

최 종
연구보고서

나노무기담체 technology를 이용한 기능성
소재 개발

Development of Nano inorganic carrier with
functional ingredient for improved quality

연구기관 : 이화여자대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “나노무기담체 technology를 이용한 기능성 소재 개발”에 관한 연구 과제(세부 과제 “미량영양소/나노무기담체의 열안정성 특성 규명”, “미량영양소 담지를 위한 나노기술(nanotechnology) 개발”과 “미량영양소(리놀레인산) 함유 식품 분석방법 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 이화여자대학교

총괄연구책임자 : 오 상 석

세부연구책임자 : 오 상 석

협동연구기관명 : 이화여자대학교 /

(주)나노하이브리드

협동연구책임자 : 최 진 호 / 강 문 식

요 약 문

I. 제 목

나노무기담체 technology를 이용한 기능성 소재 개발에 관한 연구

II. 연구 개발의 목적 및 필요성

최근 웰빙(well-being)과 식생활에 대한 관심의 증가로 기능성 식품에 대한 관심이 높아지고 있다. 또한 정보통신, 컴퓨터, 생명과학, 의료환경 등 미래 성장산업분야에서는 나노기술(nanotechnology) 관련 연구개발이 활발하게 진행되고 있다. 이에 식품산업분야에 나노기술(nanotechnology)을 적용한 기능성 소재의 개발은 세계적인 추세라고 할 수 있다.

이에 본 연구는 GRAS 무기물질 전달체 technology를 이용하여 기능성 소재의 안정성을 증진하는 것을 목적으로 하고 있다. 본 연구를 통해 확립될 것으로 기대되는 미량영양소와 향의 보관을 위한 최적의 나노무기담체 합성 방법은 향후 다양한 식품에 적용할 수 있을 것으로 기대되며, 확립시킨 GRAS 무기물질 전달체 technology의 방법은 다양한 미량영양소를 분석하는데 사용 가능할 것이다. 또한, 나노기술(nanotechnology)을 이용하여 다양한 기능성 나노 푸드 및 기능성 건강소재를 개발하여 식품의 기능성을 향상시킬 수 있을 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 나노기술(nanotechnology)을 이용하여 미량영양소와 향의 담지 조건을 확립하고 미량영양소 나노무기담체의 온도, 시간에 따른 함량변화와 안정성 특성을 분석하였다. 향 나노무기담체의 온도, 시간에 따른 향 방출 특성을 분석하였다. 이를 이용하여 기능성 소재 개발을 위한 기초 실험 및 기술을 개발하였다. 또한 나노무기담체를 이용한 기능성 소재의 특성을 X-선 회절분석(x-ray diffraction) 및 가스 크로마토그래피(gas chromatography : GC), 고성능액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography : HPLC) 등 다양한 분석기기를 이용하여 관찰하였다. 이를 향후 식품에 적용하기 위하여 미량영

양소 및 향 나노무기담체 혼성체를 식품과 혼합하여 가열조건에 따른 함량변화와 안정성 특성을 측정하였다. 이를 위하여 식품/혼성체 혼합물에서의 미량영양소 및 향 분석법을 확립하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 나노기술(nanotechnology)을 이용하여 미량영양소와 향의 담지조건을 확립하고 미량영양소 및 향 나노무기담체의 가스 크로마토그래피, 고성능액체 크로마토그래피를 이용하여 온도, 시간에 따른 함량변화와 안정성 특성을 측정하였다. 또한 기능성 소재의 특성화를 위하여 시차열분석 및 분자분광법, 크로마토그래피 분리법 등의 분석방법을 이용하여 특성을 분석하였다. 그 후 개발된 기능성 소재를 가열조건에 적용하여 가열조건 후 함량분석을 시행한 결과 나노테크놀로지를 이용한 기능성 소재가 이를 이용하지 않은 원래의 물질 보다 안정성이 크게 향상되는 것을 확인하였다. 또한 확립된 식품/혼성체 혼합물에서의 미량영양소 및 향 분석방법은 다양한 식품 중의 미량영양소 및 향 분석에 이용이 가능하다.

본 연구결과를 토대로 EPA, DHA 등 다양한 미량영양소 및 향 후보군을 발굴하여 다양한 기능성 소재를 개발이 필요할 것으로 생각된다. 또한, 개발된 기능성 소재를 실제 식품에 적용하기 위해서는 동물실험을 통한 생체 흡수율 평가 등 안정성평가가 행해져야 할 것이다. 개발된 기능성 소재를 다양한 식품에 적용한다면 기능성 성분 및 저장성을 향상하여 경쟁력 있는 식품이 개발될 수 있으며 한과 등 전통식품에 적용할 경우 전통식품의 재해석으로 부가가치를 창출하고, 이로부터 기능성 한과의 생산이 가능하여 국내에서 뿐 아니라 세계시장에서도 경쟁력 있는 식품으로 자리매김 할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 다른 식품 분야에 도입 가능한 GRAS 나노무기담체 나노기술(technology) 기반을 마련하여 부가가치를 통한 식품산업의 소득증대에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

SUMMARY

As increase of interest in food and life science, the interests of functional food are increased too. Future growth fields like information, communication, computer, bioscience, and medical environment have various research progress in nanotechnology. Food industry has to keep research of nanotechnology and it can be used to produce functional foods.

In this research, using GRAS nano inorganic carrier, development of nanotechnology makes it possible to utilize functional ingredient for improved quality of food products. Conditions of nano inorganic carrier synthesis method were established for micronutrients and flavors. Micronutrients and flavor ingredient are encapsulated in nanoparticles. Thermal stability of encapsulated ingredient was measured and confirmed at various conditions. For analysis of these nano encapsulated micronutrients and flavors, we established analysis protocols using gas chromatography (GC), high performance liquid chromatography (HPLC). Through development of analysis protocols, we can analyse ingredients in nanoparticles.

Nano encapsulated micronutrients and flavors are characterized by x-ray diffraction, UV/VIS spectroscopy, FT/IR spectroscopy and image of FE-SEM to compare with pristine materials. We used analytical techniques of HPLC, and knowledge of composition in nanoparticles, inductive coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES) and elemental CHN analysis to quantify micronutrients and flavors in nanoparticles. Results of thermogravimetric analysis-differential thermal analysis (TG-DTA) gave us information of thermal stability of nano encapsulated micronutrients and flavors in comparison to that of pristine materials.

We can expect more diverse functional ingredients using nanotechnology can be applied for the development of functionality added food.

CONTENTS

Document for submission	1
Abridgement	2
SUMMARY	4
CONTENTS(English)	5
CONTENTS(Korean)	8
Chapter 1. Introduction	11
Section 1. Object for research and development	11
Section 2. Need for research and development	11
가. Technical aspect	11
나. Economic and industrial aspect	14
다. Social and cultural aspect	16
Chapter 2. Present view of technology in domestic and foreign countries	17
Section 1. Present view of technology in korea	17
Section 2. Present view of technology in foreign countries	18
Chapter 3. Contents and results of research	21
Section 1. Results of research I : Synthesis of nano inorganic carriers for storage micronutrients and flavors	23
1. Investigation on nano inorganic carriers synthesis and conditions of synthesis	23
2. Synthesis of micronutrients in nano inorganic carriers and establishment of synthetic conditions	28
가. Materials	28
나. Methods	29
다. Results	29
3. Synthesis of flavors nano inorganic carriers and establishment of synthetic conditions	33
가. Materials	33
나. Methods	34

다. Results	36
Section 2. Results of research II: Stability analysis of encapsulated micronutrients and flavors in nano inorganic carriers	42
1. Thermal stability of nano encapsulated micro nutrients	42
가. Materials	42
나. Methods	43
다. Results	44
2. Thermal stability of nano encapsulated flavors	49
가. Materials	49
나. Methods	49
다. Results	50
Section 3. Results of research III: Characterization of encapsulated micronutrients and flavors in nano inorganic carriers	53
1. Characterization of encapsulated micronutrients in nano inorganic carriers	53
가. Materials	54
나. Methods	55
다. Results	56
2. Characterization of encapsulated flavors in nano inorganic carriers	62
가. Materials	62
나. Methods	63
다. Results	63
3. Investigation on condition of synthesis for stablization in diverse pH and solutions	73
가. Materials	73
나. Methods	73
다. Results	74
Section 4. Results of research IV: The stability analysis of encapsulated micronutrients and flavors in nano inorganic carriers II	80
1. Establishment of analysis protocols after heating conditions	80
2. Stability of nano encapsulated micronutrients after heating conditions	

.....	82
가. Materials	82
나. Methods	83
다. Results	85
3. Stability of nano encapsulated flavors after heating conditions	88
가. Materials	87
나. Methods	88
다. Results	89
Chapter 4. Achievement and contribution	91
Section 1. Achievement	91
Section 2. Contribution	92
Chapter 5. Application and utility	93
Chapter 6. Oversea information	94
Chapter 7. References	96

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	4
CONTENTS	5
목 차	8
제 1 장 연구개발 과제의 개요	11
제 1 절 연구개발의 목적	11
제 2 절 연구개발의 필요성	11
가. 기술적 측면	11
나. 경제·산업적 측면	14
다. 사회·문화적 측면	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황	17
제 1 절 국내 관련 기술의 현황 및 개발수준	17
제 2 절 외국 관련 기술의 현황 및 개발수준	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	21
제 1 절 연구결과 I: 미량영양소 및 향의 보관을 위한 나노무기담체 합성	23
제 1항. 나노무기담체 합성 및 기능성 분자의 담지방법 연구	23
제 2항. 미량영양소의 나노무기담체 담지 및 조건 확립	26
가. 실험재료	28
나. 실험방법	29
다. 실험결과	29
제 3항. 향의 나노무기담체 담지 및 조건 확립	33
가. 실험재료	33
나. 실험방법	34
다. 실험결과	36
제 2 절 연구결과 II: 나노무기담체에 캡슐화 된 미량영양소 및 향 물질의 열안정성 분석 I	42
제 1항. 나노무기담체에 캡슐화 된 미량영양소의 온도시간에 따른 열안정성 분석	42

가. 실험재료	42
나. 실험방법	43
다. 실험결과	44
제 2항. 나노무기담체에 캡슐화 된 향 물질의 온도·시간에 따른 열안정성 분석	49
가. 실험재료	49
나. 실험방법	49
다. 실험결과	50
제 3 절 연구결과 III: 미량영양소 및 향 나노무기담체의 특성	53
제 1항. 미량영양소 나노무기담체의 특성	53
가. 실험재료	54
나. 실험방법	55
다. 실험결과	56
제 2항. 향 나노무기담체의 특성	62
가. 실험재료	62
나. 실험방법	63
다. 실험결과	63
제 3항 다양한 pH 및 용매 조건에서 안정화하기 위한 반응법 및 후처리 방법 연구	73
가. 실험재료	73
나. 실험방법	73
다. 실험결과	74
제 4 절 연구결과 IV: 나노무기담체에 캡슐화 된 미량영양소 및 향 물질의 열안정성 분석II	80
제 1항. 가열조건 후 나노무기담체의 분석 protocol 확립	80
제 2항. 나노무기담체에 캡슐화 된 미량영양소의 가열조건에 따른 열안정성 분석	82
가. 실험재료	82
나. 실험방법	83
다. 실험결과	85
제 3항. 나노무기담체에 캡슐화 된 향 물질의 가열조건에 따른 열안정성 분석	87
가. 실험재료	87

나. 실험방법	88
다. 실험결과	89
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	91
제 1 절 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도	91
제 2 절 관련분야의 기술 발전에의 기여도	92
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	93
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 국내외 과학 기술 정보	94
제 7 장 참고 문헌	96

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

- ◆ 본 연구는 GRAS 나노무기담체 나노기술(technology)을 이용하여 기능성 소재의 안정성을 증진하는 것을 목적으로 한다. 미량영양소와 향의 보관을 위한 최적의 나노무기담체 합성 방법을 확립하고, 나노무기담체에 캡슐화된 미량영양소 및 향 물질의 열 안정성 및 가열조건 중의 안정성 특성을 규명하기 위하여 온도와 저장기간에 대한 안정성을 분석한다. 나노기술(nanotechnology)을 이용하여 개발된 미량영양소 및 향이 함유된 나노무기담체 기능성 소재는 X-선 회절분석, UV/vis spectroscopy, FT-IR spectroscopy, FE-SEM 등의 분석기기를 사용하여 특성을 분석한다.
- ◆ 또한 미량영양소 및 향 담지를 최적화 하기위한 무기입자 담지조건을 확립하고 미량영양소 및 향 물질의 안정성 및 가열조건 중의 안정성 특성을 규명하기 위하여 온도와 저장기간에 대한 안정성을 분석하고 식품에의 적용을 위하여 가열조건 중의 안정성을 확인한다. 나노무기담체 기능성 소재의 분석을 위하여 가스 크로마토그래피(gas chromatography : GC) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography : HPLC) 등의 분석기기를 사용하여 미량영양소 및 향이 함유된 나노무기담체 혼성체의 분석법을 확립한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

제 1항. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- ◆ 1990년대 이후 경제적 발전으로 식품가공 산업과 식품기기산업에 많은 투자가 일어나 식품의 생산 또한 산업화되었다. 또한 국민들의 건강과 장수에 대한 관심이 높아져 건강식품이 각광받기 시작하였다. 그러나 현재까지 시판 중인 건강식품의 종류가 다양하지 못하다. 따라서 높아지고 있는 소비자

의 기대와 요구를 만족시키지 못하고 있다.

- ◆ 나노기술(nanotechnology)은 세계 각국이 미래의 성장 발전을 위한 핵심기술로서 선진국들은 나노기술(nanotechnology)을 접목시킨 새로운 신기술의 확보에 총력을 기울이고 있으며, 특히 well-being과 관련된 바이오 기술과의 접목도 활발히 시도하고 있다. 또한 nano 소재를 기능성 화장품 제형기술과 접목시켜 화학적, 생물학적으로 불안정한 피부 생리활성물질을 분자수준에서 안정화하여 선택적으로 피부에 흡수시킴으로써 피부 치료 및 미용효과를 극대화하는 기능을 갖게 할 수 있다.
- ◆ 나노기술(nanotechnology)이라 하면 크게 나노 소재기술과 나노 장치기술로 나눌 수 있으며, 나노 소재기술은 취급되는 소재의 크기가 나노미터(nanometer) 단위에서 이루어지는 핵심기술이고, 나노 장치기술은 장치 내에서 특정부분에 나노미터(nanometer) 단위의 구조를 형성하여 그 기능을 발휘하도록 하는 핵심기술이다. 식품에 추가적인 기능을 부가하기 위해서는 원료의 문제를 극복하고자 나노 무기입자를 이용한 나노 소재기술을 이용할 수 있을 것이다. 이를 통해 기존의 방법으로는 기능성 원료의 안정성(stability)과 기능성(functionality)의 유지가 곤란하였던 향(flavor), 맛(taste), 미량 영양소(nutrients)의 향상이 가능할 것이다. 이들 각각의 기능성은 서로 다른 조건이 요구된다. 향의 경우에는 지속적인 향의 배출 즉, controlled release를 제공할 수 있는 전달체가 필요하고, 미량영양소의 경우에는 섭취될 때까지 영양소의 보존이 요구되며 맛의 경우 맛을 내는 성분을 파괴로부터 보호해주는 보존제로서의 기능을 제공할 수 있을 것이다.
- ◆ 무기나노전달체가 갖는 특징 즉, 생체친화적 성질과 화학적 안정성(inert)은 식품으로서의 안전성(safety)을 보장할 수 있는 필요조건이며 일반적인 유기물질에 비해 화학적으로 안정하고 기계적인 강도를 가지게 된다. 따라서 식품에 부과될 기능성 물질의 안정성 유지에 적합하고 더 나아가서 무기나노전달체와 기능성 물질간의 흡착인력으로 인해 방출조절도 용이하게 이루어질 수 있는 장점을 가지고 있다(그림 1). 즉, 불안정한 활성물질을 나노무기입자의 미세공간에 분자단위로 담지하여 외부의 반응인자로부터 보호함으로써 안정화하고, 활성물질과 나노무기입자의 결합력에 의해 방출이 조절되도록 할 수 있다.

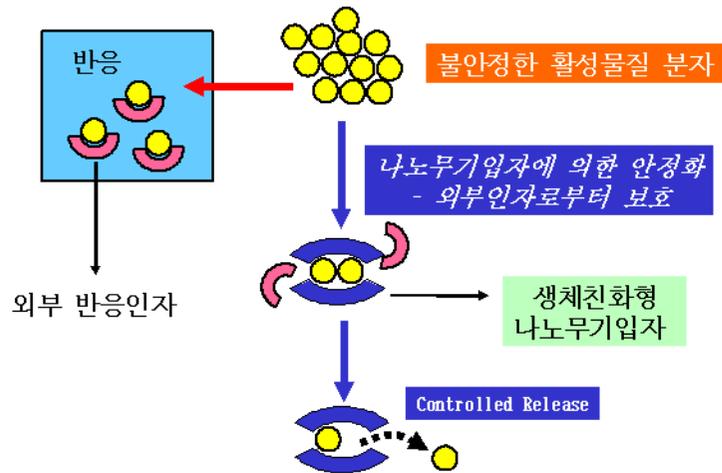


그림 1. 나노무기입자에 의해 안정화된 물질의 방출 조절 기작.

- ◆ 본 연구진에 의해 선행된 연구에서 생체물질 중 가장 불안정하다고 알려진 비타민C를 나노무기전달체를 이용하여 안정화시켜(그림 2, 한국특허등록번호 10-0439299) 세계 최초로 수분산형태의 기능성화장품을 2006년에 출시(이화여자대학교 나노과학부, 최진호)하였다. 이는 기존의 유기체를 이용한 안정화방법이 이룩하지 못한 안정성을(그림 2에서 V제품(프랑스 L사)의 안정성 비교) 달성함으로써 그 우수성을 보여주었다.
- ◆ CLA(conjugated linoleic acid)는 linoleic acid의 positional isomer와 geometric isomer를 나타내는 용어로 연구에 따르면 체지방축적 감소, 항암 작용, 아테롬성 동맥경화증 감소, 면역기능강화 등의 효과를 갖고 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 산소나 낮은 pH상태에서 분해가 촉진되어 활성이 파괴된다. 그러나 나노기술(nanotechnology)을 이용하여 CLA를 캡슐화 시킨 후 식품에 첨가한다면 안정성(stability)을 갖춘 기능성 식품의 생산이 가능할 것이다.

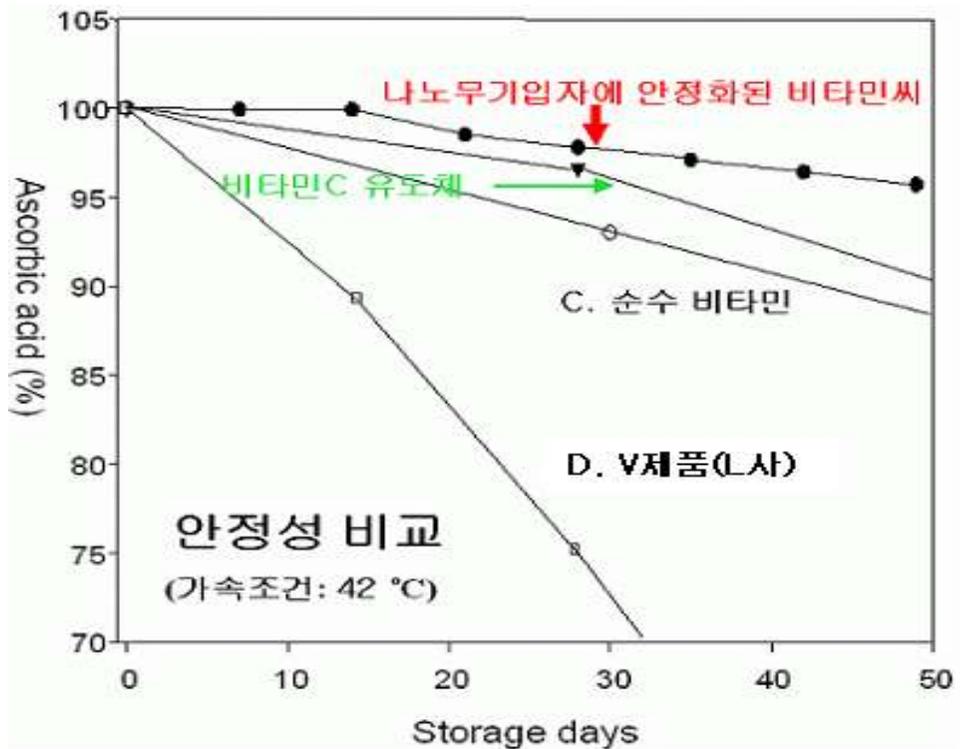


그림 2. 저장기간에 따른 나노무기입자를 이용한 비타민C의 안정성 비교.

- 식품에 다양한 기능성 소재를 접목하고, 보다 넓은 시야를 추구하여 해외 시장 공략을 도모하기 위해서는 나노기술(nanotechnology)을 이용하여 다양한 기능성 식품을 제조하여 식품에 새로운 기능을 부여한 제품의 개발에 대한 연구가 필요하다. 즉, 재료 중 단일성분의 특징점을 최대한 이용하여 기능성을 향상시킨다면 기능성 식품의 경쟁력을 높이는 계기가 될 수 있을 것이며, 궁극적으로 식품 분야 전반에 적용될 수 있을 것이다.

나. 경제·산업적 측면

- 국민소득의 향상과 소비패턴의 변화로 생활 전반에 걸쳐 특히 식생활이 향상되어 다양한 식품에 대한 관심이 증가되었다. 그 중 건강을 유지하기 위해 건강기능성 식품류가 각광받기 시작하여 건강기능식품의 소비는 점차 증가하고 있는 추세이다.

- ◆ 나노기술(nanotechnology)은 이러한 웰빙을 위한 필연적인 기술이라 할 수 있으며 가까운 미래에는 각종 질병과 기아, 환경오염 등으로부터 올 수 있는 모든 문제점과 생명연장의 꿈을 동시에 실현할 수 있는 핵심기술이 될 것이다.
- ◆ 최근에 나노기술(nanotechnology)은 전 세계적으로 상용화가 급진전되고 있으며 특히 나노무기담체 내에 약물을 캡슐화 하여 선택적으로 암세포만을 제거하거나 손톱만한 칩 하나에 화학공장 하나를 지을 수 있는 소설 속의 이야기가 막연한 꿈이 아니라 현실로 다가오고 있다. 이미 의약품이나 화장품, 생활용품 분야에서 나노기술(nanotechnology)은 더 이상 꿈의 기술이 아니며 이는 식품분야에도 예외가 아닐 것이다.
- ◆ 미국, 일본, 유럽 등에서 식품산업에 나노기술(nanotechnology) 활용이 급진전되면서 기존의 기능성 식품이 나노식품으로 변하는 과도기에 있다. 그러나 국내 식품산업의 나노기술(nanotechnology)의 이용이 미비하여 선진국 나노기술(nanotechnology)에 종속될 위기감도 있다.
- ◆ 세계 전체로 각국 정부의 나노기술(nanotechnology) 연구개발 예산은 매년 급증해 2004년 약 35억 달러(이중 미국, EU, 일본 등 3 개국의 예산이 약 30억 달러)에 달하는 것으로 추정되며 기업들의 투자규모도 이와 비슷한 수준으로 알려져 있다.
- ◆ 하지만 막대한 연구개발 자원의 투입에도 불구하고 나노기술(nanotechnology)의 상업화는 전체적으로 저조한 수준에 머물러 왔다. 하지만 최근 들어 일본을 중심으로 나노기술(nanotechnology)의 상업화가 크게 진전되는 모습을 보이고 있다. 특히 주목할 점은 정보, 전자, 보건, 의료 등 나노기술(nanotechnology)의 연구개발이 가장 활성화 된 것으로 평가되는 첨단 분야보다도 전통산업 분야를 중심으로 사업화가 활발하게 추진되고 있다는 사실이다.
- ◆ 나노기술(nanotechnology)을 이용하여 개발된 기능성 식품소재가 다양한 식품 등에 접목된다면 식품산업이 크게 성장할 수 있는 기회가 될 것이며, 이와 같은 방법이 한과류 등 전통식품에 적용된다면 국내에서 뿐 아니라 세계 시장에서도 경쟁력 있는 식품으로 자리매김 하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

다. 사회·문화적 측면

- ◆ 경제가 발전하고 생활수준이 향상되자 건강에 대한 관심이 증가되었고, 만성질환에 대한 예방적 개념이 도입되고 치료형 약품에서 예방형 식품으로의 관심이 증대하면서 전 세계적으로 헬스케어 형태의 건강기능성 식품이 선호되어 보완 또는 대체요법으로 불리는 기능성 식품소재의 요구가 급속도로 증가하고 있다.
- ◆ 우리나라 사람들은 건강식품에 대한 선호가 뚜렷하다. 다양한 기능성 소재가 나노기술(nanotechnology)을 이용하여 다양한 제품으로 개발되기 위해서는 개발 제품의 품질 특성에 대한 연구가 선행되어야 할 것이다.
- ◆ 앞으로 개발된 다양한 기능성 소재가 식품에 적용되고 특히 한과 등의 전통 식품에 적용된다면 우리 전통식품의 기능성 향상에 도움이 될 것이며 문화 교류로 국가 간의 장벽을 허물어 가고 있는 현재의 상황에서 김치의 국제화가 우리들에게 화두가 되듯이 전통한과의 국제화를 통한 우리 음식 문화의 전파는 경제적 가치 창출뿐 아니라 우리 문화의 주체성을 동시에 가져다 줄 것이며 우리들 자신에게도 고유 식생활문화의 가치에 대한 재인식의 계기가 될 수 있을 것이다.

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

나노기술(nanotechnology)은 분자 또는 원자 단위의 수준(1~100nm)에서 물질을 제어하여 유용한 재료, 소자 및 시스템을 창출하고, 나노크기에서의 새로운 특성이나 현상을 탐구하는 기술을 의미한다. 나노 사이즈의 스케일에서는 물질의 새로운 물리적, 화학적, 생물학적 성질을 나타낸다. 이러한 나노기술(nanotechnology)은 의약품 및 화장품 등의 분야에 응용되고 있으며 앞으로 식품 산업분야에 있어서 나노와 식품기술이 접목되어 높은 부가가치를 창출할 사업으로 기대를 모으고 있다.

제 1 절 국내 관련 기술의 현황 및 개발수준

- ◆ 건강에 대한 관심 증대로 영양소와 기능성을 함유하고 있는 식품들을 첨가한 기능성 식품개발에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 음료 및 유제품에 비타민, 아미노산, 칼슘, 셀레늄 등의 영양소나 클로렐라 등의 기능성을 첨가하여 식품 자체의 기능성을 향상시킨 제품과 상황버섯, 영지버섯, 느타리버섯, 동충화초균을 쌀에 배양시켜 버섯을 함유한 기능성 쌀이 시판 중에 있다.
- ◆ 철분, 불포화 지방산, vitamin, 향료 등을 미세캡슐화(micro encapsulation)하여 식품의 기능성을 향상시키고자 한 연구가 수행되고 있고, 유산균을 위산에 의한 파괴로부터 보호하기 위해 캡슐화한 유제품이 국내에서 시판 중이다. 캡슐화는 미립자 상태의 유용물질을 외부환경으로부터 보호하기 위해 막을 이용하여 캡슐을 만들고 따라서 자외선 차단 및 산화방지 그리고 보관성과 안정성을 향상시킨 것으로서 이는 독성 및 자극성이 강한 물질의 취급을 용이하게 하기 때문에 식품산업에 폭넓은 응용이 예상되고 있다.
- ◆ 전달 시스템으로서 LDH(layered double hydroxide)의 연구가 수행되었다. 이는 금속염의 침전을 이용한 나노구조물로 이온교환 반응을 통해 여러 유용물질들을 층 사이로 삽입하는 연구이다. 원하는 물질을 금속염과 함께 침전시킴으로서 그 물질을 층 내로 삽입할 수 있다. 금속 층은 내부에 삽입된 기능성 물질을 보호하며, 특히 전달하는 물질의 전하를 중성화시킴으로서 세포 내로의 내포작용을 촉진시킨다.

- ◆ 의약품 분야에서 아직까지 국내외의 연구기술은 항체를 이용한 방법의 접근이 이루어지는 정도이지만 항암제를 나노무기입자에 담지시키는 기술은 국외저널에 발표되었으며(Jin-Ho Choy *et al*, 2000, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 39, issue 22, p 4041-4045), 국제특허(US patent)를 획득하였다.
- ◆ 또한, 나노무기담체에 약물을 넣어 선택적으로 암세포만 제거하는 표적지형적 약물전달방식에 의해, 약물이나 항체를 병이 발생한 신체의 특정부위에만 선택적으로 도달시켜 치료의 효과성을 제고하여 수술 없이 병을 치료하는 기술이 각광받고 있다. 또한, 진단학과 치료학의 혁명을 가능케 하는 빠르고 효과적인 염기서열 분석 및 원격진료, 생체이식소자를 이용한 효과적이고 저렴한 보건치료가 연구되고 있다.
- ◆ 화장품 분야에서 최근에 국내에서 생체물질 중에서 가장 불안정한 것의 하나로 알려진 비타민C를 나노무기소재로 안정화시켜 기능성화장품 허가를 식약청으로부터 획득하였다. 이는 국외의 화장품회사들이 비타민C를 이용한 기능성화장품을 성공하지 못한 상황에서 나노기술(nanotechnology)로 이룬 것이어서 향후 나노기술(nanotechnology)이 화장품에 가져올 변화를 예측해 보게 하는 상황이다.
- ◆ 포장분야에서의 나노기술(nanotechnology)은 주로 포장재에 활용된다. 활용 방법으로는 첫째, 분자 간의 층간차단 작용으로 공기투과를 막는 작용을 하게 된다. 둘째, 활성성분의 함유로서 기능성 높은 포장재를 만드는 것이다. 저가이면서 기능성이 떨어지는 플라스틱 재질을 이용하여 기능성을 높임으로서 보다 개선된 포장재 생산이 가능하다.
- ◆ 나노에 대한 다양한 연구들이 진행 중이나, 식품 분야에서 나노기술(nanotechnology)을 이용한 제품에 대한 연구 및 개품 개발은 아직 미약한 실정이다.

제 2 절 외국 관련기술의 현황 및 개발 수준

- ◆ 기능성 식품이 질병에 미치는 영향, dietary fiber, 불포화지방산, flavor 등 영양소와 기능성을 함유하고 있는 식품들을 첨가한 기능성 식품개발에 대한

연구가 활발하게 이루어지고 있다.

- ◆ 체중감량을 위한 저지방, 저탄수화물, 고단백 제품과 분리대두단백 함유 식품, 칼슘함유제품, 식품에 flavor, dietary fiber를 첨가하여 기능성을 향상시킨 제품 등이 시판되고 있다.
- ◆ CLA(conjugated linoleic acid)의 체지방축적 감소, 항암작용(특히 유방암), 아테롬성 동맥경화증 감소, 면역기능강화, insulin sensitivity등의 효과 등에 대한 연구가 수행되었다. 또한 CLA의 환경적 영향(산소, pH)에 따른 파괴를 막기 위해 encapsulation한 연구가 수행되었다.
- ◆ 의약분야에서 나노기술(nanotechnology)의 활용은 항암제에 주로 활용되고 있는데 이는 항암제 자체가 정상세포와 암세포를 구분하지 못하여 암세포의 사멸만이 아닌 정상세포의 파괴도 유발하기 때문에 나노입자를 이용한 항암제를 생체 내에서 암 조직에의 targeting을 그 주된 목적으로 삼고 있다. 이를 위해서 암세포에 발현하는 항원에 결합할 수 있는 항체를 목표지향제로 사용하여 항체를 항암제가 포함된 나노무기입자에 결합시켜 항암제를 특정 암세포에 작용하도록 하는 방법이다.
- ◆ 의약품 분야에서의 나노기술(nanotechnology)의 응용은 주로 주사제로 개발되어 활용상 극복해야 할 점들이 많아 개발진도가 지연되는 면이 많지만 화장품분야에서 나노기술(nanotechnology)의 응용은 상당히 활발한 편이다. 가장 활용이 활발한 분야는 자외선 차단제 화장품에의 응용인데 이는 무기소재가 유기소재에 비해 자외선 흡수능이 월등하기 때문이다. 그럼에도 불구하고 무기소재의 사용이 제한되었던 것은 무기소재의 크기가 커서 피부에도포되었을 경우 백탁 현상을 가져와 사용자들의 불편함을 초래하여 유기물에 비해 크게 활용되지 못하였다. 이러한 무기소재의 문제를 극복한 것이 나노기술(nanotechnology)인데 무기소재를 나노단위로 크기를 제어하면 백색 분말에서투명하게 변하게 되어 소비자들의 불만요소를 제거하게 되어 그 활용분야의 획기적인 확장이 이루어지고 있다.
- ◆ 식품분야에서 나노소재가 식품의 원료로서 사용되는 상품이나 상품화 계획을 가지고 있다는 예는 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 다만 공정상에서 나노기술(nanotechnology)을 이용한 제품(nano food로 명명되고 있음)으로 oil fresh 1000(Oilfresh Cooperation, California - www.oilfresh.com)과 같이

튀김과정에서 기름의 산패를 방지하는 세라믹제품(나노기술(nanotechnology)로 만들어짐)이 알려져 있다.

- ◆ 최근 기술 선진국들은 미래 웰빙 산업시대를 겨냥한 고부가가치 기능성 나노식품 개발에 집중하고 있으며 소재크기의 극소화를 통해 기능성(function) 및 안정성(stability) 그리고 안전성(safety) 고도화와 가격 경쟁력 향상은 물론 에너지와 자원의 경제적 활용을 추구하고 있다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구개발의 1, 2차년도 목표와 내용 및 범위는 다음과 같다.

표 1. 연구개발의 1, 2차년도 목표와 내용 및 범위

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도 (2006)	- 향 담지를 위한 나노무기담체의 합성	- 향 담지 조건 확립 - 향 방출 특성 측정 (온도, 습도, 시간에 따른 변화)	기초실험 및 기술개발
	- 미량영양소를 위한 나노무기담체의 합성	- 미량영양소 담지 조건 확립 - 안정성 특성 측정 (온도, 습도, 시간에 따른 함량 변화)	
	- 향 및 미량영양소의 특성 규명	- 함량 측정 (온도, 습도, 시간에 따른 변화)	
2차년도 (2007)	- 미량영양소/나노무기담체미량영양소 혼성체의 가열조건 중의 안정성 특성 규명	- 가열조건과 유사한 온도·pH 및 용매 조건에서 나노무기담체/미량영양소 혼성체 내의 미량영양소 안정성 특성 규명	기초실험 및 기술개발
	- 미량영양소의 안정성을 확보를 위한 나노무기담체의 최적화 및 담지조건 확립	- 미량영양소의 열안정성 확보를 위한 최적의 담체-영양소 간의 화학결합 유도 - 담지 된 미량 원소를 다양한 pH·용매 등의 조건에서 안정화시키기 위하여 코팅 및 표면개질 등의 후처리 조건 최적화	
	- 식품과 혼합 후 나노무기담체의 분석 protocol 확립	- 식품 내 존재하는 미량영양소/나노무기담체 혼성체의 추출방법 확립 - 미량영양소 물질의 검출 및 분석방법 확립 - 식품/혼성체 혼합물에서의 미량영양소 분석 protocol 확립	

제 3 장에는 위 목표에 대한 실험 결과를 수록하였다.

- ◆ 제 1절에는 미량영양소 및 향을 보관을 위한 나노무기담체 합성방법 연구 결과와 미량영양소인 CLA(conjugated linoleic acid), GLA(gamma linoleic acid)와 향 성분인 vanillic acid(VA), vanillin(V) 각각의 담지방법 및 결과를 기록하였다.
- ◆ 제 2 절에는 나노무기담체에 담지 된 미량영양소 및 향 물질의 시간과 온도에 따른 열안정성 분석 결과를 기록하였다.
- ◆ 제 3 절에는 각각의 물질 특성을 다양한 분석기기를 이용하여 분석 결과를 기록하였다.
- ◆ 제 4 절에는 개발한 기능성 소재가 식품에 적용되었을 때도 안정성을 유지하는가 알아보기 위하여 가열조건에 적용하여 열안정성을 평가한 결과를 기록하였다.

제 1절 연구결과 I: 미량영양소 및 향의 보관을 위한 나노무기담체 합성

제 1항 나노무기담체 합성 및 기능성 분자의 담지방법 연구

미량영양소(CLA, GLA)와 향(vanillic acid, vanillin)은 다음과 같은 방법으로 나노 담체 내에 담지될 수 있다.

1) 공침 방법



그림 3. 공침 방법을 이용한 지방산-나노입자 혼성체 합성.

이 방법(그림 3)에서는 지방산 용액과 나노입자 전구체가 동시에 침전되어 혼성체를 이루었다. 산화아연과 염산을 혼합하여 아연 전구체 용액을 준비하고 지방산을 에탄올에 녹여 지방산 용액을 준비한다. 준비된 두 가지 용액은 교반 하에 혼합되고, 수산화나트륨 용액을 적가하여 pH를 약 6.7에 맞춘다.

pH 변화에 따라 산화아연과 지방산은 동시에 백색 침전물을 형성하게 되며, 이러한 공침 과정 속에서 산화아연 (혹은 산화아연 수화물) 나노입자의 동공 사이 사이에 지방산이 이온 결합 및 분자간인력에 의한 결합력으로 안정화되어 존재하게 된다.

2) 이온 교환법

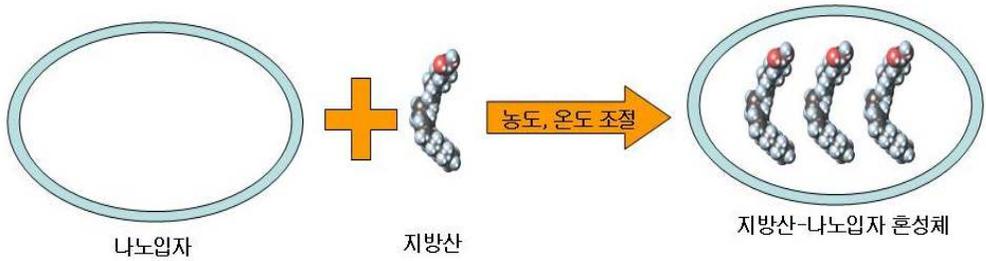


그림 4. 이온 교환법을 이용한 지방산-나노입자 혼성체 합성.

이 방법(그림 4)에서는 미리 산화아연으로부터 동공을 갖는 나노입자를 제조한다. 우선 산화아연 전구체를 수산화나트륨 용액으로 적정하여 pH를 7정도에 맞추어 나노입자만을 제조한다. 그리고, 여기에 지방산/에탄올 용액을 첨가하여 지방산이 나노입자의 동공 내로 담지되도록 한다. 이 반응에서는 온도, 농도 등의 반응 조건이 적절히 조절되어 지방산 분자가 동공 내로 충분히 담지되도록 유도한다.

3) 자기조립법

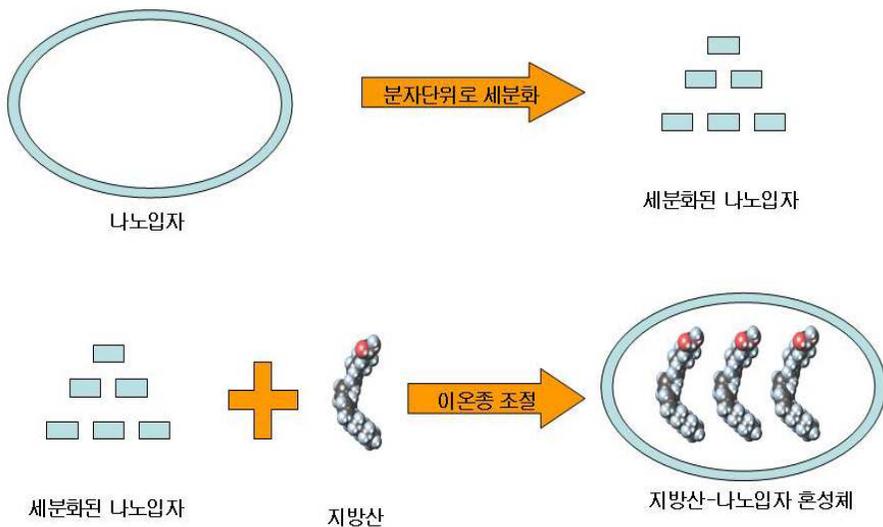


그림 5. 자기조립법을 이용한 지방산-나노입자 혼성체 합성.

자기조립법(그림 5)에서는 우선 미리 준비된 나노입자를 분자 단위로 세분화한다. 분자단위로 세분화된 나노입자는 약 1nm 정도의 매우 얇은 두께를 갖는 판상의 나노입자로 존재하게 된다. 세분화 반응 시에는 나노입자를 적절한 용매에 분산시킨 후 고온에서 환류반응 시키거나, 초음파 등의 물리적 에너지를 가해서 나노입자가 작은 단위체로 떨어져 나오게 한다.

이렇게 작은 단위체로 세분화된 나노입자는 용매에 분산할 경우 침전물을 이루지 않고 콜로이드 상태로 안정화되어 있다. 이 콜로이드 용액을 지방산/에탄올 용액과 혼합하여 반응시키고, 용액 내에 존재하는 이온종의 조건을 여러 가지로 조절할 경우 나노입자 단위체와 지방산이 분자단위로 자기조립하여 지방산-나노입자 혼성체를 이루게 된다.

4) 재조합법

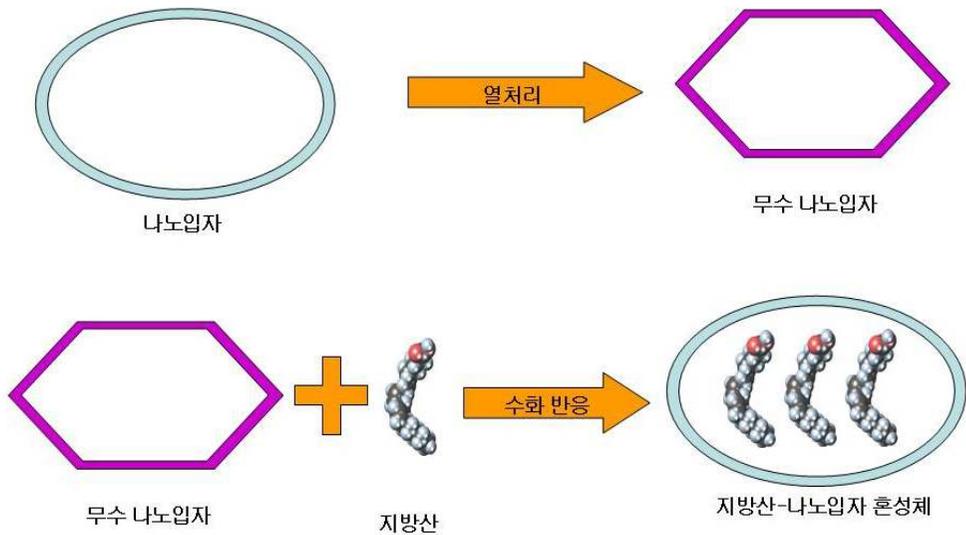


그림 6. 재조합법을 이용한 지방산-나노입자 혼성체 합성.

재조합법(그림 6)으로 지방산-나노입자 혼성체를 만들 경우에도 역시 나노입자를 미리 제조한다. 미리 제조된 나노입자는 열처리를 통하여 반응성이 높은 무수 산화 아연 나노입자가 될 수 있다. 이 때 열처리는 약 400℃ 정도의 온도에서 4시간 정도 진행함으로써 산화아연 수화물의 물 분자를 제거할 수 있다.

이렇게 준비된 무수 나노입자를 역시 지방산/에탄올 용액과 혼합하되, 물을 반응물로서 stoichiometric하게 첨가하게 되면, 다시 수화되면서 나노입자는 동공을 갖게 되고 그 동공 내에 지방산 분자들이 위치하게 된다.

지방산 뿐 아니라, 향 물질인 vanillic acid (VA) 또한 이론적으로 상기와 같은 방법으로 제조되었다. 이론적으로 가능한 다양한 합성법을 이용하여, 온도, 농도, 이온종의 종류 등 합성 조건을 변경시킨 결과, 지방산의 경우는 공침 반응을 통하여 산화아연 전구체와 지방산이 한 번에 침전되는 방법이 가장 효율적임을 알 수 있었으며, VA의 경우에는 공침 방법과 이온 교환 방법 모두 효율적인 담지 방법으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

제 2항 미량영양소의 나노무기담체 담지 및 조건 확립

CLA(conjugated linoleic acid, 그림 7)는 c9,c11-, c9,t11-, t9,c11-, t9,t11-CLA 및, c10,c12-, c10,t12, t10,c12 t10,t12-CLA 등 8개의 linoleic acid의 위치적 (positional), 기하학적(geometric) 이성질체(isomer)를 나타내는 용어로 c9,t11-CLA 이성체와 t10,c12-CLA 이성체가 각각 48% 정도이고 나머지는 미량으로 함유되어 있다. 식품 중에는 우유 및 유제품 등의 각종 낙농제품과 반추동물에서 유래한 육류에 함유되어 있다.

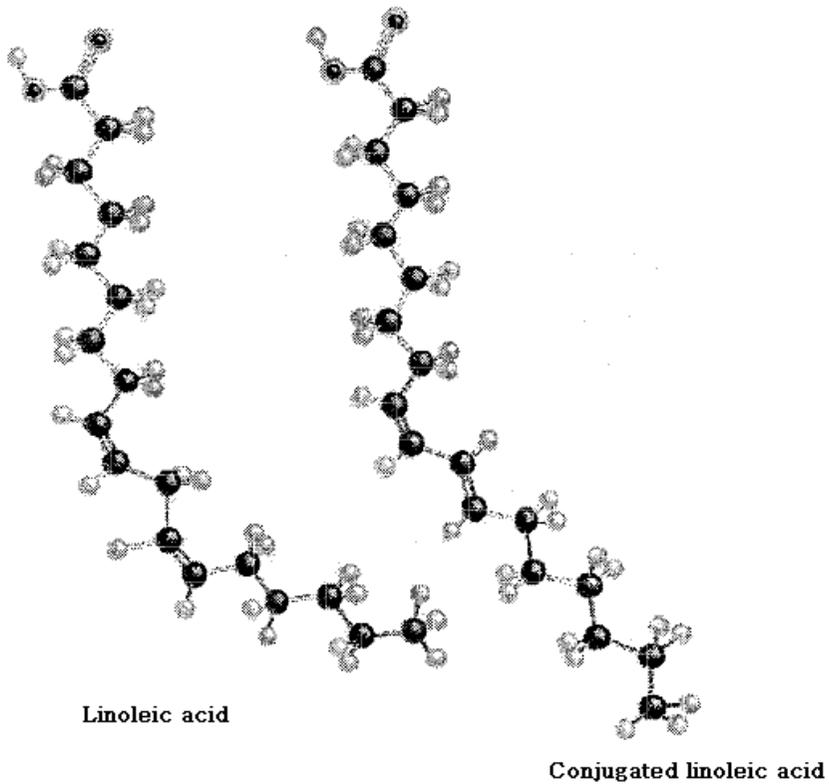


그림 7. Linoleic acid와 Conjugated linoleic acid 의 구조.

CLA는 연구에 따르면 체지방축적 감소, 항암작용, 아테롬성 동맥경화증 감소, 면역기능강화, 항산화 작용, 항균작용 등의 효과를 갖고 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 최근 연구에 따르면 트랜스 지방산(trans fatty acid)의 섭취에 따른 부작용을 다소 감소시키는 것으로 보고되었다. 그러나 산소나 낮은 pH상태에서 분해가 촉진되어 활성이 파괴된다. 또한 유제품 CLA의 첨가에 대한 연구에서 좋지 않은 관능적 특성을 발생하는 것으로 나타났다. 따라서 나노기술(nanotechnology)을 이용하여 CLA를 캡슐화 하여 좋지 않은 관능적 특성을 제거하는 것이 요구된다.

Gamma linolenic acid(GLA)는 18개의 탄소에 3개의 cis-형의 이중결합을 가지고 있으며, 첫 번째 이중결합이 ω 탄소로부터 6번째 자리에 위치한 ω -6 불포화 지방산이다. GLA는 prostaglandin, prostacyclin, tromboxan의 합성을 위한 필수적인 영양소로 인간을 포함한 모든 포유류의 간에서 α -linoleic acid로부터 생성되지만 생체 내에서 GLA 합성을 위한 δ 6 desaturase가 제한적이기 때문에 식품

의 섭취가 필요한 조건적 필수영양소이다. GLA는 Boraginaceae, Grossulariaceae(black currants포함 종), Onagraceae(evening primrose포함 종) 종 등 다양한 식물의 종자유에 존재하는 것으로 알려져 있으며, GLA의 대사생성물인 dihomo gamma linolenic acid(DGLA)는 만성염증과 혈관확장 억제, 신체 지방함량 감소와 간에서의 지방산 β -oxidation 촉진, 혈압 저하, 동맥경화와 관련한 근육세포에 경화반(plaque)발달 억제 등 신체에 유익한 기능을 수행하는 것으로 보고되고 있다.

가. 실험재료

1) 시약 및 실험재료

나노무기담체에 담지되는 미량영양소로 CLA(conjugated linoleic acid 80%, Lipoqen, Seoul, Korea)와 GLA(gamma linolenic acid 60%, Lipoqen, Seoul, Korea)를 사용하였다. 공침방법을 통한 나노캡슐화를 위해서 zinc oxide (Dae-Jung, Seoul, Korea), 염산(hydrochloric acid, Dae-Jung, Seoul, Korea), 에탄올(ethanol, Dae-Jung, Seoul, Korea), 수산화나트륨(sodium hydroxide, Dae-Jung, Seoul, Korea), 헵탄(heptane, Junsei, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

2) 실험기기

슬러리의 감압 여과를 위하여 filter paper(Adventec 185mm, Cincinnati, USA)를 부착한 aspirator(Neuberger laboport, Trenton, USA)를 사용하였다. 슬러리로부터 CLA 또는 GLA를 얻어내기 위하여 spray dryer(SD-100 model, EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하였고, 그 후 수분 제거를 위한 진공건조에는 vacuum oven (CTB-10 model, JEIO tech, Seoul, Korea)을 사용하였다.

합성한 CLA 또는 GLA가 함유된 나노무기담체의 확인을 위한 X-선 회절분석에는 D/MAX RINT 2200-Ultima+diffractometer(Rigaku, Tokyo, Japan)가 사용되었다.

나. 실험방법

1) 미량영양소의 나노무기담체 담지

5M의 zinc oxide를 3.25N 염산 4L에 녹여 용액상태로 만들었다. 2M의 CLA 또는 GLA를 에탄올 800ml에 넣고 잘 녹였다. 4구 플라스크에 이 둘을 넣고 20분간 교반한 후 3M 수산화나트륨 용액을 이용하여 pH 6.7로 적정하였다. Ice bath에서 12시간 동안 격렬한 교반을 통하여 반응시켰고 감압 여과하여 생성된 침전물을 수거하였다. 그 후 슬러리(Slurry : 불용성의 고체 미립자를 서스펜션 상태로 함유한 유동성을 지닌 고체와 액체의 혼합물) 반응량과 동량의 에탄올을 넣어 분산시킨 후 감압 여과하는 것을 3회 반복하여 반응하지 않고 남아있는 여분의 CLA 또는 GLA와 아연, 나트륨 등의 이온을 제거하였다. 마지막으로 슬러리를 동량의 에탄올에 분산시키고 이것을 분무건조(spray-dry)하여 고체 분말을 얻었으며, CLA 또는 GLA가 캡슐화 된 분말 시료는 2일 간 진공건조로 여분의 수분을 제거하였다.

2) 미량영양소의 나노무기담체 담지의 확인

위와 같은 방법으로 합성한 CLA 및 GLA가 함유된 나노무기담체는 X-선 회절분석법과 CHN analysis 를 통하여 확인하였다. X-선 회절기법에는 40kV와 30mA에서 Cu-K α X-선 (파장=1.5418 Å)을 이용하여 구조분석을 시행하였다. CLA 또는 GLA가 나노무기담체 내에 캡슐화 되었다는 사실을 확인하기 위하여 CLA 또는 GLA가 포함되지 않은 수화산화아연 나노무기담체만의 X-선 회절 패턴도 측정하여 비교하였다. X-선 회절 분석 결과 2 θ 값으로부터 Bragg 식을 이용하여 캡슐 내의 동공 크기를 계산하였다.

다. 실험결과

1) 미량영양소의 나노무기담체 담지 확인

본 실험에서 합성된 CLA 또는 GLA를 함유된 나노무기담체는 X-선 회절 분석을 이용하여 캡슐화 여부를 확인하였다.

CLA가 포함된 나노무기담체의 X-선 회절 패턴은 나노무기담체만의 X-선 회절 패턴과 비교한 결과는 그림 8에 나타내었다.

지방산이 포함되지 않은 수화산화아연 나노무기담체만의 X-선 회절 패턴 중 (001) 에 해당하는 peak는 2 $\theta \approx 9.1^\circ$ 에서 나타나고 있는데, 이는 나노무기담체

의 동공 크기를 반영한다. Bragg 식에 의하여 $2\theta \approx 9.1^\circ$ 에 해당하는 동공 크기를 계산하면 다음과 같다.

$$\lambda = 2d \times \sin\theta \quad (\lambda: X\text{-선 파장}, \theta: \text{여입사각}, d: \text{회절이 일어난 원자 사이의 거리})$$

$$d = \lambda / 2\sin\theta = 1.5418 \text{ \AA} / (2 \times \sin 4.55^\circ) = 9.7 \text{ \AA}$$

따라서, 나노무기담체만의 동공 크기는 약 9.7 \AA (0.97nm)로 측정되었으며, CLA를 함유하는 캡슐의 (001) peak는 $2\theta \approx 2.8^\circ$ 에서 관찰되었으며, 마찬가지로 Bragg 식에 의해 동공 크기는 32.01 \AA (3.20 nm)로 계산되었다. 캡슐 내 동공 크기의 변화는 CLA와 같이 부피가 큰 음이온종이 동공 내로 삽입됨에 따라 삽입된 분자에 의하여 동공이 확장되는 현상이다. 수산화화아연의 동공 겹질 두께인 6.0 \AA (0.60 nm)을 감안하면 순수한 동공의 크기는 26.01 \AA 이 되며, 이는 CLA의 분자 길이 (반 테르 발스 반경을 고려하여 $\sim 25.7 \text{ \AA}$)를 고려할 때 동공 내에 CLA의 사슬이 수직인 상태로 지그재그 형태로 조밀하게 쌓여 있음을 의미한다 (그림 9).

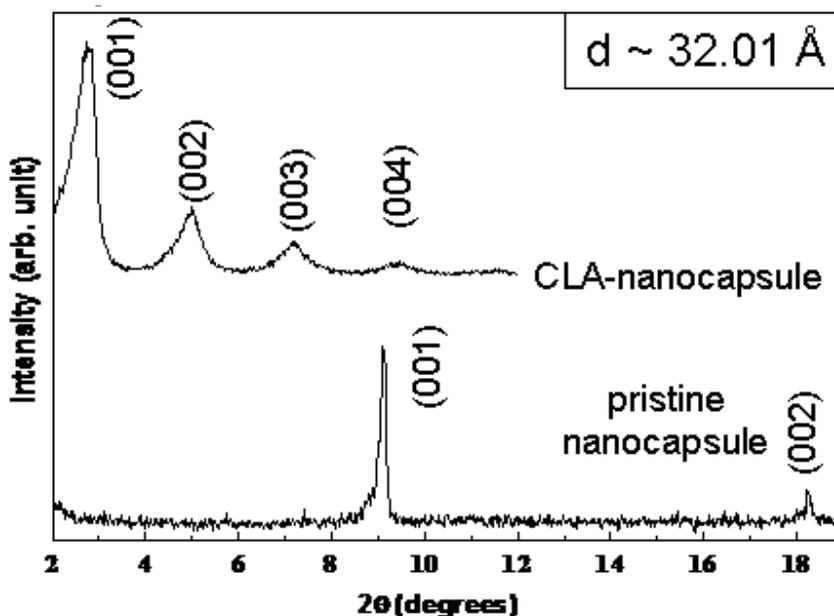


그림 8. CLA가 함유된 나노무기담체(위)와 나노무기담체(아래)만의 X-선 회절패턴 (d값은 CLA가 함유된 나노무기담체의 d-spacing을 나타냄).

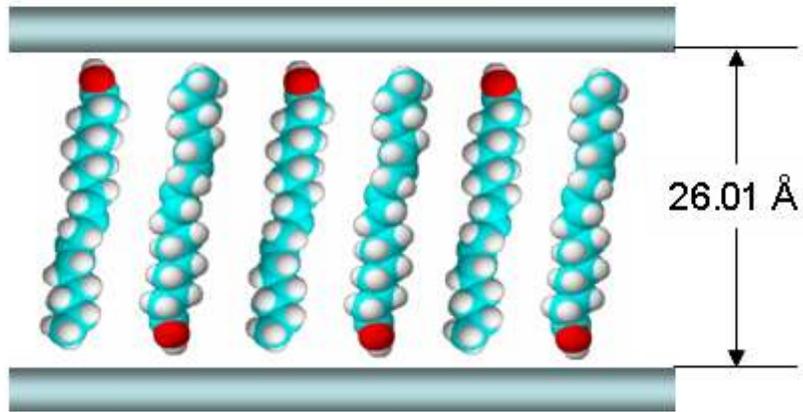


그림 9. CLA가 함유된 나노무기담체의 대칭 구조.

GLA가 포함된 나노무기담체의 X-선 회절 패턴은 나노무기담체만의 X-선 회절 패턴과 비교하여 그림 10에 나타내었다. GLA의 경우도 이와 마찬가지로 해석될 수 있다. GLA의 분자 사슬 길이는 반 데르 발스 반경을 고려할 경우 약 25.9 Å이며, X-선 회절 분석으로부터 측정된 GLA가 함유된 나노무기담체의 동공 크기는 약 21.04 Å이었으며, 동공 꺾질 두께를 고려한 순수 동공의 크기는 약 15.04 Å으로 계산되었다. 따라서 그림 11의 모델 그림에서 보는 바와 마찬가지로 약 54.5° 정도 기울어진 상태로 조밀하게 쌓여 있음을 예측할 수 있다 ($\cos 54.5^\circ = 15.04 \text{ \AA} / 21.04 \text{ \AA}$)

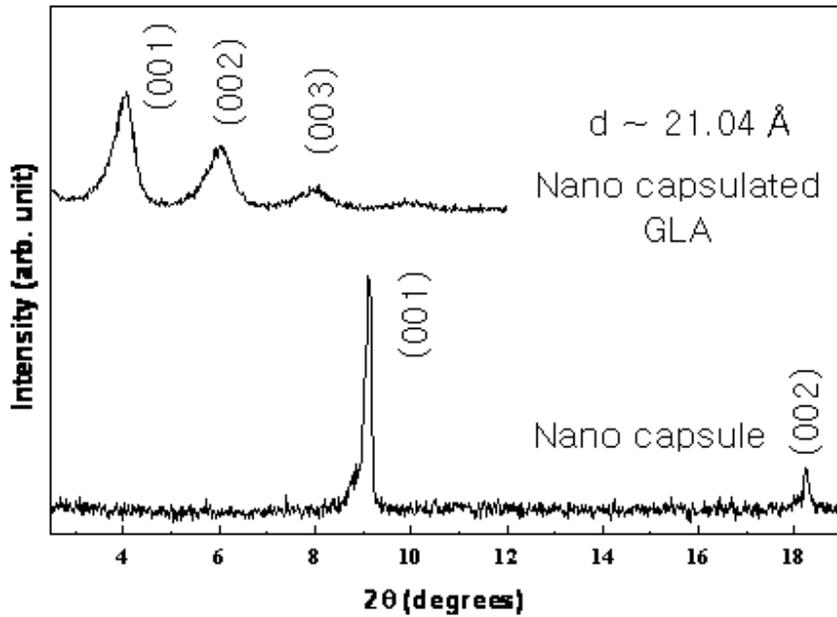


그림 10. GLA가 함유된 나노무기담체(위)와 나노무기담체(아래)만의 X-선 회절패턴 (d값은 GLA가 포함된 나노무기담체의 d-spacing을 나타냄).

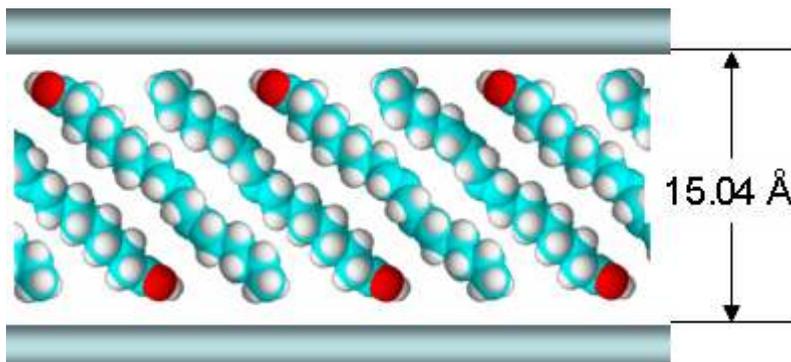


그림 11. GLA가 함유된 나노무기담체의 대칭 구조.

제 3항 향의 나노무기담체 담지 및 조건 확립

Vanillic acid(바닐산, VA)는 중성분자인 vanillin이 산화된 형태로 phenolic compounds의 한 종류이다. Vanillin은 vanilla planifolia라는 식물로부터 얻어지는 초기물질이며, 전 세계적으로 매우 인기 있는 향 물질중 하나이다. 얻어진 vanillin을 oxidation시킴으로서 vanillic acid를 얻는다. Vanillic acid 및 vanillin은 식품뿐 만 아니라, 화장품, 음료, 의약 등에도 빈번히 사용되는 flavoring agents이다.

Vanillic acid 및 vanillin(그림 12)은 바닐라 향을 내는 물질이나 그러한 향을 보관하는 면에서 저장 능력이 현저하게 감소되기 때문에 향을 담지하는 조건을 확립하는 것이 필요하다. 나노기술(nanotechnology)을 적용시켜 향을 캡슐화 시키면 향을 보관·담지 시키는데 매우 효율적이다.

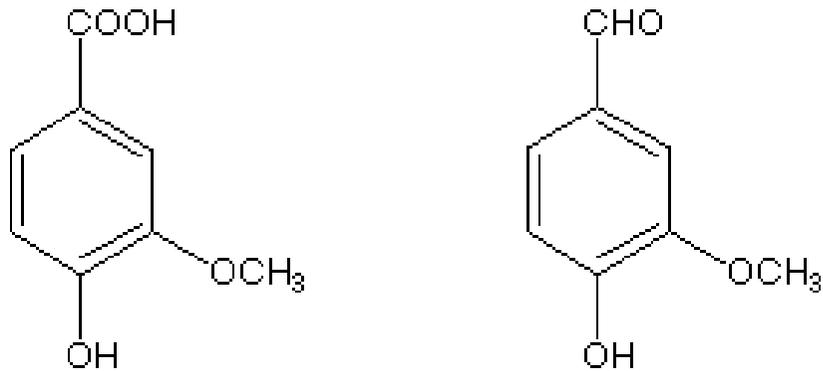


그림 12. Vanillic acid (VA) and Vanillin (V)의 구조.

가. 실험재료

1) 시약 및 실험재료

나노무기담체 담지를 위한 vanillic acid는 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid

(97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하였다. 나노 캡슐화를 위한 공침 방법에 zinc nitrate hexahydrate($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), aluminum nitrate annehhydrate($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)와 sodium hydroxide(NaOH, Dae-Jung, Seoul, Korea)가 사용되었다.

2) 실험기기

합성되지 않은 여러 불순물을 제거하기 위하여 원심분리기(Mega 17R model, Hanil science, Seoul, Korea)를 사용하였고, 불순물 제거 후 얻어진 sample의 수분을 제거하기 위해서 동결건조기(FD8508, Ilshin, Seoul, Korea)를 사용하였다.

합성한 Vanillic acid 및 vanillin가 함유된 나노무기담체의 확인하기 위한 X-선 회절분석에는 D/MAX RINT 2200-Ultima+diffractometer(Rigaku, Tokyo, Japan)가 사용되었다. 원소분석을 위해 Inductive coupled plasma-atomic emission spectroscopy(ICP-AES, JP/ICPS-7500, Shimadzu, Columbia, USA)와 CHNS(CHNS-932, LECO Corp, Michigan, USA)를 사용하였다. Vanillic acid 및 Vanillin의 정량분석을 위해서 Agilent 1100 series 모델의 HPLC(Agilent Technologies, Santa Clara, USA)를 사용하였다.

나. 실험방법

1-1) Vanillic acid(VA)의 나노무기담체 담지

Zinc nitrate와 aluminium nitrate를 2:1의 몰 비율로 carbonate가 제거된 decarbonated water 50ml에 녹여 용액상태로 만들었다. Vanillic acid는 위의 제시된 aluminium nitrate의 몰 비에 1.5배가 되도록 하여 50ml decarbonated water에 분산시켰다. 또한, 0.5M의 수산화나트륨을 decarbonated water에 녹여 준비하였다. 3구 플라스크에 vanillic acid 분산 용액을 넣은 후, 0.5M의 수산화나트륨 용액으로 물에 분산되어있는 vanillic acid를 녹였다. 다 녹인 후, 미리 준비해놓은 zinc, aluminium nitrate 용액을 위의 3구 플라스크에 붓고, 0.5M의 수산화나트륨 용액을 이용하여 pH 8.0까지 적정하였다. 빛을 차단시킨 상태에서 24시간 동안 격렬한 교반을 통하여 반응시켰다. 얻어진 하얀색의 용액을 원심분리기를 이용하여 침전시킨 후 상층액을 제거하는 작업을 4회 반복하여 반응하지 않고 남아있는 여분의 VA와 아연, 나트륨 등의 이온이 포함된 불순물을 제거하였다. 마지막으로 VA가 캡슐화 된 나노무기담체 침전물을 액체질소로 얼린 후 동결건조시켜 여분의 수분을 제거하였다.

Zinc nitrate와 aluminium nitrate의 몰 비율을 3:1, 4:1로 다르게 하여 위와 같은 방법으로 VA를 합성하였다.

1-2) Vanillin(V)의 나노무기담체 담지

위의 합성한 VA가 담지 된 나노무기담체를 3구 플라스크에 넣고, 순도 95% 에탄올에 분산시켰다. 이는, 질소 환경 하에서 진행하였다. 미리 weighing 해 놓은 V를 동일한 95% 에탄올에 녹인 후, VA가 담지 된 나노무기담체가 담긴 3구 플라스크에 부어 24시간 동안 격렬한 교반을 통하여 반응시켜 V를 VA가 담지 된 나노무기담체 내에 흡착시켰다. V에 의해 옅은 노란빛의 용액이 얻어졌으며, 이 용액을 원심분리기를 이용하여 침전시킨 후 상층액을 제거하는 작업을 4회 반복하여 흡착되지 않고 남아있는 여분의 V와 기타 불순물을 제거하였다. Washing 작업이 모두 끝난 후 얻어진 침전물을 액체질소로 얼린 후 동결건조시켜 여분의 수분을 제거하였다.

2-1) Vanillic acid(VA)의 나노무기담체 담지의 확인

위의 방법으로 합성한 VA가 담지 된 나노무기담체는 X-선 회절분석법과 원소 분석을 통하여 캡슐화를 확인하였다. X-선 회절기법에는 40kV와 30mA에서 Cu-K α X-선 (파장=1.5406 Å)을 이용하여 구조분석을 시행하였다. VA가 나노무기담체 내에 캡슐화 되었다는 사실을 확인하기 위하여 VA가 포함되지 않은 Zn-Al-NO₃ 나노무기담체만의 X-선 회절 패턴도 측정하여 함께 비교하였다. X-선 회절 분석 결과 VA가 담지 된 나노무기담체의 관찰된 피크의 2 θ 값으로부터 Bragg 식을 이용하여 캡슐 내의 동공 크기를 계산하였다. 또한, 원소분석을 통해 VA가 얼마나 캡슐화 되었는지 분석하였다.

2-2) Vanillin(V)의 나노무기담체 담지의 확인

VA가 담지 된 나노무기담체 내에 vanillin(V)를 흡착시킨 VA/V 나노무기담체는 X-선 회절분석법과 HPLC를 통해 정량분석 하였다. X-선 회절기법에는 위의 VA 나노무기담체 담지 확인 방법과 동일하며, VA, V 모두 포함되지 않은 나노무기담체만의 X-선 회절 패턴과 VA만 담지 된 나노무기담체의 X-선 회절 패턴도 함께 비교하였다. HPLC 정량분석을 통해서 VA/V 나노무기담체 내에 V가 각각 얼마나 캡슐화 되어있는지 분석하였다.

다. 실험결과

1-1) Vanillic acid(VA)의 나노무기담체 담지

본 실험에서 합성된 Vanillic acid(VA)가 담지된 나노무기담체는 X-선 회절분석을 이용하여 캡슐화 여부를 확인하였다. VA가 담지된 나노무기담체의 X-선 회절 패턴은 나노무기담체만의 X-선 회절 패턴과 비교하였다(그림 13).

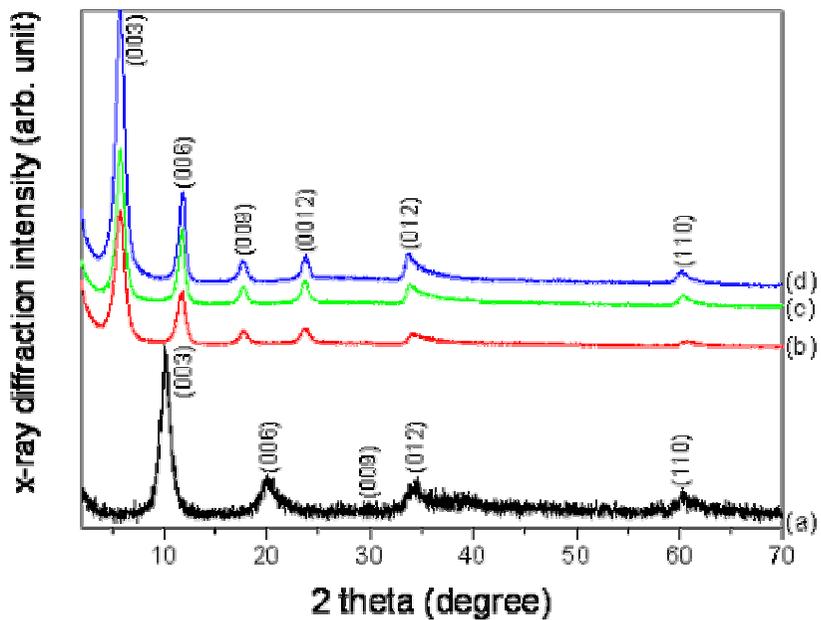


그림 13. Vanillic acid가 함유된 나노무기담체의 X-선 회절분석. (a) pristine LDH, (b) Zn₂Al-VA-LDH, (c) Zn₃Al-VA-LDH 그리고 (d) Zn₄Al-VA-LDH

VA가 담지 되어있지 않은 나노무기담체만의 X-선 회절 패턴 중 (003)에 해당하는 peak는 $2\theta \approx 10.3^\circ$ 에서 나타나고 있는데, 이는 나노무기담체의 동공 크

기를 반영한다. Bragg 식에 의하여 $2\theta \approx 10.3^\circ$ 에 해당하는 동공 크기를 계산하면 다음과 같다.

$$\lambda = 2d \times \sin\theta \quad (\lambda: X\text{-선 파장}, \theta: \text{여입사각}, d: \text{회절이 일어난 원자 사이의 거리})$$

$$d = \lambda / 2\sin\theta = 1.5406 / (2 \times \sin 5.15^\circ) = 8.8 \text{ \AA}$$

따라서, 나노무기담체만의 동공 크기는 약 4.8 \AA (0.48nm)로 측정되었으며, VA가 담지된 나노무기담체의 (001) peak는 $2\theta \approx 5.8^\circ$ 에서 관찰되었으며, 마찬가지로 Bragg 식에 의해 동공 크기는 약 15.5 \AA (1.55 nm)로 계산되었다. 캡슐 내 동공 크기의 변화는 VA와 같이 부피가 큰 음이온종이 동공 내로 삽입됨에 따라 삽입된 분자에 의하여 동공이 확장되는 현상이다. Zinc, aluminum으로 구성된 동공 꺾질 두께인 4.8 \AA (0.48 nm)을 감안하면 순수한 동공의 크기는 $\sim 10.7 \text{ \AA}$ 이 되며, 이는 VA의 분자 길이(반 테르 발스 반경 고려)를 고려할 때 동공 내에 VA의 사슬이 지그재그 형태로 서로 π - π 상호작용을 하며 캡슐화 되었음을 의미한다(그림 14).

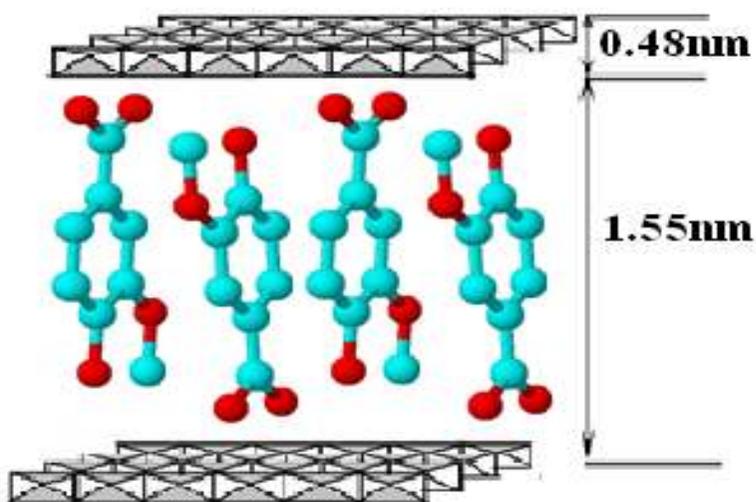


그림 14. Vanillic acid가 함유된 나노무기담체의 구조 (π - π 상호작용을 이루고 있음).

또한, VA가 담지 된 나노무기담체의 원소분석을 통하여 함량 분석을 시행하였다. 그 결과 무기담체내의 VA 함량비가 각각 40.33%, 35.09%, 38.96% 임을 확인하였다.

1-2) Vanillin(V)의 나노무기담체 담지

본 실험에서 VA가 담지 된 나노무기담체 내에 vanillin(V)을 흡착시킨 나노무기담체는 X-선 회절분석을 이용하여 캡슐화 여부를 확인하였다. V가 함유된 나노무기담체의 X-선 회절 패턴은 나노무기담체만의 X-선 회절 패턴, VA가 담지 된 나노무기담체, 나노무기담체만의 패턴을 비교하였다(그림 15, 16, 17). 그림 아래의 그래프는 (009) peak($2\theta=20^\circ$)까지 확대하여 나타낸 그래프이다.

실험결과, VA가 담지 된 나노무기담체 내에 V를 흡착시킨 후 X-선 회절분석의 (003) peak가 VA만 담지 된 나노무기담체의 (003) peak보다 미세하지만 low degree로 shift 되는 현상을 볼 수 있다. 이는, vanillin 흡착 후 캡슐 동공 내에 vanillin이 흡착됨으로 인해 구조 등의 변화가 일어났음을 의미한다. 또한, VA, V가 담지 된 나노무기담체의 정량분석을 통하여 함량 분석을 시행하였다. 그 결과 무기담체내의 V의 함량비가 각각 72.83%, 94.08%, 79.78% 임을 확인하였다.

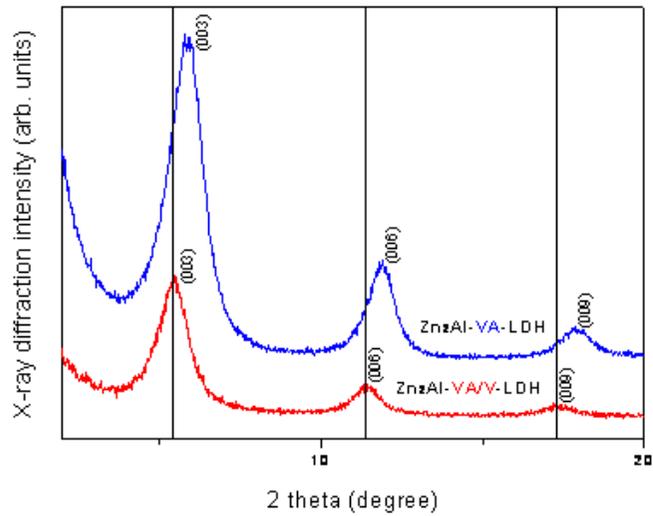
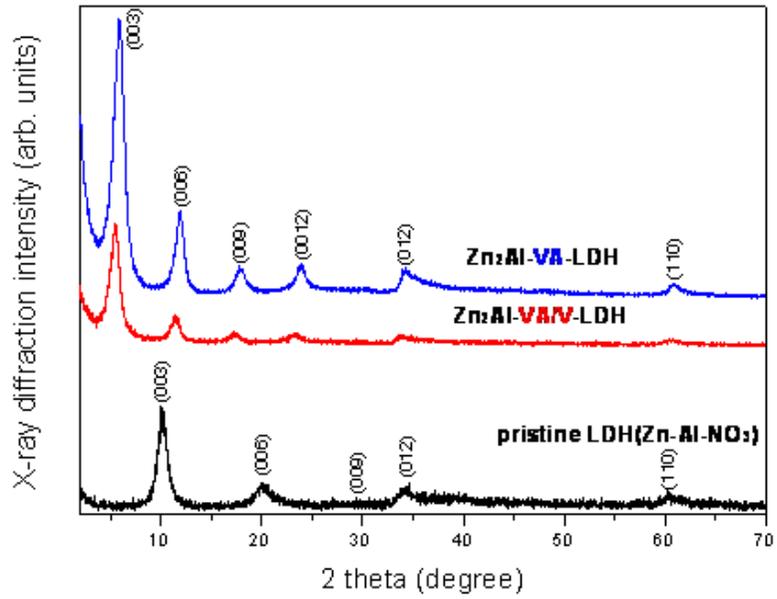


그림 15. Vanillin이 담지 된 나노무기담체의 X-ray 회절패턴 (2:1 VA/V-LDH).

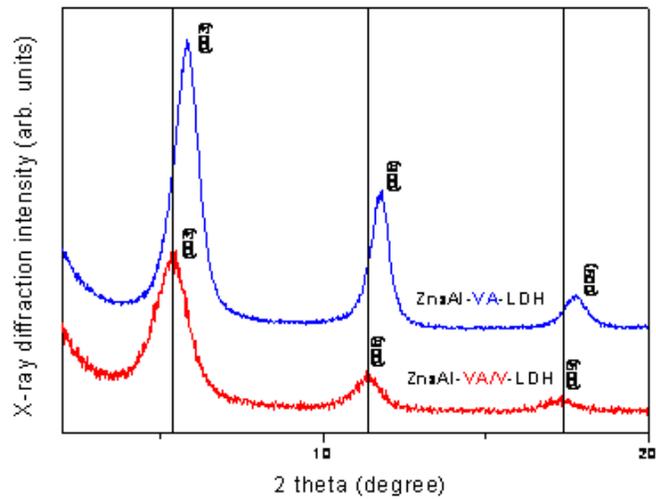
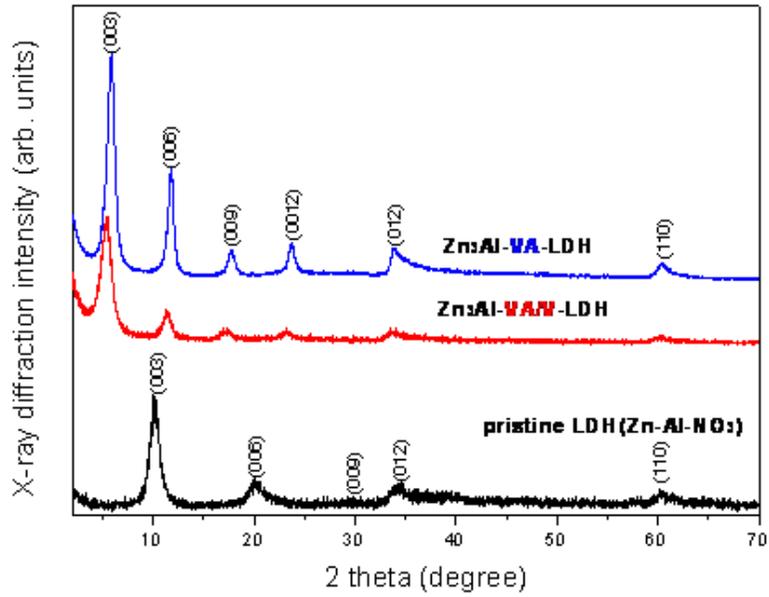


그림 16. Vanillin이 담지된 나노무기담체의 X-ray 회절패턴 (3:1 VA/V-LDH).

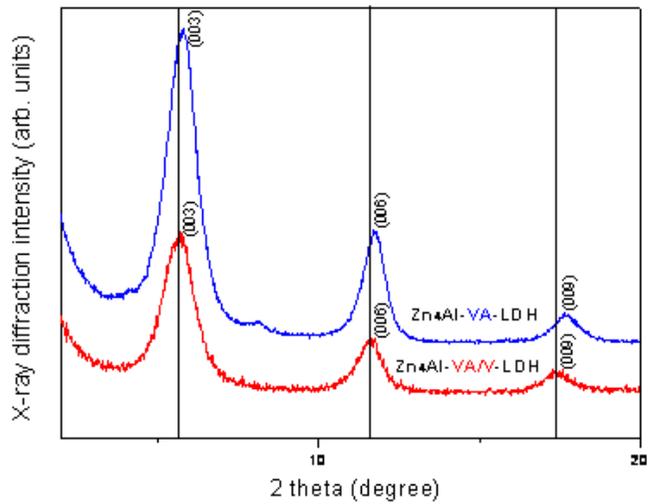
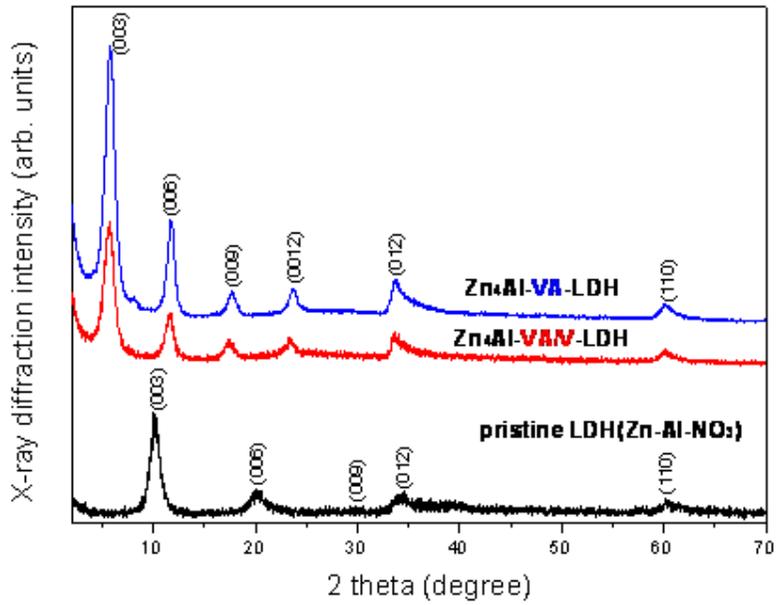


그림 17. Vanillin이 담지 된 나노무기담체의 X-ray 회절패턴 (4:1 VA/V-LDH).

제 2절 연구결과 II: 나노무기담체에 캡슐화 된 미량영양소 및 향 물질의 열안정성 분석 I

제 1항 나노무기담체에 캡슐화 된 미량영양소의 온도-시간에 따른 열안정성 분석

CLA와 GLA는 체내에서 생물학적으로 유익한 기능을 하지만 저장 중 산소를 흡수하여 자동산화(autooxidation)가 일어난다. 산화는 냄새와 맛을 변화시키고, 영양적 가치를 감소시킬 뿐 아니라 어떤 산화 생성물은 독성을 갖고 있어 유지변질의 주요원인이다. 따라서 본 연구에서는 CLA와 GLA의 산화에 대한 안정성을 향상시키기 위해 수화산화아연 나노입자로 캡슐화 하였으며, 캡슐화 된 CLA와 GLA의 온도와 시간에 따른 산화 안정성의 변화를 분석하였다.

가. 실험재료

1) 시약 및 실험재료

캡슐화 된 CLA와 GLA의 추출을 위한 시약으로 메타인산(methaphosphoric acid, Yacuri pure chemical, Kyoto, Japan), 헵탄(heptane, Juncei, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 그 후 methylation을 위하여 14% 트리플루오로보란메탄올(Boron Trifluoride (BF₃)-Methanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 헵탄(heptane, Juncei, Tokyo, Japan), 염화나트륨(sodium chloride, Wako, Tokyo, Japan), 무수황산나트륨(sodium sulphate anhydrous, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Butylhydroxytoluene(BHT, Juncei, Tokyo, Japan)을 사용하였다. GC 분석을 위해 내부표준물질인 methyl heptadecanoate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), CLA 표준물질인 conjugated linoleic acid methyl ester(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하였다.

2) 실험기기

CLA가 함유된 나노무기담체와 GLA가 함유된 나노무기담체의 온도별 보관을 위하여 20, 30, 40, 50℃ 로 맞추어진 dry oven(Sang-woo science, Bucheon, Korea)을 사용하였다. 추출된 CLA와 GLA를 methylation 하기 위해서 water bath(EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 그 후 methylation 된 CLA와 GLA는 FID 검출기와 DB-WAX 칼럼(30m × 250mm × 0.25μm)이 장착된 가스 크로마토그래피(Agilent, Santa Clara, USA)를 이용하여 분석하였다.

나. 실험방법

1) 캡슐화 된 CLA와 GLA의 시간 및 온도에 대한 안정성 실험

캡슐화 된 CLA와 GLA는 21mg(capsule 에 약 47%의 CLA 또는 GLA 함유), 대조군 실험을 위한 CLA와 GLA의 원물질은 10mg씩 담아 각각 20, 30, 40, 50°C 항온기에 저장한 후 7일 간격으로 총 7주간 실험을 진행하였다.

2) 캡슐화 된 미량영양소의 추출

합성된 나노무기담체 내에서 CLA와 GLA를 추출하기 위해 CLA와 GLA가 담겨진 나노무기담체를 0.2% 메타인산 10ml, 헵탄 3ml과 함께 20ml vial에 넣은 후 16시간 동안 암소에서 교반하여 추출하였다. 그 후 상층액인 헵탄 용액을 시험관에 옮겨 65°C로 가열하며 질소가스(N₂)로 헵탄을 제거하였다. 잔여 유지성분의 추출을 위하여 추가로 20ml vial에 헵탄 4ml을 가하여 30분간 교반한 후 1차 추출해 놓은 시험관에 옮긴 후 65°C로 가열하며 질소가스로 헵탄을 제거하여 유지를 2차 추출하였다.

3) 추출된 미량영양소의 methylation

나노무기담체에서 추출한 CLA 또는 GLA와 대조군 실험을 위한 CLA 또는 GLA 원물질은 AOAC Official Method 969.33과 식품의약품안전청이 발행한 식품공전 별책의 일반성분시험법에서 제시된 지방산의 가스크로마토그래피에 의한 정성 및 정량법 중 제1법에 따라 실험하였다(37,38). 나노무기담체 내에서 추출한 CLA, GLA와 대조군 실험을 위한 CLA, GLA는 각각 내부표준물질인 methyl heptadecanoate 5mg, 소량의 끓임쪽, 14% 트리플루오로보란메탄올 5ml와 함께 50ml 환 플라스크에 넣은 후 플라스크 위에 환류냉각기를 설치하고, 80°C 항온조로 2분간 가열하였다. 그 후 헵탄 5ml을 환류냉각기를 통해 가하고 1분간 더 가열하였다. 항온조와 환류냉각기를 제거하고 포화 염화나트륨 용액을 가하여 15초간 교반한 뒤 헵탄층이 플라스크의 목 부분까지 올라오도록 포화 염화나트륨 용액을 더 넣었다. 상층액인 헵탄 층에서 1ml을 취한 후 소량의 무수황산나트륨을 가하여 탈수시킨 것을 시험용액으로 하였다. Methylation 직후 GC 분석을 하지 않을 때는 시험용액에 0.005%의 BHT를 첨가한 후 질소 충전하여 냉동 보관하였다.

4) 가스 크로마토그래피 분석

GC 분석은 Agilent 사 (Santa Clara, USA)의 FID 검출기와 DB-WAX 칼럼 (30m × 250mm × 0.25 μ m)이 장착된 Agilent 6890N 모델을 사용하였다. 주입구와 검출기 온도는 각각 280°C, 300°C로 하였고 오븐 온도는 180°C에서 10분간 유지 후 230°C까지 25°C/min로 승온시킨 후 230°C에서 20분간 유지하였다. 이동상은 질소(N₂)를 사용하였고, 분당 유속은 1.0ml/min으로 하였다. 시험용액 중의 지방산표준용액 peak와 샘플의 peak를 비교하여 지방산을 확인하였다. 정성시험법에 의해 얻은 각 지방산 peak의 면적과 내부표준물질의 면적 및 지방산의 양을 이용하여 정량하였다. 이 정량시험법은 식품의약품안전청이 발행한 식품공전 별책의 일반성분시험법에서 제시된 지방산의 가스 크로마토그래피에 의한 정성 및 정량법 중 제1법에 따라 지방산을 정량하였다.

다. 실험결과

1) 캡슐화 된 CLA의 시간 및 온도에 대한 안정성 실험

대조군 CLA 원물질과 캡슐화 된 CLA에 대한 온도 및 시간에 따른 안정성 결과를 그림 18과 그림 19에 나타내었다. 20, 30, 40°C의 저장온도에서는 캡슐화 된 CLA와 CLA 원물질은 모두 안정성을 유지하여 49일까지 함량의 변화가 없었다 (그림 18). 그러나 50°C의 경우, 캡슐화 된 CLA는 안정성을 유지하여 49일까지 함량 변화가 없었던 반면 대조군 CLA 원물질의 경우 0일부터 7일 까지 사이에 큰 폭으로 감소하는 것으로 나타남에 따라 (그림 18, 19) 나노캡슐화가 CLA의 안정성을 향상시켰음을 알 수 있었다.

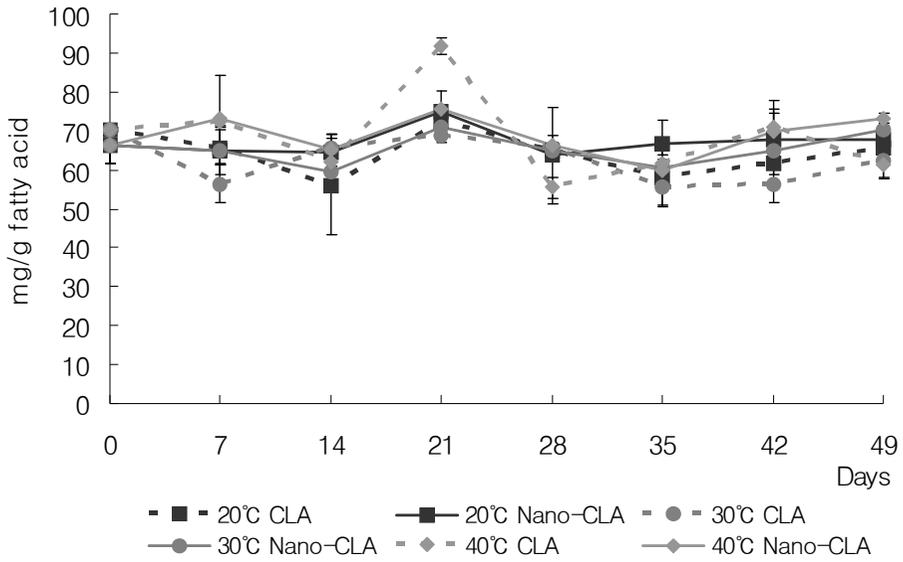


그림 18. CLA 원물질과 CLA가 함유된 나노무기담체의 20, 30, 40°C에서의 안정성 분석.

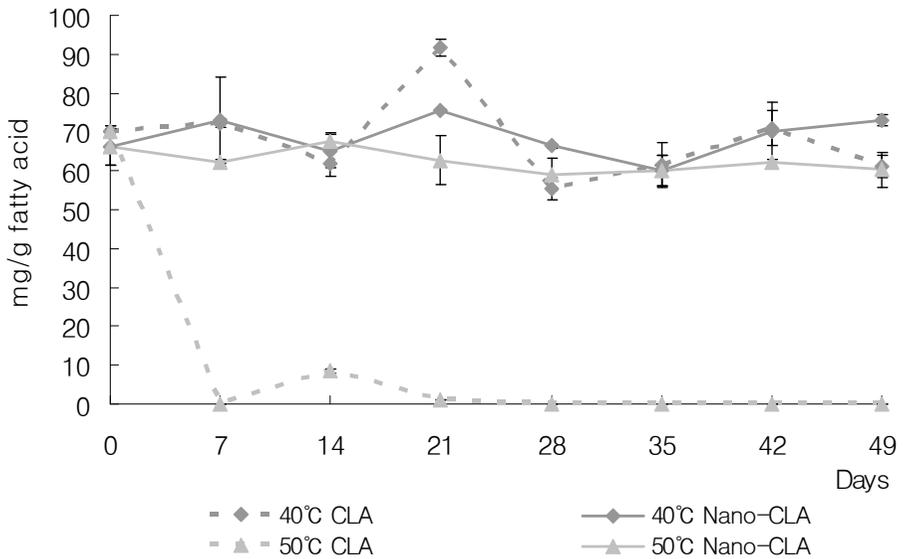


그림 19. CLA 원물질과 CLA가 함유된 나노무기담체의 40, 50°C에서의 안정성 분석.

2) 캡슐화 된 GLA의 시간 및 온도에 대한 안정성 실험

대조군 GLA 원물질과 캡슐화 된 GLA의 온도와 시간에 따른 안정성 결과를 그림 20, 그림 21에 나타내었다. 20°C에서는 캡슐화 된 GLA와 대조군 GLA 모두 안정성을 유지하여 49일까지 함량의 변화가 없었다. 그러나 30°C에서는 캡슐화 된 GLA는 안정성을 유지하여 49일까지 함량 변화가 없었으나, 대조군 GLA 원물질의 경우는 21일까지 안정한 상태를 보이다 21일부터 35일 사이에 함량이 큰 폭으로 감소되었다(그림 20). 40°C와 50°C에서는 CLA의 경우와 달리 캡슐화 된 GLA와 GLA 원물질 모두 다소 불안정한 결과를 나타내었다. 40°C에서 GLA는 7일부터 14일 사이에 함량이 큰 폭으로 감소되었고, 14일부터 35일까지는 천천히 그 함량이 감소되어 35일부터는 GLA가 남아있지 않았다. 그러나 캡슐화 된 GLA는 14일까지 안정성이 유지되다 14일부터 21일 사이에 함량이 큰 폭으로 감소된 후 21일부터 49일까지 낮은 속도로 함량이 감소되었다. 50°C에서 GLA는 0일부터 7일 사이에 함량이 큰 폭으로 감소된 후 14일부터 28일까지 낮은 속도로 함량이 감소되어 28일 이후에는 남은 양이 없었고, 캡슐화 된 GLA는 14일까지 안정성이 유지되다 14일부터 21일 사이에 함량이 큰 폭으로 감소된 후 21일부터 49일까지 낮은 속도로 함량이 감소됨을 알 수 있었다(그림 21).

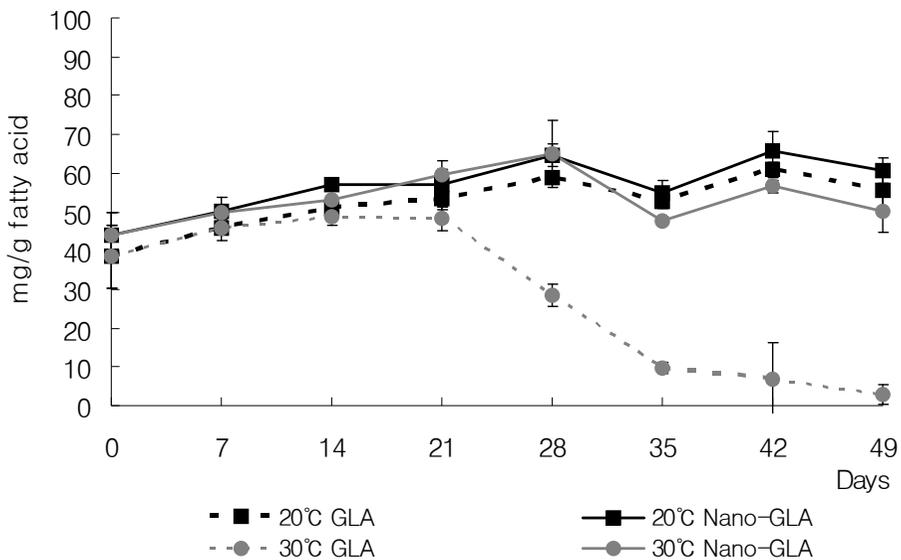


그림 20. GLA 원물질과 GLA가 함유된 나노무기담체의 20, 30°C에서의 안정성 분석.

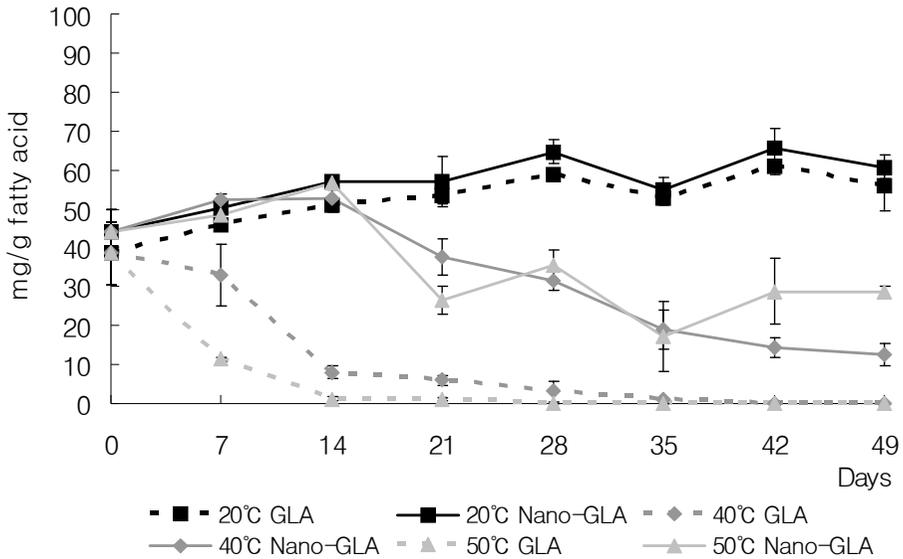


그림 21. GLA 원물질과 GLA가 함유된 나노무기담체의 20, 40, 50°C에서의 안정성 분석.

GLA와 나노캡슐화 된 GLA의 열 안정성 결과로 볼 때 캡슐화를 통해 GLA의 경우는 CLA 만큼의 효율적인 안정성 확보하진 못했지만, 같은 온도에서 비교했을 때 GLA 원물질에 비해 캡슐화 된 GLA는 더 오랜 시간 안정성을 유지하였다. 따라서 나노캡슐화가 GLA의 산화를 다소 지연시키는 데는 효과가 있었다는 것을 알 수 있었다.

3) 나노캡슐화 된 CLA와 GLA의 안정성 고찰

산화는 열에너지, 기계적 에너지, 광 에너지, 화학 에너지, 금속촉매 등의 개시제에 의해 활성화되므로 본 실험에서 사용된 온도조건은 GLA와 CLA의 산화 개시와 산화 촉진에 영향을 끼쳤을 것으로 생각되며, 더불어 CLA와 GLA의 지방산 구조 차이에 의한 산화 안정성에 차이가 있었던 것으로 생각된다. 즉, 이중결합 바로 옆의 수소를 떼어내는데 가장 적은 에너지가 소요되고 다음으로 이중 결합 옆 탄소의 수소이므로 탄소 수가 같으면서 이중결합 수가 다른 stearic acid(C18:0), oleic acid(C18:1), linoleic acid(C18:2), linolenic acid(C18:3)의 상대 산화 속도는 1 : 100 : 1200 : 2500으로 보고되고 있다. 따라서 3개의 이중결합을 가진 GLA와 나노캡슐화 된 GLA는 산화에 매우 불안정하였으며, 2개의 이중결합을 가진 CLA와 나노캡슐화 된 CLA는 비교적

산화에 안정하였던 것으로 생각된다. 나노캡슐화 된 GLA가 나노캡슐화 된 CLA에 비해 열에 대해 불안정 하였던 것 또한 GLA 자체가 CLA에 비해 열에 대한 안정성이 매우 낮았기 때문으로 사료된다.

GLA의 나노캡슐화에 의한 열안정성 효과가 CLA의 나노캡슐화에 비하여 다소 낮게 나타나는 이유 중 하나는 앞서 기술한 GLA가 담지 된 나노무기담체와 CLA가 담지 된 나노무기담체의 구조에 의하여 설명될 수도 있다. 그림 9와 11에 나타난 CLA와 GLA의 구조를 살펴 보면, CLA의 경우 지방산 사슬이 동공 내 수직으로 조밀하게 배열하여 있는 반면에 GLA의 경우 약간 기울어진 상태로 배열하여 있다. 수직으로 조밀하게 배열된 경우에는 CLA와 인접한 CLA 사이에 존재하는 약한 반데르 발스 결합이나 이중결합끼리의 상호작용으로 인하여 나타나는 상호 작용 등 지방산 분자 간의 배열에 의한 안정화 효과를 획득할 수 있다. 그러나 GLA의 배열처럼 분자가 기울어져 있는 경우 효율적인 반 데르 발스 결합을 획득할 수 없고, 이에 따라 안정화 효과가 낮아질 수 있다. 따라서 GLA의 경우 CLA에 비하여 나노캡슐화에 의한 안정화 효과가 다소 낮은 것으로 평가될 수 있다.

나노무기담체가 지방산의 산화 안정성을 향상시키는 이유는 지방산의 산화에 영향을 미치는 산소, 빛 등을 담체가 막아주기 때문으로 생각된다. 캡슐화 상태의 지방산은 직접적으로 산소와 빛의 영향을 받지 않을 뿐 아니라 나노 캡슐 물질인 수화 산화 아연과 이온 결합 또는 분자간 결합 형태로 존재하기 때문에 지방산 상태로 존재 할 때보다 더 안정한 상태를 유지하고 있을 것이라 생각된다. 또한, 앞서 언급한 바와 마찬가지로 담체 내에 분자가 배열할 때 얻어지는 반 데르 발스 결합과 같은 추가적인 안정화 에너지 또한 나노 캡슐화에 의한 안정화 효과라고 볼 수 있다.

아연의 다양한 화합물은 전자재료, 안료, 화장품 연료와 나노기술(nanotechnology)을 포함한 다양한 응용분야에서 이용되고 있지만 이를 식품과의 접목을 시도한 것은 본 연구가 선두적 역할을 한 것으로서, 이를 바탕으로 나노캡슐화 된 CLA와 GLA를 다양한 식품에 적용한다면 기능성과 안정성을 모두 갖춘 기능성 식품의 개발이 용이해질 것으로 생각된다. 그러나 나노무기담체 자체의 안전성은 여전히 많은 논란이 되고 있고, 본 연구에서 나노캡슐화에 사용된 수화 산화아연의 경우 정상적인 성장과 발달과정이 필요한 영양소이지만 과량 섭취 시에는 부작용이 존재하는 것으로 알려져 있으므로, 이를 식품에 적용하기 위해서는 산화 아연의 적절한 첨가량 설정에 대한 연구 또한 선행되어야 할 것이라고 생각된다.

제 2항 나노무기담체에 캡슐화 된 향 물질의 온도·시간에 따른 열안정성 분석

향 보관능력을 향상시키기 위해 나노무기담체 내에 vanillic acid(VA) 합성 후, 나노무기담체 내에서 향 물질이 안정하게 캡슐화 되어있는지 알아보기 위해 온도와 시간에 따른 향 물질의 안정성의 변화를 분석하였다. 20, 40, 60°C의 온도에서 4주 이상 안정성 연구 결과, VA가 나노무기담체 내에서 매우 안정함을 확인 할 수 있었다. 그리하여, 극한조건(200°C)에서도 향 물질의 안정성이 효과적인지에 대한 연구를 수행하였다.

가. 실험재료

1) 시약 및 실험재료

나노무기담체에 담지 된 vanillic acid(VA)의 추출을 위해 메타인산(Meta-phosphoric acid, Yacuri pure chemical, Kyoto, Japan)을 사용하였다. HPLC 분석을 위해 사용된 이동상은 VA의 경우 acetonitrile(J. T Baker, Phillipsburg, USA)과 물 혼합용액(15:85)을 사용하였다.

2) 실험기기

처음 온도 · 시간별 열안정성 분석 시 온도별 보관을 위하여 20, 40, 60°C 로 맞추어진 dry oven(Sang-woo science, Bucheon, Korea)을 사용하였으며, 후의 열안정성 분석 시 머플퍼니스(Ah-Jeon, Seoul, Korea)를 사용하였다. 열안정성 테스트 후 정량분석에 사용된 HPLC는 Agilent Technologies 사(Santa Clara, USA)의 Agilent 1100 series 제품을 사용하였으며, LC column은 동일회사의 C₁₈ column을 사용하였다.

나. 실험방법

1) 캡슐화 된 Vanillic acid의 열안정성 실험

Vanillic acid가 담지 된 나노무기담체(Zn₄Al-VA-LDH) 약 60mg과 대조군 실험을 위한 vanillic acid 원물질 16.82mg씩 바이알에 담아 각각 20, 40, 60°C 항온기에 저장한 후 7일 간격으로 총 7주간 실험을 진행하였다.

극한조건에서 열안정성 실험 시 미리 200°C로 세팅 해 놓은 머플퍼니스에 넣고 시간별(10min, 20min, 30min, 60min)로 추출하는 실험을 진행하였다.

2) 캡슐화 된 Vanillic acid의 추출 및 HPLC 전처리

열안정성 테스트 후 추출된 나노무기담체를 0.2% 메타인산(meta-phosphoric acid) 용액에 넣고 sonicator를 이용하여 분산시킨 후, 분산된 상태에서 HPLC 측정을 위해 농도를 묽혔다. 농도를 묽힌 샘플을 0.45 μ m 크기의 syringe filter로 필터 시킨 후 HPLC 특정 바이알에 넣었다.

3) 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography : HPLC) 분석

HPLC 기기는 UV/Mass detector가 장착된 기기를 사용하였으며(UV detector 사용), 기기를 on시킨 후 method를 저장하였다. column의 온도를 30 $^{\circ}$ C로 유지시켰으며, 이동상 유속은 분당 0.8ml을 흘려주었으며, UV의 wavelength는 260nm에서 측정하였다.

Method지정 후, column을 안정화시켰다. Vanillic acid 측정 시 이동상을 흘려주기 전 첫 번째, 필터한 증류수를 흘려준다. 압력 peak가 일정하게 지속되면 두 번째, 필터한 acetonitrile(ACN) 용액을 흘려준다. 또 다시 압력 peak가 일정하게 지속되면 마지막으로 측정할 이동상을 흘려준다. Column이 완벽하게 안정화가 되면 sample 측정을 시작하였다. 각 샘플의 측정 시간은 17분씩이었으며, vanillic acid peak의 면적으로 정량분석을 시행하였다. Vanillin의 경우, vanillic acid 측정 때와 같은 column을 사용하였다. 이때, 측정에 사용될 이동상을 이용하여 column을 안정화 시켰다. HPLC의 용매라인 중 두개의 라인(0.01% Acetic acid; C line, Methanol; D line)을 이동상으로 사용하였다. 첫 번째 C line 40%, D line 60%를 5분 동안 흘리고, 두 번째 C line 50%, D line 50%를 7분 동안 흘리고, 세 번째 D line만 100% 14분 동안 흘린 후, 마지막으로 C line 40%, D line 60%를 19분 가량 흘려주어 압력 peak가 일정하게 지속되면 시료 측정을 시작하였다.

다. 실험결과

1) 온도별 항온기에서의 열안정성

대조군 VA 원물질과 VA가 함유된 나노무기담체에 대한 온도 및 시간에 따른 안정성 결과를 그림 22와 그림 23에 나타내었다. 20, 40, 60 $^{\circ}$ C의 저장온도에서의 안정성을 측정한 결과, VA가 함유된 나노무기담체와 VA 원물질은 모두 안정성을 유지하여 49일까지 함량의 변화가 거의 없음이 관찰되었다. 즉 모두 안정성이 좋음을 관찰할 수 있었다. 그리하여, 더욱 극한 조건에서의 안정성을 고찰하였다.

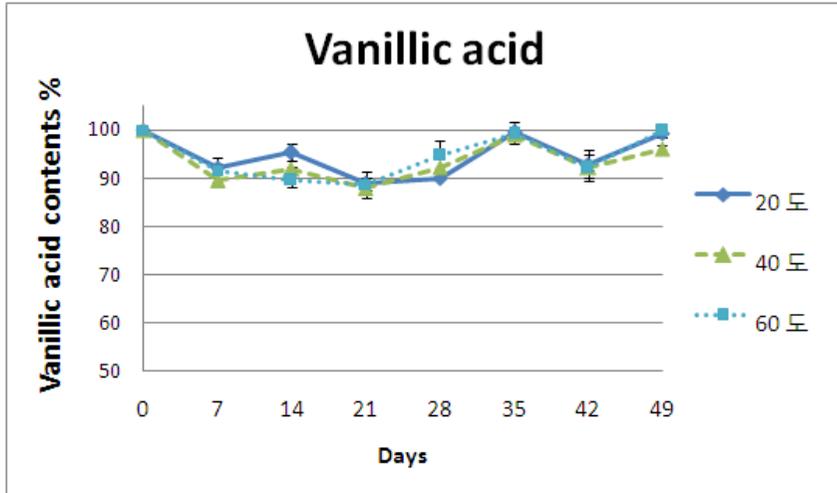


그림 22. Vanillic acid 열안정성.

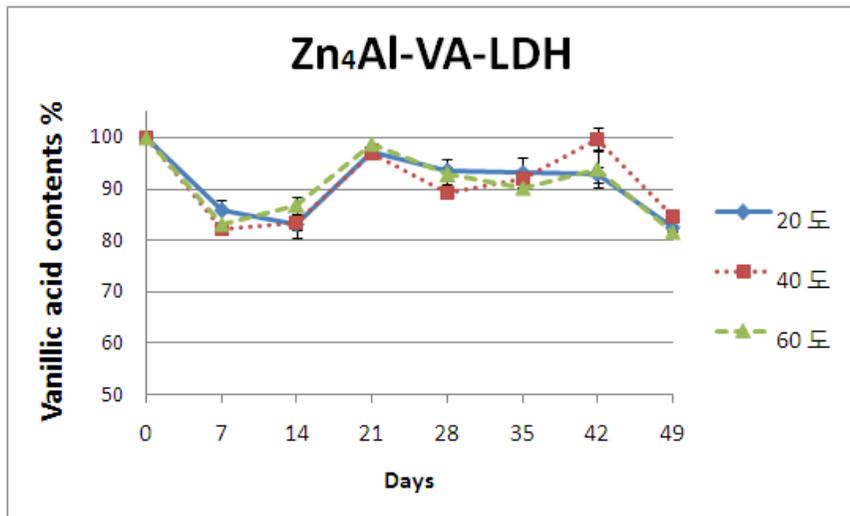


그림 23. VA가 함유된 나노무기담체의($Zn_4Al-VA-LDH$)의 열안정성.

2) 극한조건(200℃)에서의 열안정성

위의 항온기 내에서의 vanillic acid(VA)의 안정성 확보 후, 극한조건에서의 열안정성을 관찰하였다. 200℃의 가열조건과 유사한 조건 내에서의 측정 결과를 그림 24에 나타내었다. 열안정성 측정은 VA 원물질을 대조군으로 하여 VA가 함유된 각각의 나노무기담체($Zn_2Al-VA-LDH$, $Zn_3Al-VA-LDH$, $Zn_4Al-VA-LDH$)와 비교하였다.

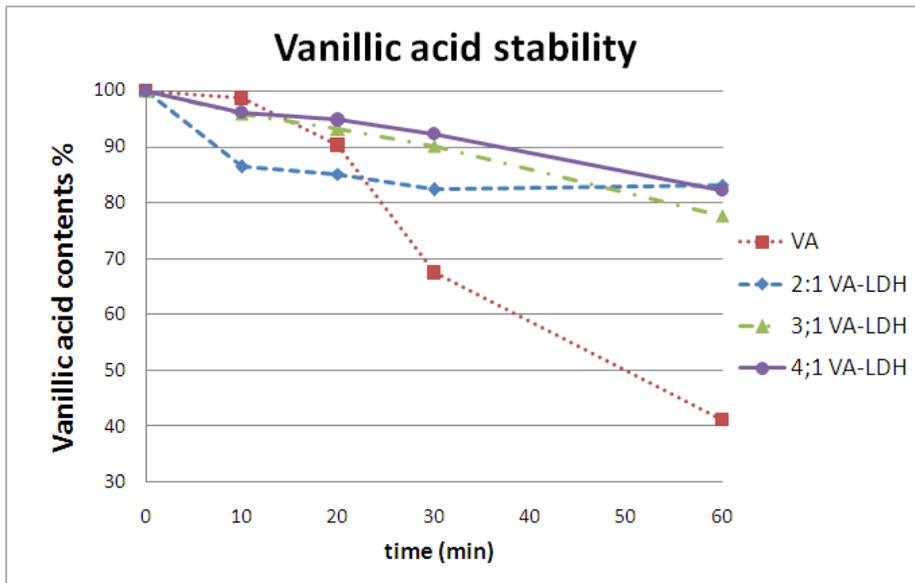


그림 24. 극한조건에서의 Vanillic acid 열안정성.

VA가 함유된 나노무기담체의 경우 시간이 지날수록 VA 함량의 변화가 적게 이루어지는 반면, 대조군 VA 원물질의 경우 20분 이후 급격히 함량 변화가 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이로써, VA 원물질과 VA가 함유된 나노무기담체의 열 안정성 결과로 볼 때 나노캡슐화를 통해 VA의 안정성이 확보되었음을 알 수 있었다.

제 3절 연구결과 III: 미량영양소 및 향 나노무기담체의 특성

제 1항 미량영양소 나노무기담체의 특성

제 2절의 연구결과에서 나노캡슐화에 의한 GLA의 열안정성 효과가 CLA의 나노캡슐화에 비하여 낮게 나타나는 것을 볼 수 있었다. 제 3절에서는 나노 캡슐화에 의한 안정성을 확인한 나노캡슐화 된 CLA에 대한 특성을 확인한다.

UV/VIS spectroscopy 와 FT-IR spectroscopy은 생화학적 물질을 분석하는데 많이 사용되어져 왔다. UV spectroscopy는 UV영역에서 가시광선 영역까지의 빛을 이용하여 시료의 흡광도를 측정하는 장치이다. 시료마다 고유의 빛을 흡수하는 영역이 있다는 것을 이용하여 흡광도를 측정하여 스펙트럼을 만들고 이를 통해 물질을 분석가능하다. 보통 특정파장에서 흡광도 차이를 이용하여 시료의 정량분석에 많이 사용된다. 시료의 농도가 높으면 강한 흡광도를 나타내며 농도가 낮은 경우 낮은 흡광도를 나타낸다. 이 차이를 이용하여 시료의 양을 측정하며 자외선이나 가시광선을 흡수하는 모든 액상 샘플에 응용이 가능하다.

FT-IRspectroscopy는 적외선 분광광도계를 나타내며 가시광선보다 긴 파장인 적외선을 시료에 쬐여주어 파장에 따른 흡광도 차이를 이용한다. 예를 들어 하이드록실기와 카르복실기의 흡수파장이 다르기 때문에 이를 이용하여 특정 파장대에 적외선을 흡수하면 그에 해당하는 작용기(functional group)의 유무를 확인할 수 있다.

UV-VIS spectroscopy는 처음으로 conjugated linoleic acid의 분광학적 분석에 사용된 기기로 알려져 있으며 CLA 는 230nm 파장대의 자외선을 흡수하는 것으로 알려져 있다. 이는 1993년 Moore가 conjugated double bond 가 있는 화합물은 230nm의 파장에서 흡광을 나타낸다고 발표한 후 1941년 Hilditch 와 1945년 Jasperson 은 18개의 탄소를 가진 polyunsaturate 된 지방산이라고 제안하였다. 그 후 Czauderna 와 Kowalczyk 는 geometric isomers 간 최대 흡수파장이 다르다는 것을 밝혔다. trans-trans isomer 는 231.9 nm, cis-trans isomer 는 234.3 nm, cis-cis isomer 의 경우 235.4 nm에서 최대 흡광도를 보인다고 발표하였다. CLA에 대한 FT-IR 연구결과 역시 찾아 볼 수 있다. 1952년 Jackson은 trans-trans isomer 는 988 cm^{-1} 에서 강한 IR 흡수 밴드를 나타내며 cis-trans

isomer와 tran-cis isomer 는 948 cm^{-1} and 982 cm^{-1} 에서 강한 IR 흡수 밴드를 나타낸다고 알려져 있다.

이번 절에서는 CLA가 담지 된 나노무기담체를 FT-IR spectroscopy과 FE-SEM을 이용하여 CLA와 비교분석 하고 CLA의 함량분석을 위하여 thermogravimetric analysis-differential thermal analysis (TG-DTA) 와 ICP-AES, elemental CHN analysis를 수행할 것이다. TG-DTA 분석결과에서 나노 캡슐화 된 CLA와 CLA 원물질 간의 열안정성 특성에 대한 결과를 얻어낼 수 있다.

가. 실험재료

1) 시약 및 실험재료

캡슐화 된 CLA의 함량분석을 위한 ICP-AES 분석을 위한 전처리를 위한 시약으로 염산(hydrochloric acid, Duksan, Ansan, Korea), 과산화수소수(Dae-Jung, Seoul, Korea)를 사용하였고, UV/VIS spectroscopy 분석을 위하여 헵탄(heptane, Juncei, Tokyo, Japan) 용액을 사용하였다. FT-IR spectroscopy 분석 시 CLA의 sodium salt를 합성하기 위하여 sodium hydroxide(Duksan, Ansan, Korea)를 사용하였고 pellet을 만들기 위해 KBr(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 시약을 이용하였으며, FE-SEM을 측정하기 위해 헵탄(heptane, Juncei, Tokyo, Japan)용액과 실리콘 웨이퍼(Si wafer, Kung-dong science, Seoul, Korea)를 사용하였다.

2) 실험기기

나노캡슐화 된 CLA의 함량분석을 위한 elemental CHNS 분석에 CHNS-932 기기(Leco, Michigan, USA)를 사용하였고, 물질의 weight decomposition 과 열분석을 위해 thermogravimetry analysis-differential thermal analysis(TG-DTA) system(TA instrument, New Castle, USA)의 DSC-2910, SRT-2960, DMA-2980을 이용하였다.

나노 캡슐화 된 CLA 와 CLA 원물질의 UV/VIS spectra를 얻기 위하여 UV/VIS Spectrometer Lambda 35(Perkin Elmer, Massachusetts, USA)를 사용하였고, 결합적 구조를 알아보기 위해 FT/IR-6100 type A model의 FT-IR 기기(JASCO, Baltimore, USA)가 사용되었고, 이 기기에 장착된 light 소스는 high intensity ceramic light source였으며 resolution은 0.5cm^{-1} 이었다. 나노캡슐화 된

CLA의 morphology를 알아보기 위해 FE-SEM 기기(JSM-6700F model, JEOL, Tokyo, Japan)를 사용하였으며 FE-SEM 측정하기 위한 Sample 준비를 위해 초음파 분쇄기(Ultra Sonicator, IKA Labor Technik, Staufen, Germany)를 사용하였다.

나. 실험방법

1) 원소분석 (ICP-CHN) 및 열분석 (TG-DTA)을 통한 화학적 구조 분석

나노캡슐화 된 CLA의 함량분석을 위한 elemental CHN 분석에는 LECO 사(Michigan, USA)의 CHNS-932 기기를 사용하였고 물질의 weight decomposition과 열분석을 위한 thermogravimetry analysis-differential thermal analysis (TG-DTA)은 미국 TA instrument 사(New Castle, USA)의 DSC-2910, SRT-2960, DMA-2980를 이용하였다. TG-DTA 분석의 heating rate는 5°C/min 이었고 분석은 질소조건에서 행하였다.

2) UV/VIS spectroscopy analysis

나노캡슐화 된 CLA와 CLA 원물질의 UV/VIS spectra를 얻기 위하여 Perkin Elmer 사(Massachusetts, USA)의 UV/VIS Spectrometer Lambda 35를 사용하였다. Lambda 35는 190 nm에서 1100 nm까지의 측정과장을 가지고 있다. UV/VIS spectra 측정을 위하여 나노캡슐화 된 CLA와 CLA 원물질은 1:10000 비율로 헵탄에 희석하였다. 희석한 용액을 1.00 cm의 quartz cell에 0.8ml 넣어 분석하였다. 이 용액은 210 nm에서 250 nm의 과장에서 흡광도가 관찰되었으며 용매로 사용된 헵탄 용액을 blank로 사용하였다.

3) FT-IR spectroscopy analysis

Fourier-transformed infrared (FT-IR) spectra를 얻기 위하여 JASCO 사(Baltimore, USA)의 FT/IR-6100 type A model(KBr pellet)을 이용하였다. FT/IR-6100 type A model은 4000 nm에서 400 nm 과장의 적외선을 통하여 분석이 가능한 장비이다. 장착된 detector는 LATFS이며 FT-IR spectrum은 가장 표준 방법인 KBr disk를 만들어서 분석하였다. CLA 원물질과 나노캡슐화 된 CLA의 화학결합의 차이를 비교분석하기 위하여 CLA 원물질, 나노캡슐화 된 CLA와 salt form의 CLA 만들어 FT-IR 결과를 얻었다. Salt form의 CLA를 얻기 위하여 같은 몰 비율의 CLA를 NaOH 수용액에 녹인 후 60°C 증탕으로 evaporation 하여 gel 상태로 얻어진 salt form의 CLA를 얻었다. 그 후 CLA와 salt form의 CLA를 FT-IR 찍기 위해서 먼저 KBr disk를 만든 후 그 위에 소량

물혀주었으며 고체상태 시료인 나노캡슐화 된 CLA는 KBr과 함께 미세한 가루로 간 후 압착하여 disk를 만들어 흡광도를 측정하여 각각 비교하였다. 모든 spectral data는 resolution 4 cm^{-1} 과 40 스캔 수를 통하여 얻어졌다.

4) FE-SEM images

CLA가 함유된 나노무기담체 소량을 코니칼 튜브에 넣고 헵탄에 녹인다. 준비한 샘플양 0.01%의 계면활성제 Tween 80 chemical pure reagent (Dea-Jung, Korea)을 넣어준다. 초음파 분쇄기를 이용하여 3시간 가량 분쇄 시켜주었다. 그 후 준비해놓은 실리콘 웨이퍼(Si wafer)위에 분쇄시킨 나노무기담체 용액 한 방울을 떨어뜨렸다. 이 웨이퍼를 건조시킨 후 FE-SEM을 측정하였다.

나. 실험결과

1) 원소분석 (ICP-CHN) 및 열분석 (TG-DTA)을 통한 화학적 구조 분석

나노 캡슐화 된 CLA의 함량은 표 2 에 나타내었다. 나노 캡슐화 된 CLA의 함량 분석을 위해서 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)와 elemental CHN analysis이 사용되었다. 또한 zinc의 함량은 ICP data 와 CHN analysis data를 통하여 계산하였다. 나노 캡슐화 된 CLA 중의 CLA의 함량과 zinc의 함량의 확인을 위해서 thermogravimetric analysis-differential thermal analysis (TG-DTA) 결과를 이용하였다.

표 2. CLA 원물질과 CLA가 함유된 나노무기담체의 함량.

Content of CLA (wt %)	Content of Zinc (wt %)	Chemical composition
42.13	28.39	$\text{Zn}_{2.43}(\text{OH})_{4.39}(\text{CLA})_{0.47}$

그림 25, 26은 CLA 원물질과 CLA가 담지 된 나노무기담체에 대한 TG-DTA 곡선을 나타낸다. 그림 25는 CLA 원물질에 대한 TG-DTA 곡선이며 그림 26은 CLA가 담지 된 나노무기담체에 대한 TG-DTA 곡선이다.

CLA 원물질의 열 분해는 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 정도에서 시작된다. $200\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 발열 peak 가 DTA 곡선에 나타나 대부분의 CLA가 이 구간에서 모두 분해되는 것을 알 수 있다. 나노캡슐화 된 CLA의 열 분해 곡선에서 3단계를 거쳐 분해되는 것을 볼 수 있다. 첫 번째 구간은 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 나타난다. 이 구간에서 나타나는 weight

loss는 전체 무게의 4 ~ 5 % 정도이며 이는 표면에 흡착된 물의 증발로 인하여 생기는 것으로 추정된다. 두 번째 weight loss 는 100 ~ 140°C 의 구간에서 볼 수 있으며 이는 나노무기담체에 붙어있던 CLA가 제거되며 생기는 것으로 전체 무게의 2 ~ 3 % 정도를 차지한다. CLA가 담지 된 나노무기담체중의 CLA는 세 번째 구간인 300 ~ 450°C에서 분해되며 CLA 의 함량은 45 wt% 정도로 이는 HPLC 및 elemental CHN analysis 의 결과와 동일하다.

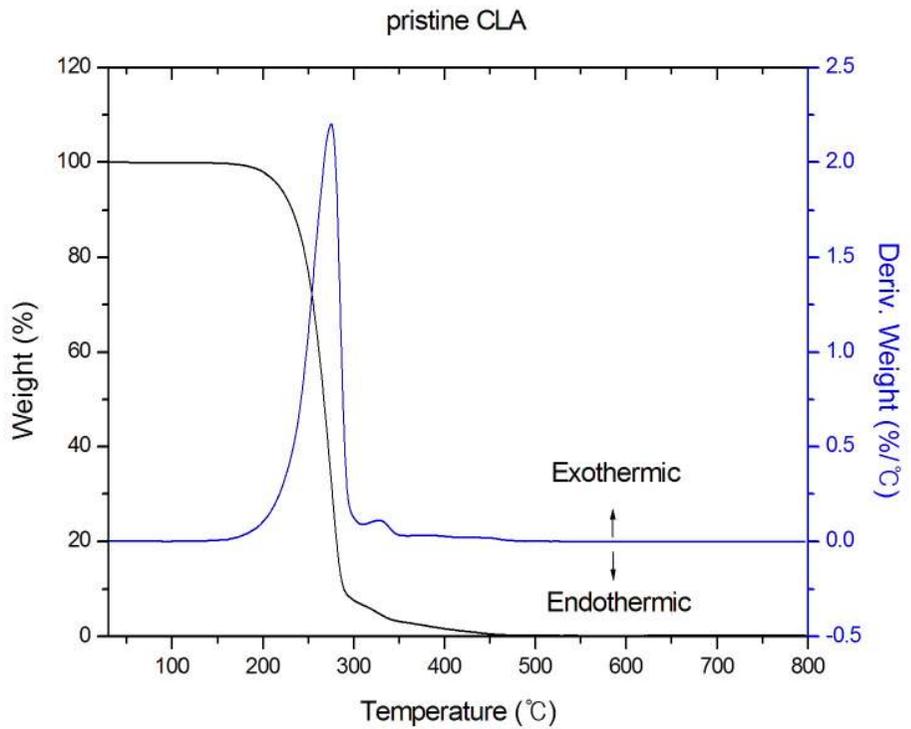


그림 25. CLA 원물질의 TG-DTA 곡선.

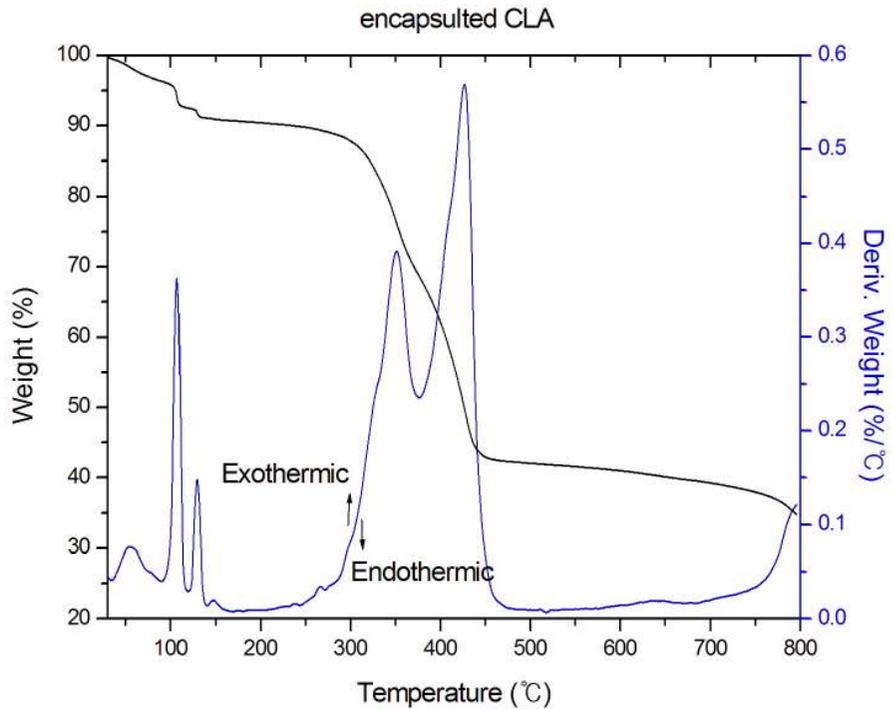


그림 26. CLA가 담지 된 나노무기담체의 TG-DTA 곡선.

2) UV/VIS spectroscopy analysis

UV/VIS spectra는 그림 27에 나타내었다. 나노캡슐화 된 CLA와 CLA 원물질은 모두 232 nm에서 최대 흡수파장을 갖는다. 이는 Conjugated linoleic acid 의 특징적인 기능기 (Functional group) 인 conjugated diene 구조의 UV/VIS 흡수파장으로 알려져 있다. CLA와 나노캡슐화 된 CLA 모두가 232 nm에서 흡수파장을 갖는 것을 통해 CLA가 나노무기담체에 담지 되어도 conjugated diene 구조가 유지되는 것을 확인 할 수 있었다.

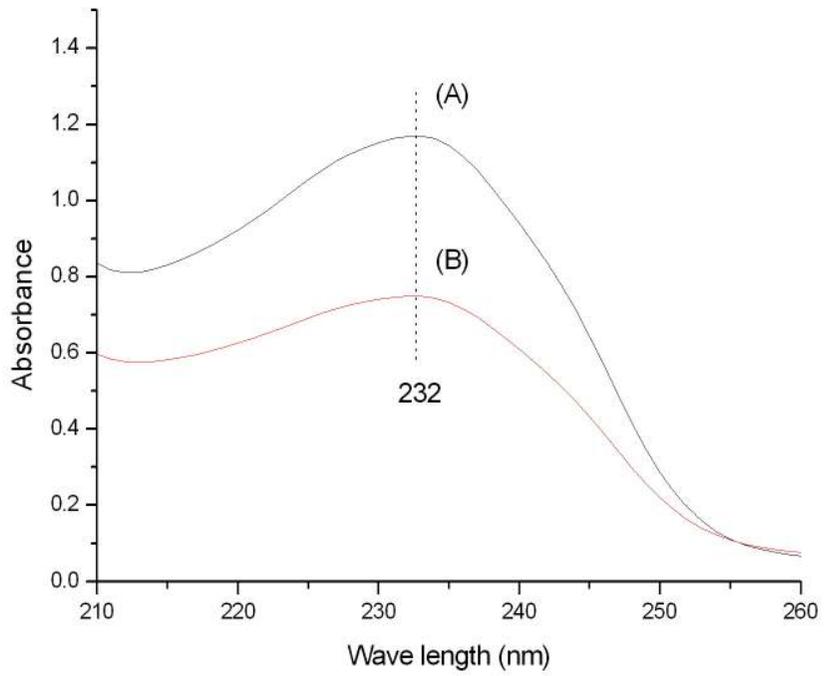


그림 27. CLA가 담지 된 나노무기담체의 UV/VIS 패턴. (a) pristine CLA, (b) encapsulated CLA

3) FT-IR spectroscopy analysis

CLA와 나노무기담체 간의 화학적인 결합을 알아 보기 위하여 나노 캡슐화 된 CLA 와 CLA 원물질, salt form의 CLA를 fourier-transformed infrared (FT-IR) spectroscopy 분석하였다. 나노 캡슐화 된 CLA 의 spectra를 CLA 원물질과 salt form의 CLA spectra와 비교하였다(그림 28). 나노 캡슐화 된 CLA와 CLA 원물질, salt form의 CLA 모두 2918, 2850 cm^{-1} 에서 $-\text{CH}$ 구조가 보이며 FT-IR측정 결과 CLA 원물질을 측정했을 시에 1715 cm^{-1} 의 파장에서 carboxylic acid의 C=O bond peak가 측정되는 것을 볼 수 있었다. 하지만 salt form의 CLA와 CLA가 담지 된 나노무기담체 내에서는 이 peak가 사라지는 것을 볼 수 있다. 이는 CLA의 Carboxylic acid ($-\text{COOH}$)의 H가 탈리되면서 carboxylate 나노무기동공 사이로 encapsulation된 것임을 나타내었으며, 결과에서 carboxylate의 peak이 symmetry, asymetry peak로 나뉘어서 나타남을 관찰 할 수 있었다.

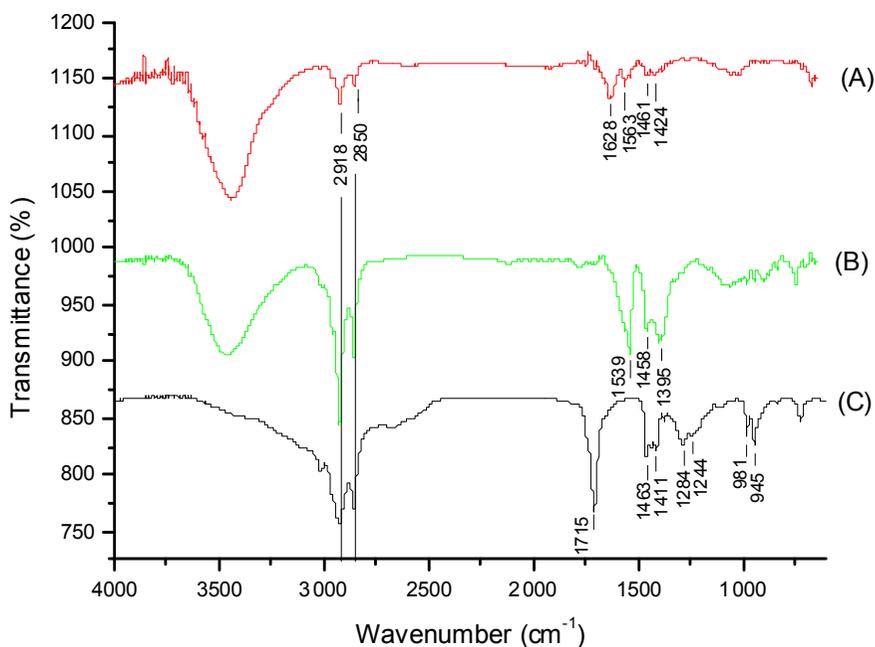


그림 28. CLA가 담지 된 나노무기담체의 FT-IR 패턴. (a) Na^+CLA^- , (b) encapsulated CLA, (c) CLA

4) FE-SEM 이미지

CLA가 담지 된 나노무기담체의 morphology는 그림 29에 나타내었다. FE-SEM 측정 결과 나노캡슐화 된 CLA 결정의 크기는 500 ~ 700nm 정도로 관찰되었다. 이는 독성을 보이는 작은 사이즈가 아니며 또한 시료가 잘 분산되어 있어 식품 등의 적용에 용이할 것으로 판단된다.

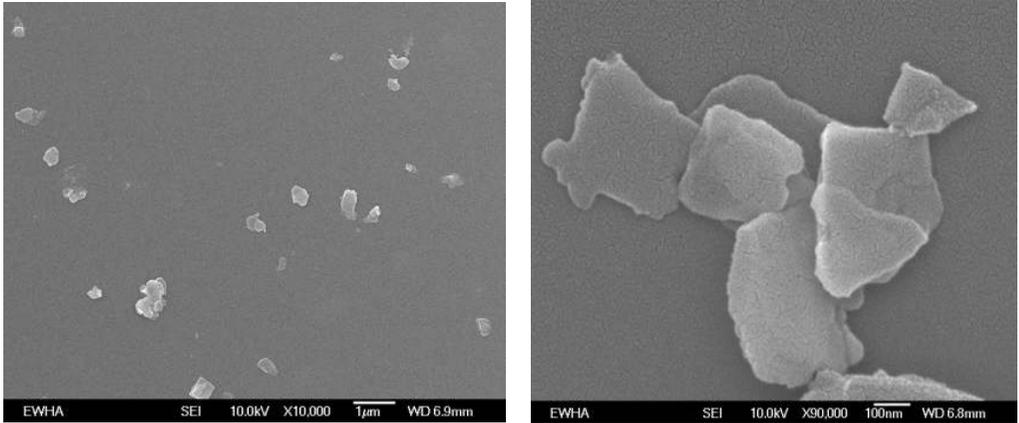


그림 29. CLA가 담지 된 나노무기담체의 FE-SEM 이미지.

제 2항 향 나노무기담체의 특성

Vanillic acid(VA)가 합성된 나노무기담체의 결합 및 격자구조(hexagonal구조 : 육방정계 구조물)형태, 물 함량 등 알아보기 위해 Fourier Transfer Infrared Spectroscopy(FT-IR), 전계방출 주사 현미경(field emission scanning electron microscopy(FE-SEM)), 열분석(thermogravmetric-differential thermal analyzer(TG/DTA)) 및 원소분석(inductive coupled plasma-atomic emission spectroscopy(ICP) & CHN)을 수행하여 특성을 알아보았다. 또한, VA가 담지된 나노무기담체로부터 VA의 향 방출특성을 알아보기 위해 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 정량 분석하였다.

가. 실험재료

1) 시약 및 실험재료

FT-IR측정을 위해 KBr(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 이용하였으며, KBr과 나노무기담체를 섞어 고운가루로 만들기 위해 몰타르를 사용하였다. FE-SEM을 측정하기 위해 실리콘 웨이퍼(Si wafer, Kung-dong science, Seoul, Korea)를 사용하였다. 향 방출특성을 위해 사용된 media는 증류수와 0.9% Sodium Chloride(NaCl) 수용액을 사용하였다.

2) 실험기기

나노무기담체 내에서 VA의 결합적 구조를 알아보기 위해 FT/IR-6100 spectrometer(JASCO, Baltimore, USA)를 사용하였고, 기기에 장착된 light 소스는 High intensity ceramic light source였으며 resolution은 0.5cm^{-1} 이었다. 격자구조 형태를 알아보기 위해 FE-SEM 기기(JSM-6700F, JEOL, Tokyo, Japan)를 사용하였으며 FE-SEM 측정하기 위한 Sample 준비를 위해 초음파 분쇄기(Ultra Sonicator, IKA Labortechnik, Staufen, Germany)를 사용하였다. 또한, 열분석을 위해 Pyris Diamond TG-DTA system(High temp 115 model, Perkin Elmer instruments, Massachusetts, USA)을 사용하였다. 향 방출특성 연구에서 정량분석을 위하여 C_{18} column(Agilent Technologies, Santa Clara, USA)이 장착된 HPLC(Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)를 사용하였다.

나. 실험방법

1) FT-IR spectroscopy analysis

VA가 담지 된 나노무기담체 극미량을 몰타르에 넣은 후 그에 몇 배 이상 되는 양의 KBr을 넣어 함께 섞어 고운파우더 상태로 만들었다. 고체상태의 pellet (구형의 평평한 고체덩어리)을 만들기 위해 이 파우더를 pelletizer(pellet제조 부품)에 넣은 후, pelletizer를 고 압력으로 펌프질 하였다. 2-3분 후 pelletizer로부터 고체상태의 pellet을 얻어낸다. 얻어낸 pellet에 적외선을 주사하였다.

2) FE-SEM image

VA가 담지 된 나노무기담체 소량을 코니칼 튜브에 넣고 증류수를 넣은 후 초음파 분쇄기를 이용하여 분쇄 시켜주었다. 2-3시간 분쇄 후 준비해놓은 실리콘 웨이퍼(Si wafer)위에 분쇄시킨 나노무기담체 한 방울을 떨어뜨렸다. 이 웨이퍼를 건조시킨 후 FE-SEM을 측정하였다.

3) 원소분석 (ICP-CHN) 및 열분석 (TG-DTA)을 통한 화학적 구조 분석

열분석을 측정위해, VA가 함유된 나노무기담체를 기기에 로딩하기 전, 먼저 기기를 안정화 시켰다. 이때, 샘플을 측정할 때 흘러줄 가스를 같이 흘려주었다. VA가 함유된 나노무기담체를 측정할 때에는 질소혼합가스(ambient air, 200cc/min)를 흘려주었다. 기기가 안정화된 후 준비해 놓았던 샘플을 로딩하였다. 실온부터 800°C 까지 온도를 올려 열분석 하였다. Heating 속도는 1분당 5도씩 올렸다.

4) 나노무기담체로부터 Vanillic acid의 방출특성 측정 (Release analysis)

제시된 두 종류의 media에 각각의 sample을 넣고 시간 별로 5ml씩 추출하여 원신분리 한 후, 위의 상층액 만을 얻어냈다. 얻어낸 상층액을 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 정량분석 하였다.

다. 실험결과

1) FT-IR spectroscopy analysis

담지 된 vanillic acid(VA)와 무기담체 사이의 결합구조를 알아보기 위해 FT-IR측정을 수행하였으며, VA가 담지 되어있지 않은 나노캡슐과 VA 원물질만의 FT-IR 패턴과 함께 비교 분석 하였다.

Vanillic acid의 핵심 구조는 carboxylic acid ($-\text{COOH}$) 구조로 되어있는 것이다. FT-IR측정 결과, VA 원물질만 측정했을 시에 carboxylic acid 의 C=O bond peak가 측정되는 것을 볼 수 있으나 VA가 담지 된 나노무기담체 내에서는 이 peak가 관찰되지 않음을 볼 수 있다. 이는 VA의 carboxylic acid ($-\text{COOH}$)의 H가 탈리되면서 carboxylate 형태로 나노무기동공 사이에 캡슐화 되었음을 나타내며, 결과에서 carboxylate의 peak가 symmetry, assymetry peak로 나뉘어서 나타남을 관찰 할 수 있었다. FT-IR결과는 그림 30에 나타내었다.

VA의 Peak search; **Black line** : aromatic ring
Red line : phenolic OH
Blue line : C-O-C stretching
Green line : $\nu(\text{C-C})_{\text{ring}} + \delta(\text{CH})_{\text{ring}}$

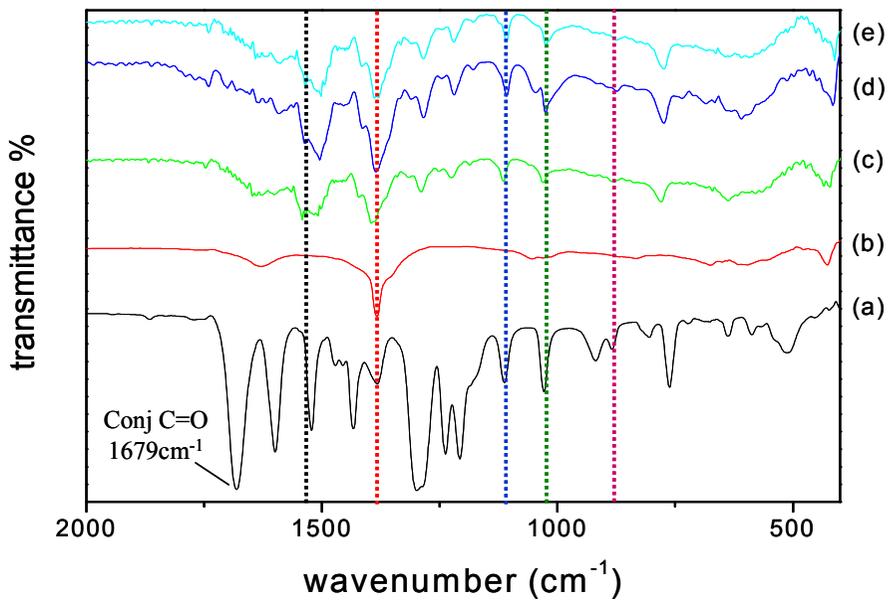


그림 30. VA가 함유된 나노무기담체의 FT-IR 패턴.
 (a) Vanillic acid, (b) pristine LDH, (c) $\text{Zn}_2\text{Al-VA-LDH}$, (d) $\text{Zn}_3\text{Al-VA-LDH}$ 그리고 (e) $\text{Zn}_4\text{Al-VA-LDH}$

2) FE-SEM image

VA가 담지 된 나노무기담체의 구조는 hexagonal의 구조로 육각형 행태로 격자구조가 형성되어 있다. 격자 구조는 FE-SEM의 측정으로 결과를 얻었다(그림 31). 또한, 합성된 나노무기담체의 크기는 약 100-200nm 정도이다.

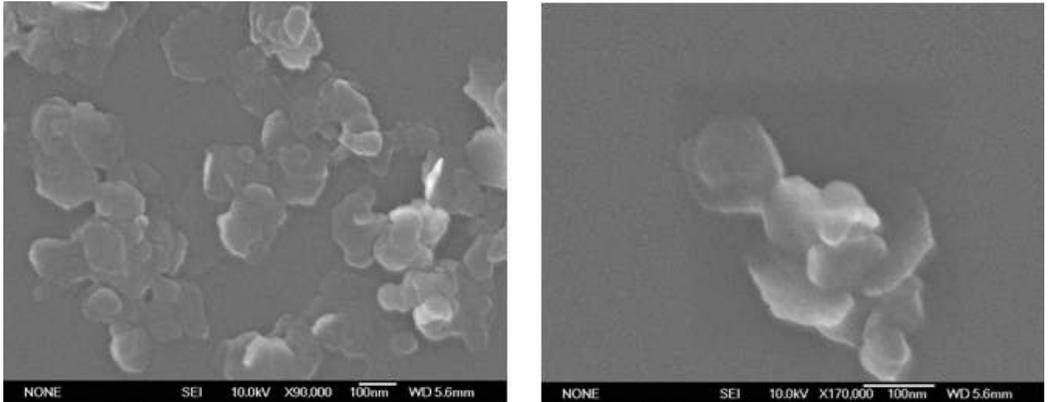


그림 31. VA가 함유된 나노무기담체의 FE-SEM 이미지.

3) 원소분석 (ICP-CHN) 및 열분석 (TG-DTA)을 통한 화학적 구조 분석

VA가 담지 된 나노무기담체의 원소분석(ICP-CHN)과 열분석(TG-DTA)을 통해서 나노무기담체 내에 담지 된 VA 및 물의 함량과 유기물 분해 등을 관찰 하였다. 관찰 결과는 각각 표 3과 그림 32, 33, 34, 35에 나타내었다.

열분석 시 VA가 담지 된 나노무기담체는 VA 원물질만의 열 분석결과와 비교 분석하여 VA가 200°C 이상에서 decomposition됨을 알 수 있었다. VA가 함유된 나노무기담체의 경우 처음(1st) 30-110°C 사이에 나노무기담체 표면의 물이 증발 되고, 두 번째(2nd) 110-280°C 사이에 유기물과 interlayer water가 decomposition됨이 관찰되었다. 마지막으로(3rd) 280-410°C 사이에 나노무기담체 layer(LDH layer)내의 Hydroxide(OH) group의 loss가 발생하였다.

표 3. Vanillic acid가 함유된 나노무기담체의 화학식.

Samples	Elemental analyze
(a) Zn ₂ Al-VA-LDH	Zn _{1.704} Al _{1.000} (OH) _{5.472} (C ₈ H ₇ O ₄) _{0.936}
(b) Zn ₃ Al-VA-LDH	Zn _{2.583} Al _{1.000} (OH) _{7.140} (C ₈ H ₇ O ₄) _{1.026}
(c) Zn ₄ Al-VA-LDH	Zn _{3.533} Al _{1.000} (OH) _{8.893} (C ₈ H ₇ O ₄) _{1.173}

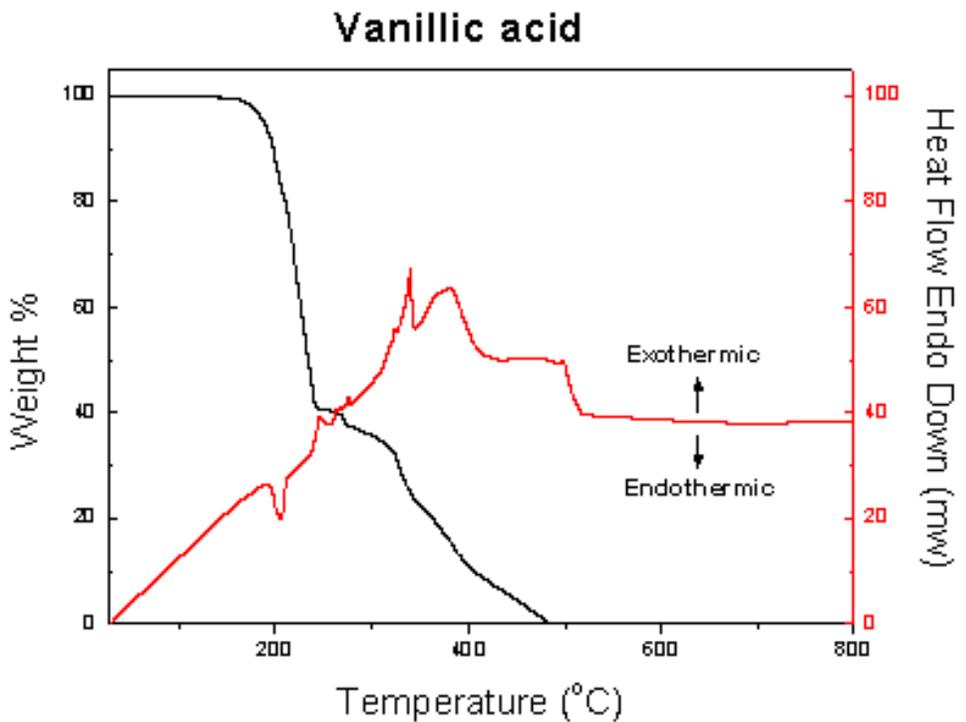


그림 32. Vanillic acid 원물질의 TG-DTA 곡선.

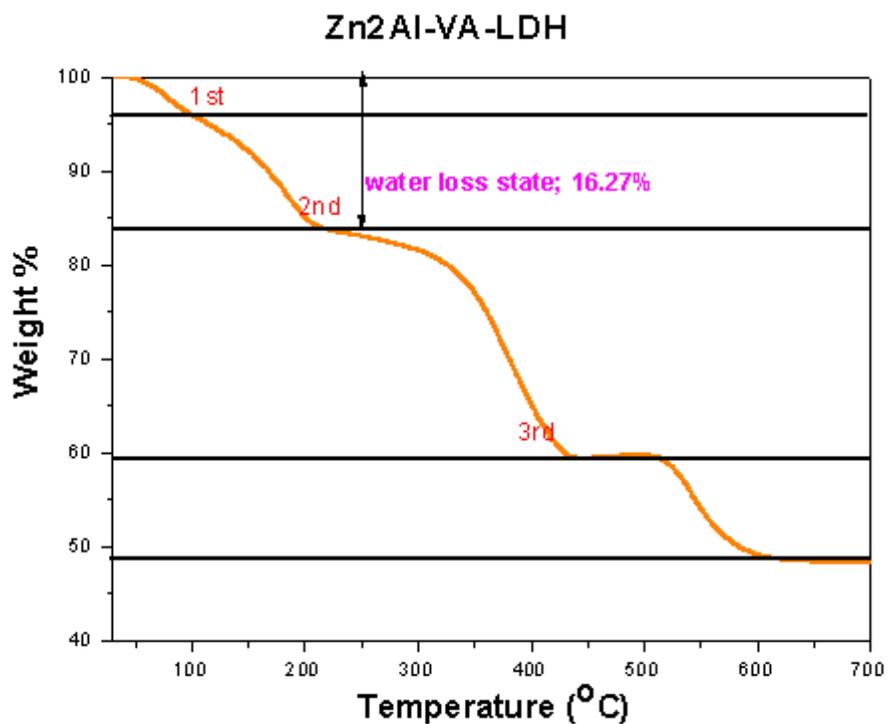


그림 33. VA가 담지 된 나노무기담체의 열분석 곡선 (Zn₂Al-VA-LDH).

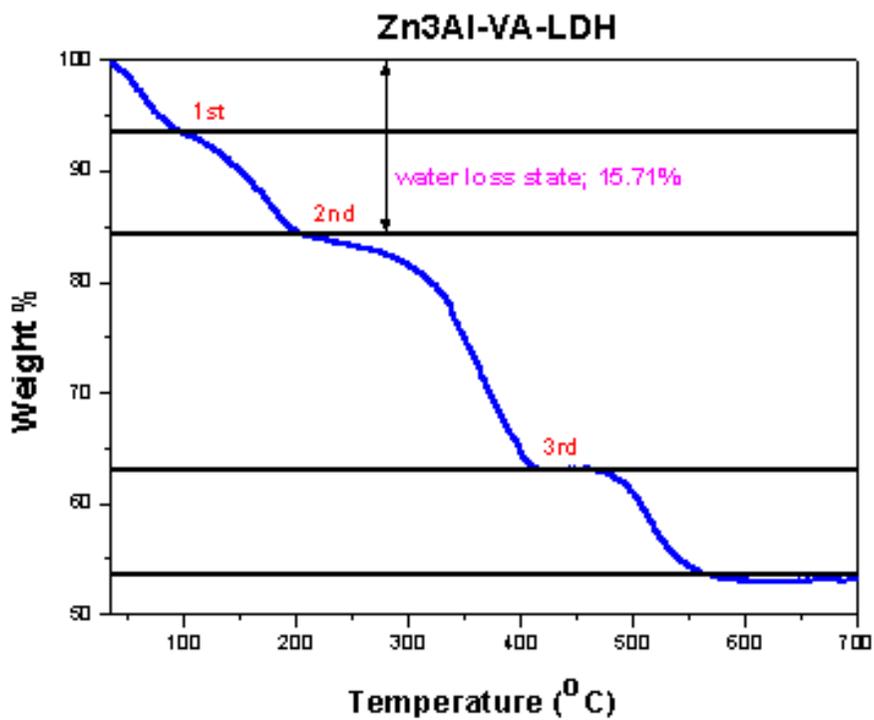


그림 34. VA가 담지 된 나노무기담체의 열분석 곡선 (Zn₃Al-VA-LDH).

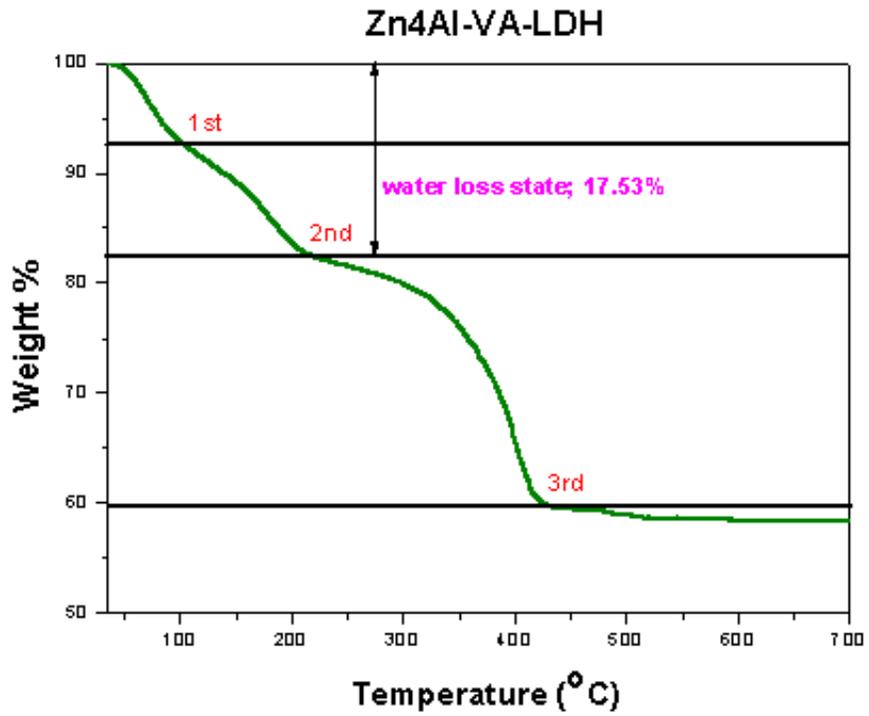


그림 35. VA가 담지 된 나노무기담체의 열분석 곡선 (Zn₄Al-VA-LDH).

4) 나노무기담체로부터 Vanillic acid의 방출특성 측정 (Release analysis)

나노무기담체에 담지 된 vanillic acid(VA)의 방출 특성을 알아보기 위해 두 가지 수용액 상의 media에서 시간에 따른 VA의 방출 특성을 연구하였다. 실험 결과는 각각 그림 36, 37에 나타내었다.

실험 결과, media와 나노무기담체의 type(metal 비율)에 따라 vanillic acid의 방출특성이 달라지는 것을 볼 수 있다. 초기 10분 동안에는 방출이 빠르게 나타나는 것을 볼 수 있는데 이는, 중성의 수용액에서 LDH 층상구조가 부분적으로 녹는 효과와 팽창 효과로 인한 것으로 설명 할 수 있다. 초기 단계의 방출 후 vanillic acid의 방출 패턴은 합성한 나노무기담체의 무기물(zinc, aluminum)의 비율과, media에 의존적임을 관찰 할 수 있었다. 0.9% NaCl solution에서 방출 양이 많은 요인은 이온교환에 의한 것으로 설명 가능하다.

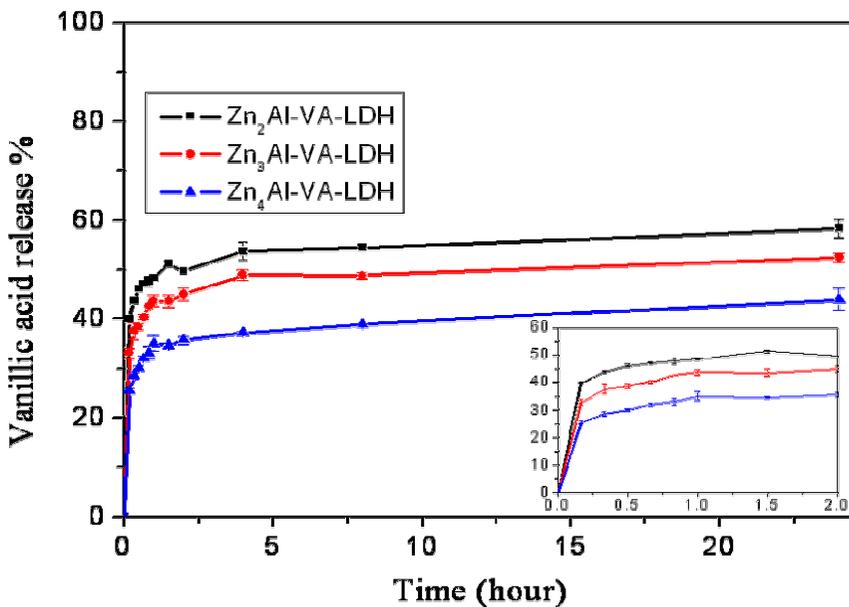


그림 36. 수상(중류수)에서 VA가 담지 된 나노무기담체의 Vanillic acid 방출특성.

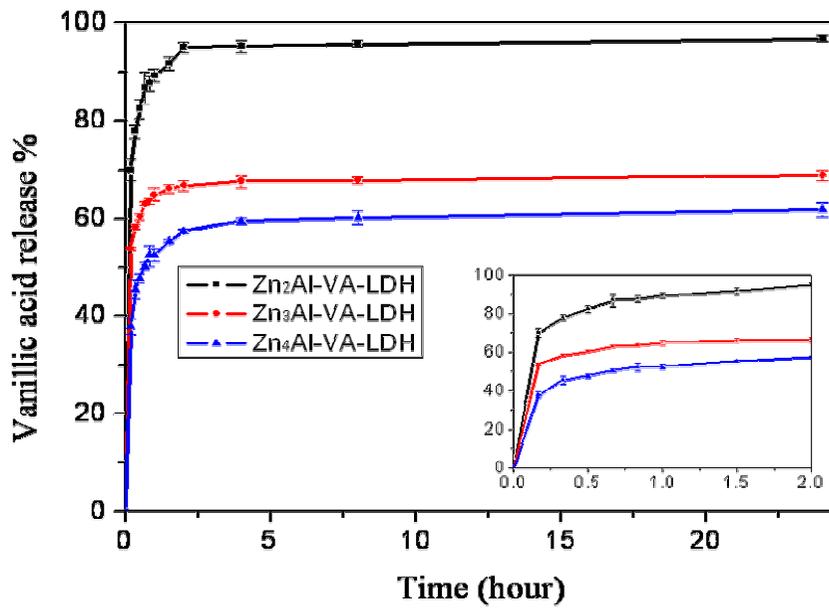


그림 37. 수상(0.9% NaCl solution)에서 VA가 담지 된 나노무기담체의 Vanillic acid 향 방출특성.

제 3항 다양한 pH 및 용매 조건에서 안정화하기 위한 반응법 및 후처리 방법 연구

미량영양소의 안정성을 확보를 위한 나노무기담체의 최적화 및 담지조건 확립을 위하여 담지 된 미량 원소를 다양한 pH·용매 등의 조건과 코팅 및 표면개질 등의 후처리 조건 최적화를 위한 실험을 진행하였다.

가. 실험재료

CLA(conjugated linoleic acid 80%, Lipoqen, Seoul, Korea)와 GLA(gamma linolenic acid 60%, Lipoqen, Seoul, Korea)를 사용하였다. 메틸렌 클로라이드(methylene chloride, Dae-Jung, Seoul, Korea), 에탄올(ethanol, Dae-Jung, Seoul, Korea), 토코페롤(tocopherol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 라우르산(lauric acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), TEOS(tetra ethyl orthosilicate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), GMS(glyceryl monostearate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 디메치콘(dimthicone, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 사용하였다.

나. 실험방법

합성된 GLA 나노무기담체와 CLA 나노무기담체를 에탄올 또는 메틸렌클로라이드에 분산시킨 뒤, 표면처리를 위하여 30mM으로 제조한 토코페롤 용액을 첨가하고 교반시킨다. 교반시간을 20분에서 1시간 유지한 후 에탄올을 이용하여 수세하였다. 수세한 슬러리는 다시 에탄올 또는 메틸렌클로라이드에 분산시킨 후 분무건조 하였다.

또한, 표면개질 물질을 라우르산(Lauric acid), TEOS(Tetra ethyl orthosilicate), GMS(Glyceryl monostearate), 디메치콘(Dimthicone) 등으로 달리하여 실험을 진행하였다.

다. 실험결과

표 4. 표면개질 후처리 물질 별 분산특성.

표면개질 후처리 물질	분산특성
토코페롤	흡습성이 낮아 물에 대한 안정성이 증가됨.
라우르산 (Lauric acid)	흡습성이 낮아 물에 대한 안정성이 증가됨.
TEOS (Tetra ethyl orthosilicate)	흡습성이 좋아 물에 대한 안정성은 떨어지나, 유기 용매나 기름에 대한 안정성은 증가
GMS (Glyceryl monostearate)	소수성과 흡습성을 동시에 지녀서 물과 기름에 대한 안정성이 동시에 보완됨
디메치콘 (Dimthicone)	흡습성이 매우 낮아 물에 대한 안정성이 매우 증가됨.

후처리 물질로 토코페롤, 라우르산, 디메치콘을 사용하였을 경우, 소수성 성질을 띠고 흡습성을 나타내지 않아 물에 대한 안정성이 매우 높아진 반면, TEOS를 사용하였을 경우에는, 친수성 성질을 띠고 강한 흡습성을 나타냄으로서 물에 대한 안정성은 다소 떨어지지만, 기름이나 유기용매에 대한 안정성은 높아짐을 알 수 있었다. 양쪽성을 지니는 GMS를 사용하여 후처리 개질을 하였을 경우 약간의 소수성과 흡습성을 동시에 띠기 때문에 물과 유기용매에 대한 안정성을 동시에 개선할 수 있음을 확인하였다.

1차 캡슐화 담체의 pH에 대한 안정성은 담체가 갖고 있는 금속 이온의 pH별 용해도로부터 이론적으로 유추될 수 있으며, 본 연구에서 실험적으로 확인하였다. Zn의 경우에는 pH 5-10 (약산성에서 약염기성의 넓은 범위)에서 낮은 용해도를 보이기 때문에 ZnO는 넓은 pH 영역에서 캡슐 내 물질을 안정화할 수 있다. 따라서, 미량 영양소를 안정화시키기 위해 사용한 ZnO 물질은 상당히 넓은 pH 영역에서 지방산을 안정화시킬 수 있는 것으로 판단되며, 연구 결과 합성 pH를 약산성에서 염기성까지 다양화하더라도 안정성이나 캡슐화 반응에는 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 단, ZnO·H₂O 캡슐 물질 생성시의 수득률과 순도를 고려할 경우 pH 7 정도의 영역이 최적임을 본 연구 결과 도출할 수 있었고, 이 결과를 최적의 합성 조건으로 활용하였다.

또한, 향 물질을 담지하기 위하여 사용된 ZnAl-LDH 담체의 경우 Zn가 갖고 있는 담체로서의 장점을 최대한 활용하는 한편, 침전율을 높이기 위하여 Al 치환을 시도하였다. Zn는 pH 5-10의 넓은 pH 영역에서 침전을 형성하여 안정화되는 반면 중성 pH에서는 약간의 용해도를 보일 가능성도 있다. 이때 침전이 pH 약 4에서 형성되는 Al 이온을 치환해 주게 되면 담체는 pH 7 근처 (중성)에서 매우 안정한 고체화합물을 형성할 수 있다. 실제 실험에서도 pH 5-10 사이에서 ZnAl-LDH 담체를 제조하였을 경우 pH 6.7 정도의 조건에서 매우 높은 침전 형성율과 안정성을 보임을 알 수 있었다. 또한, ZnAl-LDH의 제조에 있어서 물, 에탄올, 50% 에탄올 혼합용액 등의 다양한 용매를 사용한 결과, Vanillic acid나 vanillin 캡슐화에서 각각 물과 에탄올을 사용하는 경우 가장 높은 안정성과 수득률을 달성할 수 있음을 실험적으로 증명하였다. Zinc hydroxide의 solubility diagram은 그림 38에 나타내었고, 합성한 GLA가 함유된 나노무기담체와 VA-LDH 및 VAV-LDH의 X-선 회절패턴은 그림 39, 40, 41, 42에 나타내었다.

Zinc Solubility

Zn(OH)₂

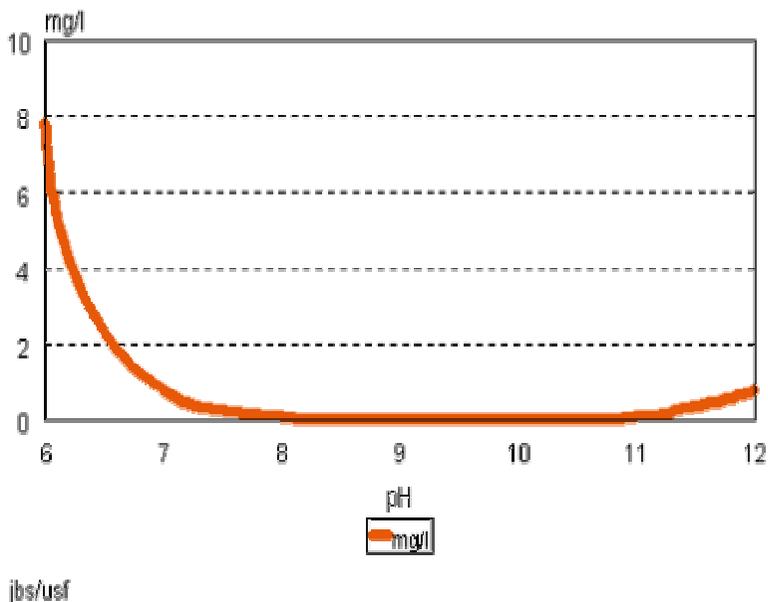


그림 38. Zinc hydroxide의 solubility diagram.

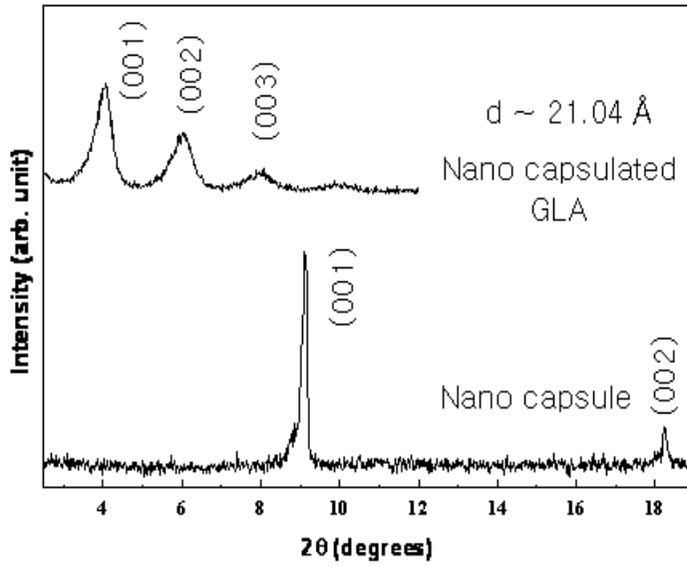


그림 39. GLA가 함유된 나노무기담체(위)와 나노무기담체(아래)만의 X-선 회절패턴 (d값은 GLA가 포함된 나노무기담체의 d-spacing을 나타냄).

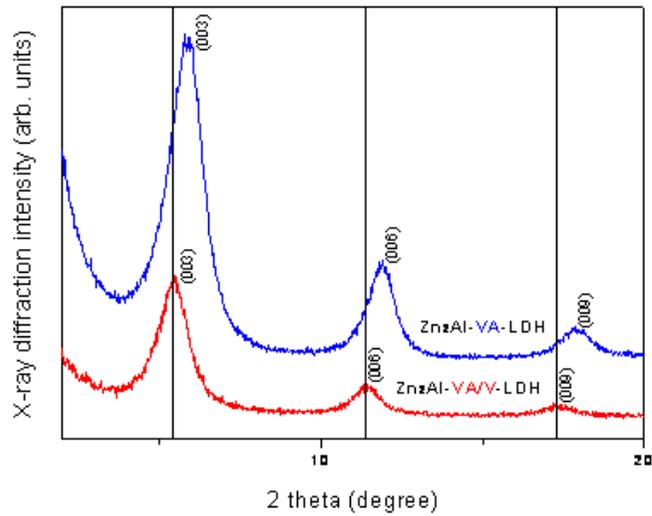
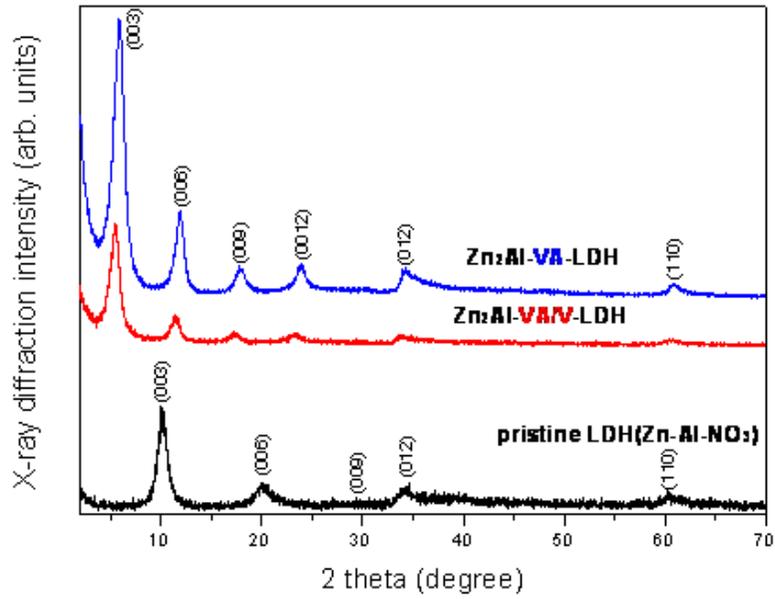


그림 40. Vanillin이 담지된 나노무기담체의 X-ray 회절패턴 (2:1 VA/V-LDH).

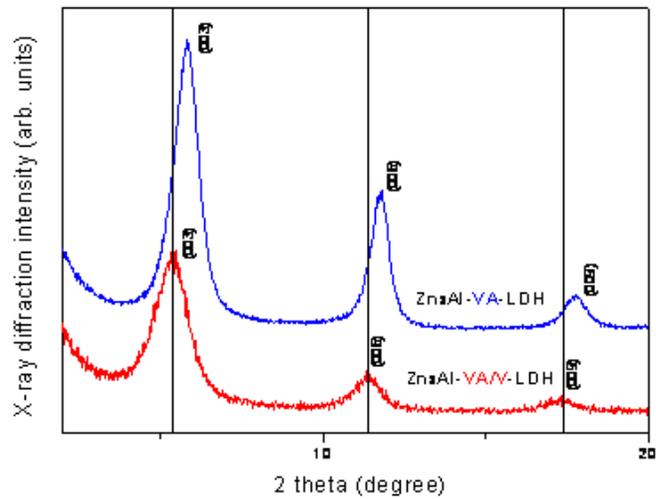
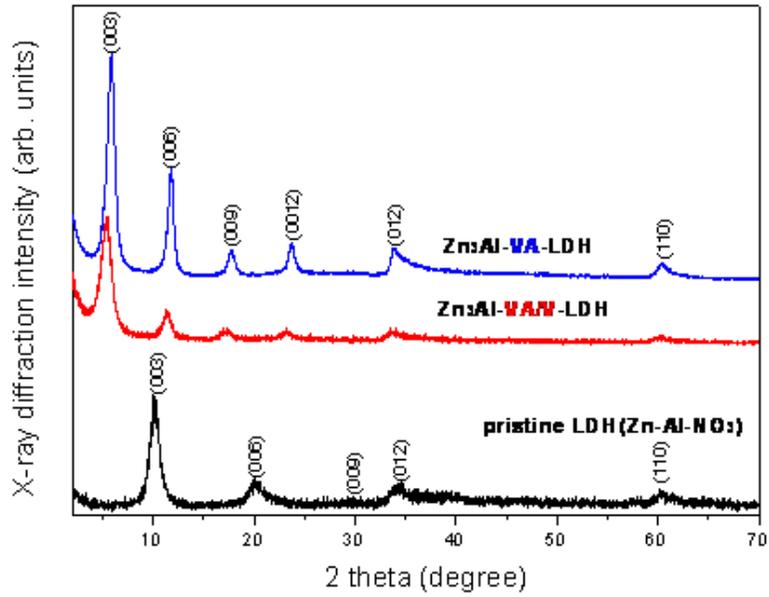


그림 41. Vanillin이 담지된 나노무기담체의 X-ray 회절패턴 (3:1 VA/V-LDH).

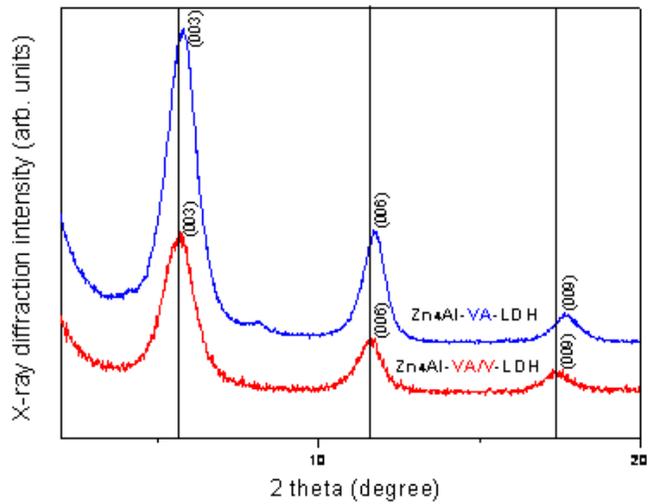
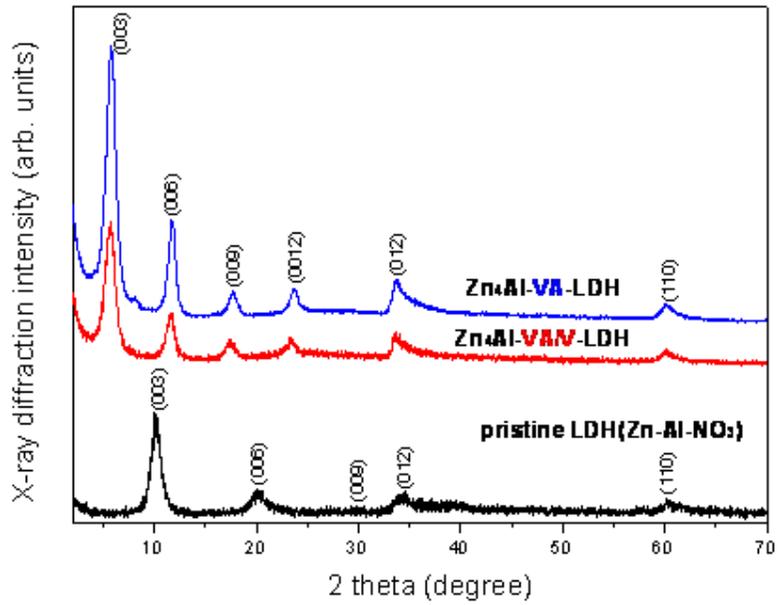


그림 42. Vanillin이 담지 된 나노무기담체의 X-ray 회절패턴 (4:1 VA/V-LDH).

제 4절 연구결과 IV : 나노무기담체에 캡슐화 된 미량 영양소 및 향 나노무기담체의 열안정성 분석 II

제 1항 가열조건 후 나노무기담체의 분석 protocol 확립

합성한 미량영양소 및 향이 담지 된 나노무기담체 시료를 각각 밀가루와 반죽하여 180℃에서 2분간 가열과정을 통해서 준비하였다. 또한, 밀가루 반죽만을 준비하여 대조군으로 사용하였다(표 5).

표 5. 가열조건 분석에 사용한 반죽 비율.

	밀가루(g)	물(ml)	시료
원물질 시료 반죽	5	3	0.5ml
나노무기담체 시료 반죽	5	5	1g
대조군	5	3	-

조지방 추출의 효율을 높이기 위하여 가열과정 후 얻어진 반죽을 믹서로 곱게 간 후 일정량을 취해 식품공전에 제시되어있는 조지방 추출법 중 산 분해법에 기초하여 실험하였다. 250ml 구수기를 100℃ 오븐에 1시간 동안 넣어 둔 후 decicator에서 30 분간 식힌다. 무게를 재어 빈 수기의 무게를 기록한다. 가열과정 후 얻어진 샘플은 2ml 의 에탄올와 10ml의 염산, GC 분석에서 내부표준물질로 사용될 heptadecanoic acid methyl ester 2mg 과 섞어 잘 흔들어 준 후 80℃ 의 water bath에서 40분간 반응시키면 색 변화를 관찰 할 수 있다. 그 후 30℃로 냉각후 마조니아관에 옮긴다. 시료를 모두 옮기기 위하여 ethanol 10ml로 행구어 준다. Ether 20ml과 perollium ether 20ml을 마조니아관에 넣은 후 격렬히 흔들어 준 후 가스 분출을 위하여 뚜껑을 잠시 열어 준다. 층 분리가 되면 상층액을 미리 준비한 수기에 담아준다. 이 과정을 3회 반복 실시한다.

분리된 상층용액에서 ether를 증발시키고 조지방 만을 남기기 위하여 ether 용액이 증발할 때까지 30℃의 water bath에서 evaporation 시킨다. 남아있는 ether 용액을 모두 제거하기 위하여 40℃ 오븐에서 20분간 유지시키고 decicator에 30 분간 넣어 조지방이 추출된 수기의 무게를 측정한다. 이 무게에서 빈 수기의 무게를 뺀 것은 추출된 조지방의 양으로 추정가능하다.

추출된 지방을 미량영양소는 GC, 향은 HPLC로 각각 분석하였다.

가. 미량영양소 나노무기담체의 가스 크로마토그래피(gas chromatography : GC) 분석 protocol

추출된 조지방은 GC 분석을 위하여 methylation하였다. 추출된 조지방은 BF₃-methanol과 혼합해 준 후 100℃ heating block에서 5분간 반응시킴으로 지방산의 carboxyl group을 제거한다. GC 용매로 사용되는 iso octane을 넣어 준 후 NaCl 포화용액과 격렬하게 흔들어 반응되지 않은 지방산을 제거한다. NaCl 포화용액을 제거하고 iso octane 층인 상층부를 취한다. 무수황산나트륨을 이용하여 취해진 상층액의 수분을 제거한 후 원심분리 한 후 용액만을 취해 GC 분석한다.

GC 분석 시 FID 검출기와 supelco 칼럼인 SP-2560 (100m×0.25mm×0.25 μ m)를 사용하였고 GC는 Agilent Technologies 사(Santa Clara, USA)의 Agilent 6890N 모델을 사용하였다. 주입구와 검출기 온도는 각각 250℃, 280℃로 하였고 오븐 온도는 180℃에서 40분간 유지 후 230℃까지 3℃/min로 승온시킨 후 230℃에서 10분간 유지하였다. 이동상은 질소(N₂)를 사용하였고, 분당 유속은 1.0ml/min, split ratio는 1:50으로 하였다. 시험용액 중의 지방산표준용액 peak와 샘플의 peak를 비교하여 지방산을 확인하였다. 정성시험법에 의해 얻은 각 지방산 peak의 면적과 내부표준물질의 면적 및 지방산의 양을 이용하여 정량하였다. 이 정량시험법은 식품의약품안전청이 발행한 식품공전 별책의 일반성분시험법에서 제시된 지방산의 가스 크로마토그래피에 의한 정성 및 정량법 중 제1법에 따라 지방산을 정량하였다.

나. 향 나노무기담체의 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography : HPLC) 분석 protocol

추출된 향 물질은 HPLC 분석으로 정량 분석 하였다. LC분석전 수기벽내에 남아있는 향 물질을 얻어내기 위해 전처리를 시도하였다. 0.2% metaphosphoric acid solution 5ml가량 넣은 후, 10-20분정도 sonicator로 분산시켜주었다. 용액 내에 녹아나온 향 물질을 수거하여 정량분석 하였다.

사용된 HPLC 기기는 UV/Mass detector가 장착된 기기를 사용하였으며(UV이용), 기기를 on시킨 후 method를 저장하였다. Column의 온도를 30℃로 유지시켰

으며, 이동상 유속은 분당 0.8ml을 흘려주었으며, UV의 wavelength는 260nm로 지정해 주었다.

Method지정 후, column을 안정화시켰다. Vanillic acid 측정 시 이동상을 흘려주기 전 첫 번째, 필터 시킨 증류수를 흘려준다. 압력peak가 일정하게 지속되면 두 번째, 필터 시킨 Acetonitrile(ACN) 용액을 흘려준다. 또 다시 압력peak가 일정하게 지속되면 마지막으로 측정할 이동상을 흘려준다. 완벽하게 안정화가 되면 sample측정을 시작하였다. 각 샘플의 측정 시간은 17분씩이었으며, vanillic acid peak의 면적으로 정량분석을 시행하였다. Vanillin 의 경우 vanillic acid 측정 때와 같은 column을 사용하였다. 이때, 측정에 사용될 이동상을 이용하여 column을 안정화 시켰다. HPLC의 용매라인 중 두개의 라인(0.01% Acetic acid; C line, Methanol; D line)을 이동상으로 사용하였다. 첫 번째 C line 40%, D line 60%를 5분 동안 흘리고, 두 번째 C line 50%, D line 50%를 7분 동안 흘리고, 세 번째 D line만 100% 14분 동안 흘린 후, 마지막으로 C line 40%, D line 60%를 19분 가량 흘려주어 압력peak가 일정하게 지속되면 sample측정 시작하였다.

제 2항. 나노무기담체에 캡슐화 된 미량영양소의 가열조건에 따른 열안정성 분석

가. 실험재료

1) 시약 및 실험재료

CLA가 담지 된 나노무기담체를 반죽하기 위하여 사용한 밀가루는 CJ(주) 백설 밀가루를 사용하였고, 반죽 후 180℃의 mineral oil pure(Acros organics, Geel, Belgium)에서 가열처리 하였다. 가열처리 된 시료에서 조지방을 추출하기 위하여 hydro chloric acid(Junsei, Tokyo, Japan), 에탄올(J. T Baker, Phillipsburg, USA), Diethyl ether(Junsei, Tokyo, Japan), Petroleum ether(Wako, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 그 후 methylation을 위하여 14% 트리플루오로보란메탄올(Boron Trifluoride (BF₃) -Methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 이소옥탄(J. T Baker, Phillipsburg, USA), 염화나트륨(Wako, Tokyo, Japan), 무수황산나트륨(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Butylhydroxytoluene (BHT, Junsei, Tokyo, Japan)를 사용하였다. GC 분석을 위해 내부표준물질인 methyl heptadecanoate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), CLA 표준물질인 conjugated linoleic acid methyl ester(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하였다.

2) 실험기기

CLA가 담지 된 나노무기담체의 무게를 재기 위하여 사용한 저울은 직시저울 CB-230(Daehyun, Seoul, Korea)을 사용하였고, 가열조건을 위해 수조(Schott Duran, Mainz, Germany)를 사용하였다. 180°C 온도를 유지하기 위하여 heating plate(MSH-20D model, Daihan Scientific, Seoul, Korea)를 사용하였다. 그 후 시료의 조지방 추출 시 시료를 곱게 갈기 위하여 mixer를 사용하였고 마조니아관과 250ml Halex 구수기를 사용하였다. 추출된 지방 용액의 evaporation을 위하여 digital water bath(EYELA, Tokyo, Japan)와 rotary evaporator(N-1000 model, EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 그 후 methylation을 위하여 10ml tube(Nalgene, New York, USA)와 heating plate(Wealtec, Sparks, USA)를 사용하였다. 시료의 분산을 위하여 Haul Micro-12 원심분리기(Changshin, Seoul, Korea)를 이용하였다. Methylation 된 CLA는 FID 검출기와 supleco SP-2560 칼럼(100m×0.25mm×0.25 μ m)이 장착된 가스 크로마토그래피(Agilent Technologies, Santa Clara, USA)를 이용하여 분석하였다.

나. 실험방법

1) Sample preparation

CLA가 담지 된 나노무기담체를 각각 밀가루와 반죽하여 180°C에서 2분간 가열 처리하였다. 밀가루 반죽만을 준비하여 대조군으로 사용하였다(표 6).

표 6. 가열조건 분석에 사용한 CLA가 함유된 나노무기담체의 반죽 비율.

	밀가루(g)	물(ml)	시료
CLA 반죽	5	3	0.5ml
CLA가 담지 된 나노무기담체 반죽	5	5	1g
대조군	5	3	-

2) 조지방 추출

조지방 추출의 효율을 높이기 위하여 가열처리 후 얻어진 반죽을 믹서로 곱게 간 후 일정량을 취해 식품공전에 나와 있는 조지방 추출법 중 산 분해법에 기초하여 실험하였다. 250ml 구수기를 100℃ 오븐에 1시간 동안 넣어 둔 후 decicator에서 30 분간 식혔다. 그 후 무게를 재어 빈 수기의 무게를 기록하였다. 가열처리 후 얻어진 샘플은 2ml의 에탄올과 10ml의 염산, GC 분석에서 내부표준물질로 사용될 heptadecanoic acid methyl ester 2mg 과 섞어 잘 흔들어 준 후 80℃의 water bath에서 40분간 반응시키면 색 변화를 관찰 할 수 있었다. 그 후 30℃로 식혀 준 후 마조니아관에 옮겼다. 시료를 모두 옮기기 위하여 ethanol 10ml로 헹구어 주었다. Ether 20ml과 perollium ether 20ml을 마조니아관에 넣은 후 격렬히 흔들어 준 후 가스 분출을 위하여 뚜껑을 잠시 열어 주었다. 층 분리가 되면 상층액을 미리 준비한 수기에 담았다. 이 과정을 3반복 실시하였다.

분리된 상층용액에서 ether를 날리고 조지방 만을 남기기 위하여 ether 용액이 모두 증발될 때까지 30℃의 water bath에서 evaporation 시킨다. 남아있는 ether 용액을 모두 제거하기 위하여 40℃ 오븐에서 20분간 유지시키고 decicator에 30 분간 넣어 조지방이 추출된 수기의 무게를 측정한다. 이 무게에서 빈 수기의 무게를 뺀 것은 추출된 조지방의 양으로 추정가능하다.

3) 추출된 미량영양소의 methylation

추출된 조지방의 50μl를 취하여 methylation을 실시하였다. 샘플 50μl에 BF3-methanol 2ml을 넣어 10 초간 격렬히 혼합하였다. 100℃ heating block에서 5분간 반응시킨 후 30℃로 냉각 시켰다. Isooctane 1ml과 포화 NaCl 수용액 5ml을 넣은 후 30 초간 격렬하게 흔들고 상층액을 취하였다. 취해진 상층액의 수분 제거를 위하여 ep tube에 무수황산나트륨을 덜어 놓은 후 5min간 원심분리 한 후 용액만을 취해 GC 분석하였다.

4) 가스 크로마토그래피(Gas chromatography : GC) 분석

GC 분석은 FID 검출기와 supelco 칼럼인 SP-2560 (100m×0.25mm×0.25μm)이 장착된 Agilent Technologies 사(Santa Clara, USA)의 Agilent 6890N 모델을 사용하였다. 주입구와 검출기 온도는 각각 250℃, 280℃로 하였고 오븐 온도는 180℃에서 40분간 유지 후 230℃까지 3℃/min로 승온시킨 후 230℃에서 10분간 유지하였다. 이동상은 질소(N₂)를 사용하였고, 분당 유속은 1.0ml/min, split ratio는 1:50으로 하였다. 시험용액 중의 지방산표준용액 peak와 샘플의 peak를 비교하여 지방산을 확인하였다. 정성시험법에 의해 얻은 각 지방산 peak의 면적과 내

부표준물질의 면적 및 지방산의 양을 이용하여 정량하였다. 이 정량시험법은 식품의약품안전청이 발행한 식품공전 별책의 일반성분시험법에서 제시된 지방산의 가스 크로마토그래피에 의한 정성 및 정량법 중 제1법에 따라 지방산을 정량하였다.

다. 실험결과

CLA 원물질과 CLA가 담지 된 나노무기담체의 가열 조건에 따른 안정성 확인 결과, 시간과 온도에 대한 안정성 결과와 마찬가지로 나노캡슐화 된 CLA의 안정성이 높은 것을 확인하였다.

측정하려는 CLA 시료의 조지방 추출 및 전처리 중의 손실을 보정해 주기 위하여 CLA와 유사한 특성을 가지고 있으면서 GC상 peak의 위치가 겹치지 않는 methyl heptadecanoate를 내부표준물질로 사용하였다. CLA 표준물질의 농도를 0.05, 0.1, 0.5, 2.5, 5, 10ppm이 되도록 만들고 내부표준물질을 넣어주었다. 그 후 각 농도별 GC를 찍은 결과를 표준곡선으로 표시하였다(그림 43).

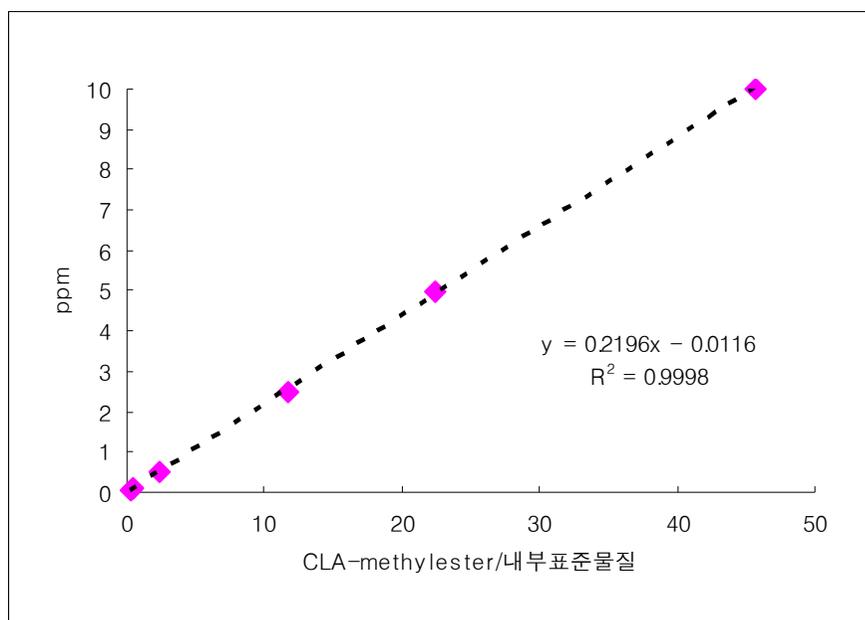


그림 43. CLA표준물질과 내부표준물질의 표준곡선.

각각의 시료 내 총 CLA의 함량을 동일하게 넣어주기 위하여 HPLC 및

TG-DTA 곡선을 통해 밝혀진 CLA가 담지 된 나노무기담체 내의 CLA 함량이 42.13%인 것을 계산하여 반죽하였다. 따라서 CLA을 넣어 만든 시료 반죽에는 CLA 0.5ml을 첨가하였고 CLA가 함유된 나노무기담체를 넣어 만든 시료 반죽에는 1.08g의 CLA가 함유된 나노무기담체를 첨가하였다.

CLA 원물질과 CLA가 함유된 나노무기담체에서 각각 추출된 조지방 중의 CLA를 methylation 시킨 후 GC를 찍은 결과를 위의 표준곡선에 대입하여 함유한 CLA의 함량을 계산한 결과 CLA 원물질과 CLA가 함유된 나노무기담체 중 남아있는 CLA의 함량을 graph로 표시하였다(그림 44).

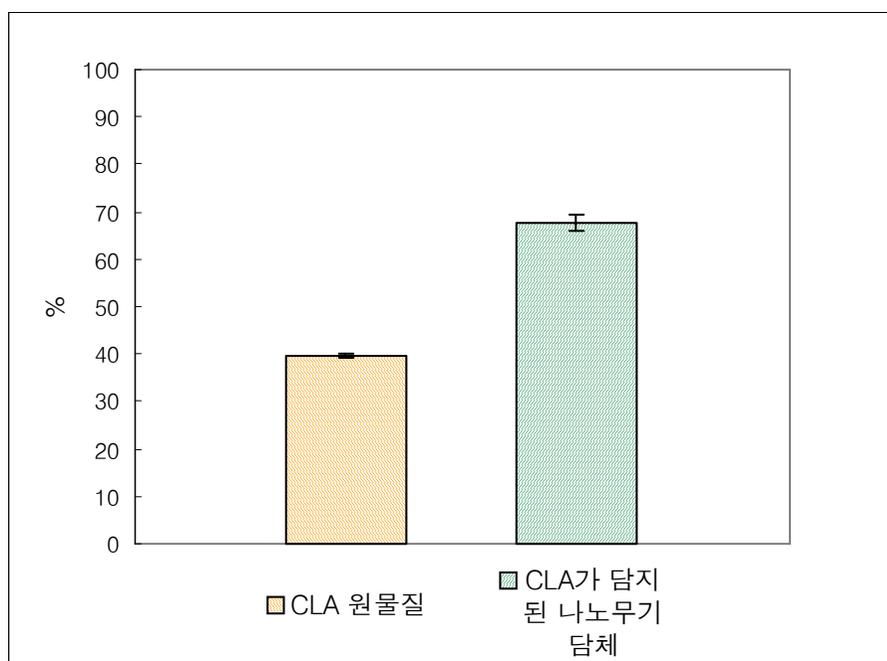


그림 44. CLA 원물질과 CLA가 담지된 나노무기담체의 가열조건 후 남아있는 CLA 함량 비교.

가열조건 하에서 나노무기담체에 함유된 미량영양소의 열안정성을 측정하기 위한 수행 결과, CLA가 담지된 나노무기담체 내의 CLA의 안정성이 더 높아진 것을 확인하였다. 나노 캡슐화 기술로 인해 미량영양소의 열안정성이 높아졌음을 알 수 있다.

제 3항. 나노무기담체에 캡슐화 된 향 물질의 가열조건에 따른 열안정성 분석

가. 실험재료

1) 시약 및 실험재료

반죽에 사용된 밀가루는 CJ(주)의 백설 밀가루를 사용하였으며, 실험 sample로는 VA가 담지 된 나노무기담체와 VA, V가 모두 담지 된 나노무기담체를 사용하였다. 향 물질의 추출을 위해 사용된 시약은 Acros Organics의 미네랄 오일(Mineral Oil, Acros organics, Geel, Belgium), 염산(hydrochloric acid, Junsei, Tokyo, Japan), 에탄올(J. T Baker, Phillipsburg, USA), diethyl ether(Junsei, Tokyo, Japan), petroleum ether(Wako, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 향 물질 추출의 HPLC 분석을 위한 전처리에 사용된 시약은 메타인산(Meta-phosphoric acid, Yacuri pure chemical, Kyoto, Japan)을 사용하였다. HPLC 분석을 위해 사용된 이동상은 VA의 경우 Acetonitrile(J. T Baker, Phillipsburg, USA) 과 물(중류수) 혼합용액(15:85)을 사용하였고, V의 경우 0.01% 아세트산(acetic acid, Dae-Jung, Seoul, Korea)과 메탄올(methanol, Dae-Jung, Seoul, Korea)을 사용하였다.

2) 실험기기

Vanillic acid(VA) 및 vanillin(V)가 담지 된 나노무기담체의 무게를 측정하기 위하여 사용한 저울은 직시저울 CB-230(Daehyun science, Seoul, Korea)을 사용하였고, 가열처리를 위하여 수조(Schott Duran, Mainz, Germany)를 사용하였다. 180°C 온도를 유지하기 위하여 MSH-20D heating plate(Daihan Scientific, Seoul, Korea)를 사용하였다. 그 후 시료의 향 물질 추출을 위하여 시료를 곱게 갈기 위하여 mixer를 사용하였고 마조니아관과 250ml Horex 구수기를 사용하였다. 추출된 지방 용액의 evaporation을 위하여 digital water bath(EYELA, Tokyo, Japan)와 rotary evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 그 후 HPLC 전처리를 위하여 초음파분쇄기(ultra sonicator, IKA Labor Technik, Staufen, Germany)를 사용하였다. 정량분석을 위해 C₁₈ column(Agilent Technologies, Santa Clara, USA)이 장착된 HPLC(Agilent 1100 series model, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)를 사용하였다.

나. 실험방법

1) Sample preparation

Vanillic acid(VA)가 담지된 나노무기담체(VA-LDHs; Zn_2Al -VA-LDH, Zn_3Al -VA-LDH, Zn_4Al -VA-LDH)와 VA, V(Vanillin) 모두 담지된 나노무기담체(VA/V-LDHs; Zn_2Al -VA/V-LDH, Zn_3Al -VA/V-LDH, Zn_4Al -VA/V-LDH)를 각각 밀가루와 반죽하여 180°C에서 2분간 가열처리하여 준비하였다. 또한, 밀가루 반죽만을 준비하여 대조군으로 사용하였다(표 7).

표 7. 가열조건 분석에 사용한 VA 및 V가 함유된 나노무기담체의 반죽 비율.

	밀가루(g)	물(ml)	시료(mg)
VA-LDHs	0.5	0.3	10
VA/V-LDHs	0.5	0.3	10
대조군	5	3	-

2) 향 추출

향 추출의 효율을 높이기 위하여 가열처리를 통해 얻어진 반죽을 믹서로 곱게 간 후 일정량을 취해 식품공전에 제시된 산 분해측정법에 기초하여 실험하였다. 250ml 구수기를 100°C 오븐에 1시간 동안 넣어 둔 후 decicator에서 30분간 식혔다. 그 후 무게를 재어 빈 수기의 무게를 기록하였다. 가열처리 후 얻어진(곱게 갈아놓은) 샘플은 2ml의 에탄올 10ml의 염산을 첨가한 후 잘 흔들어 준 후 80°C의 water bath에서 40분간 반응시키면 색 변화를 관찰할 수 있다. 그 후 30°C water bath에서 식혀 준 후 마조니아관에 옮겼다. 시료를 모두 옮기기 위하여 ethanol 10ml로 헹구어 주었다. Ether 20ml과 perollium Ether 20ml을 마조니아관에 넣은 후 격렬히 흔들어 준 후 가스 분출을 위하여 뚜껑을 잠시 열어 주었다. 층 분리가 되면 상층액을 미리 준비한 수기에 담았다. 이 과정을 3반복 실시하였다.

분리된 상층용액에서 ether를 날리고 향 물질만을 남기기 위하여 ether 용액을 모두 증발될 때까지 30°C의 water bath에서 evaporation 시켰다. 남아있는 ether 용액을 모두 제거하기 위하여 40°C 오븐에서 20분간 유지시키고 decicator에 30분간 넣어 향이 추출된 수기의 무게를 측정하였다. 이 무게에서 빈 수기의 무게를 빼면 추출된 향의 양으로 추정가능하다.

3) 추출된 향의 HPLC 전처리

향이 추출된 수기에 5ml의 0.2% meta-phosphoric acid 용액을 넣은 후 잘 흔들어주고 sonicator로 벽면에 묻어 있는 물질까지 녹여주었다(약 20분간 sonicator실시). 녹인 용액을 10ml vial에 넣은 후, 그중 일정량을 취하여 실린지 필터로 필터 시킨 후 필터 시킨 용액을 HPLC 분석하였다.

4) 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석

HPLC 기기는 UV/Mass가 장착된 기기를 사용하였으며 (UV), 기기를 on시킨 후 method를 저장하였다. column의 온도를 30°C로 유지시켰으며, 이동상 유속은 분당 0.8ml을 흘려주었으며, UV의 wavelength는 260nm로 지정해 주었다.

Method지정 후, column을 안정화시켰다. Vanillic acid 측정 시 이동상을 흘려주기 전 첫 번째 필터 된 증류수를 흘려준다. 압력 peak가 일정하게 지속되면 두 번째 필터 된 acetonitrile(ACN) 용액을 흘려준다. 압력 peak가 일정하게 지속되면 마지막으로 측정할 이동상을 흘려준다. 완벽하게 안정화가 되면 sample측정을 시작하였다. 각 샘플의 측정 시간은 17분씩이었으며, vanillic acid peak의 면적으로 정량분석을 시행하였다. Vanillin의 경우 vanillic acid 측정 때와 같은 column을 사용하였다. 이때, 측정에 사용될 이동상을 이용하여 column을 안정화시켰다. HPLC의 용매라인 중 두 라인(0.01% Acetic acid; C line, Methanol; D line)을 이동상으로 사용하였다. 첫 번째 C line 40%, D line 60%를 5분 동안 흘리고, 두 번째 C line 50%, D line 50%를 7분 동안 흘리고, 세 번째 D line만 100% 14분 동안 흘린 후, 마지막으로 C line 40%, D line 60%를 19분 동안 흘려주어 압력 peak가 일정하게 지속되면 sample측정 시작하였다.

다. 실험결과

가열조건 하에서 나노무기담체에 담지된 향 물질의 열안정성을 측정한 결과, 향 물질의 안정성이 시간, 온도 조건 처리 후에도 유지됨을 관찰할 수 있었다. VA만 담지된 나노무기담체의 경우, 가열조건 처리 후 남아있는 VA의 함량이 각각 13.52%(Zn₂Al-VA-LDH), 16.52%(Zn₃Al-VA-LDH), 21.34%(Zn₄Al-VA-LDH)였으며, VA와 V 모두 담지된 나노무기담체의 경우 가열조건 처리 후 남아있는 VA의 함량이 각각 68.94%(Zn₂Al-VA/V-LDH), 52.15%(Zn₃Al-VA/V-LDH), 68.74%(Zn₄Al-VA/V-LDH), V의 함량이 각각 50.00%, 32.20%, 49.29%였다.

위의 결과로 보아 향 물질이 담지된 나노무기담체를 가열조건 처리 후에도 향

물질의 안정성이 확보됨을 알 수 있다. 또한, 나노캡슐화 기술로 인해 향 물질의 저장이 이루어 졌음을 알 수 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

구 분	평가의 착안점	달성도(%)
1차년도	·나노무기담체 합성	100
	·혼성체내로부터의 향 발출 특성 측정	100
	·혼성체내의 미량영양소 안정성 측정	100
	·향과 조성물의 향 및 미량영양소의 반응성 규명	100
2차년도	·미량영양소의 열 안정성을 위한 나노무기담체의 최적화 및 담지조건 확립	100
	·미량영양소/나노무기담체 혼성체의 가열조건 중의 열 안정성 특성 규명	100
	·식품과 혼합 후 나노무기담체의 분석 protocol 확립	100
최종평가	·나노무기입자의 합성	100
	·나노무기담체의 합성 조건 및 가열조건 중 열안정성 규명	100

제 2절 관련 분야의 기술 발전에의 기여도

- 본 연구에서 개발된 나노 캡슐화 기술을 이용한 향 나노무기담체는 식품에 적용하여 기능성식품으로 활용할 수 있다. Vanillin과 vanillic acid는 가장 대표적인 flavor compound이므로 개발된 향 나노무기담체 기술은 다양한 식품에 적용 및 활용이 가능할 것으로 사료된다. 또한, 향 나노무기담체의 열 안정성을 규명함으로써 높은 온도의 “열 가공 식품”에도 활용이 가능하다.

- 나노 캡슐화 기술을 이용하여 생체친화성 무기화합물인 hydrated zinc oxide 를 미량영양소인 conjugated linoleic acid(CLA)에 적용한 기술은 CLA 이외의 다양한 미량영양소의 캡슐화에 활용할 수 있다. 예를 들어, EPA, DHA 등 다양한 건강기능성 원료에 나노기술(nanotechnology)를 도입하여 기능성 성분의 저장성과 안정성 향상이 가능하여 새로운 건강기능식품을 개발할 수 있다.
- 식품과 미량영양소 분석기술의 개발로 식품 중 미량영양소의 분석이 필요한 경우 이용가능하며 본 연구에서 시행한 온도/시간 및 가열조건 중의 열안정성 실험은 다양한 소재의 열안정성을 분석하는데 이용 가능하다. 또한 개발된 분석기술 이용하여 분석인력 및 경비의 절감효과를 기대할 수 있다.
- 나노 캡슐화 기술로 개발된 다양한 기능성 소재는 식품분야 이외에 의약품이나 화장품 등에 활용될 수 있다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

- 기능성 미량영양소 및 향 나노무기담체 개발에 따른 부가가치가 높은 다양한 기능성 식품의 개발
- 다른 기능성 물질에 나노 캡슐화 기술을 도입하여 다양한 종류의 기능성 나노 무기담체 개발
- 향 나노무기담체 기술 특허 출원
- 산업체에 기능성 소재 생산기술 이전
- 개발된 기능성 소재를 다양한 식품에 적용하여 부가가치가 높은 제품을 개발

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 국내외 과학 기술 정보

- 현재 CLA에 크롬과 L-카르니틴을 등의 영양소를 함유시킨 CLA 복합제가 국내에서 시판되고 있음. 이러한 CLA, GLA, EPA 등 건강기능성 원료로써의 미량영양소는 섭취에 불쾌한 이미 혹은 이취 등으로 인하여 캡셀에 쌓여서 다량의 물과 함께 섭취하고 있는 실정임.
- CLA는 antioxidant(항산화효과), anticarcinogenic(항암효과), antiatherogenic(항동맥경화), antidiabetic(당뇨예방), antiadipogenic 등의 효과가 탁월한 것으로 알려짐. 다양한 효능연구 및 합성연구가 많이 진행되어왔음.
- 1935년 Booth et al. 에 의해 지방산이 230nm UV 영역에서 흡수력이 증가됨을 발견함. 그 후, 1939년 Moore에 의해 지방산의 UV 흡수는 conjugated double bond에 의한 결과임을 밝혀냄. CLA에 대한 UV 및 Raman 등의 분광학적 연구가 활발히 진행중임.
- Vanillin은 antioxidant(항산화), antimicrobial(항균성)의 특징을 나타내기 때문에 식품방부제로서 사용가능하며 food industry(식품 산업), perfumery(향료 기술), cosmetics(화장품 산업), 의약품 및 농예화학 제품 제조 산업에 매우 중요한 화합물임.
- Vanillin의 알데히드(aldehyde) 그룹이 적혈구 세포내의 헤모글로빈 그룹과의 공유결합으로 인해 적혈구의 항 겸상효과를 높힐 것으로 예상되고 있으며 상 적혈구 빈혈증을 치료하는 잠재적인 물질이라 평가됨.
- 합성 vanillin (synthetic vanillin)은 향료로서 food 또는 non-food에 적용 된다. 현재, 전 세계적으로 생산되는 합성 vanillin의 약 50%정도는 herbicides(제초제), antifoamingagents(항기포제), 또는 papaverine(파파베린 : 아편에 함유된 알칼로이드), l-dopa, l-methyldopa(메틸도파 : 혈압강화제), antimicrobial agent(항균제), trimethoprim(트리메토포림 : 살균약, 항말라리아 제약) 같은 약물의 생산을 위해 화학 , 제약 산업에 사용됨.

- Vanillic acid는 UV 흡수력(200-400nm)이 뛰어나 선크림의 원료로 사용됨. 현재 UV 흡수제 (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid, 4-hydroxy-3-methoxy-cinnamic acid, p-aminobenzoic acid, urocanic acid)는 유기 물질로서 이는, 매우 안정하지 않으며 고분자 물질 외부로 쉽게 용해되는 경향이 있다. 그리하여, 다량의 양을 사용할 경우 안정성이 문제가 됨. 이 문제는 UV 흡수제를 Zeolites 또는 무기담체(inorganic layered materials)의 interlayer 안으로 삽입하는 방안을 모색함으로써 극복함. Intercalation(삽입)으로 얻어진 새로운 UV 흡수제 물질은 UV 흡수 능력이 매우 뛰어났으며, 공기 중에서의 촉매 활성이 낮음을 보임. 또한, Host 물질은 외부로부터 UV 흡수제의 흡수력을 보호하는 역할을 함.
- 또한 나노기술(nanotechnology)은 Indol-3-acetic acid(IAA)는 auxin(옥신:식물호르몬)의 일종으로 매우 중요한 native auxin에도 적용되며 나노테크놀로지를 이용한 다양한 캡슐화가 연구중임.

제 7 장 참고 문헌

Booth, R.G., S.K. Kon, W.J. Dann and T. Moore, 1935. A study of seasonal variation in butter fat. II. A seasonal spectroscopic variation in the fatty acid fraction. *J. Biochem.* 29, 133-137.

R.C. Khanal and T.R. Dhiman. 2004. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid (CLA): A Review. *Pakistan Journal of Nutrition.* 3 (2), 72-81.

Moore, T., 1939. Spectroscopic changes in fatty acids. VI. General. *J. Biochem.* 33, 1635-1638.

N.J. Walton et al. 2003. Molecules of interest Vanillin. *Phytochemistry.* 63, 505-515.

Bruno Bernuy, Marc Meurens, Eric Mignolet, Yvan Larondelle. 2008. Performance Comparison of UV and FT-Raman Spectroscopy in the Determination of Conjugated Linoleic Acids in Cow Milk Fat. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1159-1163.

Jean-Michel Gaullier and Ola Gudmundsen. 2006. An overview of the effects of conjugated linoleic acid on body weight and body composition in humans. *Advances in conjugated linoleic acid research.* vol 3, 203-208

S L Melton. 1990. Effects of feeds on flavor of red meat: A review. *Journal of Animal Science.* 68, 4421-4435

N C Shantha, W G Moody and Z Tabeidi. 1997. A research note: conjugated linoleic acid concentration in semimembranosus muscle of grass- and grain-fed and zeranol-implanted beef cattle. *Journal of Muscle Foods.* 8, 105-110.

ThomE, Wadstein J and O Gudmundsen. 2001. Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *J. Int. Med. Res.* 29,

392-396.

Gaullier J M, J Halse, K Hoye, K Kristiansen, H Fagertun, H Vik and Gudmundsen. 2004. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 Y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 1118-1125.

Jun-Jie Yin, Liangping Yu, Martin P. Yurawecz, John A G Roach, Magdi M Mossoba, Lingli Yu and John K G Kramer. 2006. An overview of the effects of conjugated linoleic acid on body weight and body composition in humans. *Advances in conjugated linoleic acid research.* vol 3, 183-202.

R L Griebenow, F A Martz and R E Morrow. 1997. Forage-based beef finishing systems: A review. *Journal of Production Agriculture.* 10, 84-91.

J L Atwood, J E D Davis, D D MacNicol, F Vogtle. 1996. Solid-state supramolecular chemistry: two- and three- dimensional inorganic networks. *Comprehensive supramolecular Chemistry.* Vol 7. 1st edition. Pergamon. Oxford.

Korean food and drug administration. 2007

Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some emulsifiers and stabilizers and certain other substances (tenth report of the expert committee). *FAO Nutrition meetings report series 43, WHO technical report series 373.*

P R Griffiths and J A Aethers. 1983. Fourier transformation infrared spectroscopy. *Science* 222(4621):297-302.

Hilditch T P and H Jasperson. 1941. Milk fats from cows fed on fresh pasture and on ensiled green fodder. I. Observations on the component fatty acids. *J. Soc. Chem. Ind.* 60, 305-310.

Hilditch T P and H Jasperson. 1945. The polyethenoid acids of the

C18 series present in milk and grass fats. *J. Soc. Chem. Ind.* 64, 109-111.

Czauderna M and Kowalczyk J. 2001. Separation of some mono-, di- and tri-unsaturated fatty acids containing eighteen carbon atoms by HPLC and photodiode array detection. *J. Chromatogr. B.* 760, 165-178.

Jackson J E, Paschke R F, Tolberg W E, Boyd H M and Wheeler D H. 1952. Isomers of linoleic acid. Infrared and ultraviolet properties of methyl esters. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 29, 229-234.

Hocking, M.B., 1997. Vanillin: synthetic flavoring from spent sulfite liquor. *J. Chem. Educ.* 74, 1055-1059.

Burri, J., Graf, M., Lambelet, P., Löffler, J., 1989. Vanillin: more than a flavouring agent—a potent antioxidant. *J. Sci. Food Agric.* 48, 49-56.

E.A. Velcheva, B.A. Stamboliyska. 2004. IR spectral and structural changes caused by the conversion of 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde (vanillin) into the oxanion. *Spectrochimica Acta Part A* 60, 2013-2019.

Clark, G.S. 1990. A profile: an aroma chemical phenethyl alcohol. *Perfum. flavor.* 15, 37-44.

D. Farthing et al. 1999. High-performance liquid chromatographic method for determination of vanillin and vanillic acid in human plasma, red blood cells and urine. *J. Chromatogr. B* 726, 303-307.

D.J. Abraham, A.S. Mehanna, F.C. Wireko, J. Whitney, R.P. Thomas, E.P. Orringer, 1991. Vanillin, a Potential Agent for the Treatment of Sickle Cell Anemia. *Blood* 77, 1334-1341.

Y. Feng et al. 2006. Synthesis and characterization of a UV absorbent-intercalated Zn-Al layered double hydroxide Polymer Degradation and Stability. 91, 789-794.

He Q, Yin S, Sato T. 2004. Synthesis and photo-chemical properties of zinc-aluminum layered double hydroxide/organic UV ray absorbing molecule/silica nanocomposites. *J. Phys. Chem. Solids.* 65, 395-402.

Ramamurthy V. 1994. Organic guests within zeolites: xenon as a photophysical probe. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 1345-1351.

Ramamurthy V, Eaton DF. 1994. Perspectives on solid-state host-guest assemblies. *Chem. Mater.* 6, 1128-1136.

A.M. El-Toni et al. 2004. Depression of deintercalation of 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid from Zn₂Al layered double hydroxide by direct coating with silica. *Materials Letters.* 58, 3149-3152.

A.M. El-Toni et al. 2005. Silica coating of Zn₂Al / 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid nanocomposites via seeded polymerization technique. *Materials. Chemistry and Physics.* 89, 154-158.

Q. He et al. 2004. Synthesis and photochemical properties of zinc-aluminum layered double hydroxide/organic UV ray absorbing molecule/silica nanocomposites. *J. Phy. Chem. Sol.* 65, 395-402.

J. H. Choy, J. H. Yang, Y. S Han, H. Tateyama. 2001. Intercalation of alkylammonium cations into expandable fluorine mica and its application for the evaluation of heterogeneous charge distribution. *J. Mater. Chem.* 11, 1305-1312.

J.-H. Choy et al. 2004. Layered double hydroxide as an efficient drug reservoir for folate derivatives. *Biomaterials.* 25, 3059-3064.

Choy JH, Kwak SY, Park JS, Jeong YJ, Josik P. 1999. Intercalative nanohybrids of nucleoside monophosphates and DNA in layered metal hydroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1399-1400.

Sung-Ho Hwang et al. 2001. Intercalation of Functional Organic Molecules with Pharmaceutical, Cosmeceutical and Nutraceutical Functions into Layered Double Hydroxides and Zinc Basic Salts Bull. Korean Chem. Soc. Vol. 22, No. 9.

Inacio J, Taviot-Gue'ho C, Forano C, Besse JP. 2001. Adsorption of MCPA pesticide by MgAl-layered double hydroxides. Appl. Clay. Sci. 18, 255-264.

Tagaya H, Ogata A, Kuwahara T, Ogata S, Karasu M, Kadokawa J, et al. 1996. Intercalation of colored organic anions into insulator host lattices of layered double hydroxides. Microporous. Mater. 7, 151-158.

Zhao Y, Li F, Zhang R, EvansDG, Duan X. 2000. Preparation of layered double hydroxide nanomaterials using a method with separate nucleation and aging steps. Chem. Mater. 14, 4286-4291.

Hussein MZB, Yun-Hin T-Y, Tawang MMB, Shahadan R. 2002. Thermal degradation of (zinc-aluminium-layered double hydroxide dioctyl sulphosuccinate) nanocomposite. Mater. Chem. Phys. 74, 265-271.

P. Beaudot et al. 2004. Intercalation of noble metal complexes in LDH compounds. J. Sol. Stat. Chem. 177, 2691-2698.

Li F, Zhang LH, Evans DG, Forano C, Duan X. 2004. Structure and thermal evolution of Mg-Al layered double hydroxide containing interlayer organic glyphosate anions. Thermochim. Acta. 424, 15-23.

H. Zhang et al. 2005. A magnetic organic-inorganic composite: Synthesis and characterization of magnetic 5-aminosalicylic acid intercalated layered double hydroxides. J. Sol. Stat. Chem. 178, 3485-3493.

M. Nachtegaal, D.L. 2004. Sparks Effect of iron oxide coatings on zinc sorption mechanisms at the clay-mineral/water interface. J. Colloid.

Interface. Sci. 276, 13-23.

Hussein MZ, Zainal Z, Yahaya AH. 2002. Controlled release of a plant growth regulator, α -naphthaleneacetate from the lamella of Zn-Al-layered double hydroxide nanocomposite. J. Control. Release. 82, 417-427.

Aisawa S, Takahashi S, Ogasawara W, Umetsu Y, Narita E. 2001. Direct intercalation of amino acids into layered double hydroxides by coprecipitation. J. Sol. Stat. Chem. 162, 52-62.

V. Ri6es, M. Angeles Ulibarri. 1999. Layered double hydroxides (LDH) intercalated with metal coordination compounds and oxometalates. Coordination Chemistry Reviews. 181, 61-120.

Werner J. Meudt, T. Powell Gaines. 1967. Studies on the Oxidation of Indole-3-Acetic Acid by Peroxidase Enzymes. I. Colorimetric Determination of Indole-3-Acetic Acid Oxidation Products. Plant Physiol. 42, 1395-1399.

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 아니 됩니다.