

11-1543  
000-001  
702-01

발간등록번호

11-1543000-001702-01

생체이용률 향상을 위한 난용성 소재의 가용화 기술개발 및 상품화

2017

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

# 생체이용률 향상을 위한 난용성 소재의 가용화 기술 개발 및 상품화 최종보고서

2017. 04. 06.

주관연구기관 / 서울대학교

협동연구기관 / 서울과학기술대학교

건국대학교

(주) 대상

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “생체이용물 향상을 위한 난용성 소재의 가용화 기술개발 및  
상품화”(개발기간 : 2013. 11. 20. ~ 2016. 11. 19.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 04. 06.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단

(대표자) 김 성 철



협동연구기관명 : 서울과학기술대학교 산학협력단(대표자) 박 의 권



건국대학교 산학협력단

(대표자) 서 정 향



참여기관명 : 주식회사 대상

(대표자) 임 정 배



주관연구책임자 : 장 판 식

협동연구책임자 : 최 승 준

협동연구책임자 : 백 현 동

참여기관책임자 : 이 규 환

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	313021-3	해당단계 연구기간	2013.11.20. ~ 2016.11.19.	단계구분	(1단계)/(1단계)
연구사업명	중사업명	고부가가치식품기술개발사업			
	세부사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	생체이용률 향상을 위한 난용성 소재의 가용화 기술개발 및 상품화			
연구책임자	장관식	해당단계 참여 연구원 수	총: 78명 내부: 11명 외부: 67명	해당단계 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 900,000천원 계: 1,800,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 78명 내부: 11명 외부: 67명	총연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 900,000천원 계: 1,800,000천원
연구기관명 및 소속부서명	1세부: 서울대학교 산학협력단(장관식) 1협동: 서울과학기술대학교 산학협력단(최승준) 2협동: 건국대학교 산학협력단(백현동)			참여기업명 3협동 : 주식회사 대상(이규환)	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 분지아미노산의 생체이용률 개선방법으로서 나노/마이크로에멀전 제조 및 리포솜-탑재 미세캡슐화 기술을 개발함(SCI급 논문: 14편 게재, 국내특허출원: 3건, PCT출원: 1건, 국내특허등록: 1건, 기술이전: 1건)</li> <li>● 분지아미노산 생체이용률 개선 기술을 적용한 소재를 <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> 및 <i>in vivo</i> 모델에서 생체이용률/생리활성을 종합적으로 평가함 (SCI급 논문: 1편 게재, 국내특허출원: 3건)</li> <li>● 생체이용률이 개선된 분지아미노산 소재의 제품규격기준 설정, 대량생산 체제 구축 및 공정 표준화를 통해 산업화 함(제품화: 4종)</li> </ul>				보고서 면수	407

## 〈 요약문 〉

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p><b>■ [포괄적 과제목표]</b></p> <p>본 연구는 난용성 분지 아미노산의 생체이용률을 제고하기 위한 나노/마이크로에멀전 제조 및 리포솜-탑재 미세캡슐화 기술을 개발하고 생체이용률/생리활성을 종합적으로 평가하고자 함. 또한, 이를 적용한 소재의 대량생산 체제 및 공정표준화를 구축함으로써, 난용성 생리활성 소재의 실용화 기술개발 및 제품화를 달성하고자 함.</p> <p><b>■ [연구의 세부목표]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 분지아미노산의 생체이용률 개선방법으로서 나노/마이크로에멀전 제조 및 리포솜-탑재 미세캡슐화 기술을 개발함.</li> <li>● 분지아미노산 생체이용률 개선 기술을 적용한 소재를 <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> 및 <i>in vivo</i> 모델에서 생체이용률/생리활성을 종합적으로 평가함.</li> <li>● 생체이용률이 개선된 분지아미노산 소재의 제품규격기준 설정, 대량생산 체제 구축 및 공정 표준화를 통해 산업화 함.</li> </ul> <p><b>■ [연구내용]</b></p> <p>○ [제1세부] 분지아미노산-봉입 리포솜 제조 및 이를 탑재한 방출제어형 미세캡슐화 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 분지아미노산-봉입 리포솜 설계 및 물리화학적 특성 분석/개선</li> <li>● 분지아미노산-봉입 리포솜의 미세캡슐화를 위한 공정조건 최적화 및 구조분석</li> <li>● 리포솜-탑재 미세캡슐의 저장안정성 평가 및 <i>in vitro</i> 방출제어 특성 규명</li> </ul> <p>○ [제1협동] 기능성 분지아미노산의 생체이용 극대화 맞춤형 소재 및 식품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 난용성 생리활성 물질의 식품소재화를 위한 고안정성 유화 기술 개발</li> <li>● 나노/마이크로에멀전 제조 기술을 통한 기능성 분지아미노산 중 발린, 류신 및 이소류신의 가용화</li> <li>● 나노/마이크로에멀전 제조 기술을 통하여 가용화된 발린, 류신 및 이소류신의 저장안정성 및 방출 기작 평가</li> </ul> <p>○ [제2협동] 리포솜-탑재 미세캡슐 및 나노/마이크로 에멀전 기술을 통해 제조된 기능성 분지아미노산의 생체이용률 평가 및 생리활성 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 분지아미노산의 유용성분 분석법 확립 및 <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> 상에서의 생리활성 검증</li> <li>● 식품소재화 된 발린, 류신 및 이소류신의 <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> 상에서의 생체이용률 평가 및 생리활성 검증</li> <li>● 생산된 시제품의 <i>in vivo</i> 상에서의 생체이용률 평가 및 생리활성 검증</li> </ul> <p>○ [제3협동] 난용성 소재의 가용화 기술개발을 통한 생체이용률이 향상된 분지아미노산의 상품화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 난용성 소재의 가용화 기술 개발 및 조성비 선정</li> <li>● 특수집단의 기호도 분석 및 아미노산 제품개발 및 관능평가</li> <li>● 기능성 소재를 활용한 제품 생산 및 기초효능평가</li> </ul> </div>	

연구개발성과	사업화지표										연구기반지표				
	지식 재산권		기술실시 (이전)		사업화						학술성과		정책 활용 정보		
	특허출원	특허비ой배	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치	만 SCI	비SCI	학술발표		연구지나	이력양성
최종목표	4	4	1		3					13		8		6	2
연구기간 내 달성실적	7	1	1	2,000,000 원	4	263,000,000원		6		14		19		7	3
달성율(%)	175	25	100		133					127		316		175	150

연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p><b>■ 학문적·기술적 측면</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 학술적 기초 연구자료 제공: 리포좀-담재 미세캡슐화 기술과 나노/마이크로에멀전 기술에 의한 가용화, target delivery 및 장점막 흡수과정을 연구함으로써 난용성 생리활성 물질의 생체이용률 분야에서 학술적으로 유의미한 이론적 배경을 확립할 수 있으며 연계 연구의 기초 자료를 제공하였음.</li> <li>● 저명학술지 논문게재 및 국제적 기술우위: 리포좀-담재 미세캡슐화는 선도적으로 시도하는 새로운 기술분야이므로, 유의미성 검증 등의 기술개발단계부터, 난용성 소재에 대한 실제적인 적용사례까지 종합적인 연구를 수행함으로써 국제저명학술지에 다수의 논문을 발표하였음(SCI급 논문 14편 게재, 향후 3편이상의 논문 게재 예정). 또한 국제경쟁력 측면에서 기술우위를 선점할 수 있으며, 관련 연구분야에서 선도적 역할을 할 것으로 기대됨.</li> <li>● 난용성물질의 기능성 소재화: 나노/마이크로에멀전을 이용한 가용화 기술은 낮은 생체이용률의 제약을 갖고 있는 다양한 난용성 물질로 활용범위를 확대할 수 있으며, 이를 통해 생리활성을 갖는 기능성 소재로 활용할 수 있음.</li> <li>● 전문 연구인력 양성: 본 연구과제는 기술개발(리포좀-담재 미세캡슐화 및 나노/마이크로에멀전)을 시작으로 기술을 적용한 소재의 기능성/생체이용률 평가 및 제품개발/산업화까지 달성하는 종합적인 프로젝트이므로, 관련기술 분야의 all-round 역량을 함양한 전문 연구 인력을 양성함.</li> </ul> <p><b>■ 산업적·경제적 측면</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 산업재산권 획득: 리포좀-담재 미세캡슐 기술 및 나노/마이크로에멀전 기술 및 이를 적용한 난용성 분지아미노산에 대한 소재/제조공정 및 난용성 분지아민산의 새로운 기능성 등에 대한 특허를 출원/등록함으로써 산업재산권을 확보함(출원 6건, 등록1건).</li> <li>● 기능성 식품 시장 활성화: 본 연구를 통해 개발된 리포좀-담재 미세캡슐화 기술 및 나노/마이크로에멀전 제조 기술은 다양한 난용성 소재에 적용이 가능한 생체이용률 개선 방법의 기반을 제공하므로, 기능성 식품 산업체의 제품 개발을 촉진하고 고부가가치 산업을 육성하는데 이바지함.</li> <li>● 신규 시장 창출: <i>in vitro</i> 연구를 통해 생리활성이 있지만 난용성 특성으로 인해 <i>in vivo</i> 모델에서는 그 기능성을 나타내지 못하고 폐기되는 다양한 난용성 생리활성 소재들을 활용하기 위한 솔루션을 제공하였으며, 이로 인해 신규시장을 창출할 것으로 예상함.</li> </ul>														
	중심어 (5개 이내)	난용성 생리활성 소재	분지아미노산	리포좀-담재 미세캡슐	나노-마이크로 에멀전	생체이용률									

## 〈 SUMMARY 〉

	코드번호	D-02
Purpose & Contents	<p> <b>■ [Comprehensive research goals]</b>            In this research, we tried to develop nano/microemulsion and nano-sized liposome-loaded microencapsulation technology and evaluate bioavailability and biological activity for improving bioavailability of insoluble branched chain amino acids(BCAAs). Moreover, we tried to achieve practical application by the technology and commercialization of insoluble bioactive compounds(BCAAs) by standardizing the mass production system.         </p> <p> <b>■ [Specific research goals]</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● We developed nano/microemulsion and liposome-loaded microencapsulation technology for method to improve the bioavailability of BCAAs.</li> <li>● We comprehensively evaluated bioavailability and biological activity by using <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i>, and <i>in vivo</i> models for confirmation of insoluble BCAAs which are applied to bioavailability improvement technique.</li> <li>● We established product standards for BCAAs with improved bioavailability, industrialized through mass production system and process standardization.</li> </ul> </p> <p> <b>■ [Research contents]</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Manufacture of BCAAs encapsulated in liposomes and development of controlled release micro-encapsulation technology</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Development of liposome and evaluation of physicochemical properties</li> <li>● Development of controlled release micro-encapsulation technology and evaluation of physicochemical properties</li> <li>● Evaluation of liposome nad microcapsule's stability and in bioavailability in simulated digestion models</li> </ul> </li> <li>○ <b>Development of improved bioavailability of branched amino acid from customized materials and food</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Development of high-stability emulsification technology for food materials of physiologically non-soluble bio-active compound</li> <li>● Application of nano/microemulsion technology for solubilization of BCAAs</li> <li>● Evaluation of storage stability and release mechanism of solubilized BCAAs through nano/microemulsion manufacturing technology</li> </ul> </li> <li>○ <b>Evaluation of bioavailability and physiological activity of BCAAs prepared by liposome-loaded microcapsules and nano / microemulsion</b></li> </ul> </p>	

	<p><b>technology</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Establishment of analytical method for functionality of BCAAs and validation of bioactivity <i>in vitro</i> and <i>ex vivo</i></li> <li>● Evaluation of bioavailability and bioactivity of BCAAs in food and in vitro and ex vivo</li> <li>● Evaluation of <i>in vivo</i> for bioavailability and bioactivity of produced prototype</li> </ul> <p>○ <b>Commercialization of branched amino acid with improved bioavailability through development of solubilization technology</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Development of solubilization technology for non-soluble materials and selection of composition rate</li> <li>● Analysis of preference special group, development of amino acid product and sensory evaluation</li> <li>● Production of BCAAs and evaluation of using functional materials</li> </ul>																																																																																																			
Results	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="4" style="text-align: center; vertical-align: middle;">Goals</th> <th colspan="8" style="text-align: center;">Commercialization</th> <th colspan="4" style="text-align: center;">Research</th> </tr> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;">Intellectual Property rights</th> <th colspan="2" style="text-align: center;">Technology transfer</th> <th colspan="4" style="text-align: center;">Commercialization</th> <th colspan="2" style="text-align: center;">Academic achievements</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Manpower training</th> <th colspan="2" style="text-align: center;">Application to policy-promotion</th> </tr> <tr> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Application</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Enrollment</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Number</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Price</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Commercialized</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Sales creation</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">The amount of export</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Job creation</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Investment</th> <th colspan="2" style="text-align: center;">Articles</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Academic presentation</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Application to policy</th> <th rowspan="2" style="text-align: center;">Promotion exhibitions</th> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">SCI</th> <th style="text-align: center;">Non-SCI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;"><b>The ultimate goals</b></td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td></td> <td style="text-align: center;">3</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">13</td> <td style="text-align: center;">8</td> <td style="text-align: center;">6</td> <td></td> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><b>Research results achieved within the period</b></td> <td style="text-align: center;">7</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2,000,000 원</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">263,000,000 원</td> <td style="text-align: center;">6</td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">14</td> <td style="text-align: center;">19</td> <td style="text-align: center;">7</td> <td></td> <td style="text-align: center;">3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"><b>Achievement rate (%)</b></td> <td style="text-align: center;">175</td> <td style="text-align: center;">25</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td></td> <td style="text-align: center;">133</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">127</td> <td style="text-align: center;">316</td> <td style="text-align: center;">175</td> <td></td> <td style="text-align: center;">150</td> </tr> </tbody> </table>													Goals	Commercialization								Research				Intellectual Property rights		Technology transfer		Commercialization				Academic achievements		Manpower training	Application to policy-promotion		Application	Enrollment	Number	Price	Commercialized	Sales creation	The amount of export	Job creation	Investment	Articles		Academic presentation	Application to policy	Promotion exhibitions	SCI	Non-SCI	<b>The ultimate goals</b>	4	4	1		3					13	8	6		2	<b>Research results achieved within the period</b>	7	1	1	2,000,000 원	4	263,000,000 원	6			14	19	7		3	<b>Achievement rate (%)</b>	175	25	100		133					127	316	175		150
Goals	Commercialization								Research																																																																																											
	Intellectual Property rights		Technology transfer		Commercialization				Academic achievements		Manpower training	Application to policy-promotion																																																																																								
	Application	Enrollment	Number	Price	Commercialized	Sales creation	The amount of export	Job creation	Investment	Articles		Academic presentation	Application to policy		Promotion exhibitions																																																																																					
										SCI	Non-SCI																																																																																									
<b>The ultimate goals</b>	4	4	1		3					13	8	6		2																																																																																						
<b>Research results achieved within the period</b>	7	1	1	2,000,000 원	4	263,000,000 원	6			14	19	7		3																																																																																						
<b>Achievement rate (%)</b>	175	25	100		133					127	316	175		150																																																																																						
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>● We established on theoretical bases for application of non-solubility bioactive compound and suggest an basic research background. In addition, as a research from the stage of technological development such as verification, production of actually application goods, we can anticipate the superiority of technology in international competitive and expect a leading group in related research fields.</li> <li>● Quantitative performance goals: 14 SCI-grade papers, 7 patents, and 4 products.</li> </ul>																																																																																																			
Keywords	Non soluble bioactive compound	Brached chain amino acid	Liposome encapsulation	Nano/microemulsion	Bioavailability																																																																																															

## <CONTENTS>

- Chapter 1. Overview and performance goals of research and development
- Chapter 2. The current state of domestic and international research and technical development
- Chapter 3. The Contents and results of research and development
- Chapter 4. Goal achievements and contribution to related area
- Chapter 5. Application plans of research results
- Chapter 6. Oversee scientific technology information collected in the procedures research and development
- Chapter 7. The security grade of research and development outcomes
- Chapter 8. The current status of research installation and equipment
- Chapter 9. Performance result of laboratory safety management
- Chapter 10. The main results of research and development
- Chapter 11. The others
- Chapter 12. References



## < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	1
2. 국내외 기술개발 현황 .....	9
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	13
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	377
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	382
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	383
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	391
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	392
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	393
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	402
11. 기타사항 .....	402
12. 참고문헌 .....	403

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 제1절 연구개발 목적

### 1. 포괄적 과제목표

- 난용성 분지 아미노산의 생체이용률을 제고하기 위한 나노/마이크로에멀전 제조 및 리포솜-탑재 미세캡슐화 기술을 개발하고 생체이용률/생리활성을 종합적으로 평가함. 또한, 이를 적용한 소재의 대량생산 체제 및 공정표준화를 구축함으로써, 난용성 생리활성 소재의 실용화 기술개발 및 제품화를 달성하고자 함.

### 2. 연구의 세부목표

- 분지아미노산의 생체이용률 개선방법으로서 나노/마이크로에멀전 제조 및 리포솜-탑재 미세캡슐화 기술을 개발함.
- 분지아미노산 생체이용률 개선 기술을 적용한 소재를 *in vitro*, *ex vivo* 및 *in vivo* 모델에서 생체이용률/생리활성을 종합적으로 평가함.
- 생체이용률이 개선된 분지아미노산 소재의 제품규격기준 설정, 대량생산 체제 구축 및 공정 표준화를 통해 산업화함.

## 제2절 연구개발의 필요성

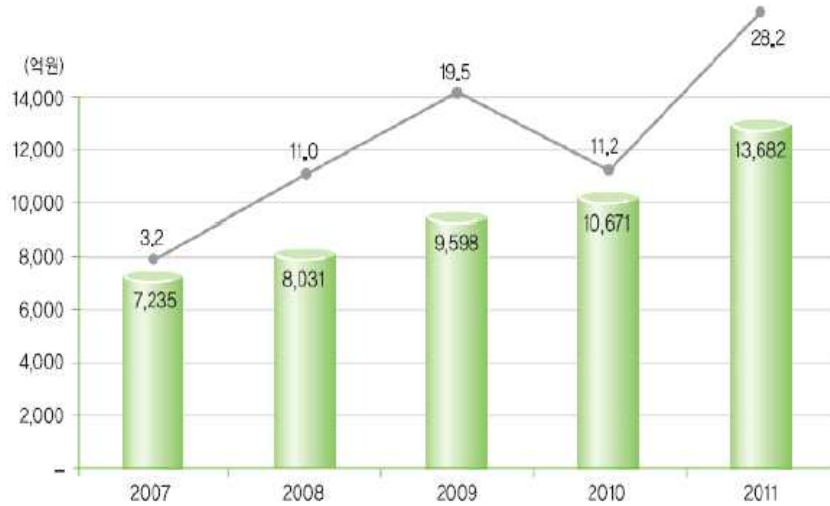
### 1. 기능성 식품소재의 중요성 및 현황

- 21세기 들어 전 세계적으로 인구 고령화 현상이 빠르게 나타나고 있으며, 2012년 우리나라의 노령화 지수는 77.9%, 노령인구의 비율은 12.2%을 기록함으로써 OECD 국가에서 전례를 찾을 수 없을 정도로 급격한 인구 고령화가 진행 중에 있음(통계청, 2013).
- 노인 인구의 증가와 웰빙 추구 현상으로 인해 만성질환예방 및 치료를 위한 건강기능식품의 수요가 증가하고 있으며, 2011년 기준 전 세계 건강기능식품시장은 약 3천억 달러의 시장을 형성하는 것으로 추정됨.



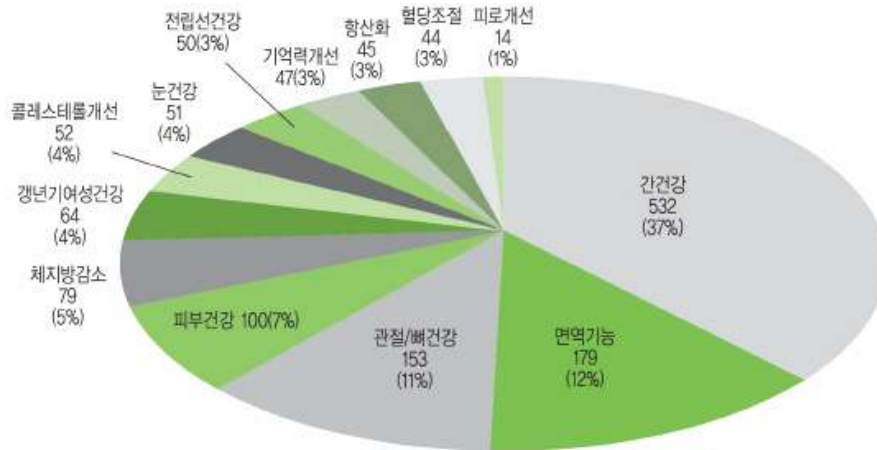
국가/지역별 건강기능식품 시장규모 및 성장률  
(한국보건산업진흥원 식품산업분석보고서, 2012년)

- 국내 건강기능식품 시장은 2011년 생산액 기준으로 약 1.3 조원 규모로 추산되며, 인구의 고령화 속도와 건강 지향적 식생활에 대한 관심 등을 감안할 때 향후 약 30% 대의 성장률로 시장이 확대되어 나갈 것으로 예상됨.



국내 건강기능식품 생산액 및 성장률 현황  
(한국보건산업진흥원 식품산업분석보고서, 2012년)

- 식품에 비해 고부가가치 창출이 가능한 건강기능식품 시장은 소비자들의 인식 변화와 치료 효능을 가진 개별인정형 원료가 발견되면서 홍삼 및 비타민C 제품에서 면역증강, 체중 조절, 체력 향상을 돕는 performance enhancer, muscle builder, weight gainer 관련 제품으로 다양화되고 있음.



개별인정형 건강기능식품 생산현황  
(식약처 2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표, 2012년)

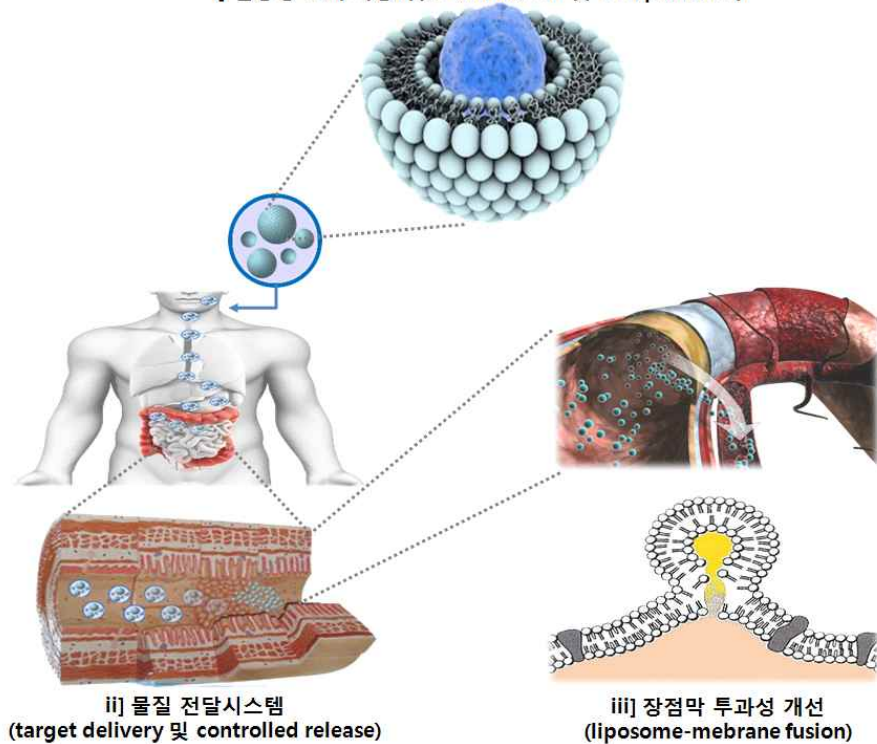
- 그 동안 일반 식품에 기능성 소재를 첨가했던 소극적인 전략에서 벗어나 신규 시장을 창출할 수 있는 새로운 기능성 소재를 연구·개발하고 제품을 다양화함으로써 시장을 선도해야 함.
- 특히 암, 에이즈, 당뇨, 아토피, 천식, 류마티스, 알러지 등 인체의 면역계 약화 및 면역계 이상에서 기인한 질병을 예방 및 치료할 수 있는 신소재 기능식품이 강조되고 있는 실정임.

## 2. 난용성 생리활성 소재의 제품화 가능성

- 새로 발굴된 생리활성 소재 중 40% 이상은 *in vitro*에서 매우 탁월한 효과를 나타내지만 난용성 및 투과성 등 기타 물리·화학적 특성으로 인해 낮은 생체이용률(bioavailability) 때문에 *in vivo*에서는 효과가 발현되지 않고 기능성소재 제품화에 실패하는 상황임.
- 생리활성 유용성분은 경구투여 시 매우 적은 양만이 생체에서 이용되어 활성을 보이는데, 이는 불충분한 장내 체류 시간, 장내에서 낮은 투과도, 장내에서 낮은 용해도, 식품가공 및 저장 중의 온도, 산소, 빛 등에 의한 안정성 저하, 소화과정 동안 pH, 효소, 다른 물질들에 의한 안정성 저하 등의 요인들 때문임.
- 이러한 난용성 생리활성 소재의 낮은 생체이용률 제고하기 위해서는 에멀전 등을 이용한 가용화 기술, 흡수되는 장기까지 안정한 상태로 전달하는 미세캡슐화 기술 및 장점막의 투과성 증대 기술 등이 수반되어야 함.
- 캡슐화(encapsulation) 기술은 향료, 영양성분 등의 불안정한 물질을 빛, 산소, 수분, 온도 등의 외부요인으로부터 보호하여 손실을 줄이고, 나아가 유용성분을 캡슐화함으로써 식품소재의 산화방지 및 보존성의 향상, 변화하기 쉬운 식품 소재의 안정화, 불필요한 냄새의 차단, 식품소재의 방출속도 조절, 제조공정의 개선 및 물성 향상 등의 장점을 지니고 있음(Byun et al., 2010).
- 방출제어 시스템(controlled release system)은 물질의 안정성과 생체이용률(bioavailability)을 개선시키고 그 흡수부위에서 물질의 방출을 제어하여 일정량의 물질이 일정 기간 동안 흡수되도록 할 목적으로 쓰이게 되어 종래에 사용된 단순한 물질 투여의 단점을 개선할 수 있는 효과를 얻을 수 있음(Zhao et al., 2009).
- 캡슐 피복물질은 무독성, 체내 적합성, 생분해적 특성을 가져야 하며, 경제적이며 코팅 효과가 좋아 중심 물질의 보호가 뛰어나며 수용액 상에서 잘 분산되는 특징을 가지고 있는 캡슐소재들이 주로 이용되고 있음.
- 유효성분을 보호하는 전달체의 제조 시 유효성분의 생체 흡수 및 활성을 증대시켜 최적화할 수 있는 전달체의 설계가 필요한데, 효과적인 설계를 위해서는 유효성분의 수용성 및 지용성, 유효성분 전달체의 형태, 캡슐물질의 원료, 유효성분 흡수 증진물질, 유효성분의 효능 상승 물질 등에 대한 총체적인 고려가 필요함. 이렇게 최적화된 유효성분 전달체는 이들의 생체 내 효능을 최적화시킬 수 있으며, 적은 양의 섭취를 통해서 그 효능을 극대화 할 수 있음.
- 결론적으로, 난용성의 유용 성분이 장점막을 통과하여 체내에 흡수된 후 생리활성을 발현하기 위해서는 i] 난용성 소재의 가용화(emulsification 및 encapsulation), ii]

물질전달 시스템(target delivery 및 controlled release) 및 iii] 장점막 투과 개선(mucous membrane penetration 및 liposome-membrane fusion) 등이 요구되며, 이러한 기술을 기반으로 난용성 생리활성 소재의 생체이용률을 제고할 수 있음(Augustin et al., 2009; Nedovic et al., 2011).

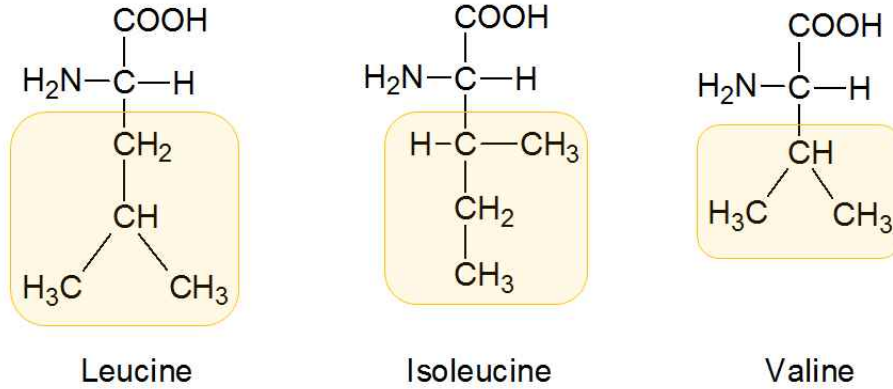
ii] 난용성 소재 가용화(emulsification 및 encapsulation)



난용성 소재의 생체이용률 개선을 위한 기술전략 개념도

3. 난용성 생리활성 소재로서 분지아미노산의 중요성

- 최근 효소·아미노산 등이 기능성식품 소재로서 활발히 연구되고 있으며, 특히 아미노산 중 분지아미노산(branched chain amino acid, BCAA)의 면역 증강 및 혈행개선 등의 뚜렷한 효능이 밝혀지면서 제품에의 적용을 위한 연구가 활발히 진행 중에 있음.
- BCAA는 체내에서 합성이 되지 않는 9종류의 필수아미노산 중 지방족 잔기를 가진 아미노산으로서 leucine, isoleucine, valine이 있으며, 아미노산 중에서 소수성이 가장 강한 편에 속함(난용성 소재).



분지아미노산의 구조(난용성 소재)

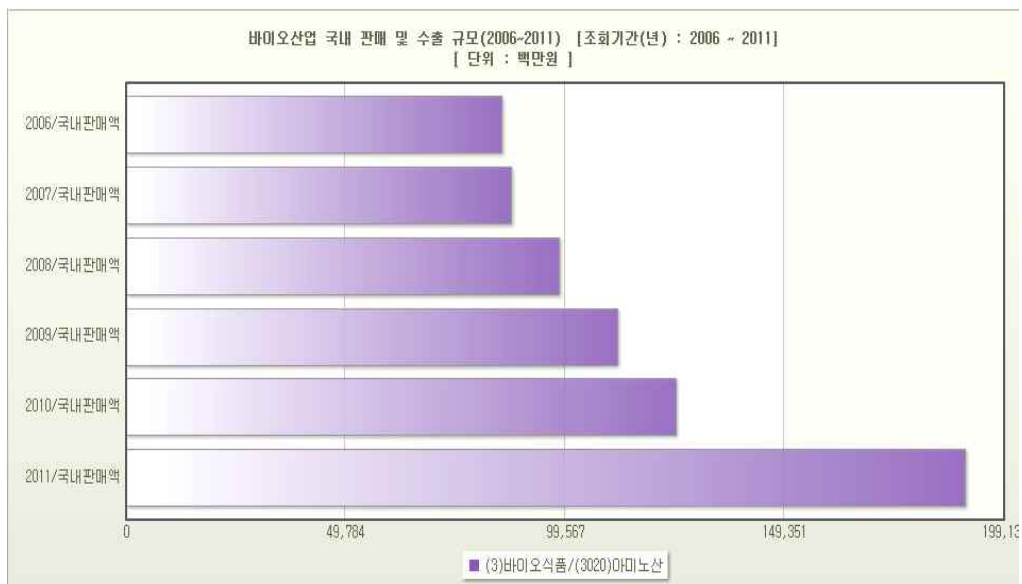
- BCAA는 인체 면역반응에 특히 중요하게 관여하고 있는 물질로서, 체내에서 병원균에 의한 감염 시 면역세포의 에너지원으로 작용하며 면역반응에 관련된 새로운 분자들을 합성하기 위한 전구체를 제공함. 따라서 BCAA는 면역체계를 유지하고 림프구의 반응을 위해 절대적으로 필요한 물질이라 할 수 있음(Calder, 2006).
- BCAA의 결핍은 신체대사에서 여러 질병을 야기할 수 있기 때문에(ex. maple syrup urine disease), 저 영양상태의 환자, 수술 후 회복기의 환자, 간 질환자에게 영양 보급용으로 BCAA를 투여하기도 함.



생리활성 소재로 판매되고 있는 분지아미노산의 예(난용성 분말제품)

- BCAA는 이 외에도 인체 내 다양한 기능적 특성을 가지며, 그 중 하나로서 인지질 이중층과 막관통 단백질(transmembrane protein)의 상호작용 및 구형 단백질의 구조를 결정하는데 큰 역할을 한다고 알려져 있음(Brosnan et al., 2006).
- BCAA를 포함한 세계 아미노산 시장은 사료, 화장품, 인공감미료, 식품보조제와 같은 다양한 제품 수요에 의해 2017년 128억 달러규모로 성장 할 것으로 예상되며, 영양보충제와 같은 건강보조식품시장의 성장 및 품질혁신에 의해서도 시장규모가 커질 것으로 예측됨(Global Industry Analysts, 2012).

- 미국 시장은 2011년 기준 12억 달러 규모로써 전 세계 아미노산 시장의 20%를 차지하고 있으며, 2016년까지 평균 2.8%의 성장을 보이며 14억 달러 규모로 성장할 것으로 보임. 한편, 아시아지역에서는 중국과 인도가 아미노산 시장의 리더로서 아미노산의 생산 및 소비를 담당할 것으로 보이며, 2017년까지 평균 4.9%의 가파른 성장을 할 것으로 예상됨(Global Industry Analysts, 2012).
- 국내 식품 시장 및 아미노산 시장은 외국보다 규모 상으로는 차이가 크지만 판매액이 꾸준히 증가하고 있으며, BCAA의 다양한 기능성을 토대로 숙취해소제, 에너지 드링크, 의약품 및 식품에의 적용을 통해 여러 가지 제품이 출시되고 있음.



국내 바이오산업 중 아미노산 식품 시장 현황  
(통계청, 2012)

- 그러나 BCAA는 지방족 잔기로 인해 친수성이 매우 낮아 물에 잘 녹지 않으며 이로 인해 생체 이용률이 매우 낮고 기능식품소재로서의 활용에 많은 제약이 있음. 따라서 이 같은 난제를 극복하기 위한 획기적인 기술을 고안하여 BCAA의 생체이용률을 증대할 필요가 있음.
- 또한, BCAA는 자체적으로 쓴맛을 나타내며, 외부 물질에 의한 영향에 매우 취약하여 알코올이나 미네랄 첨가에 의한 화학반응으로 nitrogen oxide를 형성하고 이취를 발생시킴. 또한 가열에 의한 마이야르 반응에 의해서도 바람직하지 않은 색과 향을 띄는 것으로 보고되었음(Itou et al., 2009).
- 이러한 근본적인 문제를 해결하기 위한 방안으로써 나노/미세캡슐화 기술을 적용할 수 있으며 소재의 용해성 향상을 통한 생체이용률을 증대시키며 및 이미·이취를 억제함으로써 안정성을 증대하는 결과를 가져올 수 있음. 이 같은 기술을 개발함으로써 BCAA 국제시장에서 충분한 경쟁력을 지닐 것으로 사료됨.

### 제3절 연구개발 범위

#### 1. 연구개발의 최종목표

- 난용성 분지 아미노산의 생체이용률을 제고하기 위한 나노/마이크로에멀전 제조 및 리포솜-탑재 미세캡슐화 기술을 개발하고 기능성/생체이용률을 종합적으로 평가함. 또한, 이를 적용한 소재의 대량생산 체제 및 공정표준화를 구축함으로써, 난용성 생리활성 소재의 실용화 기술개발 및 제품화를 달성하고자 함.



#### 2. 주요 연구내용

- [제1세부] 분지아미노산-봉입 리포솜 제조 및 이를 탑재한 방출제어형 미세캡슐화 기술 개발
  - 분지아미노산-봉입 리포솜 설계 및 물리화학적 특성 분석/개선
  - 분지아미노산-봉입 리포솜의 미세캡슐화를 위한 공정조건 최적화 및 구조분석
  - 리포솜-탑재 미세캡슐의 저장안정성 평가 및 *in vitro* 방출제어 특성 규명
  - 리포솜-탑재 미세캡슐을 고체상의 기능성 소재로 활용하기 위한 확대연구



- [제1협동] 기능성 분지아미노산의 생체이용률 증대를 위한 액상 맞춤형 소재 및 식품 개발
  - 기능성 분지아미노산의 액상 소재화를 위한 고안정성 유화 기술 개발
  - 나노/마이크로에멀전 기술을 통한 기능성 분지아미노산(발린, 류신 및 이소류신)을 액상소재화 하기 위한 가용화
  - 나노/마이크로에멀전 제조 기술을 통하여 가용화된 분지아미노산의 저장안정성 및 방출 기작 평가
  
- [제2협동] 리포좀-탑재 미세캡슐 및 나노/마이크로에멀전 기술을 통해 제조된 기능성 분지아미노산의 생체이용률 평가 및 생리활성 검증
  - 분지아미노산의 유용성분 분석법 확립 및 *in vitro*, *ex vivo* 상에서의 생리활성 검증
  - 식품소재화 된 발린, 류신 및 이소류신의 *in vitro*, *ex vivo* 상에서의 생체이용률 평가 및 생리활성 검증
  - 생산된 시제품의 *in vivo* 상에서의 생체이용률 평가 및 생리활성 검증
  
- [제3협동] 난용성 소재의 가용화 기술개발을 통한 생체이용률이 향상된 분지아미노산의 상품화
  - 난용성 소재의 가용화 기술 개발 및 조성비 선정
  - 특수집단의 기호도 분석 및 아미노산 제품개발 및 관능평가
  - 기능성 소재를 활용한 제품 생산 및 기초효능평가

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### 제1절 국내외 관련 기술개발 현황과 문제점

#### 1. 난용성 생리활성 소재 가용화 및 생체이용률 개선 관련기술의 현황

- 난용성 생리활성 소재(기능성 성분 및 약물)의 생체이용률 증대를 위한 다양한 가용화 기술이 현재 연구되고 있으나 소재의 특성에 따른 막대한 생산비용과 가용화 방법에 따른 낮은 수율 및 고유의 한계점이 문제시 되고 있음.
- 미분쇄화: 난용성 물질의 용해도를 증가시키기 위하여 제일 먼저 처리하는 방법임. Griseofulvin의 경우 입자 크기를 분쇄기나 sieve를 이용하여 입자의 크기를 감소시켜 입자의 표면적을 증가시키는 방법임. 이 방법으로서 보통의 난용성 물질은 용해도 및 생체이용률이 증가되나 일반적인 공정이므로 특히 취득이 불가능하다는 단점을 가지고 있음(Greenhalgh et al., 1999; Glowka, 2000).
- 염 형성 및 전구체(precursor)형 변환: Sibutramine 등의 난용성 물질은 염산이나 구연산 등의 염 형태로, ibuprofen의 경우 lysine 등을 결합시켜 새로운 prodrug형 전구체로 개발하여 수용성으로 변경시킴으로서 용해도 및 생체이용률을 증가시킴(Bansal et al., 1994; Murtha et al., 1994). 그러나 염 형성이나 전구체 제조의 경우 새로운 신물질로 취급하기 때문에 다른 개량신물질 시스템과는 달리 신물질로 독성 시험을 수행하여야 하므로 막대한 인력과 비용이 소요되는 단점을 가지고 있음.
- 포접화합물 형성: 난용성 물질인 paclitaxel, itraconazole 및 ibuprofen의 경우 cyclodextrin 등으로 포접하여 생체이용률이 증가된 연구가 시도되고 있으나(Charoenchaitrakool et al., 2002; Ghorab et al., 2001) 적용 물질이 매우 한정되어 있으며 다른 개량신물질 시스템보다 생체이용 효과가 매우 떨어지는 단점을 가지고 있음.
- 공용혼합물 형성: Ibuprofen 등은 poloxamer 및 menthol과 공용혼합물을 형성할 경우 용점이 저하됨으로서 수용액에서 용해도가 증가된다는 원리로 투명한 액상제제를 개발하고자 하는 시도는 있었으나, 이 경우 경구용이나 주사용 등 액상제제로만 개발되고 고형제제 등으로는 적용하지 못하는 제제의 한계성을 가지고 있음(Yong et al., 2005).
- 용매증발법(solvent evaporation method): 난용성 물질을 고분자와 함께 메칠렌클로라이드, 아세톤 및 에탄올 등 유기용매 등에 용해시킨 후 spray dryer 또는 evaporator 등을 사용하여 유기용매를 제거하는 방법으로서 일반적인 마이크로캡슐 및 고체분산체를 제조하는 방법임. 그러나 이 방법은 입자 크기의 상대적인 거대함 및 불균일성에 의한 가용화의 미미한 효과 그리고 물질에 비해 다량의 고분자 사용 등의 많은 문제점을 가지고 있음(Leuner et al., 2000; Yamashita et al., 2003).

- 초임계 유체 팽창법(RESS, Rapid Expansion of Supercritical Solutions): 난용성 물질 및 고분자를 이산화탄소와 같은 초임계유체에 용해시키고 초음속으로 노즐이나 capillary를 통해 팽창시켜 용질의 과포화 상태를 유발시킴으로서 제조하는 방법임. 그러나 이 방법은 입자 크기의 상대적인 거대함 및 불균일성에 의한 가용화의 미미한 효과, 생산원가의 상승 및 초임계유체에 녹을 수 있는 난용성 물질만 적용 가능하므로 사용이 매우 제한적임(Türk et al., 2002).
- 상기와 같이 난용성 물질의 생체이용률 증대를 위한 가용화 기술 연구가 현재까지 많이 시도되었으나 기존의 가용화 기술은 위에서 열거한 제약 및 독보적인 기술경쟁력을 갖기 어렵고, 또한 대개의 연구에서 FDA의 승인을 받지 않은 신규 고분자를 사용하였기 때문에 체내에서의 독성 문제를 해결하지 못하였음.
- 본 연구에서 개발하고자 하는 리포솜-탑재 미세캡슐화 및 나노/마이크로 유화 에멀전 기술은 gelatin, HPMC, PVA, gelatinized starch 및 edible oil 등 FDA의 승인을 받은 생체적합성 물질을 사용하기 때문에 체내에서 독성 및 축적을 나타내지 않음.

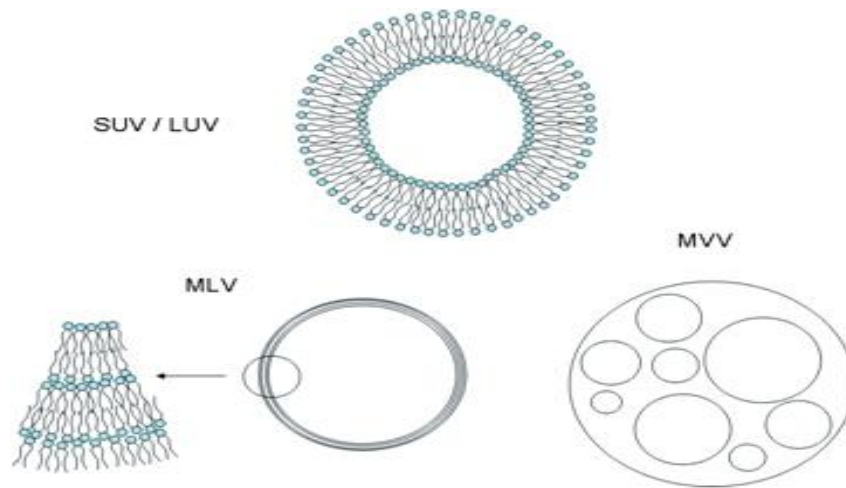
## 2. 국내외 연구개발 동향

### 가. 리포솜-탑재 미세캡슐(liposome-associated microcapsule)

- 리포솜은 세포막의 주성분인 인지질의 이중층 또는 다중층으로 싸여진 vesicle 구조로써 수용액에서 나노~마이크로 범위의 w/o/w형 분산계를 이룸. 내부의 수상, 또는 막을 이루는 인지질층 분자사이에 다양한 물질을 봉입시켜 이들의 난용성, 화학적 불안전성 및 낮은 막투과도 등을 개선시킬 수 있기에 리포솜은 생리활성 성분, 효소 및 각종 영양 성분(nutraceutical) 등 다양한 유용성분의 수송체로써 각광받고 있음.
- 리포솜은 제조방법에 따라 SUV(small unilamellar vesicle), LUV(large unilamellar vesicle) 또는 MLV(multilamellar vesicle) 타입을 여러 형태로 조절할 수 있으므로, 다양한 소재에 널리 적용이 가능함(Kashyap et al., 2012).
- 의약품·화장품 분야에 비하여 식품 분야에의 리포솜 공법의 적용 예는 거의 전무함. 이는 위장관계-식품의 다양한 구성 성분-리포솜 간의 3자간 상호작용이 복잡하여 체계적 연구가 되어 있지 않고, 리포솜 제품의 생산 단가 및 대량 생산의 어려움 등이 제품화에 장벽이 되어 왔기 때문임.
- 그러나 최근 나노테크놀러지의 발전은 고압균질분산기, microfluidizer 등 리포솜의 대량생산을 가능케 해주는 제조공정을 개발시켜 주고 있으며(Huang et al., 2010), 식품에서 면역증진능, 항산화능 항고혈압 등 건강증진 및 질병예방 효과를 나타내는 유용성분들이 규명됨에 따라 이들 유용성분들을 단독으로 또는 다른 식품에 첨가물로 보충하여 섭취 후 보다 우수한 질병 예방 및 건강 증진 효과 등을 얻을 수 있는 가능성이 제시되고 있음.
- 유용성분의 수송체로서 리포솜의 가장 뛰어난 장점은 소재(인지질)의 생체적합성 및

구조적 유연성임. 또한 구성 성분이나 제조공정의 선택에 따라 분산입자의 크기, 표면 전하 등의 조절이 가능한데다 표면의 리간드를 수식함에 의해 그 리간드에 대한 수용체를 갖는 특정 세포/장기로의 유용성분의 표적 수송 등을 가능케 해주는 장점이 있음.

- 리포솜이 갖는 여러 가지 장점을 고려하면, 유용성분을 리포솜 내부에 봉입시켜 수상에 분산시키는 방법은 난용성 문제를 해결하면서도 보관 시 또는 섭취 후 소화기계 내에서의 유용성분의 안정성을 유지할 수 있는 가장 적합한 방법의 하나임(Taylor et al., 2005; Takahashi et al., 2009).
- 또한 리포솜 표면의 실리카 코팅에 의해 위장관내에서의 급격한 pH 변화에 의한 리포솜의 불안정화 문제를 방지할 수 있으며(Li et al., 2012), 키틴 코팅에 의해 장점막에 리포솜이 부착되어 체류시간을 연장할 수 있다는 보고(Han et al., 2012)들은 적합한 리포솜 피복물질을 선택해서 미세캡슐화 함으로써 리포솜이 위장관 통과 시 흡수를 최대로 할 수 있는 부위에서 봉입된 생리활성 성분을 방출할 수 있는 설계의 가능성을 시사하고 있음.
- 따라서 난용성 식품 유용성분의 물리화학적 특성 및 소화기계에서의 흡수 특성에 적합한 맞춤형 리포솜-탑재 미세캡슐화 기술을 개발함으로써, target delivery와 장점막 투과성을 동시에 충족할 수 있음.

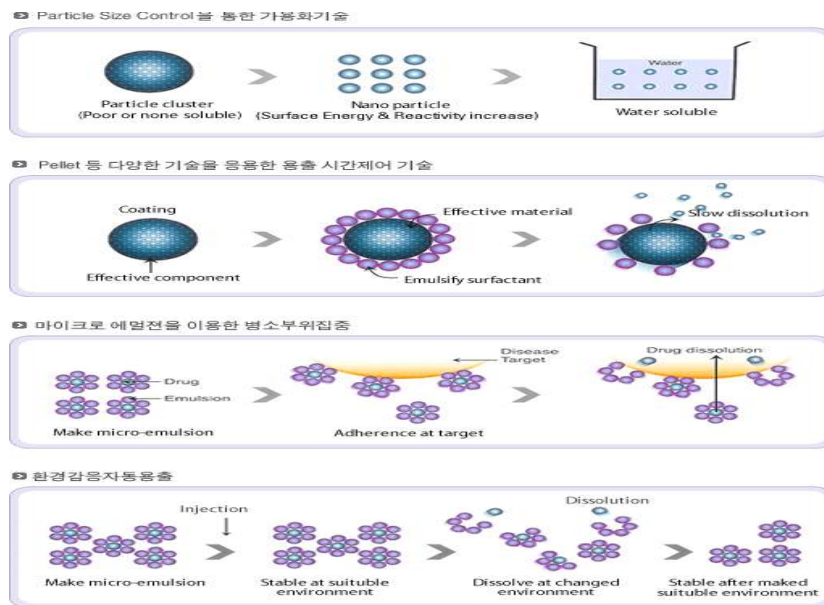


리포솜의 여러 가지 형태 모식도

#### 나. 나노/마이크로에멀전(nano/micro emulsion)

- 나노에멀전은 상이 다른 두 용액을 혼합할 때 한쪽 액체가 미세한 입자를 형성하여 다른 액체 속에 분산되어 있는 시스템으로, 입자의 중심부에 생리활성 물질과 같은 유용성분을 저장하여 난용성 성분의 가용화에 효과적인 기법임.
- 나노에멀전은 일반적으로 물속에 오일상을 분산시킨 o/w형 나노에멀전, 유상에 물을 분산한 w/o형 나노에멀전, 그리고 이들의 혼합형인 w/o/w형 나노에멀전 방법으로 생성 가능함.

- 이와 유사한 방법으로 형성된 마이크로에멀전의 경우도 LDL(low density lipoprotein)과 유사한 크기와 조성, 표면특성을 갖도록 재구성함으로써 인체 내에서의 적합성을 향상시키며 안정성과 기능성을 제고할 수 있음.
- 마이크로에멀전은 작은 액체입자로서 양친매성 성분, 알코올, 오일, 염 용액을 기본 성분으로 여러 가지 기능성 분자를 삽입하여 구성하며 그 막은 단분자층 혹은 이중층으로 구성되어 있음. 그 크기는 80-800Å 정도의 구형 혹은 실린더형의 액적이 분산되어 있는 계로서 열역학적으로 안정한 상태를 띄고 있음.



나노/마이크로에멀전 기술을 이용한 난용성 소재의 가용화 및 delivery system(콜마파마 제제연구소)

### 3. 문제점 및 발전방향

- 본 연구에서는 주요 기술인 리포솜-담재 미세캡슐화 및 나노/마이크로에멀전 기술을 통해 난용성 생리활성 소재의 가용화, target delivery 및 장 점막 투과성을 동시에 개선함으로써 생체이용률을 제고함.
- 난용성 생리활성 소재의 생체이용률 개선 연구는 생체이용률 개선기술 개발을 비롯하여 생리활성/생체이용률 평가, 기술적용 소재의 제품개발/사업화 등의 분야가 오케스트라와 같은 유기적인 협동연구가 요구되지만, 많은 연구과제가 단발적으로 이루어져 효율성 낮고 최종적인 제품개발까지 이어지지 않는 문제가 지적되어 왔음. 따라서 본 연구과제에서는 이러한 모든 팀으로 구성함으로써, 최종결과까지 달성할 수 있는 유기적인 협동연구 체계를 구축할 수 있었음.
- 특히 기능성 식품 분야에 있어서는 기능성 소재 개발 및 시험관 수준에서의 기능성 평가만 주로 이루어지고 있는데, 기능성에 대한 *in vivo* 모델(생체 시스템)에서의 생리활성 평가 및 이로 인한 용량-반응 관계에 대한 연구를 종합적이고 심도 있게 수행하였음. 이를 바탕으로 기능성식품 인증 절차에 필요한 수준의 연구 자료를 확보할 수 있으며, 연구과제에서 개발된 기능성 소재 및 관련 기술을 조속히 산업화/제품화 진행하고 있음.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

#### 제1절 연구개발 추진전략 및 방법

##### 1. 분지아미노산-붕입 리포솜 제조 및 이를 탑재한 방출제어형 미세캡슐화 기술 개발(1세부: 서울대학교 장판식)

가. 분지아미노산-붕입 리포솜 설계 및 물리화학적 특성 분석/개선

(1) 분지아미노산의 특성을 고려한 맞춤형 리포솜 설계 및 붕입효율 분석법 확립

- 리포솜은 제조방법에 따라 SUV(small unilamellar vesicle), LUV(large unilamellar vesicle) 또는 MLV(multilamellar vesicle) 타입으로 조절할 수 있으므로 분지아미노산 특성에 맞는 제조법을 모색

(2) 분지아미노산-붕입 리포솜의 물리화학적 특성 분석(평균입자경, 표면 전하 등)

- 입자경 및 분산도 측정: electrophoretic light scattering spectrophotometer를 이용하여 광산란법으로 측정하며 입도분포 데이터는 volume distribution 법으로 해석
- 전자현미경: 전자현미경으로 리포솜의 입자경, 모양, 막 두께 등을 평가
- 제타 포텐셜 측정: 아미노산 붕입에 의한 리포솜의 표면 하전 변화를 평가

(3) 분지아미노산의 붕입효율 극대화를 위한 방안 모색(정전기적 인력, 표면 전하 제어 등)

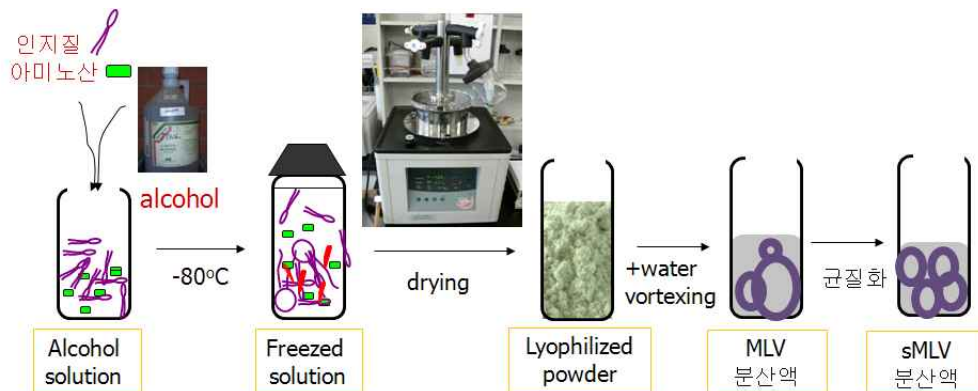
- Phospholipid 및 cholesterol 비율별 붕입된 분지아미노산의 포집율을 측정하여 최적의 리포솜 제조

(4) 표면코팅 및 리간드 수식에 의한 분지아미노산-붕입 리포솜의 안정성 및 방출특성 개선

- 분산안정성 개선을 위하여 다양한 물질(hexadylamine, palmitic acid 등)을 이용하여 표면전하에 변화를 주어 분산안정성을 개선

(5) 분지아미노산-붕입 리포솜의 선업적 생산을 위한 대량생산 시스템 구축

- 초고압균질기(microfluidizer)를 이용한 대량생산 공정 설계 및 최적화
- Liquid mediated lyophilization(LML)을 이용한 가공적성에 유리한 리포솜 분말화 제조공정 개발 및 최적화



Small MLV type의 리포솜 제조 공정 모식도

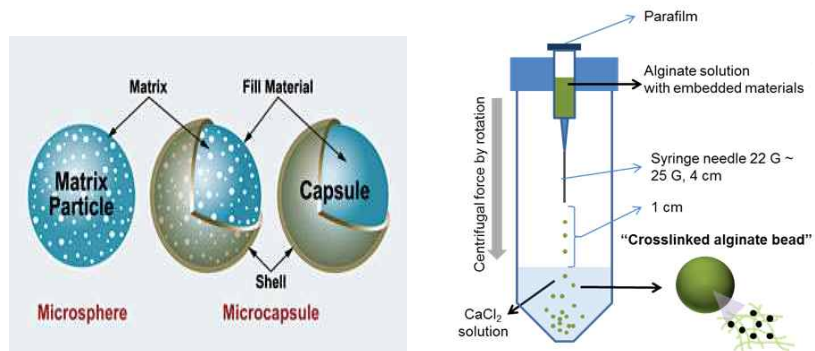
나. 리포솜-담재 미세캡슐화 기술개발 및 최적화

(1) 다당류 폴리머(polymer)를 이용한 나노입자(nanoparticle) 제조공정 구축

- 다당류 종류에 따른 최적의 나노캡슐 제조 공정 설계
- 주요 반응변수(농도, 폴리머 전하, 농도 등)의 탐색 및 유의적 변화범위 설정

(2) Syringe dropping을 이용한 알지네이트 하이드로겔(alginate-hydrogel) 마이크로 캡슐 제조공정 구축

- 분지아미노산을 이용한 미세캡슐화 수율분석법 확립 및 syringe dropping 공정 설계
- 주요 반응변수(구성비, centrifuge 속도, syringe 내경 등)의 탐색 및 유의적 변화범위 설정



난용성 물질을 함유하는 미세캡슐의 구조모델(좌) 및 syringe dropping 공정 요약도(우)

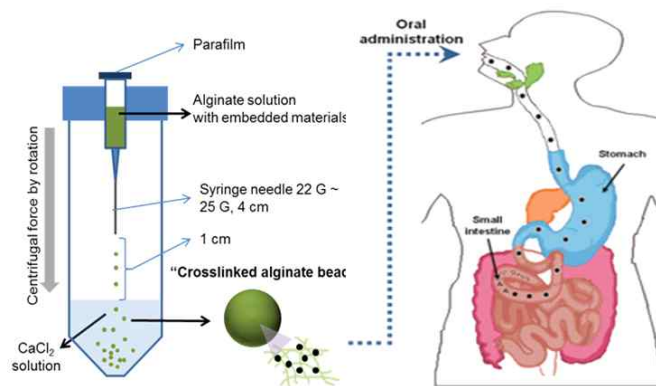
다. 분지아미노산-봉입 리포솜을 담재한 미세캡슐의 저장안정성 및 방출제어 평가

(1) pH 및 온도변화에 대한 영향 평가 및 가속화 실험을 통한 저장안정성 모니터링

- 분지아미노산-봉입 리포솜의 pH 및 온도 안정성 평가
- 분지아미노산-봉입 리포솜 담재 미세캡슐의 pH 및 온도 안정성 평가

(2) In vitro 소화모델에서의 중심물질 방출특성 및 방출률 규명

- 유사 소화모델(입, 위, 소장)조건에서의 리포솜 및 리포솜 담재 미세캡슐의 방출특성 규명
- 분지아미노산-봉입 리포솜의 표면코팅을 통한 소화기계 안정성 개선



미세캡슐화 기술의 공정개요 및 중심물질 방출제어 개념도

## 2. 기능성 분지아미노산의 생체이용 극대화 맞춤형 소재 및 식품 개발(1협동: 서울과학기술대학교 최승준)

가. 기능성 분지아미노산의 액상 소재화를 위한 고안정성 유화기술 개발

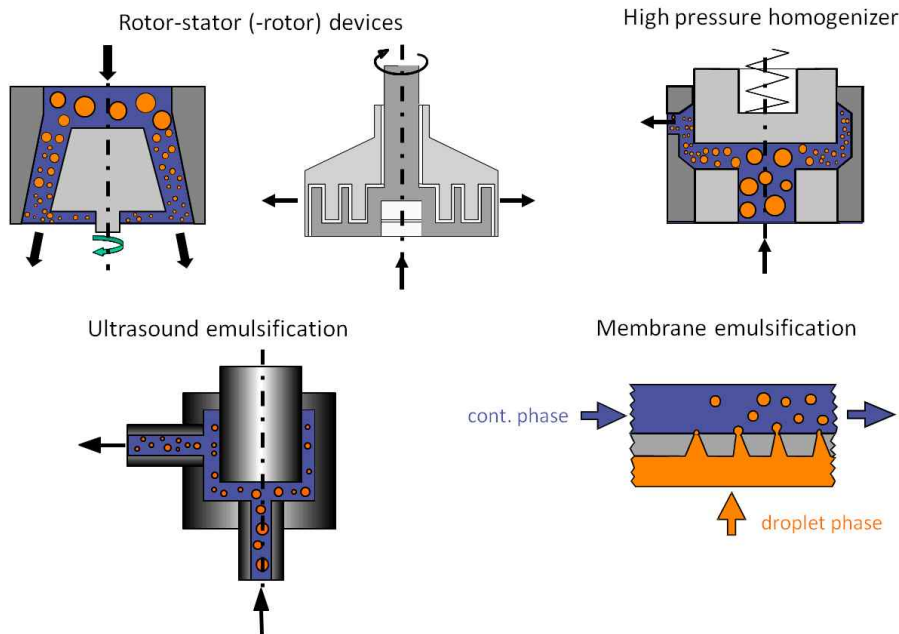
(1) 기능성 분지아미노산 액상 소재화를 위한 고안정성 수중유적형(oil-in-water emulsion)의 나노/마이크로에멀전을 제조에 적합한 최적의 고기능성 유화제 및 유지류 탐색

- Tween류, diacylglycerol류, monoacylglycerol류 등과 같은 다양한 분자량, HLB value 및 친수성 부분의 하전 유무에 따라 유화제를 구분하여 고안정성 나노/마이크로에멀전을 형성하는 조건 탐색
- 난용성 기능성 물질을 효과적으로 포집할 수 있는 최적의 유지류 선정
- High pressure homogenization, ultrasonic homogenization 및 membrane homogenization 등과 같은 다양한 균질화 방법을 이용하여 고안정성 나노/마이크로에멀전을 제조하는 조건 탐색

(2) 유화안정성(emulsion stability)의 모니터링을 위한 과학적 분석지표 확립

- Laser diffraction particle size analyzer 및 turbiscan 등과 같은 분석장비를 이용하여 나노/마이크로에멀전 내의 지방구와 그들의 유화안정성 간의 상관관계를 분석하는 지표 탐색

(3) 통계적 모델링을 통한 유화제(구조, 하전 및 농도 등) 및 유지성상과 같은 유효변수와 유화안정성(지방구 크기, 지방구 표면전하 특성, 그에 따른 유화안정지수 및 유화분리속도)의 관계모델을 도출



나노/마이크로에멀전을 제조하기 위한 다양한 homogenization 기술

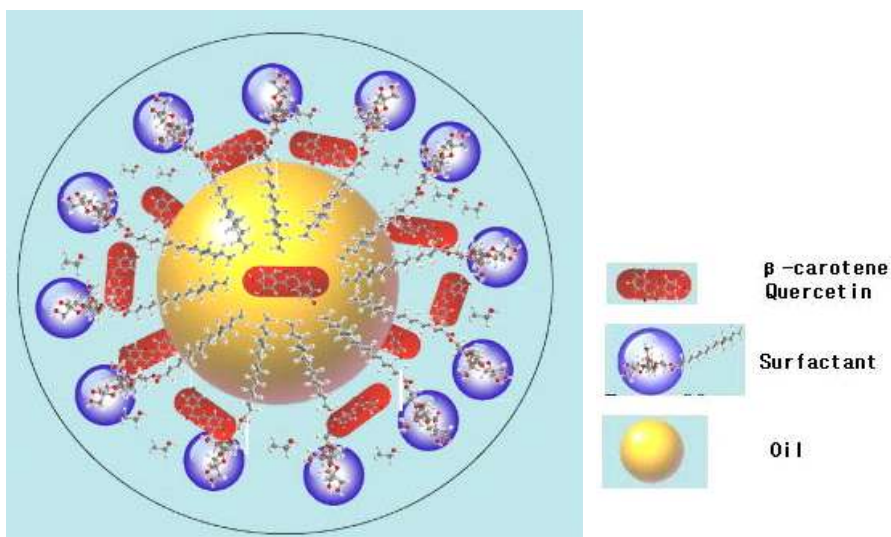


나. 기능성 분지아미노산인 발린, 류신 및 이소류신의 나노/마이크로에멀전 전처리 조건 및 제조 공정 확립하여 액상 소재 개발

(1) 발린, 류신 및 이소류신의 이화학적 특성 분석에 근거한 최적의 유화제, 유지류 및 그들의 혼합 최적조건 탐색

(2) 발린, 류신 및 이소류신을 함유한 고안정성 나노/마이크로에멀전의 제조 공정 확립을 통한 액상 소재화

- HLB value에 따른 최적 유화제의 선정 및 유의적 농도 범위 탐색
- 유화안정성에 유용한 공정변수(유화액의 조성비 및 균질화 조건 등)의 선정 및 최적 조건 확립
- 유화제 내의 발린, 류신 및 이소류신의 안정성 평가



수중유적형(oil in water)의 나노/마이크로에멀전 가상 모델

다. 나노/마이크로에멀전 기술을 통해 액상화된 된 기능성 분지아미노산인 발린, 류신 및 이소류신의 저장안정성 평가

(1) 발린, 류신 및 이소류신 함유한 액상 형태의 고안정성 나노/마이크로에멀전의 안정성 평가

- 가속화 실험을 통한 저장안정성 모니터링
- 발린, 류신 및 이소류신을 함유한 나노/마이크로에멀전의 품목별 유화 붕괴양상 특성 분석
- 발린, 류신 및 이소류신을 함유한 나노/마이크로에멀전의 외부요인(pH, 전해질 농도 및 온도변화 등)에 대한 저장안정성 확립

(2) 고안정성 나노/마이크로에멀전의 *in vitro* 소화/흡수 조건에서 방출 특성 연구

- 가상의 생체(인공 위장액/소장액) 조건에서의 발린, 류신 및 이소류신의 방출 특성 연구

**3. 리포솜-담재 미세캡슐 및 나노/마이크로에멀전 기술을 통해 제조된 기능성 분지아미노산의 생체이용률 평가 및 생리활성 검증(2협동: 건국대학교 백현동)**

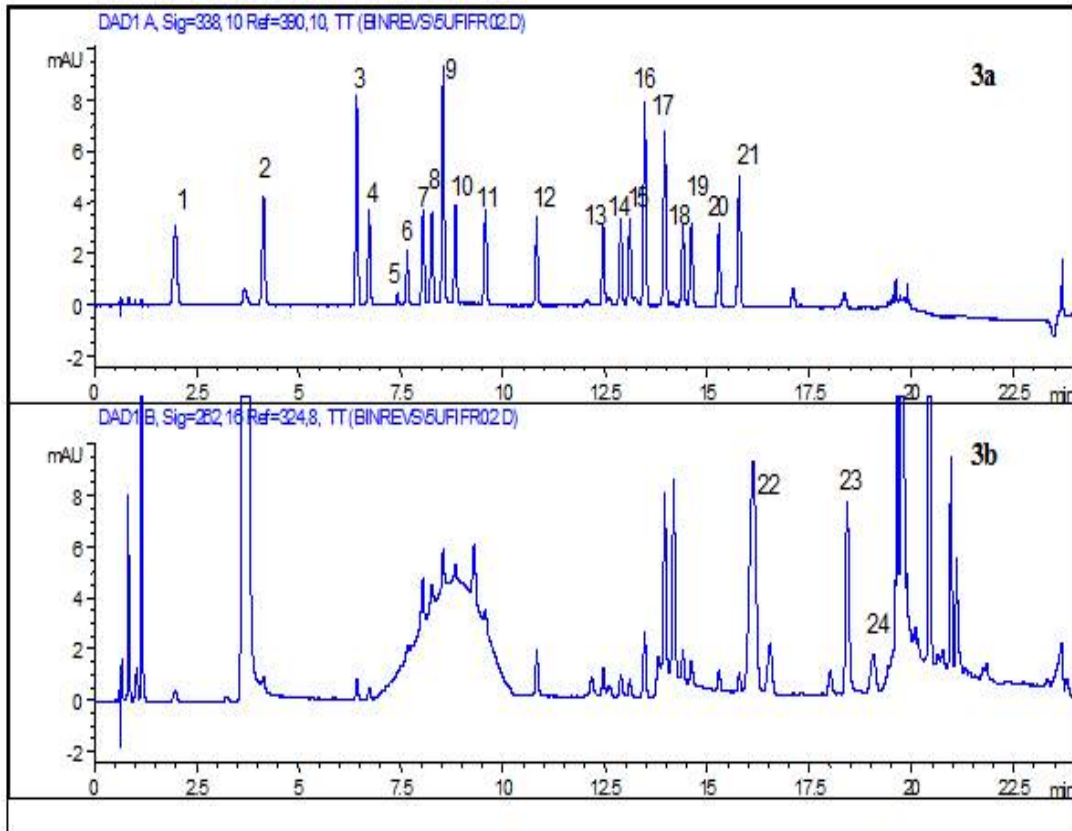
가. 리포솜-담재 미세캡슐 및 나노/마이크로에멀전 기술을 통해 제조된 기능성 분지아미노산의 분석법 확립

- (1) 식품첨가물 공전에 따른 기능성 분지아미노산인 발린, 류신, 이소류신의 분석
- (2) HPLC를 이용한 분지아미노산 분석

- 분석 조건 및 결과

아미노산 분석을 위한 HPLC 조작 조건

HPLC 분석	조작 조건
검출기	UV 338 nm, 262 nm
칼럼	ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 × 150 mm, 5µm PN 993967-902
칼럼 온도	40 °C
이동상	A: 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.8 [5.5 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1 liter water adjust to pH 7.8 with NaOH solution(10N)]
	B: ACN:MeOH:water(45:45:10. v/v)
유속	2 mL/min
시료량	20 µL



아미노산 HPLC 분석방법(14: 발린, 19: 이소류신, 20: 류신)

나. *In vitro*, *ex vivo* 방법을 통한 난용성 생리활성 소재(분지아미노산)의 생체이용률 평가 및 생리활성 검증

(1) 난용성 생리활성 소재의 *ex vivo* 상에서의 생체이용률 평가

- Caco-2, MDCK 세포를 이용한 난용성 생리활성 소재의 세포내 흡수효율 측정 연구

(2) 다양한 *in vitro* 항산화 활성 측정법을 통한 난용성 생리활성 소재의 항산화 활성 검증

- ABTS 라디칼 소거능 측정
- SOD-like activity 측정
- DPPH 소거능 측정
- Oxygen radical absorbance capacity(ORAC) value 측정
- TRAP(총 항산화능) 측정

(3) 다양한 *in vitro* 항염 활성 측정법을 통한 난용성 생리활성 소재의 항염 활성 검증

- SNP를 이용한 nitric oxide scavenging activity 측정
- Hyaluronidase 저해활성 측정

(4) 난용성 생리활성 소재의 *ex vivo* 상에서의 면역 증강효과 검증

- PCR array 및 real-time PCR을 이용한 염증 관련 후보 유전자 발현 정도 확인

염증 관련 유전자 발현 측정을 위한 PCR array 후보 유전자

Inflammatory Responses ChIP PCR Array	
Chemokines	C5, CCL1, CCL11, CCL17, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL3, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IL13, IL8.
Chemokine Receptors	CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR9, CX3CR1, IL10RB, IL1R1, IL1RN, IL6R, IL8RB.
Cytokine Genes	CD40LG, CSF2, FASLG, IFNA2, IFNG, IL10, IL13, IL15, IL17A, IL17C, IL17F, IL18, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1RN, IL2, IL21, IL22, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SPP1, TGFB1, TNF.
Cytokine Receptors	CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CXCR4, IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL8RB, IL9, TNFRSF1B.
Transcription Factors	FOXP3, GATA3, JUN, RELA.
Acute-Phase Response	CEBPB, CRP, IL22, IL6.
Inflammatory Response	ABCF1, BCL6, C3, CCL11, CCL17, CCL19, CCL2, CCL21, CCL3, CCL4, CCL5, CCR3, CCR4, CD40, CD40LG, CEBPB, CRP, CXCL1, CXCL10, CXCL5, CXCL6, CXCL9, FOS, IL10, IL10RB, IL18RAP, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1R1, IL1RN, IL22, IL8, IL8RB, IL9, LTBR, NFKB1, PTGS2, TLR4, TMPS11D, TNF, TOLLIP.
Humoral Immune Response	C3, CCL2, CCL3, CD40, IL10, IL18, IL1B, IL6, NFKB1.

암 관련 유전자 발현 측정을 위한 PCR array 후보 유전자

Cancer Pathway Finder PCR Array	
Cell Cycle Control & DNA Damage Repair	ATM, BRCA1, CCNE1(cyclin E1), CDC25A, CDK2, CDK4, CDKN1A(p21Waf1), CDKN2A(p16Ink4), CHEK2(chk2 / Rad53), E2F1, MDM2, RB1, S100A4, TP53.
Apoptosis & Cell Senescence	APAF1, BAD, BAX, BCL2, BCL2L1(bcl-X), CASP8, CFLAR(CASPER), GZMA, HTATIP2, TERT(telomerase), TNFRSF1A(TNF- $\alpha$ receptor), TNFRSF10B(DR5), TNFRSF25(DR3).
Signal Transduction Molecules & Transcription Factors	AKT1, ERBB2, ETS2, FOS, JUN, MAP2K1(MEK), MYC, NFKB1(NF $\kappa$ B), NFKBIA(I $\kappa$ B $\alpha$ ), PIK3R1(PI3K p85 $\alpha$ ), RAF1, SNCG.
Adhesion	ITGA1(integrin $\alpha$ 1), ITGA2(integrin $\alpha$ 2), ITGA3(integrin $\alpha$ 3), ITGA4(integrin $\alpha$ 4), ITGAV(integrin $\alpha$ V), ITGB1(integrin $\beta$ 1), ITGB3(integrin $\beta$ 3), ITGB5(integrin $\beta$ 5), MCAM, MTSS1, PNN, SYK, UCC1.
Angiogenesis	ANGPT1(angiopoietin-1), ANGPT2(angiopoietin-2), COL18A1(endostatin), FGFR2, IFNA1(IFN $\alpha$ ), IFNB1(IFN $\beta$ ), IGF1, IL8, PDGFA, PDGFB, TEK(tie-2), TGFB1, TGFBR1(ALK-5), THBS1(thrombospondin-1), TNF, VEGFA.
Invasion and Metastasis	MET, MMP1(collagenase-1), MMP2(gelatinase A), MMP9(gelatinase B), MTA1, MTA2, NME1, NME4, PLAU, PLAUR, S100A4, SERPINB5(maspin), SERPINE1(PAI1), TIMP1, TIMP3, TWIST1.

- PCR array 결과에서 가장 두드러지게 up 또는 down regulation 된 염증 관련 유전자를 주 target으로 하여 real-time PCR 수행
- Western blot법을 이용하여 염증 관련 유전자의 단백질 발현 정도에 난용성 생리활성 소재가 미치는 영향 연구
- Comet assay 통한 백혈구 및 대장 조직 DNA 손상에 미치는 영향 연구

다. 동물실험을 통한 난용성 생리활성 소재를 이용한 제품의 생체이용률 평가 및 생리활성 검증

(1) 동물실험을 통한 난용성 생리활성 소재의 동물에서의 흡수효율 측정

- 시제품에 함유되어 있는 분지아미노산의 함량 측정 연구
- 동물실험을 통해 분지아미노산의 회장 소화율을 측정하여(growing rat model) 시제품의 난용성 생리활성 소재(분지아미노산) 흡수효율 측정 연구
- 분지아미노산의 근육 내로의 이송 확인 연구

Table 3: Variation in ileal amino acid digestibility (%) of 15 samples of meat and bone meal for broiler chickens and growing rats.

Parameter	Broiler chickens			Growing rats		
	Range	SD	CV, %	Range	SD	CV, %
<b>Indispensable amino acids:</b>						
Arginine	41.6-78.5	10.8	15.6	61.3-88.5	13.9	18.1
Histidine	45.3-78.1	10.6	17.3	37.1-79.0	17.9	29.8
Isoleucine	53.8-78.1	8.0	11.5	50.0-81.5	11.1	15.1
Leucine	50.6-81.4	8.1	11.6	57.1-88.0	11.3	15.1
Lysine	42.5-80.4	11.4	16.5	47.6-84.9	11.9	15.8
Methionine	55.9-86.2	8.3	11.3	53.4-87.3	11.8	15.3
Phenylalanine	57.8-82.6	9.1	12.5	51.5-87.4	10.5	13.6
Threonine	48.8-71.5	8.0	12.9	40.3-82.4	14.4	23.7
Valine	52.4-77.3	7.7	11.3	58.8-84.8	12.0	16.7
<b>Semi-indispensable amino acids:</b>						
Cystine	26.7-55.0	9.7	24.9	35.9-78.9	11.8	15.3
Tyrosine	54.9-80.2	8.2	11.8	53.3-85.1	11.5	15.7
<b>Dispensable amino acids:</b>						
Alanine	42.6-78.2	10.7	15.6	54.6-82.9	13.2	18.6
Aspartic acid	20.9-68.9	11.5	24.4	10.1-71.8	18.5	39.5
Glycine	36.6-76.1	11.0	17.4	32.9-75.8	13.8	22.1
Glutamic acid	56.8-73.0	8.8	13.2	50.6-82.3	13.1	19.5
Proline	38.0-73.5	11.0	18.2	30.9-78.0	14.2	23.3
Serine	43.6-70.9	7.9	13.5	30.4-77.0	15.1	26.9
Amino acid N	57.2-77.8	9.1	14.0	52.1-80.8	12.9	19.2

*Growing rat model*을 이용한 아미노산 회장흡수율 측정 예시

(2) 난용성 생리활성 소재를 이용한 제품의 면역 증강 효과 검증을 위한 동물실험

- 백혈구 및 대장 조직 DNA 손상 측정 연구
- Real-time PCR을 이용한 염증 관련 후보 유전자 발현 정도 확인
- 혈장 지용성 항산화 비타민 분석 연구
- 적혈구 내 항산화 효소활성 측정 연구

#### 4. 난용성 소재의 가용화 기술개발을 통한 생체이용률이 향상된 분지아미노산의 상품화(3협동: 주식회사대상 이규환)

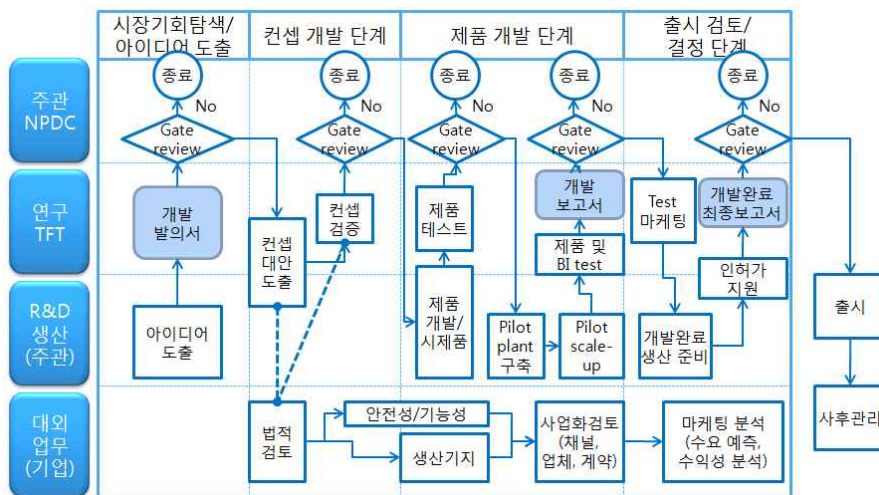
##### 가. 국내외 시장현황 및 환경분석

- (1) 원료수급 현황(아르기닌, 글루타민- 대상(주)의 발효기법을 통한 생산제품 이용가능)
- (2) 시장현황(연평균 성장률, 외국계 글로벌 기업들의 시장 진출현황)
- (3) 융복합 제품 사례 탐색

- 제품 유형별 : 건강기능식품, 식음료, 의약품, 애완용품등
- 제품 기능성별 : 심장 및 혈관건강, 성기능개선, 면역기능, 간 건강등

##### 나. 관련 아미노산을 응용한 시제품의 개발

- (1) 부원료의 발굴 및 각 편의성에 적합한 제품 제형의 선택
  - 부원료 - 국산 농산물을 이용한 제품환(복분자, 인삼 등)
- (2) 기능의 최적화 제품의 설계 및 관능평가를 통한 최상의 배합비 선정
  - 유통기간 내 기능성 소재 안정화를 위한 공정 조건 설계
  - 선정 소재의 적정 첨가 수준 및 가공 안정성 테스트
  - 기능성 소재의 가공특성 연구 및 분석
- (3) Pilot scale 제품 개발 및 기능성분, 영양성분 분석
  - 기능성 소재의 가공특성 연구 및 분석
  - Pilot scale 규모 시험생산을 통한 가공 프로세스 확립
  - 공인기관을 통한 기능성분, 영양성분 분석
- (4) 생산 공정의 표준화를 통한 대량생산의 최적화
- (5) 기능성에 적합한 특정집단을 위한 관능평가
  - 센소메트릭스 등 관능검사 전문기관 의뢰하여 객관적인 외부 관능평가 시스템 활용



신제품개발(NPD) 및 마케팅전략 수립을 위한 공정흐름도

## 제2절. 연구개발 추진체계

- 본 연구진은 난용성 소재의 가용화 기술개발(제1세부: 리포좀-탑재 미세캡슐화, 제1협동: 나노/마이크로에멀전 기술), 생리활성/생체이용률 평가(제2협동) 및 개발기술을 적용한 생리활성 소재의 제품개발/사업화(참여기업) 부문으로 공동 구성되어 있음.
- 또한, 정기적인 연구 진도발표(2회/년)를 통해 세부과제 간 유기적인 협동, 연구방법론/중간결과 공유 및 feedback 시스템(예를 들어 제품개발/대량생산/생산경제성의 제약 및 검토사항을 가용화 기술연구에서 재반영)을 운영함으로써, 현실적이고 합리적인 연구방향을 설정할 수 있었음.
- 결론적으로 이러한 공동연구의 연계성을 극대화함으로써 본 연구과제의 최종목표인 개발기술이 적용된 소재의 사업화까지 달성할 수 있었음.



### 제3절. 연구개발 추진일정

년차	세부과제명	세부연구내용	월 단위 추진계획											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1차년도 (2013)	분지아미노산-붕입 리포솜 설계 및 물리화학적 특성 분석	분지 아미노산의 특성을 고려한 맞춤형 리포솜 설계 및 붕입효율 분석법 확립	■	■	■	■	■							
		분지 아미노산-붕입 리포솜의 물리화학적 특성 분석(평균입자경, 표면 전하 등)			■	■	■	■	■	■				
		분지 아미노산의 붕입효율 극대화를 위한 방안 모색(정전기적 인력, 표면 전하 제어 등)					■	■	■	■	■			
		표면코팅 및 리간드 수식에 의한 분지아미노산-붕입 리포솜의 안정성 및 방출특성 개선									■	■	■	■
	기능성 분지아미노산의 액상 소제화를 위한 고안정성 유화 기술 개발	고안정성 나노/마이크로에멀전 형성을 위한 최적 조건의 확립	■	■	■	■	■							
		고안정성 나노/마이크로에멀전 제조를 위한 유지 및 유화제의 탐색			■	■	■	■	■					
		나노/마이크로에멀전의 이화학적 특성 분석					■	■	■	■	■			
		완성된 나노/마이크로에멀전의 외부요인(pH 및 온도변화 등)에 대한 저장안정성 확인								■	■	■	■	■
		나노/마이크로에멀전 제조 공정의 유효 반응변수 결정 및 유의적인 변화범위 설정을 위한 예비실험	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
	분지아미노산의 분석법 확립 및 <i>in vitro</i> 및 <i>ex</i>	분지아미노산(발린, 류신, 이소류신)의 분석법 확립	■	■	■	■	■							









## 제4절 연구방법 및 결과

### 1. 리포솜-담재 미세캡슐 제조 및 물리화학적 특성분석/개선(1세부: 서울대학교 장판식)

가. 분지아미노산-봉입 리포솜 설계 및 물리화학적 특성 분석

(1) 분지아미노산의 특성을 고려한 맞춤형 리포솜 설계

(가) Microfluidic chip 기반의 리포솜 제조 기술 연구개발

- ① Hydrodynamic focusing 기술 유래 microfluidic chip 기반의 리포솜 제조 기술 개발
  - 리포솜을 제조하기 위한 기술에는 sonication, extrusion 등 여러 가지 리포솜 제조 방법이 있음(Figure 1-1(a)). 하지만 기존 리포솜 제조 기술은 균일한 크기의 리포솜을 제조하기 어려우며, 입자크기 조절이 용이하지 못하다는 한계를 지님. 이러한 한계를 극복하기 위하여 hydrodynamic focusing 방법을 이용하여 리포솜을 조립하는 microfluidic chip 기반의 리포솜 제조 기술을 개발함.
  - Hydrodynamic focusing 기법을 이용한 microfluidic chip 기반의 리포솜 제조 기술의 원리는 서로 다른 hydrophilicity를 가진 두 종류의 유체(water phase, oil phase)가 microchannel안에서 혼합됨으로써 oil phase안에 포함된 인지질이 continuous phase인 water phase와 만나면서 열역학적으로 가장 안정한 구 형태로 조립되어 outlet을 통해 나옴으로써 균일한 리포솜이 자발적으로 만들어지게 되는 기술임(Figure 1-1(b)).

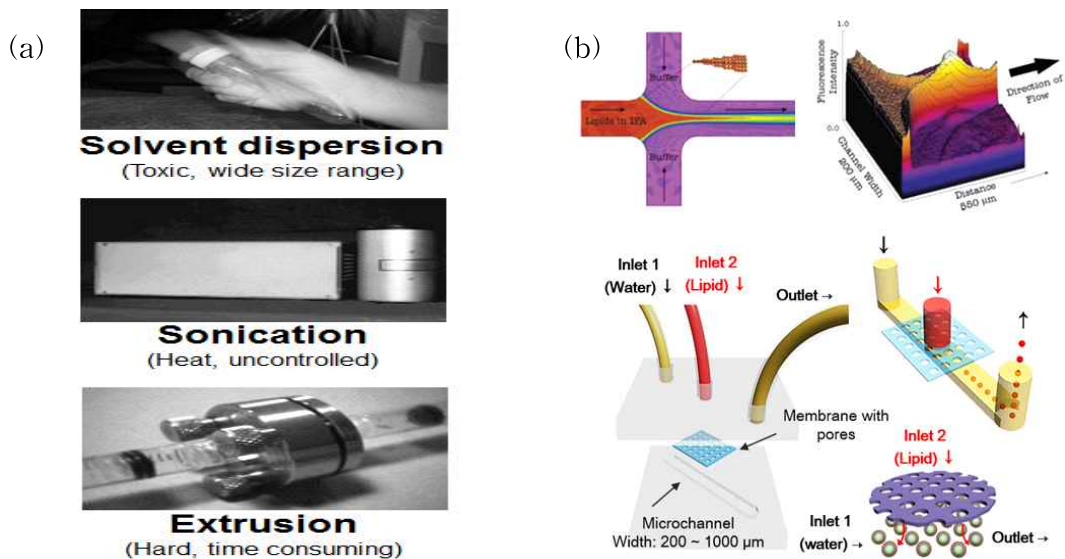


Figure 1-1. 일반적인 리포솜 제조 기술(a) 및 hydrodynamic focusing 기법을 이용한 microfluidic chip 기반 리포솜 제조 기술 모식도(b).

- 이러한 이론적인 원리를 바탕으로 Figure 1-2와 같이 microfluidic chip 기반 리포솜 제조 시스템을 구축함. Inlet 1과 inlet 2에 일정한 유속을 조절하기 위하여 syringe pump(KD scientific 100)를 이용하여 각각 일정한 유속이 흐르도록 조절함. Inlet 1에는 water phase가 흐르도록 하였으며, phospholipid가 함유된 isopropyl alcohol 용

액의 oil phase는 inlet 2에 흐르도록 설정함. 자발적으로 조립된 리포솜은 배출구를 통하여 채취함.

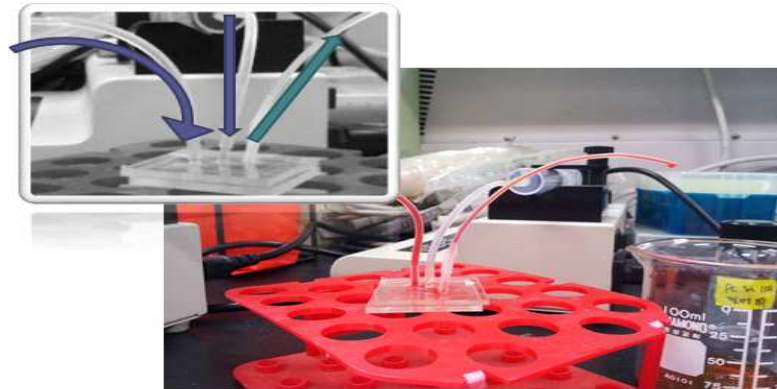


Figure 1-2. Microfluidic 기반 리포솜 제조 시스템 확립.

② 리포솜 제조를 위한 분지아미노산 용매 설정

- 분지아미노산을 리포솜에 탑재하기 위하여 용매 선정을 진행함. 용매 선정은 polarity index(Table 1-1)를 기준으로 비극성도가 강한 *n*-hexane, oil phase의 용매인 2-propanol, 중간정도의 비극성도를 가지는 acetonitrile과 dimethylsulfoxide를 비롯하여 비극성도가 가장 낮은 물에 이르기 까지 다양한 용매들을 통하여 분지아미노산의 용해도를 살펴봄. 그 결과, 분지아미노산을 녹일 수 있는 용매로서 물을 선정함.

Table 1-1. Polarity index를 통한 분지아미노산 용매 선정

Polarity Index	Solvent	Viscosity	Boiling Point, °C(1atm)	Miscibility Number(M)
-0.3	<i>n</i> -Decane	0.92	174.1	29
-0.4	Iso-octane	0.50	99.2	29
0.0	<i>n</i> -Hexane	0.313	68.7	29
0.0	Cyclohexane	0.98	80.7	28
1.7	Butyl ether	0.70	142.2	26
1.8	Triethylamine	0.38	89.5	26
2.2	Isopropyl ether	0.33	68.3	-
2.3	Toluene	0.59	101.6	23
2.4	<i>p</i> -Xylene	0.70	138.0	24
3.0	Benzene	0.65	80.1	21
3.3	Benzyl ether	5.33	288.3	-
3.4	Methylene chloride	0.44	39.8	20
3.7	Ethylene chloride	0.79	83.5	20
3.9	Butyl alcohol	3.00	117.7	-
3.9	Butanol	3.01	117.7	15
4.2	Tetrahydrofuran	0.55	66.0	17
4.3	Ethyl acetate	0.47	77.1	19
4.3	1-propanol	2.30	97.2	15
4.3	2-propanol	2.35	117.7	15
4.4	Methyl acetate	0.45	56.3	15, 17
4.5	Methyl ethyl ketone	0.43	80.0	17
4.5	Cyclohexanone	2.24	155.7	28
4.5	Nitrobenzene	2.03	210.8	14, 20

4.6	Benzonitrile	1.22	191.1	15, 19
4.8	Dioxane	1.54	101.3	17
5.2	Ethanol	1.20	78.3	14
5.3	Pyridine	0.94	115.3	16
5.3	Nitroethane	0.68	114.0	-
5.4	Acetone	0.23	56.3	15, 17
5.5	Benzyl alcohol	5.80	205.5	13
5.7	Methoxyethanol	1.72	124.6	13
6.2	Acetonitrile	0.37	81.6	11, 17
6.2	Acetic acid	1.26	117.9	14
6.4	Dimethylformamide	0.90	153.0	12
6.5	Dimethylsulfoxide	2.24	189.0	9
6.6	Methanol	0.60	64.7	12
7.3	Formamide	3.76	210.5	3
9.0	Water	1.00	100.0	-

(가) Microfluidic chip 기반 리포솜 조립 공정 확립

- 본 연구진이 새롭게 구축한 microfluidic chip 기반 리포솜 제조 시스템을 이용하여 분지아미노산 탑재 리포솜을 제조하기 위하여 리포솜 조립 공정을 확립함. 리포솜 조립 공정에서 리포솜 형성에 영향을 미칠 수 있는 인자로서 inlet 1과 inlet 2의 유속비 및 water phase의 buffer를 설정함.

① Microfluidic chip inlet 유속에 따른 리포솜 분석

- Microfluidic chip 기반 리포솜 제조 시스템은 각각 inlet의 유속에 따라 리포솜 크기 및 분포도를 조절할 수 있음. 분지아미노산의 생체이용률 향상을 위한 최적 리포솜 크기인 100 nm를 기준으로 하여, 리포솜을 제조하기 위하여 inlet 1(water phase)의 유속을 60 mL/h로 고정하고, inlet 2(oil phase)의 유속을 조절하여 리포솜을 제조함. 그 결과, inlet 2의 유속이 빨라질수록 리포솜의 평균 입자 크기가 커지는 것을 확인할 수 있었음. 또한 유속이 낮을 때 분지 아미노산 탑재 리포솜의 입자 크기 분포도는 유속이 빠를 때에 비해 각각의 실험군에 대한 편차가 상당히 큰 것을 확인할 수 있었음. 이는 유속이 낮을 때 제조되는 리포솜 용액에서 차지하는 인지질의 농도가 낮으며, 낮은 농도로 인하여 생성되는 리포솜의 양이 매우 적어 입자 크기 분석에 적절하지 않은 수준임을 확인할 수 있었음(Table 1-2). 유속별로 제조된 리포솜의 입자 크기 분포도를 비교하였을 때, 생체 이용에 가장 적합한 100 nm 근처의 리포솜을 균일하게 제조하기 위해 inlet 2의 유속 6.0 mL/h가 가장 적합한 것으로 확인됨. 6.0 mL/h 이상의 유속에서는 리포솜이 제대로 형성되지 않는 것을 확인함. 결과적으로 본 microfluidic chip 기반 리포솜 제조 시스템의 최적 유속은 inlet 1 유속 60 mL/h, inlet 2의 유속 6.0 mL/h임.

Table 1-2. Oil phase 유속별 분지아미노산 탑재 리포솜 크기 분포도

Average diameter(nm)	Flow rate of microfluidic device (Water phase/Oil phase)(mL/h)		
	Oil phase	Oil phase	Oil phase
	a. 1.5 mL/h	b. 3.0 mL/h	c. 6.0 mL/h
15.69	1.5		
18.17	5.4		
21.04	8.3	1.5	
24.36	7.9	5.4	
28.21	8.1	11.1	
32.67	11.8	18.3	
37.84	14.7	21.63	
43.82	13.6	17.9	0.4
50.75	10.5	11.6	3.9
58.77	7.1	6.4	11.6
68.06	4.5	3.2	18.2
78.82	2.7	1.5	18.9
91.28	1.6	0.7	15.4
105.7	0.9	0.3	10.9
122.4	0.5	0.2	7.1
141.8	0.3	0.1	4.5
164.2	0.2	0.1	2.9

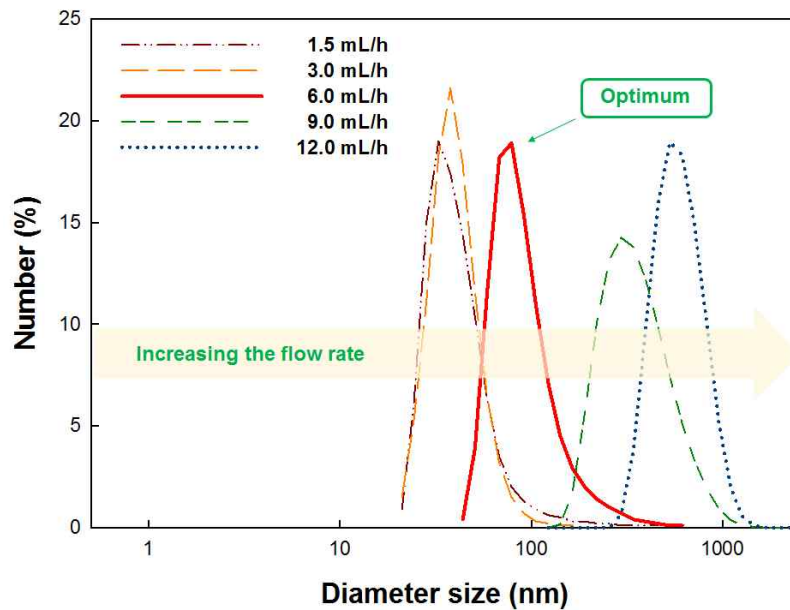


Figure 1-3. DLS 분석을 통한 oil phase 유속별 분지아미노산 탑재 리포솜 크기 분포도.

② Buffer 선정

- Continuous phase를 구성하는 buffer는 리포솜 제조 공정에서 리포솜의 물리화학적 성질에 큰 영향을 미치는 요소임. 리포솜은 인공적인 vesicle이기 때문에 hydrodynamic focusing 방법에 의한 리포솜 제조공정상 내부와 외부의 물질은 동일

한 조성의 continuous phase로 구성되어 있음. 이로 인하여 기본적으로 삼투압이나 pH에 영향을 받지 않음. 하지만, 분지아미노산 봉입 리포솜이 생체에 이용될 경우 리포솜의 안정성은 생체내 생리학적 조건에 의해 크게 좌우되기 때문에 pH와 삼투압 등의 기본적인 조건은 생체내와 비슷한 환경으로 구성되어야 함. 생체내 pH를 고려하여 pH 7~8 사이의 이용가능한 buffer들을 이용하여 제조한 결과, HEPES buffer에서 구형을 지닌 균일한 리포솜에 조립되는 것을 확인할 수 있었음(Figure 1-4). 일반적으로 PBS(phosphate buffered saline)가 생리학적 조건에 가장 적합한 buffer로 알려져 있으나, 본 연구에서 이용한 분지아미노산 정량 방법을 이용 시 PBS에 의하여 분지아미노산 정량분석의 오차가 발생됨. Ionic buffer를 사용했을 때는 nonionic buffer를 사용하였을 때에 비해 lipid bilayer의 phosphate group과 상호작용에 의해서 막 안정성이 감소시키는 되는 것을 확인함. Tris-HCl buffer를 이용한 리포솜 제조 예비실험 결과, Tris-HCl buffer는 lipid성분과 반응성이 좋고, 용해도가 높아 리포솜 제조에 적합하지 않은 것을 확인함(Figure 1-5).

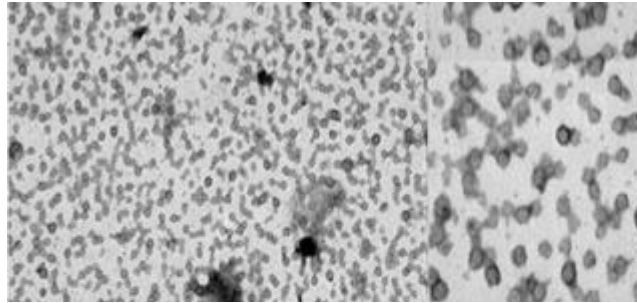


Figure 1-4. HEPES buffer를 이용하여 만든 리포솜 형태.

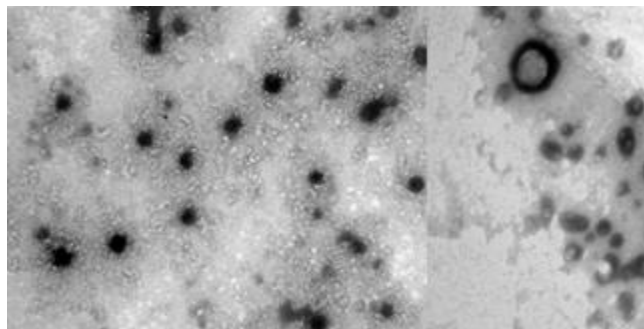


Figure 1-5. Tris-HCl buffer를 이용하여 만든 리포솜 형태.

### ③ Filtration 과정

- 본 연구에서는 제조된 리포솜을 0.8  $\mu\text{m}$  pore size filter를 이용하여 여러 번의 필터 과정을 거친 후 DLS 결과를 분석함으로써 DLS 결과의 신뢰성 및 filtration과정의 유용성 및 최적횡수를 확인함. 그 결과, 제조된 리포솜의 크기는 평균 100 nm 이하로 필터를 횡수가 증가 할수록 평균 입자 크기가 서서히 감소함을 DLS number distribution을 통해 알 수 있었음. 하지만 필터의 횡수에 의한 리포솜 크기 변화의 차이는 오차범위를 상회할 정도로 크지 않기 때문에 차후에 진행되는 모든 실험에서



필터과정은 한번으로 고정함.

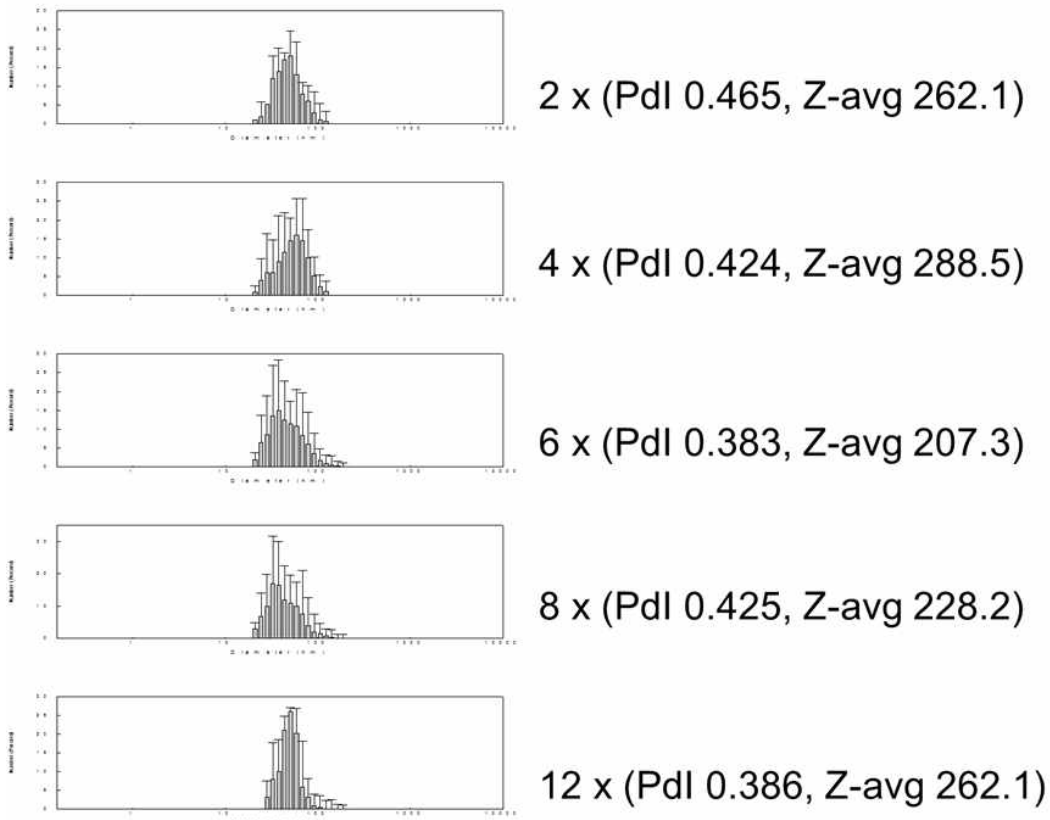


Figure 1-6. Filtration 횟수에 따른 분지아미노산 탑재 리포솜 크기 분포도.

#### ④ 리포솜 제조 후 처리과정

- 리포솜을 제조하기 위해서는 제조과정 중 온도를 lipid의 transition temperature 이상으로 유지해주어야 하며 반대로 제조된 리포솜을 안정하게 보관하기 위해서 transition temperature 이하의 온도에서 보관해야함. 제조된 리포솜은 보통 냉장온도 (4℃)에서 보관하는데 리포솜의 보관 상태에 따라 안정성의 편차가 상이한 것을 확인할 수 있음.

제조된 리포솜 내에 IPA는 앞서 microfluidic chip의 유속조절에 관련된 실험을 진행하면서 실험 및 조사한 결과에 의하면 전체 용액의 10%를 하회하는 농도까지는 리포솜의 안정성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보임. 하지만 최종 리포솜 용액에서는 IPA를 완전히 제거하는 것이 가장 바람직하며 이를 위해 리포솜의 안정성에 영향을 최소화하면서 IPA를 제거를 하는 다양한 방법에 대해 고려함. 가장 기본적으로 고려할 수 있는 방법은 가열에 의한 IPA 제거인데 alcohol은 휘발성이 강하기 때문에 가열하면 쉽게 리포솜 용액의 IPA를 제거할 수 있음. 본 연구진의 선행 연구인 hydrodynamic focusing에 의한 PCDA liposome제조에서도 리포솜 용액 내의 IPA를 가열 과정을 통해 제거하였는데, 이때 온도는 약 70~80℃ 정도로 설정함.

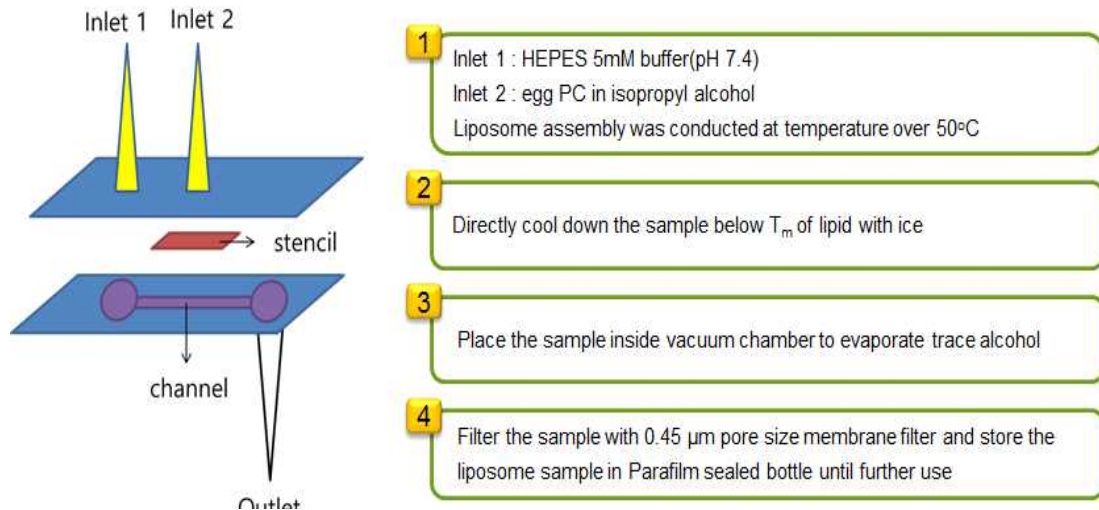


Figure 1-7. Microfluidic chip 기반 분지 아미노산 리포솜 제조 방법.

(2) 분지아미노산-봉입 리포솜의 물리화학적 특성 분석

(가) Dynamic light scattering(DLS)를 통한 분지아미노산-봉입 리포솜의 입자 분포도 분석

- 본 연구진이 구축한 microfluidic chip 기반 리포솜 제조 기술을 통하여 분지 아미노산 탑재 리포솜을 제조하였다. 제조한 리포솜을 후처리 과정 후, 입자 크기 및 분포도를 DLS를 통하여 분석하였고, 분석 결과는 다음과 같음(Figure 1-8).

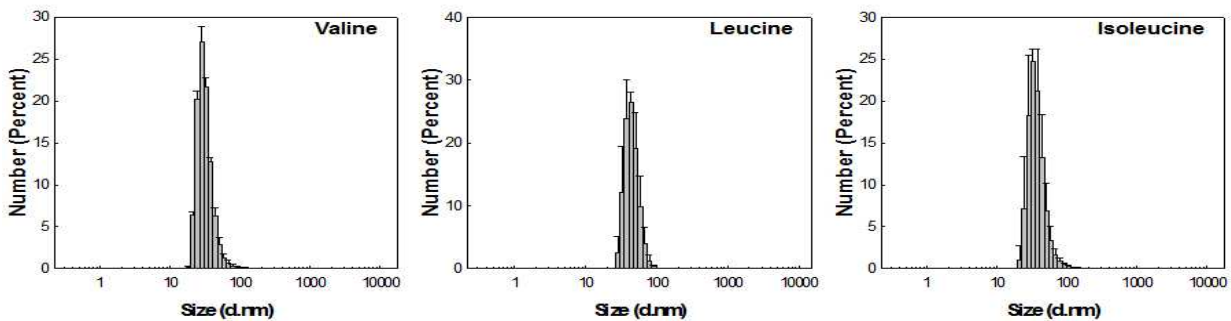


Figure 1-8. 분지아미노산 봉입 리포솜의 입자 분포도.

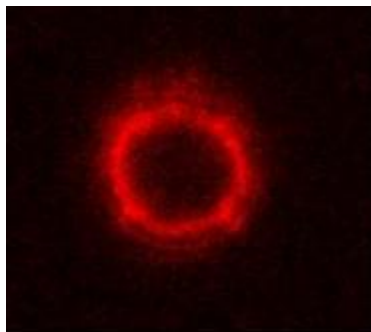
- 분지 아미노산 탑재 리포솜은 대부분 80~100 nm의 균일한 나노 크기로 제조되는 것을 확인함.

(나) 분지아미노산-봉입 리포솜의 형태학적 분석

① Confocal laser scanning microscopy(CLSM)를 통한 분지 아미노산-봉입 리포솜 분석

- 구축된 방법을 통해 제조된 리포솜의 형태를 관찰하기 위하여 CLSM을 이용하여 표면분석을 시행함. CLSM은 z-axis까지 visualization이 가능하므로 해상도가 높고 명확한 형태를 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있으며, 시료에 대한 전처리과정이 필요하지 않기 때문에 시료의 정확한 3차원 구조를 관찰 할 수 있음. CLSM 분석을 위

해 리포솜 제조시 oil phase에 rhodamine 6G를 첨가하여 phospholipid를 염색함. CLSM 분석을 실시한 결과 다음과 같은 형태를 관찰함.



CLSM analysis conditions	
Model	Leica TCS SP8X Gated STED(Leica, Germany)
Fluorescent dye	Rhodamine 6G
Ex/Em wavelength	528/561 nm
Liposome sample preparation	Egg PC with HEPES, ~3x concentrated through MWCO 10000 membrane filter

Figure 1-9. CLSM을 통한 rhodamine 6G을 통한 분지 아미노산-봉입 리포솜 형태 분석.

- 분석결과, 명확한 3차원 구조의 리포솜이 관찰되지 않았는데, 이는 CLSM에 로딩된 액상의 리포솜 시료의 80~100 nm 크기의 리포솜이 브라운운동을 하고 있어 명확한 관찰이 어렵다고 판단됨.
- ② Transmission electron microscopy(TEM)를 통한 분지 아미노산-봉입 리포솜 분석
- 리포솜의 형태학적 분석을 위해 TEM 분석을 시행함. TEM 분석을 위하여 전처리 과정으로 formvar/carbon grid에 리포솜을 고정시킨 후, uranyl acetate를 통하여 리포솜을 negative staining함. 80 keV TEM을 사용하여 시료가 로딩 되어있는 grid의 손상이 최소화되도록 진행함. 투과전자현미경을 통하여 리포솜의 형태를 관찰한 결과 다음과 같은 구형의 균일한 리포솜을 확인함(Figure 1-10).

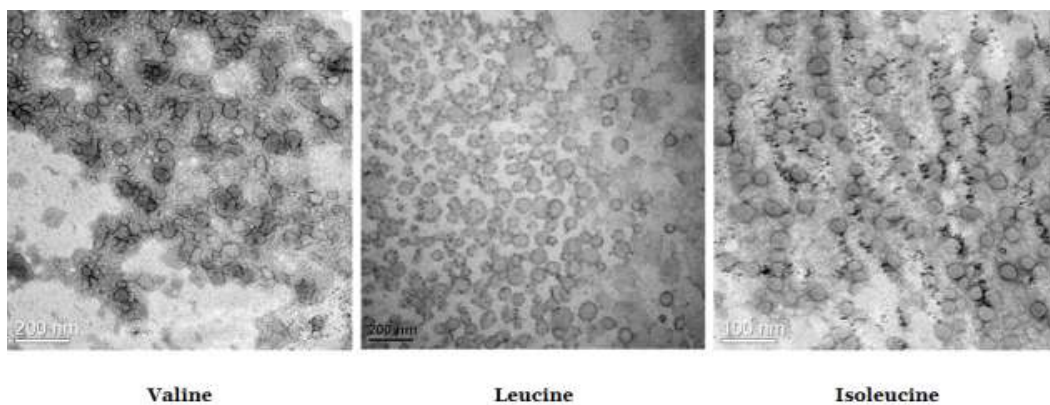


Figure 1-10. TEM을 통한 분지 아미노산-봉입 리포솜의 형태학적 분석도.

(3) 분지아미노산의 봉입효율 극대화를 위한 방안 모색

(가) Phospholipid 종류에 따른 봉입효율 증대방안

- 리포솜의 이중막 주요 구성성분인 phospholipid는 리포솜의 전체적인 안정성, 투과성과 같은 물리화화적인 성질을 결정하는 요인이다. 분지 아미노산의 봉입효율을 증대

하고, 봉입된 분지 아미노산의 저장 안정성을 높이기 위하여 다양한 phospholipid를 비교한 후 분지 아미노산-봉입 리포솜에 적합한 최적의 인지질을 선정함.

- Phospholipid의 acyl chain이 포화지방산으로 구성되어있으면 불포화지방산으로 구성되어있을 경우에 비해 상전이온도가 높음. 기존 리포솜의 경우 천연물 유래의 egg PC나 soybean PC를 이용하여 리포솜을 제조함. 하지만 이들의 상전이온도가 영하 또는 상온이하이기 때문에 상온이나 냉장온도에서 보관하더라도 리포솜 자체가 불안정하므로 내부 생리활성 물질을 제대로 포집하지 못하는 한계를 지님. 그렇기 때문에 분지아미노산-봉입 리포솜을 제조하기 위한 phospholipid로서 기본적으로 상전이온도가 상온이상인 포화지방산을 위주로 사용적합성을 살펴봄.
- 다양한 조건을 고려해본 결과, 리포솜의 building block으로 DPPC를 선정함. 상전이온도는 41℃로서, 리포솜을 제조할 때 상전이온도 이상으로 온도를 높이기 용이하며 제조 후에 상온/냉장온도에서 보관할 때의 온도도 상전이 온도 이하의 조건이기 때문에 리포솜 제조에 적합한 인지질로 판단됨. 또한 DPPC는 포화지방산으로 구성된 인지질이기에 때문에 불포화지방산이 많이 함유되어있는 천연 PC에 비해서 산화안정성, 저장안정성이 높음. 또한 가격이 다른 PC에 비해 저렴하기 때문에 가격경쟁성을 지님. 종합적으로 분지 아미노산의 봉입 효율을 증대시키기 위해서 기존 egg PC를 이용하여 조립하던 리포솜을 DPPC로 대체 하여 조립하는 것이 좋을 것으로 판단함.
- 하지만 saturated phospholipid로 만들어진 리포솜은 막구조 자체의 유동성이나 탄력성이 떨어질 수 있다는 단점이 있을 것으로 예상됨. 이러한 단점을 극복하고 리포솜 안정성을 증대 시킬 수 있는 방안으로 cholesterol 첨가가 있음.

Table 1-3. PC종류별 지방 구성 비율 및 상전이온도

Name	Fatty acid	Transition Temperature(℃)	Net charge at pH 7.4
DLPC	12:0	-1	0
DMPC	14:0	23	0
DPPC	16:0	41	0
DSPC	18:0	55	0
DOPC	18:1	-20	0
DMPE	14:0	50	0
DPPE	16:0	63	0
DOPE	18:1	-16	0
DMPA • Na	14:0	50	-1.3
DPPA • Na	16:0	67	-1.3
DOPA • Na	18:1	-8	-1.3
DMPG • Na	14:0	23	-1
DPPG • Na	16:0	41	-1
DOPG • Na	18:1	-18	-1
DMPS • Na	14:0	35	-1
DPPS • Na	16:0	54	-1
DOPS • Na	18:1	-11	-1
DOPE-mPEG-2000 • (Na) <sub>2</sub>	18:1	~10	-2
DSPE-mPEG-2000 • Na	18:0	N/A	-1
DSPE-mPEG-5000 • Na	18:0	N/A	-1
DSPE-Maleimide	18:0	N/A	-1
PEG-2000 • Na	18:0	N/A	-1
DOTAP • Cl	18:1	~0	+1

- DLS 분석을 통하여 DPPC와 egg PC로 조립한 리포솜의 입자 분포도를 분석한 결과, DPPC를 이용하여 리포솜을 조립하였을 때 평균입자 크기가 egg PC를 이용하였을 때에 비해 더 작은 것으로 나타났으며, 단일 크기의 리포솜이 조립되는 것으로 나타남(Figure 1-11).

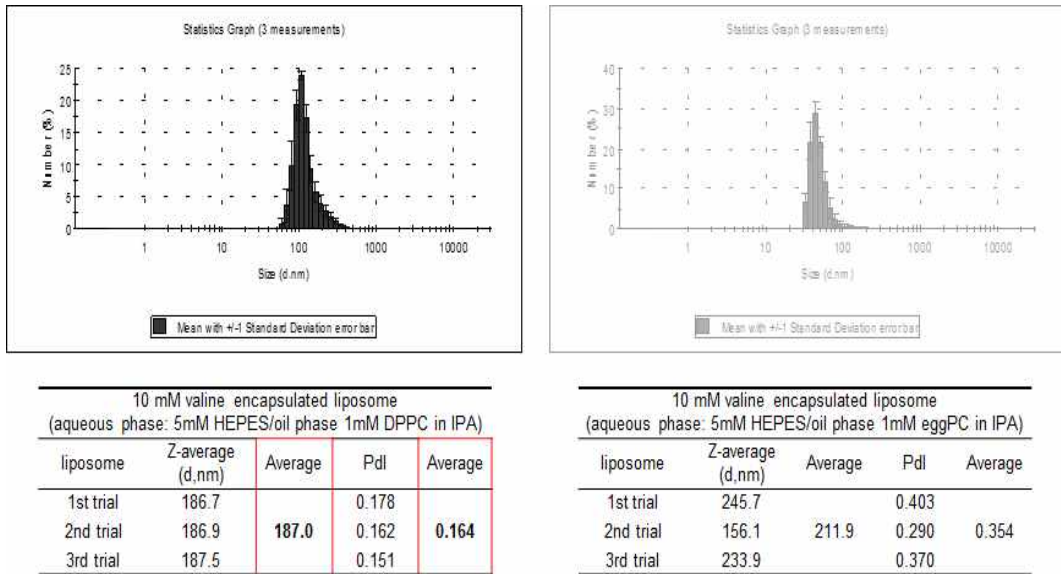


Figure 1-11. DLS 분석을 통하여 DPPC(좌)와 egg PC(우)를 이용한 분지아미노산-붕입 리포솜 입자 크기 분포도.

#### (4) 리간드 수식에 의한 분지아미노산-붕입 리포솜의 안정성 및 방출특성 개선

##### (가) Cholesterol 첨가를 통한 분지아미노산-붕입 리포솜의 안정성 개선

- Cholesterol은 실제 세포의 인지질 이중막 안에도 다량 포함되어 막의 유동성 및 안정성 유지에 중요한 역할을 함. 리포솜 제조공정에서도 인지질만을 첨가하게 되면 자체의 안정성이 낮아지고 외부 환경(열, pH, 삼투압 등)변화에도 민감하기 때문에 보통은 리포솜 내에 일정 비율의 cholesterol을 첨가하여 안정성 및 기능성을 향상시킬 수 있음.
- 포화지방산으로 이루어진 saturated phospholipid는 지방산 사슬이 기하학적으로 빈틈없이 겹쳐져있는(packed) 구조이기 때문에 cholesterol과 같은 연쇄고리형의 물질을 첨가해주면 막의 유동성이 증가하고 상전이온도가 전체적으로 내려가게 됨. 반대로 unsaturated phospholipid는 지방산 사슬 자체가 굽어져 있기 때문에(kinked) saturated phospholipid에 비해서 막 유동성이 상당히 높고 상전이 온도도 낮음. 즉, unsaturated phospholipid 자체만으로 리포솜을 제조하게되면 내부 함유물질을 제대로 포집할 수 없게 되어 목적하는 리포솜을 제대로 만들지 못하게 됨.
- 보통 리포솜을 조립할 때 cholesterol과 phospholipid를 적절한 비율로 섞게 되는데 이 때 고려해야할 것이 lipid의 상전이 온도임. Cholesterol은 막의 유동성을 조절하는 역할 뿐 아니라 cholesterol의 비율에 따라 리포솜을 조립하기 위한 최소온도(상전이온도 이상)에도 변화가 생기기 때문에 이를 DSC를 통한 직접관찰 및 DLS 분석

을 통한 간접적인 관찰을 통해 리포솜을 구성하는 lipid의 조성에 맞는 최적의 온도를 설정하였음.

- 본 연구에서는 리포솜을 제조하는 과정에서 phospholipid와 cholesterol의 비율을 다양하게 고려하여 리포솜 조립에 있어서 최적의 lipid composition을 선정하였다. 그 결과 8 : 2 molar ratio의 리포솜이 재현성이 높은 100 nm 전후의 입자 분포도를 나타내었기 때문에 본 연구에서도 이를 토대로 DPPC : Chol.= 8 : 2(i.e. 4 : 1) 비율로 리포솜을 제조함.

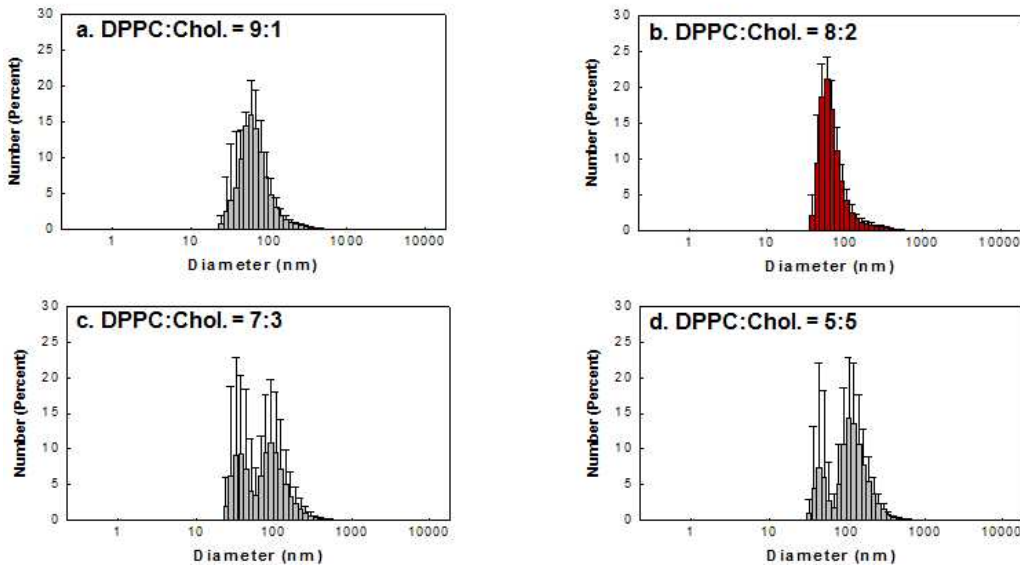


Figure 1-12. DPPC와 cholesterol 비율별 분지아미노산-붕입 리포솜의 입자 크기 분포도.

(나) Cholesterol 대체  $\beta$ -sitosterol 이용 분지아미노산-붕입 리포솜 제조

- Cholesterol은 보편적으로 리포솜 제조에서 광범위하게 사용되어 왔지만 항상 비만과 같은 성인병에 직·간접적으로 관여하는 물질이기 때문에 cholesterol을 효과적으로 대체할 수 있는 물질을 찾고자하는 노력이 꾸준히 진행되고 있음.
- 최근에는 phytochemical 중에서 콜레스테롤 억제 효과가 있으며 구조적으로도 콜레스테롤과 비슷한 스테롤구조(고리구조)를 가지고 있는  $\beta$ -sitosterol을 이용하여 리포솜을 제조하고자 하는 연구가 주목 받음.
- 보다 기능적으로 증진된 식품소재로 리포솜을 사용하기 위하여, cholesterol의 대체제인  $\beta$ -sitosterol를 첨가하여 리포솜 제조후, 물리화학적 분석결과  $\beta$ -sitosterol이 효과적으로 cholesterol를 대체할 수 있음을 확인함.

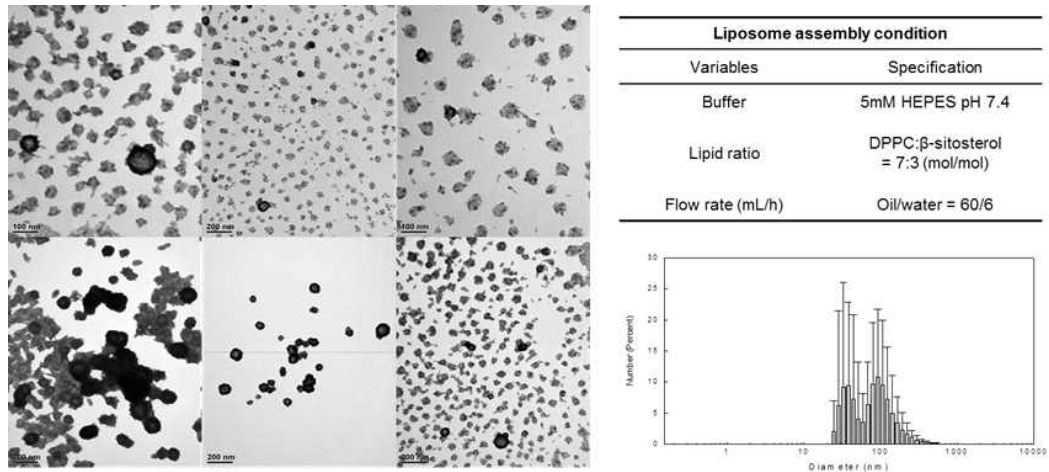


Figure 1-13. TEM 및 DLS 분석을 통하여 beta-sitosterol 첨가 분지아미노산-붕입 리포솜의 특징

(다) 분지아미노산-붕입 리포솜의 분산안정성 제어 및 평가

- 선행 연구에서 선정된 유화제(16:0 DPPC)를 사용하여 리포솜을 제조하고 투과전자현미경을 사용하여 분산안정성을 확인함. 또한, 산업적인 측면을 고려하여, 생산단가에 맞게 적용가능한 유화제(Span 40)를 사용하여 니오솜(niosome)을 제조하고, 리포솜과 같이 분산안정성을 확인함. 제조된 리포솜 및 니오솜을 4°C에서 일주일 동안 보관 후 형태를 분석한 결과, 리포솜은 응집현상이 발생한 것을 확인하였으며, 반면 니오솜의 경우 안정한 구 형태를 유지하는 것을 확인함(Figure 1-14(a)).

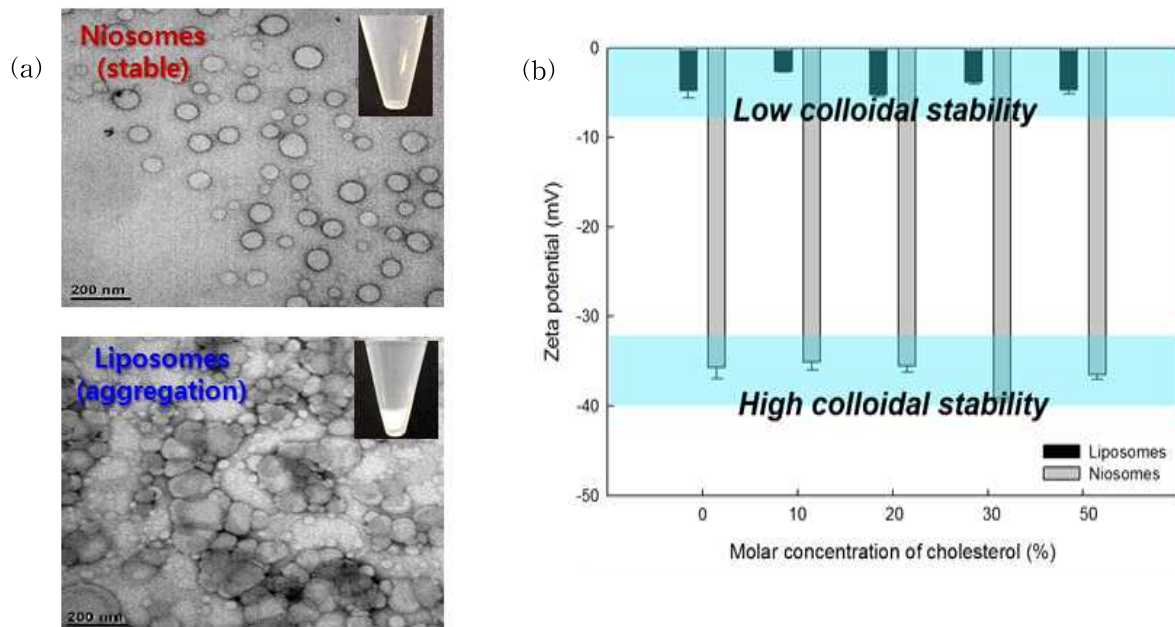


Figure 1-14. TEM 분석을 통한 리포솜과 니오솜의 형태분석(a) 및 제타전위를 통한 리포솜과 니오솜의 분산안정성 분석(b).

- 보다 명확한 원인을 분석하기 위하여 제조된 리포솜과 니오솜의 제타전위(zeta potential)를 측정함. 리포솜 및 니오솜과 같은 lipid vesicle은 알짜 전하의 종류에 따

라 제타전위의 부호가 결정되며, 분산안정성이 뛰어난 vesicle의 경우 제타전위의 절대값이 크고 응집현상이 나타나지 않음. 이러한 원리를 바탕으로 lipid nano-vesicle의 제타전위를 측정하였으며, 그 결과 분산안정성을 보인 니오솜에서는 -35 mV 전후의 제타전위를 가졌으며, 리포솜의 경우 콜레스테롤 함량에 상관없이 -5 mV 전후의 낮은 제타전위를 가지는 것으로 확인됨. 이를 토대로, 리포솜의 경우 제조 후 보관시 분산안정성이 니오솜에 비해 상대적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 표면전하의 영향으로 인한 것으로 확인함(Figure 1-14(b)).

(라) 이온성 유화제 첨가에 의한 분지아미노산-봉입 리포솜의 분산안정성 개선

- 이러한 분산안정성이 낮은 리포솜의 분산안정성 개선을 위하여 리포솜에 이온성 유화제를 첨가하여 리포솜의 분산안정성을 개선하고자함. 리포솜의 표면에 전하를 부여하기 위해 음전하를 띄는 palmitic acid와 양전하를 띄는 hexadecylamine을 리포솜 제조 시 첨가하였으며, 제조된 리포솜의 표면전하량을 나타내는 제타전위와 입도 분포 균일성을 나타내는 지표인 PdI를 측정하여 분산안정성을 확인함. 앞선 예비실험을 통하여 제타전위의 절대값이 20 mV이상일 때 4°C에서 30일 이상 보관하여도 응집현상을 나타내지 않았기 때문에, 분산안정성의 최적 구간을 절대값 20 mV이상으로 기준을 설정하여 최적 이온성 유화제의 농도를 구함. Palmitic acid를 20~40%의 몰농도로 첨가하였을 때 제타전위의 절대값이 20 mV 이상 되었고, 입도분포의 균일성을 고려하였을 때, PdI 값이 상대적으로 제일 낮은 20%의 몰농도를 최적 농도로 선정하였함(Figure 1-15(a)). Hexadecylamine의 경우, 5-20%의 몰농도로 첨가하였을 때 제타전위의 절대값이 20 mV 이상 되었고, 이 중 PdI 값이 상대적으로 낮은 4%의 몰농도를 최적 농도로 선정함(Figure 1-15(b)).

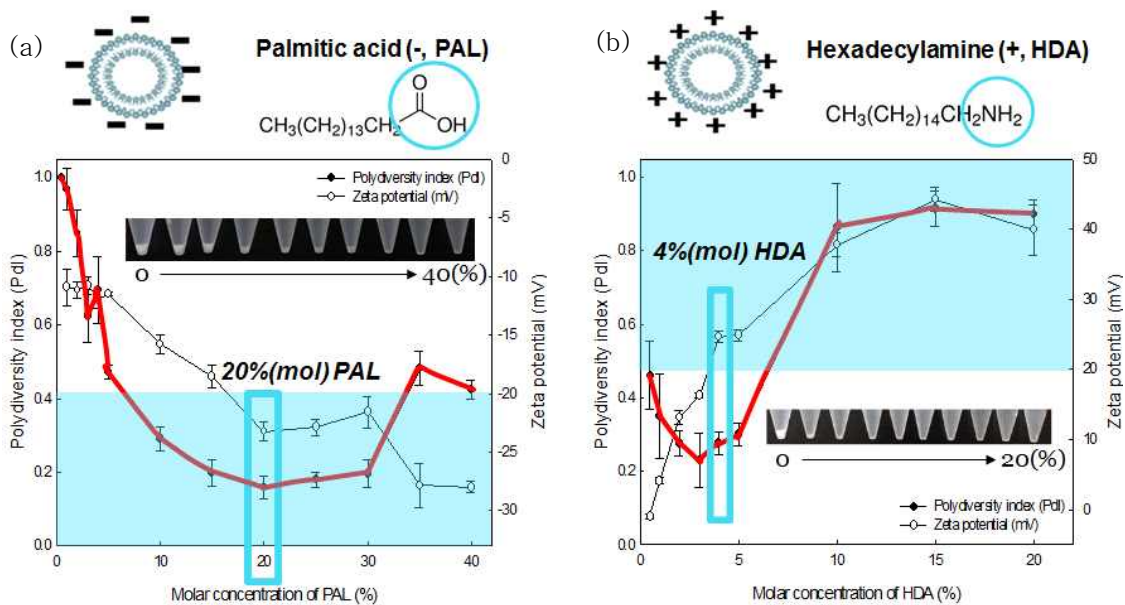


Figure 1-15. Palmitic acid(a) 및 hexadecylamine(b)의 첨가에 의한 리포솜의 분산안정성 및 입자분포도 분석.



(5) 분지아미노산-붕입 리포솜의 붕입효율 분석법 확립

(가) 분지아미노산 정량법 확립

- 분지아미노산-붕입 리포솜의 붕입효율을 분석하기 위하여 우선적으로 분지아미노산 정량법을 확립함. 신속성 및 정확성을 위하여 다양한 방법 중 ninhydrin 용액을 이용하여 분지 아미노산의 정량법을 확립함. 분지 아미노산 정량 방법은 다음과 같은 순서로 진행함(Figure 1-16).

- 1 200 mg ninhydrin(Sigma Co.) and 7.5 mL ethylene glycol(Sigma Co.) are added and vortexed together.
- 2 2.5 mL of 4N sodium acetate buffer is added into 1) and vortexed until no precipitate is visible.
- 3 50 mg of stannous chloride powder(Daejung Chemical Co.) is added into 500  $\mu$ L of ethylene glycol and vortexed until no precipitate is visible.
- 4 Just before the experiment, 250  $\mu$ L of 3) is added into 2) and vortexed for 5 sec. the reagent color should be pale-red.
- 5 The color of the reagent continuously changes into dark purple, which indicates the stability and quality of the reagent do not meet the experimental criteria.

Figure 1-16. Ninhydrin을 통한 분지아미노산 정량 방법.

- 확립된 ninhydrin 용액을 이용하여 다음의 valine, isoleucine, leucine의 정량곡선을 얻음(Figure 1-17).

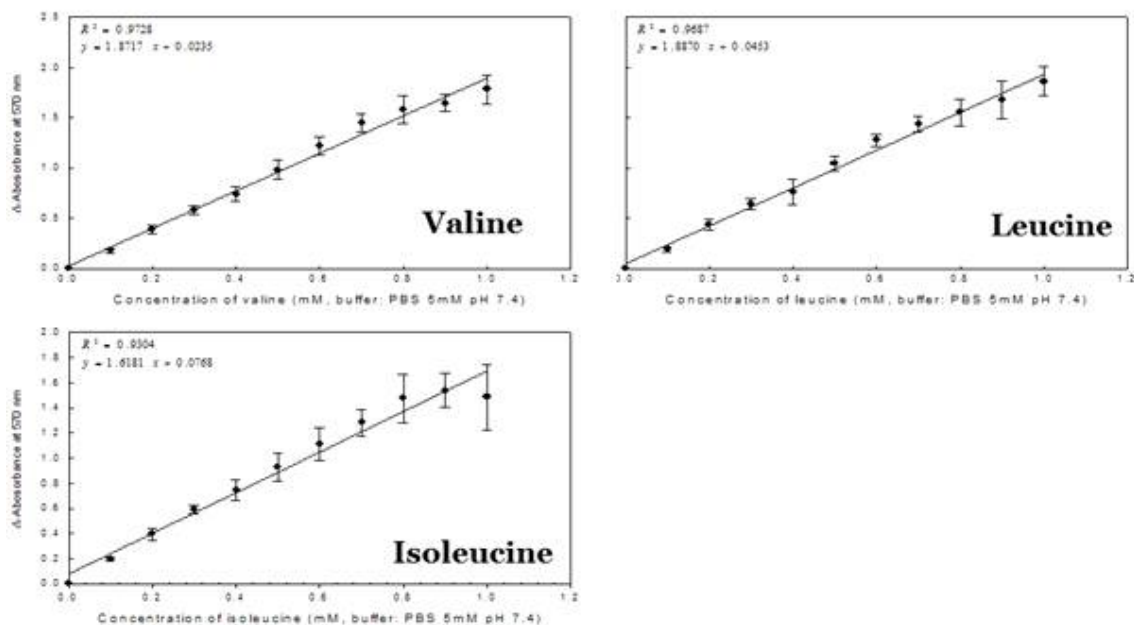


Figure 1-17. Ninhydrin 용액을 이용한 분지아미노산의 정량곡선.

(나) 분지아미노산-봉입 리포솜의 분리·정제 공정 구축

① Calcein 리포솜 분리를 통한 선행연구

- Calcein 리포솜은 fluorescent dye인 calcein을 함유하고 있기 때문에 리포솜 샘플 자체도 주황색~노란색을 띄며 gel permeation chromatography(GPC) 컬럼에 로딩했을 때 용액의 전개가 뚜렷하게 관찰할 수 있음. 이에 비해 본 연구에서 제조하는 BCAA liposome은 무색, 반투명한 상태로써 추가적인 분석을 진행하지 않고서는 어느 부분에서 리포솜이 elution 되는지 알 수 없기 때문에 색깔을 띄는 calcein 리포솜을 이용하여 리포솜 분리·정제 연구를 진행함.
- 직접 제조한 calcein 리포솜을 GPC 컬럼(sephadex G-25 prepacked)을 통하여 분리·정제를 함. 리포솜 및 포집되지 않은 생리활성물질이 나오는 elution volume을 확인할 수 있음.

② BCAA liposome에 대한 GPC 진행 및 DLS, TEM을 통한 확인

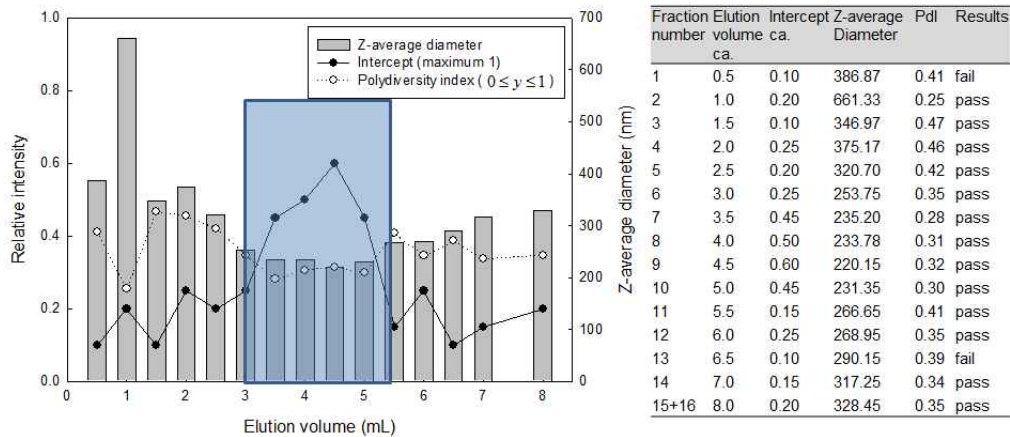


Figure 1-18. Valine-봉입 리포솜에 대한 GPC 및 DLS 분석 결과.

- Sephadex G-25 prepacked column(PD-10)을 이용하여 0.5 mL 씩 리포솜 용액을 분획하여 DLS 분석을 진행한 결과에 의해 약 3~5 mL에 해당하는 부분에서 리포솜이 다량 포함 되어있을 것으로 확인함. GPC를 통해서 리포솜이 분획되었고 리포솜에 함유되지 않은 분지 아미노산과 분리가 되었지만 Pdl가 약 0.3 이상으로 낮지 않고 intercept가 높지 않은 것으로 보아(제조가 잘 되었다고 여겨지는 리포솜은 보통 intercept가 0.7~1.0 사이) eluent에 의해서 희석이 진행되어 리포솜의 농도가 낮다고 예상하였고 추가적으로 농축이 진행하여 고농도의 리포솜 용액을 얻고자함.
- 추가적으로 농축을 진행한 고농도의 리포솜 용액에 대하여 리포솜 형태를 확인하기 위하여 TEM 분석을 진행함(Figure 1-20).

③ 분지아미노산 정량 분석을 통한 리포솜의 elution volume 예측 및 확인

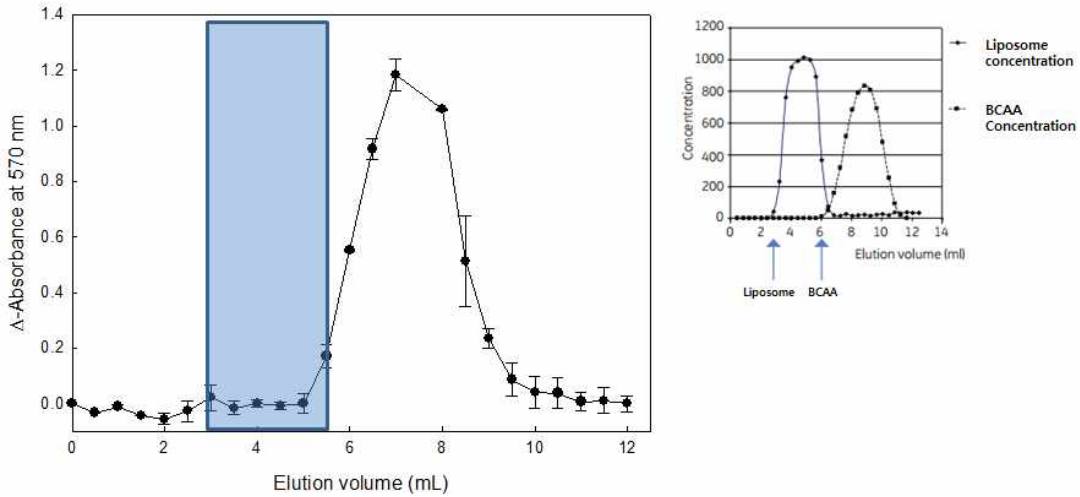


Figure 1-19. Valine(10 mM) 리포솜에 대한 정량분석 결과.

- GPC를 통해 분획한 리포솜 용액에 대한 분지 아미노산 정량법을 ninhydrin 용액을 통해 진행함. 각 분획된 용액은 10 배 희석하여 분지 아미노산 표준 정량곡선에서의 정량범위 내(1mM 이하)에 포함되게 함. 결과적으로 약 6 mL에 해당하는 elution volume부터 10 mL에 해당하는 샘플에서 valine이 나타나는 것을 확인함.
- GPC의 원리상 분자량이나 입자의 크기가 클수록 gel을 먼저 통과하여 elution time 이 빠르기 때문에 DLS 결과와 종합해봤을 때 3~6 mL에 해당하는 elution volume 에서 리포솜을 분획함.

④ TEM을 통한 실제 리포솜 elution 및 분획구간 재확인

- 분지 아미노산-봉입 리포솜을 분획한 샘플을 TEM을 통해 확인함. GPC를 통해 나온 샘플은 후처리과정을 따로 거치지 않았고 바로 negative staining하여 TEM관찰을 시도함. 결과적으로 elution volume이 빠른 곳에서 상대적으로 큰 크기의 리포솜이 관찰되었고 elution 이 늦을수록 작은 크기의 리포솜이 관찰되었으며 6 mL 이후에는 리포솜이 관찰되지 않음.

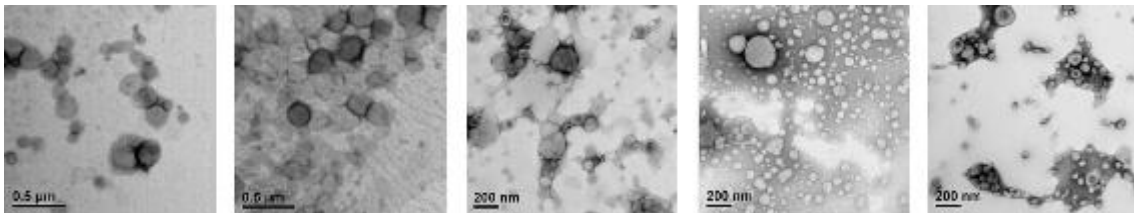


Figure 1-20. GPC를 통한 분획한 리포솜 형태.

(왼쪽부터 차례대로 elution volume 3.0~3.5 mL, ~4.0 mL, ~4.5 mL, ~5.0 mL ~5.5 mL)

⑤ Ultrafiltration

- Ultrafiltration을 위해 사용하는 amicon centrifugal unit은 MWCO 10,000의 membrane filter가 장착되어있어 centrifugation을 거치게 되면 리포솜은 retantant로

상층부에 남아있고 포집되지 않은 분지 아미노산이나 buffer는 하층부에 filtrate로 떨어지게 됨. 포집되지 않은 분지 아미노산과 분리된 리포솜 용액만을 분획하여 ultrafiltration을 거치게 되면 상층액에는 리포솜, 하층액에는 buffer가 분리되어 나오며 이를 각각 ninhydrin분석을 통해 분지아미노산을 정량하고 각각의 아미노산에 대한 추세선 식을 통해 분지아미노산의 농도를 구하여 아래의 식을 통해 함입효율을 계산함.

$$\frac{\text{상층액의 BCAA 농도} - \text{하층액의 BCAA 농도}}{\text{하층액의 BCAA 농도}} \times 100 (\%)$$

(다) 분지아미노산-봉입 리포솜의 함입효율 분석

① 함입효율 측정을 위한 liposome bilayer disruption method

- 리포솜 내부에 함입되어있는 분지아미노산을 정량하려면 리포솜 bilayer를 불안정화 시켜서 리포솜을 파괴하는 과정이 필요함. 리포솜을 파괴하는 방법은 sonication, organic solvent, radiation, heating 등 여러 가지 방법이 있지만, 본 연구에서는 리포솜을 파괴하는 방법으로서 triton X-100을 이용하였다. 리포솜이 파괴된 것을 확인하기 위하여 DLS 분석을 실시함.

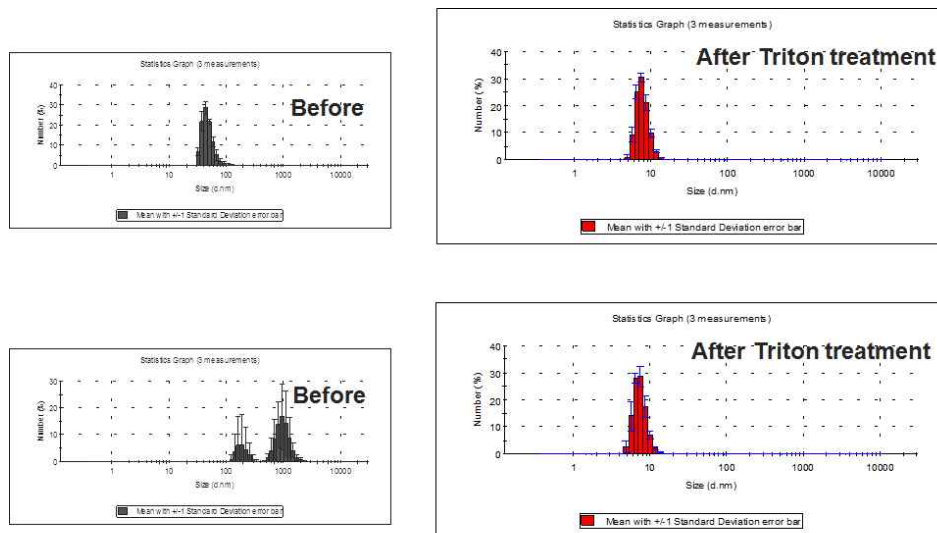
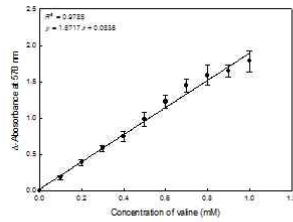


Figure 1-21. DLS 분석을 통한 tritox X-100 처리 전·후의 리포솜 크기 변화.

② 함입 효율(Encapsulation efficiency)



Filtration condition	
Model	Amicon filtration tube (MWCO 10000)
sample	Val, Ile, Leu liposome elution volume from 3-6 mL(4 mL)
Centrifuge condition	2500 xg(4933 rpm) for at least 120 min
Amino acid analysis	Ninhydrin reagent for 10 fold diluted samples

Encapsulation efficiency measurement for valine liposome (triplicate)			
Specification	Absorbance at 570 nm (Δ-absorbance)		
	Valine	Leucine	Isoluecine
Control (5mM HEPES pH 7.4)	0.648 (0.000)	0.679 (0.000)	0.705 (0.000)
Upper (retentate)	1.079 (0.431)	1.148 (0.469)	1.174 (0.469)
Lower (filtrate)	0.807 (0.159)	0.873 (0.194)	0.870 (0.165)
<b>Encapsulation efficiency (%)</b>	<b>66.7</b>	<b>61.7</b>	<b>68.2</b>

Figure 1-22. 분지 아미노산-봉입 리포솜의 봉입효율.

- 위에서 확립한 함입효율 측정법을 적용하여 각각의 분지 아미노산 별 봉입 효율을 측정된 결과 valine의 경우 66.7%, leucine의 경우 61.7%, isoluecine의 경우 68.2%의 봉입효율을 가지는 것을 확인 할 수 있었다.

나. 분지아미노산-봉입 리포솜의 대량생산공정 구축 및 미세캡슐화

(1) 분지아미노산-봉입 리포솜 산업적 적용을 위한 공정설계

(가) Microfluidizer 기반의 리포솜 제조기술 개발

- 선행연구에서 개발한 “hydrodynamic focusing 기법을 이용한 microfluidic chip 기반의 리포솜 제조 기술”의 원리는 서로 다른 hydrophilicity를 가진 두 종류의 유체 (water phase, oil phase)가 microchannel안에서 섞임으로써 oil phase안에 포함된 인지질이 continuous phase인 water phase와 만나면서 열역학적으로 가장 안정한 구 형태로 조립되어 outlet을 통해 균일한 리포솜이 자발적으로 만들어져 나오게 되는 제조 기법임(Figure 1-23(a)).
- 리포솜의 크기 및 분포는 inlet의 유속에 따라 조절되며, 생체이용률에 적합한 100 nm 크기의 최적 리포솜을 제조하기 위한 조건은 inlet 1의 유속이 60 mL/h 일 때, inlet 2의 유속은 6.0 mL/h 인 것을 확인함. 하지만 0.2 g의 분지아미노산을 사용하여 리포솜 제조 시 약 10분의 시간이 소요되며, 지속적인 연구를 하기 위해서는 대량생산을 위한 공정이 필요함.
- 이에 기존 연구진이 개발한 hydrodynamic focusing 원리를 응용하여 microfluidic chip을 대체할 수 있는 microfluidizer 기반의 리포솜 대량 생산 공정을 구축함. Microfluidizer를 이용한 리포솜생산 공정에서 리포솜은 microfluidic homogenizer(15,000 psi)를 통과할 때 높은 전단력을 받게 되어 입자크기가 감소하게 됨(Figure 1-23(b)). 구축된 리포솜 제조공정은 같은 양의 분지아미노산을 microfluidic chip을 통해 리포솜을 제조하였을 때에 비해 약 23배의 시간절약 효과를 가짐.

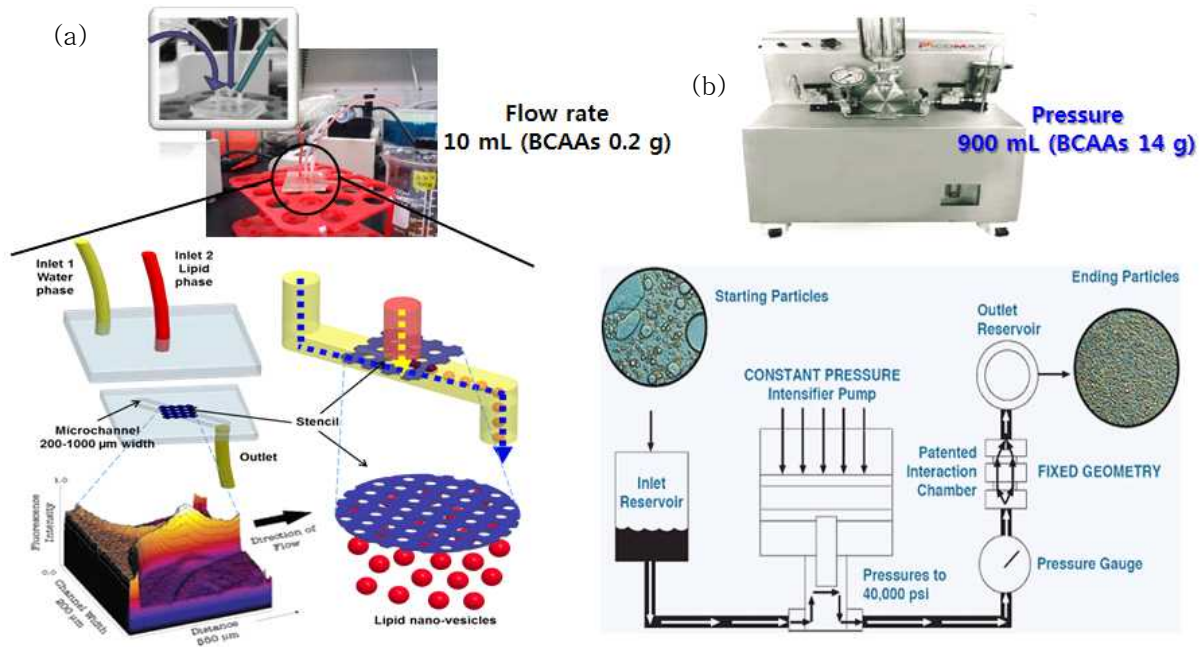


Figure 1-23. Microfluidic chip 기반(a) 및 microfluidic homogenization 기반(b) 리포솜 제조 기술 모식도.

(나) 산업적용을 위한 리포솜 제조공정 개선

① 리포솜의 식품용도를 위한 대체 용매 및 유화제 선정

- 연구진이 리포솜의 대량생산을 위해 개발한 microfluidizer 기반 제조 공정에서 phosphatidylcholine 및 cholesterol의 분산시키기 위해 사용된 유기용매인 chloroform 또는 cyclohexane은 리포솜의 식품산업적용을 위해 대체되어야함. 이에, 연구진은 기존 연구에 이용되던 phophatidylcholine을 대두 레시틴(lecithin)으로 대체 하였으며, lecithin을 용해시킬 수 있는 용매를 선정하고자 하였다. 식품첨가물공전에 등재되어 있는 유기용매(*n*-hexane, acetone, isopropyl alcohol, ethyl acetate)를 이용 하였을 때, 리포솜의 제조 단계 중 역미셀계(inverted micelle) 단계에서 모든 용매는 역미셀계를 형성하지 못함. 이에, 용매특성을 고려하여 다양한 혼합용매를 제조하여, 역미셀 형성능을 비교한 결과, *n*-hexane과 ethyl acetate를 1:4로 혼합하였을 때 기존 용매를 사용하였을 때와 동일한 안정적인 역미셀계를 형성하는 것으로 확인함.

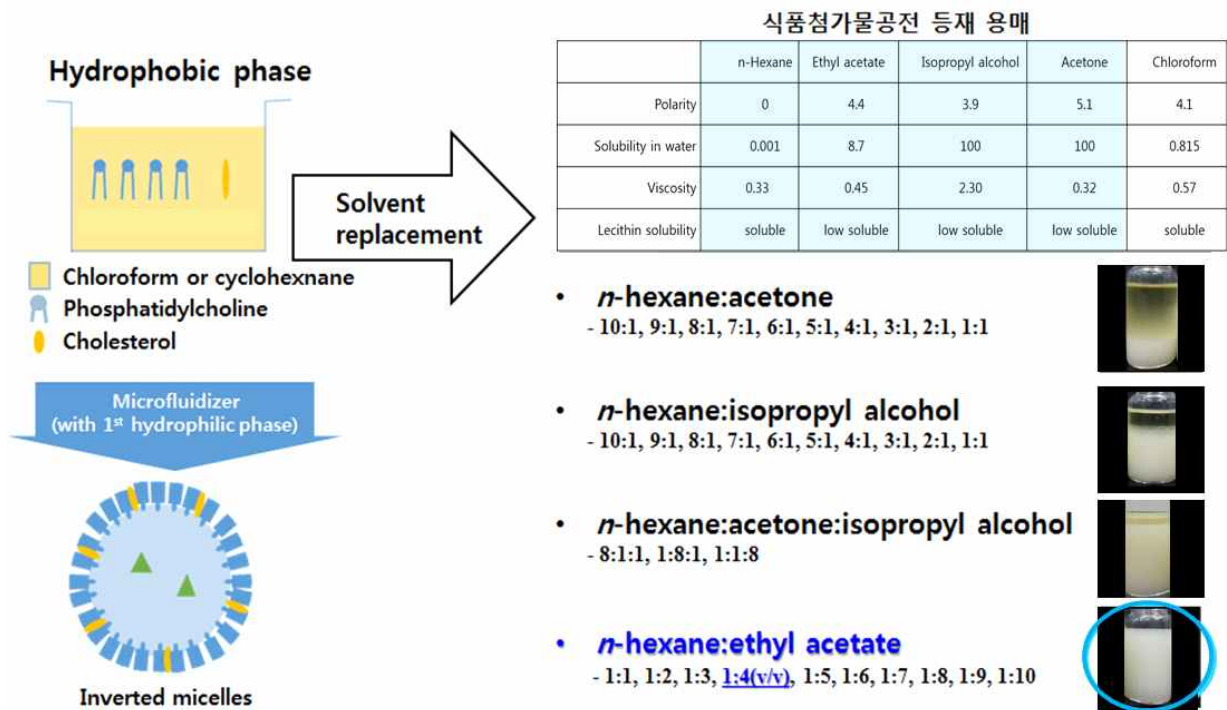


Figure 1-24. 식품첨가물공전 등재 용매별 리포솜 용매 대체 가능성 확인 및 최적조건 확립.

② Cholesterol 대체  $\beta$ -sitosterol 첨가 분지아미노산-붕입 리포솜 제조

- 리포솜을 식품산업에 적용하였을 때, 기존 리포솜과 동일한 안정성을 가지며, 보다 월등한 기능성을 가진 리포솜을 제조하기 위하여 cholesterol을 식물성 sterol인  $\beta$ -sitosterol로 대체하는 연구를 수행함. Cholesterol은 심근경색 및 뇌졸중의 위험요인으로 부정적인 측면이 많이 알려져 있기 때문에 cholesterol 함유 리포솜을 상업화함에 있어서 제품에 부정적인 요소로 작용될 수 있음. 따라서 cholesterol과 구조적으로 유사하지만 인체에 유해하지 않으며, 다양한 기능성을 가진  $\beta$ -sitosterol을 사용하여 리포솜을 제조하였고, 그 결과 제타전위(-47.5 mV)와 크기 분포(70-100 nm)에서 cholesterol을 사용하였을 때와 유사한 결과를 도출하였다(Figure 1-25).

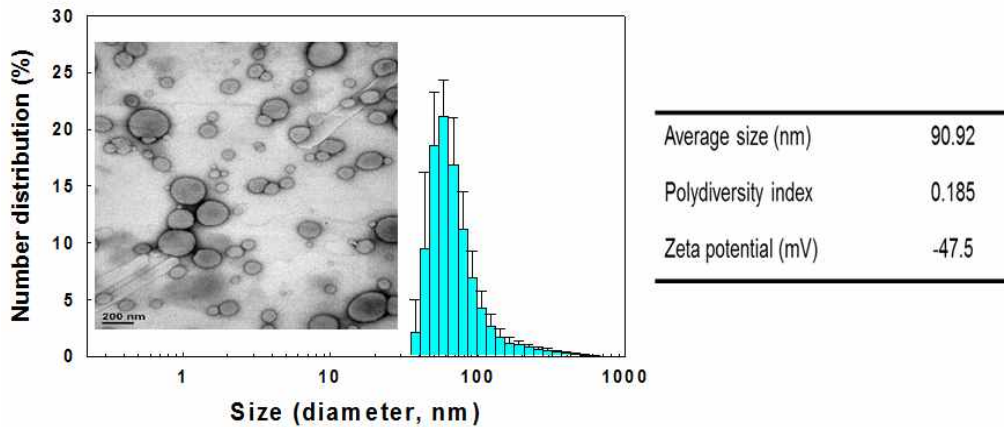


Figure 1-25. Cholesterol 대체  $\beta$ -sitosterol 첨가 분지아미노산-붕입 리포솜의 형태학 및 입자분포도 분석.

(다) 항동결제 첨가 및 완만동결에 의한 리포솜 분말화 공정 개발

- 제조된 리포솜의 식품 산업적 가공적성을 높이기 위해, 리포솜 분말화를 하였다. 리포솜 함유액을  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 동안 초저온동결(deep freezing) 후 동결건조 하여 분말화를 시도하였으며, 동결건조 시 리포솜 구조의 붕괴를 막기 위해 항동결제(cryoprotectant)를 사용함. 항동결제는 리포솜의 유리전이온도를 낮추거나 주위 물 분자와 수소결합하여 동결시 결정화로 인한 리포솜의 구조 붕괴를 방지하는데 사용된다. 항동결제로서 sucrose, trehalose, mannitol, isomalt를 후보군으로 선정하여 여러 농도 범위에서 리포솜을 제조하였지만, 동결건조시 황색화(지질 유출) 및 caking 현상이 나타났으며, 재수화(rehydration)하였을 때 분산되지 않음(Figure 1-26). 이에 대한 문헌연구를 수행한 결과, 재수화시  $60^{\circ}\text{C}$ 까지 열처리하였을 경우 리포솜이 재수화되는 것으로 나타났지만, 이는 리포솜이 열에 의하여 재조립되는 현상임을 알 수 있음.

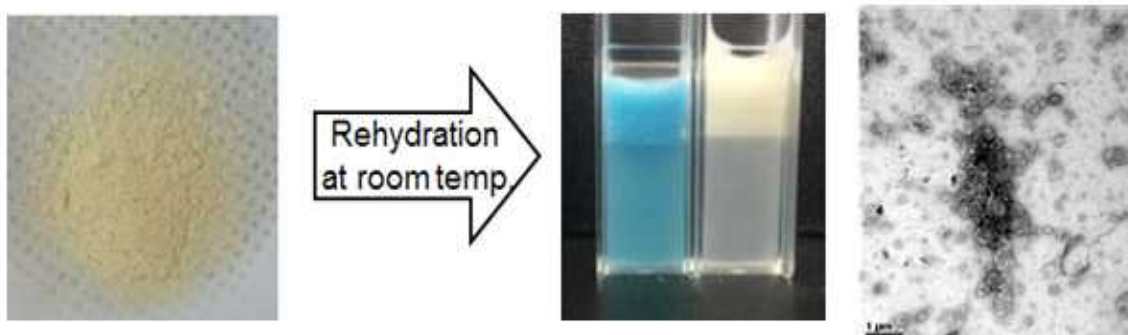


Figure 1-26. 항동결제 첨가에 의한 리포솜 분말화시 재수화에 따른 리포솜 응집현상.

- 리포솜 동결 시 리포솜의 용매로 사용되는 물 분자의 결정화 및 온도하강 특성이 리포솜 구조붕괴의 주요 요인이라는 추론을 바탕으로 온도하강 속도를 제어하는 연구를 수행함. Isopropyl alcohol container를 이용하여 리포솜 용액의 온도하강 속도를  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 느리고 일정하게 유지시킴. 위의 방법으로 제조된 리포솜 분말은 상온에



서 투명한 혼합액으로 재수화 됨. 재수화 리포솜 용액의 크기 분포 및 형태학적 특성을 관찰한 결과 분말화 전 리포솜의 특성(70-100 nm)과 동일한 양상을 나타내었다.

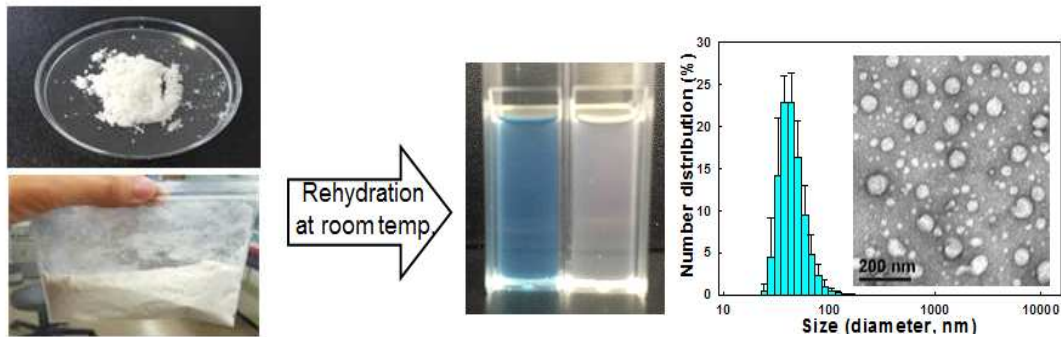


Figure 1-27. 개선된 분말화 공정에 의한 재수화시 입자의 분산안정성 분석 및 형태학적 관찰.

- 본 연구진이 개발한 용매 매개 동결건조법(liquid mediated lyophilization, LML)은 isopropyl alcohol container와 같은 용매를 이용하여 리포솜을 초저온 완만동결시키는 방법으로서, 리포솜 분말의 구조적 안정성을 높여 동결건조 후, 추가적인 물리적 에너지를 가하지 않고 리포솜을 재수화시킬 수 있는 방법임. LML 공정에서 초저온에 노출된 리포솜을 더욱 안정화시킬 수 있는 요소를 탐색하기 위하여 항동결제에 따른 리포솜 내의 함입효율을 비교함. 항동결제로 사용가능한 성분 중 상대적으로 낮은 유리전이온도를 보이며 물 분자와 강한 수소결합을 할 수 있는 성분으로 sucrose와 trehalose를 선정함. 항동결제는 역미셀 및 리포솜 제조 시 첨가되어, 리포솜 내외부에서 이중막을 감싸주는 역할을 하는 것으로 알려져 있음. Sucrose와 trehalose 5 g을 리포솜 내외부에 각각 첨가하여 리포솜 분말을 제조하였을 때, 재수화하여도 균일한 크기의 안정한 리포솜을 얻을 수 있었으며 분지아미노산의 함입효율은 각각 14.6%, 19.8%를 보였다. 리포솜 내부에 trehalose를 첨가하고 외부에 sucrose를 첨가하였을 경우 함입효율이 25.9%로 증가하였으며, 상대적으로 값이 비싼 trehalose의 첨가량을 줄일 수 있기 때문에 경제적인 이점을 가져 올 수 있음.

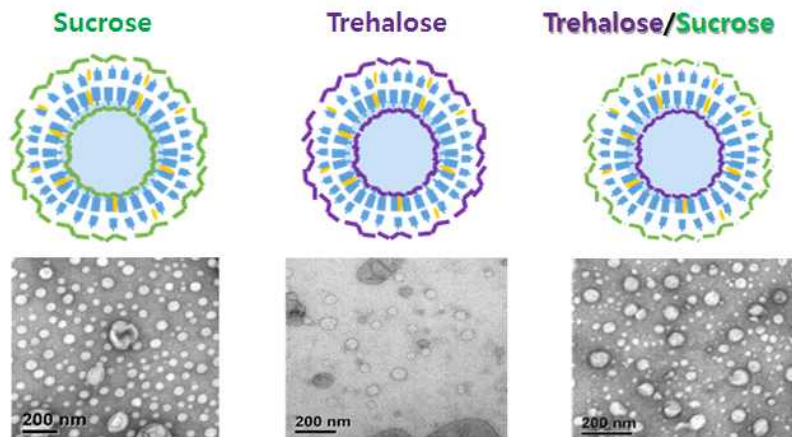


Figure 1-28. 항동결제에 따른 입자 형태 분석.

Table 1-4. 항동결제의 조성에 따른 분지아미노산의 함입효율 분석

	Cryoprotectant (inner/outer concentration (w/v))		
	Sucrose 5 g/5 g	Trehalose 5 g/5 g	Trehalose 5 g/Sucrose 5 g
Loading efficiency (%)	14.6	19.8	25.9

(라) 산업적 적용을 위한 liquid mediated lyophilization 용매 최적화

① Liquid mediated lyophilization(LML) 후보군 용매 선정

- 선행연구에서 개발한 microfluidizer 기반의 분지아미노산 봉입 리포솜 제조 방법 (Figure 1-29) 중 분말화 공정을 보다 개선하고자, 사용가능한 liquid mediated lyophilization(LML) 용매를 스크리닝 하였음. 식품산업에서 많이 이용되는 용매 7종 (isopropanol, methanol, ethanol, 1-propanol, 1-butanol, *n*-hexane, acetone)을 선별 하여 LML 용매로 사용가능한지를 평가함.

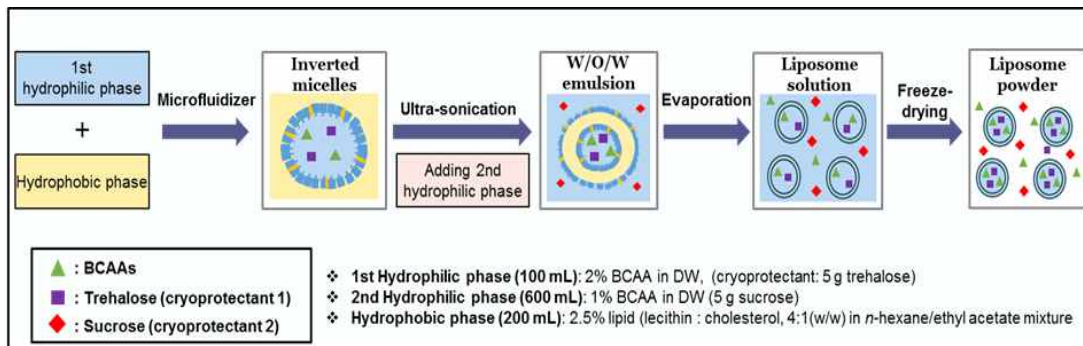


Figure 1-29. Microfluidizer 기반 리포솜 대량생산 공정도

② Liquid mediated lyophilization(LML) 적합 용매 선정(재수화시 리포솜의 변화분석)

- LML 적합 용매를 선정하기 위하여, 리포솜을 제조후 리포솜 함유액을 -80℃에서 4 시간 동안 초저온동결(deep freezing) 과정에서의 기존 isopropanol container를 앞선 선별한 용매 6종으로 대체하여 동결건조 전처리를 진행함. isopropanol container와 같이 초저온 완만동결을 유도하여 분말의 구조적 안정성을 높여, 재수화가 가능한지 살펴봄.
- LML 적합 용매의 선정은 재수화 후 리포솜이 동결건조 이전 입자크기 및 균일분포도를 그대로 유지하는지를 기준으로 설정함. 그 결과, 1-propanol, 1-butanol과 acetone을 용매로 사용했을 때는 LML을 사용하지 않았을 때처럼 리포솜의 입자 크기가 증가하였고(Figure 1-30(b)), methanol, ethanol, *n*-hexane을 사용했을 때는 isopropanol container와 마찬가지로 동결건조 이전의 크기를 유지함(Figure 1-30(a)). 하지만, *n*-hexane의 경우 균일성을 나타내는 지표인, polydispersity index(pdI)가 0.33으로 균일성이 크게 떨어지는 것으로 나타나, isopropanol(0.09)과 같이 동결건조 이전의 균일성을 유지한 methanol(0.12)과 ethanol(0.13)만이 LML 용매로 적합한 것으로 확인함(Figure 1-31).

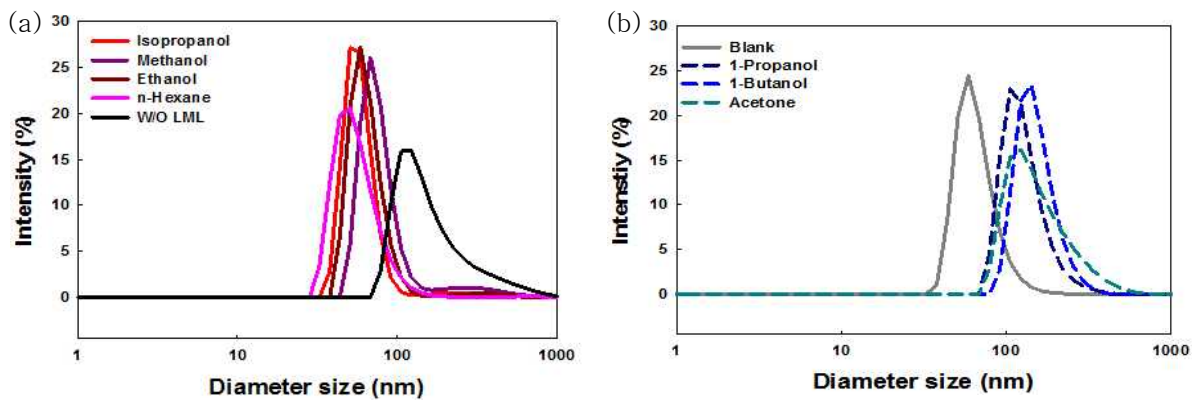


Figure 1-30. Isopropanol container 내의 isopropanol 대체 유기용매별 분말 리포솜 제조 후 재수화시킨 리포솜 크기분석.

Pdl 0.20

Blank*	Isopropanol	Methanol	Ethanol	1-Propanol	1-Butanol	n-Hexane	Acetone	W/O LML
0.07	0.09	0.12	0.13	0.14	0.12	0.33	0.34	0.27

Blank\* : liposome solution before lyophilization

Figure 1-31. Isopropanol container 내의 isopropanol 대체 유기용매별 분말 리포솜 제조 후 재수화시킨 리포솜의 크기분포도 분석.

- LML 적합 용매로 선정된 용매와 LML 효과를 나타내지 않은 용매들 간의 유의적 차이를 확인하기 위해, 각각 용매의 비열을 확인하고, 동결온도  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서의 온도 변화, 최대빙결정생성대 통과시간 및 냉각 속도를 확인함. 그 결과, 용매의 비열이 높을수록  $0-10^{\circ}\text{C}$  구간에서의 냉각 속도가 빨라지고, 해당 구간(최대빙결정생성대)을 통과하는 시간이 짧아지는 경향성을 확인함. 이는 용매의 비열이 높을수록 잠열에 의한 온도변화 없이 냉각에너지를 유지할 수 있고, 통과시간이 짧아짐에 따라 얼음 결정의 크기 역시 작아지는 것으로 판단됨.

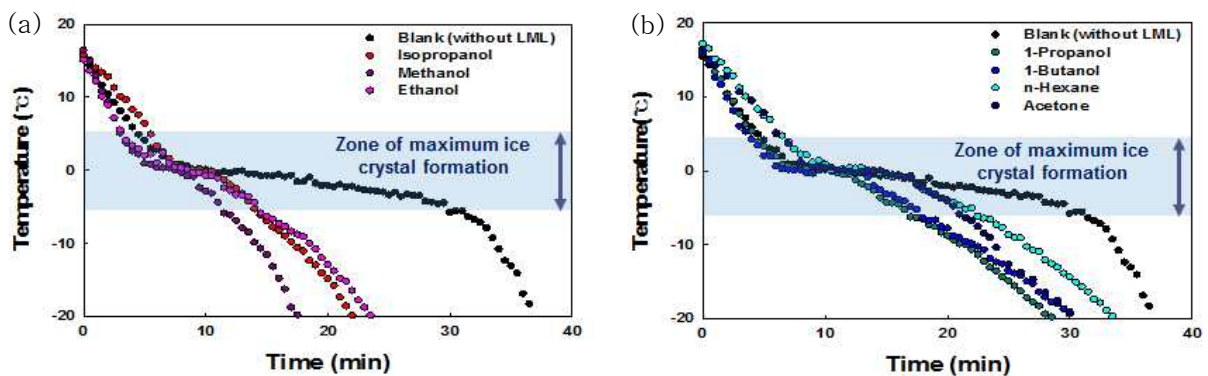


Figure 1-32. Isopropanol container 내의 isopropanol 대체 유기용매별 최대빙결정생성대 통과 시간 및 냉각속도 분석.(a) 최대빙결정생성대 통과시간 10분 미만 유기용매 선별, (b) 최대빙결정생성대 통과시간 10분 이상 유기용매 선별.

- 이중 LML 적합 용매로 선정된 isopropanol, methanol, ethanol은 선별한 용매 7종 중 비열이 가장 높고 통과시간이 가장 짧은 것으로 나타남. 따라서 적합 용매 세 가지를 LML로 사용했을 때 리포솜 내외부 얼음 결정의 크기가 작아 리포솜 막에 끼치는 손상이 감소하였고, 리포솜 구조를 유지함. 이를 통해, LML 용매로 사용하기 위해서는 일정 이상의 비열을 가지고 냉각에너지를 유지하여 통과시간을 단축시켜야 리포솜 분말을 제조하는 것을 확인함.

Table 1-5. 유기용매별 비열(specific heat)

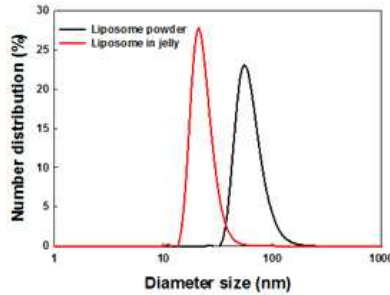
	Transit Time (min)	Freezing velocity (°C/min)	Specific heat (J/g*°C)		
			20°C	0°C	-5°C
<b>Isopropanol</b>	7.0	-1.43	2.68	2.33	2.28
<b>Methanol</b>	7.5	-1.33	2.53	2.40	2.38
<b>Ethanol</b>	9.5	-1.05	2.43	2.25	2.22
<b>1-Propanol</b>	11.0	-0.91	2.35	2.18	
<b>1-Butanol</b>	12.5	-0.80	2.37	2.26	
<b>n-Hexane</b>	13.5	-0.74	2.26		
<b>Acetone</b>	12.5	-0.80	2.18		
<b>Blank (air)</b>	22.5	-0.44	1.02		

(2) 소재화된 분지아미노산-봉입 리포솜의 산업적 적용 확인

(가) 소재화된 리포솜의 제품 적용 안정성 확인

① 젤리 제형 적용성 확인

- 분지아미노산 탑재-리포솜의 산업적 적용을 위하여 3종류(젤리, 액상, 분말)의 제품에 적용가능한지에 대한 확인 실험을 진행함. 리포솜의 형태 유지를 확인하기 위하여, 분말화 된 리포솜을 수화시켜 DLS를 통하여 입자들의 크기 및 분포도를 확인하였으며, 제품별 제조 공정을 거친 후, 각각의 제형별로 리포솜만을 분리·정제하여 리포솜들의 입자 크기 및 분포도를 확인함.
- 첫 번째로 최적화된 공정을 거쳐 제조된 분지아미노산-탑재 리포솜 분말을 2차년도에 주식회사 대상에서 확립한 젤리 공정에 적용함. 젤리 공정에 적용한 리포솜은 공정 적용 전에 비하여 리포솜의 평균 직경이 50~70 nm로 감소하는 것으로 나타남 (Figure 1-33). 이러한 리포솜의 크기 감소는 젤리 공정 중 약 85°C 가열 공정에 의하여 비롯된 것으로 판단됨.

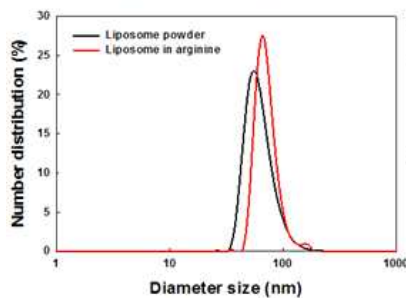


Type	Diameter size (nm)	Pdl
대조군	118.1	0.121
젤리	29.68	0.535

Figure 1-33. 젤리 제품에서 소재화된 리포솜의 가공전후의 크기 및 분포도 분석.

② 분말 제형 적용성 확인

- 두 번째로 분지아미노산-탐재 리포솜의 적용 제품은 분말 제형의 제품에 적용함. 분말 제형의 경우, 젤리 공정과 다르게 100 nm 근처의 리포솜 형태가 균일하게 분포되어 있는 것으로 나타남(Figure 1-34). 분말 제품의 공정은 젤리 공정과 다르게 약 70°C에서 건조하는 공정밖에 없으며, 젤리 제형에 비해 낮은 온도 처리로 인하여 리포솜 형태가 잘 유지되는 것으로 유추됨.



Type	Diameter size (nm)	Pdl
대조군	118.1	0.121
분말	71.78	0.213

Figure 1-34. 분말 제품에서 소재화된 리포솜의 가공전후의 크기 및 분포도 분석.

③ 액상 제형 적용성 확인

- 마지막으로 액상 제품에 대한 분지아미노산-탐재 리포솜의 안정성 유무를 확인함. 액상 제품에 적용한 리포솜은 리포솜의 평균 직경이 200 nm 이상으로 증가되는 것으로 나타남(Figure 1-35). 공정 중 온도 상승 구간이 총 3군데가 있는데, 첫 번째

구간인 70℃ 가열 구간은 분말 제품과 동일한 온도로 리포솜에 손상을 주지 않지만, 살균 공정에서 90~130℃ 가열 구간에 의해 리포솜이 손상을 입는 것으로 예상됨.

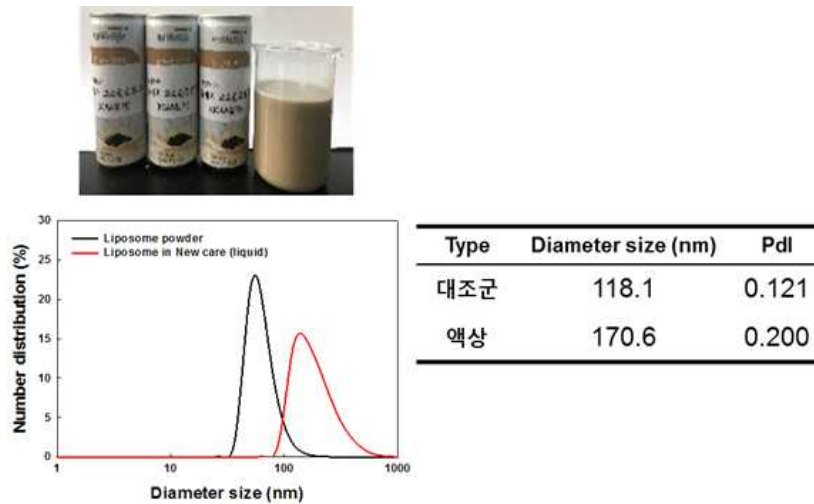


Figure 1-35. 액상 제품에서 소제화된 리포솜의 가공전후의 크기 및 분포도 분석.

(나) 산업적 적용을 위한 분지아미노산-붕입 리포솜의 제조 공정 개선

① 동결보호제 종류에 따른 리포솜 분말의 입도 제어

- 분지아미노산-탑재 리포솜의 제품화 적용 과정 중에 리포솜 분말의 날림현상으로 인하여, 제품화 과정 중 리포솜 분말의 손실이 많은 것을 확인함. 이에 따라, 리포솜 분말의 날림현상을 방지하기 위하여, 기존 동결보호제로 사용했던 trehalose와 sucrose를 dextrin으로 대체하여 리포솜 분말의 날림현상을 개선하고자함.
- 기존 리포솜 분말화 공정에서 동결보호제로 리포솜 내부에는 trehalose를 넣었으며, 외부에는 sucrose를 넣어 리포솜의 동결건조 시 리포솜 손상을 방지함. 동일한 동결 보호제 효과를 나타낼 수 있는 dextrin의 최적 조건을 찾기 위하여, 1) 내부 dextrin, 외부 dextrin, 2) 내부 dextrin, 외부 sucrose, 3) 내부 trehalose, 외부 dextrin로 하여 각각의 조건에 따른 리포솜 형태 유무를 DLS 분석을 통하여 확인함.
- 그 결과, 내외부 dextrin을 넣은 리포솜의 경우, 평균 직경이 200 nm이상으로 증가하였으며, 제조된 리포솜 분말들 간에 뭉침현상이 나타나는 것을 확인함. 또한, 내부 dextrin, 외부 sucrose의 경우 150 nm 크기의 리포솜이 균일하게 제조되었으나, 리포솜 분말의 날림현상은 개선되지 않은 것으로 나타남.
- 반면, 내부에 trehalose를 넣고, 외부에는 dextrin을 넣은 리포솜의 경우, 기존 trehalose/sucrose와 대비하였을 때 큰 차이 없이 100 nm 크기의 리포솜이 균일하게 제조되었으며, 기존 리포솜 분말에 비하여 날림현상 없이 정량이 가능한 것으로 나타남.

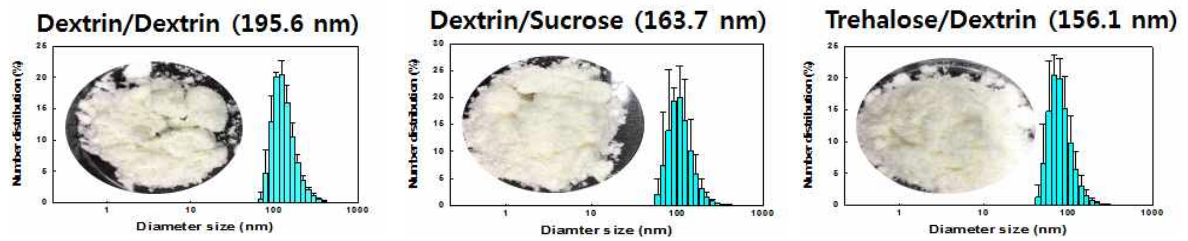


Figure 1-36. 내외부의 동결보호제 종류에 따른 리포솜 분말의 형태 분석 및 리포솜 크기분석.

(3) 분지아미노산-붕입 리포솜 탑재 미세캡슐화 기술개발 및 최적화

(가) 나노입자 제조공정 설계

① 이온 상호작용(ion interaction)을 이용한 생체고분자 코팅(biopolymer coating)

- 리포솜의 경우 소화기관 내에서 낮은 pH에 의해 분해되어 장점막을 통한 흡수가 용이하지 않음. 따라서 분지아미노산-붕입 리포솜의 가공적성 및 소화기계 내에서의 안정성을 높이기 위해 미세캡슐화를 진행함. GRAS(Generally Recognized As Safe) 물질로서 생분해성이고 장점막 흡착성이 뛰어난 키토산(chitosan)과 펙틴(pectin)을 사용하여 리포솜을 코팅하고, 장점막에 흡착된 리포솜에서 생리활성물질의 지속적 방출(sustained release)이 가능하도록 유도함. 본 연구에서는 음전하를 띠는 palmitic acid 리포솜에 양전하를 띠는 키토산을 코팅하고 양전하를 띠는 hexadecylamine(HDA) 리포솜에 음전하를 띠는 펙틴을 코팅함. 코팅을 위해 사용한 키토산 및 펙틴의 함량에 따른 제타전위를 측정하여 최적의 코팅 함량을 선정한 결과, 키토산 함유량(w/v)이 0.02% 이상일 때, 펙틴 함유량이 0.002% 이상일 때 크기가 균일하고 안정한 리포솜이 형성되는 것으로 나타남.

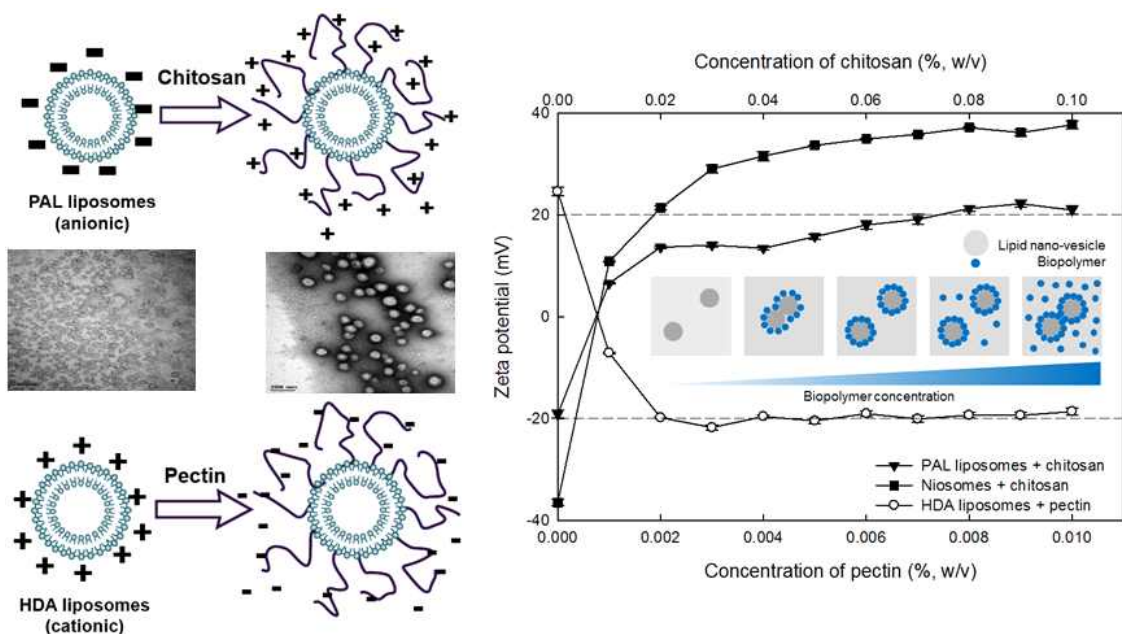


Figure 1-37. 키토산 또는 펙틴 코팅에 의한 나노입자의 분산안정성 분석 및 형태학적 관찰.

(나) 마이크로입자 제조공정 구축

① Syringe-dropping을 이용한 칼슘 알지네이트 하이드로겔 제조

- 나노 사이즈의 리포솜은 경구 투여시 비특이적으로 흡수될 수 있어서 인체에 유해할 수 있기 때문에 마이크로 크기의 미세캡슐을 제조하였다. 캡슐 소재로는 칼슘 알지네이트 하이드로겔을 이용함. 칼슘 알지네이트는 이미 널리 알려져 있는 캡슐로서, guluronic acid와 mannuronic acid에 칼슘 이온을 첨가함으로써 이온 결합에 의하여 가교가 형성되는 캡슐임. 이는 이미 식품에서 널리 이용되는 소재로, 본 연구에서 리포솜을 식품 소재화하는데 매우 적합한 기술이라 판단하여 본 소재를 적용함.
- 본 연구진은 여러 칼슘알지네이트 하이드로겔을 제조한 기법 중 syringe dropping 기법을 이용하여 캡슐화를 진행함. 기존 syringe dropping 방법은 0.1 mL 단위로, 소량의 캡슐을 제조하는 방법을 이용하였으나, 본 연구에서는 이를 개량하여 4 mL 수준까지 scale-up을 하여 진행함.

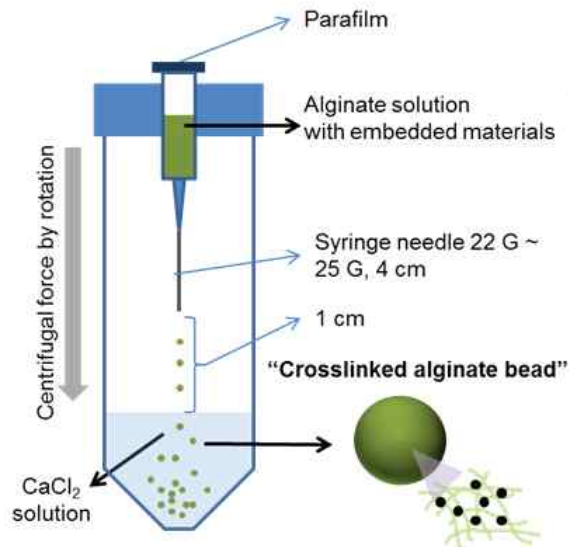


Figure 1-38. 마이크로입자 제조 시스템 공정.

- 캡슐의 분산안정성과 식감 등을 고려하였을 때 400  $\mu\text{m}$ 의 마이크로캡슐이 제조되는 구간을 선정하고자함. 이에, 여러 알지네이트 농도 및 칼슘 농도를 조절하여 최적 구간을 구한 결과, 알지네이트 농도 2%, w/v와 칼슘농도 2.5%, w/v일 때 최적의 칼슘 알지네이트 하이드로겔이 제조됨.



Table 1-5. 마이크로 입자의 유효 공정변수 및 유의적 변화범위 설정

Variables	BCAAs:Alginate (1:2, w/w)						
	Concentration of sodium alginate (% w/v)						
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	
1.0	-	-	-	-	-	-	
1.5	-	최적조건 : alginate 2%(w/v) CaCl <sub>2</sub> 2.5%(w/v)					-
2.0	-						
2.5	-	-	○	●	○	-	
3.0	-	-	○	○	○	-	
3.5	-	-	○	○	○	-	
4.0	-	-	-	-	-	-	
6.0	-	-	-	-	-	-	
8.0	-	-	-	-	-	-	
10.0	-	-	-	-	-	-	

(4) 리포솜-담재 미세캡슐의 이화학적 특성규명

(가) 하이드로겔 입자의 크기 및 분포 분석

① 하이드로겔 입자의 크기 및 분포 분석

- 최적의 리포솜 담재 마이크로 크기의 캡슐 제조 조건은 다음과 같으며, 이를 현미경 분석한 결과, 약 400 μm 정도의 균일한 입자가 형성되는 것을 확인함. 보다 정확한 입자 분포도를 확인하기 위하여 particle size analyzer를 이용하여 입자분포도를 확인한 결과, 평균 입자 크기 425 μm의 단일 크기의 입자가 제조되는 것을 확인함 (Figure 1-39).

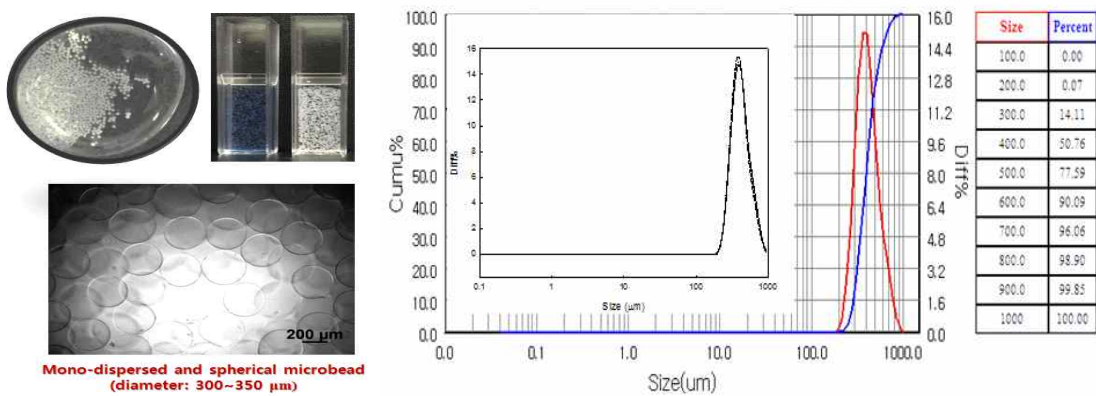


Figure 1-39. 최적 조건에서의 칼슘 알지네이트 하이드로겔의 형상 관찰 및 particle analysis에 의한 마이크로 입자 크기 분포도 분석.

- 특히, 리포솜이 칼슘 알지네이트 하이드로겔에 의하여 캡슐화 될 때의 변화 유무를 확인하기 위하여, 캡슐화 전후의 리포솜 크기 분석을 진행함. 그 결과, 캡슐화 전후의 리포솜의 크기분포도는 동일한 것으로 나타났으며, 함유된 BCAAs의 양을 확인한 결과 동일한 양임을 확인함.

(나) 형광현미경을 통한 리포솜 함입형태 관찰 및 안정성 분석

- 리포솜 함입 칼슘 알지네이트 하이드로겔의 리포솜 안정성을 확인하기 위하여, 형광 물질인 sodium fluorescein을 탑재한 리포솜을 칼슘 알지네이트 하이드로겔을 통하여 캡슐화를 진행함. 리포솜 내에 탑재된 형광 지표의 경우, 일정 파장을 통하여 exciting을 할 경우, 형광 물질을 띄게됨. 이를 통하여 캡슐안에 탑재된 리포솜을 확인할 수 있으며, 캡슐내 리포솜의 안정성은 DLS 분석을 통하여 캡슐화 전후의 크기 분포도를 살펴봄으로써 확인함. 형광현미경을 통하여 형광지표를 탑재한 리포솜 함입 칼슘 알지네이트 하이드로겔을 관찰한 결과, 공리포솜을 탑재한 알지네이트 하이드로겔에 비해, 형광물질이 보이는 것으로 확인함(Figure 1-40).

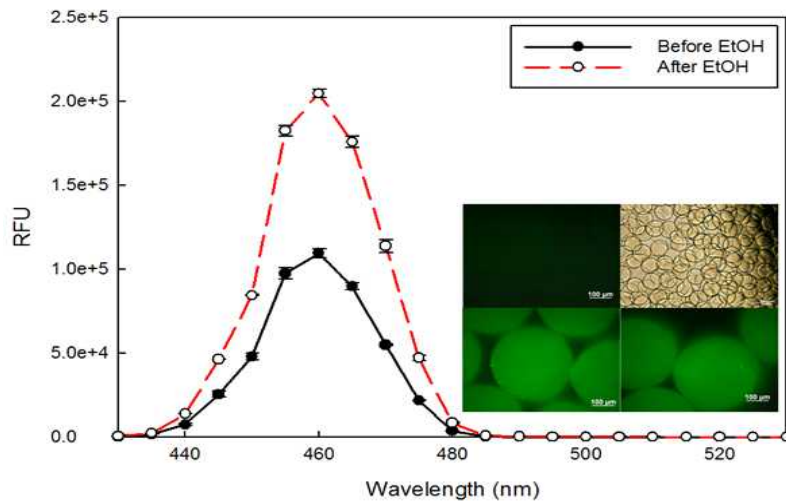


Figure 1-40. 형광지표 물질인 sodium fluorescein 탑재 리포솜의 캡슐화 전후 sodium fluorescein의 흡광도 비교 및 형광현미경을 통한 형태학적 관찰.

- 또한, 리포솜 탑재 칼슘 알지네이트 하이드로겔의 캡슐화 전후의 DLS 분석결과, 동일한 입자분포도를 가지는 것으로 보아, 리포솜이 칼슘 알지네이트 하이드로겔 내에 깨지지 않고 리포솜 형태로 잘 유지되는 것을 확인함(Figure 1-41).

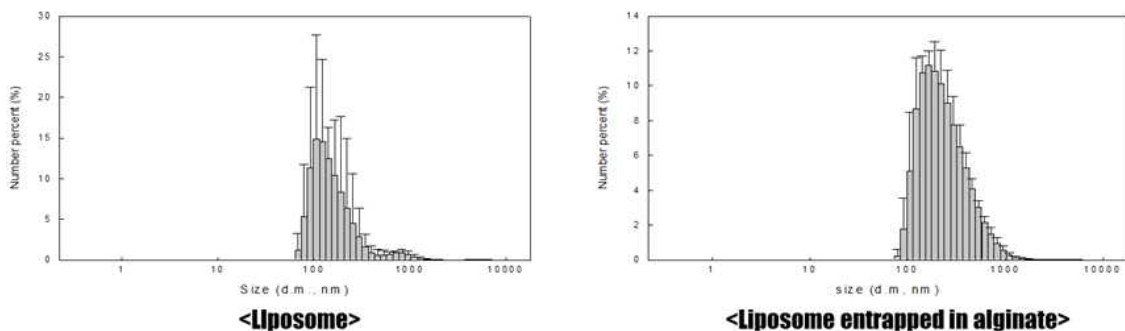
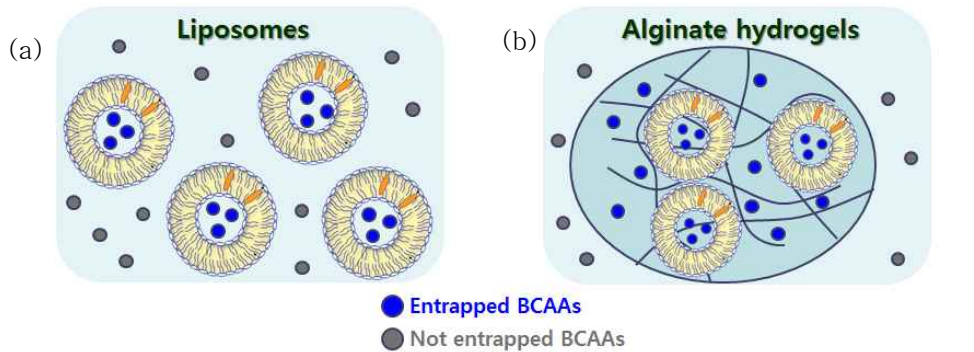


Figure 1-41. DLS 분석을 통한 칼슘 알지네이트 하이드로겔 캡슐화 전후의 리포솜 입자분포도 분석.

(다) 분지아미노산-봉입 리포솜 탑재 미세캡슐의 수율 분석

- 분지아미노산을 함유한 리포솜의 수율의 경우, ninhydrin 정량법에 의하여 25.9%의 수율이 나타났다. 이러한 리포솜을 칼슘알지네이트 하이드로겔에 의하여 캡슐화 하였을 때의 수율을 분석해보면, 96.8%의 높은 수율을 보임. 이는, 분리·정제과정에서 약 3%의 손실만을 보여주었으며, 대부분의 분지아미노산-봉입 리포솜이 미세캡슐에 포집되는 것으로 판단함(Figure 1-42).



Liposome loading efficiency

$$= \frac{\text{BCAAs loaded into liposome}}{\text{Total BCAAs in liposome powder}} \times 100 (\%)$$

$$= 25.9\%$$

Encapsulation efficiency of alginate hydrogel

$$= \frac{\text{BCAAs entrapped in alginate hydrogel}}{\text{Total BCAAs in alginate hydrogel solution}} \times 100 (\%)$$

$$= 96.8\%$$

Figure 1-42. 분지아미노산-봉입 리포솜의 수율 분석(a) 및 리포솜-탑재 칼슘 알지네이트 하이드로겔의 수율 분석.

다. 분지아미노산-봉입 리포솜 및 이를 탑재한 미세캡슐의 저장 안정성 및 방출특성 규명

(1) 분지아미노산-봉입 리포솜 및 이를 탑재한 미세캡슐의 저장안정성 평가

(가) 분지아미노산-봉입 리포솜의 pH 안정성 평가

- 분지아미노산-봉입 리포솜의 가공 가능 pH 구간 및 최적 저장 조건을 살펴보기 위해 universal 버퍼를 사용하여 pH 2~10.5 까지 구간별 리포솜의 안정성을 확인함. 각각의 pH에서 2시간동안 리포솜을 보관 후, DLS를 통하여 리포솜의 크기 및 분포도를 측정함.
- 리포솜이 안정적으로 형태를 유지할 수 있는 최적의 pH를 탐색한 결과 pH 4.5 이상에서 리포솜은 100 nm 근처때의 균일한 형태를 진고 있는 것을 확인함. pH 3이하의 산성 조건에서는 리포솜을 구성하고 있는 인지질 이중층의 재배열로 인하여, 리포솜의 직경 크기가 증가하는 것으로 나타남(Figure 1-43).

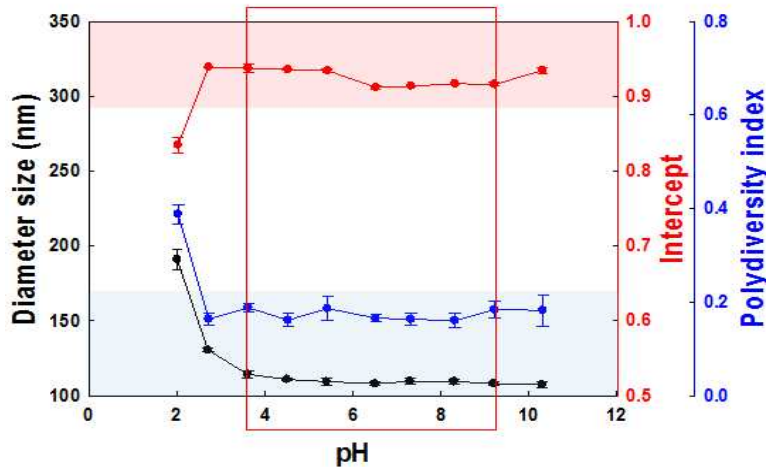


Figure 1-43. pH별 리포솜의 저장안정성 평가.

(나) 분지아미노산-붕입 리포솜의 온도 안정성 평가

- 분지아미노산-붕입 리포솜의 온도에 따른 저장안정성을 살펴보고자 함. 리포솜은 소재화된 리포솜(powder)와 액상 리포솜 두 개를 이용하여 둘간의 차이 및 소재화된 리포솜의 우수성을 증명하고자 함. 리포솜의 형태를 유지하고 있다는 것을 확인하기 위하여 DLS를 통하여 분지아미노산-붕입 리포솜의 평균 입자 크기 및 입자분포도를 측정하였으며, 리포솜 보관 온도는 상온(30°C)와 냉장온도(4°C)에서의 차이를 확인함.
- 상온보관한 소재화된 리포솜 및 액상 리포솜은 약 3일까지 안정적으로 크기 및 형태를 유지하는 것으로 나타남. 3일 이후에는 액상 리포솜에서 리포솜의 형태가 깨지는 것으로 나타났으며, 소재화된 리포솜의 경우 약 28일까지 상온에서 보관하였을 때 형태 및 크기를 잘 유지하는 것으로 나타남(Figure 1-44).

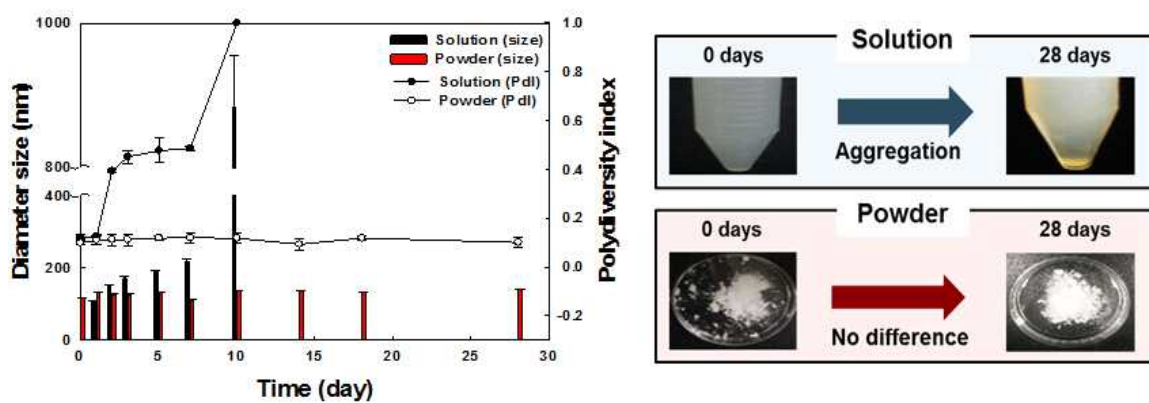


Figure 1-44. 상온보관(30°C)에서의 소재화된 리포솜 및 액상리포솜의 보관 기간별 리포솜의 형태 및 크기 분석.

- 두 번째로, 냉장보관한 리포솜의 경우, 앞선 상온보관보다는 소재화된 리포솜 및 액상 리포솜이 약 10일까지는 형태가 잘 유지되는 것으로 나타남. 특히, 액상의 경우 냉장보관과 상온보관에 따라 형태 및 크기 차이가 극명하게 차이가 났으며, 10일 이후에는 상온보관에서와 같이 리포솜의 형태가 깨지는 것으로 나타남. 반면, 소재화된 리포솜의 경우 28일까지 냉장보관하였을 때 상온보관과 같이 형태 및 크기를 잘 유지하는 것으로 확인함(Figure 1-45).

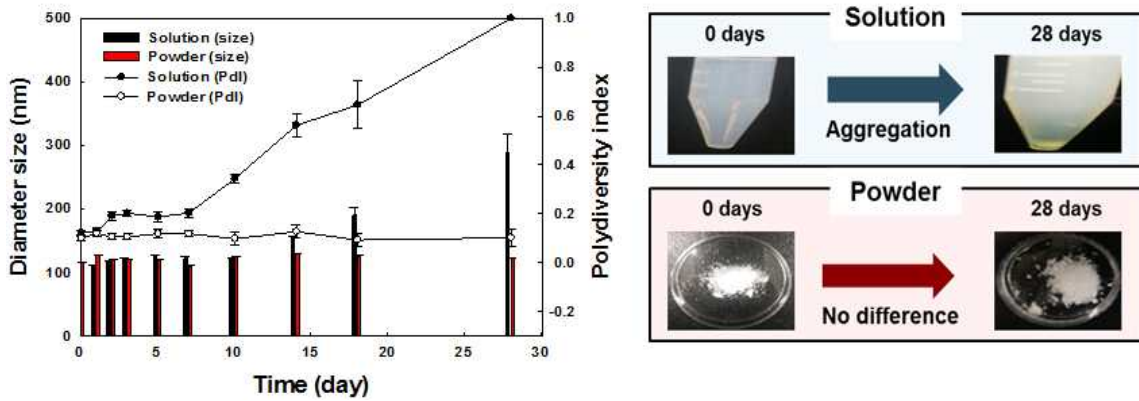


Figure 1-45. 냉장보관(4°C)에서의 소재화된 리포솜 및 액상리포솜의 보관 기간별 리포솜의 형태 및 크기 분석.

- 형태외에도 각각의 소재화된 리포솜과 액상리포솜 및 보관상태에 따라 봉입 물질인 분지아미노산의 방출정도를 확인함. 액상리포솜의 경우 상온 보관에서의 형태가 가장 먼저 중심물질인 분지아미노산을 방출하는 것으로 나타남. 반면 소재화된 리포솜을 냉장보관 하였을 경우 약 50일 이상 50%이상의 분지아미노산을 리포솜 내에 잘 포집하고 있는 것으로 나타남.
- 안정성과 관련하여, 반감기를 비교하였을 때, 소재화된 리포솜의 냉장보관, 상온보관이 가장 안정적으로 리포솜을 잘 유지하며 함입물질을 잘 보존하는 것으로 나타났으며, 다음으로는 냉장보관한 액상리포솜이 안정적인 것으로 나타남.

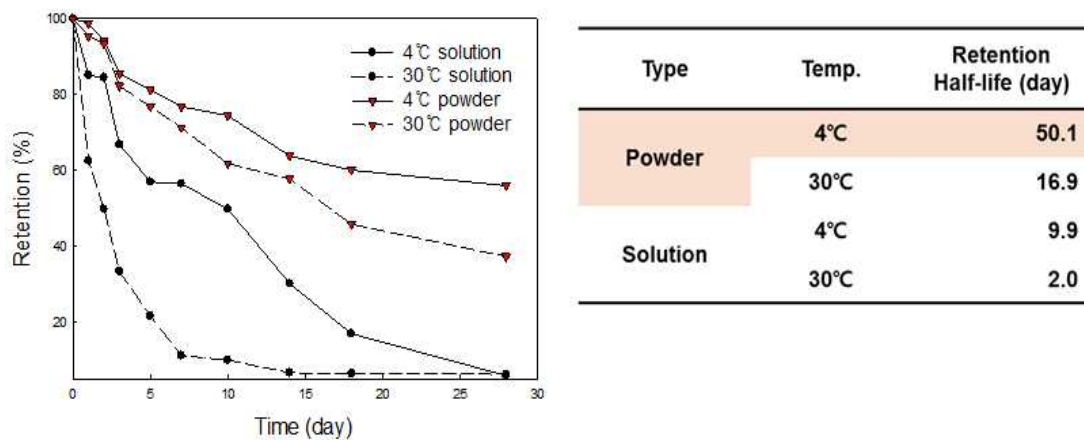


Figure 1-46. 온도 및 형태별 분지아미노산 방출률 측정.

- 소재화된 리포솜의 shelf-life을 알아보기 위하여, 60일동안 냉장보관하였을 때 함유 물질은 약 50% 근처로 방출된 것을 확인하였지만, 리포솜 형태를 잘 유지하는 것으로 나타나, 추후 산업적으로 적용하기 위해서는 소재화된 리포솜을 사용하면 될 것으로 사료됨.

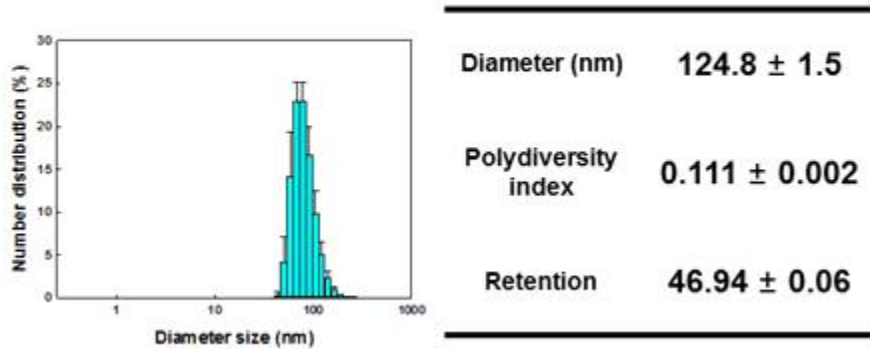


Figure 1-47. 60일동안 냉장보관한 소재화된 리포솜의 형태 분석 및 분지아미노산 방출률 분석.

(다) 분지아미노산-봉입 리포솜 탑재 미세캡슐의 pH 안정성 평가

- 리포솜의 캡슐화의 또 다른 목적은 위장 내 pH인 2에서 재조립이 일어나는 것을 막고, 장까지 안정적으로 전달하는 역할을 할 수 있을것이라고 예상함. 이에, 칼슘 알지네이트 하이드로겔의 방출특성을 살펴보고자 다양한 pH에서의 리포솜의 방출정도를 확인함. 그 결과, pH 6.4 이하에서는 칼슘 알지네이트 하이드로겔에 의해 리포솜은 잘 보관되었으며, pH 6.8이상에서는 리포솜이 캡슐 밖으로 방출되는 것을 확인함 (Figure 1-48). 이는 장내의 pH로, 리포솜이 위 조건 pH에서 방출되지 않다가 소장 조건의 pH에서 방출되는 것으로 판단함.

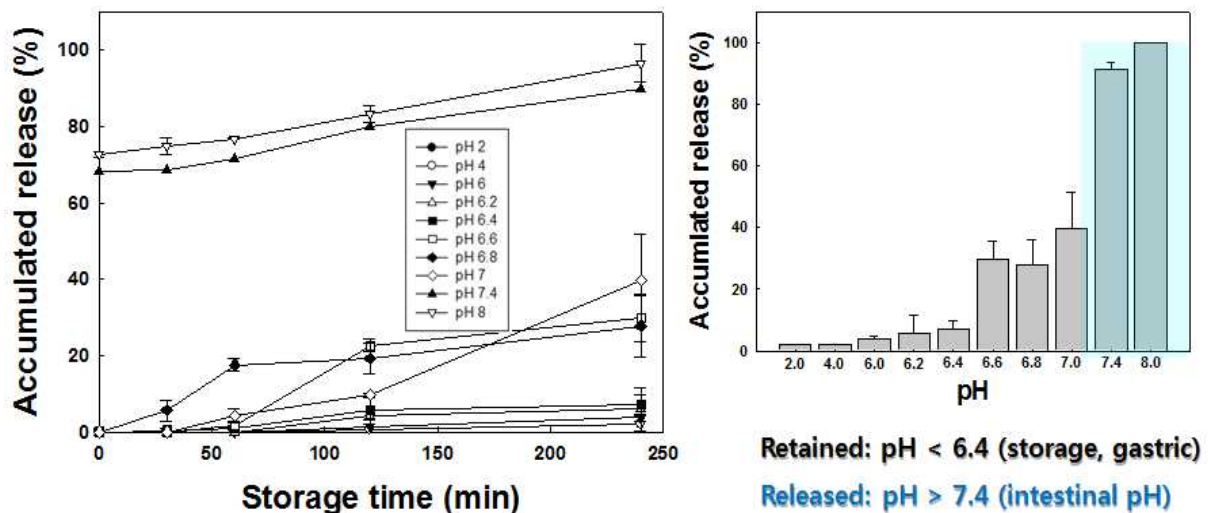


Figure 1-48. pH에 따른 리포솜-탑재 칼슘 알지네이트 하이드로겔의 방출특성 분석.

(라) 분자아미노산-봉입 리포솜 탑재 미세캡슐의 온도 안정성 평가

- 리포솜의 캡슐화의 가장 큰 목적은 식품가공학적 측면에서 열처리를 할 경우, 리포솜이 재조립이 일어나는 현상 때문임. 실제로 미세캡슐화를 통하여 리포솜의 재조립을 방지할 수 있는지에 대한 확인을 진행함. 온도에 따른 저장안정성을 살펴보기 위하여, 리포솜-탑재 칼슘 알지네이트 하이드로겔을 다양한 온도에서 보관하고 swelling 시켰을 때, 리포솜의 재조립이 일어나는지 살펴봄. 그 결과, 여러 온도구간에서 보관하여도 리포솜은 재조립이 일어나지 않았으며, 함유물질인 BCAAs 역시 동일한 양이 나타나는 것을 확인함(Figure 1-49).

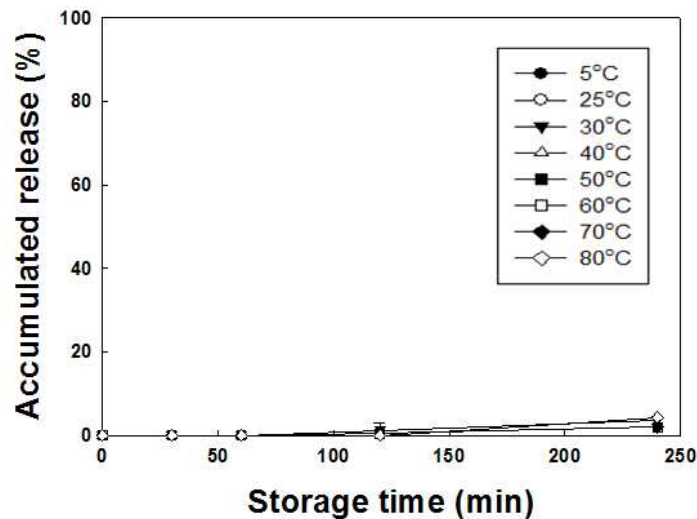


Figure 1-49. 온도에 따른 리포솜-탑재 칼슘 알지네이트 하이드로겔의 저장안정성 분석.

- 특히 식품가공을 할 때, 가장 극한 온도인 살균공정의 표준점인 121°C에서 20분간 보관하는 autoclave를 시켰을 때, 리포솜이 칼슘 알지네이트 하이드로겔에 의하여 안정적으로 보관되는 것을 확인함(Figure 1-50).

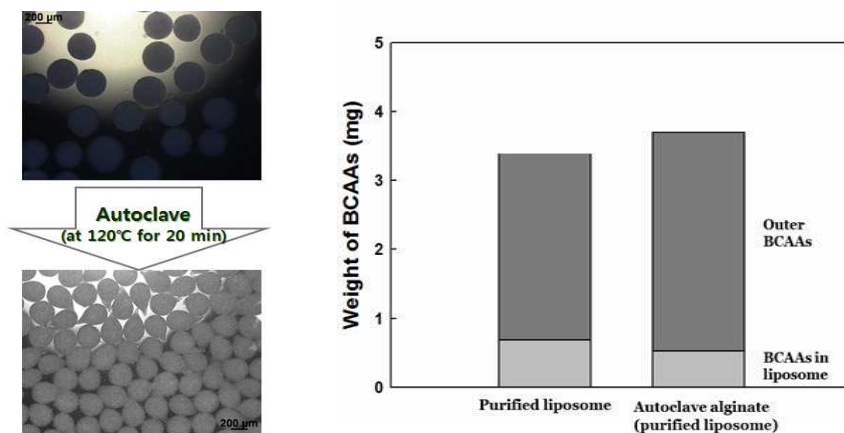


Figure 1-50. 살균공정인 autoclave 공정에 의한 리포솜-탑재 칼슘 알지네이트 하이드로겔의 저장안정성 분석 및 형태학적 변화 관찰.

(2) 분지아미노산-붕입 리포솜 및 미세캡슐의 *in vitro* 방출제어 특성 규명

(가) 유사 소화모델에서 조건 설정

① 유사 소화모델(입) 조건 설정

- 분지아미노산-붕입 리포솜 탑재 미세캡슐의 소화모델 계에서의 방출 특성을 분석하기 위하여 유사 소화모델 중 구강에서의 영향력을 살펴보기 위하여 다음의 조건 (Figure 1-51)에 따라 유사 소화모델(입)을 설계함.

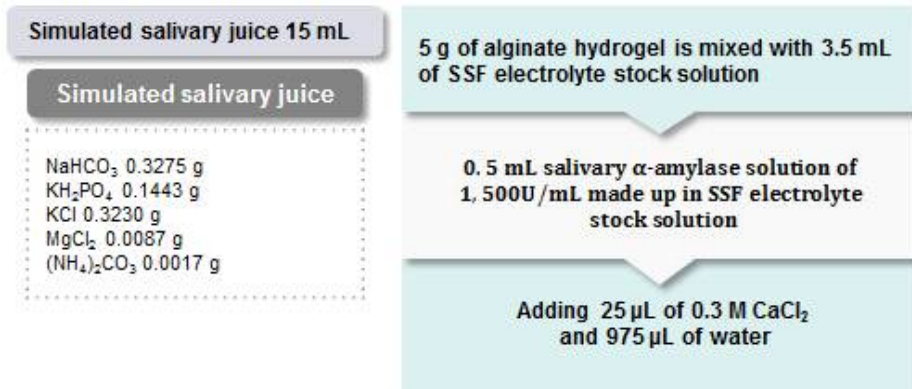


Figure 1-51. 유사소화모델(입)의 설정 조건.

② 유사 소화모델(위) 조건 설정

- 식품 섭취 시 두 번째로 머무르게 되는 위장조건에서의 분지아미노산-탑재 리포솜 및 이를 탑재한 미세캡슐의 방출특성을 분석하기 위하여 위장조건과 비슷한 유사소화모델을 설계함. 다음의 조건을 토대로, 유사소화모델(위)을 제작하였으며, 위장에서 최대 머무르는 시간인 2시간을 기준으로 방출특성을 살펴봄(Figure 1-52).

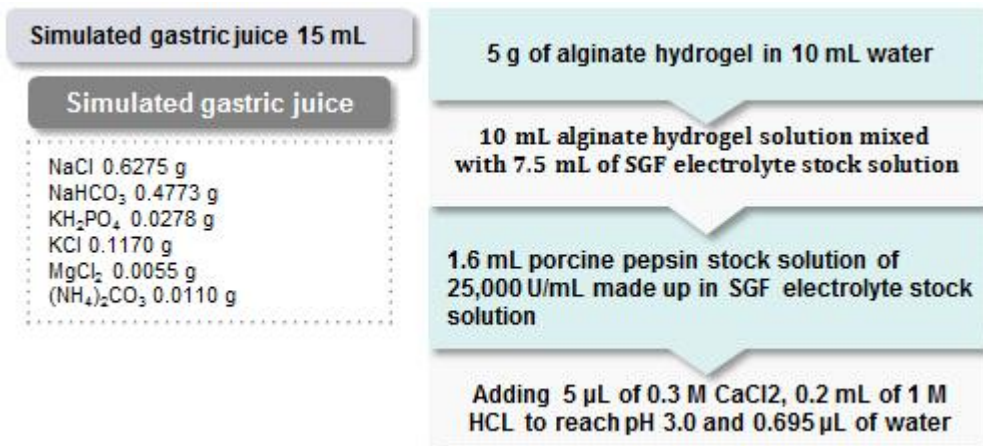


Figure 1-52. 유사소화모델(위)의 설정 조건.

③ 유사 소화모델(소장) 조건 설정

- 분지아미노산-붕입 리포솜의 소화모델 계에서의 방출 특성을 분석하기 위하여 유사 소화모델을 이용하여 리포솜의 방출 특성을 분석함. 여러 참고 문헌들을 토대로, 소장 조건에서의 유사 소화모델을 제작함.



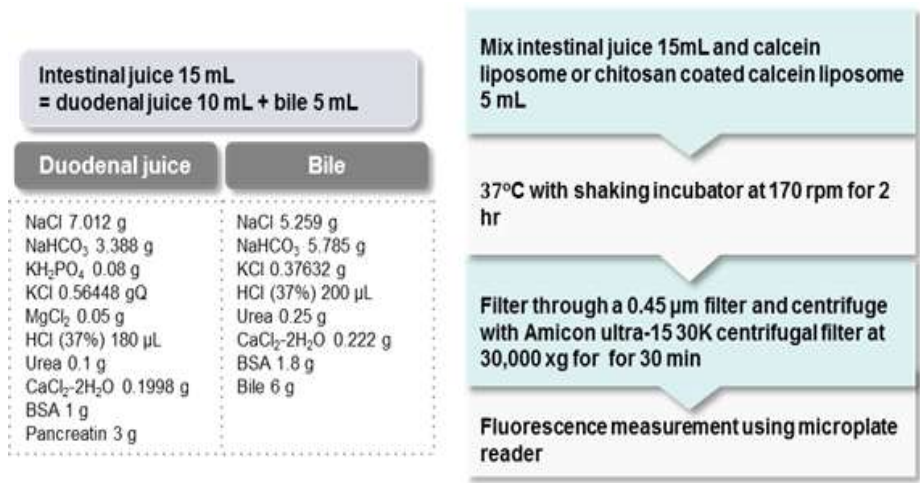


Figure 1-53. 유사소화모델(소장)의 설정 조건.

(나) 유사 소화모델에서의 리포솜 방출 특성 분석

- 본 연구진이 제작한 유사 소화모델(소장)에서의 소화화된 리포솜의 안정성을 확인한 결과, 소화모델 처리전에는 100 nm 근처의 평균 직경을 지니고 있었던 리포솜이, 소장용액에서 2시간 처리 후 리포솜의 크기 및 크기분포도를 확인한 결과, 350 nm 근처로 크기가 커졌으며, 크기 분포도 역시 균일하지 못한 것으로 확인함.
- 또한, 내부 물질의 방출량을 확인한 결과, 약 90%의 내부 물질이 방출되는 것으로 확인함. pH 안정성 평가를 통하여 7.4에서의 리포솜은 안정적으로 보관되는 것을 확인하였지만, 소장내에 존재하는 효소에 의하여 인지질 이중층이 파괴되면서 이러한 현상이 발생하는 것으로 예상함.

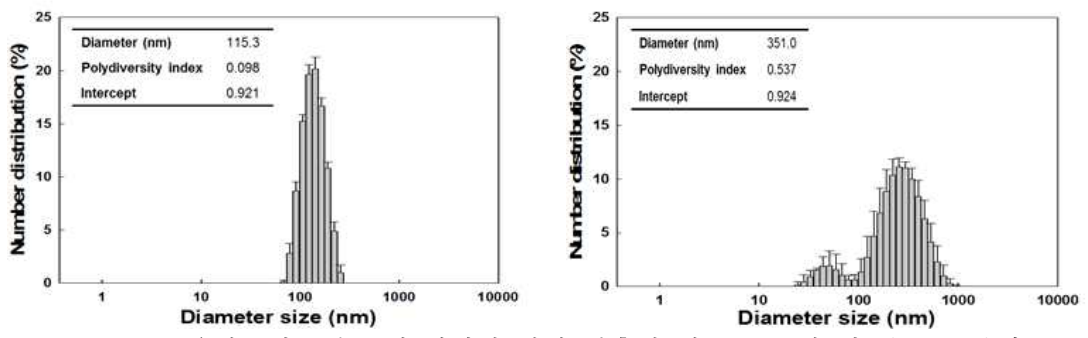


Figure 1-54. 유사소화모델(소장)에서의 처리 전후의 리포솜 크기 및 분포도 분석.

(다) 유사 소화모델에서의 미세캡슐 방출 특성 분석

- 분지아미노산 봉입-리포솜 탑재 미세캡슐의 소화기계 내에서의 방출특성을 살펴봄. 분지아미노산 봉입-리포솜 탑재 미세캡슐을 섭취하였을 때, 구강에서의 파괴가 일정 부분 나타나는 것으로 보임. 내부 분지아미노산 방출률이 약 10%내외로 짧은 시간(5분)안에 10%가까이 방출되는 현상이 나타남.
- 하지만, 실제로 입에서 일어나는 저작 운동과 함께 머무름 시간은 약 2~3분 내외로 중심물질의 안정성에 큰 영향을 주기에는 너무나 짧은 시간을 판단되며, 문제가 없

을 것으로 사료됨.

- 소화기계내의 두 번째 단계인 위에서의 미세캡슐의 방출특성을 살펴보봄. 최대 머무름 시간인 2시간동안 일정 시간별로 방출되는 분지아미노산의 양을 측정한 결과, 2시간동안 최대 방출률 5%이하를 나타냄. 이는, 미세캡슐에 의하여 리포솜이 잘 보호되고 있으며, 본 연구진이 원하는 소장에서의 controlled release가 가능하다는 것을 확인함.
- 마지막으로, 소장에서의 미세캡슐의 방출특성을 살펴봄. 30분내로 내부의 중심물질이 모두 방출되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 리포솜을 소장에서 소화시간 내에 소장에 분산시킬 수 있을 것으로 예상함.

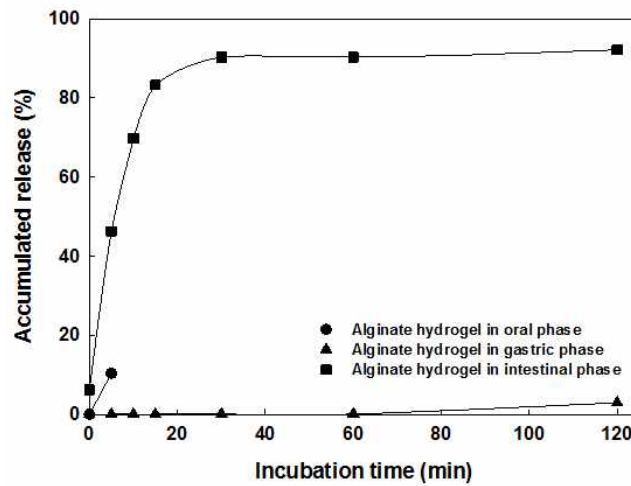


Figure 1-55. 유사소화모델(입, 위, 소장)에서 알지네이트 하이드로겔의 방출률 분석.

(라) 표면코팅을 통한 리포솜의 소화기계 안정성 개선

- 리포솜의 소화기계 안정성을 위하여 표면코팅을 진행함. 분지아미노산-붕입 리포솜은 표면전하가 음전하로 되어 있어, 양이온성 폴리머를 이용하면 쉽게 리포솜 표면코팅을 할 수 있음. 이에 따라, 여러 가지 폴리머 중 생체내에서 쉽게 세포막과 접합할 수 있는 키토산을 이용하여 표면 코팅을 하고자함.
- 키토산 코팅의 최적화를 위하여, 키토산 농도별 DLS 분석을 통하여 키토산 코팅 리포솜의 크기 및 크기 분포도, 표면전하(zeta-potential)을 측정함.
- 각각의 키토산 농도별 키토산 코팅 리포솜의 크기 및 크기 분포도, 표면전하를 분석한 결과, 키토산의 농도가  $2 \times 10^{-2}$  %(w/v)일 때 100 nm 전후 균일한 리포솜이 안정적으로 제조되는 것으로 확인함.

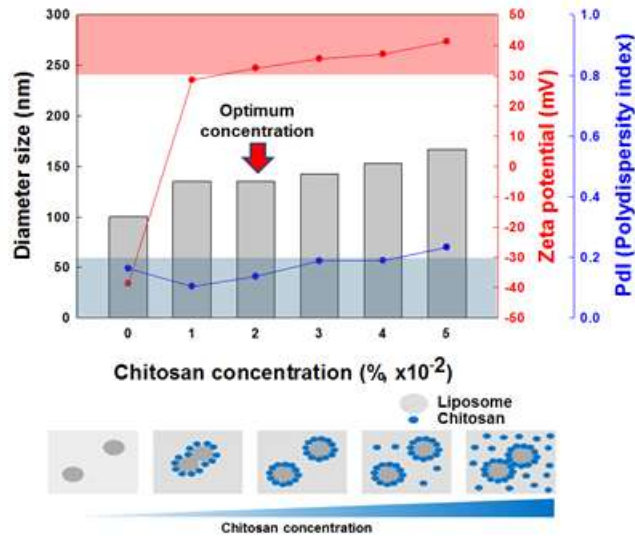


Figure 1-56. 키토산 코팅된 리포솜의 최적화.

① 표면 코팅에 따른 리포솜 방출률 제어평가

- 키토산으로 표면코팅된 리포솜과 코팅처리 하지 않은 리포솜간의 유사 소화모델(소장)에서의 안정성을 비교평가함. 코팅처리하지 않은 리포솜은 유사 소화모델 처리에 따라 리포솜의 크기가 약 3배이상 증가하는 것으로 나타남.
- 반면, 키토산 코팅 리포솜은 약 90 nm만 증가하는 것으로 나타남. 또한, 코팅처리하지 않은 리포솜은 크기 분포도가 균일하지 않았지만, 키토산 코팅 리포솜의 경우 균일한 크기의 리포솜을 유지하고 있는 것을 확인함.

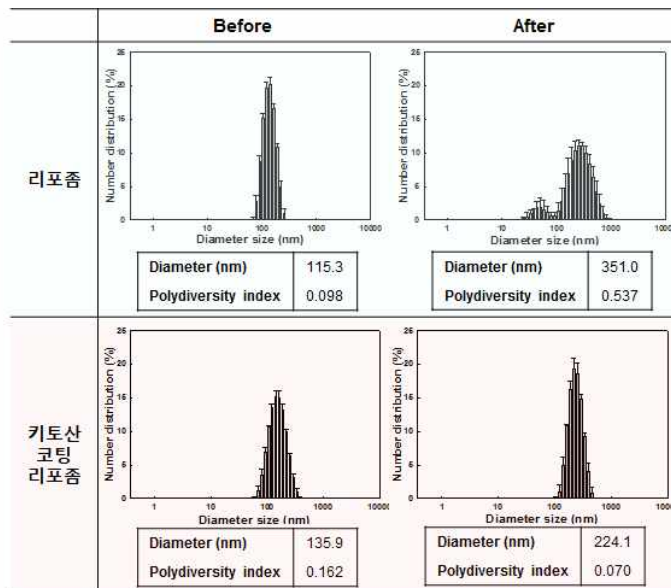


Figure 1-57. 키토산 표면 코팅된 리포솜과 일반 리포솜의 유사소화모델(소장)에서의 처리 전후의 차이 비교 분석.

- 키토산 코팅 리포솜과 일반 리포솜의 유사 소화모델(소장)에서의 중심물질 방출량을 확인한 결과, 일반 리포솜은 53% 내외의 중심 물질을 함유하고 있는 것으로 나타난 반면, 키토산 코팅 리포솜의 경우 약 93% 내외의 중심 물질을 함유하고 있는 것으로 확인함.

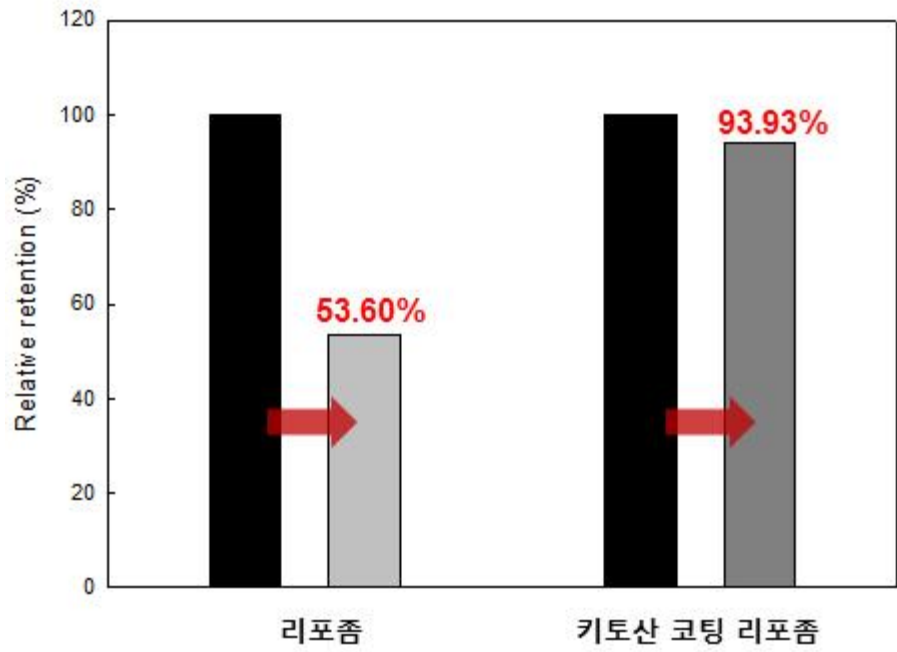


Figure 1-58. 키토산 표면 코팅된 리포솜과 일반 리포솜의 유사소화모델 (소장)에서의 처리 전후의 내부물질 함유량 비교 분석.

## 2. 분지아미노산의 생체이용률을 개선을 위한 고농도 가용화 및 안정화 기술 개발(1협동: 서울과학기술대학교 최승준)

### 가. 기능성 분지아미노산 액상 소재화를 위한 고안정성 유화기술 개발

#### (1) 나노/마이크로에멀전의 이화학적 특성 분석

##### (가) 산란광 측정법을 통한 나노/마이크로에멀전의 입도분석법 확립 방법

###### ① O/W 에멀전 제조 방법

- 유화제 Tween 60이 각각 200, 300, 400 및 500  $\mu\text{M}$ 이 함유된 수용액에 들기름을 첨가한 후, 고속교반기(Ultra-Turrax T25)를 이용하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분 동안 8,000 rpm으로 균질화하였다. 충분히 균질화된 후, 12 mL의 증류수를 첨가함. 그 후, 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분 동안 8,000 rpm 고속교반기를 이용하여 들기름과 혼합물을 균질화시켜 에멀전을 제조함.

###### ② Backscattering profile 측정을 사용한 에멀전 안정성의 측정

- 에멀전 안정성 분석은 TURBISCAN LAB 광학 분석기를 사용하여 backscattering의 변화( $\Delta\text{backscattering}$ ,  $\Delta\text{BS}$ )를 측정함.

$$\text{Backscattering} = \left( \frac{1}{\lambda^*} \right)^{1/2}$$

$$\lambda^* = \frac{2d}{3\phi(1-g)Q_s}$$

- 방정식의  $\lambda^*$ 는 에멀전의 평균 자유 경로 광자 전송(photon transport mean free path)으로 적용되었다.  $\lambda^*$ 는 다음 식에서 계산된 값이고,  $\phi$ 는 지방의 체적 분율이며  $d$ 는 지방구의 평균 직경이며,  $Q_s$  및  $g$ 는 각각 로렌츠-미 이론에 의해 주어진 광학 매개변수인 산란 효율과 비대칭 인자를 나타냄(Bohren and Huffman 1998).
- 제조된 에멀전은 바닥이 평평한 원통형 유리 vial(높이 70 mm 및 내부 직경 25 mm)에 즉시 5 cm의 높이로 담았다. 그런 다음 vial을 TURBISCAN LAB에 장착하고, 근적외선( $\lambda = 880 \text{ nm}$ ) 전자 발광 다이오드를 광원으로 사용함.
- vial 전체 길이( $\sim 55 \text{ mm}$ )를 따라 이동하는 동안 두 개의 동기식 광학 센서는 주기적으로 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 40  $\mu\text{m}$  간격으로 투과(transmitted) 및 후방 산란(backscattered)광의 세기를 기록함.

###### ③ 체적법을 사용한 에멀전 안정성 지수의 결정

- 체적법에 의한 유화 안정성 지수(ESI)를 평가하기 위해, Chang(1994)에 의해 제안된 체적법이 약간 변경하였으며, 제조 직후 에멀전을 유리 메스 실린더에 100 mL을 붓고, 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 방치함.
- 유화 안정성은 저장 시간과 에멀전 하단에 있는 지방구 희박층을 육안으로 관찰함으로써 평가하였고, 이어서, ESI는 다음과 같은 계산식을 통하여 계산함.

$$ESI = \left(1 - \frac{V_w}{V_e}\right) \times 100$$

- $V_e$  는 O/W 에멀전의 부피이고,  $V_w$  는 원하는 저장 기간 후에 분리된 지방구 희박층의 부피를 의미함.

(나) 산란광 측정법을 통한 나노/마이크로에멀전의 입도분석법 확립 결과

①  $\Delta$ BS Profile에서 유화 농도의 효과

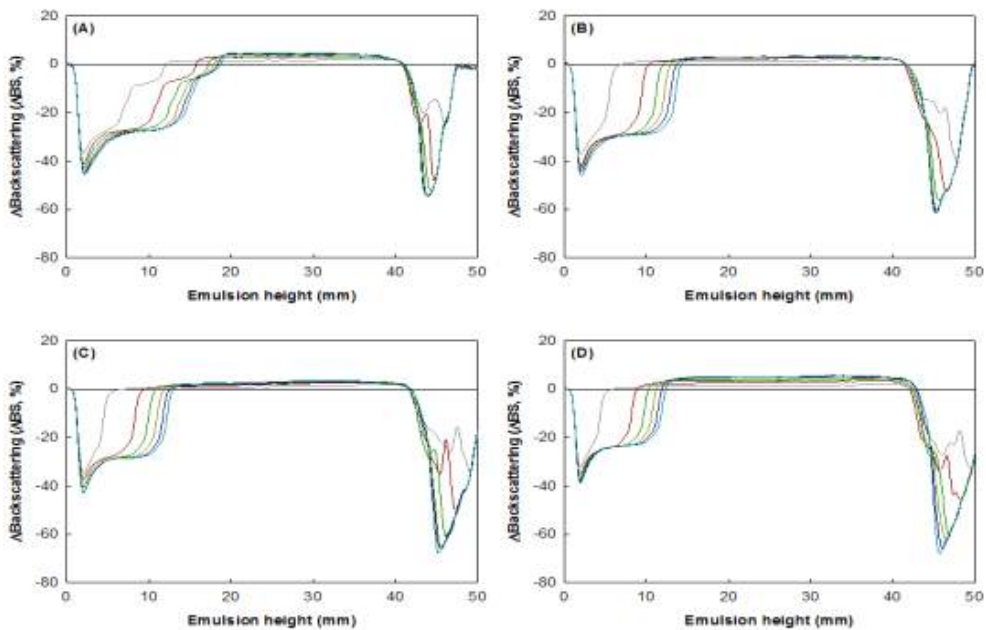


Figure 2-1. Tween 60이 각각 200(A), 300(B), 400(C) 및 500  $\mu$ mol(D)이 들어간 안정화된 수중유적형 들깨 에멀전의 Backscattering profiles(저장 시간(0-11 시간) 및 샘플 높이의 함수 데이터. a, 0 시간 저장된 에멀전; b, 1시간 저장된 에멀전; c, 3시간 저장된 에멀전; d, 5시간 저장된 에멀전; e, 7시간 저장된 에멀전; f, 9시간 저장된 에멀전; g, 11시간 저장된 에멀전).

- Figure 2-1는 저장 시간과 에멀전의 층 분리 높이의 함수로써 Tween 60을 통해 유화안정화된 O/W 에멀전의  $\Delta$ BS profile을 보여줌.
- Fig. 2-1에서와 같이,  $\Delta$ BS profiles은 각각 Tween 60이 200, 300, 400 및 500  $\mu$ M이 들어간 안정화된 에멀전에 따라 음의 피크가 -46, -46, -43 및 -39%로 점차 감소하는 것을 보여주며, 저장 기간에 따라, 음의 피크가 더 깊고 넓어짐.
- 에멀전 샘플의 바닥에서 상층으로 지방구가 이동하는 것은 에멀전을 담고 있는 vial의 바닥에서 지방구의 농도가 점진적으로 감소가 그 원인이며, 따라서 backscattered light의 강도가 음의 피크의 모양으로 감소함.
- 지방구의 이동은 연속상인 수용액(물 [1,000 kg/m<sup>3</sup>])보다 들기름의 낮은 밀도(930

kg/m<sup>3</sup>)에 기인 할 수 있으며, 또한, 음의 피크는 에멀전을 담고 있는 vial의 바닥으로부터 40 mm 위에서 나타남.

- 에멀전의 저장 시간이나 에멀전 제조를 위해서 사용된 유화제 농도의 증가에 따라 음의 피크의 넓이는 감소 또는 증가와 같은 일정패턴이 나타나지 않음.
- 에멀전이 담긴 vial의 바닥으로부터 40 mm 이상의 높이에서 관찰되는 음의 피크는 에멀전 위에 존재하는 기포층에 기인한 것으로 추정됨. 이러한 결과들은 에멀전의 하층부분의  $\Delta BS$ (음의 피크)의 감소나 에멀전의 상층부분의  $\Delta BS$ (양의 피크)의 약간의 증가에 의해 입증 할 수 있음. 지방구는 저장 중에 에멀전의 상층으로 이동하여 크림(지방구 밀집)층을 형성 함. 지방구는 저장시간이 증가 할수록 에멀전의 상층으로 이동하므로, 지방구의 농도는 하층영역에서 서서히 감소하며, 그로인해 에멀전의 하층에서 더 많은 빛의 투과를 허용함. 따라서, 일정기간 저장된 에멀전의 하층은  $\Delta BS$  감소와 음의 피크를 보여줌.

## ② Backscattering light 측정 방법에 의한 ESI의 측정

- 200, 300, 400 및 500  $\mu M$  유화제 Tween 60으로 유화안정화된 에멀전의 초기 지방구의 크기는 8.4, 7.3, 7.0 및 7.5  $\mu m$ 이다. 100  $\mu M$ 의 Tween 60으로 유화안정화된 에멀전은 균질화 후 바로 에멀전 상층에서 기름층이 관찰된 정도로 불안정하였기 때문에 초기 지방구의 크기를 측정하지 않음(균질화 후 기름층이 에멀전의 상층에 형성). 이것은 균질화하는 동안 안정한 형태의 지방구를 형성 하는데 필요한 유화제의 농도가 100  $\mu M$  이상이라고 예상할 수 있음. 유화제의 농도가 증가하면 초기 지방구의 크기는 감소하며, 지방구가 고도로 균질화 되면서 보다 빠르게 유화제가 지방구의 표면으로 흡착되어 재유착을 감소시키기 때문임. 진술한 바와 같이, 다양한 농도(100~500  $\mu M$ )의 유화제 Tween 60으로 제조한 에멀전은 예비 실험을 진행함. 상분리의 시작은 100  $\mu M$ 의 Tween 60으로 안정화된 에멀전에서 유화 후 곧바로 관찰함. 100  $\mu M$ 보다 높은 농도의 Tween 60으로 유화안정화된 에멀전에서는 100  $\mu M$ 의 Tween 60으로 제조한 에멀전만큼 빠른 상분리가 관찰되지 않음. 따라서 100  $\mu M$ (200~500  $\mu M$ ) 이상의 Tween 60으로 유화안정화된 에멀전을 광산란기법을 통한 ESI의 측정에 사용함.
- 산란광 측정법에 의해 결정된 에멀전의 ESI와 체적측정법에 의해 결정된 에멀전의 ESI를 비교함. 체적측정법을 이용한 ESI는 지방구가 풍부한 층과 결핍된 층사이의 경계 관측에 의해 결정됨. 그러므로 산란광 측정법에 의해서 측정된 지방구 결핍층(에멀전 하층)의  $\Delta BS$ 는 체적측정법으로 얻어진 ESI값과 음의 관계를 갖음. 그러나 저장 중 지방구 결핍층의 높이 변화에 기초하여 에멀전의 안정성을 결정하는 것은 다소간의 문제가 있음. 에멀전 내의 지방구 크기가 균일하지 않는 경우, 지방구가 풍부한 에멀전의 상층과 지방구가 결핍된 하층사이의 경계, 산란광 측정법에 의해 결정된 지방구 결핍층(에멀전 하층)의 높이는 체적측정법에 의한 ESI와 부합하지 않음. 그러므로  $-\Delta BS$  profile의 면적의 측정은 바닥에서부터 4 mm이상의 지방구 결핍층의  $\Delta BS$ 의 합으로 계산됨. Figure 2-2는 저장 시간의 함수로써 지방구 결핍층(에멀전 하층)의  $\Delta BS$ 의 합과 체적측정법에 의해 ESI가

결정된다는 것을 보여줌. Figure 2-2에 보여지는 바와 같이 이 모든 경우에 체적측정법으로 계산된 ESI값은 지방구 결핍층(에멀전 하층)의  $\Delta$ BS의 합과 유사함. ESI의 감소가  $\Delta$ BS의 음의 피크의 면적 증가와 매우 유사한 것을 나타냄.

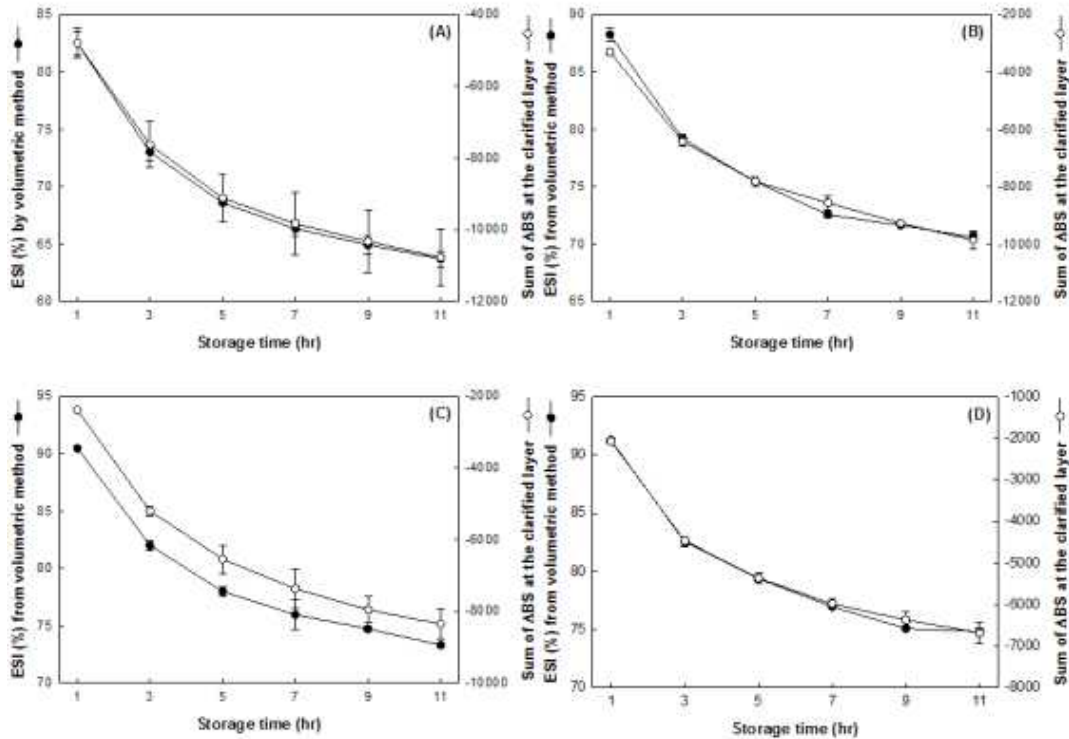


Figure 2-2. Tween 60 농도에 따른 지방구 결핍층에서의 체적측정법 및  $\Delta$  Backscattering(BS) 합에 의해 계산된 ESI(Emulsion stability index) 값의 변화((A) 200  $\mu$ mol Tween 60-stabilized emulsion.(B) 300  $\mu$ mol Tween 60 stabilized emulsion.(C) 400  $\mu$ mol Tween 60 stabilized emulsion.(D) 500  $\mu$ mol Tween 60 stabilized emulsion).

③ 체적측정법에 의해 측정된 ESI와 지방구 결핍층에서의  $\Delta$ BS 합의 관계

- 지방구 결핍층(에멀전 하층)에서  $\Delta$ BS 합은 체적측정법에 의해 계산된 ESI와 잘 부합함을 확인함(Figure 2-3). 지방구 결핍층(에멀전 하층)에서  $\Delta$ BS 합과 체적측정법에 의해 계산된 ESI 사이의 선형관계에서 200~500  $\mu$ M농도 Tween 60으로 유화안정화된 에멀전은 각각 상관인자( $R^2=0.9990, 0.9933, 0.9980$  및  $0.9980$ )를 얻음. 또한, 지방구 결핍층(에멀전 하층)에서  $\Delta$ BS 합과 체적측정법에 의해 결정된 ESI 사이의 선형관계( $R^2=0.9530$ )는 유화제의 농도와 무관하다는 것을 확인함(Figure 2-4). 에멀전의 안정성 평가를 위한 새로운 방법은 많은 연구그룹에 의해 개발됨. Garti(1981) 등은 전기전도도 측정에 기반을 한 방법을 확립했고, Latreille and Paquin(1990)은 원심분리와 전도도 측정에 기반한 방법을 확립함. 에멀전의 안정성 평가를 위한 위의 방법들은 간단하고 신속하며 표준안정성시험과 연관성이 있으나, Latreille and Paquin(1990)의 방법은 측정하는 동안 원심분리 과정을 거치기 때문에 에멀전의 파괴를 야기할 수 있음. 또한 전기전도도 측정은 유화 안정성(유적의 크기



아님)에 대한 정보를 제공 할 수 있음. 그러나 산란광 측정법은 유화 안정성과 지방구 크기 변화에 대한 정보를 제공하며, 지방구 결핍층(에멀전 하층)에서  $\Delta BS$  합이 유화 안정성의 새로운 지표로 사용될 수 있음.

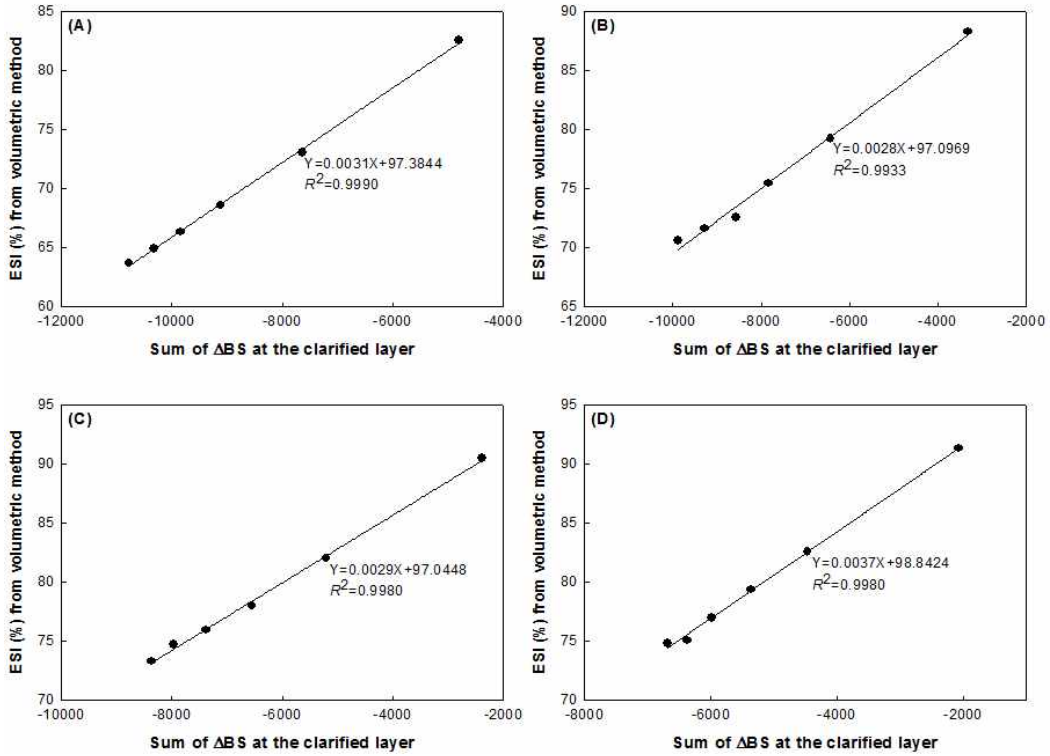


Figure 2-3. 산란광 측정법 및 체적측정법의 상관성에 대한 fit curve((A) 200  $\mu\text{mol}$  Tween 60-stabilized emulsion.(B) 300  $\mu\text{mol}$  Tween 60-stabilized emulsion.(C) 400  $\mu\text{mol}$  Tween 60-stabilized emulsion.(D) 500  $\mu\text{mol}$  Tween 60-stabilized emulsion).

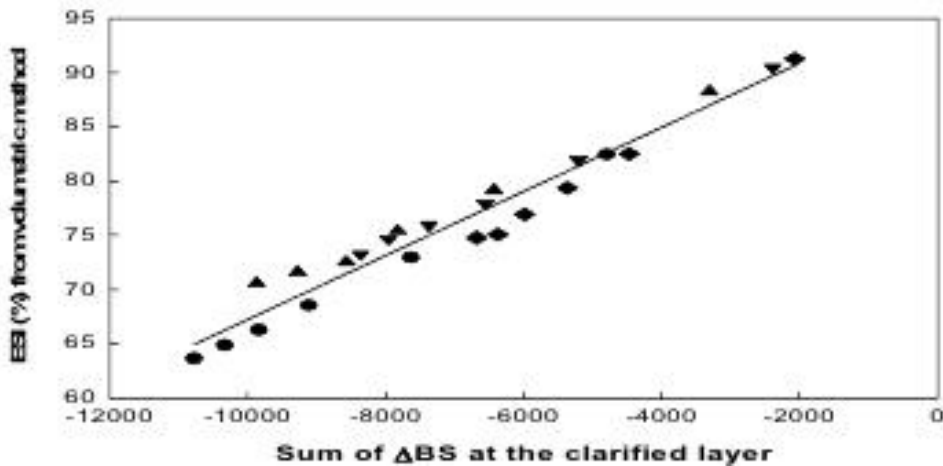


Figure 2-4. 지방구 결핍층의  $\Delta BS$ 의 합과 체적측정법에 의한 ESI 사이의 관계(●, 200  $\mu\text{mol}$  Tween 60-stabilized emulsion; ◆, 300  $\mu\text{mol}$  Tween 60-stabilized emulsion; ▼, 400  $\mu\text{mol}$  Tween 60-stabilized emulsion; ◀, 500  $\mu\text{mol}$  Tween 60-stabilized emulsion. ESI, emulsion stability index;  $\Delta BS$ ,  $\Delta$ backscattering).

(2) 고안정성 나노/마이크로에멀전 제조를 위한 최적 공정 조건 확립

(가) 고안정성 나노/마이크로에멀전 제조를 위한 유화제의 탐색 방법

- ① 유화제의 분자량과 친수/친유 부위 크기에 따른 고안정성 나노/마이크로에멀전을 형성하는 조건을 탐색함. 유화제는 친수성기의 크기와 친유성기의 길이에 따라 특성이 달라짐. 유화제 Brij 35, 58, 78 및 700을 10 mM phosphate buffer(pH 7)에 최종 농도가 1 mM이 되도록 용해함(Figure 2-5). 그 후, 에멀전에 citral 최종농도가 533 mg/L이 되도록 citral을 첨가한 뒤 4°C에서 12 시간 동안 교반한 후, pH를 2, 4.5 및 7로 보정한 뒤, 2주 동안 냉장 저장함. 지표물질로 사용한 citral은 알칼리성이나 강산성에서 불안정하고 물에는 녹지 않으며, 에탄올 및 에테르등에 녹는 지용성임. 또한, 온도와 빛에 의해 분해가 촉진되는 외부요인에 민감한 물질임. citral의 잔존량을 측정하기 위해 gas chromatography와 high performance liquid chromatography를 사용함.

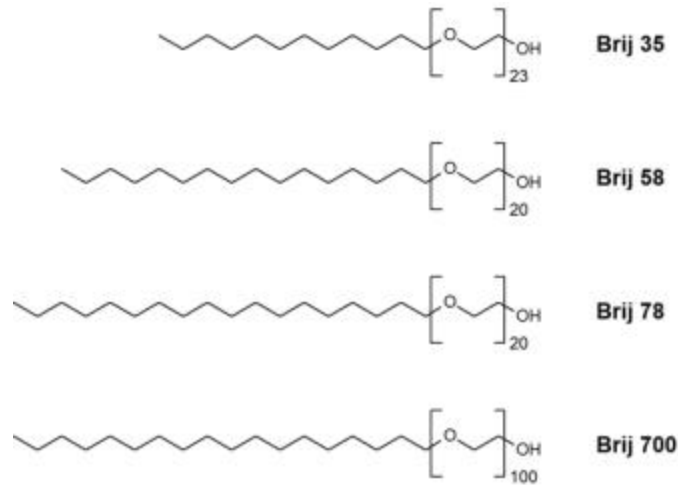


Figure 2-5. Brij 35, 58, 78 및 700의 형태

(나) 고안정성 나노/마이크로에멀전 제조를 위한 유화제의 탐색 결과

- ① 유화제의 분자구조(친수성기와 친유성기의 분자크기)를 검토하여 유화제 중에서 Brij 35, 58, 78 및 700을 선정함. 비이온계 유화제인 Brij는 매우 유사한 분자 구조를 갖고 있으며 Brij 35, 58, 78 및 700의 친수/소수성의 균형(HLB)이 15에서 18(17, 16, 15, 18)로 매우 유사함. 각각의 Brij는 소수성기인 탄소 사슬을 12, 16, 18 및 18개씩 갖고 있으며, 친수성기인 옥시에틸렌을 23, 20, 20, 100개씩 갖고 있음. 위에서 언급한 Brij들의 구조적 차이를 보면 소수성기의 길이는 Brij 700 = Brij 78 > Brij 58 > Brij 35 이며, 친수성기의 크기는 Brij 700 > Brij 35 > Brij 78 > Brij 58 순임. 따라서 Brij 34, 58, 78 및 700의 구조적 차이에 따른 유화 안정화의 정도를 측정하기 위하여 실험을 설계함.

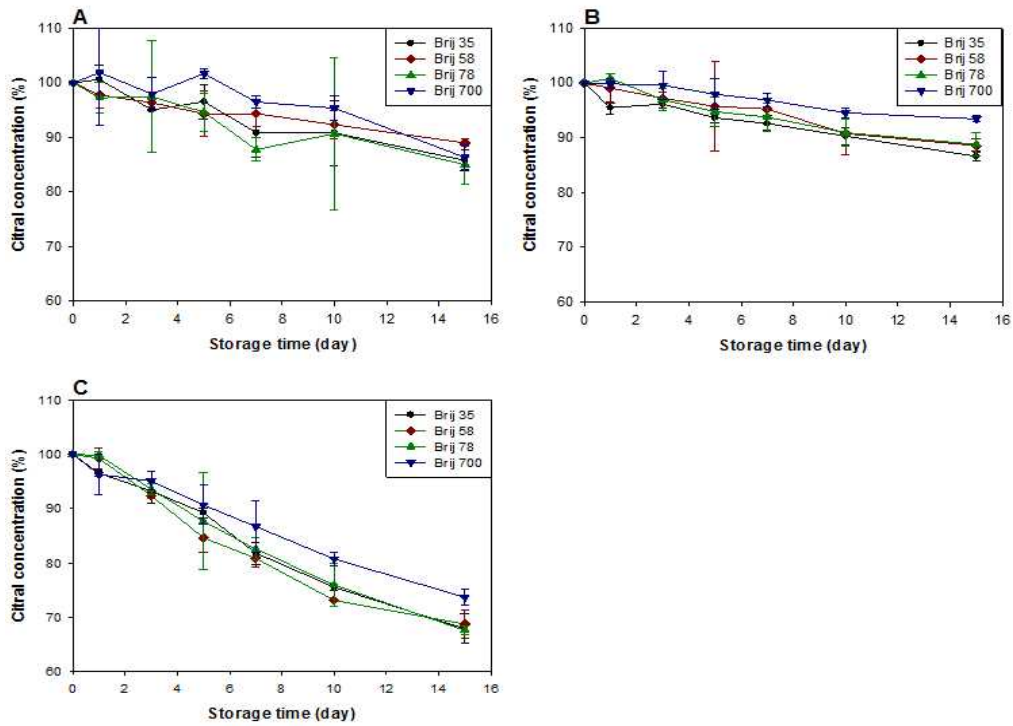


Figure 2-6. 다양한 pH에서 1 mM Brij 종류 계면활성제를 함유한 phosphate buffer 용액 속 citral 농도의 시간 의존성(A; pH 7, B; pH 5, C; pH 3).

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

②  $C_0$ 는 초기의 농도이고,  $C_t$ 는 t시간 경과 후 잔존량이며,  $k$ 는 분해속도상수를 나타낸다. ( $C_t/C_0$ )를 계산하여 분해속도상수  $k$ 를 계산함(Table 2-1 및 Figure 2-6). 모든 pH에서 Brij 700은 상대적으로 가장 낮은 감소 비율을 보이고 있으며 pH 3에서의 감소비율을 보면 Brij 78  $\approx$  Brij 58  $\geq$  Brij 35  $>$  Brij 700 으로 나타남. Brij 78과 700은 18개의 탄소로 구성된 소수성 사슬을 갖고 있지만, 각각 다른 친수성기의 크기(20과 100)를 갖음. 따라서 친수성기의 크기가 클수록 보다 저장안정성이 우수하다는 것이 확인 됨. 또한 Brij 58과 78은 옥시에틸렌이 20개로 친수성기의 크기가 같으나, 각각 16 및 18개의 탄소로 구성된 소수성 사슬을 갖음. 하지만 Brij 58과 78로 제조한 시료 간의 저장안정성에는 큰 차이가 없음.

Table 2-1. 일차반응으로 가정된 pH 함수의 citral의 화학적 분해 모델링을 통한 파라미터 측정

pH	Brij 78		Brij 58		Brij 35		Brij 700	
	$k(\text{day}^{-1})$	$R^2$	$k(\text{day}^{-1})$	$R^2$	$k(\text{day}^{-1})$	$R^2$	$k(\text{day}^{-1})$	$R^2$
3	0.0274	0.995	0.0270	0.966	0.0264	0.991	0.0203	0.993
5	0.0087	0.952	0.0083	0.975	0.0085	0.941	0.0051	0.962
7	0.0105	0.864	0.0071	0.965	0.0104	0.924	0.0096	0.801

(다) 고안정성 나노/마이크로에멀전의 외부요인(pH 및 저장기간)에 대한 저장안정성 확인 방법

- ① 물에 녹는 계면활성제의 농도가 증가해도 전기전도율이 더 이상 증가하지 않고 미셀이라는 집합체가 형성되는 시기의 농도가 CMC(critical micelle concentration)이다. 실험에 사용된 유화제의 CMC가 다르기 때문에 유화제 각각의 CMC를 20배로 고정하고, 각 유화제의 농도를 CMC를 기준으로 설정함.

(라) 고안정성 나노/마이크로에멀전의 외부요인(pH 및 저장기간)에 대한 저장안정성 확인 결과

- ① 위에서 확인한 결과를 토대로 Brij 35, 78 및 700을 선정하여 첨가량을 CMC의 20배가 되도록 시료를 제조한 후, 500  $\mu\text{L/L}$ 가 되도록 citral을 첨가함. 그런 후, 지표물질인 citral의 나노에멀전 내의 저장안정성을 평가하기 위하여 pH를 2, 4.5 및 7로 보정한 뒤, 암실에서 2주 간 냉장보관을 함. GC를 사용한 Brij 35, 78 및 700의 실험은 지표물질의 잔존량이 14일, pH 2에서 각각 13.5%, 9.2%, 4.6%로, pH가 낮아질수록 지표물질의 분해속도가 빨라지는 것을 확인 할 수 있음. 저장 기간이 증가할수록 지표물질이 더 많이 분해되는 것도 확인 할 수 있음(Figure 2-7).

- ② 1 mM의 Brij로 유화 안정화한 용액들과 20배의 CMC 농도로 유화 안정화한 용액들은 분자 구조와 citral 잔존량 간의 상관관계가 부합되지 않음을 확인함. 주된 원인은 20배의 CMC 농도로 Brij를 녹이면 Brij 35, 78 및 700은 1.8 mM, 0.92 mM 및 0.4 mM로 앞서 실험한 1 mM의 Brij용액과 비교 시 시료 내의 유화제의 절대량에 상당한 차이가 나타나기 때문임. 이러한 이유로 Brij 700으로 제조한 시료에는 citral이 안정화 될 수 있는 소수중심(hydrophobic core)의 양이 Brij 35 또는 78에 비해 적기 때문에 citral은 외부환경에 쉽게 노출되어 빠르게 분해됨.

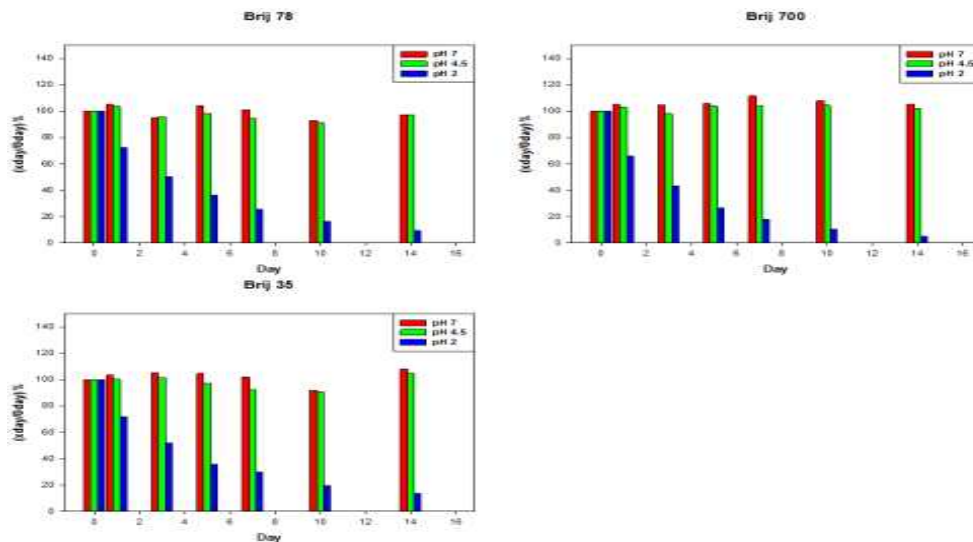


Figure 2-7. 다양한 pH에서 20 CMC Brij 종류 계면활성제를 함유한 phosphate buffer 용액 속 citral 농도의 시간 의존성(A; pH 7, B; pH 5, C; pH 3).

나. 나노/마이크로에멀전 제조 기술에 의한 분지아미노산을 고농도 가용화한 액상 소재 개발

(1) 분지아미노산을 함유한 나노/마이크로에멀전의 전처리 조건 확립

(가) 분지아미노산의 이화학적 특성 분석에 근거한 최적 유화제 및 유지류 탐색 방법

① HLB value에 따른 유화제 탐색

- 유화제의 HLB value(hydrophile lipophile balance) 및 분자구조에 따른 분지아미노산을 고농도 가용화 가능한 조건을 탐색함. 유화제는 친수성기와 친유성기를 동시에 공유하고 있으며 이를 수치화하여 1949년 Griffin에 의해 창안된 방법이 HLB value임. HLB value는 유화제의 친수성기의 분자량을 유화제 전체의 분자량으로 나눈 값에 20을 곱한 값으로 6이하는 W/O형 에멀전, 8이상은 O/W형 에멀전을 형성한다고 알려져 있음.
- 분지아미노산의 이화학적 특성에 따른 유화제의 선정에 있어서 유화물 형성에 다양한 가능성을 고려하여 넓은 범위의 HLB value 별 유화제를 선정함. lecithin 및 Span 80(Sorbitan monooleate)은 주로 W/O형 에멀전을 형성하며 lysolecithin, Tween 80(Polyoxyethylene sorbitan monooleate)은 주로 O/W형 에멀전을 형성함(Table 2-2).

Table 2-2. 각 유화제 별 HLB value 및 수상에서의 용해정도

Surfactants	Lecithin	Span 80	Lysolecithin	Tween 80	Brij series
HLB value	4.0	4.3	9.0	15.0	4.9~18.8
Water soluble	Partly soluble	Partly soluble	soluble	soluble	soluble

- Brij series의 경우 넓은 범위의 HLB value를 갖고 있으나 식품첨가물로서 승인되지 못하여 본 연구 수행에 있어서 제외함.
- 분지아미노산의 분산안정성 연구에 있어 유사 분자구조인 Span 80과 Tween 80의 친수성기(polyoxyethylene)의 차이를 관찰하기 위해 유화제를 선정함(Figure 2-8). Span 80과 Tween 80 분자는 같은 sorbitan monooleate를 갖고 있지만 Tween 80이 polyoxyethylene 친수성기를 함유하고 있어 구조적 유사성은 갖고 있으나 친수성기의 차이가 발생함. 따라서 보다 명확한 HLB value에 따른 분지아미노산의 분산안정성을 확인함에 있어 두 유화제를 사용하여 연구를 수행함.

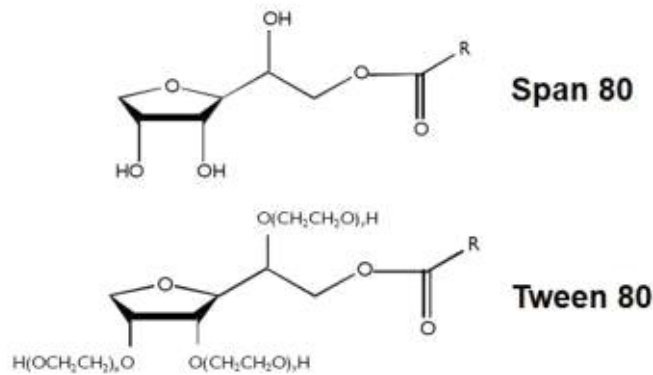


Figure 2-8. Span 및 Tween의 분자 구조.

- 식품에서 사용하는 lecithin은 순도가 낮고 수상에서의 용해성이 좋지 않은 단점을 보완한 lysolecithin을 사용하여 연구를 수행함. Lysolecithin은 lecithin을 효소적 가수분해 반응을 통해 지방산 한 분자를 제거하여 수상에서의 용해성을 확보한 유화제임.
- 따라서 본 연구에서는 Span 80, lysolecithin 및 Tween 80을 최적 유화제 후보로 선정하였으며 또한 모든 유화제는 식품첨가물로 승인되었으며 Food grade 등급의 제품으로 수행함.

② 분지아미노산과 유화제의 혼합 최적 조건 탐색

- 분지아미노산과 유화제의 혼합 비율을 설정하여 분지아미노산의 농도의 변화에 무관하게 같은 비율로 제조하도록 함. 유화제의 농도는 분지아미노산을 100으로 설정하였을 때 1.00, 0.67, 0.50, 0.40의 비율로 첨가함(Table 2-3). 따라서 비율을 고정함으로써 분지아미노산의 농도와 무관한 일정한 결과가 도출될 것으로 추측함. 유화제를 4가지 다른 농도로 첨가하여 분지아미노산을 고농도로 가용화하기 위한 최적 농도를 탐색할 수 있음.

Table 2-3. 분지아미노산과 유화제의 비율에 따른 첨가 유화제의 농도

BCAAs Conc.(%)	BCAAs : Surfactants ratio(%)			
	100:1	100:0.67	100:0.50	100:0.40
3	0.030	0.020	0.015	0.012
4	0.040	0.027	0.020	0.016
5	0.050	0.033	0.025	0.020
6	0.060	0.040	0.030	0.024

(2) 분지아미노산 함유 나노/마이크로에멀전의 제조공정 확립을 통한 고농도 액상화

(가) 유화안정성에 유용한 공정변수의 선정 및 최적 조건확립 방법

① 분지아미노산 용액 제조 방법

- 10 mM phosphate buffer 용액을 제조한 후 pH 3, 6으로 보정하였다. 보정한 phosphate buffer에 선정된 3가지 유화제를 Table 2-3에서 제시된 농도로 각각 녹인 후 분지아미노산을 첨가하여 2시간동안 실온에서 교반함.
- 문헌 탐색 결과 분지아미노산의 용해도는 등전점에서 멀어질수록 증가한다고 알려져 있음. 따라서 pH에 따른 분지아미노산의 용해도 변화를 관찰하기 위하여 pH 3의 산성조건과 분지아미노산의 등전점인 pH 6에서 용해도를 관찰함. 또한 pH 7이상의 알칼리 조건에서의 관찰이 제외된 이유는 일반적으로 식품에서 알칼리성을 띄는 제품은 거의 존재하지 않기 때문임.

② Microfluidizer를 활용한 분지아미노산 고농도 가용화 방법

- Microfluidizer는 초고압 처리기술을 이용하여 용액에 순간적인 힘을 가하여 입자를 균질화시키는 가공처리 기술임(Figure 2-9). 분산상의 입자는 나노 사이즈로 감소할 뿐만 아니라 분산상의 안정성도 확보할 수 있는 유용한 기술임. Microfluidic 기술을 이용하여 분지아미노산을 수상에 고농도로 가용화하고 분지아미노산의 분산 안정성도 확보하는 연구를 수행함.

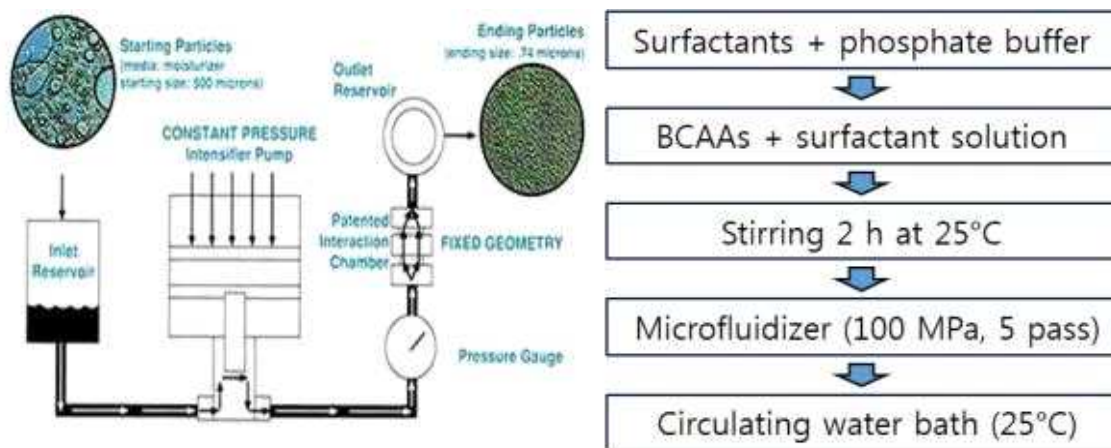


Figure 2-9. Microfluidizer의 모식도 및 공정 방법.

- Microfluidizer의 압력은 분지아미노산이 충분한 물리적 힘을 받아 균일한 분산성을 확보하도록 100 MPa로 설정함. 이 이상의 압력에서는 분산성의 큰 차이를 보이지 않으며 불필요한 에너지를 유발하기 때문에 최적 압력으로 구동함.
- 공정횟수는 5회의 기기 내 순환을 주어서 분산상의 균질화를 유도함. 5회 이하에서는 분산성이 균일하게 확보되지 못하며 그 이상에서는 큰 차이가 나타나지 않을 뿐 아니라 분산상 시료의 기계적 손실을 야기할 수 있기 때문에 5회 순환을 최적 공정횟수로 설정함.

- 제조온도는 70°C로 하여 microfluidizer 내에서 분지아미노산의 석출 등으로 기계적 결함을 방지하며 분지아미노산의 초기 용액의 과포화를 유도하여 고농도 액상화가 가능하도록 함.

③ 분지아미노산 고농도 가용화 용액의 용해도 측정 방법

- Microfluidizer를 통한 분지아미노산 고농도 가용화 용액의 용해도를 측정하기 위하여 ninhydrin법을 사용함. Ninhydrin법은 아미노산 혹은 단백질을 정량하는 방법 중 하나로 ninhydrin 발색시약을 아미노산의 아민기에 부착하여 흡광도를 측정함으로써 정량할 수 있음. ninhydrin 발색시약은 아미노산과 반응하여 청자색을 나타내며 최대 흡수파장은 570 nm로 알려져 있음.
- Ninhydrin 반응을 이용한 아미노산 정량법은 다음과 같음. 먼저 ninhydrin 0.16 g을 4 N sodium acetate buffer solution 2 mL과 ethylene glycol 6 mL에 용해하여 preninhydrin 용액을 제조하고 SnCl<sub>2</sub> 1 g을 ethylene glycol 10 mL에 용해하여 SnCl<sub>2</sub>용액을 제조함. 그 후 preninhydrin 용액 4 mL에 SnCl<sub>2</sub>용액 100 μL을 혼합하여 ninhydrin발색시약을 제조함. Ninhydrin발색시약을 시료와 1:1 비율로 혼합한 후 100°C에서 10분간 가열하고 2분간 0°C에서 냉각한 후 50% 에탄올 용액 1mL을 첨가하여 교반 후 575 nm 파장에서 흡광도를 측정함.
- 본 연구에서 제조한 분지아미노산 용액은 증류수로 600배 희석하여 ninhydrin법으로 측정하였으며 분지아미노산에 대한 standard curve는 0~0.012%의 농도로 측정하여 도출하였고 이를 이용하여 분지아미노산 고농도 가용화 용액의 농도를 유추함.
- 제조된 고농도 분지아미노산 용액은 4, 25°C에서 20일간 저장하며 0, 1, 5, 10, 20일에 ninhydrin법을 이용하여 용해도를 측정함.

(나) 유화안정성에 유용한 공정변수의 선정 및 최적 조건확립 결과

- 유화제의 HLB value에 따른 분지아미노산의 용해도 증가와 microfluidizer를 활용한 물리적 용해도 증가에 대한 연구를 수행함. 선정된 3가지 유화제의 HLB value는 Span 80, lysolecithin 및 Tween 80 순으로 4.3, 9.0 및 15.0으로 HLB value와 분지아미노산의 용해도의 상관관계를 알아보기 위하여 선정하였으며, 각각의 유화제는 4가지 농도 변화를 주어 유화제의 농도와 분지아미노산의 농도와의 상관관계도 관찰함.
- 제조 방법 중 pH와 저장 온도에 따른 분지아미노산 용액의 용해도 변화를 관찰함.

① Microfluidizer를 활용한 물리적 힘에 의한 분지아미노산의 용해도 관찰 결과

- Microfluidizer의 물리적 힘만을 이용하여 분지아미노산을 고농도로 가용화 하여 microfluidizer의 분지아미노산을 가용화 할 수 있는 능력을 알아볼 수 있었으며 유화제의 첨가에 따른 분지아미노산의 용해도 결과와 비교하여 유화제의 첨가와 분지아미노산의 용해도의 상관관계 분석에 활용함.
- Microfluidizer를 활용한 분지아미노산 용액의 초기 용해도는 최대 4.69%로 나타났으며 모든 시료에서 pH 3과 6간의 통계적 유의성은 나타나지 않았지만 pH



6에서 다소 높은 결과를 보여주고 있음(Figure 2-10). 3, 4%의 분지아미노산을 가용화 시킨 용액에서는 대부분의 분지아미노산이 용해된 것으로 나타났으며 약 0.01~0.05%의 분지아미노산 손실이 발생함. 이는 Microfluidizer를 활용한 가용화 방법에서 기기 내 흡착이나 잔존량으로 약간의 손실이 일어난 것으로 추측됨. 하지만 5, 6%의 분지아미노산을 가용화 시킨 용액에서는 0.51~1.32%의 분지아미노산 손실을 나타내었으며 이는 microfluidizer를 활용한 물리적 가용화 방법의 최대 용해도를 초과하는 양으로 추측됨. 즉, 약 4.5% 내외에서 물리적 방법에 의한 분지아미노산의 최대 용해도가 형성됨을 알 수 있음.

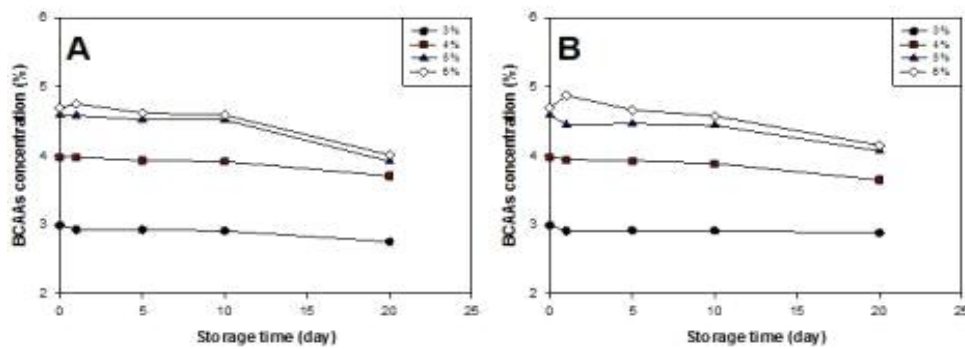


Figure 2-10. 저장온도(25°C)에 따른 pH 3(A), 6(B)에서 BCAAs 용해도 변화.

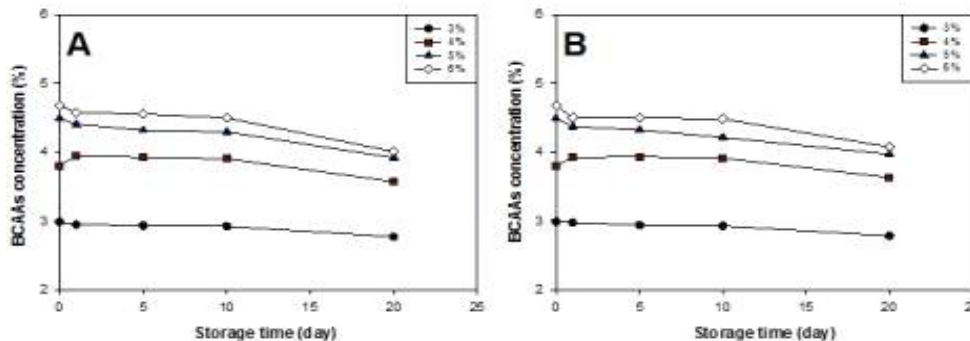


Figure 2-11. 저장온도(4°C)에 따른 pH 3(A), 6(B)에서 BCAAs 용해도 변화.

- Microfluidizer를 활용한 분지아미노산 가용화 방법에서는 일반적으로 알려진 낮은 pH에서 분지아미노산의 용해도가 향상되는 무관하게 분지아미노산의 용해도가 pH에 영향을 받지 않는다는 것을 증명하고 있음. 즉, 물리적 방법에서 화학적 변인인 pH는 유의적 차이를 야기하지 않는 것으로 분지아미노산과 같은 특정 pH에서 일반적으로 가용화하기 어려운 난용성 물질이나 pH의 변화에 민감한 물질을 가용화시키는데 microfluidic방법은 유용한 공정 중 하나로 사료됨.

② 유화제의 종류와 농도에 따른 분지아미노산의 용해도 관찰 결과

- 3종류의 유화제와 4종류의 유화제 농도에 따른 분지아미노산의 용해도를 관찰하여 유화제의 HLB value 및 유화제의 농도와 분지아미노산과의 상관관계를 분석함. 또한 유화제를 첨가하지 않은 시료와의 비교를 통해서 유화제의 분지아미노산 용해

능력을 관찰함. 선행 연구된 유화제 미첨가 시료에서의 결과를 바탕으로 분지아미노산의 최대 용해도가 4~5% 부근일 것으로 추측되어 유화제 첨가 실험에서는 4 및 5% 분지아미노산 용액을 중점적으로 연구 수행함.

- 4% 분지아미노산을 가용화 시킨 용액에서는 pH 3과 6에서 유화제 별 용해도의 통계적인 유의적 차이는 나타나지 않았으나 Tween 80이 다른 시료보다 다소 높은 용해도 결과를 나타내고 있음(Figure 2-12와 2-13).
- 유화제를 첨가한 5% 분지아미노산을 가용화 시킨 용액을 비교해보면 상대적으로 HLB value가 높은 Tween 80을 첨가한 분지아미노산 용액이 다른 시료들과 통계적으로 유의적 차이를 나타내며 용해도 향상을 보임. 반면에 상대적으로 HLB value가 낮은 Span 80의 경우 Span 80 자체의 수용액상에서의 낮은 용해도로 인해 분지아미노산의 용해도 향상에 기여하지 못함을 관찰함(Figure 2-14과 2-15).
- 4% 분지아미노산 용액의 용해도에서는 pH 변화에 대한 유의적 차이는 관찰되지 않았으나 5% 분지아미노산의 용해도에서는 Span 80 첨가 분지아미노산 용액을 제외하고 pH 6에서 pH 3보다 높은 용해도를 보이고 있음(Figure 2-14과 2-15).
- 각 유화제의 농도별 분지아미노산 가용화 용액의 용해도를 살펴보면 유화제의 농도의 증가에 따라 근소하게 분지아미노산의 용해도가 향상되나 통계적 유의성은 없는 것으로 나타남. 특히 수용액상에서 불안정한 Span 80의 경우는 농도의 증가에 따른 경향성이 뚜렷하게 나타나지 않고 있음을 볼 수 있음(Figure 2-14과 2-15).
- 수용액상에서 분지아미노산 용액의 용해도는 상대적으로 HLB value가 높은 Tween 80이 가장 높게 나타났으며 분지아미노산 대비 100:1의 유화제 비율에서 최대 농도 4.99%를 나타냄. 즉, 유화제 미첨가 분지아미노산 용액보다 약 0.4%의 용해도 향상을 나타냈으며 결과적으로 Tween 80이 3종류의 유화제 중 최적 유화제로 선정할 수 있음. 또한 농도에 따른 통계학적 차이는 없으나 분지아미노산 대비 100:1에서의 비율이 가장 높은 용해도를 나타내어 이를 최적 농도로 설정할 수 있음.
- 20일간의 저장 실험 결과를 보면 초기 용해도 보다 최대 0.5%의 용해도 감소를 보이고 있음. 문헌 탐색 결과 1차적 유화 안정제의 경우 용해도 향상의 결과는 가져올 수 있으나 이를 장기간 안정적으로 지속할 수 있는 능력은 다소 낮음이 나타나 추후 연구에서 고분자 중합체를 활용한 분지아미노산의 저장 안정성 향상을 극대화할 수 있는 방법을 연구 할 계획임.

### ③ 저장 조건 중 온도에 따른 분지아미노산 용액의 용해도 관찰 결과

- 저장 온도에 따른 분지아미노산 가용화 용액의 용해도는 유의적으로 차이가 없었으며 4, 25℃간 매우 비슷한 경향성을 나타냄. 즉, 온도 변화에 대한 분지아미노산 가용화 용액의 저장 안정성은 유의미한 차이가 없음을 말해주고 있음(Figure 2-10과 2-11, 2-12와 2-16, 2-13와 2-17, 2-14와 2-18, 2-15과 2-19).

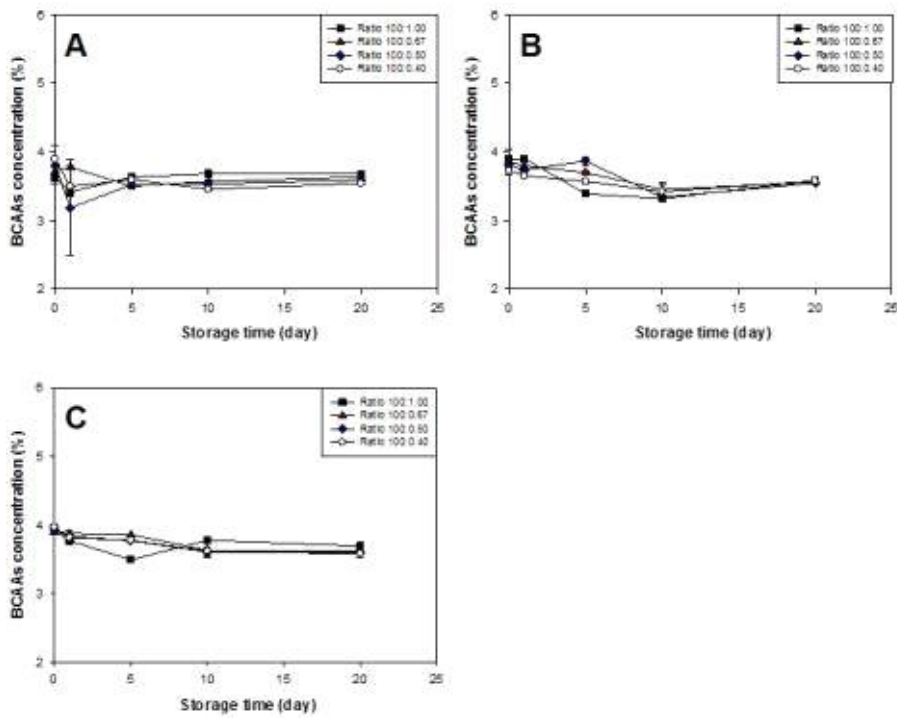


Figure 2-12. 저장온도(25°C), pH 3에서 4% BCAAs 용해도 변화(A: Span 80, B: Lysolecithin, C: Tween 80)

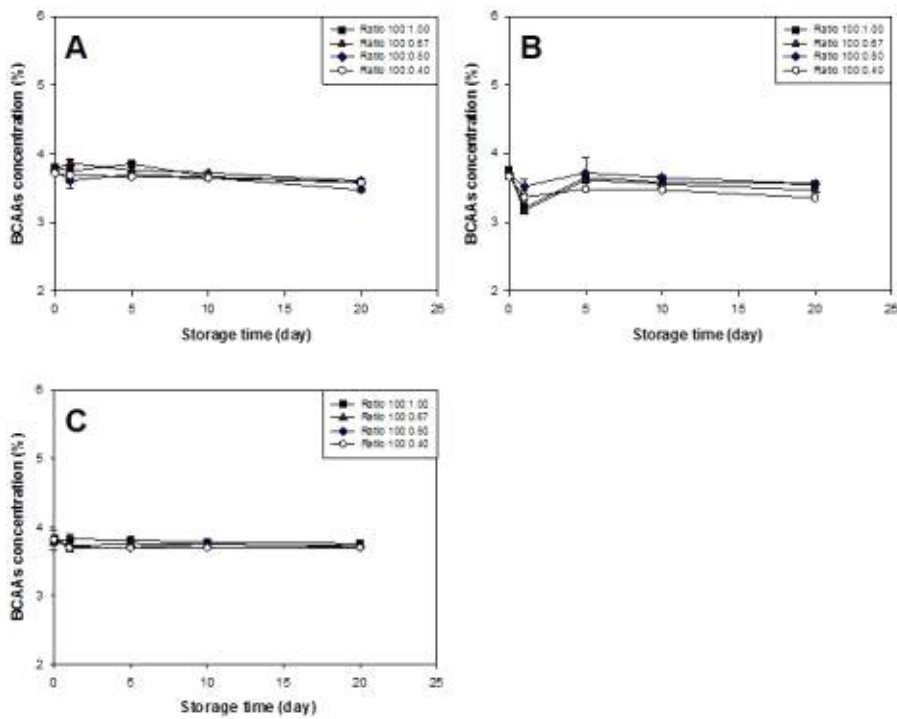


Figure 2-13. 저장온도(25°C), pH 6에서 4% BCAAs 용해도 변화(A: Span 80, B: Lysolecithin, C: Tween 80).

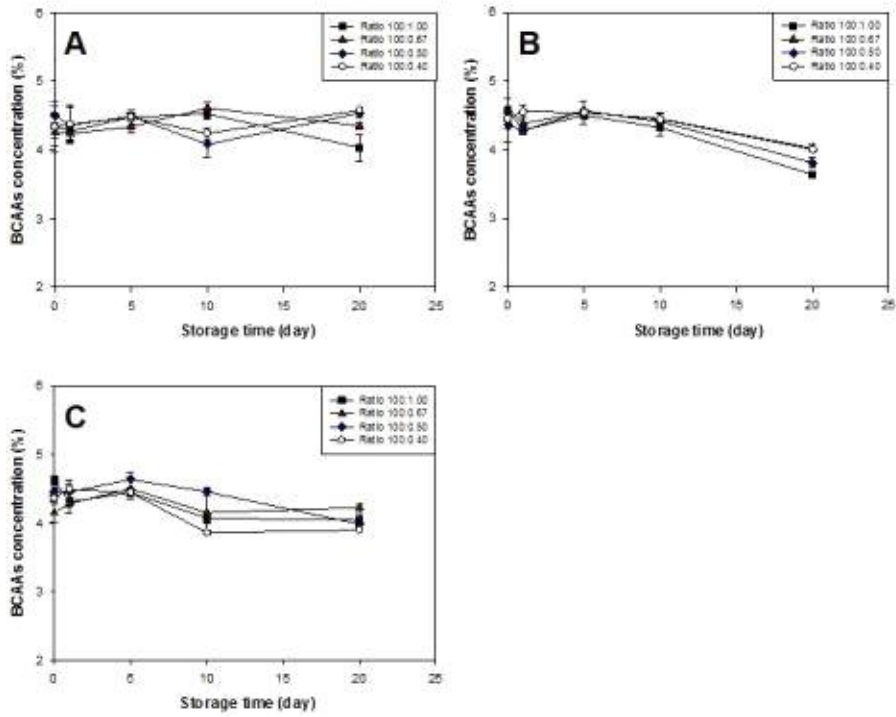


Figure 2-14. 저장온도(25°C), pH 3에서 5% BCAAs 용해도 변화(A: Span 80, B: Lysolecithin, C: Tween 80).

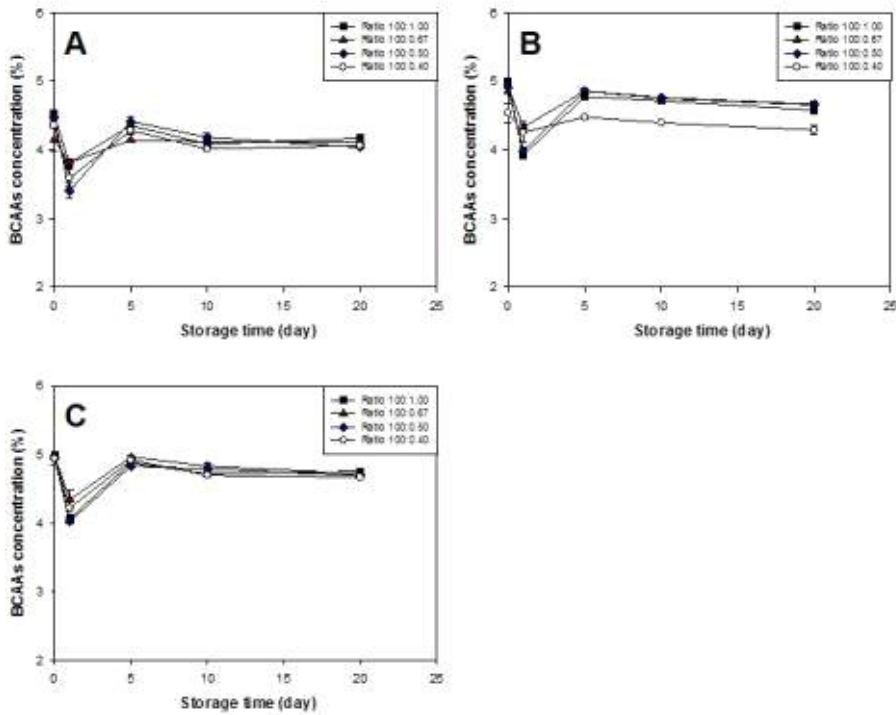


Figure 2-15. 저장온도(25°C), pH 6에서 5% BCAAs 용해도 변화(A: Span 80, B: Lysolecithin, C: Tween 80).

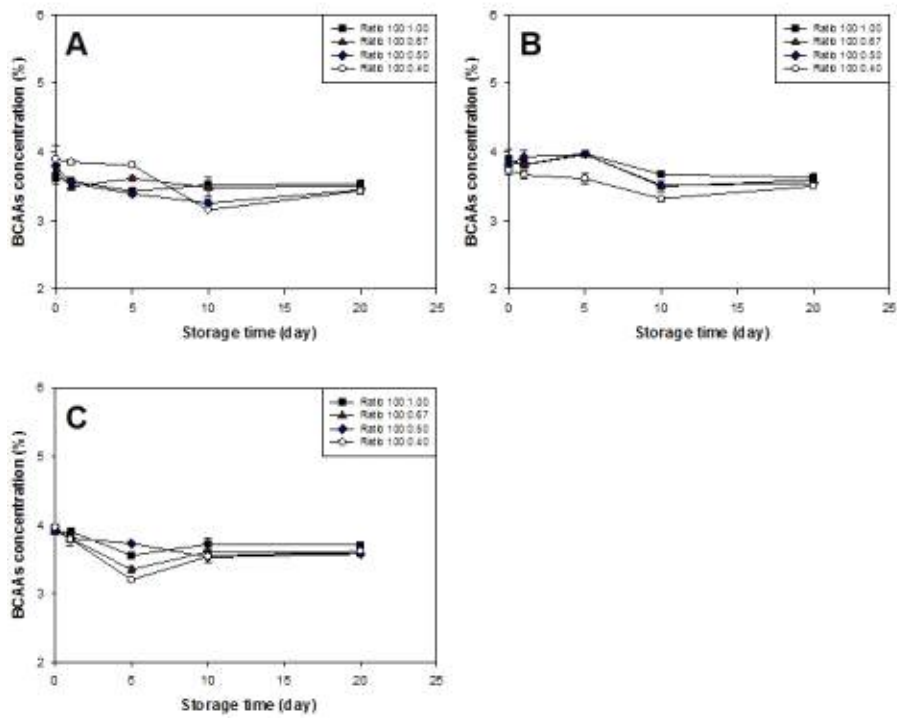


Figure 2-16. 저장온도(4°C), pH 3에서 4% BCAAs 용해도 변화(A: Span 80, B: Lysolecithin, C: Tween 80).

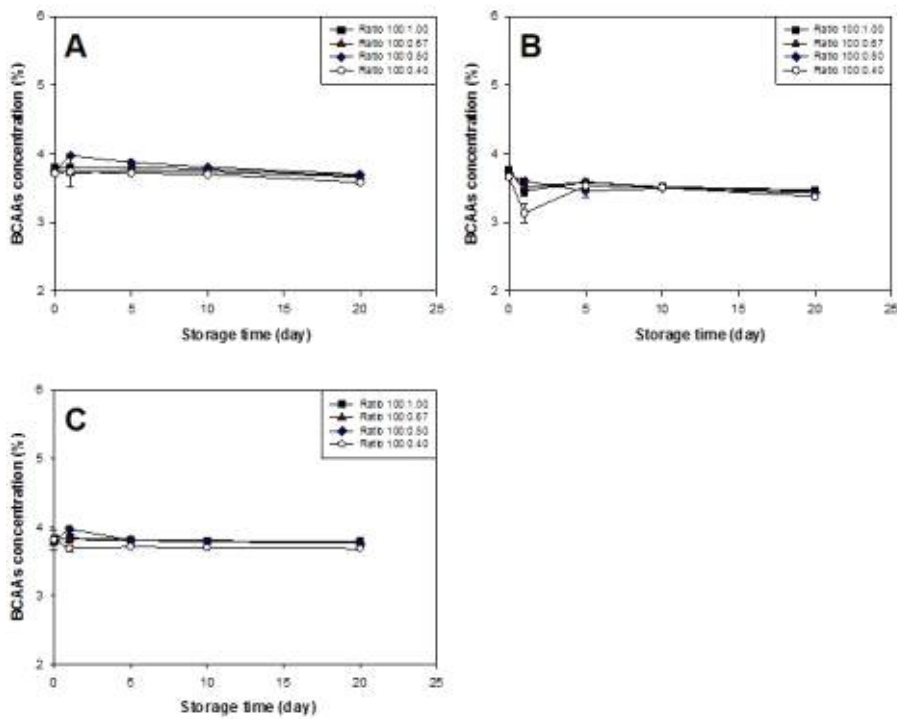


Figure 2-17. 저장온도(4°C), pH 6에서 4% BCAAs 용해도 변화(A: Span 80, B: Lysolecithin, C: Tween 80).

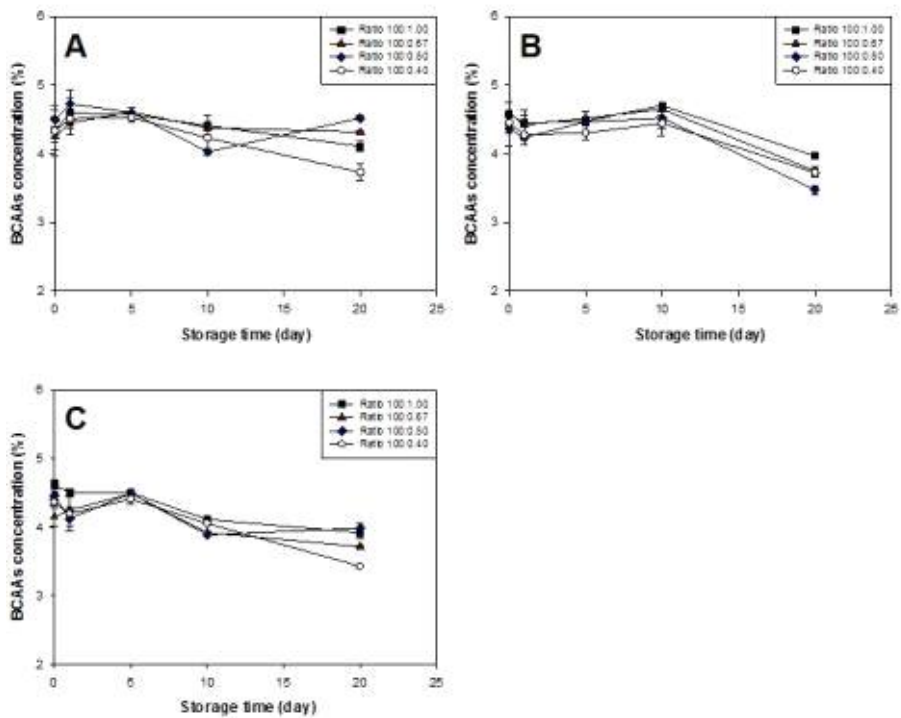


Figure 2-18. 저장온도(4°C), pH 3에서 5% BCAAs 용해도 변화(A: Span 80, B: Lysolecithin, C: Tween 80).

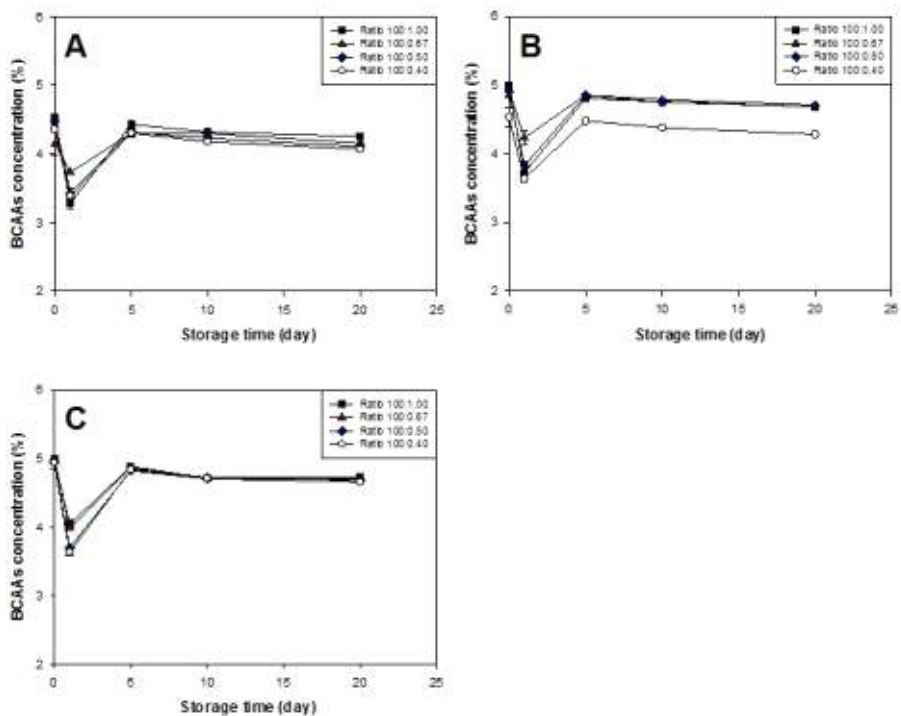


Figure 2-19. 저장온도(4°C), pH 6에서 5% BCAAs 용해도 변화(A: Span 80, B: Lysolecithin, C: Tween 80).

(3) 분지아미노산 함유 나노/마이크로에멀전의 이화학적 특성 분석

(가) 분지아미노산 함유 나노/마이크로에멀전의 유화안정지수 평가 방법

- ① Turbiscan을 활용한 나노/마이크로에멀전의 유화안정지수 측정 방법은 광원으로부터 발생한 빛의 투과 및 후방 산란광의 세기를 이용하여 실질적인 용액의 물성 및 이화학적 특성을 분석하기에 적합한 광학 분석기임. 이 분석 장비의 작동 원리는 시료가 담긴 높이 70 mm 유리 원통형 vial을 광원이 40 μm 간격으로 빛을 발생시키며 투과광 혹은 산란광의 세기 변화를 수집하여 시간에 따른 시료의 상태나 시료 내 입자의 크기변화를 관찰할 수 있음(Figure 2-20).



Figure 2-20. Turbiscan의 모식도.

- 제조된 고농도 분지아미노산 용액을 즉시 원통형 vial에 50 mm가 되도록 주입하고 Turbiscan에 장착 후 근적외선 광원( $\lambda = 880 \text{ nm}$ )을 이용하여 25°C에서 0, 1, 2, 12 및 24 시간 간격으로 투과광 및 산란광의 세기를 측정함.
- 투과광의 세기에 의한 현탁액의 안정성 지수(SSI)를 평가하기 위해 Turbiscan을 이용하여 측정된 투과광의 세기는 다음과 같은 식을 통하여 계산함.

$$SSI = \left( \frac{A_t}{A_0} \right) \times 100$$

- $A_0$ 는 초기 50 mm의 시료에서 40 μm 간격으로 측정된 투과광의 세기의 합이고,  $A_t$ 는 t시간 후 50 mm의 시료에서 40 μm 간격으로 측정된 투과광의 세기의 합임. 시료의 안정성의 변화가 발생하면 즉, 입자의 크기 증가, 응집이나 침전 등으로 인한 투과광의 세기가 감소되며 이를 통하여 시간에 따른 분지아미노산 용액의 분산 안정성을 확인할 수 있음.

(나) 분지아미노산 함유 나노/마이크로에멀전의 유화안정지수 평가 결과

- ① 유화제의 종류 및 유화제의 농도에 따른 분지아미노산 용액의 분산안정성 평가 결과
- 유화제의 첨가 없이 pH 3과 6의 phosphate buffer용액에 용해한 분지아미노산을

microfluidizer에 통과시켜 제조한 대조군과 비교하여 보면 pH 3의 경우 거의 모든 시료에서 2시간 이내에 대조군보다 낮은 분산안정성을 나타내고 있음. 반면에 pH 6에서 대조군과 각 유화제 첨가 분지아미노산 용액을 보면 Span 80과 lysolecithin은 pH 3에서의 결과와 유사하게 대부분의 시료에서 분산안정성이 대조군보다 낮음을 알 수 있음. 하지만 pH 6에서 Tween 80은 유화제의 첨가에 따른 분산안정성 향상을 확인함.

- Tween 80을 제외한 Span 80이나 lysolecithin은 유화제 첨가에 따른 분산안정성 향상시키는 일반적인 경향성은 나타나지 않음. 하지만 lysolecithin을 첨가한 분지아미노산 용액 중 일부의 시료에서 대조군에 비해 향상된 분산안정성을 보여주고 있음. 또한 유화제의 농도에 따른 분산안정성을 보면 Tween 80은 pH 3에서 농도가 높을수록 분산안정성이 우수했으나 pH 6에서는 유의적 차이가 나타나지 않음. Span 80과 lysolecithin은 유화제의 농도에 따른 경향성을 보이지 않았으나 Span 80은 대체로 농도가 높을수록 분산안정성이 감소하는 결과를 보여주고 있음.

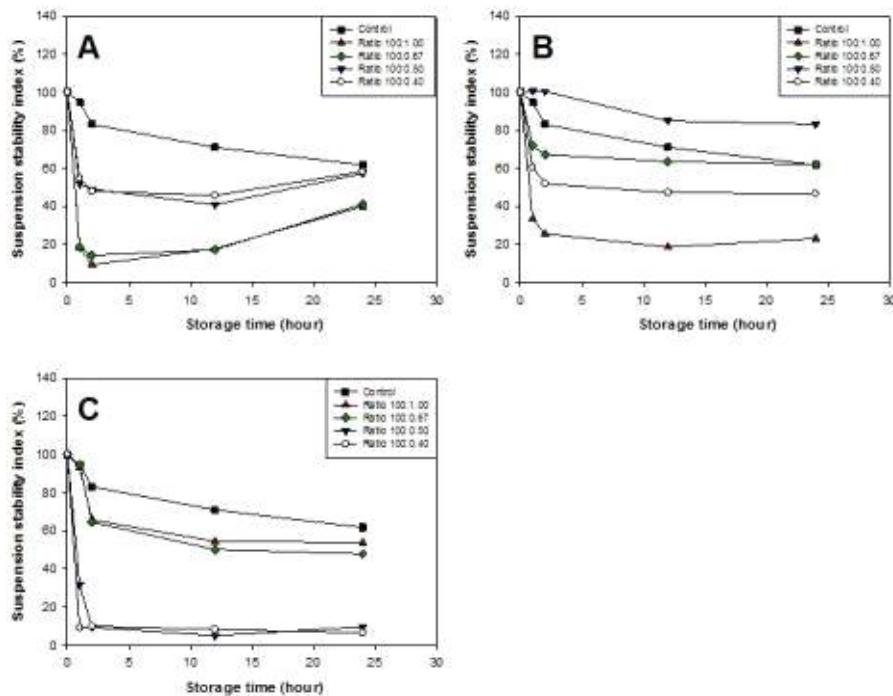


Figure 2-21. pH 3에서 5% BCAAs 분산안정성(A: Span 80, B: Lysolecithin, C: Tween 80, 25°C)



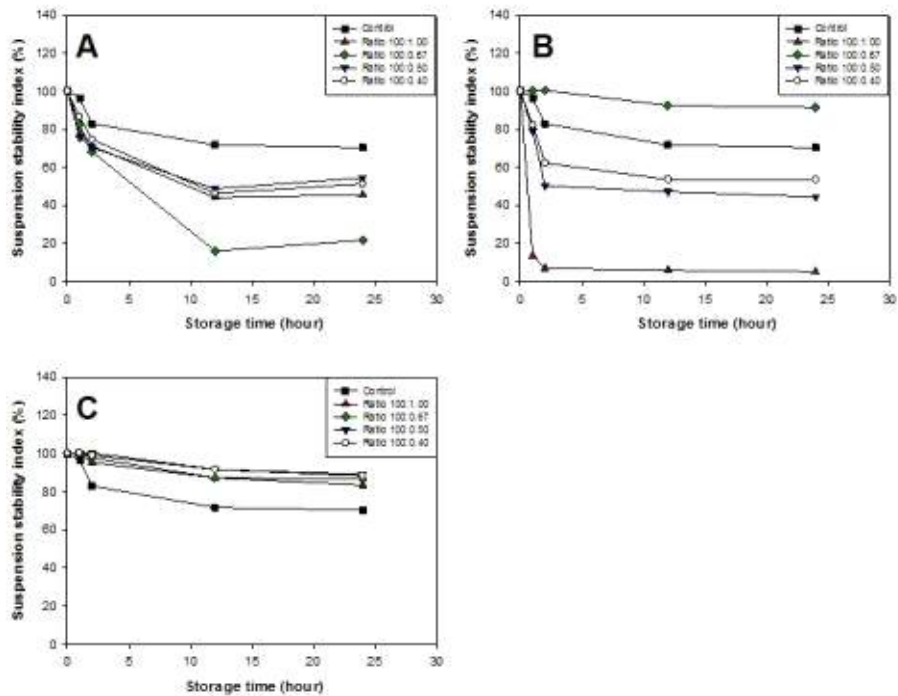


Figure 2-22. pH 6에서 5% BCAAs 분산안정성(A: Span 80, B: Lysolecithin, C: Tween 80, 25°C).

② Span 80의 수용액상에서의 안정성 조사

- HLB value가 낮은 Span 80은 수용액상에서 상당히 불안정한 것으로 알려져 있음. 뿐만 아니라 Turbiscan을 활용한 분산안정성 분석 중 낮은 pH에서 Span 80을 첨가한 용액에서 일정한 패턴을 나타내며 분산안정성이 감소하는 것을 보임. 따라서 Span 80 용액을 제조하여 Turbiscan 분석을 실행해본 결과 pH 3에서 시료 전반에 걸쳐 피크가 감소하는 것으로 나타남. 이는 Turbiscan에 사용되는 광원의 파장과 연관 지어 분석해 보면 광원으로 사용되는 파장( $\lambda = 880 \text{ nm}$ )보다 매우 작은 약 600 nm이하의 입자 크기를 나타내다가 전반적인 입자 크기의 증가로 600 nm 이상의 크기로 입자가 응집되어 투과광과 산란광 모두 감소하는 결과를 나타낸 것으로 추측됨. 즉, 수용액상에서 Span 80은 입자 응집으로 인한 안정성이 감소하는 결과를 나타내며 특히 pH가 낮을수록 그 안정성은 더욱 감소함.

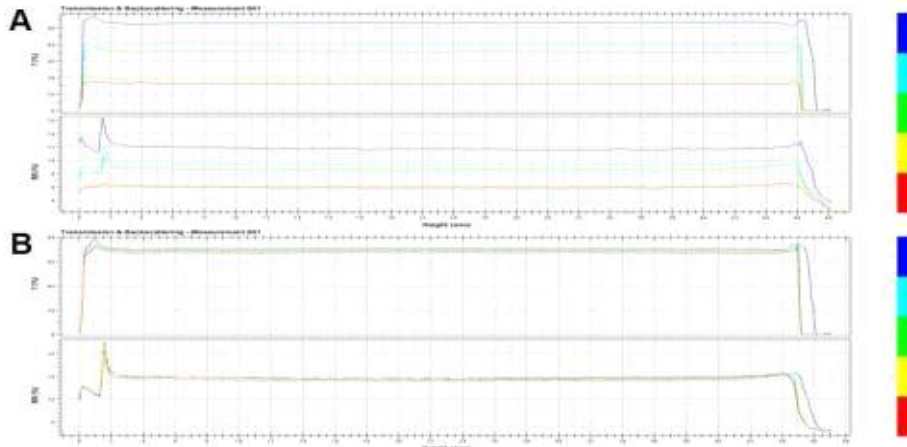


Figure 2-23. pH 3, 6에서 Span 80의 분산안정성(A: pH 3, B: pH 6, 25°C).

#### 다. 나노/마이크로에멀전 제조 기술을 통하여 가용화된 분지아미노산의 안정성 평가

(1) 분지아미노산을 함유한 나노/마이크로에멀전의 분산안정성 향상 방법 탐색

(가) 분지아미노산의 이화학적 특성에 근거한 최적 분산안정제 탐색

##### ① Biopolymer 분산안정제 탐색

- 2차년도 연구에서 활용한 계면활성제 계열의 분산안정제와 물리·화학적인 분산안정성 향상 방법이 다른 biopolymer 계열의 분산안정제를 탐색함.
- 계면활성제 계열의 분산안정제는 주로 입자간 정전기적 반발력을 이용하여 입자의 응집 및 융합을 방해함으로써 분산안정성을 향상할 수 있으나, 계면활성제를 고농도 첨가 시 다량의 거품 발생으로 균일한 분지아미노산 용액의 제형확보에 어려움을 야기함.
- Biopolymer는 입자와 입자 사이의 공간적 제약 혹은 입자의 운동성을 저하시킴으로써 분산안정성을 향상시킬 수 있으며, biopolymer를 gum 및 protein으로 분류함.
- gum에서 carrageenan 및 xanthan은 물리·화학적 특성인 점도에 의한 분산입자의 운동성 저해를 통한 입자 응집 및 융합 방해기작을 이용하여 분지아미노산의 분산안정성을 확보할 수 있음.
- protein에서 sodium caseinate, soy bean protein isolated 및 whey protein isolated는 입체 구조적 특성을 통한 분산입자의 응집 방해 및 protein의 열변성에 의한 구조 변이로 노출되는 double sulfide bond와 분지아미노산 간의 소수성결합을 통해 분산안정성을 향상시킬 수 있음.
- 확립한 제조공정을 활용하여 분지아미노산을 고농도 가용화하여 최적 분산안정제를 선정함.

(나) 나노/마이크로에멀전의 용해도 향상 효과 증대를 위한 최적 분산안정제 탐색

① 분지아미노산 가용 농도 설정

- 2차 년도 실험 결과에 따라 확립된 고농도 분지아미노산 용액 제조에 의한 최대 가용 농도는 5% 내외로 확인함.
- 분지아미노산 5% 이상의 농도에서 투여한 분지아미노산의 류신, 이소류신 및 발린의 첨가 비율(류신 : 이소류신 : 발린 = 2 : 1 : 1)이 유지되지 못함.
- 제조 공정 중 phosphate buffer solution을 citrate buffer solution으로 교체하여 분지아미노산의 쓴맛에 대한 마스킹이 가능할 수 있음.
- 기존의 제조 공정 유지 하여 분산안정제의 분지아미노산에 대한 용해도 및 분산안정성을 비교분석하여 평가함.

② 분지아미노산과 biopolymer 혼합 최적 조건 탐색

- 2차 년도에서 계면활성제계열의 안정제의 비율은 계면활성제의 특성상 다량의 거품이 발생하여 고농도 첨가에 따른 제형의 균일한 생산을 유도할 수 없었지만, biopolymer 계열에서는 계면활성제보다 높은 농도의 첨가가 가능하며, 계면활성제와 같이 법적인 허용첨가량이 일정수준 이하로 정해져있지 않고, 첨가량이 자유로운 측면이 있음.
- 공정 가능한 최대 농도를 설정하여, 고농도 분지아미노산 용액 제조함(Table 2-4).

Table 2-4. 분지아미노산과 분산안정제의 비율에 따른 분산안정제 첨가 농도

BCAAs : Stabilizer ratio (w : w)	BCAAs concentration (%, w/w)	Stabilizer concentration (%, w/w)
200 : 1		0.025
200 : 2		0.050
200 : 4	5	0.100
200 : 8		0.200

(2) 분지아미노산을 함유한 나노/마이크로에멀전의 저장안정성 평가

(가) 분지아미노산 함유 나노/마이크로에멀전의 제조 방법, 용해도 분석 방법

① 분지아미노산 용액 제조 방법

- Citarate buffer solution을 pH 3, 6으로 제조 후, 선정된 4종의 biopolymer를 분지아미노산과의 비율(Table 2-4)에 따라 분지아미노산과 같이 2시간동안 실온에서 교반함.
- 70°C로 가열하며, 고압균질기의 물리적인 힘(cavitation, collision, shearing)을 이용하여 100 MPa로 5회 반복 통과시켜 고농도의 분지아미노산 용액을 제조함.

② 분지아미노산 용액의 용해도 분석 방법

- 분지아미노산 용액의 용해도 측정을 위해 HPLC를 활용하여, OPA(*o*-phthalaldehyde and  $\beta$ -mercaptopropionic acid) 시약을 이용한 아미노산 정량을 함. OPA 형광유도체화법에 의해 형광을 띄는 물질이 유도체화된 아미노산 산물은 338 nm 파장에서 최대 흡수파장으로 보고됨.
- 분지아미노산 용액 내에 존재하는 결정을 이루는 입자를 제거하기 위해 0.2  $\mu$ m pore size filter를 이용하여 제거 후, 맑은 용액부위를 채취하여 용해도를 측정함.

Table 2-5. 분지아미노산 용해도 측정을 위한 HPLC 작동 조건

HPLC	Operation condition
Detector	UV 338 nm
Column	ZORBAX Eclipse AAA 4.6 $\times$ 150 nm, 3.5 $\mu$ m
Oven temp.	40°C
Mobile phase	A: 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.8)
	B: Acetonitrile : methanol : water(45 : 45 : 10)
Flow	2 mL/min
Injection	Using autosampler

Table 2-6. 분지아미노산 용해도 측정을 위한 HPLC 주입 순서

#	Injection program
1	Draw 2.5 $\mu$ L of borate buffer
2	Draw 0.5 $\mu$ L of sample
3	Mix 3.0 $\mu$ L, "in air", max speed 2x
4	Wait 0.5 min
5	Draw 0.0 $\mu$ L of water(for needle washing), 2x
6	Draw 0.5 $\mu$ L of OPA
7	Mix 3.5 $\mu$ L, "in air", max speed 6x
8	Draw 0.0 $\mu$ L of water(for needle washing), 2x
9	Draw 32.0 $\mu$ L of water
10	Mix 18.0 $\mu$ L, "in air", max speed 2x
11	Inject

(나) 분지아미노산 함유 나노/마이크로에멀전의 용해도 분석 결과

① 분산안정제의 종류에 따른 분지아미노산의 용해도 관찰 결과

- Gum류 2종과 protein류 3종의 분산안정제 첨가에 따른 분지아미노산의 용해도를 관찰함.
- Gum류에서 분지아미노산의 초기용해도는 4.80~4.90%로 관찰함.
- protein류에서는 4.95% 내외로 보다 높은 초기용해도를 보이고 있음. protein류의 일부 아미노산의 유리에 따른 분지아미노산 용해도 증가는 관찰되지 않음.
- 초기용해도의 경우 분산안정제의 첨가보다 고압균질기의 활용에 따른 고농도 가용화가 주원인으로 추측됨.
- Gum류는 초기용해도를 유지할 수 있는 분산안정제의 능력이 계면활성제 계열의 분산안정제보다 유효하지 못함. 이는 계면활성제 계열 분산안정제의 물리화학적 특성에 의한 용해도 향상효과가 biopolymer의 특성에 따른 용해도 향상효과보다 우수함을 의미함. 하지만 첨가된 분산안정제의 분자 구조나 이화학적인 특성과 분지아미노산의 용해도 향상간의 상관관계를 증명하기 위한 명확한 근거는 밝히지 못함.
- Gum류의 첨가에 따른 분지아미노산의 용해도유지효과는 본 연구에서 수행한 다양한 분산안정제의 첨가에 따른 분지아미노산의 용해도유지효과보다 유의적인 차이로 낮은 것으로 확인됨.
- Protein류 첨가에 따른 분지아미노산의 초기용해도를 유지하는 능력은 계면활성제 계열의 분산안정제 및 gum류 보다 우수한 것으로 나타남. 이러한 결과는 protein류의 변성으로 인한 내부 이황화결합이 노출로 입자간 소수성결합이 원인인 것으로 추측됨.
- 본 연구에서 수행한 다양한 분산안정제 중 protein류의 분산안정제가 가장 우수한 용해도유지효과를 갖는 것으로 나타남.

② pH에 따른 분지아미노산의 용해도와 분산안정제간의 상관관계 관찰 결과

- 일반적으로 gum류의 경우 carrageenan과 xanthan이 식품으로 사용할 수 있는 대부분의 pH구간에서 안정적임에 따라 대부분의 제형에서 pH 3, 6간의 유의적인 차이는 없었으며, pH에 비 의존적인 경향성을 나타내고 있으나, protein류의 경우 Sodium caseinate, SPI 및 WPI가 pH 4 부근에서 등전점을 형성함에 따라 pH에 일부 의존적인 경향성을 나타내고 있음.

③ 첨가된 분산안정제의 농도에 따른 분지아미노산의 용해도 관찰 결과

- 본 연구에서 사용한 모든 분산안정제의 첨가농도에 따른 분지아미노산의 초기용해도에 대한 유의적인 차이가 없음.
- Carrageenan을 첨가한 분지아미노산 용액은 분산안정제의 농도 증가에 따른 분지아미노산 용해도유지효과에 유의적인 차이가 없음. 또한, xanthan을 첨가한 분지아미노산 용액은 분산안정제의 농도 증가에 따른 분지아미노산 용해도유지효과도 유의적인 차이가 없음. Carrageenan은 농도 별 점도의 차이가

유의적이지 못했으며, xanthan은 농도 별 점도의 차이가 발생함. 결과적으로 분산안정제 중 gum류에서 점도와 분지아미노산의 용해도유지효과간의 상관관계는 없으며, 점도가 분지아미노산의 용해도에 직접적인 연관성이 없음을 증명함.

- Sodium caseinate, SPI 및 WPI는 분지아미노산의 용해도유지효과에 대해 pH 6에서는 분산안정제 첨가 농도 별 유의적 차이는 없으나, pH 3에서 sodium caseinate를 제외하고 분산안정제 첨가비율의 증가에 따라 분지아미노산의 초기용해도를 유지하는 효과도 증가하는 것을 관찰함.
- SPI와 WPI의 등전점 이하에서 분산안정제의 농도와 분지아미노산 용해도 유지와의 상관관계가 있을 것으로 추측되나, 용해도 유지에 대한 기작이 명확치 않음.
- 분지아미노산의 고농도 액상화에서 protein류의 분산안정제 첨가가 가장 좋은 용해도 향상 및 용해도 유지효과를 나타냈으며, 일반적으로 알려진 분지아미노산의 등전점 이하에서의 보다 높은 용해도를 갖는 성질과는 다른 경향성을 보이며 pH 6에서 보다 높은 용해도유지효과를 나타냄.

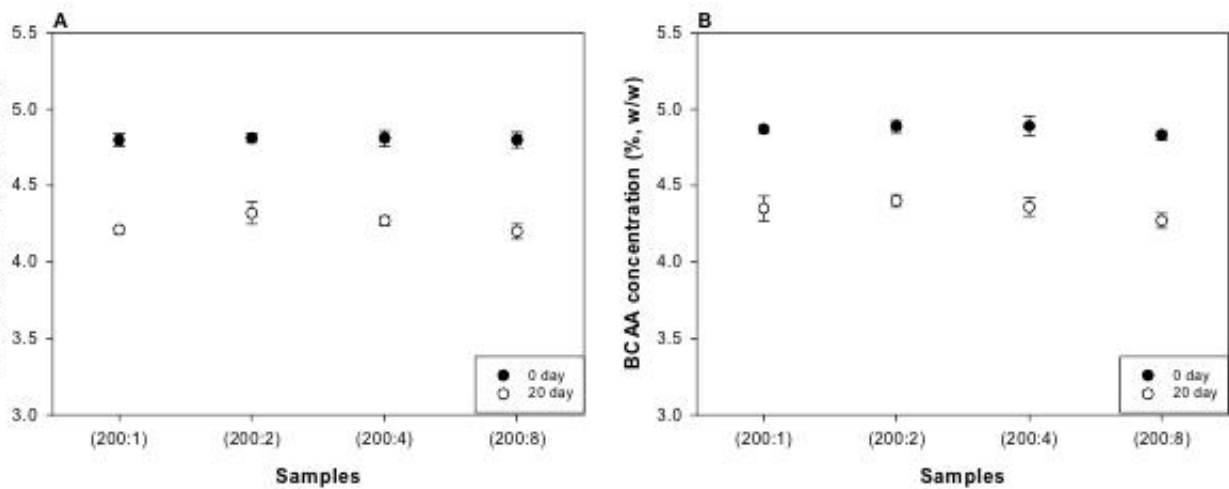


Figure 2-24. Carrageenan 첨가에 따른 분지아미노산의 용해도 변화(A: pH 3, B: pH 6).

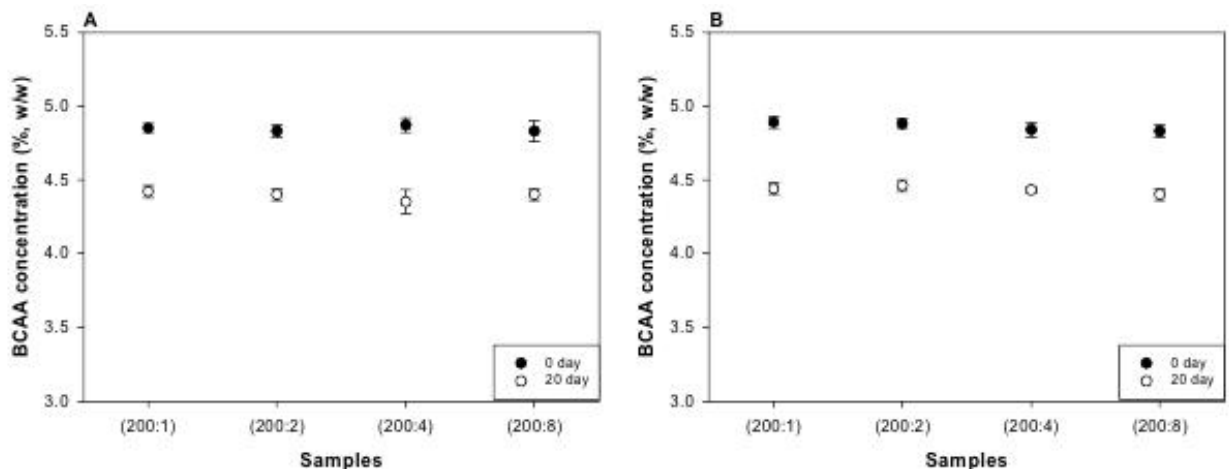


Figure 2-25. Xanthan 첨가에 따른 분지아미노산의 용해도 변화(A: pH 3, B: pH 6).

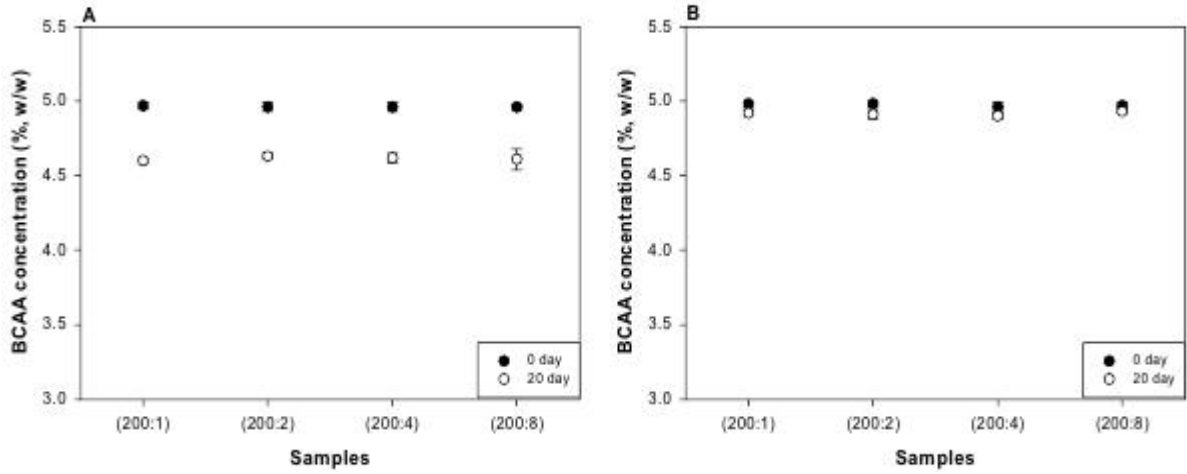


Figure 2-26. Sodium caseinate 첨가에 따른 분지아미노산의 용해도 변화(A: pH 3, B: pH 6).

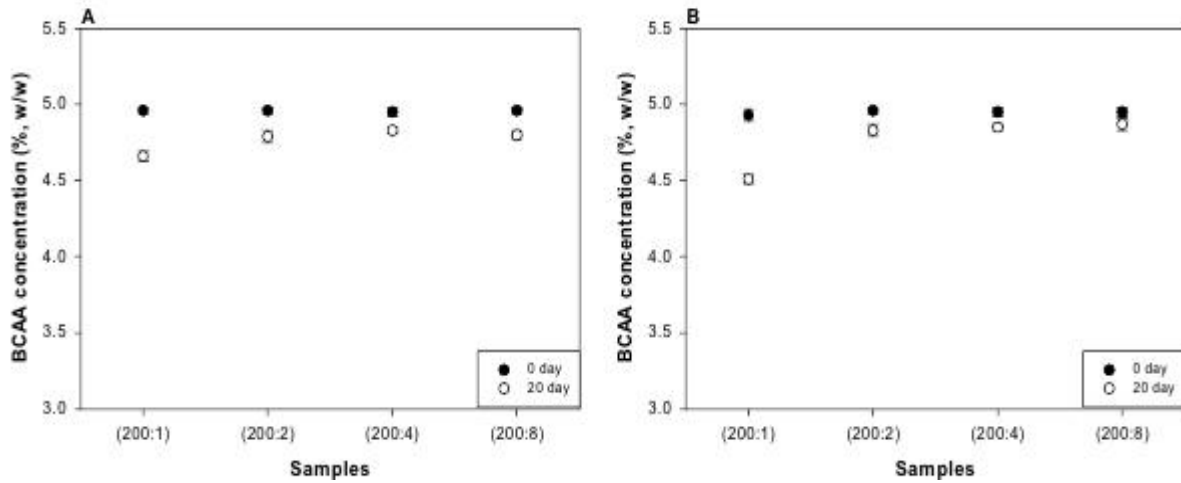


Figure 2-27. Soybean protein isolated 첨가에 따른 분지아미노산의 용해도 변화(A: pH 3, B: pH 6).

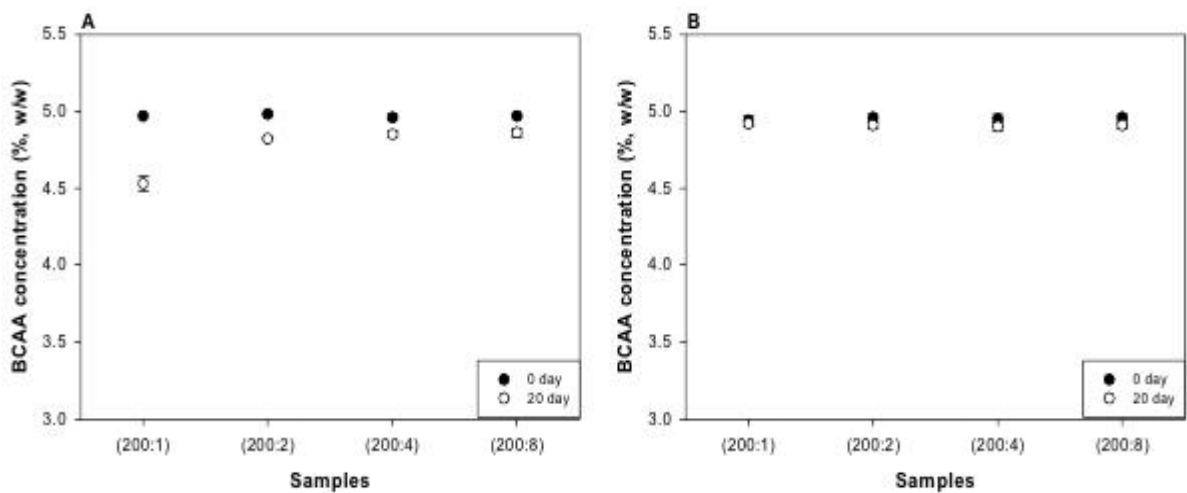


Figure 2-28. Whey protein isolated 첨가에 따른 분지아미노산의 용해도 변화(A: pH 3, B: pH 6).

(다) 분지아미노산 함유 나노/마이크로에멀전의 분산안정성 평가방법

① 분지아미노산 용액의 분산안정성 측정 방법

- 분지아미노산 함유한 나노/마이크로에멀전의 분산안정성을 측정하기 위해 광학장비 중 하나인 Turbiscan을 이용하여 분지아미노산 결정입자에 의한 광원의 산란과 투과율의 감소를 통해 입자의 응집, 융합 및 침전 등의 용액내 상태변화를 직접적으로 측정하여 이를 확인함.
- 제조한 고농도 분지아미노산 용액을 즉시 원통형 vial에 50 mm가 되도록 주입 후 근적외선 광원( $\lambda = 880 \text{ nm}$ )을 이용하여 25°C에서 투과광과 산란광의 세기를 측정함.

② 분지아미노산 함유 나노/마이크로에멀전의 분산안정지수 평가방법

- 측정한 분지아미노산 용액의 투과광과 산란광의 세기를 바탕으로 분산안정지수를 평가함.
- 2차 년도에 확립한 분산안정지수를 수정 보완하여 분산안정성 측정에 앞서 용액이 함유된 vial을 세 구간으로 분획(총 50 mm의 구간을 2~18, 18~34 및 34~50 mm로 구분)하고 각 구간의 투과율 평균을 계산하여 분지아미노산의 분산안정지수를 계산함. 각 구간의 투과율 변화를 관찰하여, 분산안정성의 변화와 분산안정제의 분지아미노산 용액에 대한 분산안정성 효과를 평가함.
- Figure 2-29와 같이 초기 용액의 투명성으로 인해 투명성은 높은 상태를 유지함. 하지만 시간의 경과 후 초기 상태를 유지한다면 높은 분산안정성을 나타내며, 반대로 입자의 침전에 의해 바닥부분의 투과율이 낮은 경우 혹은 전반적인 용액 전체가 투과율이 낮은 경우 분산안정성은 낮다고 평가할 수 있음.
- 결정입자의 생성과 성장으로 입자의 응집과 침전을 야기 시킬 수 있으며, 결정입자의 생성 속도가 빠를 경우 용액 내 전 구간에 걸쳐 투과율이 낮아지는 결과를 초래하여 분산안정성이 감소할 수 있음. 또한 결정입자의 성장속도가 빠를 경우 입자의 크기가 증가하여 결과적으로 침전에 이르게 되고 큰 결정입자가 하부에 결착하여 하부에 낮은 투과율로 분산안정성이 감소함.
- 초기 용액의 투명성이 보장되어야한다는 단점이 있으나, 현재 분산안정성을 평가할 수 있는 적절한 방법을 탐색하지 못함. 추가적인 연구를 통해 단점을 보완 할 수 있는 방안을 마련해야할 것으로 사료됨.



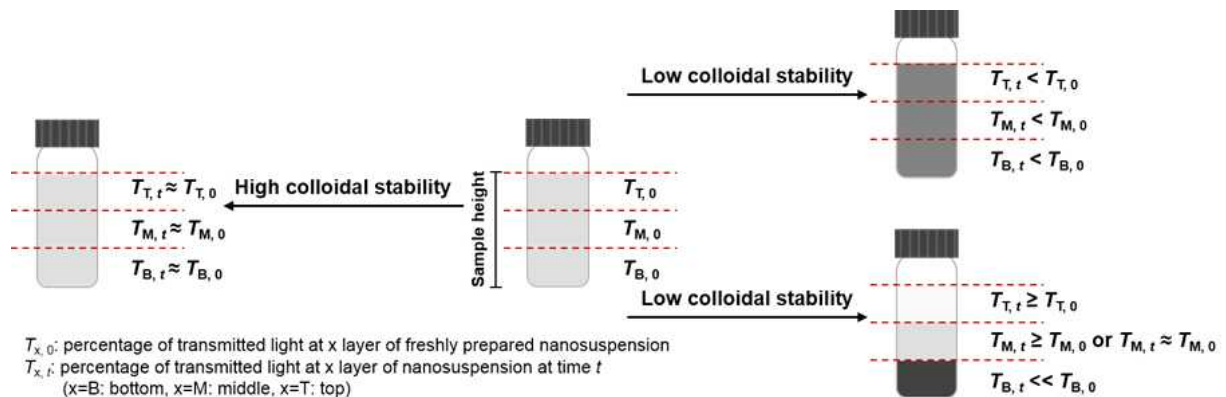


Figure 2-29. 분산안정지수 평가 방법 모식도.

(라) 분지아미노산 함유 나노/마이크로에멀전의 분산안정성 평가 결과

① 분산안정제의 종류에 따른 분지아미노산 용액의 분산안정성 평가 결과

- Gum류의 경우 낮은 분산안정성을 관찰하였으며, 제형의 전 구간에서 낮은 분산안정성이 나타났음. 하지만 protein류의 경우 초기 탁도의 증가로 인한 낮은 분산안정성으로 나타날 수 있으나, 초기 시간 이후 대부분의 시간대에서 높은 분산안정성을 나타냄.
- Gum류는 분지아미노산 용액의 분산안정성을 향상시킬 수 있는 분산안정제의 능력이 계면활성제 계열의 분산안정제보다 유효하지 못함을 관찰함. 이는 계면활성제 계열의 분산안정제의 물리화학적 특성인 정전기적 반발력 및 높은 친수성에 의한 분산안정성이 biopolymer의 입자간의 공간적 제약 혹은 입자의 운동성을 감소시킴에 의한 분산안정성보다 우수함을 의미함.
- Protein류는 분지아미노산 용액의 분산안정성을 높일 수 있는 능력을 갖고 있으며, 열변성을 통한 소수성결합 및 공간적 제약이 그 주된 원인으로 예측됨.

② pH에 따른 분지아미노산 용액의 분산안정성과 분산안정제간의 상관관계 관찰 결과

- Gum류 및 protein류에서 pH 3에서 pH 6에서보다 낮은 분산안정성을 나타내고 있음.
- Gum류의 경우 낮은 첨가 농도의 제형을 비교해보면, 분지아미노산 용액의 안정성이 pH에 보다 의존적인 것으로 나타났으며, 이와는 반대로 높은 첨가 농도에서는 점차적으로 pH에 비 의존적인 것으로 나타남. gum류의 점도보다 gum류의 높은 pH 안정성이 이와 같은 결과를 초래한 것으로 예측되며, 분지아미노산의 영향이 보다 높은 것으로 판단됨.
- Protein류에서 분지아미노산의 분산안정성은 모든 제형에서 농도 및 분산안정제의 종류와 무관하게 pH에 의존적인 것으로 나타나며, 이는 단백질 특유의 등전점이 큰 영향을 미친 것으로 사료됨.
- pH 3에서 Protein류는 초기 낮은 투과율이 나타나지만 시간의 경과에 따라 다시 높은 투과율을 회복하는 것을 볼 수 있으며, 바닥부분의 약간의 침전이 발생하지만 본 연구에서 확립한 분산안정지수가 구간 별 평균값으로 산출되어 정확히 반영되지

못한 결과로 추후 지속적인 보완이 요구됨.

- 결과적으로 biopolymer계열 혹은 계면활성제 계열의 분산안정제 사용에 있어서, 분산안정제가 이온화 할 수 있는 능력이 있거나, pH의 변화에 따라 구조적 혹은 물리화학적 성질이 변할 경우 필연적으로 이를 첨가한 용액의 분산안정성은 pH에 의존적일 수밖에 없음.
- 양/음이온성 계면활성제 혹은 protein류의 분산안정제는 일반적으로 pH에 의존적으로 나타날 것으로 예측할 수 있으며, polysaccharide 중 대부분의 pH구간에서 분자의 전위가 중성을 유지하는 경우 pH에 비 의존적일 것으로 추측할 수 있음.

③ 첨가된 분산안정제의 농도에 따른 분지아미노산 용액의 분산안정성 관찰 결과

- Gum류는 농도와 pH의 상관관계에 의해 분지아미노산 용액의 분산안정성이 영향을 받을 수 있으며, 그에 따라 첨가된 분산안정제의 농도에 대한 의존성이 유의적으로 나타나고 있음.
- 연구 수행 초기 예상했던 Gum류의 점도의 증가에 의한 분지아미노산 결정입자의 운동성 감소로 입자간 응집 방해 효과는 없는 것을 관찰함. 또한, 점도의 증가는 분지아미노산 용액의 분산안정성을 감소시키는 경향을 나타냄. 이는 초기 분지아미노산의 용해도에 대비하여 그 용해도에 대한 유지효과가 매우 낮았던 현상과 같은 기작일 것으로 예측됨.
- Protein류의 경우 pH 6에서는 농도에 따른 분산안정성에 대한 유의적인 차이가 나타나지 않지만(SPI 농도 비율 200:1을 제외하고), 단백질의 등전점에 기인하여, pH 3에서는 첨가 비율이 높을수록 더 낮은 분산안정성을 나타냄.

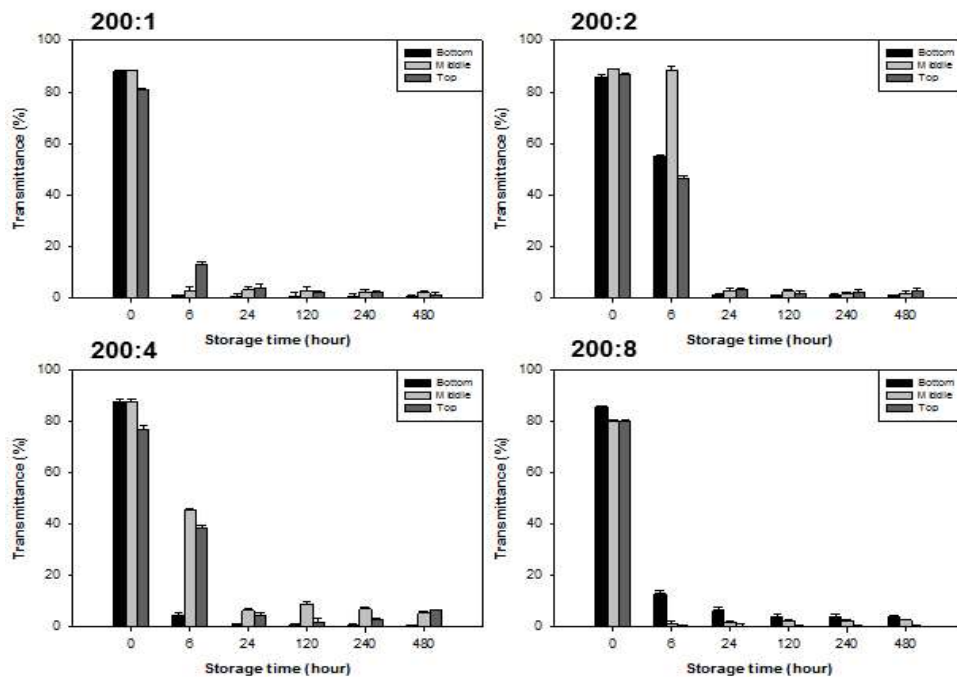


Figure 2-30. Carrageenan 첨가에 따른 pH 3에서 분지아미노산 용액의 분산안정성.

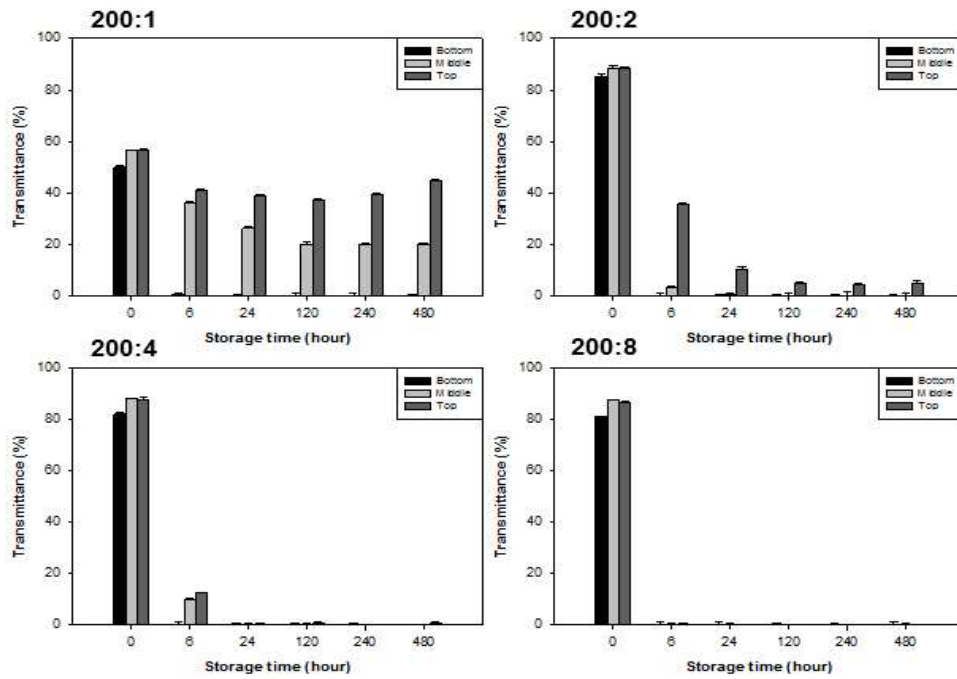


Figure 2-31. Carrageenan 첨가에 따른 pH 6에서 분지아미노산 용액의 분산안정성.

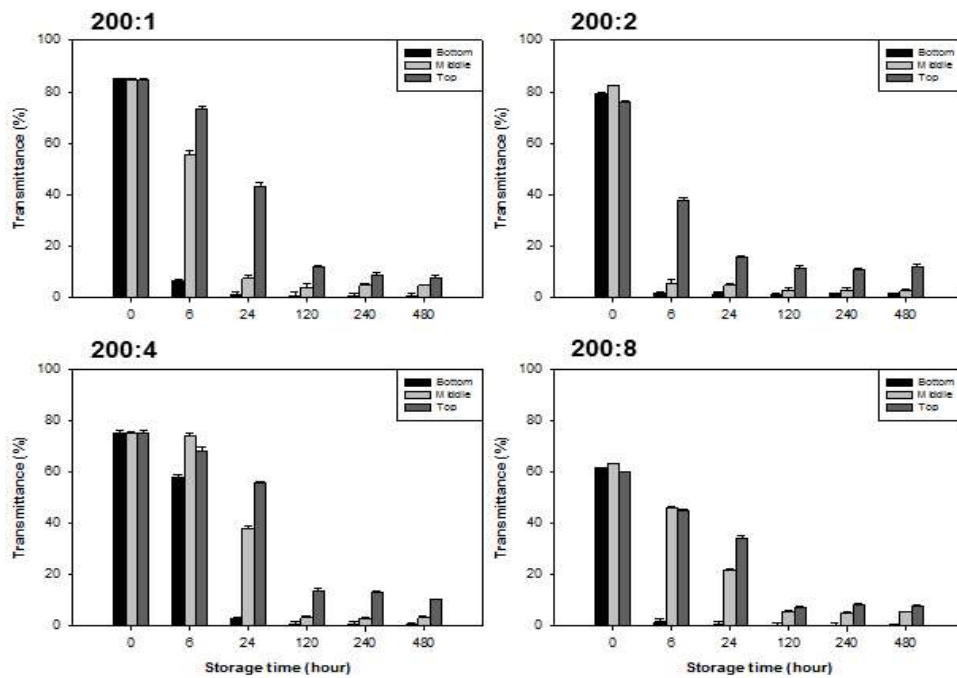


Figure 2-32. Xanthan 첨가에 따른 pH 3에서 분지아미노산 용액의 분산안정성.

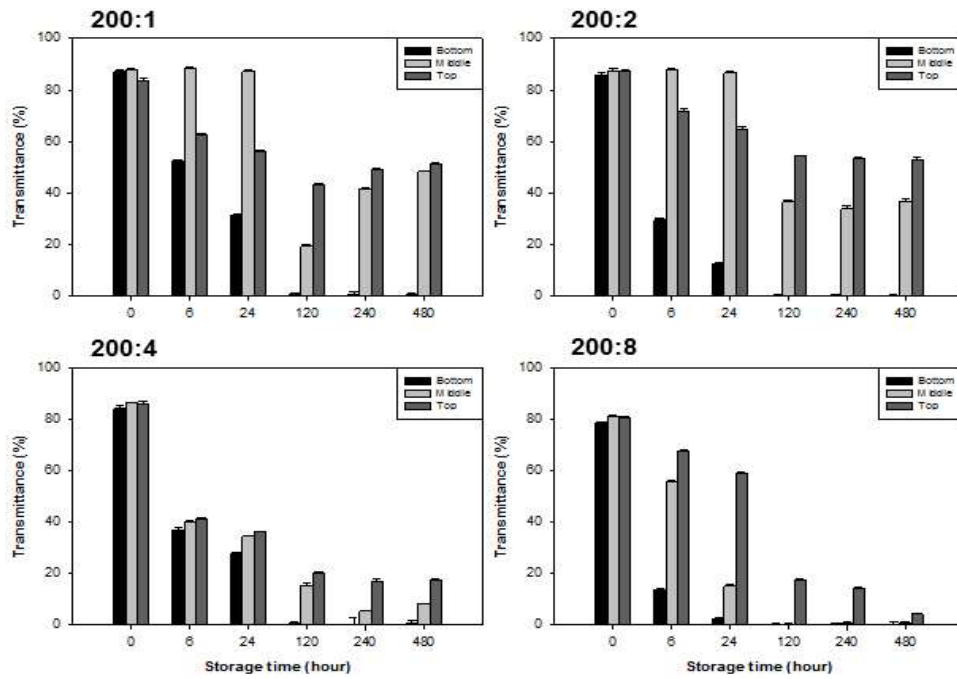


Figure 2-33. Xanthan 첨가에 따른 pH 6에서 분지아미노산 용액의 분산안정성.

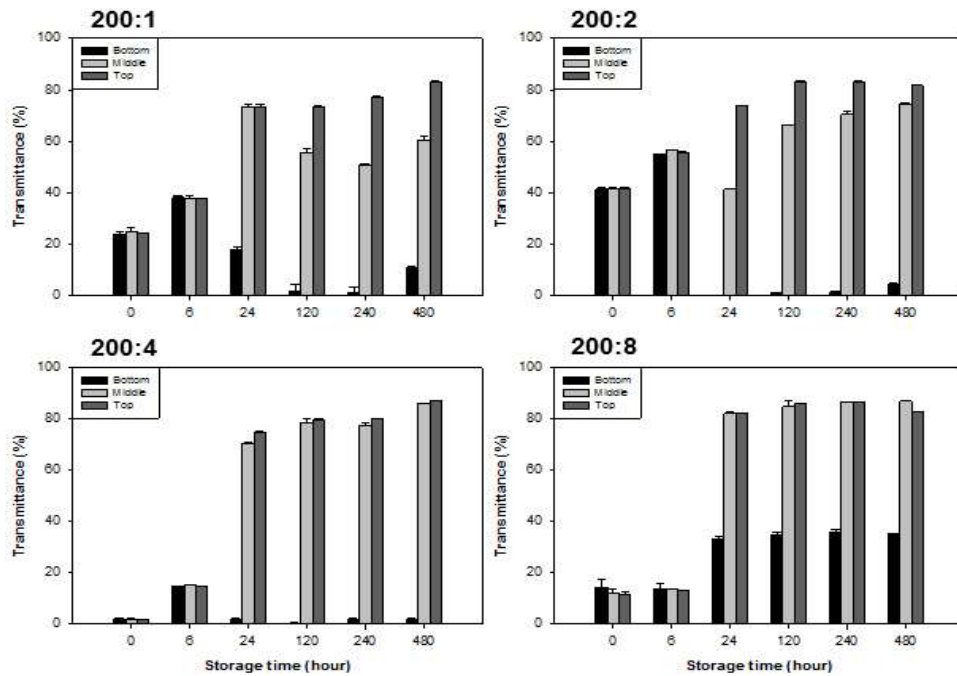


Figure 2-34. Sodium caseinate 첨가에 따른 pH 3에서 분지아미노산 용액의 분산안정성.

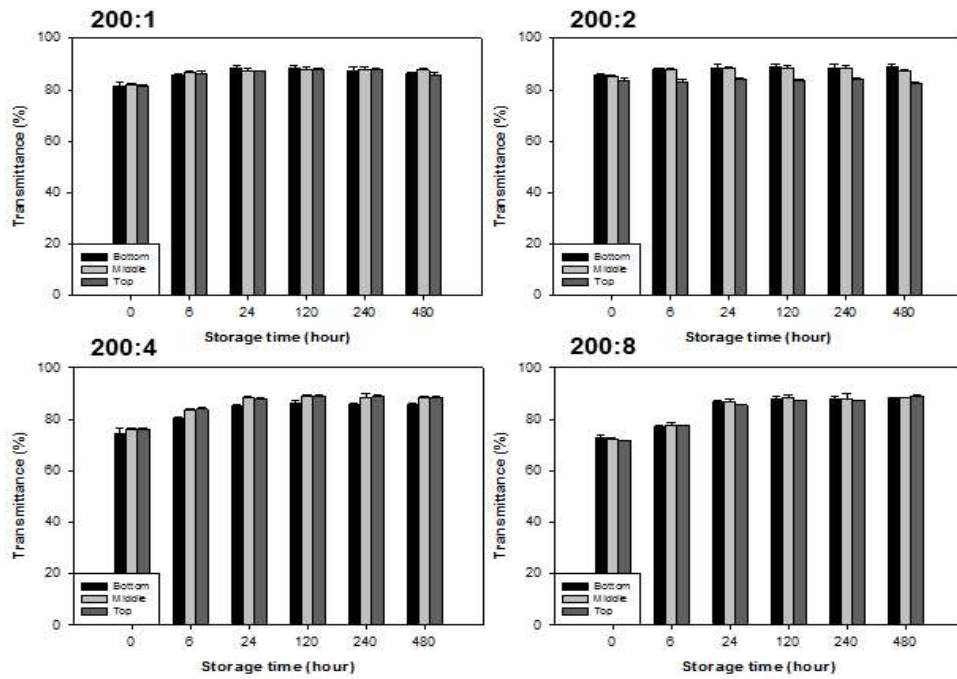


Figure 2-35. Sodium caseinate 첨가에 따른 pH 6에서 분지아미노산 용액의 분산안정성.

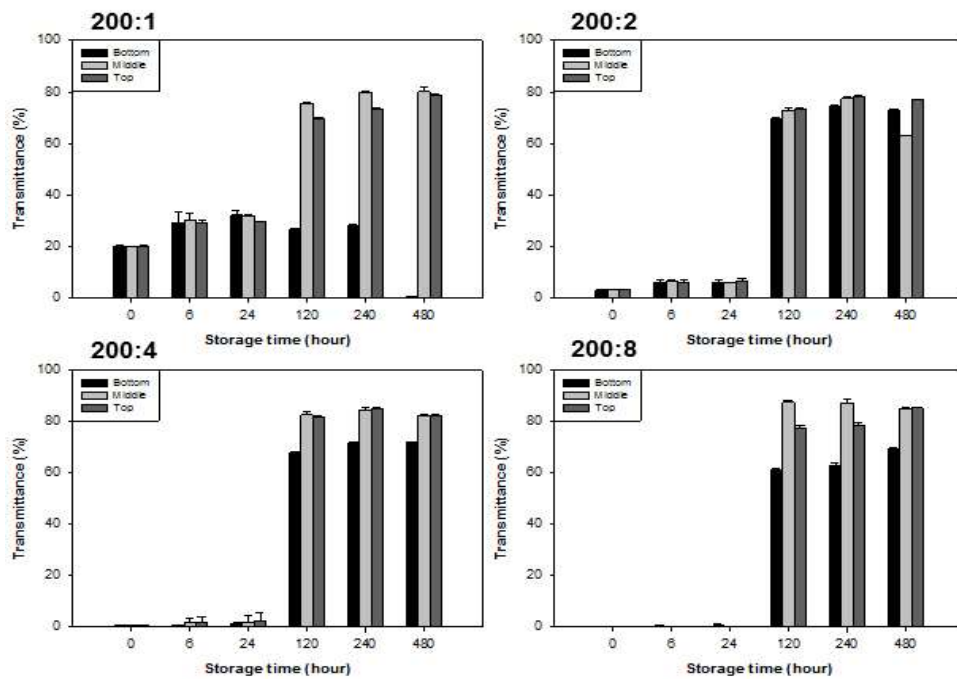


Figure 2-36. SPI 첨가에 따른 pH 3에서 분지아미노산 용액의 분산안정성.

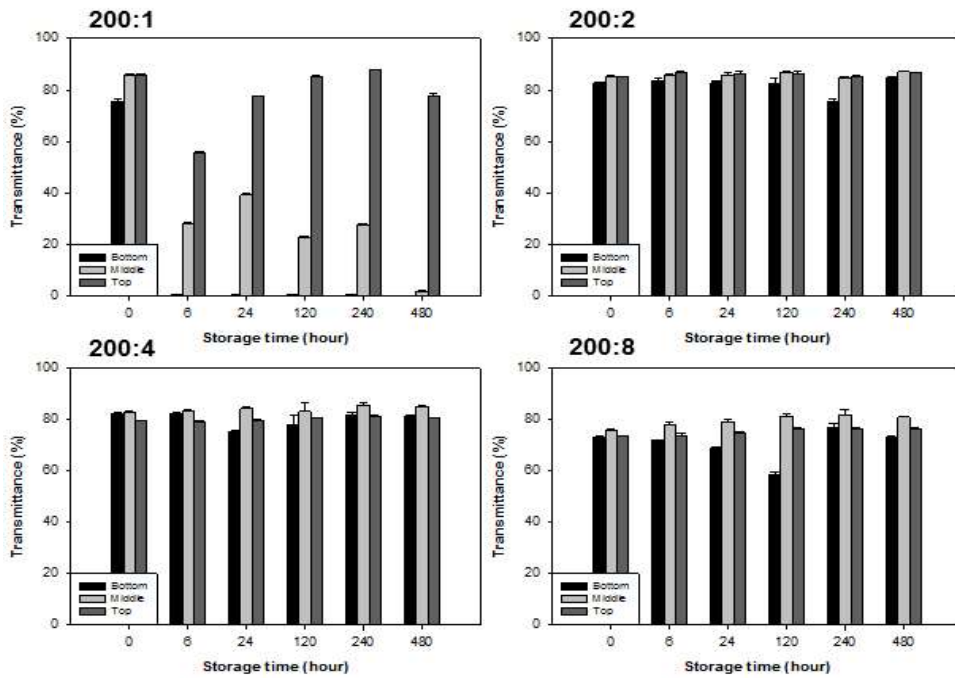


Figure 2-37. SPI 첨가에 따른 pH 6에서 분지아미노산 용액의 분산안정성.

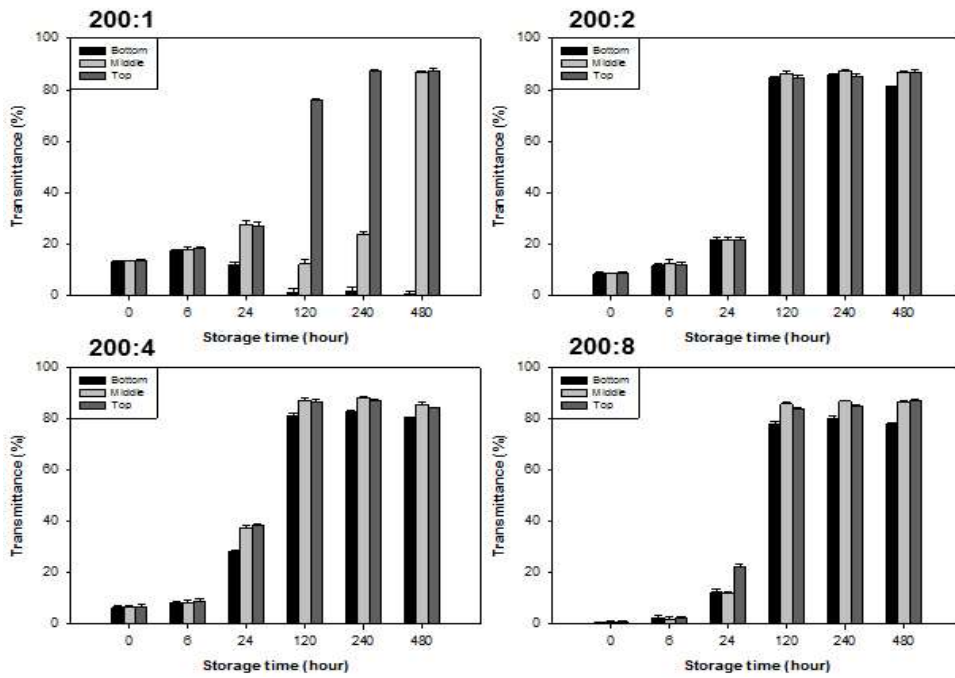


Figure 2-38. WPI 첨가에 따른 pH 3에서 분지아미노산 용액의 분산안정성.

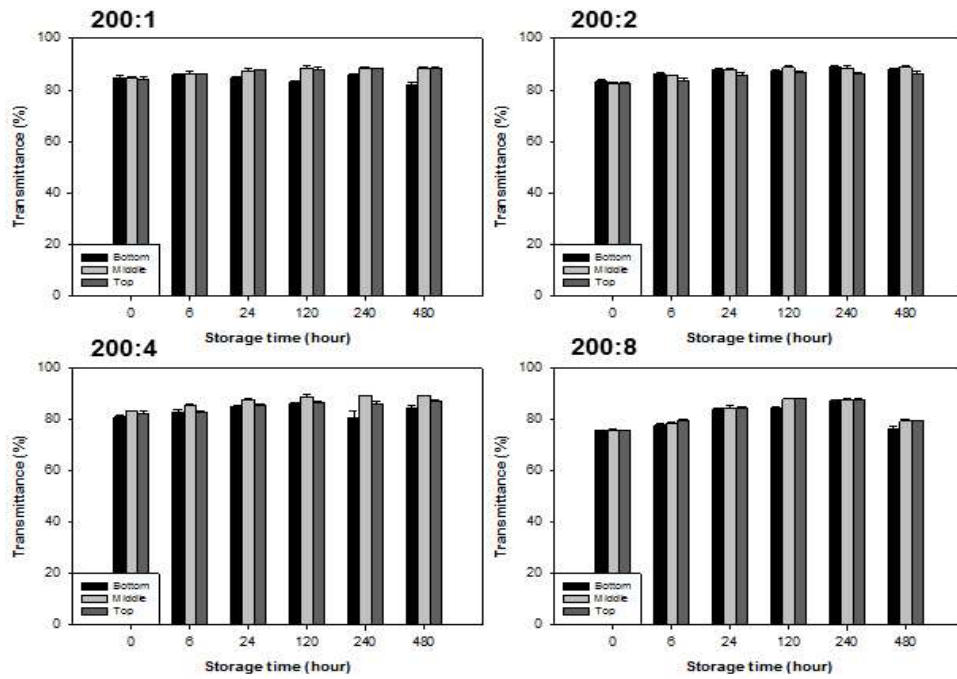


Figure 2-39. WPI 첨가에 따른 pH 6에서 분지아미노산 용액의 분산안정성.

### 3. 분지아미노산의 분석법 확립 및 *in vitro* 및 *ex vivo* 상에서의 생리 활성

김중(2협동: 건국대학교 백현동)

#### 가. 분지아미노산의 분석법 확립

##### (1) 식품 첨가물 공전에 따른 분지아미노산의 분석

- 분지아미노산의 정확한 분석법을 확립하기 이전에 식품첨가물 공전에 명시되어 있는 방법에 따라 분지아미노산의 분석을 실시함. 각각의 분지아미노산에 대한 분석법은 다음과 같음.
- Leucine 0.4 g을 정밀히 달아 개미산 3 mL 및 빙초산 50 mL을 가하여 녹인 다음, 0.1 N 과염소산용액으로 적정함(지시약: 크리스탈바이올렛 빙초산시약 2방울). 종말점은 반응액의 색이 청녹색으로 변하는 시점으로 함(0.1 N 과염소산용액 1 mL = 13.12 mg leucine).
- Valine 0.15 g을 개미산 3 mL에 녹이고, 빙초산 50 mL을 가하여 0.1 N 과염소산용액으로 적정(지시약: 시약:  $\alpha$ -나프톨벤제인시약 0.5 mL), 종말점은 반응액의 갈색이 녹색으로 변하는 시점으로 함(0.1 N 과염소산용액 1 mL = 11.71 mg valine).
- Isoleucine 0.3 g을 정밀히 달아 빙초산 50 mL에 가열하여 녹이고 식힌 다음 0.1 N 과염소산용액으로 적정(지시약:  $\alpha$ -나프톨벤제인시약 10방울), 종말점은 반응액의 갈색이 녹색으로 변하는 시점으로 함(0.1 N 과염소산용액 1 mL = 13.12 mg isoleucine).
- 각각의 분지아미노산 20, 40, 60 mg/mL의 농도로 분석을 진행하였으며, 그 결과는 Table 3-1에 나타냄.

Table 3-1. 식품첨가물공전에 따른 분지아미노산 농도 분석

Samples		Perchloric acid solution	Colorimetric assay
Leucine	20 mg/mL	1.6 mL	$(1.6 \times 13.12)/20 = 1.05$
	40 mg/mL	3.5 mL	$(3.5 \times 13.12)/40 = 1.15$
	60 mg/mL	5.0 mL	$(5.0 \times 13.12)/60 = 1.09$
Valine	20 mg/mL	1.9 mL	$(1.9 \times 11.71)/20 = 1.11$
	40 mg/mL	3.2 mL	$(3.2 \times 11.71)/40 = 0.93$
	60 mg/mL	5.6 mL	$(5.6 \times 11.71)/60 = 1.09$
Isoleucine	20 mg/mL	1.6 mL	$(1.6 \times 13.12)/20 = 1.05$
	40 mg/mL	3.8 mL	$(3.8 \times 13.12)/40 = 1.26$
	60 mg/mL	5.0 mL	$(5.0 \times 13.12)/60 = 1.09$

- 식품첨가물공전에 명시되어 있는 분지아미노산의 분석법은 지시약을 이용한 적정법으로 분석에 있어 적정점에 대한 주관의 개입에 따른 오차가 발생할 수 있는 분석법임.
- 실험에 사용한 분지아미노산은 모두 순도 95%(HPLC grade)가 넘는 시약이며 분석 결과 적정결과를 환산한 값이 100%를 넘는 값(valine 40 mg/mL = 93%)을 보이는 것을 확인함.
- 위에서 언급한 것처럼 적정을 통한 비색정량법이기에 때문에 정확도가 떨어져 위와 같은 결과가 나왔을 것이라 사료됨.



- 따라서 과제를 진행함에 있어 보다 정확한 분석법을 확립하기 위하여 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)를 이용해 분석을 진행함.

(2) HPLC를 이용한 분지아미노산 분석

- 식품첨가물 공전을 통한 분지아미노산의 적정 분석 방법보다 정확한 분석을 위해 HPLC를 이용한 분석법을 진행하였다. 사용한 컬럼과 컬럼 온도, 이동상의 조성, 유속 등 분지아미노산 분석을 위한 HPLC 조작 조건은 Table 3-2에 나타냄.

Table 3-2. 분지아미노산 분석을 위한 HPLC 조작 조건

HPLC	세부 조작 조건
Detector	UV 338 nm, 262 nm
Column	ZORBAX Eclipse AAA 4.6 × 150 mm, 3.5 μm PN 963400-902
Oven temp.	40℃
Mobile phase	A: 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.8 B: ACN:MeOH:water(45:45:10, v/v)
Flow rate	2 mL/min
Injection	Using autosampler

- 분지아미노산을 포함한 대부분의 아미노산은 single bond로 이루어져 있어 UV/Vis 파장에서 흡광이 없기 때문에(tryptophane, tyrosine, phenylalanine 예외), 형광 유도체화 과정을 거쳐야만 분석이 가능함.
- 따라서 본 연구팀은 분지아미노산의 형광 유도체화 과정을 위해 OPA 유도체화 시약을 사용하였고, autosampler를 이용하여 유도체화 시킨 후 분석을 실시하였다. autosampler를 이용하여 유도체화 시키는 과정은 다음과 같음.
  - Draw 2.5 μL of borate buffer
  - Draw 0.5 μL of sample
  - Mix 3 μL, “in air”, max speed, 2×
  - Wait 0.5 min
  - Draw 0 μL of water(for needle washing)
  - Draw 0.5 μL of OPA
  - Mix 3.5 μL, “in air”, max speed, 6×
  - Draw 0 μL of water(for needle washing)
  - Draw 0.5 μL of water
  - Mix 4 μL, “in air”, max speed, 6×
  - Draw 32 μL of water
  - Mix 18 μL, “in air”, max speed, 2×
  - Injection

- 위와 같은 일련의 유도체화 과정과 HPLC 조건을 이용하여 분석을 실시함(Figure 3-1).

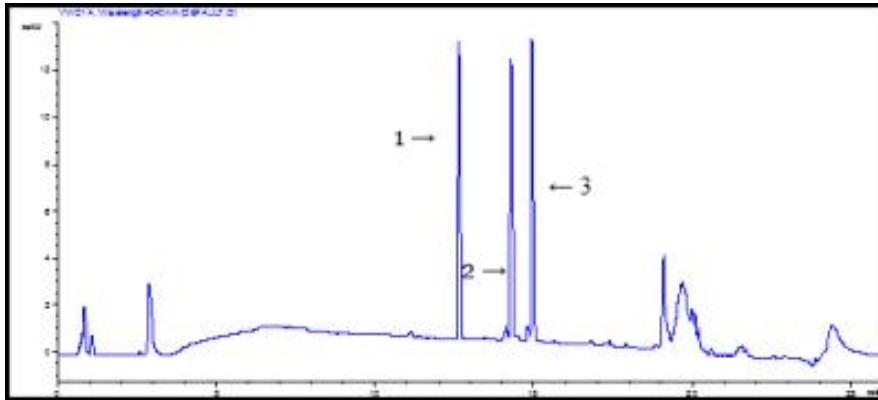


Figure 3-1. HPLC를 이용한 분지아미노산의 분석과 그 크로마토그램.

- Sigma-Aldrich에서 구입한 표준 물질인 leucine, valine, isoleucine이 2 mM씩 혼합된 sample을 분석한 결과로서, 3개의 주된 peak를 얻을 수 있었음.
- 첫 번째로 retention time 12.647분에 얻은 peak는 valine으로 peak의 높이는 12.71340 mAU, 면적은 54.637 mAU×s의 결과를 얻었고, 두 번째 retention time 14.300분에 얻은 peak는 isoleucine으로 peak의 높이는 12.05329 mAU, 면적은 51.044 mAU×s의 결과를 얻음.
- 마지막으로 retention time 14.964분에 얻은 peak는 leucine으로 peak의 높이는 12.90462 mAU, 면적은 54.005 mAU×s의 결과를 얻음.
- Sigma-Aldrich에서 구입한 HPLC grade의 분지아미노산 각각을 농도별로 제조하고, 위와 같은 유도체화 과정과 HPLC 조건에서 분석을 실시하고, 각 농도에 따른 peak의 높이를 이용하여 검정선의 회귀식을 도출함(Figure 3-2).
- HPLC를 이용하여 얻은 각 분지아미노산의 표준곡선의 회귀식
  - Valine 표준곡선의 회귀식  
 $y=115.58x + 1.3632, R^2=0.9986$
  - Isoleucine 표준곡선 회귀식  
 $y=105.81x + 1.1335, R^2=0.9988$
  - Leucine 표준곡선 회귀식  
 $y=99.048x + 3.5835, R^2=0.9966$
- 각 분지아미노산의 회귀식의 정확도와 직선성을 나타내는 값인  $R^2$  값이 모두 0.99 이상으로 분석한 농도 구간 내에서는 구해진 회귀식의 정확도가 높음.
- 각 표준곡선의 회귀식을 이용하여 제 1세부 기관과 제 1협동 기관으로부터 받은 시료의 분지아미노산을 분석하였다. 분석 결과는 Table 3-3에 나타냄.

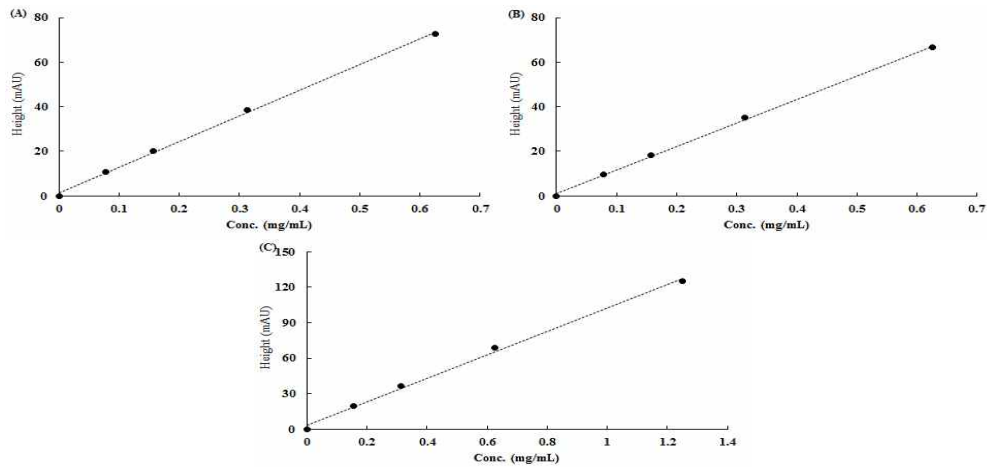


Figure 3-2. 분지아미노산의 표준곡선((A), Valine;(B), Isoleucine;(C) Leucine).

Table 3-3. 리포솜-담재 미세캡슐 및 나노/마이크로에멀전 기술을 통해 제조된 기능성 분지아미노산의 HPLC 분석 결과

Samples		Concentration(mg/mL)
제 1 세부기관 시료 (분지아미노산-봉입 리포솜)	Valine	0.637±0.004
	Isoleucine	0.607±0.006
	Leucine	1.432±0.005
	합계	2.676±0.016
제 1 협동기관 시료 (분지아미노산-에멀전, pH 4)	Valine	9.506±0.147
	Isoleucine	9.416±0.121
	Leucine	19.055±0.186
	합계	37.977±0.454
제 1 협동기관 시료 (분지아미노산-에멀전, pH 7)	Valine	9.342±0.478
	Isoleucine	9.268±0.541
	Leucine	18.914±0.996
	합계	37.524±2.015

- 제 1세부 기관으로부터 받은 분지아미노산 시료는 리포솜 내에 분지아미노산을 봉입한 타입의 시료로서 분석 전에 아미노산의 방출을 위해 리포솜을 파괴하는 단계를 거침.
- 끓는 물에서 10분간 중탕하여 리포솜을 파괴하고 4°C에서 식힌 후, 원심분리를 이용하여 증발되었던 수분을 포집하여 리포솜 내 봉입되어 있던 분지아미노산의 농도에 대해 HPLC 분석을 실시함.
- 분석 결과, valine이 0.637 mg/mL, isoleucine이 0.607 mg/mL, leucine이 1.432 mg/mL로 분석되어 분석 시료의 비율이 1:1:2(val:ile:leu)인 것을 확인 하였고, 제조된 분지아미노산의 최종 농도는 2.676 mg/mL임을 확인함.
- 제 1협동 기관으로부터 받은 시료의 분지아미노산은 에멀전 상태의 분지아미노산으로 분석을 위한 추가적인 전처리 과정 필요 없이 HPLC 분석을 실시하고, pH 조건이 2가지(pH 4, pH 7)인 형태인 시료를 제공받아 2가지 모두

분석을 실시함.

- 분석 결과, valine이 9.506, 9.342 mg/mL, isoleucine이 9.416, 9.268 mg/mL, leucine 19.055, 18.914 mg/mL로 분석되어 분석 시료의 비율이 1:1:2(val:ile:leu)인 것을 확인하였고, 제조된 분지아미노산의 최종 농도는 37.977, 37.524 mg/mL임을 확인함.

#### 나. *In vitro* 상에서 분지아미노산의 생리활성 검증

##### (1) 분지아미노산의 항산화 활성 검증

###### (가) DPPH radical scavenging assay

- DPPH free radical은 소수성 유리 라디칼로서 메탄올이나 에탄올에 용해되며 자색을 띠고 있는데, 항산화능이 있는(radical 소거능을 갖고 있는) 시료와 반응하면 free radical이 소거되어 옅은 노란색으로 변하는 성질을 이용해 시료의 항산화 활성을 검증하는 방법임.
- 실험을 진행한 분지아미노산의 농도는 25, 50, 100 mM로 실험을 진행하였고, 음성 대조군으로는 시료가 용해되지 않은 distilled water(D.W)를 설정하였으며, 양성 대조군으로는 ascorbic acid 25 mM을 이용, 그 결과는 Table 3-4에 나타냄.

Table 3-4. DPPH radical scavenging assay를 통한 분지아미노산의 항산화 활성 검증

Samples		Absorbance at 517 nm
Leucine	25 mM	1.002 ± 0.002
	50 mM	1.002 ± 0.013
	100 mM	1.016 ± 0.018
Valine	25 mM	0.998 ± 0.010
	50 mM	1.017 ± 0.005
	100 mM	0.921 ± 0.113
Isoleucine	25 mM	1.013 ± 0.002
	50 mM	0.996 ± 0.005
	100 mM	0.986 ± 0.009
Ascorbic acid	25 mM	0.035 ± 0.002
Control	D.W.	1.011 ± 0.011

- 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid 25 mM은 517 nm에서 흡광도 0.035 ± 0.002로 음성 대조군인 control에 비해 약 97%(control의 흡광도 1.011 ± 0.011)의 항산화 활성을 보였지만 실험에 사용한 분지아미노산은 모든 농도에서 음성 대조군인 control(D.W.)과 비교했을 때, 흡광도에 있어 유의적인 차이가 없으므로 보아 DPPH assay를 통한 분지아미노산의 항산화 활성은 없는 것으로 확인함.

###### (나) β-Carotene bleaching assay

- β-Carotene bleaching assay는 반응시간 동안 peroxidized linoleic acid로 부터 β-carotene의 이중결합을 보호하여 본래의 색소를 유지하는 정도를 측정하는 방법으로 일정 배양시간 이후 초기 흡광도 값과 비교하여 시료의 항산화력을 도출하는 방법임.

- DPPH assay와 마찬가지로 실험을 진행한 분지아미노산의 농도는 25, 50, 100 mM이며, 음성 대조군으로는 D.W.를 양성 대조군으로는 25 mM의 ascorbic acid를 사용하였고 그 결과는 Table 3-5에 나타냄.

Table 3-5.  $\beta$ -Carotene bleaching assay를 통한 분지아미노산의 항산화 활성 검증

Samples		Inhibition of $\beta$ -carotene and linoleic acid oxidation(%)
Leucine	25 mM	24.26 $\pm$ 0.528
	50 mM	24.13 $\pm$ 0.188
	100 mM	21.65 $\pm$ 0.508
Valine	25 mM	24.93 $\pm$ 0.345
	50 mM	28.05 $\pm$ 1.222
	100 mM	27.08 $\pm$ 0.406
Isoleucine	25 mM	24.64 $\pm$ 0.401
	50 mM	26.52 $\pm$ 0.188
	100 mM	25.88 $\pm$ 0.167
Ascorbic acid	25 mM	73.85 $\pm$ 1.388
Control	-	24.63 $\pm$ 0.402

Values were calculated according to the following equation: antioxidant activity(%) =  $(\beta$ -carotene content after 4h/initial  $\beta$ -carotene content)  $\times$  100

- 양성 대조군으로 사용한 25 mM ascorbic acid는 반응 시간인 4시간이 지난 뒤에도  $\beta$ -carotene의 색소를 73.85%까지 유지시켜주는 것을 보아 항산화 활성을 확인하였지만 실험에 사용한 분지아미노산은 모든 농도에서 음성 대조군과 비슷한  $\beta$ -carotene 표백 억제능을 보여 DPPH assay와 마찬가지로 항산화 활성이 확인되지 않음.

(다) TBARS assay

- TBARS assay는 시료의 지질 과산화 억제효과를 확인할 수 있는데, 다가 불포화 지방산의 산화로 생성되는 malonaldehyde와 TBA 시약이 반응하여 붉은색으로 발색되는 정도를 측정함.
- 실험에 사용한 농도와 양성 대조군, 음성 대조군은 위 실험법과 같은 조건으로 실험하였고, 실험 결과는 Table 3-6에 흡광도 값으로 나타냄.

Table 3-6. TBARS assay를 이용한 분지아미노산의 항산화 활성

Samples		0 h	24 h	48 h
Leucine	25 mM	0.086	0.454	0.514
	50 mM	0.116	0.468	0.499
	100 mM	0.083	0.467	0.521
Valine	25 mM	0.081	0.475	0.490
	50 mM	0.072	0.448	0.482
	100 mM	0.080	0.491	0.548
Isoleucine	25 mM	0.073	0.470	0.479
	50 mM	0.122	0.432	0.468
	100 mM	0.084	0.480	0.518
Ascorbic acid	25 mM	0.093	0.117	0.665
Control	-	0.062	0.426	0.431

- 양성 대조군으로 사용한 25 mM의 ascorbic acid는 반응 24시간까지는 음성 대조군에 비해 그 흡광도 값이 낮아 항산화 활성을 보였으나, 시간이 지남에 따라 오히려 산화를 촉진하는 효과를 나타내 반응 시간 48시간 이후부터는 음성 대조군보다 높은 흡광도 값을 나타냄.
- 실험에 사용한 분지아미노산 모든 농도에서 음성 대조군과 비교했을 때 흡광도의 차이가 없어, 위 두 항산화 실험과 마찬가지로 항산화 활성 확인 안됨.

(라) Ferric thiocyanate chloride assay(FTC assay)

- 마지막으로 실행한 항산화 활성 측정 실험법은 FTC method로 지질 산화 초기에 생성되는 과산화물의 양을 측정하는 방법으로 형성된 과산화물이 ferrous chloride를 산화시켜 ferric chloride를 형성하고, 이것이 ammonium thiocyanate와 반응하여 붉은색의 침전물을 발생시킴. 즉 산화 정도를 비색법을 통해 측정하는 방법임.
- 실험에 사용한 농도는 분지아미노산 5, 2.5, 1.25 mg/mL이며, 양성 대조군으로는 ascorbic acid 5 mg/mL을 사용하였고, 음성 대조군은 D.W를 사용하였고 실험결과는 Figure 3-3에 나타냄.
- 지질산화의 초기 과산화물의 정도를 측정하는 방법인 FTC법을 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과, 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid의 경우 초기 0시간에는 그 항산화 활성이 우수하여 음성 대조군과 다른 분지아미노산 시료보다 낮은 흡광도 값을 보였으나, 시간이 지남에 따라 산화를 촉진하는 경향을 보여 반응 24시간부터는 음성 대조군보다도 높은 흡광도 값을 나타냄.
- Leucine의 결과를 보면(a), leucine의 농도가 증가함에 따라 항산화 활성이 증가하는 것을 확인하였고, 최종 반응 시간인 72시간에는 음성 대조군과 비교했을 때 73.19%의 항산화 효과를 확인할 수 있었음.
- 두 번째로 valine의 결과를 보면(b), valine 역시 농도가 증가함에 따라 항산화 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 최종 반응 시간인 72시간 후에는 69.67%의 항산화 효과를 보여 leucine과 비슷한 항산화 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었음.

- 마지막으로 isoleucine의 결과(c)역시, 가장 농도가 높은 5 mg/mL에서 가장 높은 항산화 활성을 보였으며, 최종 반응 시간인 72시간 후에 항산화 활성은 66.83%로 세 분지아미노산 중 낮은 항산화 활성을 보이는 것을 확인함. 항산화 실험 결과, FTC method를 통한 항산화 활성 측정법에서 분지아미노산의 항산화 활성을 확인 할 수 있었고, 그 효과는 leucine, valine, isoleucine 순임.

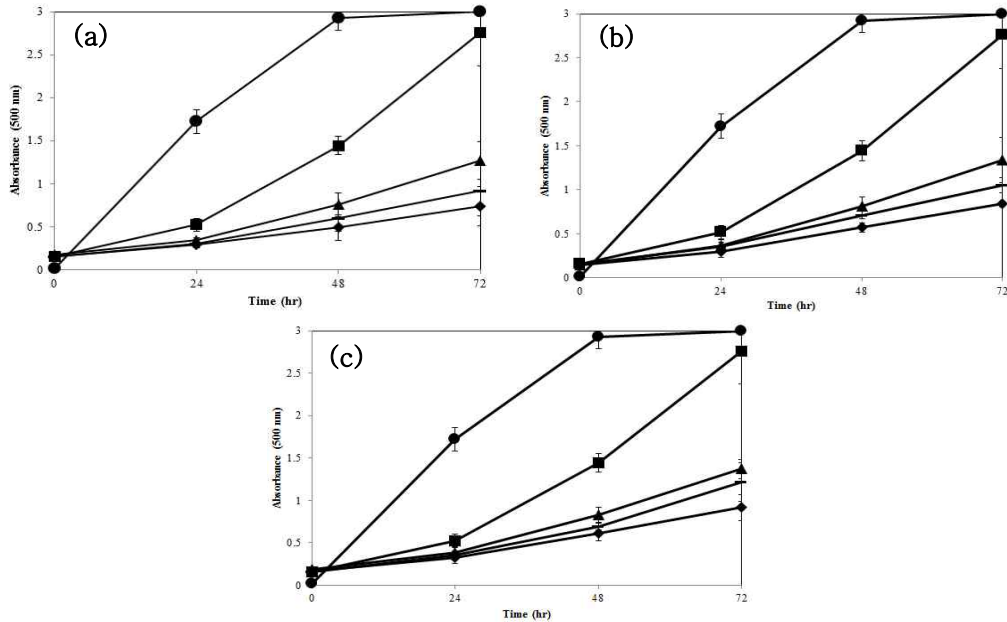


Figure 3-3. FTC method를 이용한 분지아미노산의 항산화 활성.(■, control; ●, ascorbic acid 5 mg/mL; ◆, 5 mg/mL; □, 2.5 mg/mL; ▲, 1.25 mg/mL.(a) Leucine, (b) Valine, (c) Isoleucine).

## (2) *In vitro* 상에서의 분지아미노산의 항염 활성 검증

### (가) Hyaluronidase inhibition assay

- Hyaluronidase는 인체내에 존재하는 효소로서, 고분자의 hyaluronic acid를 저분자의 N-acetylglucosamine으로 분해하고 N-acetylglucosamine은 인체 내에서 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있어, hyaluronidase 저해 활성을 측정함으로써 항염 활성을 측정할 수 있음.
- 실험에 사용한 hyaluronidase는 5.5 mg/mL의 농도로 기질 hyaluronic acid(5 mg/mL)과 40분간 반응시킬 때, 농도 20 mM의 분지아미노산을 함께 처리하여 발생하는 N-acetylglucosamine의 함량을 비색법을 통해 측정하여 음성 대조군인 control과 비교하여 저해율(%)로 그 활성을 나타냄(Figure 3-4).
- Figure 3-4에 나타낸 것과 같이, leucine, valine, isoleucine 모두 음성 대조군과 비교했을 때 저해효과가 없는 것으로 나타나 hyaluronidase를 통한 항염 활성은 없는 것을 확인함

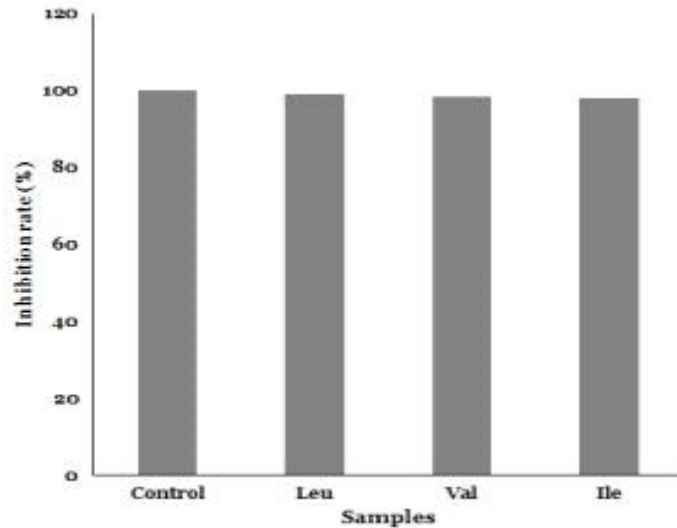


Figure 3-4. 분지아미노산의 hyaluronidase 저해 활성.

(나) Sodium nitroprusside assay(SNP assay)

- Sodium nitroprusside(SNP)는 phosphate buffer상에서 산소의 존재하에서 빛과 반응하면 nitric oxide(NO)와 nitrite를 형성하게 되고 이러한 nitrite compound는 Griess 시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in water)와 반응하여 자색으로 발색이 되는데, SNP assay는 이 원리를 이용하여 시료의 NO scavenging activity를 측정하는 실험법임.
- 실험에 사용한 분지아미노산의 농도는 25, 50, 100 mM이며, 결과는 Figure 3-5에 나타냄.

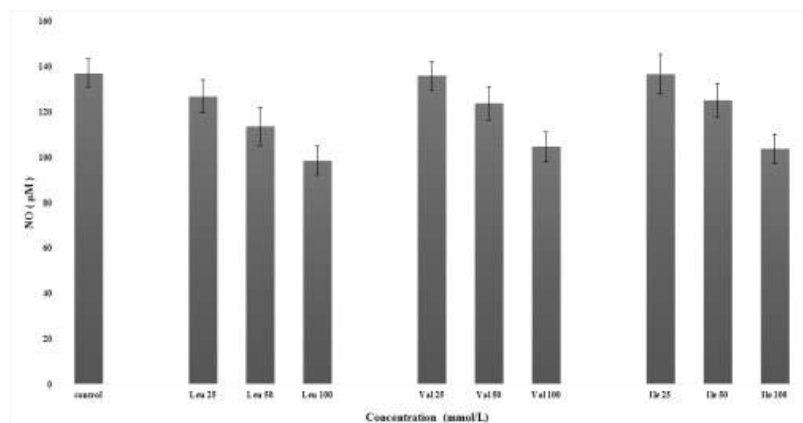


Figure 3-5. 분지아미노산의 nitric oxide 소거활성.

- 실험 결과, 음성 대조군에서 NO의 생성량은 137.20  $\mu$ M로 측정되었고 모든 분지아미노산의 실험군에서 농도 의존적으로 NO 소거능이 증가함.
- Leucine의 경우 실험을 진행한 25, 50, 100 mM에서 각각 127.01, 113.79, 98.52



$\mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었으며, 이를 음성 대조군과 비교하여 저해율로 환산한 결과 7.43, 17.06, 28.19%로 나타남.

- Valine과 isoleucine의 경우도 모든 농도에서 음성 대조군과 비교했을 때, 낮은 NO 생성량을 보였고, 농도 100 mM의 valine, isoleucine의 저해율은 각각 23.62, 24.36%로 나타남.
- 이 실험을 통해 분지아미노산 모두 NO 소거 활성이 있는 것으로 확인 되었고, 이는 인체 내에서 염증 반응에서 중요한 역할을 하지만, 문제가 될 수 있는 과량의 NO를 소거할 수 있다는 것을 의미하며 각각의 분지아미노산 모두 항염 활성을 나타낼 수 있음을 간접적으로 확인함.

### (3) *Ex vivo*상에서의 분지아미노산의 항염 활성 검증

#### (가) Inhibition of nitric oxide production

- 대식세포의 일종인 RAW 264.7 murine macrophage는 염증관련 인자들과 사이토카인들을 방출함으로써 염증반응에 관여하며, LPS와 같은 염증 인자에 의해 nitric oxide를 생성하는 세포임.
- 생리학적으로 NO는 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 하지만 LPS와 같은 인자에 의해 염증 반응이 일어나면 관련 세포, 특히 면역계 세포에서는 iNOS의 발현이 증가하여 과량의 NO가 생성이 되고, 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킴.
- 따라서 이러한 NO의 생성을 저해하는 정도를 측정함으로써 항염증 효과를 측정할 수 있음.
- 실험에 사용된 RAW 264.7 murine macrophages는 한국세포주은행(KCLB, Seoul)으로부터 분양받아 DMEM medium에 10% FBS(fetal bovine serum), 100 unit/mL의 penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며 80-90% confluence에서 계대 배양하여 사용함.
- LPS를 이용하여 분지아미노산의 NO 생성 저해 정도를 측정하기 이전에 RAW 264.7 murine macrophage에 대한 분지아미노산의 세포독성과 이로 인한 NO 생성 저해를 알아보기 위해 MTT assay를 통해 세포독성을 확인함.
- MTT는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide로 수용성이고 형광빛의 황색을 띄고 살아있는 세포 내의 미토콘드리아의 환원효소에 의해 불용성의 formazan으로 전환되는데 이 formazan을 DMSO에 용해시키고 그 흡광도를 측정함으로써 세포의 생존 정도를 비색법을 통해 간접적으로 측정할 수 있는 방법임.
- 따라서 세포독성을 측정하기 위해 각각의 분지아미노산을 12.5, 25, 50, 100 mM의 농도로 대식세포 RAW 264.7 murine macrophages에 LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  와 함께 배양 후 MTT solution(2.5 mg/mL)을 분주하고 배양하여 세포독성을 확인하였고 결과는 Figure 3-6에 나타냄.

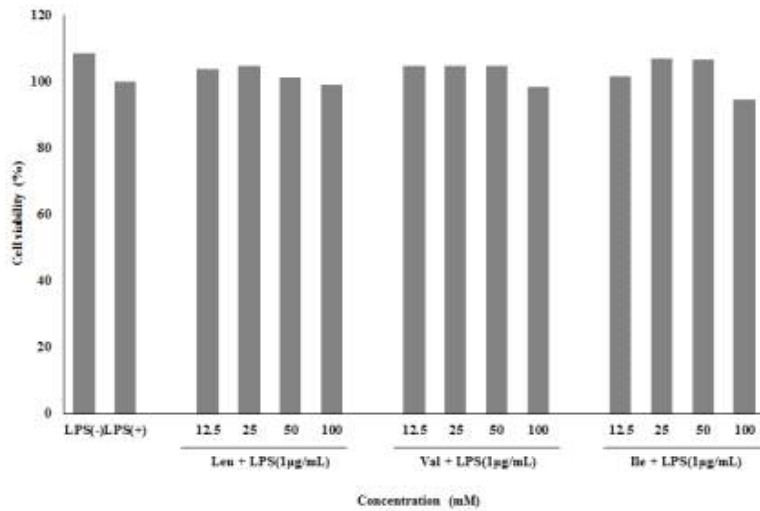


Figure 3-6. RAW 264.7 murine macrophage에 대한 분지아미노산의 세포독성.

- 실험을 실시한 분지아미노산의 모든 농도(12.5, 25, 50, 100 mM)에서 모두 90%가 넘는 세포 생존율을 보임으로써 NO 저해 정도를 측정하는데 무리가 없다고 판단되어 상기 농도를 실험에 적용함.
- 분지아미노산이 대식세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RAW 264.7 murine macrophages를  $2 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하여 2시간 동안 전배양 시키고 2시간 뒤에 분지아미노산(12.5, 25, 50, 100 mM)과 염증유발 물질인 LPS(1µg/mL)를 함께 처리하여 24시간 동안 배양시킨 뒤, 상등액을 동량의 Griess 시약과 15분간 암반응 시켜 배양액에 존재하는 NO의 양을 비색법을 통해 측정함.
- 생성된 NO의 양은 배지에 용해시킨  $\text{NaNO}_2$  의 농도 대비 흡광도를 이용해 도출한 표준 회귀식을 통해 산출 후 이를 통해 분지아미노산이 LPS로 유도된 macrophages의 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였고, 그 결과는 Figure 3-7에 나타냄.

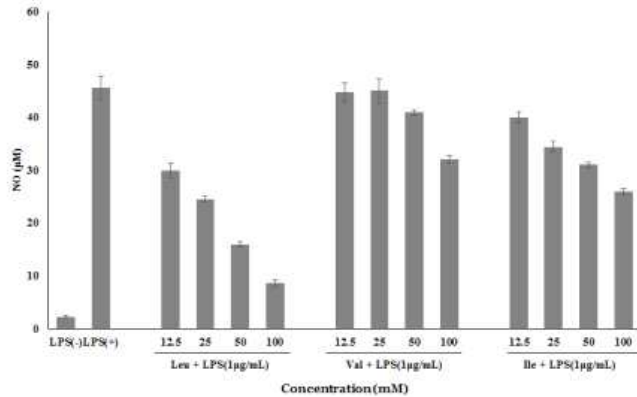


Figure 3-7. LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 murine macrophage 에서의 분지아미노산의 NO 생성 저해 활성.

- LPS를 처리하지 않은 음성 대조군에서는 NO의 생성량이 2.28 µM로 LPS로 염증이 유도되지 않은 상태에서는 NO의 생성량이 적은 것을 확인함.
- LPS를 1 µg/mL 농도로 처리한 군에서는 NO의 생성량이 45.63 µM로, 염증이 유도되어 NO의 생성량이 급증한 것이 확인되어 각각의 분지아미노산을 농도별로 처리하였을 때, NO의 생성량이 농도 의존적으로 줄어드는 것을 확인함.
- Leucine의 경우, 12.5 mM을 처리한 군에서도 29.97 µM로 NO의 생성량이 15 µM 정도 줄어드는 것을 확인 할 수 있었고, 25, 50, 100 mM로 처리하였을 때, 그 생성량은 더 감소되어 각각 24.47, 15.97, 8.60 µM로 NO 생성이 저해되는 것을 확인함.
- 이를 저해율로 환산하였을 때 leucine 100 mM에서 81.14% 저해율을 확인할 수 있었고 valine과 isoleucine의 경우, leucine보다는 저해율이 낮았지만, 그 저해율은 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 최고 농도인 100 mM에서 valine, isoleucine의 저해율은 각각 29.65, 42.94%로 각각의 분지아미노산 모두 NO 생성 저해 효과가 있음을 확인할 수 있었음.

(나) 분지아미노산이 염증관련 유전자 발현에 미치는 영향

① Real-time PCR assay

- RAW 264.7 murine macrophage는 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 포함한 DMEM 배지에서 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양함.
- 24-well plate에 6×10<sup>5</sup> cells/well로 24시간 배양한 후, 100 mM 분지아미노산(Leu, Val, Ile)를 처리하여 24시간 배양하고, 그 후 1 µg/mL LPS를 처리하여 24시간 배양(조건 1) 또한, 조건을 달리하여 각각의 분지아미노산과 LPS를 동시에 처리, 24시간 배양하여 연구를 진행함(조건 2).
- 배양이 끝난 RAW 264.7 murine macrophage에 각 well에 TRIzol reagent 1 mL을 첨가하고 균질화한 다음 실온에 5분간 방치 후 Chloroform 0.2 mL을 가하여 20초간 강하게 vortex하고 실온에서 10분간 방치한 후 4°C에서 10,000×g로 15분간

원심분리함.

- 상층액을 RNA 분리에 이용하였으며, 상층액에 RNase-free water 0.5 mL와 isopropanol 1 mL을 가하여 혼합하고 실온에서 10분간 방치 후 이를 4°C에서 10,000×g로 15분간 원심분리하고 75% ethanol 1 mL로 RNA pellet을 세척하여 4°C에서 10,000×g로 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하여 공기 중에서 건조함.
- M-MLV reverse transcriptase(Promega, USA)를 이용하여 reverse transcription를 수행하고 cDNA를 합성한 후 PCR tube에 1 µg total RNA, 30 pmole oligo dT19, dH<sub>2</sub>O를 혼합하여 70°C에서 5분간 반응시키고, 5× RT buffer(250mM Tris-HCl; pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 1 mM dNTPs를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 200U M-MLV reverse transcriptase를 가하여 37°C에서 1시간, 70°C에서 15분의 조건으로 DNA thermal cycler(Mycycler™ thermal cycler, BIO-RAD, USA)를 이용하여 cDNA를 합성함.
- RNA로부터 reverse transcriptase를 이용하여 합성된 cDNA를 template로 사용하며, 증폭하고자 하는 유전자 cDNA의 5' 과 3' flanking sequence를 primer로 사용하여 PCR을 수행함.
- 희석한 cDNA에 2× SYBR Green master mix, 0.5 µM primers, RNase-free water를 total volume 20µL가 되도록 혼합하여 Real-time DNA thermal cycler(iQ™5 multicolor real-time PCR detection system, BIO-RAD, USA)를 이용하여 증폭하였다. 반응조건은 95°C에서 15분간(initiation), 55 cycle을 95°C에서 10초(denaturation), 55°C에서 30초(annealing), 72°C에서 20초(extension)의 조건으로 실행함.
- Delta delta Cq( $\Delta\Delta Cq$ ) 분석법으로 증폭결과를 구하고, PCR reaction의 melting curve를 확인하여 증폭산물의 purity를 검증했고 Real-time PCR을 수행한 염증관련 유전자는 Table 3-7에 제시하였으며, housekeeping gene으로  $\beta$ -actin을 사용함.

Table 3-7. Real-time PCR에 사용한 primer sequence

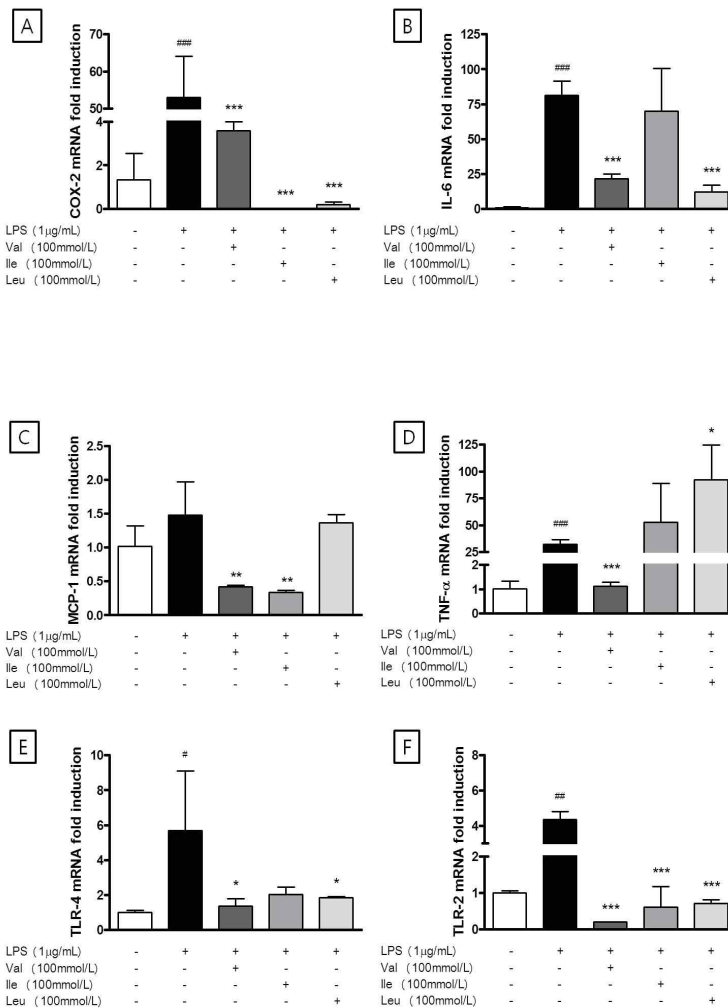
Gene	Description	Primer sequence
COX-2	Cyclooxygenase-2	forward: 5' -tgggaagctttctccaacct-3' reverse: 5' -gtgaagtgctgggcaaagaa-3'
IL-6	Interleukin-6	forward: 5' -ccttcctacccaattcca-3' reverse: 5' -cgcactaggtttgccgagta-3'
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1	forward: 5' -catctgccctaaggtcttc-3' reverse: 5' -cttgaggtggttgaggaa-3'
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$	forward: 5' -atgagaagttcccaaattggc-3' reverse: 5' -gaattttgagaagatgatctgagtg-3'
TLR-4	Toll-like receptor-4	forward: 5' -atagcatggaccttaccggg-3' reverse: 5' -ggcttgattcaaaaggccc-3'
TLR-2	Toll-like receptor-2	forward: 5' -tgatcttgctcgtagtgcc-3' reverse: 5' -ttaaagggcgggtcagagtt-3'
IL-10	Interleukin-10	forward: 5' -taaggctggccacacttgag-3' reverse: 5' -agtttcagggatgaagcgg-3'
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$	forward: 5' -gttgacggaccaaccgat-3' reverse: 5' -aaggctccacgggaaagacac-3'
IL-2	Interleukin-2	forward: 5' -acctggagcagctgttgatg-3' reverse: 5' -gtcaaatccagaacatgccg-3'
IL-4	Interleukin-4	forward: 5' -atcatcggcatttgaacga-3' reverse: 5' -aagcccgaagagtctctgc-3'
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$	forward: 5' -acactgcatcttgctttgc-3' reverse: 5' -ctggctctcaggattttca-3'
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	forward: 5' -cttggtgaggggactggact-3' reverse: 5' -ggggttttctccacgttgtt-3'
$\beta$ -actin		forward: 5' -gattactgctctggctccta-3' reverse: 5' -atcgactctgcttgct-3'

- 염증관련 유전자로 알려진 COX-2, IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , TLR-4, TLR-2, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, 및 IFN- $\gamma$ 의 유전자 발현에 미치는 영향에 대한 결과를 Figure 3-8과 Table 3-8에 나타냄.
- COX-2의 발현은 LPS 처리에 의해 유의적으로 증가하였으며, 분지아미노산(Val, Ile, Leu)의 처리에 의해 유의적으로 감소하였고 또한 LPS 처리에 의해 증가한 IL-6 유전자 발현은 valine 과 leucine 처리에 의해 유의적으로 감소하였고, MCP-1은 LPS 처리에 의한 유의적인 변화는 나타나지 않았으나, LPS 처리시보다 valine 과 isoleucine 처리시 유의적인 감소를 나타냄.
- TNF- $\alpha$ 의 발현은 LPS 처리에 의해 유의적으로 증가하였으며, valine 처리에 의해 유의적인 감소를 나타내었고 TLR-4의 발현은 LPS 처리에 의해 유의적으로 증가하였으며 valine, leucine 처리에 의해 유의적인 감소를 나타냄.
- TLR-2와 IL-2의 발현은 LPS 처리에 의해 유의적으로 증가하였으며 분지아미노산(Val, Ile, Leu) 처리에 의해 유의적으로 감소하였고 이외의 다른 항염증 관련 유전자의 발현도 LPS 처리에 의해 유의적으로 증가한 양을 분지아미노산을 통해 유의적으로 감소하는 것을 확인함.
- 이를 통해, 분지아미노산이 대식세포인 RAW 264.7 murine macrophages에서

항염증 관련 유전자 발현에 유의적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었음.

Table 3-8. 분지아미노산이 LPS로 유도된 RAW 264.7 murine macrophage에서 염증관련 유전자 발현에 미치는 영향(조건 1)

	LPS(+)				
	LPS(-)	-	Leu	Val	Ile
COX-2	1.32±1.22	52.96±11.18	3.59±0.41	0.01±0.01	0.19±0.12
IL-6	1.03±0.37	81.15±10.32	21.65±3.38	69.96±30.64	12.14±4.86
MCP-1	1.02±0.30	1.48±0.49	0.42±0.02	0.34±0.03	1.37±0.12
TNF- $\alpha$	1.02±0.30	32.10±4.45	1.12±0.17	52.73±35.99	92.36±32.38
TLR-4	1.00±0.11	5.68±3.42	1.37±0.44	2.02±0.44	1.85±0.05
TLR-2	1.00±0.06	4.26±0.46	0.21±0.00	0.62±0.56	0.71±0.10
IL-10	1.29±1.14	47.04±20.12	37.51±0.49	9.95±6.20	29.72±7.81
IL-1 $\beta$	1.07±0.55	259.16±6.86	6.33±1.58	494.56±148.02	301.13±15.66
IL-2	1.00±0.06	1.88±0.02	0.24±0.02	0.28±0.22	0.47±0.11
IL-4	1.01±0.20	1.75±0.56	7.66±0.67	1.05±1.10	1.17±0.02
IFN- $\gamma$	1.02±0.28	1.29±0.32	2.31±0.51	0.47±0.29	0.42±0.01



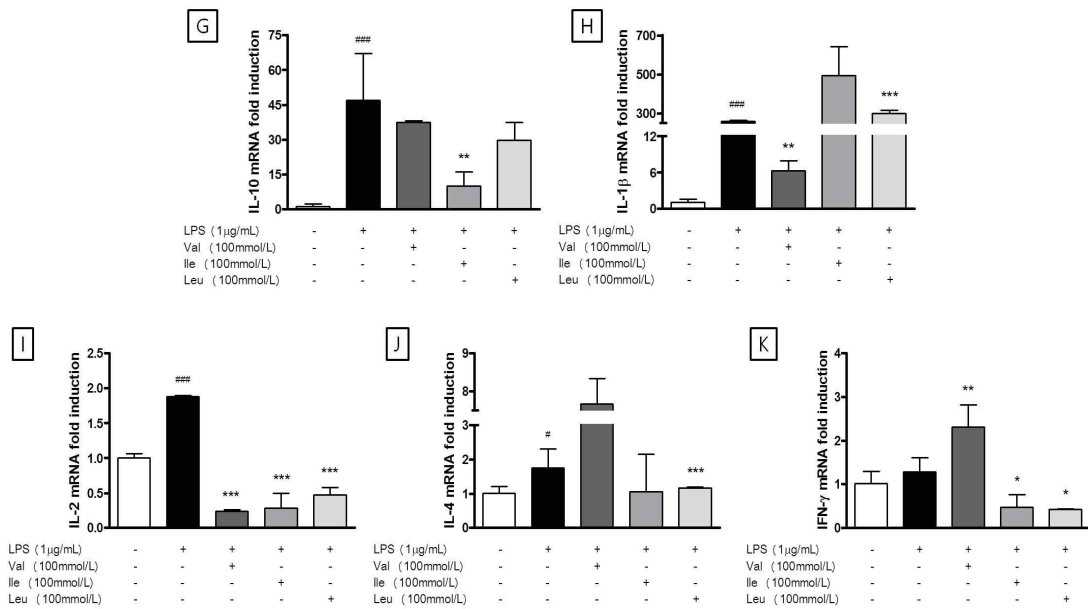


Figure 3-8. 분지아미노산이 LPS로 유도된 RAW 264.7 murine macrophages에서 COX-2(A), IL-6(B), MCP-1(C), TNF- $\alpha$ (D), TLR-4(E), TLR-2(F), IL-10(G), IL-1 $\beta$ (H), IL-2(I), IL-4(J), and IFN- $\gamma$ (K) 발현에 미치는 영향(조건 1).

- COX-2와 iNOS 항염증 관련 유전자 발현에 대한 연구는(조건 2)에 따라 진행하였다. 그 결과는 Table 3-9와 Figure 3-9에 나타냄.

Table 3-9. 분지아미노산이 LPS 유도된 RAW 264.7 murine macrophage에서 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향

	LPS(-)	LPS(+)			
		-	Leu	Val	Ile
COX-2	1.69±1.92	27.48±0.27	10.63±0.06	39.05±5.59	16.82±5.21
iNOS	1.01±0.23	3.79±0.14	2.47±0.02	3.13±0.19	1.29±0.18

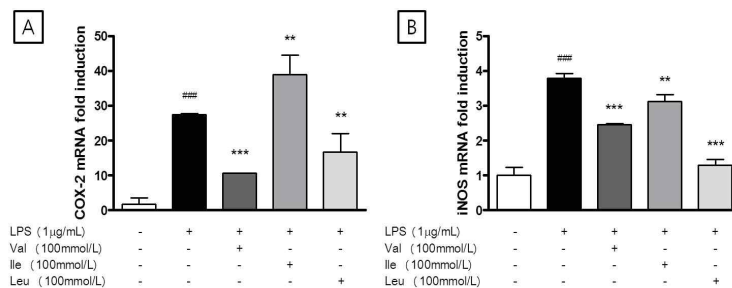


Figure 3-9. 분지아미노산이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage에서 COX-2(A), iNOS(B) 발현에 미치는 영향.

(다) *Ex vivo* 상에서 분지아미노산의 암세포 성장 억제 효과 검증

① MTT assay

- MTT assay는 미토콘드리아의 탈수소 효소에 의하여 노란색의 수용성 기질인(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenol-tetrazolium bromide) 을 청자색의 비수용성 기질인 formazan 으로 환원되는 기작을 이용하는 방법임.
- 분지아미노산이 용해되지 않은 증류수를 처리한 음성 대조군에 대해 분지아미노산의 농도별 처리군의 흡광도를 비교하였고 실험에 사용한 암세포는 인체유래 암세포로서 HT-29(대장암), LoVo(대장암), HepG2(간암), AGS(위암)이며, 이는 한국세포주은행(KCLB, Seoul)으로부터 분양받아 10% FBS(fetal bovine serum), 100 unit/mL의 penicillin, 100 µg/mL의 streptomycin을 첨가한 RPMI 1640, MEM medium을 배지로 이용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며 confluence 80-90%에서 계대 배양하며 사용함.

Table 3-10. 인체 유래 암세포에 대한 분지아미노산의 성장 저해 활성

		HT-29(대장암)	LoVo(대장암)	HepG2(간암)	AGS(위암)
Leu	12.5 mM	12.74 ± 4.17	2.12 ± 4.96	-5.68 ± 6.56	7.20 ± 3.71
	25 mM	31.93 ± 4.76	21.96 ± 4.01	0.69 ± 1.38	14.93 ± 3.56
	50 mM	53.40 ± 3.56	25.93 ± 4.79	15.04 ± 4.19	32.05 ± 4.98
	100 mM	68.80 ± 2.91	60.91 ± 3.45	48.12 ± 2.72	46.35 ± 4.45
Val	12.5 mM	14.09 ± 4.59	9.06 ± 4.61	25.06 ± 4.87	8.56 ± 4.12
	25 mM	15.50 ± 4.14	11.35 ± 4.84	18.99 ± 4.49	11.24 ± 3.00
	50 mM	41.54 ± 5.30	30.47 ± 1.76	25.76 ± 6.95	20.16 ± 7.40
	100 mM	44.75 ± 4.90	38.54 ± 3.67	36.16 ± 3.61	21.08 ± 5.27
Ile	12.5 mM	10.43 ± 4.91	15.93 ± 6.61	7.46 ± 3.00	6.08 ± 2.14
	25 mM	24.09 ± 5.14	16.97 ± 5.64	9.81 ± 4.05	18.80 ± 8.63
	50 mM	35.18 ± 5.33	21.95 ± 4.34	19.35 ± 4.68	24.24 ± 5.66
	100 mM	53.75 ± 3.47	50.30 ± 5.17	35.19 ± 2.56	44.28 ± 4.40

- 세포독성을 비색법을 통해 간접적으로 측정하는 MTT assay는 일반적으로 50%를 넘는 효과를 보일 때에 세포독성이 있다고 정의하는데, 실험을 진행한 4가지의 인체유래 암세포 중 대장암 유래 암세포인 HT-29, LoVo 세포주에 대해서 leucine, isoleucine의 농도 100 mM에서 50%가 넘는 효과를 보여 세포독성이 있는 것을 확인할 수 있었음.
- 특히, leucine의 경우, HT-29 대장암 세포에 대해 50 mM에서도 50%가 넘는 53.40%의 세포독성을 보여 세 가지의 분지아미노산 중 암세포 성장 억제 효과가 가장 큰 것을 확인함.

(라) 분지아미노산이 DNA 손상에 미치는 영향 연구

① Comet assay

- DNA 손상측정은 Alkaline comet assay 방법에 따라 시행함.



- 배양된 RAW 264.7 murine macrophage 세포를  $2 \times 10^5$  cells/mL 준비하고 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 분지아미노산(Val, Ile, Leu)을 처리하여 37°C에서 30분간 반응하고 세포를 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 인위적인 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 200  $\mu\text{M}$ 의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 4°C에 5분간 처리한 후 PBS로 세척함.
- Positive control(PC)을 위해 시료 대신 1% DMSO를 처리한 후 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 을 처리하고, negative control(NC)은 1% DMSO만을 처리하고 반응을 끝낸 세포를 75  $\mu\text{L}$ 의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후 1.0% normal melting agarose(NMA)가 precoating된 슬라이드 위로 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 커버글라스로 덮어 4°C에 방치함.
- Gel이 굳으면 커버글라스를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75  $\mu\text{L}$ 로 덮은 후 4°C에 방치하고 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10 mM Tris, 1% sodium lauryl sarcosine, 1% Triton X-100, 10% DMSO)에 슬라이드를 담가 암실에서 1시간 동안 침지시킨 후 세포를 용해시켜 핵막을 제거함.
- Lysis 과정이 끝난 후 슬라이드를 전기영동수조에 배열하고 4°C의 차가운 electrophoresis buffer(300 mM NaOH, 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH>13)를 채워 20분 동안 방치하여 DNA의 이중가닥을 풀어주어 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 $\pm$ 3 mA의 전압으로 20분간 전기영동을 실시 후 차가운 중성용액(0.4 M Tris buffer, pH 7.5)에 5분간 3회 세척한 다음 에탄올에 5분간 침지한 후 건조함.
- 슬라이드는 20  $\mu\text{g/mL}$  ethidium bromide로 염색하여 형광현미경(LEICA DMLB, Wetzlar, Germany)의 CCD 카메라(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 이미지를 comet image analyzing system(Komet version 5.0, Kinetic Imaging, Liverpool, UK)을 이용해 분석함.
- RAW 264.7 murine macrophage의 산화적 스트레스 유발에 의한 DNA의 손상 정도는 핵으로부터 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA 함량(% of tail intensity)으로 나타내었고, 결과는 Table 3-11과 Figure 3-10, 11에 나타냄.

Table 3-11. 분지아미노산의 DNA 손상 억제 효과

	NC	PC	Val	Ile	Leu
Head DNA(%)	94.0 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	86.6 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	89.9 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	87.9 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	88.3 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
Tail DNA(%)	6.0 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	13.4 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	10.1 $\pm$ 1.7 <sup>ab</sup>	12.1 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	11.7 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
Tail Moment	8.2 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	63.6 $\pm$ 11.1 <sup>c</sup>	36.6 $\pm$ 7.7 <sup>b</sup>	38.6 $\pm$ 2.5 <sup>ab</sup>	39.1 $\pm$ 6.6 <sup>ab</sup>
Tail Length( $\mu\text{m}$ )	98.8 $\pm$ 6.8 <sup>a</sup>	434.3 $\pm$ 51.3 <sup>c</sup>	254.8 $\pm$ 7.5 <sup>b</sup>	235.6 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>	271.5 $\pm$ 19.9 <sup>b</sup>

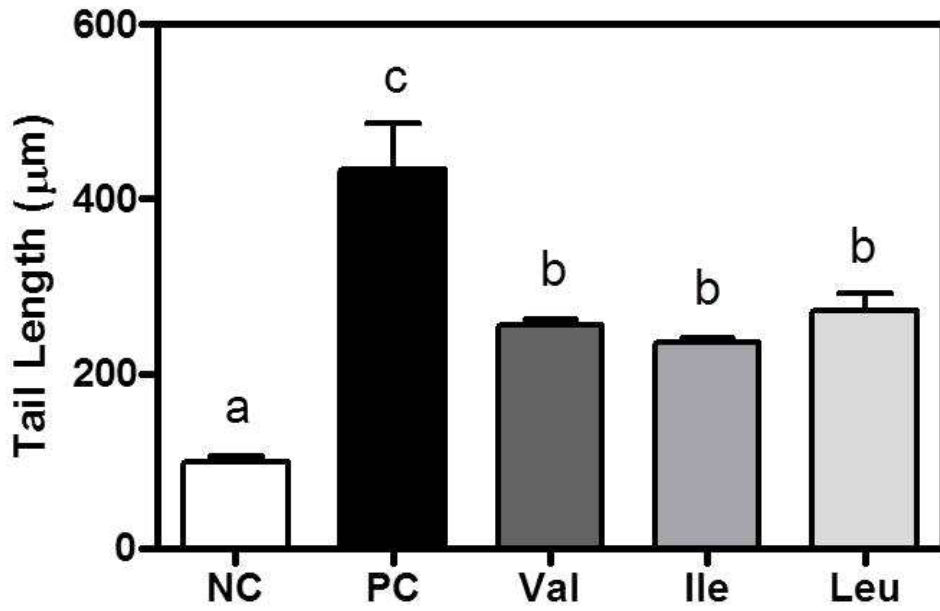


Figure 3-11. 분자아미노산이  $H_2O_2$ 로 유도된 RAW 264.7 murine macrophages의 DNA 손상 억제에 미치는 영향.

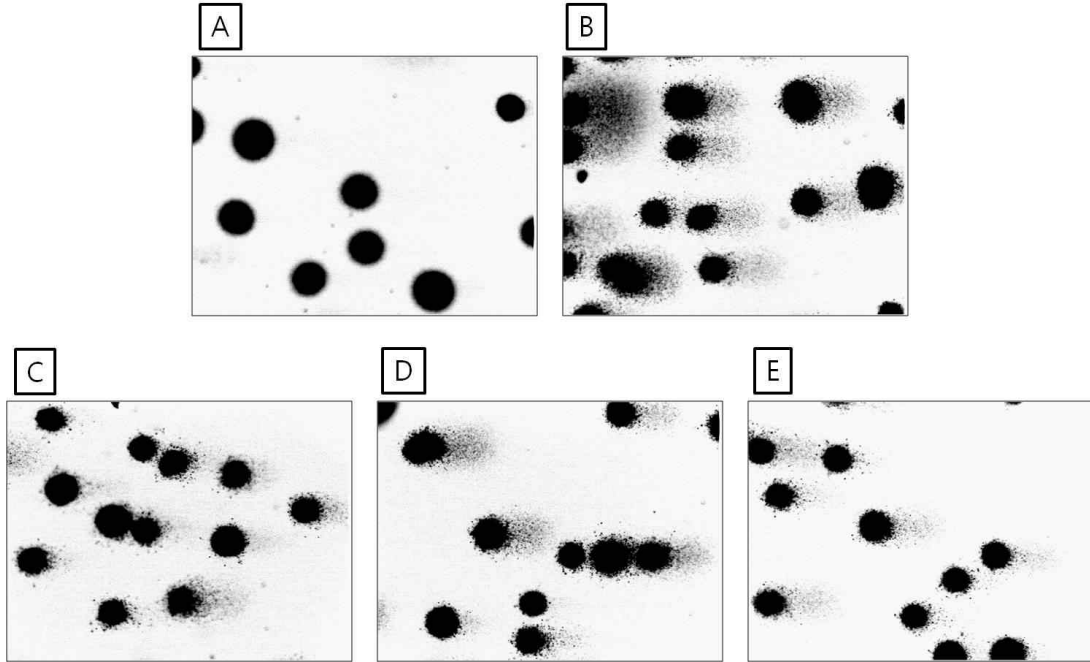


Figure 3-12. 분지아미노산이  $H_2O_2$ 로 유도된 RAW 264.7 murine macrophages의 DNA 손상 억제에 미치는 영향.(A), negative control;(B),  $200 \mu M H_2O_2$  로 처리된 positive control;(C),  $200 \mu M H_2O_2 + Val$ ;(D),  $200 \mu M H_2O_2 + Ile$ ;(E),  $200 \mu M H_2O_2 + Leu$ .

- Single-cell gel-electrophoresis(SCGE) assay로 잘 알려진 comet assay는 활성산소에 의한 산화적 스트레스 유발 시 세포내의 DNA 손상 정도를 직접적으로 확인할 수 있는 유용한 지표로 사용됨. 분지아미노산(Val, Ile, Leu)의  $H_2O_2$ 로 유도된 산화적 스트레스에 대한 DNA 손상 보호능을 측정할 결과 Tail Length에서 Val, Ile, Leu 모두 positive control에 비해 유의적으로 감소한 것으로 나타남.

#### 다. *In vitro, ex vivo* 상에서의 리포솜-탑재 분지아미노산과 나노-에멀전 분지아미노산의 생리 활성 검증

(1) 식품 소재화된 분지아미노산의 기능성 검증을 위한 시료의 선택

- 식품 소재화된 분지아미노산의 기능성 검증을 위하여 각 실험법에 맞는 시료를 선택하였음. 제 1세부 기관으로부터 제공 받은 리포솜 봉입 분지아미노산은 소량의 분지아미노산을 리포솜으로 봉입하여 세포 흡수율을 높인 시료이고, 제 1협동 기관으로부터 제공 받은 분지아미노산 에멀전은 분지아미노산의 가용성을 최대한 높여 기존 2%에 머물렀던 가용성을 4%까지 높인 시료로 그 성격이 다름을 알 수 있었으며, 각 실험에 있어 적절한 형태의 시료를 선택하였음. 제 1세부 기관으로부터 제공 받은 리포솜 봉입 분지아미노산 시료를 이용하여 *in vitro* 상에서 실험을 진행할 경우 실험 공정 중 리포솜이 깨져 낮은 농도의 분지아미노산을 실험하는 것과 다른 점이 없을 뿐만 아니라 탁도가 있어 비색법을 이용하는 실험에서 한계점이 존재함. 따라서 기존보다 높은 농도에서 항산화 활성을 볼 경우에는 제1협동기관의

시료를, 세포주를 이용한 흡수율 실험과 *ex vivo* 상에서의 기능성 검증을 할 때에는 제 1세부기관의 리포솜 봉입 분지아미노산을 사용하기로 결정함.

(2) 나노/마이크로에멀전 기술을 통해 제조된 분지아미노산의 *in vitro* 상에서의 항산화 활성

(가) FTC assay

- 1차년도 연구를 통해 다양한 *in vitro* 항산화 활성 실험법 중 FTC method를 통해서 항산화 활성이 있는 것을 확인하였고 2차년도 연구에서도 DPPH radical scavenging assay,  $\beta$ -carotene bleaching assay, TBARS assay 등의 실험법을 통해서도 항산화 활성이 검증되지 않았지만, FTC method를 통하여 분지아미노산의 항산화 활성을 검증함.
- *In vitro* 상에서의 항산화 검증은 제 1협동 기관으로부터 제공 받은 분지아미노산 에멀전을 이용하여 실험을 진행하였고 제 1협동 기관으로부터 제공 받은 분지아미노산 에멀전은 기존의 분지아미노산의 가용성을 높여 최대 농도 4%의(leu:val:ile=2:1:1) 분지아미노산 에멀전을 제공받아 실험에 사용함. 최고 농도인 4%부터 순차적으로 희석하여 1%까지 실험을 진행함(pH 조건 4, 7).
- FTC method는 지질 산화 초기에 생성되는 과산화물의 양을 측정하는 방법으로 형성된 과산화물이 ferrous chloride를 산화시켜 ferric chloride를 형성하고, 이것이 ammonium thiocyanate와 반응하여 붉은색의 침전물을 발생시키는데 이 붉은색의 침전물의 양을 비색법을 통해 산화정도를 측정하는 방법임.
- 붉은색의 침전물이 적을수록 그 항산화능이 높다는 것을 알 수 있고 그 결과는 Figure 3-13과 Table 3-12에 나타냄.
- 대조군으로서 사용한 D.W.(negative control)은 시간이 지남에 따라 그 흡광도가 증가하여 지질 산화가 계속 진행되고 있음을 확인 할 수 있었지만 그에 반해, 실험에 사용한 분지아미노산 에멀전은 모든 농도에서 반응 시간 72시간 까지도 항산화 활성을 보여주는 것을 확인 할 수 있었음.
- 양성 대조군으로 사용 한 ascorbic acid(4%)는 반응 72시간까지도 99.97%의 항산화 활성을 보였고 실험에 사용한 분지아미노산 에멀전은 pH 7 시료의 경우 모든 농도에서 80%가 넘는 항산화 활성을 보였으며(4%-85.86%, 2%-83.73%, 1%-81.03%), pH 4 시료의 경우 그보다 조금 낮은 항산화 활성을 보였음(4%-79.14%, 2%-79.60%, 1%-69.30%).

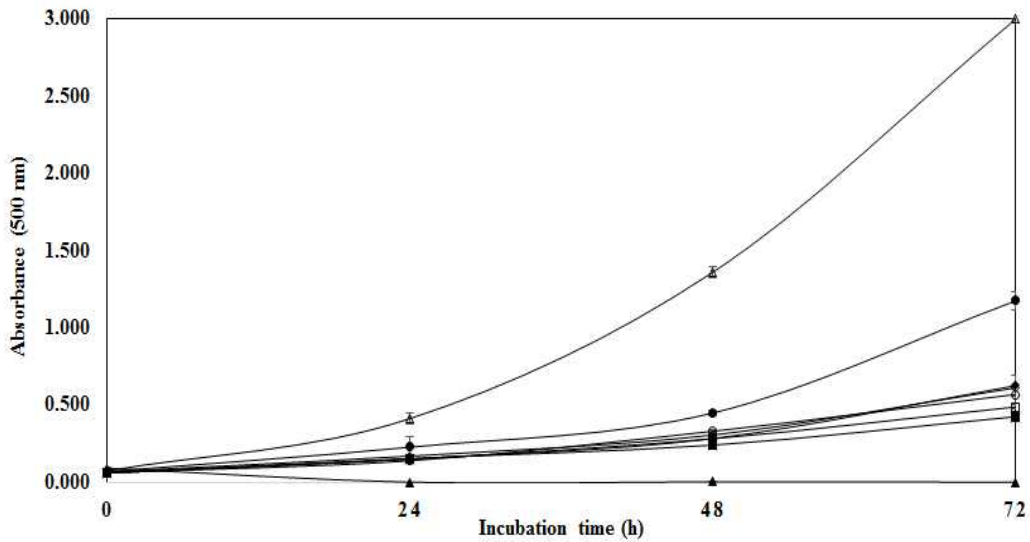


Figure 3-13. FTC 방법을 통한 분지아미노산 에멀전의 항산화 활성 검증( $\Delta$ , control;  $\blacktriangle$ , ascorbic acid 4%;  $\blacklozenge$ , 분지아미노산 emulsion(pH 4) 4%;  $\diamond$ , 분지아미노산 emulsion(pH 4) 2%;  $\bullet$ , 분지아미노산 emulsion(pH 4) 1%;  $\blacksquare$ , 분지아미노산 emulsion(pH 7) 4%;  $\square$ , 분지아미노산 emulsion(pH 7) 2%;  $\circ$ , 분지아미노산 emulsion(pH 4) 1%).

Table 3-12. 배양 72시간 후의 분지아미노산 에멀전의 FTC 방법을 통한 항산화 활성

Samples	Concentration (%)	Antioxidant activity(%)	
Control	-	-	
분지아미노산 에멀전	4	79.14±2.33	
	pH 4	2	79.60±0.25
	1	69.30±2.07	
	4	85.86±0.51	
	pH 7	2	83.73±0.57
	1	81.03±2.12	
Ascorbic acid	4	99.97±0.00	

(3) 나노/마이크로에멀전 기술을 통해 제조된 분지아미노산의 항염 활성 검증

(가) *In vitro* 상에서의 항염 활성 검증

① SNP assay

- 1차년도 연구를 통해 다양한 *in vitro* 항염 활성 실험법 중 sodium nitroprusside(SNP)를 이용한 NO scavenging activity 측정 실험에서 항염 활성을 확인함.
- Sodium nitroprusside(SNP)는 phosphate buffer에서 산소 존재 하에 빛과 반응하면

NO와 nitrite를 형성하는 물질로, 이 nitrite compound는 Griess 시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in water)와 반응하여 자색으로 발색이 되는데, SNP assay는 이 원리를 이용하여 시료의 NO scavenging activity를 측정하는 실험법임.

- 실험에 사용한 분지아미노산 시료는 제 1협동기관으로부터 제공받았으며, 수용액 상태의 시료와 안정제를 첨가한 에멀전(lysolecithin, polysorbate 80, soy protein isolated, whey protein isolated) 형태의 시료이며 농도는 2.5, 5, 10, 20, 40 mg/mL를 사용함.
- 분지아미노산이 포함되지 않은 D.W.를 음성 대조군으로 설정하였으며 시료와 동량의 SNP solution과 혼합하여 37°C 항온 수조에서 산소를 공급하여 명반응시켰고 결과는 Figure 3-14~18에 나타냄.

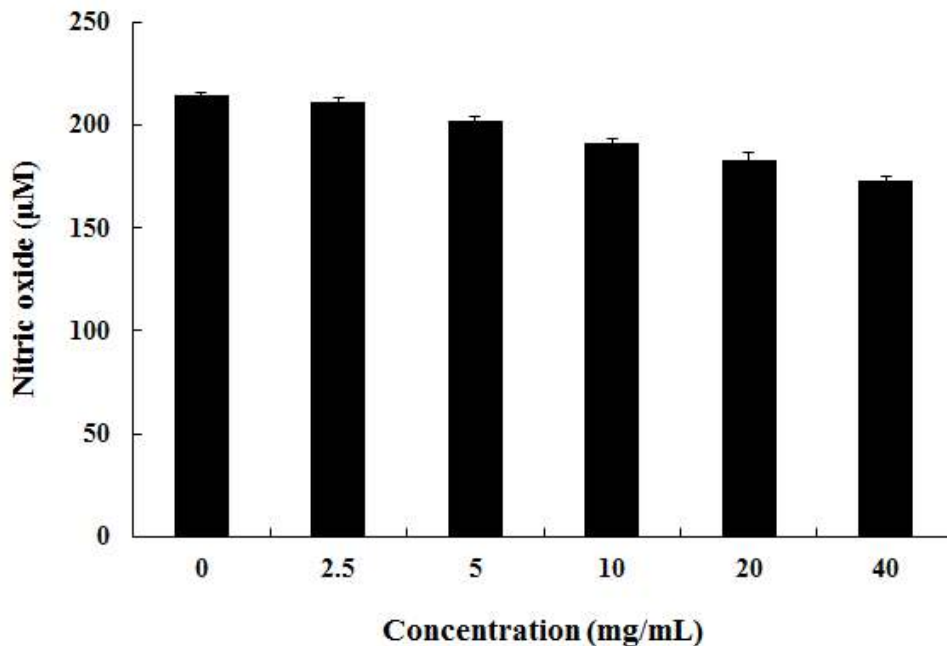


Figure 3-14. 고농도 분지아미노산의 수용액의 NO 소거능

- 실험결과, 음성 대조군(D.W.)에서는 214.89±1.44 µM의 NO가 생성 되었으며, 농도의존적으로(211.54±1.97, 202.25±2.05, 191.36±2.13, 183.36±3.76, 172.74±2.35 µM,  $p<0.05$ ) NO의 생성이 저해되었고 40 mg/mL의 농도에서는 20%정도의 NO 생성 저해율을 보였으며 분지아미노산 수용액은 이전과 같이 간접적인 항염 활성의 가능성이 있는 것으로 사료됨.
- 1차 년도의 SNP assay에서 각각의 분지아미노산은 NO 소거능을 가지고 있음을 확인한 바 있으며, 이로 인해 분지아미노산 혼합 수용액 또한 NO 소거능을 가지고 있음을 확인할 수 있었고, 또한 적절한 유화제 또는 안정제의 첨가를 통해 분지아미노산 에멀전의 용해도, 분산안정성 향상에 기여할 수 있으며, NO 소거능과 같은 기능성 또한 증대될 수 있다고 사료됨.

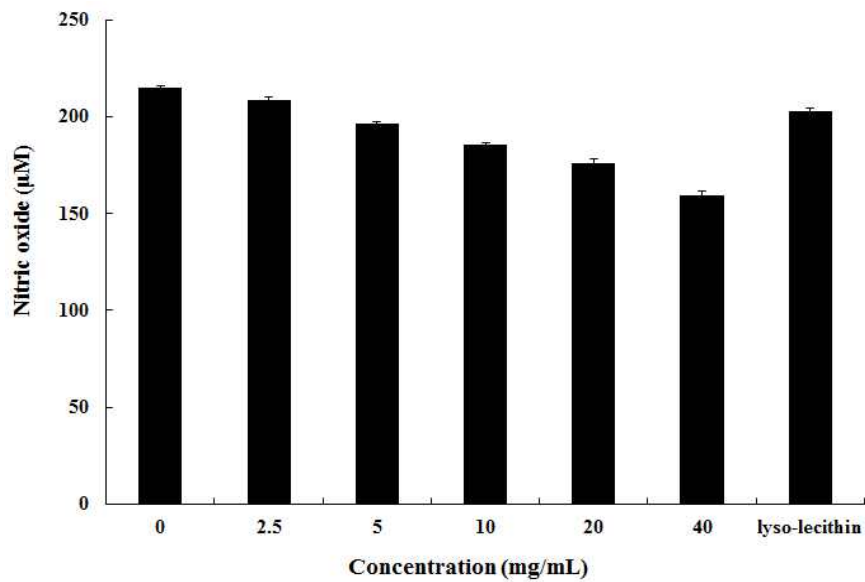


Figure 3-15. lysolecithin을 안정제로 첨가한 분지아미노산 에멀전의 NO 소거능.

- 음성 대조군(D.W.)에서는  $214.89 \pm 1.44$   $\mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었으며, 모든 군 중에서 가장 많은 양의 NO가 생성됨.
- 분지아미노산이 첨가 되지 않은 0.04% lysolecithin buffer의 경우  $202.95 \pm 1.38$   $\mu\text{M}$ 의 NO 생성량을 보였으며 약간의 NO 소거능을 보였었고. lysolecithin이 안정제로 첨가된 분지아미노산 에멀전의 경우 40 mg/mL의 농도에서 기존의 분지아미노산 수용액보다 유의적으로 향상된 55%의 NO 소거능( $p < 0.05$ )을 보였으며 이는 단순한 lysolecithin의 첨가에 기인하는 것으로 사료되며 시너지 효과는 없는 것으로 생각됨.

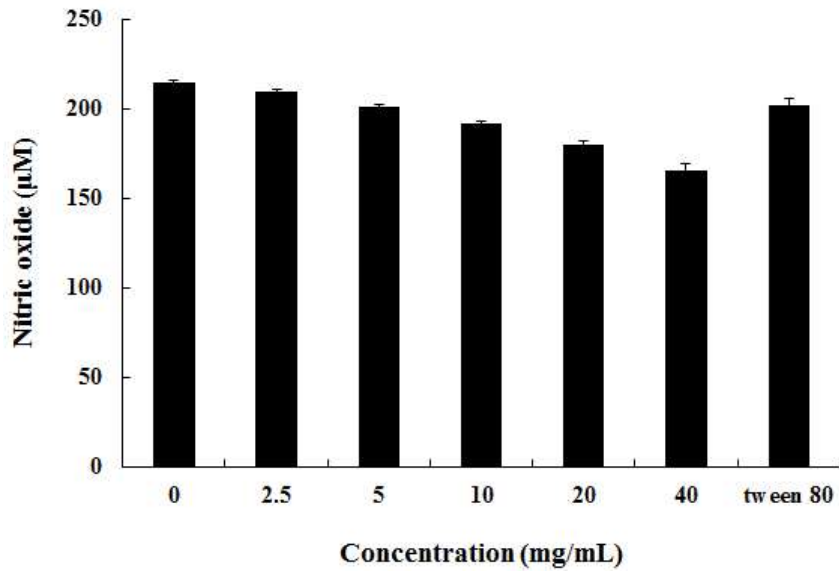


Figure 3-16. Tween 80이 안정제로 첨가된 분지아미노산 에멀전의 NO 소거능.

- 음성 대조군(D.W.) 에서는 214.89±1.44 µM의 NO가 생성되었으며, 모든 군 중에서 가장 많은 양의 NO가 생성됨.
- 분지아미노산이 첨가 되지 않은 0.04% Tween 80의 경우 202.05±3.72 µM 의 NO 생성량을 보였으며 약간의 NO 소거능을 보였고 Tween 80이 안정제로 첨가된 에멀전의 경우 기존의 분지아미노산 수용액보다 유의적으로 향상된 NO 소거능(p<0.05)을 보였으며 이는 단순한 Tween 80의 첨가에 기인하는 것으로 사료되며 시너지 효과는 없는 것으로 사료됨.
- 또한 lysolecithin의 경우보다 낮은 NO 소거능을 나타내는 것으로 보아 lysolecithin에 비해 분지아미노산 에멀전의 분산 안정성에 미치는 영향이 낮은 것으로 사료됨.



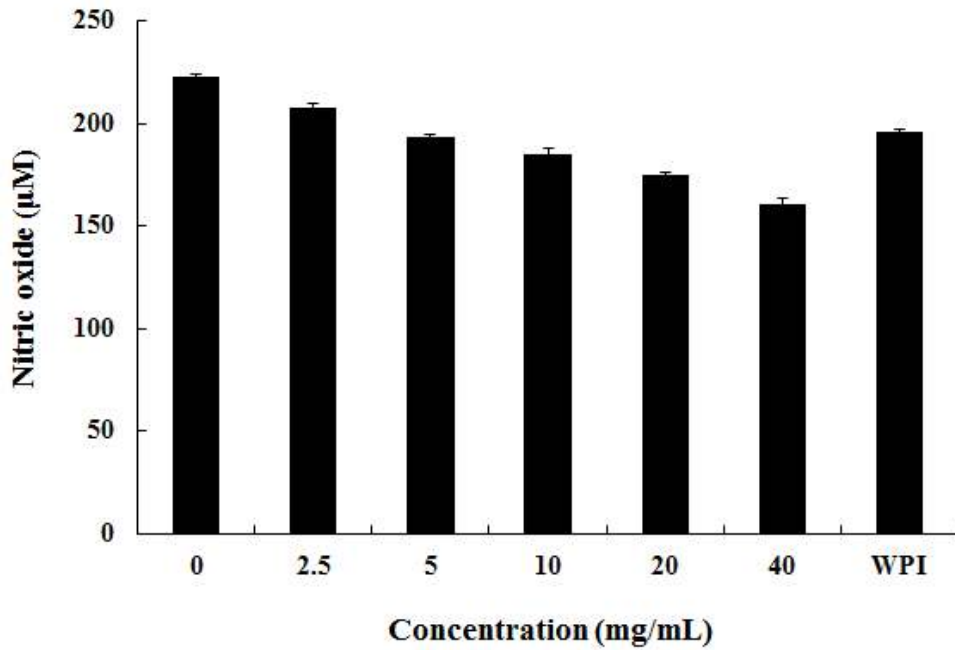


Figure 3-17. WPI가 안정제로 첨가된 분지아미노산 에멀전의 NO 소거능.

- 음성 대조군(D.W.) 에서는 222.38±1.88 µM의 NO가 생성되었으며, 모든 군 중에서 가장 많은 양의 NO가 생성됨.
- 분지아미노산이 첨가 되지 않은 0.2% whey protein isolated 의 경우 195.67±1.48 µM의 NO 생성량을 보였으며 유의적인 NO 소거능( $p < 0.05$ )을 보였고 WPI이 안정제로 첨가된 에멀전의 경우 기존의 분지아미노산 수용액보다 향상된 NO 소거능( $p < 0.05$ )을 보였으며 이는 단순한 WPI의 첨가에 기인하는 것으로 사료되며 시너지 효과는 없는 것으로 사료됨.
- lysolecithin이나 Tween 80의 경우보다 중량대비 높은 농도로 첨가되었기 때문에 이와 같은 결과가 나온 것으로 사료되며 앞의 유화제들과 동일한 농도로 첨가했을 때의 결과를 비교해봐야 할 것으로 사료됨.

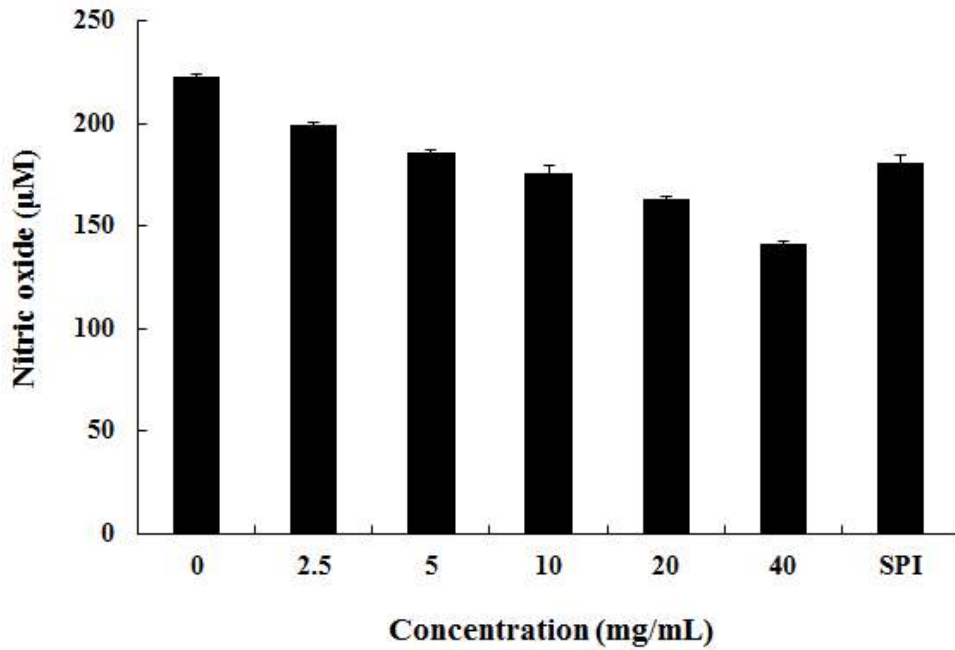


Figure 3-18. SPI가 안정제로 첨가된 분지아미노산 에멀전의 NO 소거능.

- 음성 대조군(D.W.) 에서는 222.38±1.88 µM의 NO가 생성되었으며, 모든 군 중에서 가장 많은 양의 NO가 생성됨
- 분지아미노산이 첨가 되지 않은 0.2% soy protein isolated의 경우 180.62±4.26 µM의 NO 생성량을 보였으며 유의적인 NO 소거능( $p<0.05$ )을 보였고 SPI이 안정제로 첨가된 에멀전의 경우 기존의 분지아미노산 수용액보다 향상된 NO 소거능( $p<0.05$ )을 보였으며 40 mg/mL 농도에서 각 시료들 중 가장 높은 NO소거능(81.52%,  $p<0.05$ )을 보였는데 이는 단순한 SPI의 첨가에 기인하는 것으로 사료되며 시너지 효과는 없는 것으로 사료됨.
- Lysolecithin이나 Tween 80의 경우보다 중량대비 높은 농도로 첨가되었기 때문에 이와 같은 결과가 나온 것으로 사료되며 앞의 유화제들과 동일한 농도로 첨가했을 때의 결과를 비교해봐야 할 것으로 사료됨.

(나) *Ex vivo* 상에서의 항염 활성 검증

① Nitric oxide 생성 저해 활성

- 대식세포인 RAW 264.7 murine macrophages는 염증반응에 관여하여 nitric oxide를 생성하는 세포이고 생리학적으로 기저상태에서의 NO는 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 함.
- 그러나 염증 반응이 일어나면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 과량의 NO가 생성이 되고, 이는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시키는 등의 문제점을 야기할 수 있음.
- 따라서 이러한 LPS와 같은 물질에 의한 급성 염증 유도시의 과량의 NO의 생성을 저해하는 정도를 측정함으로써 항염증 효과의 가능성을 간접적으로 측정 가능함.

- 실험에 사용된 RAW 264.7 murine macrophages는 한국세포주은행(KCLB, Seoul)으로부터 분양받아 DMEM medium에 10% FBS(fetal bovine serum), 100 unit/mL의 penicillin, 100 µg/mL의 streptomycin을 첨가하여 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며 confluence 80-90%에서 계대 배양하여 사용함.
- LPS를 이용하여 고농도 수용액 및 에멀전화 분지아미노산의 NO 생성 저해 정도를 측정하기 이전에 RAW 264.7 murine macrophage에 대한 분지아미노산의 세포독성과 이로 인한 NO 생성 저해를 알아보기 위해 제 1협동기관에서 받은 분지아미노산 수용액과 에멀전(lysolecithin, Tween 80, soy protein isolated, whey protein isolated) 2.5, 5, 10, 20, 40 mg/mL 농도로 대식세포 RAW 264.7 murine macrophages에 LPS 1 µg/mL와 함께 배양하고 MTT assay를 실시하여 그 세포독성을 확인하였고 결과는 Figure 3-19~23에 나타냄.

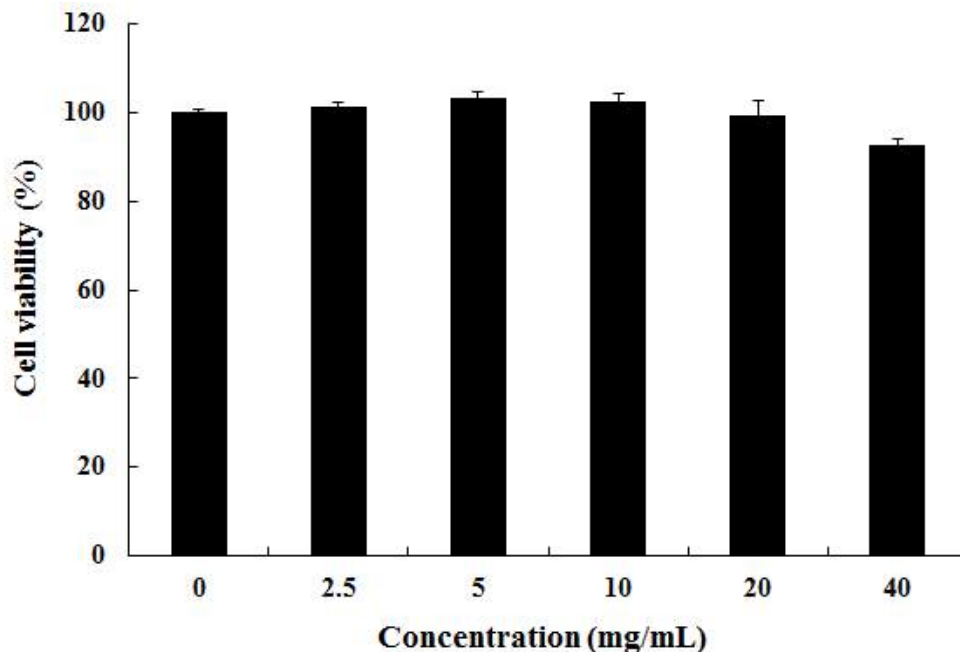


Figure 3-19. RAW 264.7 murine macrophage에 대한 분지아미노산 수용액의 세포독성.

- 실험 결과, 분지아미노산 수용액은 음성 대조군(D.W.)에 대해서 20 mg/mL의 농도까지는 유의적인 세포 독성을 보이지 않았고 40 mg/mL의 농도에 한해서 7.16±1.36%의 독성을 보였으나, 10% 이내의 세포 독성은 일반적으로 용인 가능한 범위로 이후 실험에 있어서도 적용하기로 함.

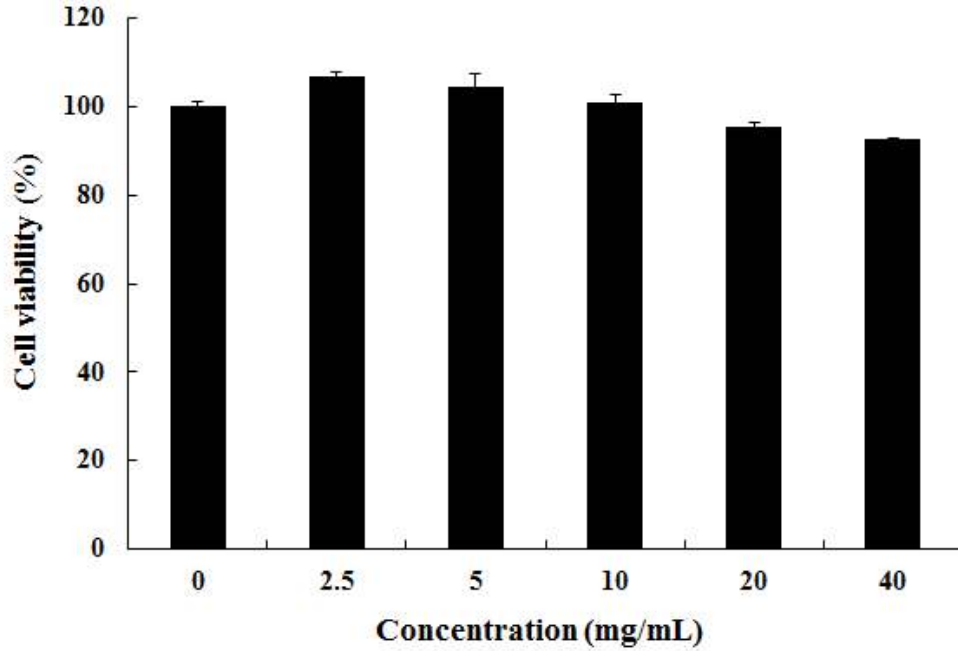


Figure 3-20. RAW 264.7 murine macrophage에 대한 lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전의 세포독성.

- 실험 결과, lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전은 음성 대조군(D.W.)에 대해서 10 mg/mL의 농도까지는 유의적인 세포 독성을 보이지 않았고 20, 40 mg/mL의 농도에서 4.54±1.13, 7.49±0.18%의 독성을 보였으나, 10% 이내의 세포 독성은 일반적으로 용인 가능한 범위이며 분지아미노산 수용액과 비교했을 때, 세포 독성에 있어 유의적인 차이를 보이지 않았기 때문에 이후 실험에 있어서도 적용하기로 함.

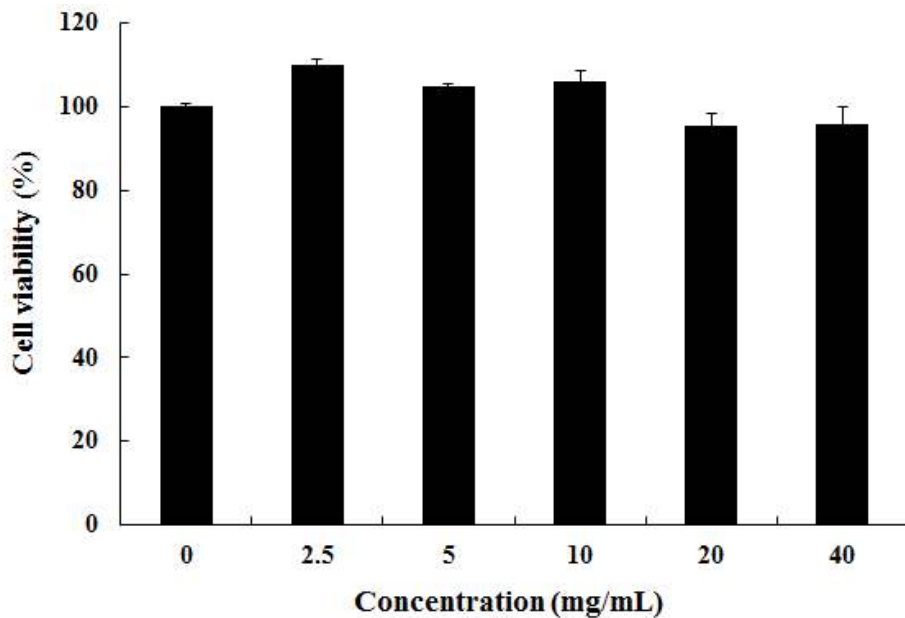


Figure 3-21. RAW 264.7 murine macrophage에 대한 Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전의 세포 독성.

- 실험 결과, Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전은 음성 대조군(D.W.)에 대해서 10 mg/mL의 농도까지는 유의적인 세포 독성을 보이지 않았고 20, 40 mg/mL의 농도에서  $4.48 \pm 4.00$ ,  $4.20 \pm 0.28\%$ 의 독성을 보였으나, 10% 이내의 세포 독성은 일반적으로 용인 가능한 범위이며 분지아미노산 수용액과 비교했을 때, 세포 독성에 있어 유의적인 차이를 보이지 않았기 때문에 이후 실험에 있어서도 적용하기로 함.
- 분지아미노산이 첨가되지 않고, lysolecithin, Tween 80만 첨가된 buffer에서도 음성 대조군(D.W.)과 비교했을 때 RAW 264.7 murine macrophage에 대해서 세포 독성을 보이지 않음.

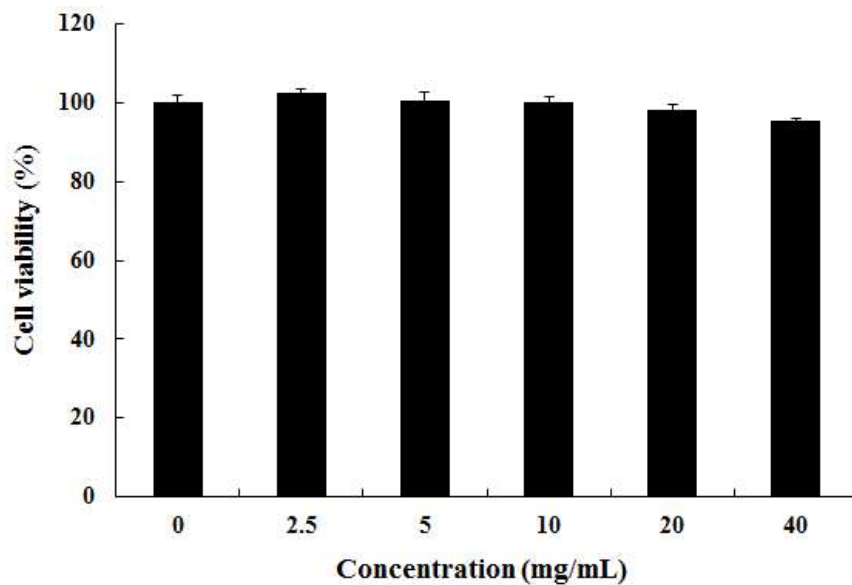


Figure 3-22. RAW 264.7 murine macrophage에 대한 WPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 세포 독성.

- 실험 결과, WPI 첨가 분지아미노산 에멀전은 음성 대조군(D.W.)에 대해서 10 mg/mL의 농도까지는 유의적인 세포 독성을 보이지 않았고 20, 40 mg/mL의 농도에서  $1.74 \pm 1.21$ ,  $4.58 \pm 0.63\%$ 의 독성을 보였으나, 10% 이내의 세포 독성은 일반적으로 용인 가능한 범위이며 분지아미노산 수용액과 비교했을 때, 세포 독성에 있어 유의적인 차이를 보이지 않았기 때문에 이후 실험에 있어서도 적용하기로 함.

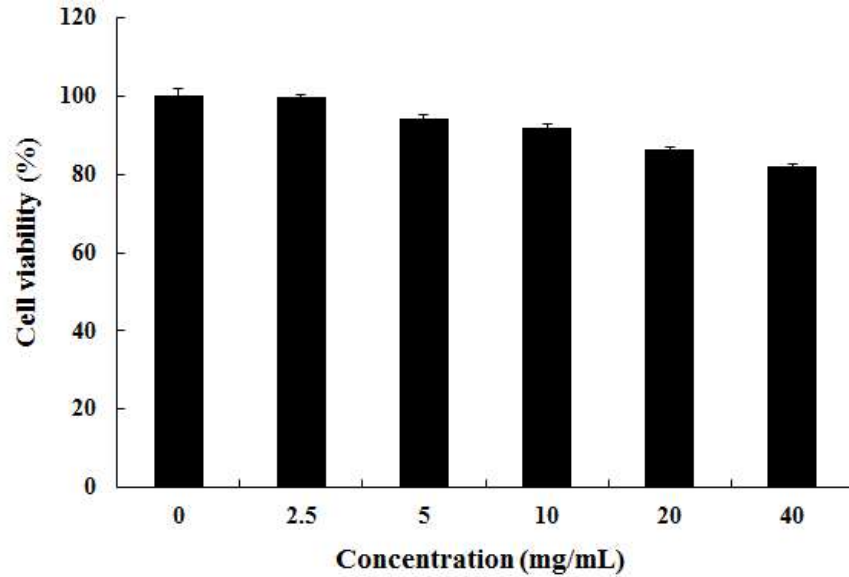


Figure 3-23. RAW 264.7 murine macrophage에 대한 SPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 세포 독성,

- 실험 결과, SPI 첨가 분지아미노산 에멀전은 음성 대조군(D.W.)에 대해서 10 mg/mL의 농도까지는 유의적인 세포 독성을 보이지 않았고 20, 40 mg/mL의 농도에서  $13.80 \pm 0.96$ ,  $17.96 \pm 0.68\%$ 의 독성을 보임.
- 분지아미노산 수용액군, WPI 첨가군과 비교했을 때, 유의적인 세포 독성을 나타냈으며, 분지아미노산이 첨가되지 않은 SPI buffer에서도  $12.62 \pm 1.17\%$ 의 세포 독성을 나타냄.
- 따라서 RAW 264.7 murine macrophage에 대한 독성은 SPI에서 기인하는 것으로 사료되며 이후 실험을 진행함에 있어 세포 독성 결과를 고려하여 해석하기로 함
- 분지아미노산이 대식세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RAW 264.7 murine macrophages를  $2 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고 고농도 분지아미노산 수용액 및 에멀전(2.5, 5, 10, 20, 40 mg/mL)과 함께 2시간 동안 전배양함.
- 이후 염증유발 물질인 LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ )를 처리하여 24시간 동안 배양시킨 뒤, Griess 시약을 동량의 상등액과 반응시켜 배양액 내에 존재하는 NO(nitric oxide)의 양을 측정하여 이를 통해 분지아미노산 고농도 수용액 및 에멀전 시료들이 LPS로 유도된 RAW 264.7 murine macrophages의 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였고, 그 결과는 Figure 3-24~28에 나타내었다. 생성된 NO의 양은 배지에 용해된  $\text{NaNO}_2$ 의 각 농도대비 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 작성하고 이 표준곡선의 회귀식을 통해 산출함.

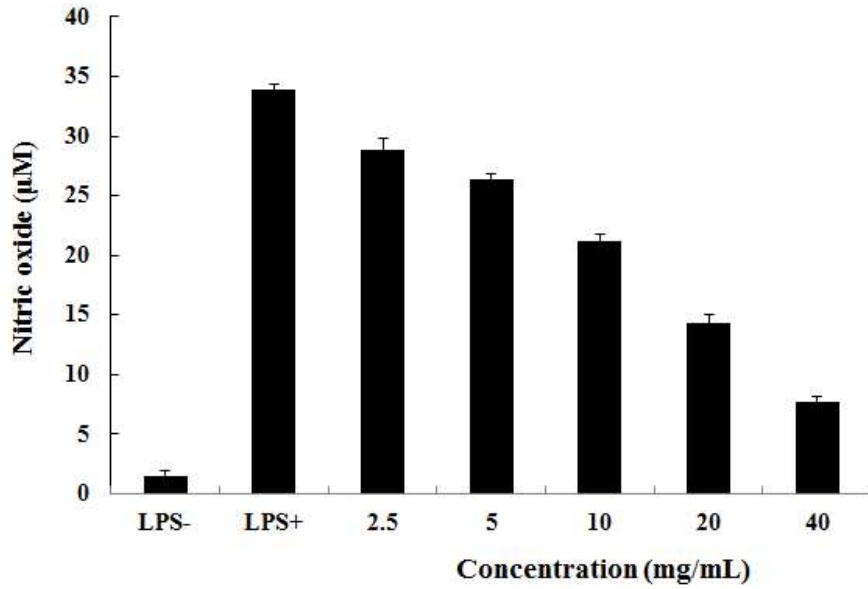


Figure 3-24. 분지아미노산 수용액이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 NO 생성에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군(LPS+)은  $33.88 \pm 0.44 \mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었으며 음성 대조군에(LPS-,  $1.52 \pm 0.46 \mu\text{M}$ ) 비해 유의적으로 NO의 생성이 유도되었고( $p < 0.001$ ) 분지아미노산 수용액은 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) NO의 생성을 감소시켰으며 40 mg/mL의 농도에서는  $7.74 \pm 0.40 \mu\text{M}$ 의 NO를 생성하였으며 양성 대조군 대비 77.15%의 NO 생성 저해율을 보임.

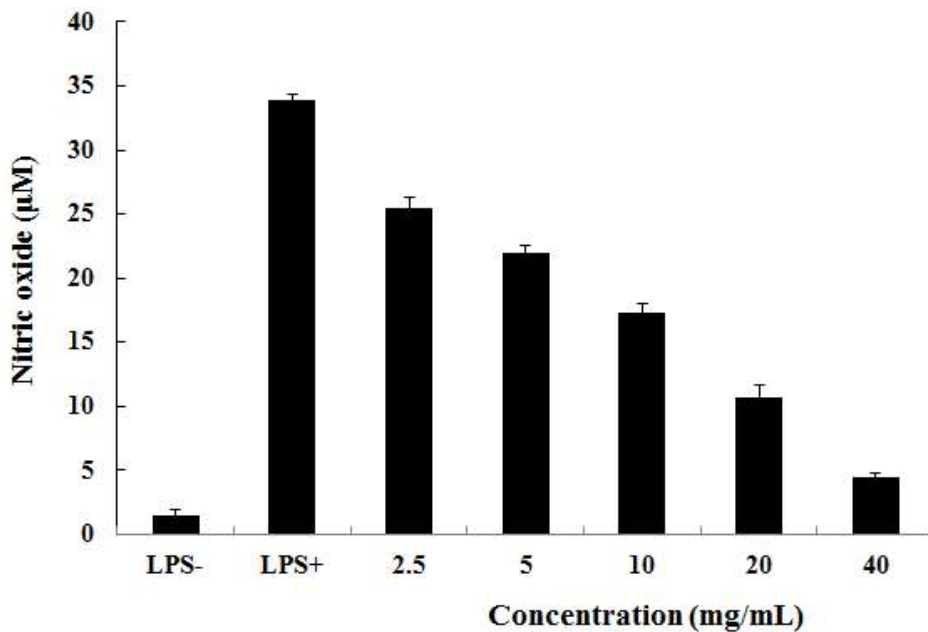


Figure 3-25. lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 NO 생성에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군(LPS+)은  $33.88 \pm 0.44 \mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었으며 음성 대조군에(LPS-,  $1.52 \pm 0.46 \mu\text{M}$ ) 비해 유의적으로 NO의 생성이 유도되었고( $p < 0.001$ ) lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전은 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) NO의 생성을 감소시켰으며 40 mg/mL의 농도에서는  $4.50 \pm 0.25 \mu\text{M}$ 의 NO를 생성하였으며 양성 대조군 대비 86.73%의 NO 생성 저해율을 보였으며 기존 분지아미노산 수용액 보다 유의적으로 효과적임( $p < 0.05$ ).
- 분지아미노산을 제외한 lysolecithin buffer에서도 12.48  $\mu\text{M}$ 의 NO를 생성하며 NO 생성 억제능을 보였고 이로 인해 SNP assay에서와 마찬가지로 lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전이 기존 분지아미노산 수용액보다 좋은 결과를 보이는 것이라 사료됨.

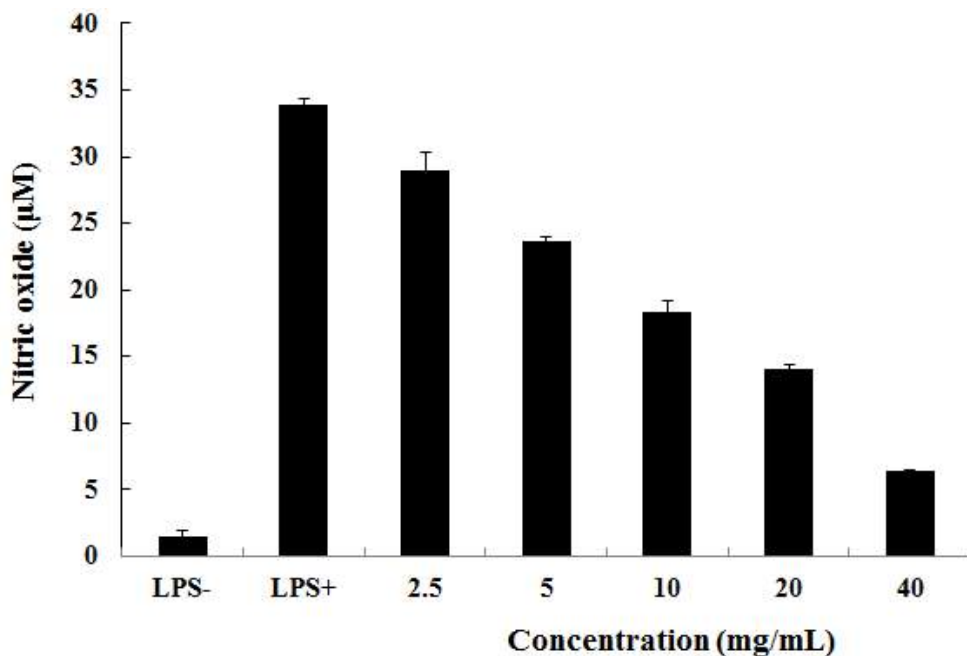


Figure 3-26. Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 NO 생성에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군(LPS+)은  $33.88 \pm 0.44 \mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었으며 음성 대조군에(LPS-,  $1.52 \pm 0.46 \mu\text{M}$ ) 비해 유의적으로 NO의 생성이 유도 되었고( $p < 0.001$ ) Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전은 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) NO의 생성을 감소시켰으며 40 mg/mL의 농도에서는  $6.37 \pm 0.13 \mu\text{M}$ 의 NO를 생성하였고 양성 대조군 대비 81.20%의 NO 생성 저해율을 보였으며 기존 분지아미노산 수용액 보다 유의적으로 효과적임( $p < 0.05$ ).
- 분지아미노산을 제외한 Tween 80 buffer에서도 12.82  $\mu\text{M}$ 의 NO를 생성하며 NO 생성 억제능을 보였고 이로 인해 SNP assay에서와 마찬가지로 Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전이 기존 분지아미노산 수용액보다 좋은 결과를 보이는 것이라 사료됨.



- lysolecithin, Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전 모두 기존 분지아미노산 수용액보다 좋은 결과를 보이고, 분지아미노산이 빠진 두 buffer를 양성 대조군과 비교했을 때 유의적인 차이가 없는 것으로 미루어 lysolecithin이 Tween 80보다 분지아미노산 에멀전의 분산 안정성과 RAW 264.7 murine macrophage에서의 이용성에 보다 효과적인 것으로 사료됨.

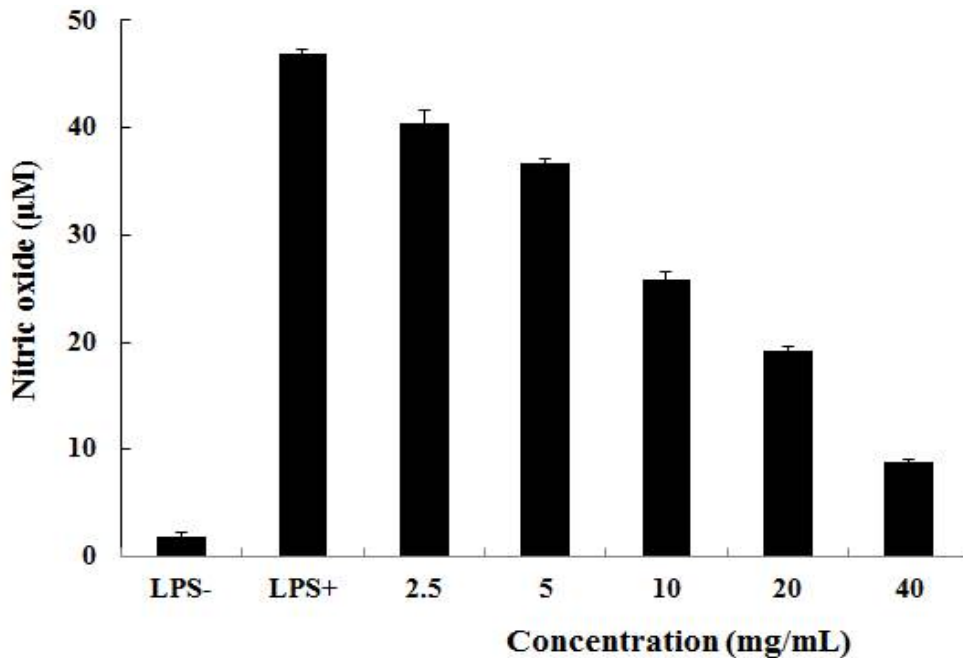


Figure 3-27. WPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 NO 생성에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군(LPS+)은  $46.93 \pm 0.84 \mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었으며 음성 대조군에(LPS-,  $1.86 \pm 0.21 \mu\text{M}$ ) 비해 유의적으로 NO의 생성이 유도되었고( $p < 0.001$ ) WPI 첨가 분지아미노산 에멀전은 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) NO의 생성을 감소시켰으며 40 mg/mL의 농도에서는  $8.86 \pm 0.41 \mu\text{M}$ 의 NO를 생성하였고 양성 대조군 대비 81.11%의 NO 생성 저해율을 보였으며 10 mg/mL의 이상의 농도에 한해서 기존 분지아미노산 수용액 보다 유의적으로 효과적임( $p < 0.05$ ).
- 분지아미노산을 제외한 WPI에서는  $43.53 \pm 0.64 \mu\text{M}$ 의 NO를 생성하며 미약한 NO 생성 억제능을 보였으나 WPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 경우, 기존 분지아미노산 수용액에 비해 효과적인 것으로 미루어 RAW 264.7 murine macrophage에서 분지아미노산을 이용함에 있어 WPI와 약간의 시너지스틱 상호작용이 있는 것으로 사료됨.
- WPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 경우, 저농도에 한해서는(2.5, 5 mg/mL) 기존 분지아미노산 수용액에 비해 효과적이지 못한 결과를 보였는데 이는 저농도의 whey protein이 RAW 264.7 murine macrophage와 같은 면역계 세포의 작용에 어떤 영향을 미치는지에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 사료됨.

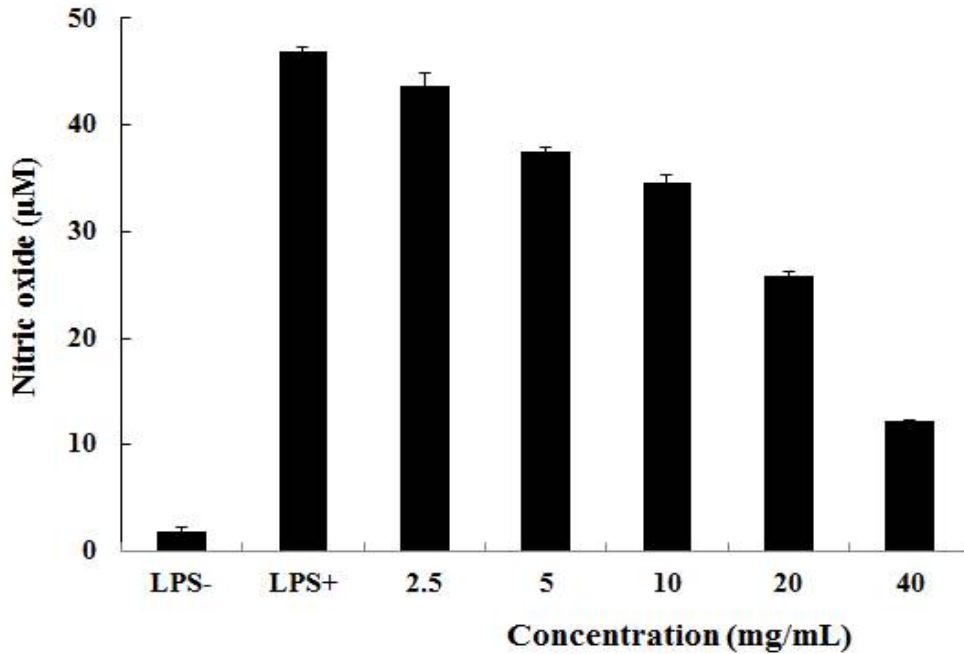


Figure 3-28. SPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 NO 생성에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군(LPS+)은  $46.93 \pm 0.84 \mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었으며 음성 대조군에(LPS-,  $1.86 \pm 0.21 \mu\text{M}$ ) 비해 유의적으로 NO의 생성이 유도되었고( $p < 0.001$ ) SPI 첨가 분지아미노산 에멀전은 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) NO의 생성을 감소시켰으며 40 mg/mL의 농도에서는  $12.22 \pm 0.99 \mu\text{M}$ 의 NO를 생성하였고 양성 대조군 대비 73.95%의 NO 생성 저해율을 보였으며 40 mg/mL의 농도에 한해서 기존 분지아미노산 수용액 보다 유의적으로 효과적임( $p < 0.05$ ).
- 하지만 이는 SPI가 RAW 264.7 murine macrophage에 대해 독성을 보이기 때문에, 이 같은 결과가 나온 것으로 사료되며 생체 이용률이나 항염 활성 증대의 관점에서 기존 분지아미노산에 비해 개선된 부분이 없음을 알았음을 도출함.

② RT-PCR assay를 통한 gel electrophoresis와 Real-time qPCR

- 제 1협동기관으로부터 제공받은 분지아미노산 시료(고농도 수용액, 에멀전)가 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 murine macrophage에서 염증 관련 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 세포에서 mRNA를 추출하고 RT-PCR과 gel electrophoresis를 이용하여 image blotting하였으며 Real-time qPCR을 이용하여 상대적 정량을 실시함.
- RAW 264.7 murine macrophage는 10% FBS(fetal bovine serum), 100 unit/mL의 penicillin, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 streptomycin을 첨가하여 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며 confluence 80-90%에서 계대 배양하여 사용함.
- RAW 264.7 murine macrophage는 6-well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well 농도로 분주되었으며 5, 10, 20, 40 mg/mL 농도의 분지아미노산 수용액, 에멀전(lysolecithin, polysorbate 80, soy protein isolated, whey protein isolated) 과

함께 24시간 배양함.

- 이 후 LPS(1 µg/mL)로 염증을 유도하였으며 24시간 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하였다. 분지아미노산 시료 대신 D.W.를 처리하고 LPS를 유도하지 않은 균을 음성 대조군으로, LPS를 유도한 균을 양성 대조군으로 설정함.
- 배양액을 제거하고 4°C PBS로 2회 세척한 후, RNeasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 RNA를 분리하였으며 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Scientific Pierce, MA, USA)를 이용하여 총 1 µg의 cDNA로 합성함.
- 합성된 cDNA를 주형 가닥으로 Taq PCR master mix(2×), RNase free water, sense primer, anti-sense primer과 혼합하여 총 부피 20 µL으로 하고, 95°C(denaturation) 5분, 20-25 cycle을 95°C 30초, 각 유전자의 프라이머에 해당하는 annealing 온도 30초, 72°C 45초 실행하고 마지막 신장 72°C 10분으로 RT-PCR을 실행하여 기존 주형가닥을 증폭함.
- 증폭한 산물은 1.2% agarose gel을 이용하여 150 V에서 전기영동을 실행하였으며 blotting 결과는 Figure 3-29~33에 나타냄.
- Real-time qPCR assay에서도 RT-PCR과 같이 합성된 cDNA를 주형 가닥으로 SYBR Green master mix(2×), 400 µM primer, RNase free water와 혼합하여 총 부피 20 µL로 하고 95°C 2분, 40 cycle을 95°C 30초, 60°C 30초 실행한 후, 마지막 신장 60°C 20초 조건으로 real-time qPCR을 진행함.
- Housekeeping gene으로 β-actin을 사용하였으며 이를 표준으로 하여 delta delta Cq(ΔΔCq) 분석법을 통해 증폭결과를 구하고 상대적 정량을 실시하였고 qPCR reaction의 melting curve를 확인하여 증폭산물의 purity를 검증하였으며 상대적 정량 결과는 Figure 3-29~58에 나타냄.
- RT-PCR과 Real-time qPCR에서 사용한 염증관련 유전자의 primer의 서열은 Table 3-13에 나타냄.

Table 3-13. 염증 관련 유전자들의 Primer sequences

Gene	Description	Primer sequence
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	sense: 5'-CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C-3' antisense: 5'-GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G-3'
COX-2	Cyclooxygenase-2	sense: 5'-CAC TAC ATC CTG ACC CAC TT-3' antisense: 5'-ATG CTC CTG CTT GAG TAT GT-3'
IL-1β	Interleukine-1β	sense: 5'-CAG GAT GAG GAC ATG AGC ACC-3' antisense: 5'-CTC TGC AGA CTC AAA CTC CAC-3'
IL-6	Interleukine-6	sense: 5'-AGT TGCCTT CTT GGG ACT GA-3' antisense: 5'-TTC TGC AAG TGC ATC ATC GT-3'
IL-10	Interleukine-10	sense: 5'-TAA GGC TGG CCA CAC TTG AG-3' antisense: 5'-AGT TTT CAG GGA TGA AGC GG-3'
β-Actin		sense: 5'-GTG GGC CGC CCT AGG CAC CAG-3' antisense: 5'-GGA GGA AGA GGA TGC GGC AGT-3'

(다) 분지아미노산 수용액

①  $\beta$ -Actin

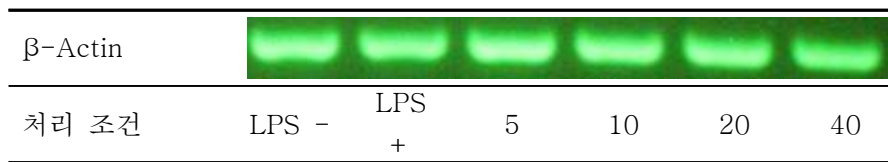


Figure 3-29. 분지아미노산 수용액이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의  $\beta$ -actin mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, house keeping gene 인  $\beta$ -actin의 경우 모든 처리 조건에서 충분히 발현되었으므로 이후의 항염증관련 결과를 논하는데 있어 RAW 264.7 murine macrophage의 대사 장애나 세포 독성에 대한 고려는 배제하기로 함.

② Inducible nitric oxide synthase

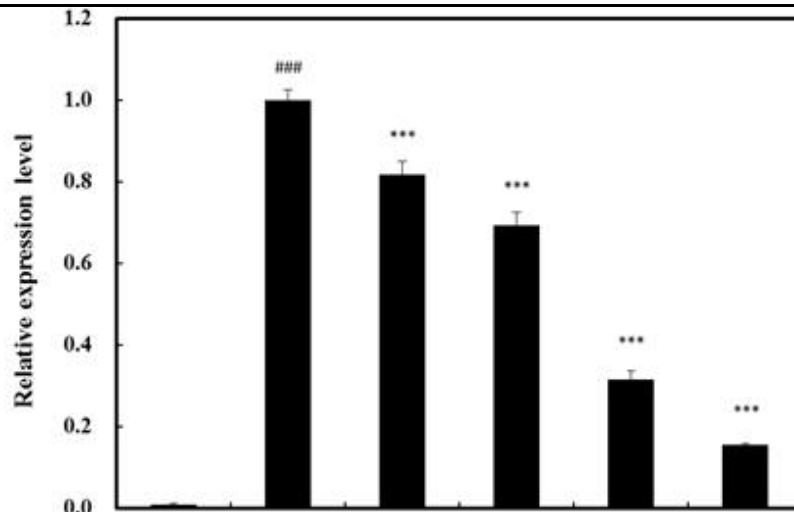
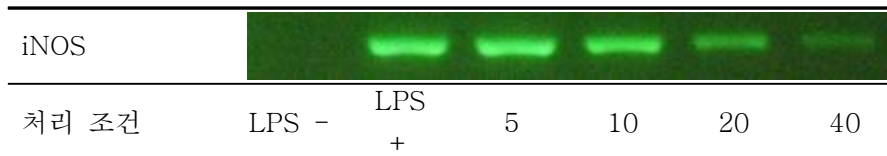


Figure 3-30. 분지아미노산 수용액이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 iNOS mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군은 LPS의 자극에 의해 음성 대조군 보다 iNOS의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). 분지아미노산 수용액의 처리에 의해 양성 대조군에 대해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) iNOS의 발현이 감소하였고 40 mg/mL의 농도에서  $15.15 \pm 0.39\%$ 의 발현율을 보였음.

③ Cyclooxygenase(COX)-2

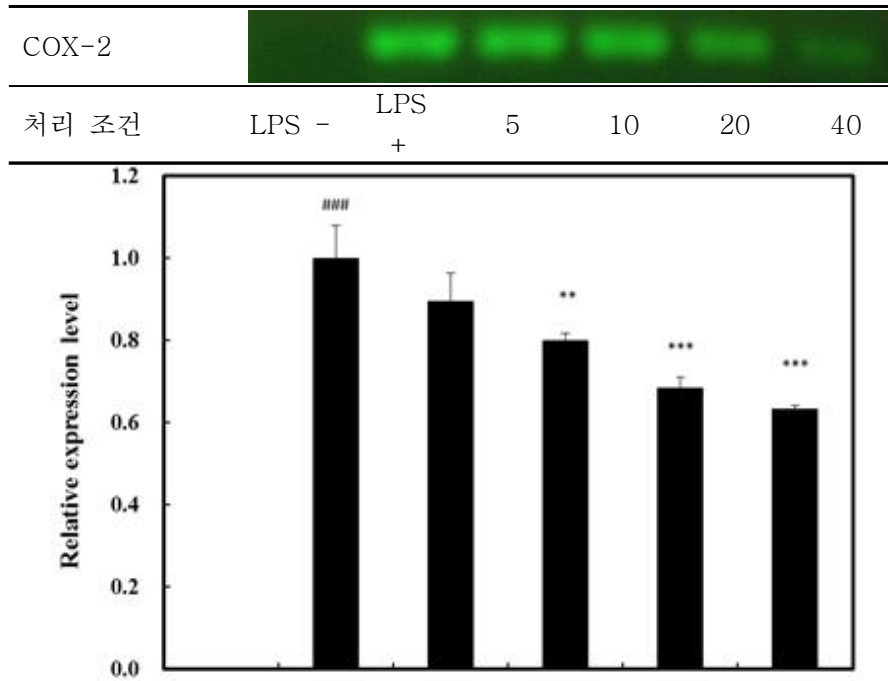
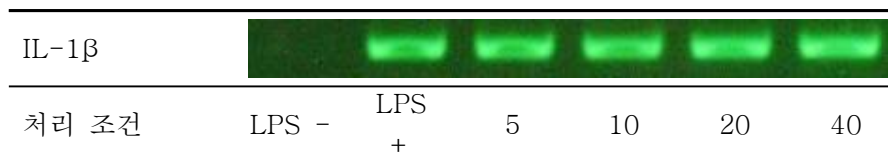


Figure 3-31. 분지아미노산 수용액이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 COX-2 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군은 LPS의 자극에 의해 음성 대조군 보다 COX-2의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). 분지아미노산 수용액의 처리에 의해 양성 대조군에 대해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) COX-2의 발현이 감소하였고 40 mg/mL의 농도에서  $63.24 \pm 0.80\%$ 의 발현율을 보였음.

④ Interleukine-1 $\beta$



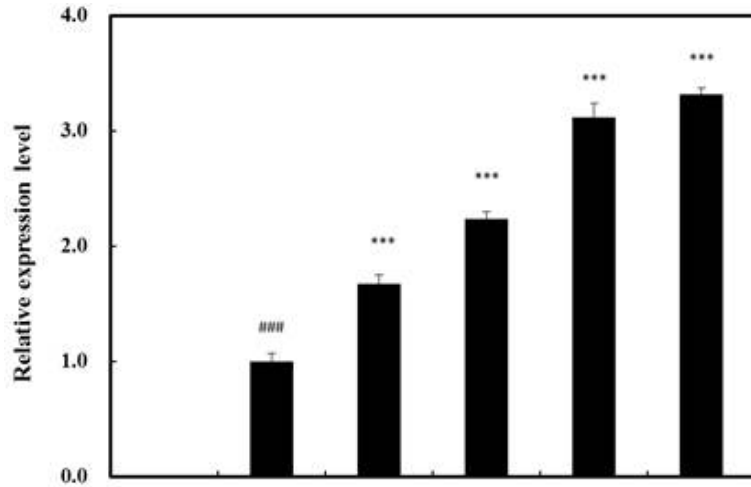


Figure 3-32. 분지아미노산 수용액이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현에 미치는 영향

- 실험 결과, LPS의 처리에 의해 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 IL-1 $\beta$ 의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). 고농도 분지아미노산 수용액의 처리는 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 그 발현이 증가되었으며 40 mg/mL 처리에서 양성 대조군 대비 331.54 $\pm$ 5.53%의 발현율을 보임.

⑤ Interleukin-6

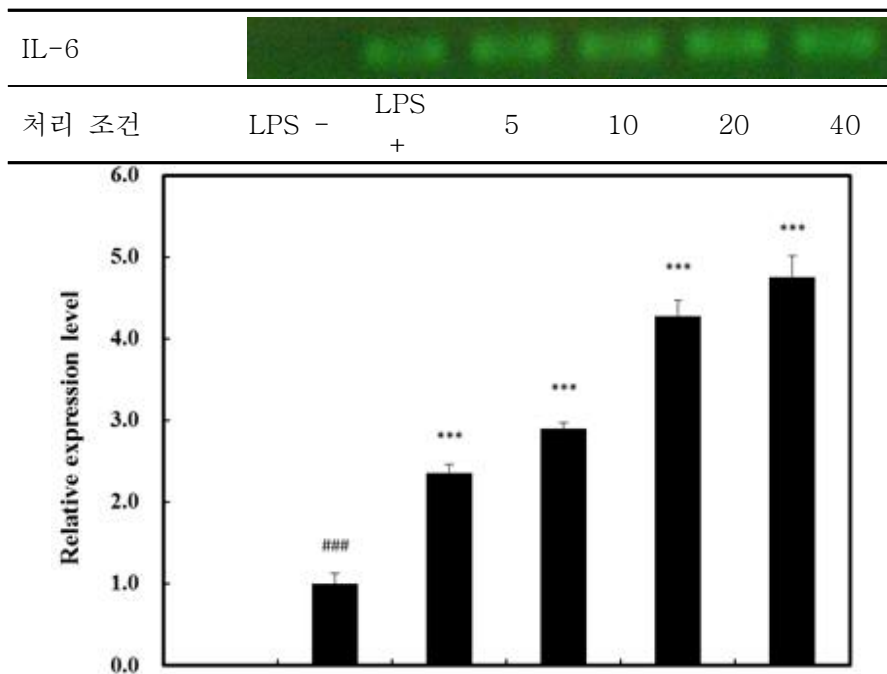


Figure 3-33. 분지아미노산 수용액이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-6 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, LPS의 처리에 의해 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 IL-6의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). 고농도 분지아미노산 수용액의 처리는 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 그 발현이 증가되었으며 40 mg/mL 처리에서 양성 대조군 대비  $475.94 \pm 26.11\%$ 의 발현율을 보임.

⑥ Interleukin-10

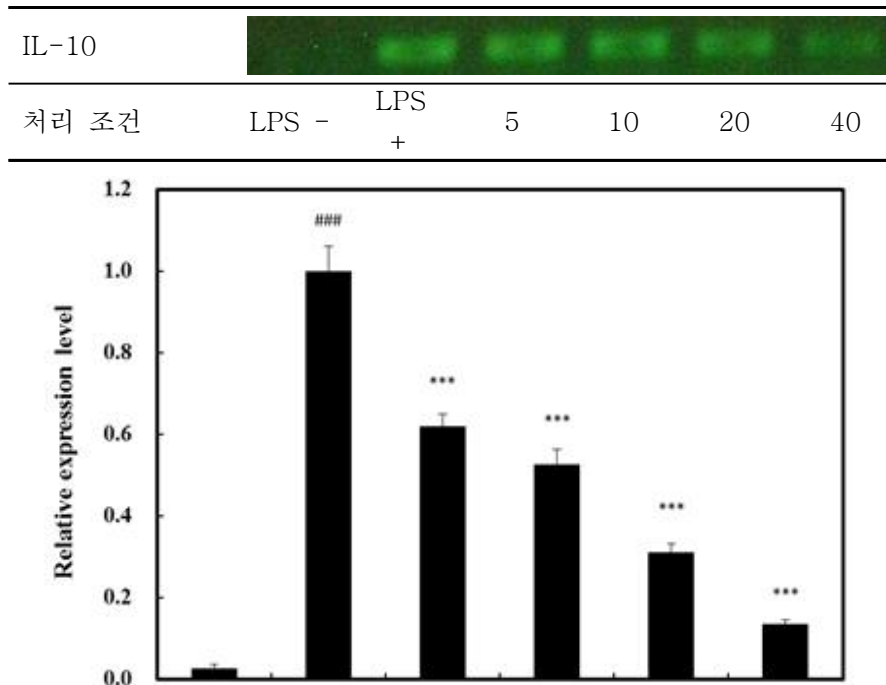


Figure 3-34. 분지아미노산 수용액이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-10 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- NF- $\kappa$ B를 억제하여 anti-inflammatory 효과를 나타내는 사이토카인인 IL-10의 경우, 양성 대조군은 LPS 처리에 의해 음성 대조군에 비해 유의적으로 그 발현량이 증가함을 확인하였으며 분지아미노산 수용액의 처리는 그 발현량을 양성 대조군 대비 농도 의존적으로 감소시킴을 확인함.
- 선행 연구에서 보고된 바와 같이 고농도의 분지아미노산의 처리는 macrophage 세포에서 염증을 매개하는 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현량을 증가시키고, 항염증 효과를 나타내는 사이토카인인 IL-10의 발현은 감소시키는 것을 확인함.
- 분지아미노산의 처리 농도가 증가할수록 iNOS와 COX-2의 저해율은 증가하지만 염증을 매개하는 사이토카인은 발현율이 증가하는 기작에 대한 후속 연구가 필요하다고 사료됨.

(라) Lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전

①  $\beta$ -Actin

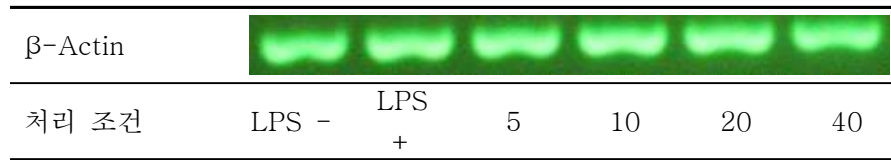


Figure 3-35. lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의  $\beta$ -actin mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, housekeeping gene인  $\beta$ -actin의 경우 모든 처리 조건에서 충분히 발현되었으므로 이후의 항염증관련 결과를 논하는데 있어 RAW 264.7 murine macrophage의 대사 장애나 세포 독성에 대한 고려는 배제하기로 함.

② Inducible nitric oxide synthase

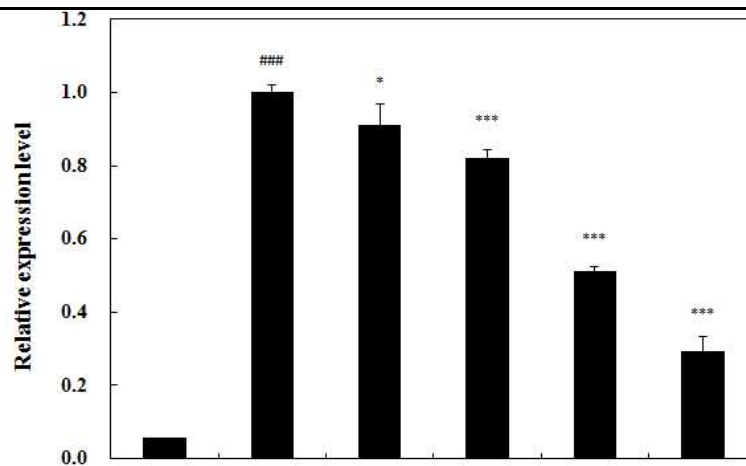
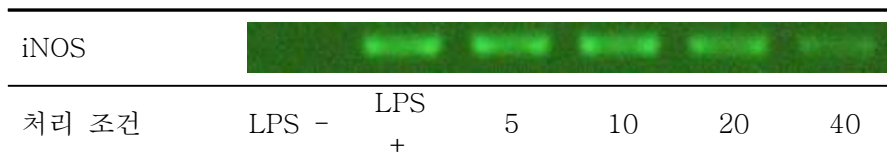


Figure 3-36. lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 iNOS mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군은 LPS의 자극에 의해 음성 대조군 보다 iNOS의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). Lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리에 의해 양성 대조군에 대해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) iNOS의 발현이 감소하였고 40 mg/mL의 농도에서  $29.22 \pm 4.02\%$ 의 발현율을 보였음.
- 동일한 실험 배치 상에서 분지아미노산 수용액에 비해 유의적으로 효과적임을 확인함.



③ Cyclooxygenase(COX)-2

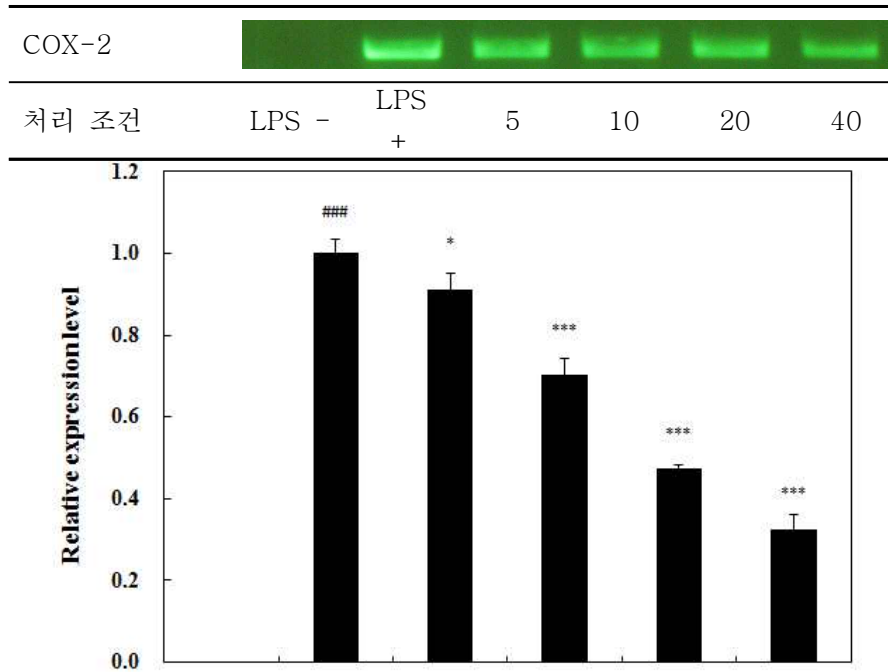
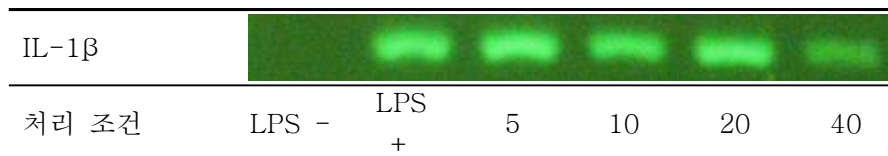


Figure 3-37. lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 COX-2 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군은 LPS의 자극에 의해 음성 대조군 보다 COX-2의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리에 의해 양성 대조군에 대해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) COX-2의 발현이 감소하였고 40 mg/mL의 농도에서  $32.44 \pm 3.71\%$ 의 발현율을 보였음.
- 동일한 실험군 상의 분지아미노산 수용액에 비해 효과적임을 확인함( $p < 0.001$ ).

④ Interleukine-1 $\beta$



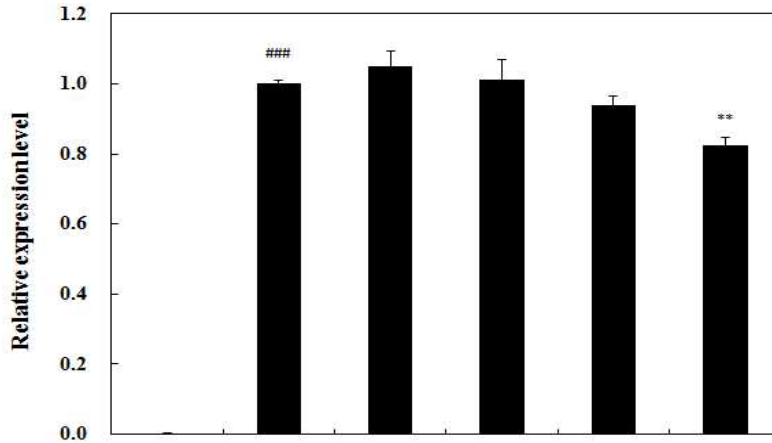


Figure 3-38. lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, LPS의 처리에 의해 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 IL-1 $\beta$ 의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리는 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 그 발현을 감소시키는 경향을 보였으며 40 mg/mL 처리에서 양성 대조군 대비 82.38 $\pm$ 2.22%의 발현율을 보임.

⑤ Interleukin-6

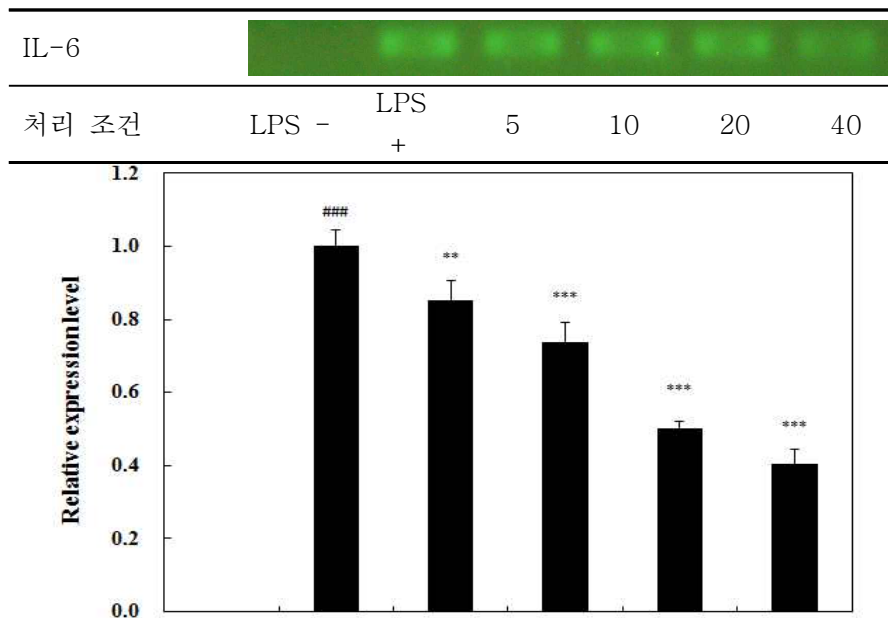


Figure 3-39. lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-6 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, LPS의 처리에 의해 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 IL-6의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리는 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 그 발현이 감소하였으며 40 mg/mL 처리에서 양성 대조군 대비  $40.34 \pm 4.03\%$ 의 발현율을 보임.

⑥ Interleukin-10

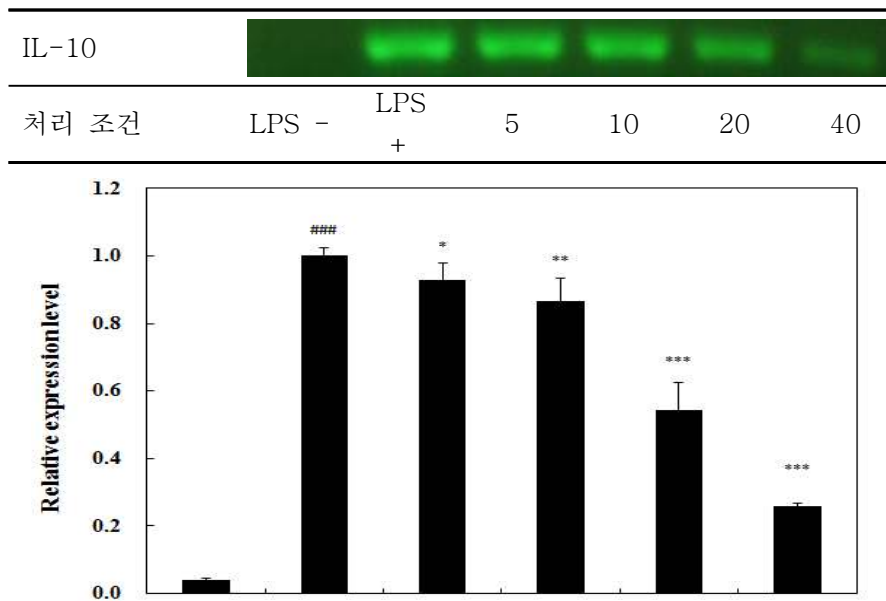


Figure 3-40. lysolecithin 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-10 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- NF- $\kappa$ B를 억제하여 anti-inflammatory 효과를 나타내는 사이토카인인 IL-10의 경우, 양성 대조군은 LPS 처리에 의해 음성 대조군에 비해 유의적으로 그 발현량이 증가함을 확인하였으며 분지아미노산 수용액의 처리는 그 발현량을 양성 대조군 대비 농도 의존적으로 감소시킴을 확인함.
- 선행 연구에서 보고된 바와 같이 고농도의 분지아미노산의 처리는 macrophage 세포에서 염증을 매개하는 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현량을 증가시키고, 항염증 효과를 나타내는 사이토카인인 IL-10의 발현은 감소시키는데에 반해 lysolecithin 첨가 분지아미노산의 에멀전의 첨가는 IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현량을 양성 대조군에 비해 유의적으로 감소시키는 것을 확인함.
- lysolecithine 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리 농도가 증가할수록 iNOS와 COX-2의 저해율은 기존 분지아미노산 수용액에 비해 향상되었음을 확인하였으며, 염증 매개 사이토카인들의 발현 경향 또한 감소시키는 방향으로 변화되었음을 확인함.
- 안정제로 첨가된 lysolecithin이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage에서 어떤 역할을 하는지 후속 연구가 필요할 것으로 사료됨.

(마) Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전

①  $\beta$ -Actin

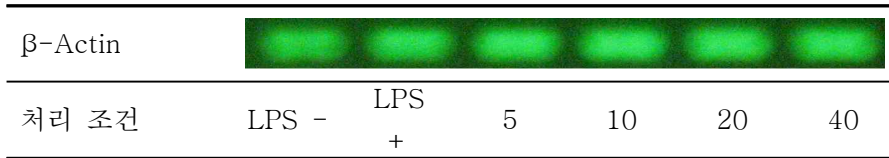


Figure 3-41. Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의  $\beta$ -actin mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, housekeeping gene인  $\beta$ -actin의 경우 모든 처리 조건에서 충분히 발현되었으므로 이후의 항염증관련 결과를 논하는데 있어 RAW 264.7 murine macrophage의 대사 장애나 세포 독성에 대한 고려는 배제하기로 함.

② Inducible nitric oxide synthase

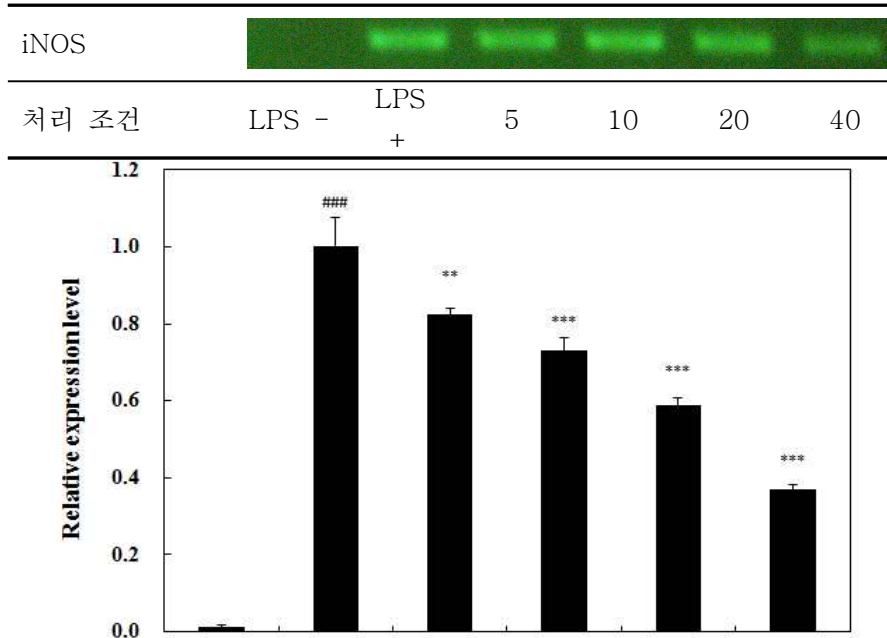


Figure 3-42. Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 iNOS mRNA의 발현에 미치는 영향

- 실험 결과, 양성 대조군은 LPS의 자극에 의해 음성 대조군 보다 iNOS의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리에 의해 양성 대조군에 대해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) iNOS의 발현이 감소하였고 40 mg/mL의 농도에서  $36.83 \pm 1.29\%$ 의 발현율을 보였음.
- 동일한 실험 배치 상에서 분지아미노산 수용액에 비해 유의적으로 효과적임을 확인함.

③ Cyclooxygenase(COX)-2

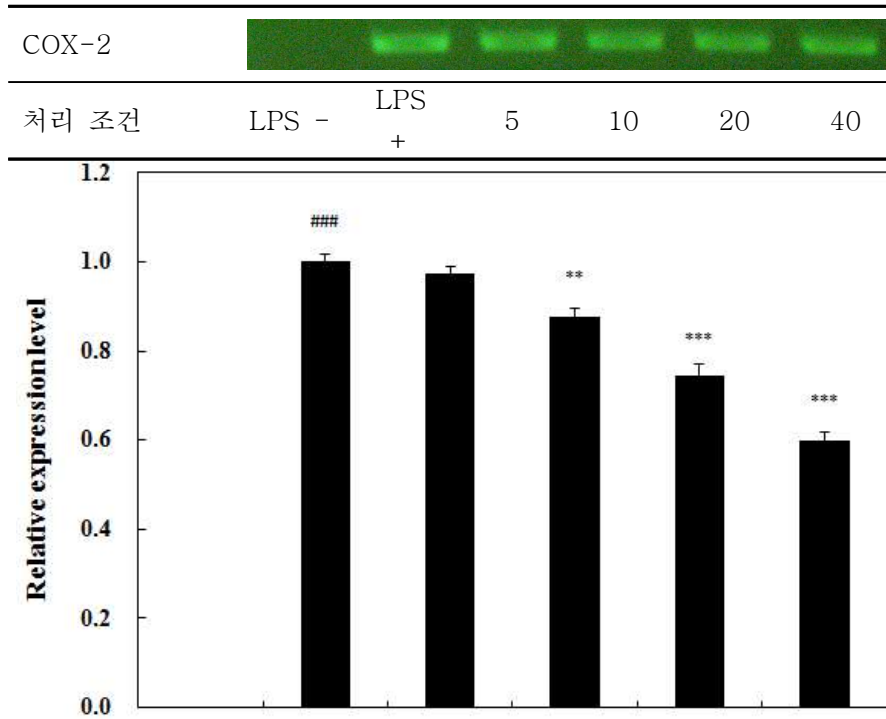
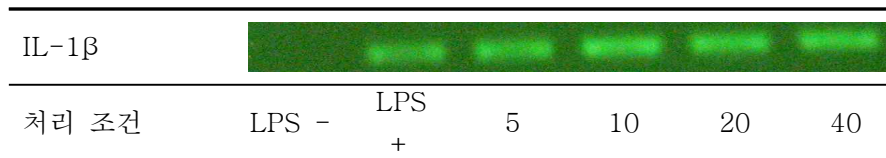


Figure 3-43. Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 COX-2 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군은 LPS의 자극에 의해 음성 대조군 보다 COX-2의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리에 의해 양성 대조군에 대해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) COX-2의 발현이 감소하였고 40 mg/mL의 농도에서  $59.79 \pm 2.02\%$ 의 발현율을 보였음.
- 동일한 실험군 상의 분지아미노산 수용액에 비해 효과적임을 확인함( $p < 0.001$ ).

④ Interleukine-1 $\beta$



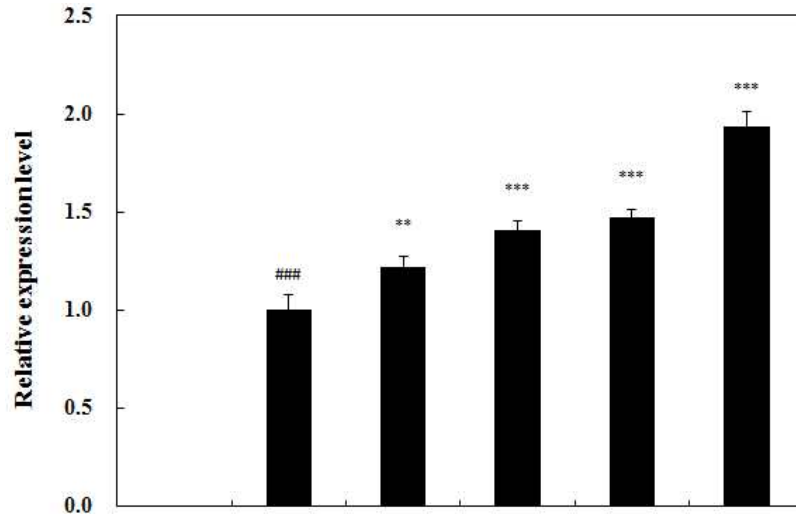


Figure 3-44. Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, LPS의 처리에 의해 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 IL-1 $\beta$ 의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리는 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 그 발현을 증가시킴을 확인하였으며 40 mg/mL 처리에서 양성 대조군 대비 193.71 $\pm$ 7.30%의 발현율을 보임.
- 동일한 실험 배치상에서 분지아미노산 수용액 보다 발현율이 낮음을 확인함.

⑤ Interleukin-6

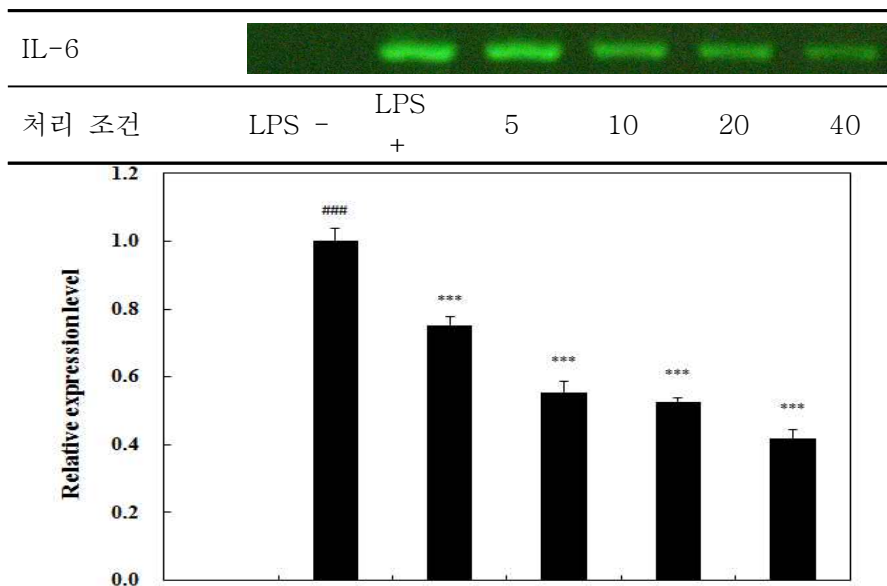


Figure 3-45. Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-6 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, LPS의 처리에 의해 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 IL-6의 발현이 유의적으로 증가함을 확인함( $p < 0.001$ ). Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리는 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 그 발현이 감소하였으며 40 mg/mL 처리에서 양성 대조군 대비 41.72±2.55%의 발현율을 보임.

⑥ Interleukin-10

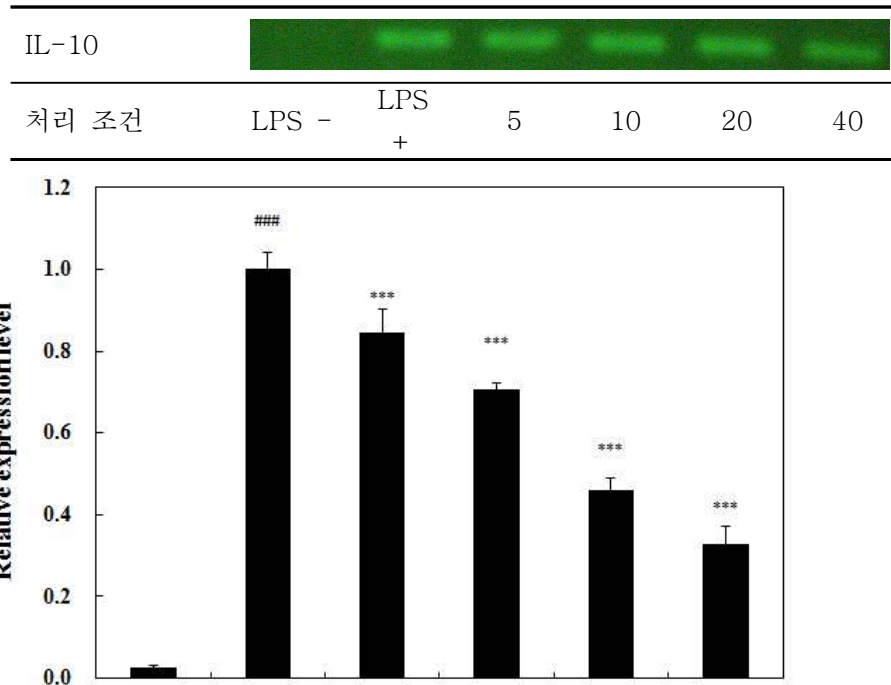


Figure 3-46. Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-10 mRNA의 발현에 미치는 영향

- NF- $\kappa$ B를 억제하여 anti-inflammatory 효과를 나타내는 사이토카인인 IL-10의 경우, 양성 대조군은 LPS 처리에 의해 음성 대조군에 비해 유의적으로 그 발현량이 증가함을 확인하였으며 분지아미노산 수용액의 처리는 그 발현량을 양성 대조군 대비 농도 의존적으로 감소시킴을 확인함.
- 선행 연구에서 보고된 바와 같이 고농도의 분지아미노산의 처리는 macrophage 세포에서 염증을 매개하는 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현량을 증가시키고, 항염증 효과를 나타내는 사이토카인인 IL-10의 발현은 감소시키는데 반해 Tween 80 첨가 분지아미노산의 에멀전의 첨가는 IL-1 $\beta$ 의 발현을 농도 의존적으로 증가시키지만 증가율을 양성 대조군에 비해 유의적으로 적음.
- IL-6의 경우는 분지아미노산 수용액과 반대로 발현율이 양성 대조군에 비해 감소하는 경향을 보이는 것을 확인함.
- Tween 80 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리 농도가 증가할수록 iNOS와 COX-2의 저해율은 기존 분지아미노산 수용액에 비해 향상되었음을 확인하였으며, 염증 매개

사이토카인들의 발현 증가율을 감소시키거나 발현 자체를 감소시키는 경향으로 변화되었음을 확인함.

- 안정제로 첨가된 Tween 80이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage에서 어떤 역할을 하는지 후속 연구가 필요할 것으로 사료됨.

(마) WPI 첨가 분지아미노산 에멀전

①  $\beta$ -Actin

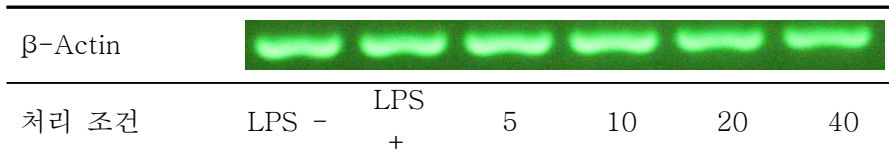
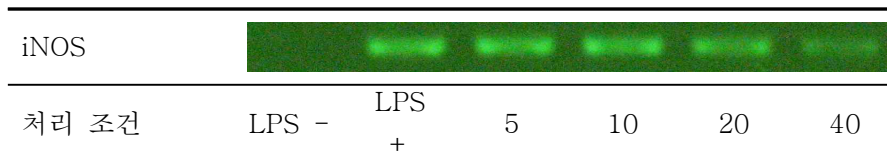


Figure 3-47. WPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의  $\beta$ -actin mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, housekeeping gene인  $\beta$ -actin의 경우 모든 처리 조건에서 충분히 발현되었으므로 이후의 항염증관련 결과를 논하는데 있어 RAW 264.7 murine macrophage의 대사 장애나 세포 독성에 대한 고려는 배제하기로 함.

② Inducible nitric oxide synthase





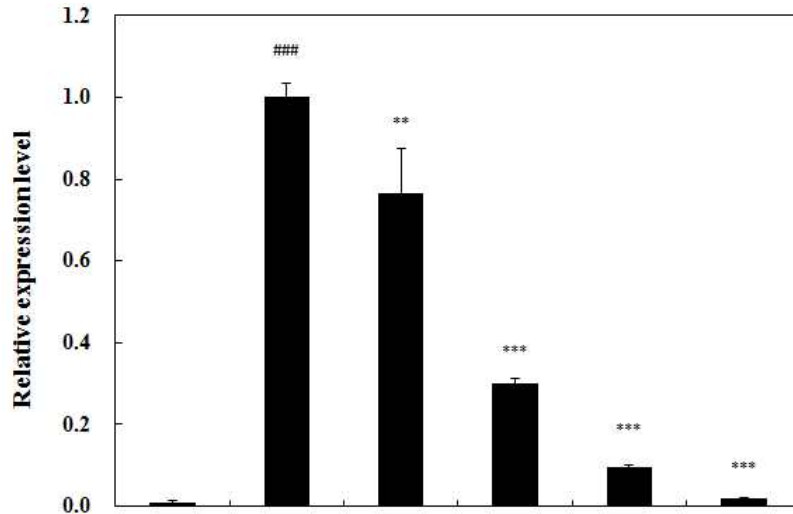
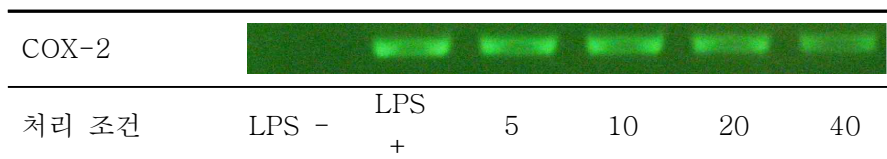


Figure 3-48. WPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 iNOS mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군은 LPS의 자극에 의해 음성 대조군 보다 iNOS의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). WPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리에 의해 양성 대조군에 대해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) iNOS의 발현이 감소하였고 40 mg/mL의 농도에서  $2.01 \pm 0.10\%$ 의 발현율을 보이며 음성 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않음
- 동일한 실험 배치 상에서 분지아미노산 수용액에 비해 유의적으로 효과적임을 확인함( $p < 0.001$ ).

### ③ Cyclooxygenase(COX)-2



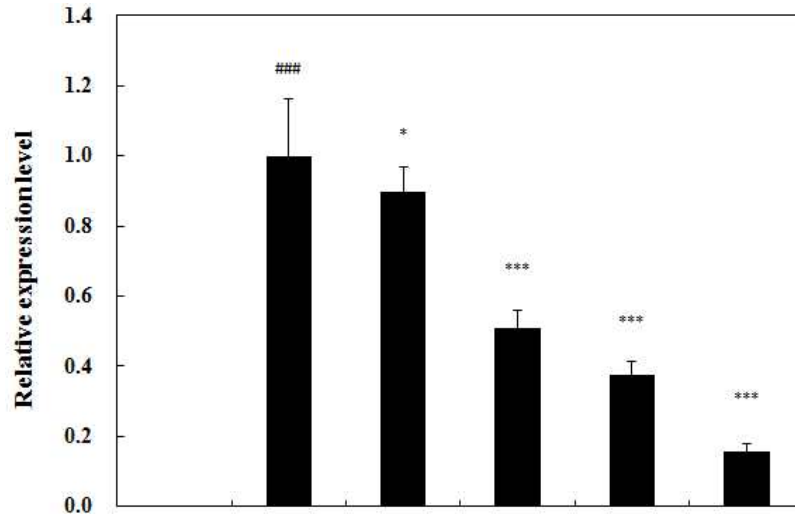
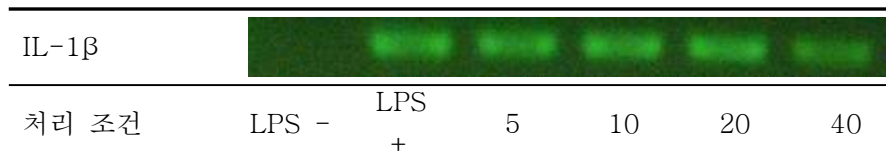


Figure 3-49. WPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 COX-2 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군은 LPS의 자극에 의해 음성 대조군에 비해 COX-2의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). WPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리에 의해 양성 대조군에 대해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) COX-2의 발현이 감소하였고 40 mg/mL의 농도에서  $15.70 \pm 2.29\%$ 의 발현율을 보였음.
- 동일한 실험군 상의 분지아미노산 수용액에 비해 유의적으로 효과적임을 확인함( $p < 0.001$ ).

#### ④ Interleukine-1 $\beta$



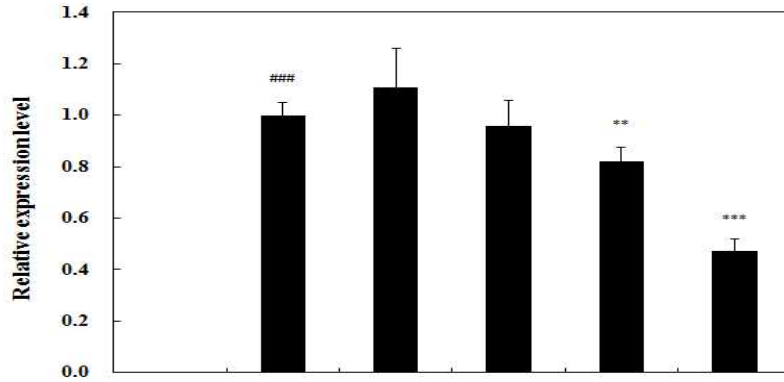


Figure 3-50. WPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, LPS의 처리에 의해 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 IL-1 $\beta$ 의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). WPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리는 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 그 발현을 감소시킴을 확인하였으며 40 mg/mL 처리에서 양성 대조군 대비 47.07 $\pm$ 4.71%의 발현율을 보임.

#### ⑤ Interleukin-6

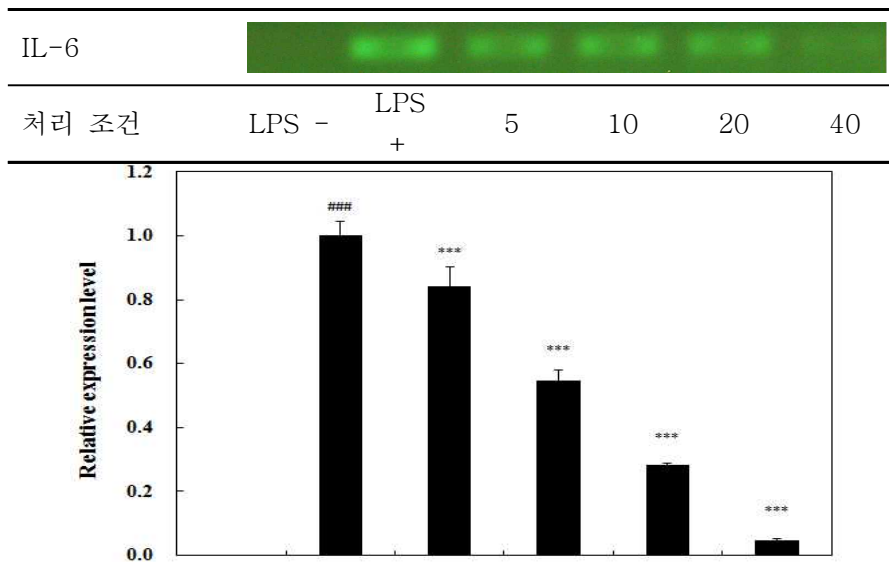


Figure 3-51. WPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-6 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, LPS의 처리에 의해 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 IL-6의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). WPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리는 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 그 발현이 감소하였으며 40 mg/mL 처리에서 양성 대조군 대비 4.82 $\pm$ 5.39%의 발현율을 보임.

⑥ Interleukin-10

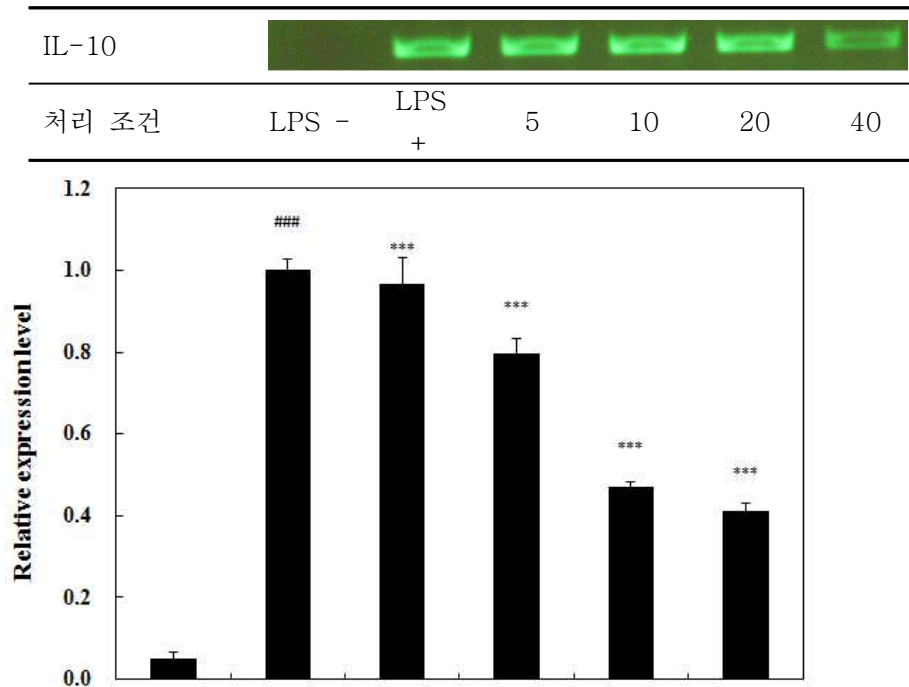


Figure 3-52. WPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-10 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- NF- $\kappa$ B를 억제하여 anti-inflammatory 효과를 나타내는 사이토카인인 IL-10의 경우, 양성 대조군은 LPS 처리에 의해 음성 대조군에 비해 유의적으로 그 발현량이 증가함을 확인하였으며 분지아미노산 수용액의 처리는 그 발현량을 양성 대조군 대비 농도 의존적으로 감소시킴을 확인함.

(바) SPI 첨가 분지아미노산 에멀전

①  $\beta$ -Actin

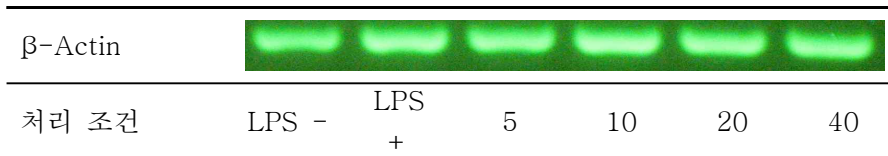


Figure 3-53. SPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의  $\beta$ -actin mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, house keeping gene 인  $\beta$ -actin의 경우, 샘플 처리 농도가 높아질수록 발현 Cq 값이 약간은 증가하였으나  $\Delta\Delta Cq$  산출법의 특성상 상대적 정량 결과에서 독성이나 대사 장애에 대한 고려는 배제하기로 함 .

② Inducible nitric oxide synthase

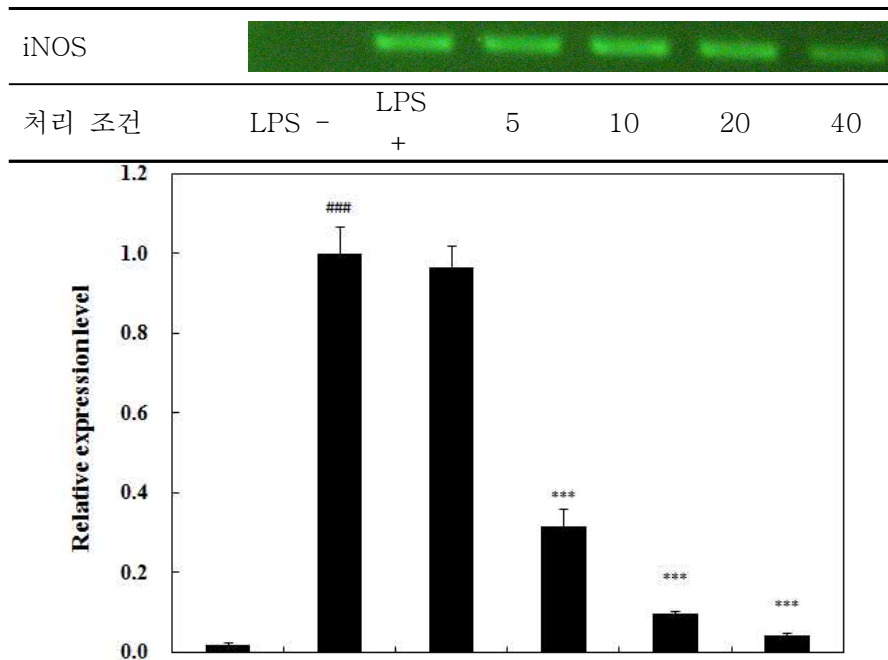
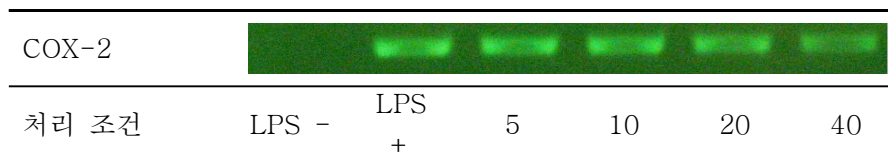


Figure 3-54. SPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 iNOS mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군은 LPS의 자극에 의해 음성 대조군 보다 iNOS의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). WPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리에 의해 양성 대조군에 대해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) iNOS의 발현이 감소하였고 40 mg/mL의 농도에서  $4.09 \pm 0.62\%$ 의 발현율을 보임.
- 동일한 실험 배치 상에서 분지아미노산 수용액에 비해 유의적으로 효과적임을 확인함( $p < 0.001$ ).

③ Cyclooxygenase(COX)-2



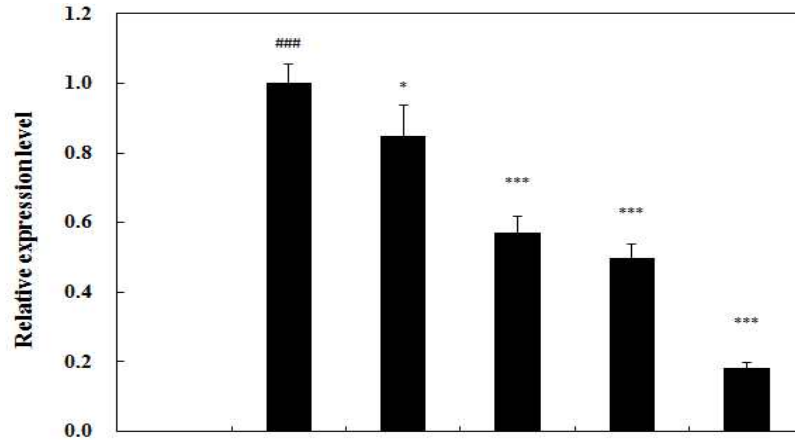


Figure 3-55. SPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 COX-2 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 양성 대조군은 LPS의 자극에 의해 음성 대조군에 비해 COX-2의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). SPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리에 의해 양성 대조군에 대해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) COX-2의 발현이 감소하였고 40 mg/mL의 농도에서 18.15±1.61%의 발현율을 보였음.
- 동일한 실험군 상의 분지아미노산 수용액에 비해 유의적으로 효과적임을 확인함( $p < 0.001$ ).

#### ④ Interleukine-1 $\beta$

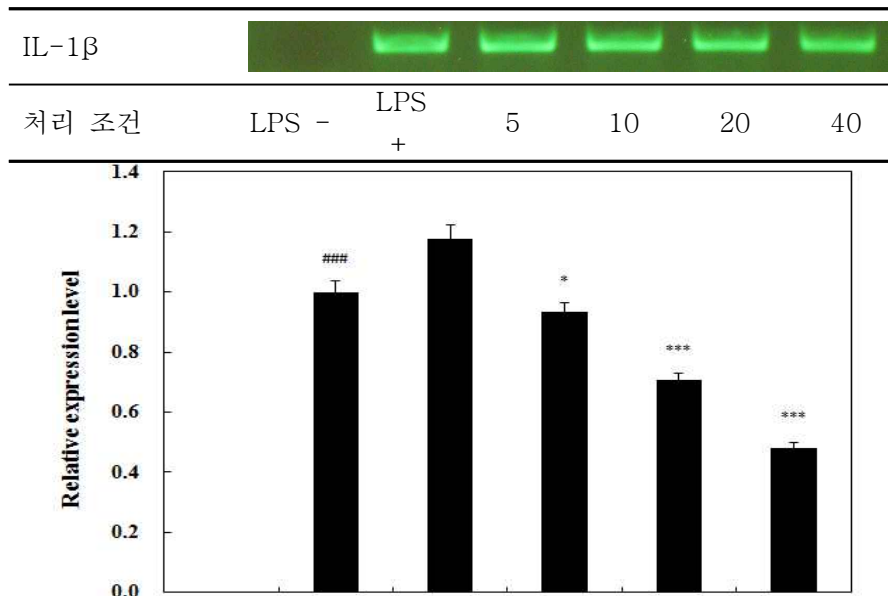


Figure 3-56. SPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, LPS의 처리에 의해 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 IL-1 $\beta$ 의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). SPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리는 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 그 발현을 감소시킴을 확인하였으며 40 mg/mL 처리에서 양성 대조군 대비 47.84 $\pm$ 2.13%의 발현율을 보임.

⑤ Interleukin-6

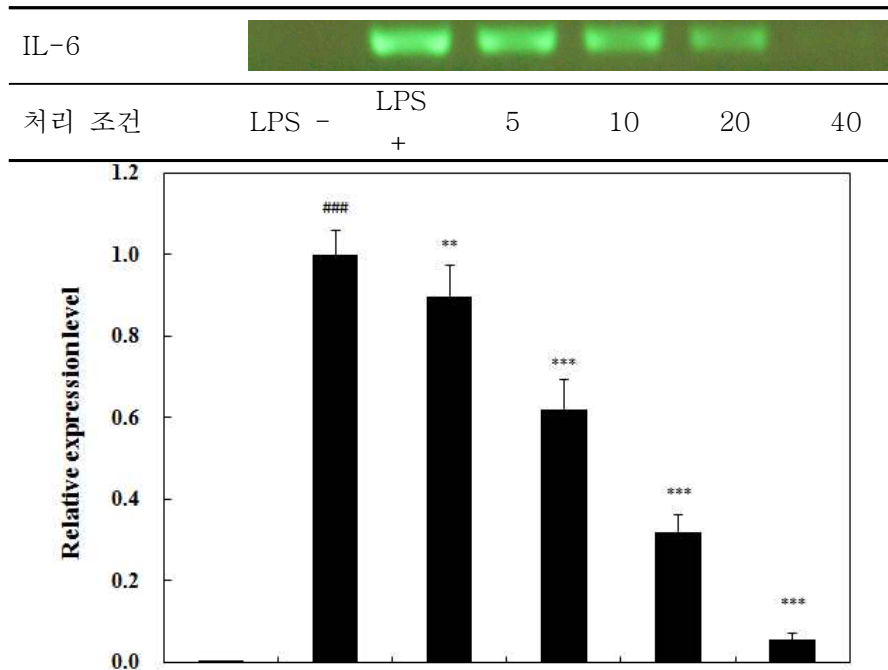
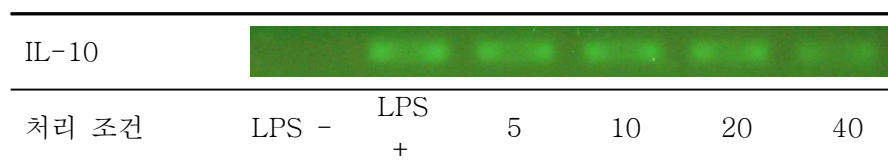


Figure 3-57. SPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-6 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, LPS의 처리에 의해 양성 대조군은 음성 대조군에 비해 IL-6의 발현이 유의적으로 유도되었음( $p < 0.001$ ). SPI 첨가 분지아미노산 에멀전의 처리는 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 그 발현이 감소하였으며 40 mg/mL 처리에서 양성 대조군 대비 5.63 $\pm$ 1.47%의 발현율을 보임.

⑥ Interleukin-10



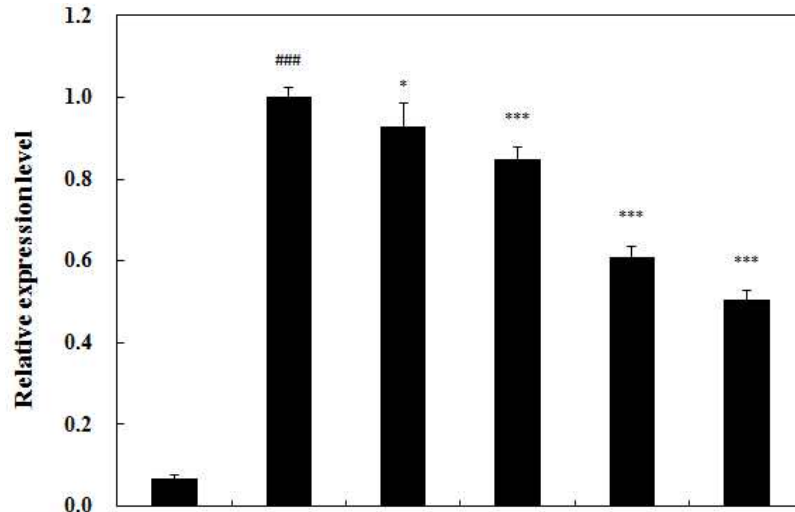


Figure 3-58. SPI 첨가 분지아미노산 에멀전이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-10 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- NF- $\kappa$ B를 억제하여 anti-inflammatory 효과를 나타내는 사이토카인인 IL-10의 경우, 양성 대조군은 LPS 처리에 의해 음성 대조군에 비해 유의적으로 그 발현량이 증가함을 확인하였으며 분지아미노산 수용액의 처리는 그 발현량을 양성 대조군 대비 농도 의존적으로 감소시킴을 확인함.
- 단백질 계열 안정제의 경우, 기존 분지아미노산 수용액과 계면 활성제 계열 안정제 첨가 분지아미노산 에멀전에 비해 유의적( $p < 0.001$ )으로 효과적인 항염 활성을 보임.
- WPI와 SPI의 경우 lysolecithin과 Tween 80 보다 높은 수준으로 첨가가 되어 있으므로, 동일한 수준에서 항염증 효과에 대한 결과를 비교해 봐야 할 것으로 사료됨.

#### (4) 리포솜-담재 분지아미노산의 항염 활성 검증

##### (가) 리포솜-담재 분지아미노산의 *in vitro*상에서의 항염활성 검증

###### ① SNP assay

- 1차년도 연구를 통해 다양한 *in vitro* 항염 활성 실험법 중 sodium nitroprusside(SNP)를 이용한 NO scavenging activity 측정 실험에서 항염 활성을 확인함.
- Sodium nitroprusside(SNP)는 phosphate buffer에서 산소하에 빛과 반응하면 NO와 nitrite를 형성하는 물질로, 이 nitrite compound는 Griess 시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in water)와 반응하여 자색으로 발색이 되는데, SNP assay는 이 원리를 이용하여 시료의 NO scavenging activity를 측정하는 실험법임.
- 실험에 사용한 분지아미노산 시료는 제 1세부기관으로부터 제공받았으며, 농도는 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL를 사용함. 분지아미노산이 담재되지 않은 공리포솜을



음성 대조군으로 설정하였으며 시료와 동량의 SNP solution과 혼합하여 37°C 항온 수조에서 산소를 공급하여 명반응 시킴. 결과는 Figure 3-59에 나타냄.

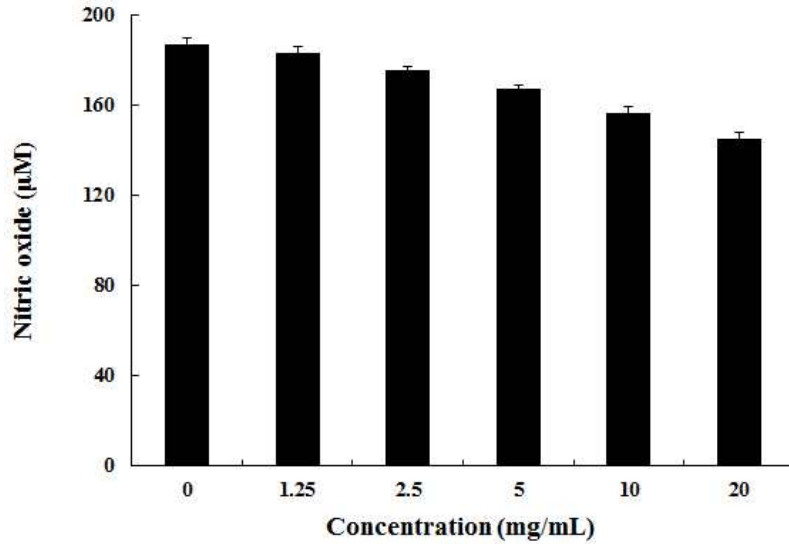


Figure 3-59. 리포좀-탑재 분지아미노산의 NO 소거능

- 분지아미노산이 탑재되지 않은 음성 대조군의 경우,  $186.72 \pm 72 \mu\text{M}$ 의 NO가 발생되었으며, 분지아미노산이 탑재된 시료의 경우 농도 의존적으로 NO가 소거됨. 소거된 NO의 양은 각각  $3.67 \pm 2.55(2\%)$ ,  $11.18 \pm 1.13(6\%)$ ,  $19.72 \pm 1.70(11\%)$ ,  $30.52 \pm 2.84(16\%)$ ,  $41.66 \pm 2.55(22\%) \mu\text{M}$  이었으며  $p < 0.05$  수준에서 유의적 차이를 보임을 확인함.
- 리포좀-탑재 분지아미노산 또한 탑재되지 않은 분지아미노산과 마찬가지로 *in-vitro* 상에서 NO 소거능을 보이며 항염 활성의 가능성을 확인함.

## ② Nitric oxide 생성 저해 활성

- 대식세포인 RAW 264.7 murine macrophage는 염증반응에 관여하여 nitric oxide를 생성하는 세포이고 생리학적으로 기저상태에서의 NO는 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 하지만 염증 반응이 일어나면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 과량의 NO가 생성이 되고, 이는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시키는 등의 문제점을 야기할 수 있음.
- 따라서 이러한 LPS와 같은 물질에 의한 급성 염증 유도시 과량의 NO의 생성을 저해하는 정도를 측정함으로써 항염증 효과의 가능성을 간접적으로 측정할 수 있음.
- 실험에 사용된 RAW 264.7 murine macrophages는 한국세포주은행(KCLB, Seoul)으로부터 분양받아 DMEM medium에 10% FBS(fetal bovine serum), 100 unit/mL의 penicillin, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 streptomycin을 첨가하여 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며 confluence 80-90%에서 계대 배양하여 사용함.
- 시료는 제 1세부기관에서 제공받은 리포좀-탑재 분지아미노산이며, 탑재 목적이

생체 이용률, 즉 활성의 증가이므로 같은 농도 상에서 기존 분지아미노산 수용액에 대해 그 활성을 비교함.

- LPS를 이용하여 고농도 수용액 및 에멀전화 분지아미노산의 NO 생성 저해 정도를 측정하기 이전에 RAW 264.7 murine macrophage에 대한 분지아미노산의 세포독성과 이로 인한 NO 생성 저해를 알아보기 위해 제 1세부기관에서 받은 리포솜-담재 분지아미노산과 분지아미노산 수용액 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL 농도로 대식세포 RAW 264.7 murine macrophage에 LPS 1 µg/mL와 함께 배양하고 MTT assay를 실시하여 그 세포독성을 확인하였으며 결과는 Figure 3-60에 나타냄.

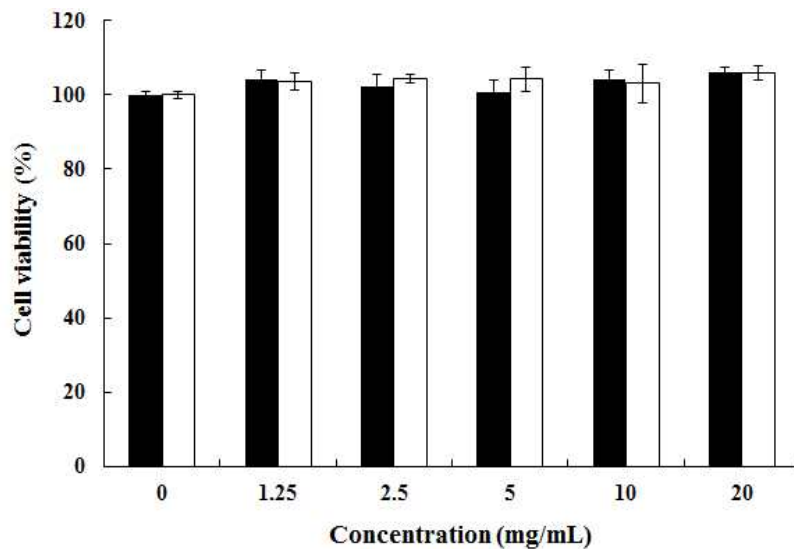


Figure 3-60. 분지아미노산이 RAW 264.7 murine macrophage의 생존에 미치는 영향. ■, 분지아미노산 수용액; □, 리포솜-담재 분지아미노산

- 실험 결과 분지아미노산, 리포솜-담재 분지아미노산 모두 음성 대조군(D.W.)에 비해 높은 흡광도를 보여 생존율이 100%을 상회하였고 이와 같은 결과를 통해 분지아미노산, 리포솜-담재 분지아미노산은 RAW 264.7 murine macrophage에 독성을 보이지 않으며 오히려 성장에 도움을 준다고 사료됨.
- 리포솜-담재 분지아미노산이 대식세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 확인하고, 기존 분지아미노산 수용액에 대한 활성 증대 여부 확인을 위하여 RAW 264.7 murine macrophages를  $2 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고 리포솜 담재-분지아미노산과 분지아미노산 수용액 및 리포솜-담재 분지아미노산(1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL)과 함께 2시간 동안 전배양함.
- 이후 염증유발 물질인 LPS(1 µg/mL)를 처리하여 24시간 동안 배양시킨 뒤, Griess 시약을 동량의 상등액과 반응시켜 배양액 내에 존재하는 NO(nitric oxide)의 양을 측정하여 이를 통해 분지아미노산 고농도 수용액 및 리포솜-담재 시료들이 LPS로 유도된 RAW 264.7 murine macrophage의 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였고, 그 결과는 Figure 3-61에 나타냄.

- 생성된 NO의 양은 배지에 용해된 NaNO<sub>2</sub>의 각 농도대비 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하고 이 표준곡선의 회귀식을 통해 산출함.

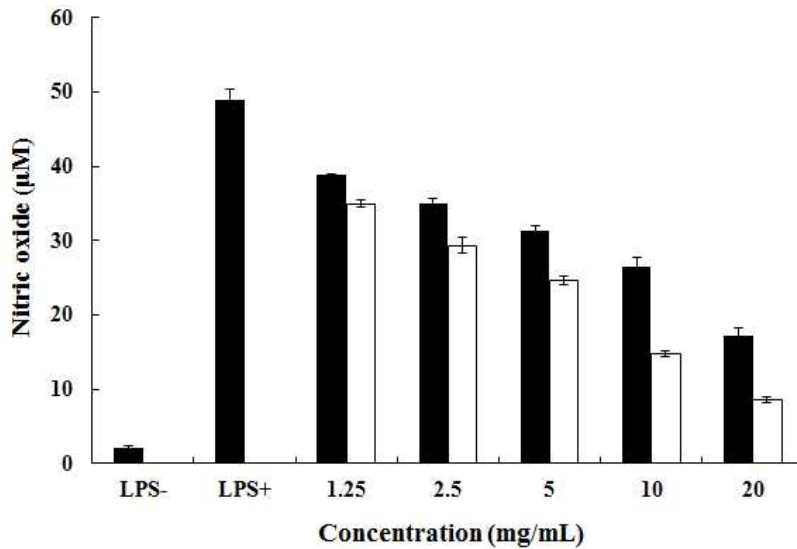


Figure 3-61. 분지아미노산이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage에서 NO생성에 미치는 영향. ■, 분지아미노산 수용액; □, 리포솜-담재 분지아미노산.

- 실험 결과, LPS positive 양성 대조군은 48.89±1.47 µM의 NO를 생성하였으며, 2.16 µM의 NO를 생성한 LPS negative 음성 대조군에 대해 LPS에 의해 유의적으로 NO의 생성이 유도되었고( $p < 0.001$ ) 리포솜-담재 분지아미노산과(35.01±0.52, 29.37±1.11, 24.62±0.58, 14.79±0.45, 8.56±0.36 µM), 분지아미노산 수용액(38.84±0.10, 34.92±0.83, 31.27±0.76, 26.51±1.27, 17.29±0.91 µM)은 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage에서 농도 의존적으로 NO의 발생을 억제함( $p < 0.05$ ).
- 리포솜-담재 분지아미노산은 각각의 동일한 농도에서의 분지아미노산 수용액보다 유의적으로 높은 저해율을 보였으며( $p < 0.001$ ) 이를 통해 생체 이용률의 향상을 통한 항염 활성의 증대를 간접적으로 확인함.

### ③ RT-PCR assay를 통한 gel electrophoresis와 real-time qPCR

- 제 1세부기관으로부터 제공받은 분지아미노산 시료(수용액, 리포솜-담재)이 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 murine macrophage cell에서 염증 관련 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 세포에서 mRNA를 추출하고 RT-PCR과 gel electrophoresis를 이용하여 image blotting하였으며 Real-time qPCR을 이용하여 상대적 정량을 실시함.
- RAW 264.7 murine macrophage는 10% FBS(fetal bovine serum), 100 unit/mL의 penicillin, 100 µg/mL의 streptomycin을 첨가하여 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며 confluence 80-90%에서 계대 배양하여 사용함.
- RAW 264.7 murine macrophage는 6-well plate에 1×10<sup>6</sup> cells/well 농도로

분주되었으며 2.5, 5, 10, 20 mg/mL 농도의 분지아미노산 수용액(BA), 리포좀-탐재 분지아미노산(BL)과 함께 24시간 배양함.

- 이 후 LPS(1 µg/mL)로 염증을 유도하였으며 24시간 후 세포를 회수하여 RNA를 추출함. 분지아미노산 시료 대신 D.W.를 처리하고 LPS를 유도하지 않은 군을 음성 대조군으로, LPS를 유도한 군을 양성 대조군으로 설정함.
- 배양액을 제거하고 4°C PBS로 2회 세척한 후, RNeasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 RNA를 분리하였으며 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Scientific Pierce, MA, USA)를 이용하여 총 1 µg의 cDNA로 합성함.
- 합성된 cDNA를 주형 가닥으로 Taq PCR master mix(2×), RNase free water, sense primer, anti-sense primer과 혼합하여 총 부피 20 µL으로 하고, 95°C(denaturation) 5분, 20-25 cycle을 95°C 30초, 각 유전자의 프라이머에 해당하는 annealing 온도 30초, 72°C 45초 실행하고 마지막 신장 72°C 10분으로 RT-PCR을 실행하여 기존 주형가닥을 증폭함.
- 증폭한 산물은 1.2% agarose gel을 이용하여 150 V에서 전기영동을 실행하였으며 blotting 결과는 fluorescent table(Vilber Lourmat, Torcy, France)을 이용하여 가시화 했으며 Figure 3-29~34에 나타냄.
- Real-time qPCR assay에서도 RT-PCR과 같이 합성된 cDNA를 주형 가닥으로 Pikoreal 96(Thermo Scientific Pierce, Waltham, MA, USA)기기를 이용하여 실시하였다. Real time qPCR assay의 세부 조건은 다음과 같음. SYBR Green master mix(2×), 400 µM primer, RNase free water와 혼합하여 총 부피 20 µL로 하고 95°C 2분, 40 cycle을 95°C 30초, 60°C 30초 실행한 후, 마지막 신장 60°C 20초 조건으로 Real-time qPCR을 진행함.
- Housekeeping gene으로 β-actin을 사용하였으며 이를 표준으로 하여 Delta delta Cq(ΔΔCq) 분석법을 통해 증폭결과를 구하고 상대적 정량을 실시함. qPCR reaction의 melting curve를 확인하여 증폭산물의 purity를 검증하였다. 상대적 정량 결과는 Figure 3-62~66에 나타냄.
- RT-PCR과 Real-time qPCR에서 사용한 염증관련 유전자의 primer의 서열은 Table 3-14에 나타냄.

Table 3-14. 염증 관련 유전자들의 Primer sequences

Gene	Description	Primer sequence
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	sense: 5'-CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C-3' antisense: 5'-GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G-3'
COX-2	Cyclooxygenase-2	sense: 5'-CAC TAC ATC CTG ACC CAC TT-3' antisense: 5'-ATG CTC CTG CTT GAG TAT GT-3'
IL-1β	Interleukine-1β	sense: 5'-CAG GAT GAG GAC ATG AGC ACC-3' antisense: 5'-CTC TGC AGA CTC AAA CTC

		CAC-3'
IL-6	Interleukine-6	sense: 5'-AGT TGCCTT CTT GGG ACT GA-3' antisense: 5'-TTC TGC AAG TGC ATC ATC GT-3'
IL-10	Interleukine-10	sense: 5'-TAA GGC TGG CCA CAC TTG AG-3' antisense: 5'-AGT TTT CAG GGA TGA AGC GG-3'
$\beta$ -Actin		sense: 5'-GTG GGC CGC CCT AGG CAC CAG-3' antisense: 5'-GGA GGA AGA GGA TGC GGC AGT-3'

④  $\beta$ -Actin

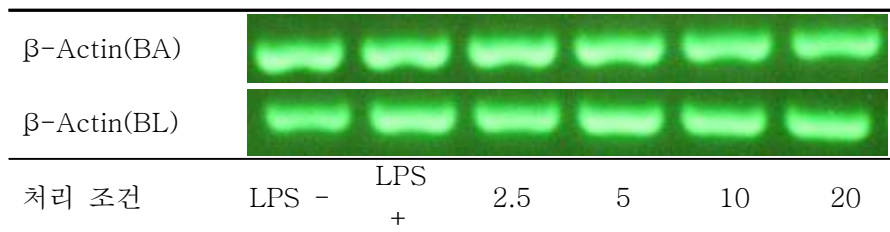
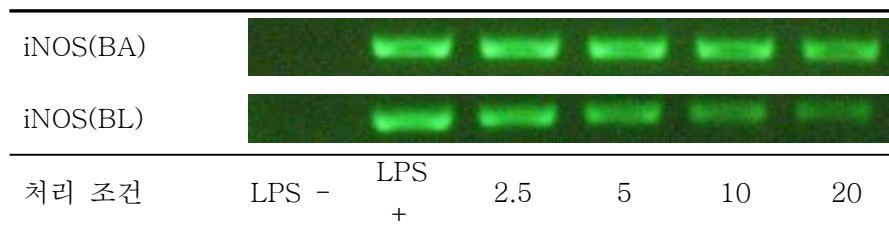


Figure 3-62. 분지아미노산 수용액과 리포솜-담재 분지아미노산이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의  $\beta$ -actin mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, housekeeping gene인  $\beta$ -actin의 경우 모든 처리 조건에서 충분히 발현되었으므로 이후의 항염증관련 결과를 논하는데 있어 RAW 264.7 murine macrophage의 대사 장애나 세포 독성에 대한 고려는 배제하기로 함.

⑤ inducible nitric oxide synthase



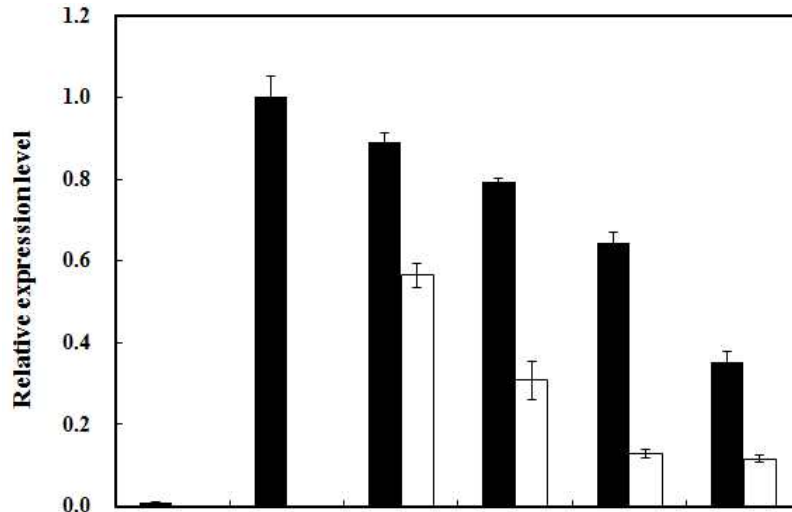
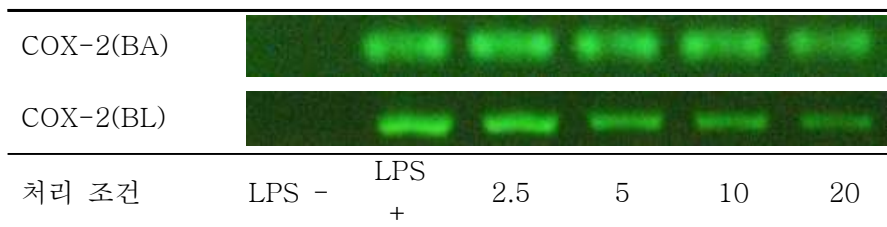


Figure 3-63. 분지아미노산 수용액과 리포솜-탑재 분지아미노산이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 iNOS mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 분지아미노산 수용액, 리포솜-탑재 분지아미노산 두 군에서 모두 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) iNOS의 발현이 감소하였고 20 mg/mL의 농도에서  $35.17 \pm 2.72$ ,  $11.64 \pm 0.90\%$ 의 발현율을 보였으며 리포솜-탑재 분지아미노산의 경우 분지아미노산 수용액에 비해 효과적( $p < 0.001$ )임을 확인함.
- iNOS의 경우, 일반적으로 arginine를 기질로 하여 NO를 생성하는데, 분지아미노산의 처리는 RAW 264.7 murine macrophage에서 arginase-1의 발현을 증가시키는 것으로 보고되어있고 이 효소는 iNOS와 경쟁적으로 작용하여 iNOS가 arginine를 기질로 사용하는 것을 억제함.
- 이와 같은 기작을 통해, 분지아미노산 수용액과 리포솜-탑재 분지아미노산이 RAW 264.7 murine macrophage에서 iNOS의 작용을 억제하고 결과적으로는 NO의 생성을 억제하는 것으로 사료됨.

⑥ Cyclooxygenase(COX)-2



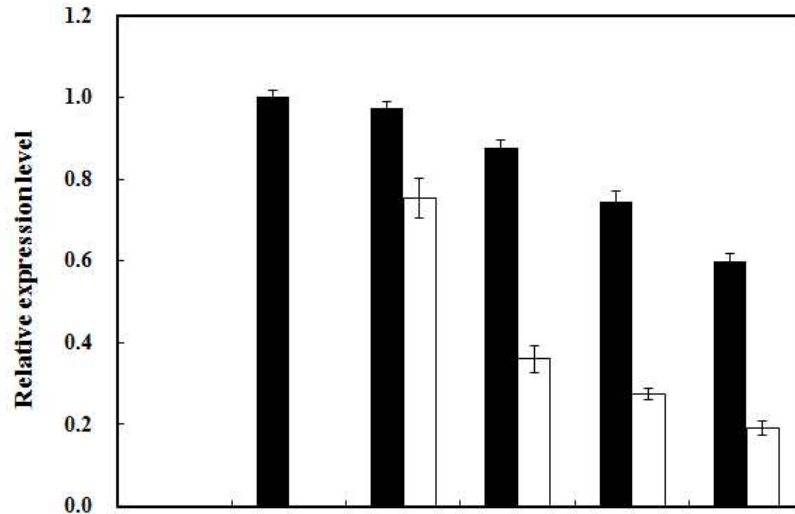
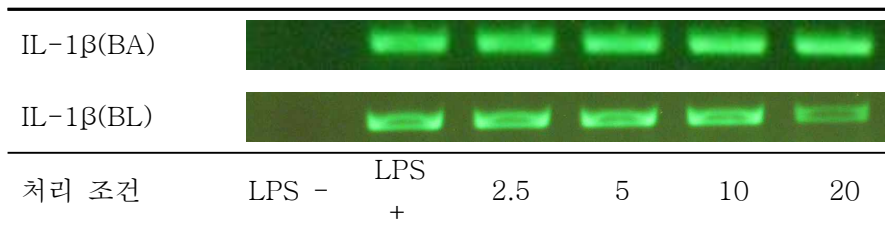


Figure 3-64. 분지아미노산 수용액과 리포솜-탑재 분지아미노산이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 COX-2 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 분지아미노산 수용액, 리포솜-탑재 분지아미노산 두 군에서 모두 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로( $p < 0.05$ ) COX-2의 발현이 감소하였고 20 mg/mL의 농도에서  $59.79 \pm 2.02$ ,  $19.13 \pm 1.63\%$ 의 발현율을 보였으며 리포솜-탑재 분지아미노산의 경우 분지아미노산 수용액에 비해 효과적( $p < 0.001$ )임을 확인함.
- COX-2의 경우, insuline like growth factor-1(IGF-1)의 작용이나 heme의 산화로 인해 발생한 유리 tyrosyl-radical이 아라키돈산과 같은 지방산을 산화시키고 이 산화로 인해 발생한 유도체들이 COX-2의 발현을 증가시키는 것으로 보고됨.
- 분지아미노산의 처리는 지방산의 산화 방지에 효과가 있으며, RAW 264.7 murine macrophage에 대해 IGF-1의 수용체의 발현을 억제시키는 것으로 보고된 바 있어 이로 인해 분지아미노산과 리포솜-탑재 분지아미노산이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage에서 COX-2 발현을 억제하는 것으로 사료됨.

⑦ Interleukine-1 $\beta$



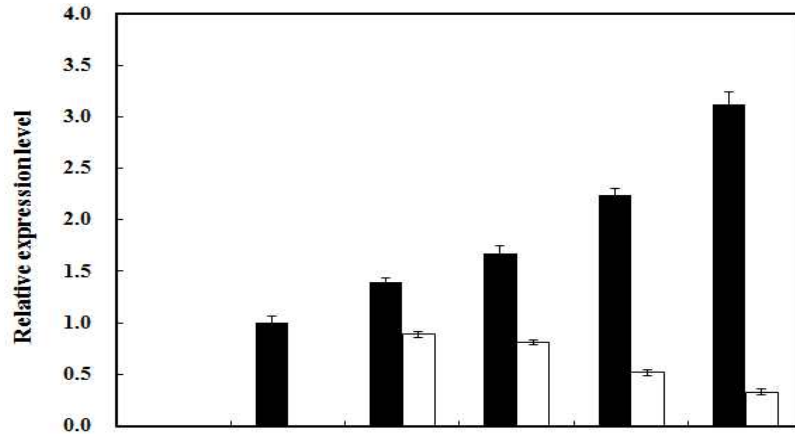


Figure 3-65. 분지아미노산 수용액과 리포솜-탑재 분지아미노산이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 IL-1 $\beta$  mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 분지아미노산 수용액의 경우 양성 대조군에 비해 IL-1 $\beta$ 의 발현을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인함( $p < 0.05$ ).
- 이에 반해 리포솜-탑재 분지아미노산의 경우 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 IL-1 $\beta$ 의 발현을 감소시켰고( $p < 0.05$ ). 20 mg/mL의 농도에서 32.91 $\pm$ 3.24%의 발현율을 보였으며 분지아미노산 수용액과는 반대의 경향을 보이는 것을 확인함.

⑧ Interleukine-6

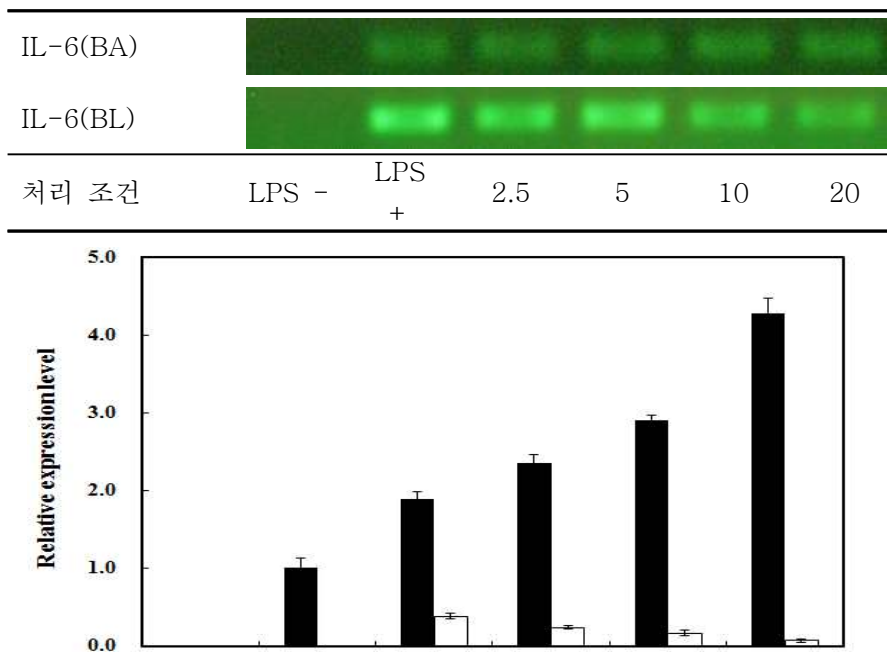


Figure 3-66. 분지아미노산 수용액과 리포솜-탑재 분지아미노산이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 mRNA의 발현에 미치는 영향.



- 실험 결과, 분지아미노산 수용액의 경우 양성 대조군에 비해 IL-6의 발현을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인함( $p < 0.05$ ).
- 이에 반해 리포솜-탑재 분지아미노산의 경우 양성 대조군에 비해 농도 의존적으로 IL-6의 발현을 감소시켰고( $p < 0.05$ ). 20 mg/mL의 농도에서  $6.79 \pm 2.07\%$ 의 발현율을 보였으며 분지아미노산 수용액과는 반대의 경향을 보이는 것을 확인함.
- 위와 같은 결과로 미루어 리포솜-탑재 분지아미노산은 분지아미노산 수용액에 비해 항염 효과가 증대된 것을 간접적으로 확인할 수 있었으며, LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage에서 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 발현을 유의적( $p < 0.05$ )으로 감소시킬 수 있다고 사료됨.

⑨ Interleukine-10

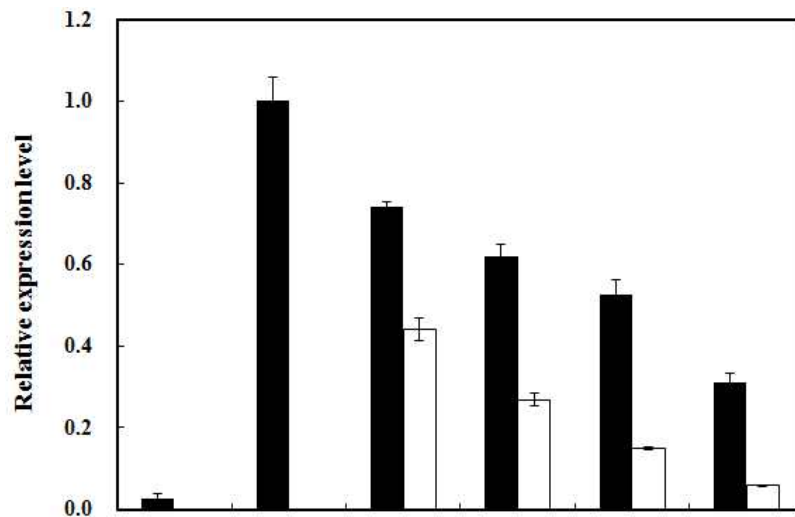
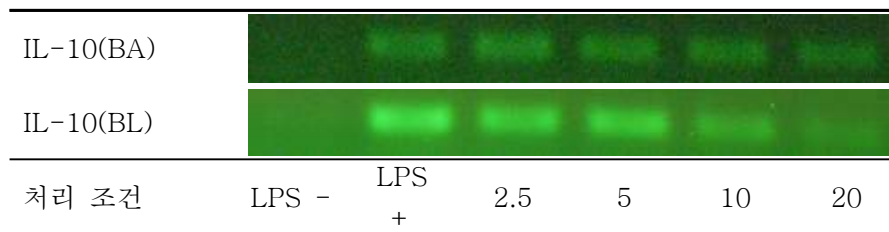


Figure 3-67. 분지아미노산 수용액과 리포솜-탑재 분지아미노산이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 mRNA의 발현에 미치는 영향.

- 실험 결과, 분지아미노산 수용액, 리포솜-탑재 분지아미노산의 경우 양성 대조군에 비해 IL-10의 발현을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인함( $p < 0.05$ )
- 20 mg/mL의 농도에서  $5.87 \pm 1.73\%$ 의 발현율을 보였고 IL-10의 경우 IL-1 $\beta$ , IL-6과는 다르게 NF- $\kappa$ B의 작용을 억제하여 항염증 작용을 하는 cytokine의 일종으로 보고되었으며 또한 분지아미노산의 처리는 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage에서 IL-10의 발현을 억제하는 경향을 보인다고 보고되었음.

- 리포솜-탑재 분지아미노산의 경우 기존 분지아미노산 수용액에 비해 생체 효율이 증대되어 위와 같이 IL-10의 발현이 더 낮아지는 것인지, NF- $\kappa$ B의 억제를 통해 다른 염증 관련 인자들이 억제되고 이 때문에 IL-10의 발현이 결과적으로 더 낮아지는 것인지 불분명하기 때문에 upstream 부분에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료됨.
- 위와 같은 분지아미노산이 LPS 유도 RAW 264.7 murine macrophage의 cytokine들의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 정확한 기작에 대해 알려진 바가 없어 후속적으로 추가 연구 요망.

(4) *Ex vivo* 상에서의 분지 아미노산과 리포솜-탑재 분지아미노산의 흡수 효율 검증

- Monolayer Caco-2 세포주를 이용하여 제 1세부 기관과 제 1협동 기관으로부터 제공받은 분지아미노산의 순수 분지아미노산 대비 세포내 흡수율 증가 정도를 측정하고자 함.
- 실험에 사용된 Caco-2 세포주는 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 MEM medium에 10% FBS(fetal bovine serum), 100 unit/mL의 penicillin, 100  $\mu$ g/mL의 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 계대 배양하여 사용함.
- Caco-2 세포주를 이용하여 세포흡수율을 측정하기 전, 리포솜-탑재 분지아미노산의 Caco-2 세포주에 대해 독성 여부를 확인하기 위해 MTT assay를 실시함. 실험에 사용한 봉입 리포솜 분지아미노산의 농도는 10 mg/mL부터 순차적으로 희석하여 사용하였고, 결과는 Figure 3-68에 나타냄.

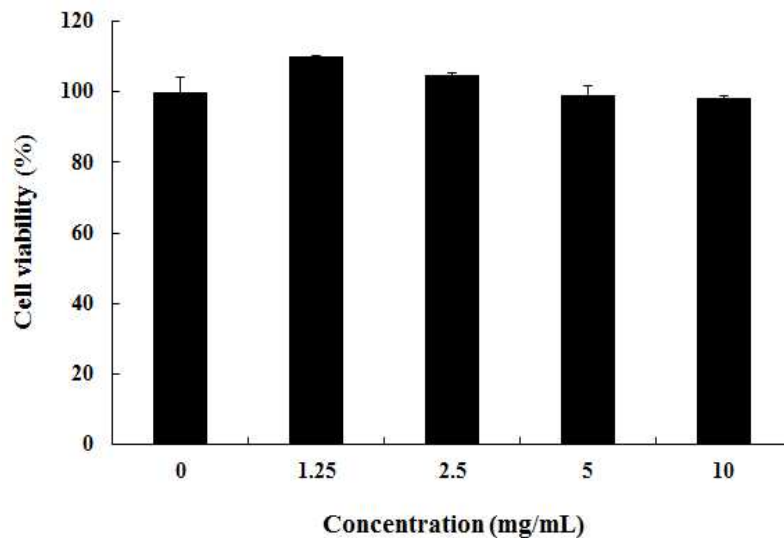


Figure 3-68. Caco-2 세포주에 대한 리포솜-탑재 분지아미노산의 세포독성.

- 실험 결과, 리포솜-탑재 분지아미노산은 Caco-2 세포주에 대하여 유의적인 독성을 나타내지 않음을 확인함. 이에 세포 흡수율 측정에 10 mg/mL의 농도를 적용하기로 함.

- 세포내 흡수율 측정을 위해 Caco-2 세포주는 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 MEM medium에 10% FBS(fetal bovine serum), 100 unit/mL의 penicillin, 100 µg/mL의 streptomycin을 첨가하여 12 trans-well (0.45 µm)상에서 배양했으며 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3일마다 배지를 교체하여 monolayer를 형성할 때까지 21일 배양함.
- Apical side와 basal side의 저항차가 300 Ω/cm<sup>2</sup> 이상인 well에 한해서 HBSS 용액으로 세척 후, 10 mg/mL의 분지아미노산 수용액과 리포솜-탑재 분지아미노산을 처리했으며 0, 1, 2, 4, 6 시간 간격으로 Apical side의 배양액을 취하여 분지아미노산의 농도를 HPLC 분석을 통해 측정하였으며 그 결과는 Figure 3-69에 나타냄.

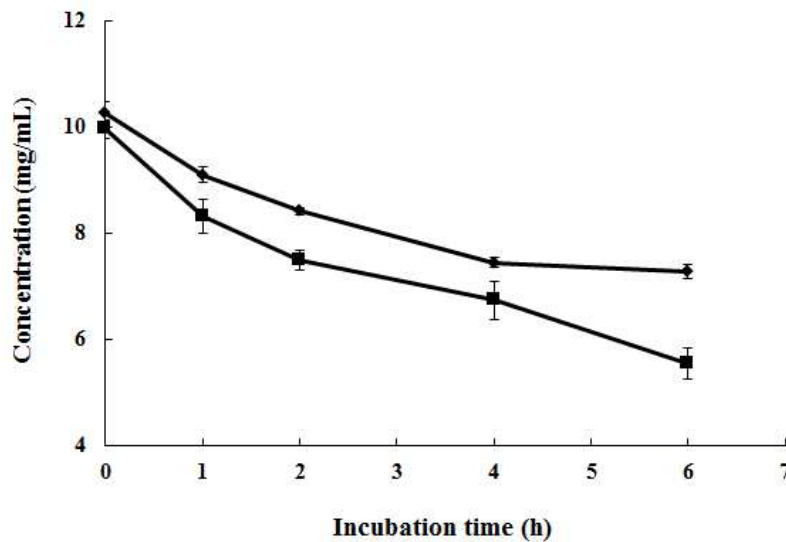


Figure 3-69. Caco-2 monolayer에서 분지아미노산과 리포솜-탑재 분지아미노산의 흡수 효율 측정 (◆, 분지아미노산 수용액; ■, 리포솜-탑재 분지아미노산).

- 실험 결과, 리포솜-탑재 분지아미노산이 분지아미노산 수용액에 비해 Apical side에서의 농도변화가 큰 것을 확인함. 이에 리포솜 탑재를 통해 분지아미노산의 흡수효율이 증가했음을 간접적으로 확인함.

(5) *In vivo* 상에서의 분지아미노산과 리포솜-탑재 분지아미노산의 생리 활성 검증

(가) LPS로 급성 염증이 유도된 쥐에서 분지아미노산이 염증반응과 백혈구 DNA 손상에 미치는 영향 검증

- 동물실험을 이용한 시제품의 생리활성 검증을 수행하기 이전에 순수 분지아미노산으로 동물실험을 진행하여 분지아미노산의 기능성이 *in vivo* 상에서도 확인이 가능한지 알아보기 위하여 LPS로 급성 염증이 유도된 쥐에서 분지아미노산이 염증반응과 백혈구 DNA 손상에 미치는 영향을 검증하기로 하였음.

① 실험동물 및 실험식이

- 평균 체중이 200 g인 6주령의 Sprague-Dawley 종 수컷 흰쥐 48마리를 코아텍(Koatech, Pyungtack, Korea)으로부터 받아 1주간 pellet으로 적응시키고 난

후에 쥐의 무게를 달아 난괴법으로 6군으로 나누어 cage에 한 마리씩 분리 사육하였음

- 그룹은 정상 대조군(Normal control group, NC), LPS 투여군(Positive control, PC), Valine 군(Valine group, Val), Leucine군(Leucine group, Leu), Isoleucine군(Isoleucine group, Ile), Mix군(Valine, Leucine, Isoleucine group, Mix)으로 구성됨.
- 정상 대조군과 LPS 투여군은 분지아미노산을 첨가하지 않은 식이를 제공하였으며, 이를 제외한 그룹은 분지아미노산이 첨가된 식이를 제공하였음. 4주간 식이를 제공한 후, 5주째 정상 대조군을 제외한 모든 그룹에 염증유발물질인 lipopolysaccharide(LPS resolved in PBS, sigma L2630, 5 mg/kg)를 복강 투여하여 4시간 동안 급성염증을 유발하였음.
- 본 실험에 사용한 식이는 AIN-76을 기본으로 한 분지아미노산첨가 식이(Valine, leucine, Isoleucine, 분지아미노산 Mix)를 제공하였음. 아미노산은 각각 Valine은 식이의 3.5%, leucine 6%, Isoleucine 3%를 포함하였음. 분지아미노산첨가 비율은 WHO 성인 아미노산 요구량을 참고하였고 외삽법을 통해 쥐가 먹는 양을 산출하였음.
- 실험식이 제조 시에는 첨가되는 아미노산의 양만큼 카제인을 제외하여 식이를 제조하였음(Table 3-15). 물은 자유공급 하였으며 실험식은 pair feeding 하였음. 사육실의 실내온도는 22±2℃, 습도는 50±5%를 유지하고, 전등을 조절하여 낮 12시간, 밤 12시간으로 조절하였음.
- 식이섭취량은 하루에 한 번, 체중은 일주일에 한 번 일정한 시간에 측정하였음. 실험 기간 동안의 체중증가량을 같은 기간 동안의 총 식이섭취량으로 나누어 식이효율을 구하였음.

Table 3-15. 동물실험을 위한 식이제조

Ingredient(g/kg)	Diet					
	NC <sup>1)</sup>	PC	Val	Leu	Isoleu	Mix
Basal composition						
Casein	200	200	193	188	194	175
Valine	0	0	7	0	0	7
Leucine	0	0	0	12	0	12
Isoleucine	0	0	0	0	6	6
Cornstarch	457	457	457	457	457	457
Sucrose	228	228	228	228	228	228
Rapeseed oil	35	35	35	35	35	35
Soybean oil	15	15	15	15	15	15
Cellulose	20	20	20	20	20	20
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	10	10	10	10	10	10
Mineral mixture <sup>3)</sup>	35	35	35	35	35	35

<sup>1)</sup>NC, AIN-76 based normal diet group; PC, AIN 76 based normal diet group; V, Valine diet group; L, Leucine diet group; I, Isoleucine diet group.

<sup>2)</sup>Vitamin mixture: AIN-76

<sup>3)</sup>Mineral mixture: AIN-76

② 혈액 및 각종 장기의 채취

- 실험동물을 희생시키기 전 12시간 동안 금식 시킨 후, CO<sub>2</sub>로 마취하여 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 응고 방지를 위해 헤파린 처리 튜브로 옮겨 보관하였음.
- Comet assay를 위하여 전혈 10 mL를 이용한 후 남은 혈액은 3000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 혈장을 획득한 다음 분석 시 까지 -70°C에 냉동 보관하였음.
- 실험동물의 장기는 적출하여 생리식염수에 세척하여 흡수지로 물기를 제거하였으며 무게 측정 후 액체질소로 급속 냉동시켜 분석 시 까지 -70°C에 냉동 보관하였음.

③ 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 민감도 측정을 위한 comet assay 실시

- 전혈 10  $\mu$ L 또는 비장세포를  $2 \times 10^5$  cell을 채취하여 75  $\mu$ L의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 0.5% normal melting agarose(NMA)가 precoating된 fully frosted slide 위로 전혈과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였음.
- Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75  $\mu$ L로 한 겹 더 덮었음. 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상을 유도하기 위해 세포가 도포된 슬라이드를 4°C의 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 5분간 방치한 후 PBS로 세척하였음.
- Cell lysis를 위해 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris)에 사용직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 침지시켰음.
- Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 DNA의 double strand를 풀어주기 위하여 4°C의 electrophoresis buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA)를 채워 20분간 unwinding 시킨 후 25 V/300 $\pm$ 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였음.
- 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액(pH 7.4)으로 충분히 세척하고 20  $\mu$ g/mL 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 형광현미경(Leica, Wetzlar, Germany)에서 관찰하고 CCD camera(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, Komet 4.0, Liverpool, UK)이 설치된 컴퓨터상에서 분석하였음. 백혈구의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 DNA 손상 민감도는 핵으로부터 이동한 DNA 손상정도(% Tail DNA)를 정량하여 측정하였음.
- 분지아미노산의 보충섭취와 LPS 투여가 비장세포의 DNA에 미치는 영향과 산화적 스트레스로 유도된 비장세포의 DNA 손상에 미치는 영향은 Figure 3-68~70에 제시하였음.

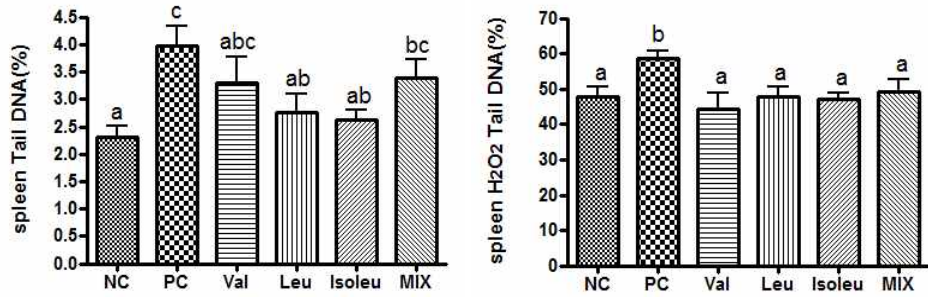


Figure 3-70. 분지아미노산의 비장세포의 DNA 손상에 미치는 영향((A) LPS에 의한 DNA 손상,(B) LPS와 함께 200  $\mu$ M  $H_2O_2$ 에 의한 DNA 손상).

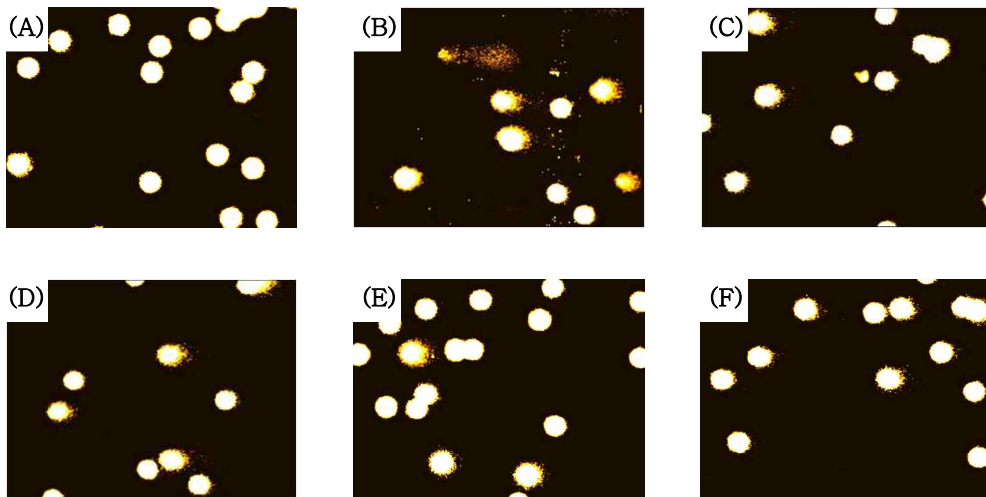


Figure 3-71. 분지아미노산의 비장세포의 DNA 손상에 미치는 영향((A) LPS에 의한 DNA 손상,(B) LPS와 함께 200  $\mu$ M  $H_2O_2$ 에 의한 DNA 손상).

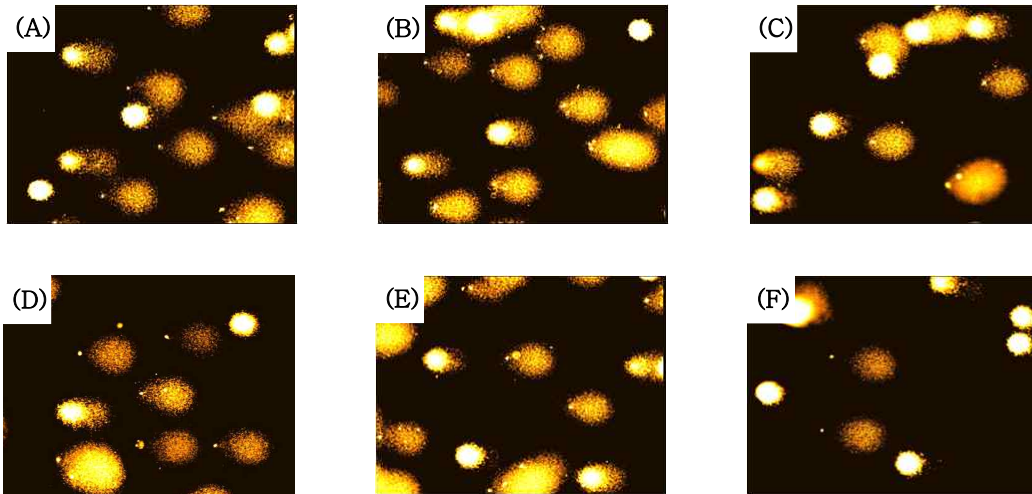


Figure 3-72. 분지아미노산의 비장세포의 LPS와 함께 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의한 DNA 손상에 미치는 영향((A) NC, (B) PC, (C) Val, (D) Leu, (E) Ile, (F) Mix).

- 실험 결과, LPS 투여는 비장세포의 DNA 손상을 유의적으로 증가시켰고(Tail DNA의 비율을 2.25%에서 4%까지 증가시킴) Leucine군과 Isoleucine군에서는 LPS 투여에 의해 손상된 비장세포의 DNA 손상을 유의적으로 2.5%까지 감소시키는 것을 확인하였음.
- 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의한 산화적 스트레스로 손상된 비장세포의 DNA 꼬리부분의 DNA% 함량을 측정하였을 때, NC군에 비해 PC군에서 DNA 손상이 유의적으로 증가하였고 PC군에 비해 분지아미노산 실험군(Val, Leu, Isoleu, Mix)에서는 유의적으로 감소되었음.
- LPS는 자유 라디칼을 생산하여 세포벽에 손상을 주어 결과적으로 DNA 손상과 세포사멸을 초래하는 것으로 알려져 있음. 따라서 분지아미노산의 보충섭취가 LPS에 의해 생성되는 자유 라디칼을 억제하고 세포벽을 보호함으로써 비장세포의 DNA 손상을 방어하는 것을 확인하였음.

(나) 비알코올성 지방간 손상 환쥐에 대한 리포솜에 봉입된 분지아미노산의 간 기능 보호 효과

① 실험동물의 사육 및 실험식이

- 7주령의 SD계 수컷 흰쥐 20마리를 (주)코아텍사(Pyungtack, Korea)로부터 구입하여 1주일간 lab-chow 식이(5057, (주)에그리브랜드 퓨리나 코리아, Sungnam, Korea)를 제공하면서 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법에 의하여 대조군(NC), 고탄수화물 식이군(FG), 고탄수화물 식이+분지아미노산 섭취군(SB), 고탄수화물 식이와 리포솜에 봉입된 분지아미노산 섭취군(LB)로 나누어 8주간 사육하였음.
- 비알코올성 지방간을 유발하기 위한 고탄수화물 식이는 AIN-93 식이조성을 토대로 high-fructose/high-glucose 식이(총 섭취에너지의 70%)로 구성하였으며, 분지아미노산 섭취군(SB, LB)은 각각의 분지아미노산을 매일 1 g/kg BW씩 음수로 제

공하였음.

- 실험동물은 각 케이지에 1마리씩 사육하면서 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육기간 동안 사육실의 온도는 20°C, 습도는 55%를 유지하고 명암은 12시간(08:00~20:00)을 주기로 자동 조절하였음.
- 실험 동물에 대한 식이 조성은 Table 3-16에 나타냄.

Table 3-16. 동물실험을 위한 식이제조(g/kg)

Ingredient	NC <sup>1)</sup>	FG	SB	LB
Corn starch	700	0	0	0
Glucose	0	350	350	350
Fructose	0	350	350	350
Casein	170	170	150	150
Soybean oil	30	30	30	30
Mineral mixture <sup>2)</sup>	35	35	35	35
Vitamin mixture <sup>3)</sup>	10	10	10	10
Cellulose	50	50	50	50
Choline bitartrate	2	2	2	2
Methionine	3	3	3	3
분지아미노산			20	
분지아미노산-encapsulated liposomes				20
Total	1000	1000	1000	1000

<sup>1)</sup>NC(normal control), FG(fructose-glucose control), SB(분지아미노산), LB(분지아미노산-entrapped liposomes)

<sup>2)</sup>AIN-93 mineral mixture

<sup>3)</sup>AIN-93 vitamin mixture

## ② 혈액 및 장기의 채취

- 8주간의 사육이 끝난 후 12시간 이상 공복을 유도한 흰쥐를 드라이아이스로 흡입 마취시킨 후 복대동맥에서 채혈하였음.
- 분리한 간, 심장, 신장, 비장, 근육, 부고환지방, 신장주변지방은 생리식염수로 세척하여 표면의 혈액을 제거한 후 여과지로 습기를 제거하고 무게를 측정하였음.
- 각 군별 체중증가량, 식이섭취량, 식이섭취효율 및 장기무기는 Table 3-17~18에 나타냄.

Table 3-17. 체중증가량, 식이섭취량 및 식이섭취효율

	NC	FG	SB	LB
Body weight gain(g/day)	3.8±0.1 <sup>b</sup>	3.7±0.2 <sup>b</sup>	3.2±0.1 <sup>a</sup>	2.9±0.1 <sup>a</sup>
Food intakes(g/day)	19.9±0.2 <sup>ns</sup>	20.4±0.2	19.7±0.5	19.8±0.6
FER(%) <sup>1)</sup>	19.2±0.5 <sup>b</sup>	18.4±0.8 <sup>b</sup>	16.0±0.6 <sup>a</sup>	14.8±0.7 <sup>a</sup>

Values are the mean±S.E.

Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group.

<sup>ns</sup>not significant.

<sup>1)</sup>FER: food efficiency ratio(weight gain/food intake × 100)



- 실험 결과, 각 군별 식이섭취량은 유의적인 차이를 보이지 않음.
- 체중증가량과 식이섭취효율은 고탄수화물 식이군(FG)보다 분지아미노산 섭취군(SB, LB)이 유의적으로 낮은 결과를 보임.
- 리포솜-탑재 분지아미노산 섭취군의 경우, 기존의 분지아미노산 수용액 섭취군에 비해 유의적으로 낮은 체중증가량과 식이섭취효율을 보임.

Table 3-18. 분지아미노산의 섭취가 장기무게에 미치는 영향

	NC	FG	SB	LB
	(g/100g body weight)			
Liver	2.5±0.1 <sup>ns</sup>	2.9±0.2	2.8±0.1	2.6±0.1
Heart	0.3±0.0 <sup>ns</sup>	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0
Kidney	0.6±0.0 <sup>ns</sup>	0.6±0.0	0.6±0.0	0.6±0.0
Spleen	0.2±0.0 <sup>ns</sup>	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
Skeletal muscle	0.6±0.0 <sup>ab</sup>	0.5±0.0 <sup>ab</sup>	0.5±0.0 <sup>a</sup>	0.6±0.0 <sup>b</sup>
Epididymal fat	1.3±0.2 <sup>ns</sup>	1.3±0.1	1.1±0.1	1.1±0.0
Peritoneal fat	0.3±0.1 <sup>ns</sup>	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.1

Values are the mean±S.E.

Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group.

<sup>ns</sup>not significant.

- 간, 심장, 신장, 비장, 근육, 부고환지방, 신장주변지방의 체중 대비 상대적인 무게는 그룹 간에 유의적인 차이를 보이지 않음.
- 근육의 체중 대비 상대적인 무게는 대조군(NC), 고탄수화물 식이군(FG), 분지아미노산 섭취군(SB) 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, LB군은 고탄수화물 식이군(FG)보다 근육 무게가 증가하는 결과를 확인함.
- 분지아미노산의 경우, 근육 세포 및 조직의 구성에 있어 큰 비율을 차지할 뿐만 아니라, 주로 대사되는 기관임에 비추어 리포솜-탑재 분지아미노산의 경우 그 생체이용률이 증가되어 위와 같은 결과가 도출된 것으로 사료됨.

### ③ 간기능 지표 분석

- 간기능을 나타내는 지표인 AST, ALT 및 ALP에 대한 결과는 Table 3-19와 Figure 3-71에 나타냄.

Table 3-19. 분지아미노산의 섭취가 간기능 지표에 미치는 영향

	NC	FG	SB	LB
AST(mg/dL)	83.8±1.5 <sup>ab</sup>	95.4±12.2 <sup>b</sup>	65.6±2.5 <sup>a</sup>	80.0±3.4 <sup>ab</sup>
ALT(mg/dL)	66.0±3.5 <sup>ab</sup>	75.0±9.4 <sup>b</sup>	52.0±2.6 <sup>a</sup>	57.4±3.0 <sup>a</sup>
ALP(mg/dL)	27.7±4.5 <sup>ab</sup>	30.1±4.1 <sup>b</sup>	19.7±1.9 <sup>a</sup>	22.4±0.7 <sup>ab</sup>

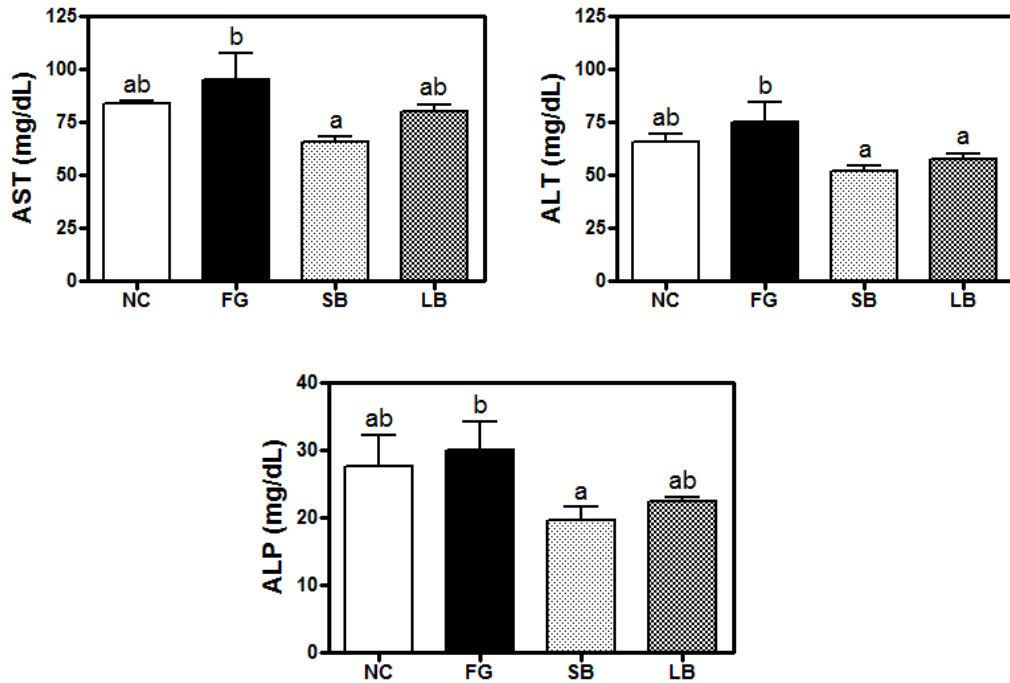


Figure 3-73. 분지아미노산의 섭취가 간기능 지표에 미치는 영향.

- 간기능 지표를 분석한 결과 AST, ALT, ALP 모두 대조군(NC)보다 고탄수화물식이군(FG)에서 증가함을 확인함.
- 고탄수화물식이군(FG)과 분지아미노산 섭취군(SB, LB)을 비교한 결과 SB군은 AST, ALT, ALP 모두 고탄수화물식이군(FG)보다 유의적으로 감소하여 지방간유도에 의해 증가한 간독성을 감소시키는 효과를 확인함.
- LB군의 경우, AST, ALT 및 ALP 모든 지표에서 NC군과 유의적 차이를 보이지 않았으며 FG군에 대해서는 유의적인 감소를 보임. AST와 ALP에 대해서는 SB군과 비교해서 유의적으로 높은 수치를 보임을 확인함.
- 분지아미노산의 주요 대사 경로가 근육 세포이며 간에서는 비교적 소량만이 대사되는데, 분지아미노산을 리포솜에 탑재함으로써, 근육세포에 및 간세포에서 생체이용률이 높아져 대사 효율이 증가하여 분지아미노산 대사 중간 산물인 aspartate, oxaloacetate와 레시틴과 베타-시토스테롤에 존재하는 인산기를 대사시키기 위해 관련 효소인 AST와 ALP의 발현량이 증가한 것으로 사료됨.
- LB군은 다른군에 비해 근육의 무게가 증가함을 보였는데, AST, ALT의 경우는 간뿐만 아니라 근육이나 신장, 뇌 조직에서도 생성될 뿐만 아니라 염증과 같은 손상이 아닌 활발한 대사로 인해 그 발현량이 증가할 수 있다는 보고와, LB군에서 NC에 대비해 그 발현량이 유의적인 차이는 보이지 않는 것으로 미루어 비알콜성 지방간유도에 있어 효과적이라 사료됨.

#### ④ 간 지질 지표 분석

- 간 지질의 지표가 되는 중성지방과 총 콜레스테롤의 함량은 Table 3-20에 나타냄.

Table 3-20. 분지아미노산의 섭취가 간 지질 지표에 미치는 영향

	NC	FG	SB	LB
Triglyceride(mg/g)	0.9±0.0 <sup>a</sup>	1.1±0.0 <sup>b</sup>	1.0±0.0 <sup>ab</sup>	1.0±0.0 <sup>ab</sup>
Total cholesterol(mg/g)	2.3±0.1 <sup>a</sup>	2.6±0.1 <sup>b</sup>	2.4±0.1 <sup>ab</sup>	2.7±0.1 <sup>b</sup>

- 간지질 대사를 분석한 결과 중성지방과 총 콜레스테롤은 대조군(NC)보다 고탄수화물 식이군(FG)이 유의적으로 증가하였으며, 분지아미노산의 섭취는 고탄수화물 식이로 인해 증가한 중성지방(SB, LB)과 총 콜레스테롤(SB)을 감소시켰으나 통계적인 차이는 없었음.
- 리포솜 제작시에 이용된 레시틴과 베타-시토스테롤의 주기적인 섭취와 대사로 인해 LB 군에서 총 콜레스테롤이 증가된 것으로 사료됨.

⑤ 지질 과산화 분석

- 지질의 과산화 분석을 위해 혈장과 간의 TBARs 수준을 측정하였으며 분지아미노산의 섭취가 지질 과산화에 미치는 영향은 Table 3-21과 Figure 3-72에 나타냄.

Table 3-21. 분지아미노산의 섭취가 혈장 및 간의 지질과산화에 미치는 영향

	NC	FG	SB	LB
Plasma TBARs(% of control)	83.5±16.3 <sup>ns</sup>	80.7±11.3	73.4±8.0	71.0±17.0
Liver TBARs(% of control)	93.8±3.6 <sup>a</sup>	106.3±4.9 <sup>b</sup>	94.1±3.1 <sup>a</sup>	95.2±3.3 <sup>ab</sup>

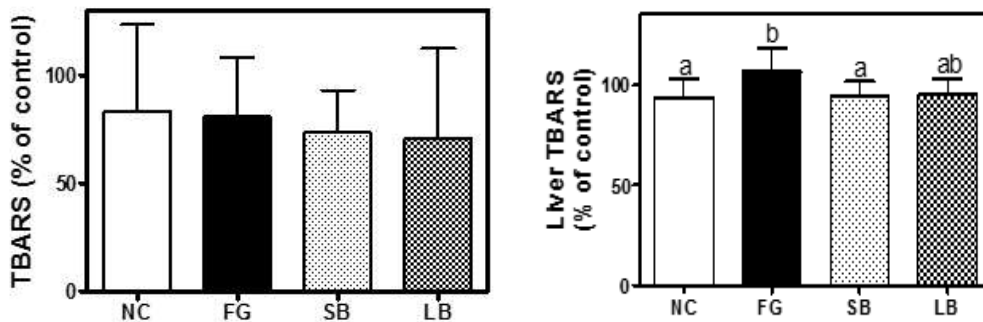


Figure 3-74. 분지아미노산의 섭취가 혈장 및 간의 지질과산화에 미치는 영향.

- 간의 지질과산화 분석에서 대조군(NC)보다 고탄수화물 식이군(FG)이 유의적으로 간 TBARs가 증가하였고, 분지아미노산 섭취로 인해 감소함을 확인함.
- 혈장의 지질과산화는 그룹간의 유의적인 차이가 없었음.

⑥ 산화적 DNA 손상 보호 효과 분석

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>유도 산화적 스트레스로부터 분지아미노산의 간세포와 혈액으로부터 분리한 백혈구에 대한 보호 효과는 Table 3-22와 Figure 3-73에 나타냄.

Table 3-22. 분지아미노산의 섭취가 백혈구 및 간세포의 DNA 손상 보호에 미치는 효과

	NC	FG	SB	LB
<i>DNA damage of leukocyte</i>				
Tail DNA(%)	22.2±2.4 <sup>a</sup>	33.9±5.0 <sup>b</sup>	22.9±1.3 <sup>a</sup>	26.4±3.5 <sup>ab</sup>
<i>DNA damage of hepatocyte</i>				
Tail DNA(%)	28.9±1.9 <sup>a</sup>	66.0±6.2 <sup>c</sup>	53.6±7.2 <sup>bc</sup>	40.8±6.8 <sup>ab</sup>

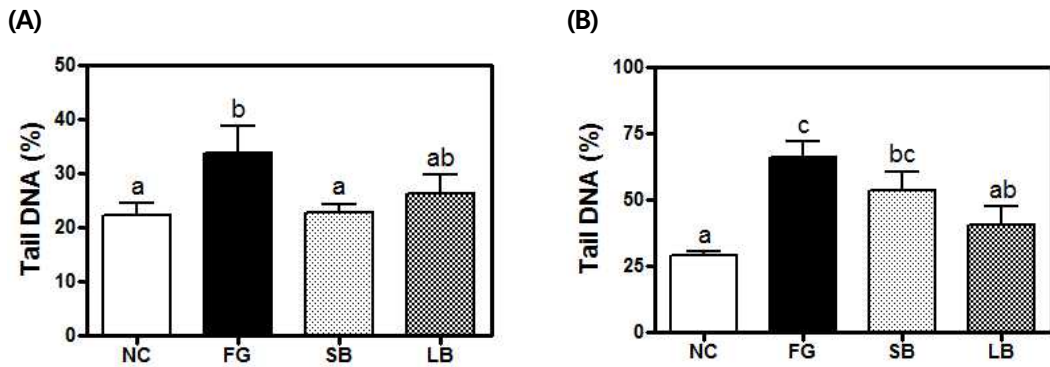


Figure 3-75. 분지아미노산의 섭취가 백혈구 및 간세포의 DNA 손상 보호에 미치는 효과.

- 혈액으로부터 분리한 백혈구와 간세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스를 유도한 후 DNA 손상보호 효과를 분석한 결과 고탄수화물 식이는 DNA 손상을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났으며, 분지아미노산의 섭취로 인해 DNA 손상이 감소하는 효과를 나타내었음.
- 백혈구에서는 SB군에서만 유의적인 DNA 손상 보호효과가 유의적인 차이를 나타냈는데, 이는 기존 분지아미노산의 경우 혈중에서 일정 농도로 존재할 수 있는 반면 리포솜-담재 분지아미노산의 경우 인지질 이중층 구조라는 특성으로 인해 혈중으로부터는 림프관을 통해 이동할 것이라 사료됨.
- 이 같은 이유 때문에 혈중 백혈구에는 전달 효율이 떨어져 위와 같은 결과가 도출된 것이라 사료됨.
- 간세포에서는 LB군이 유의적으로 가장 높은 DNA 손상 보호능을 나타냄을 확인하였으며 이 또한 리포솜-담재로 인한 생체 이용률이 증가되었음에 기인함으로 사료됨.

#### 4. 기능성 소재를 활용한 제품 생산 및 기초효능평가(3협동: 대상 이규환)

가. 난용성 소재의 가용화 기술 개발 및 조성비 선정

(1) 국내외 인정·허가 사용 현황 및 제품 현황조사

(가) 아미노산 인정·허가 사용 현황

① 아미노산 분야별 현황

- 의료용 영양분야: 품질이 기본이고 안정적인 납품이 중요, 스포츠, 영양 및 건강기능식품 시장은 가격이 중요하다.
- 경구용, 정맥용 등 제품에 적기 공급을 위해 대리상을 통해 구매 중이다.
- 의약과 관련된 기능만 과학적으로 인정하고 있다.
- 스포츠 영양 및 영양 보충제품: 북미, 유럽에 집중되나, 성장속도는 러시아, 브라질, 중국이 더 빠르다.
- 스포츠 영양, 건강기능식품 등과 관련된 기능에 대해서는 자료가 미흡한 실정이다.
- 화장품 및 퍼스널 케어 제품: 아미노산은 이 시장에서 크게 영향을 못 미치고 있다.
- 시장 특성상, 오픈된 정보가 많지 않아 제품의 원재료 등이 잘 알려져 있지 않다.
- 식품과 같이 유효한 과학적 기능이 거의 없다.
- 사료시장: 환경적인 이점과 가격적으로 불안정한 대두단백질을 대체하기 위해 사용하고 있다.
- 사료에 대한 아미노산의 기능성 자료가 많이 부족하다.

Table 4-1. 아미노산 종류별 글로벌 수요량(2011/12년, 톤)

아미노산	지역					
	북미	중국	유럽	일본	기타	합
GLN	2952	1781	1261	344	360	6338
ARG	2860	1475	1590	760	500	7285
LEU	765	260	287	132	196	1640
ILE	715	225	277	127	189	1533
VAL	835	880	1205	165	120	3025

Table 4-2. 아미노산 종류별 글로벌 수요 예측량(2017/18년, 톤)

아미노산	지역					
	북미	중국	유럽	일본	기타	합
GLN	3393	2337	1541	411	571	8253
ARG	4583	3376	2360	1141	1712	13172
LEU	980	360	375	173	263	2151
ILE	870	328	355	168	238	1959
VAL	1030	1285	1300	248	167	4030

② 제품별 아미노산 수요

- 아르기닌이 37%로 가장 크고, 글루타민, BCAA 순으로 수요가 있다.
- 발린: 의료 영양용 제품과 스포츠 영양 조성물의 사용비율이 증가하여 BCAA중 가장 크다.

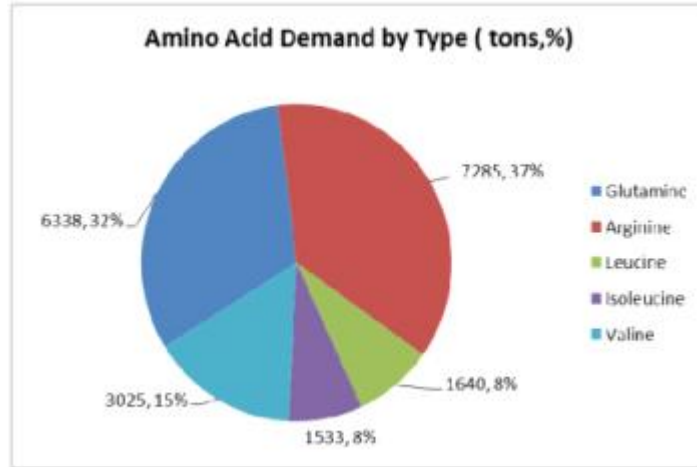


Figure 4-1. 제품별 아미노산 수요 종류.

③ 용도별 아미노산 수요

- 식품 및 영양공급 분야가 다른 분야보다 큰 비율이다(57%).
- 글루타민은 사료로 사용되고 있지 않음에도 불구하고 대량 수요가 있는 아미노산 소재이다.

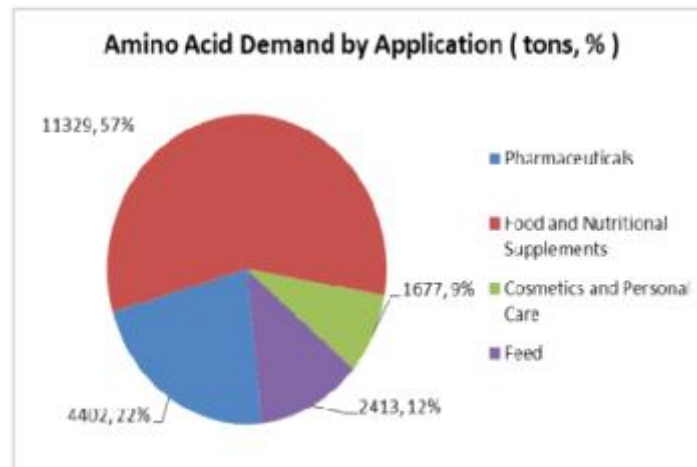


Figure 4-2. 용도별 아미노산 수용 시장

④ 아미노산 응용용도별 구분

Table 4-3. 용도별 주요 사용 아미노산

Food & Beverage	Animal Feed	Sports Nutrition	Cosmeceutical
MSG(Glutamic acid)	Lysine	BCCA(Leucine, Valine, Isoleucine)	Lysine
Cysteine	Methionine	Arginine	Cysteine
Lysine	Threonine	Glutamine	Arginine
Glutamine	Tryptophan		Glutamic acid
			Proline

## (2) 난용성 소재 가용화 기술 개발을 위한 자문 및 현황 조사

### (가) 난용성 생리활성 소재의 제품화 가능성

- 현재까지 발굴된 난용성 생리활성 소재의 경우 대부분이 25상에서 뛰어난 효과를 보이는 유용성 물질임에도 불구하고 경구투여 시 매우 적은 양만이 생체 내에서 이용된다는 단점이 있다. 이는 낮은 생체이용률에서 기인한 결과로서 이로 인해 난용성 생리활성 소재의 제품화에 어려움을 겪고 있다.
- 세부적으로 장내의 낮은 용해도 및 투과도, 불충분한 장내 체류 시간, 식품 가공 및 저장 중의 산소, 온도, 빛 등에 의한 안정성 및 보존성 저하 등의 요인이 있으며, 난용성 생리활성 소재의 제품화 가능성을 높이기 위해서는 미세캡슐화 기술 및 방출제어 기술 개발 등이 함께 이루어져야 한다.
- 캡슐화(encapsulation) 기술은 고체, 액체, 기체상의 물질을 특정 조건하에서 조절된 속도로 방출할 수 있도록 어떤 물질(material)이나 조직(system)내부에 포장하는 기술이다. 크기는 수  $\mu\text{m}$  단위에서 수 nm로 다양하다.
- 미세캡슐화(microencapsulation)기술은 불안정한 물질을 외부환경, 즉 빛, 산소, 수분으로부터 보호하여 손실을 줄이거나 반응성이 큰 물질을 격리시키고 독성, 냄새, 맛을 은폐시키며, 산화방지, 물성향상 및 내용물의 용출속도를 조절하는 등의 목적으로 이용되고 있다.
- 미세캡슐화에 사용되는 피복물질은 유화제의 역할을 하므로 피막형성능력이 우수한 물질이 사용된다. 이상적인 피복물질의 조건은 독성이 없고 체내에 적합하며 외부 환경으로부터 중심물질의 보호가 가능해야 한다. 외에도 경제성이 우수해야하며 식품산업에서 사용이 허용된 용매(물, 에탄올 등)에서 용해도가 우수한 물질들이 주로 사용되고 있다.
- 방출제어 기술(controlled release system)은 단시간에 물질 방출이 진행되는 기존의 단점을 개선한 기술로서 비교적 오랜 시간동안 지속적으로 물질의 방출이 진행되거나 혹은 특정 시간동안 물질의 방출을 제어할 수 있는 기술을 말하며, 이는 생체이용률을 향상시킴으로서 기존의 급작스러운 물질 방출에 따른 부작용을 최소화할 수 있는 기술이다.
- 난용성 생리활성 소재의 제품화를 위해서는 낮은 생체이용률을 개선할 수 있어야 하며 이는 난용성 소재의 가용화 기술, 방출제어기술 및 target delivery, 장점막 투과기술 개선이 수반되어야 한다(Augustin et al., 2009; Nedovic et al., 2011).

### (나) 난용성 생리활성 소재로서 분지아미노산의 중요성

- BCAA는 인체에 필요한 필수 아미노산으로서 leucine, isoleucine, valine이 있으며 인체의 근육단백질의 약 35%를 차지하고 있다. 신체에서는 합성하지 못하므로 음식을 통해 섭취해야하는 아미노산이다.
- BCAA는 아미노산 중에서도 소수성이 강한 편에 속하는 난용성 물질로 알려져 있으며 근육 형성촉진, 신체 에너지 향상, 집중력 유지 등의 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.
- BCAA는 체내 면역시스템에서 면역반응에 관련된 물질을 합성하기 위한

전구체로서의 중요한 역할을 담당하며 인체 면역체계 유지에 필수적이라고 할 수 있다(Calder, 2006).

- BCAA는 특히 장과 면역시스템에서 체내 세포분화에 도움을 주는 영양물질로 알려진 글루타민의 합성을 촉진하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 섭취를 통해 격렬한 운동 후 말초 혈액 단핵세포의 증식능력 회복에 도움을 주며 혈중 글루타민 농도를 일정하게 유지하는데 도움을 주는 것으로 보고되었다(Pratell et al., 2000; Bassit et al., 2002).
- BCAA의 섭취는 간경변증에 걸린 비만환자의 간암 위험성을 줄여주는 화학적 예방법이 될 수 있으며 이는 인슐린 저항성의 개선과 관계가 깊다(Shimizu et al., 2009).
- BCAA는 만성간염환자에 대해 알부민 대사장애 개선 효과를 나타낸 것으로 보고되었다(Takeshita et al., 2012).
- BCAA는 mRNA의 번역과 신호전달경로의 조절을 통해 단백질 번역을 위한 특정 mRNA의 선별과 같은 기능을 조절할 수 있는 것으로 보고되었으며 이는 곧 BCAA가 유전자 발현과 관계가 있음을 의미한다(Liu et al., 2013).
- BCAA(leucine, isoleucine, and valine)중 특히 leucine의 경우 단백질대사에 있어 동화작용을 하며, 인체 근육 내 단백질 합성속도를 증가시키고 단백질 분해를 억제시키는 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 혈당을 낮추고 성장호르몬의 생성을 증가시키며 근육조직의 분해를 억제하는 것으로 보고되었다(Blomstrand et al., 2006).
- BCAA중 특히 leucine의 경우, 충분한 단백질을 포함한 식이요법과 함께 섭취 시 질소평형 유지에 도움 및 단백질 합성을 증가시킨다고 알려져 있으며 또한 인슐린과 prolactin의 분비에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Harbans et al., 1995).
- Isoleucine의 경우 헤모글로빈 형성에 필요하고 혈당을 일정하게 유지하도록 도움을 주며 에너지 향상, 근육조직 손상의 재생 및 성장호르몬 분비를 자극하는 기능이 있다.
- Valine은 근육대사에 필요한 아미노산으로 수소평형 유지에 도움을 주며, 간, 담낭질환의 치료보조에 사용되기도 한다.
- BCAA시장은 주로 의약, 건강기능식품 위주이며, BCAA중 valine의 경우 사료수요가 유럽과 중국에서 높은 것으로 나타난다. 향후 BCAA를 포함한 세계 아미노산 시장의 규모는 지속적으로 커질 것으로 예측된다.
- BCAA는 음주문화 및 노령화 가속으로 인해 향후 간 건강 관련 시장 및 노인의 근육감소증 치료제품 시장(제약 및 건강기능식품)에 유망할 것으로 예상된다. 일본의 경우 수액, 경장영양, 아미노산 제제 등의 BCAA 제약용 제품이 판매되고 있을 뿐만 아니라 스포츠 에너지 음료, 아미노산 보충제 및 유동식과 같이 식품으로도 판매되고 있다. 외에도 화장품이나 사료에 적용한 제품개발이 진행 중에 있다.
- 국내 시장의 경우 꾸준한 성장세에 있으며, BCAA를 의약품 및 식품에 적용하여 다양한 제품이 출시되고 있다.



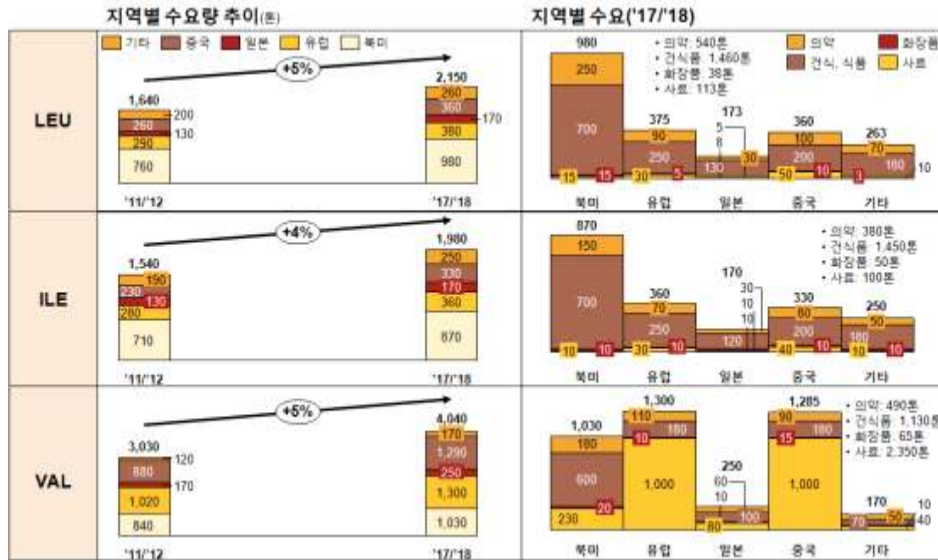


Figure 4-3. BCAA 세계 시장 현황.

(다) 난용성 생리활성 소재 가용화 및 생체이용률개선 관련기술의 현황

- 현재 난용성 생리활성 소재의 가용화를 위한 다양한 방법이 연구되고 있다. 용해도의 향상 및 물질의 흡수도를 증가시킬 수 있는 전통적인 기술로는 입자의 크기를 감소시켜 용해도를 증가시키는 미분쇄법, 염의 형태로 제조하는 방법, pH를 조절하여 용해도를 증가하는 방법, 유기용매에 용해시킨 뒤 증발시키는 용매증발법, 초임계 유체 팽창법 등이 있으나 낮은 수율 및 제약점에 부딪히고 있는 실정이다.
- 따라서 이 같은 한계를 극복하고 독보적 기술경쟁력을 갖추기 위해 리포좀-탐재 미세캡슐화 및 나노/마이크로에멀전 기술을 통해 난용성 물질의 생체이용률을 개선하고자 한다.
- 리포좀은 수용성 내핵과 함께 지질소포 내에 열역학적으로 안정하며 적어도 하나의 내핵을 둘러싸고 있는 이중층 구조로서 현재 target delivery의 수단으로 가장 각광받고 있는 물질 가운데 하나이다. 리포좀에서 난용성 물질은 이중층에 위치하며 수용액에서 나노~마이크로 범위의 w/o/w형 분산계를 이루고 있다.
- 리포좀은 지질이중층이 여러 겹 겹쳐 있을 수 있으며, 이 같은 구조를 라멜라구조라고 하며 이는 세포막 구조와 유사하다. SUV(small unilamellar vesicle), LUV(large unilamellar vesicle) 또는 MLV(multilamellar vesicle)과 같이 분류될 수 있으며 이렇게 만들어진 지질 이중층은 등그렇게 배열된다. 난용성 물질의 경우 지질의 탄화수소 사슬 층에 분포하게 되나, 경우에 따라 내부 물층 속에 침전하여 넣기도 한다(Kashyap et al., 2012).
- 리포좀의 경우 난용성 물질의 생체이용률을 높일 수 있고 화학적 불안정성 및 낮은 막투과도 등을 개선할 수 있으며 각종 생리활성을 지닌 유용물질의 수송체로서 이용될 수 있다.
- 리포좀은 난용성 물질의 용해도를 획기적으로 증가시킬 수 있는 장점이 있으나 혈중 리포좀이 터지는 경우가 종종 발생한다. 이 같은 문제의 해결을 위해 리포좀 표면을

안정한 고분자인 폴리에틸렌 글리콜 등으로 소식하여 생체 내 안정성을 획기적으로 개선한 스텔스 리포좀(Stealth liposome)기술이 개발되어 상업적으로도 적용되고 있다.

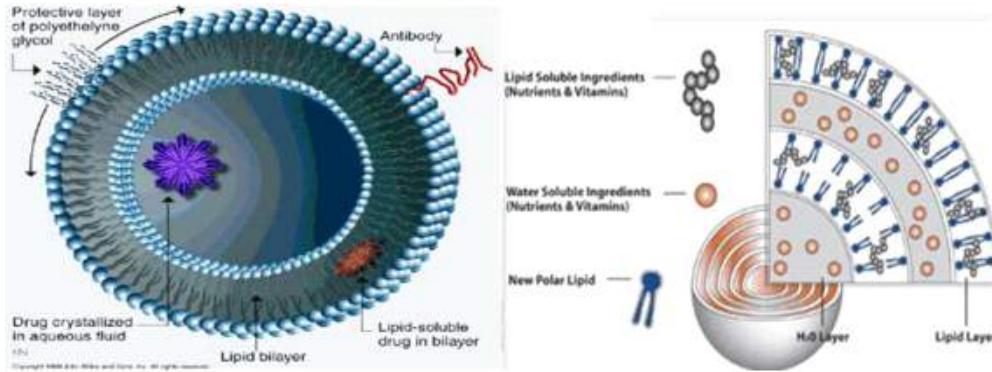


Figure 4-4. 일반적인 리포좀의 라멜라 구조.

- 난용성 약물의 가용화를 위해서는 나노/마이크로에멀전이 매우 효과적인데 이는 기름 상에서 난용성 물질을 잘 녹일 수 있기 때문이다. 난용성 물질을 o/w 에멀전의 중심부를 형성하는 기름 상에 녹인 후 유화제를 이용하여 물에 분산시키면 수백 nm의 지름을 가진 입자가 분산체인 에멀전을 얻을 수 있고 입자의 크기도 충분히 작아 주사제로도 널리 이용되고 있다.
- 나노에멀전의 경우 일반적으로 물속에 오일상을 분산시킨 o/w형, 오일상에 물을 분산한 w/o형, 그리고 혼합형인 w/o/w형 나노에멀전 방법으로 생성 가능하며 여러 기능성 생리활성 소재를 삽입하여 만들어진다. 그 크기는 80-800Å 정도의 구형 혹은 실린더형의 액적이 분산되어 있는 계로서 열역학적으로 안정한 상태를 띄고 있다.
- 제약부문에 많은 난용성 물질 중 에멀전 형태로 가용화되어 판매되는 것으로는 면역억제제인 사이클로스포린과 항암제 파클리탁셀이 있다. 사이클로스포린의 경우 마이크로에멀전을 형성하여 몸속으로 흡수시킨다. 파클리탁셀 제품 또한 흡수가 어려워 마이크로에멀전을 형성시켜 정맥주사로 이용하고 있다.

#### (라) 난용성 소재 연구개발동향

##### ① 미국 및 유럽

- 난용성 약물의 가용화 기술을 개발하는 대표적인 제제개발 전문회사로 Alza, Euland, Knoll, Gatteposse, Emisphere등이 있으며 특화된 가용화 기술을 개발하여 제품을 개발 중에 있다.
- Alza사는 나노입자화 기술 중 특수 분쇄기를 사용하여 입자를 나노단위로 미분화하고 입자 상호간의 응집현상을 막기 위해 새로운 첨가제를 사용하는 것을 특징으로 하는 나노크리스탈 기술을 개발하여 다수의 난용성 물질에 적용하고 있다.
- Euland사는 BIORISE™이라는 무정형화 기술 및 Glytech™이라는 흡수율을 개선시킬 수 있는 기술을 개발하여 제품에 적용하고 있다.

- Abbott의 자회사인 Knoll사는 Meltrex™이라는 기술을 개발하였으며 이는 난용성물질과 기체를 고온에서 용융시킨 후 냉각하여 무정형화 함으로써 생체이용률을 획기적으로 높이는 방법이다.
- 프랑스 Gattepose사는 SMEDDS(self-microemulsifying drug delivery system)라는 마이크로에멀전 상태의 미세 용액입자 제어기술을 개발하여 제품에 적용하고 있으며, 이 기술은 계면활성제, 보조 계면활성제 및 난용성 약물을 최적의 비율로 혼합, 가용화 하여 캡셀에 충전한다.
- R.P. Scherer사는 Scherasol™이라는 초기 마이크로에멀전 기술을 개발하여 현재 다양한 제품에 적용하고 있다.

#### ① 일본

- 미국이나 유럽 등에 비하여 두드러지는 가용화 기술 개발회사는 없으며, 소규모 단위의 자체 연구팀에서 위와 같은 연구가 주로 수행되고 있다.

#### ② 국내

- 국내의 제약회사를 중심으로 연구의 상당부분이 난용성 약물의 가용화 기술개발에 집중되어 있다.
- 국내 기업 중에는 한미약품, 유한양행, 동아제약, 종근당 등이 이 분야 연구를 선도하고 있으며, 최근에는 대부분의 국내 제약기업이 이 분야 연구를 자체 제품개발의 가장 중요한 부분으로 인식하고 있다.
- 특히, 한미약품은 난용성 약물의 가용화 기술 부분에서 국내 연구를 선도하고 있으며, 1997년 마이크로에멀전 기술을 개발하여 라이선싱에 성공함으로써 이 분야의 기술개발이 고부가가치로 연결됨을 입증했다.
- 유한양행, 동아제약 등도 사이클로스포린 A, 이트라코나졸 등의 제품에 적용하여 기술수출에 성공한 바 있다.
- 삼천당제약(주)는 난용성약물 가용화의 핵심기술인 마이크로스피어 제조기술을 발전시켜 클리펜슈프림정 제품화에 성공하였으며 일본, 인도네시아 등의 국가에 수출예정이다.
- JW중외제약은 물질의 물리적 정상만의 변화를 통한 가용화 기술 및 초임계유체를 이용한 나노 및 무정형 입자 제조기술 개발을 추진하여 난용성 물질의 용해도 증가를 위한 기술 개발에 집중하고 있으며 이를 적용한 다양한 제품개발 연구를 진행 중에 있다.
- 난용성 물질의 가용화 또는 흡수율을 개선시킬 수 있는 원천 기술을 개발할 경우 화장품, 식품 등의 타 분야에 곧바로 적용이 가능하므로 막대한 파급효과가 예상된다.

#### (마) 난용성 생리활성 소재의 생체이용률 개선을 위한 연구의 복합성

- 난용성 생리활성 소재의 생체이용률 개선 연구는 생체이용률 개선기술 개발을 비롯하여 생리활성/생체이용률 평가, 기술적용 소재의 제품개발/사업화 등의 분야가

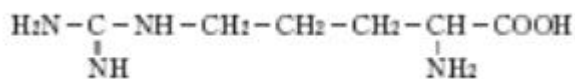
오케스트라와 같은 유기적인 협동연구를 하도록 요구되지만, 많은 연구과제가 단발적으로만 이루어져 효율성이 낮고 최종적인 제품개발까지 이어지지 않는 문제가 지적되어 왔다. 따라서 본 연구과제는 이러한 모든 팀으로 구성함으로써, 최종결과까지 달성할 수 있는 유기적인 협동연구 체계를 구축할 수 있다.

- 특히 기능성 식품 분야에 있어서는 기능성 소재 개발 및 시험관 수준에서의 기능성 평가만 주로 이루어지고 있는데, 기능성에 대한 in vivo 모델(생체 시스템)에서의 생리활성 평가 및 이로 인한 용량-반응 관계에 대한 연구를 종합적이고 심도 있게 수행해야 하며, 이를 바탕으로 기능성식품 인증을 받아야 한다.
- 절차에 필요한 수준의 연구 자료를 확보할 수 있으며, 연구과제에서 개발된 기능성 소재 및 관련기술을 조속히 산업화/제품화 할 수 있다.

(바) 난용성 생리활성 소재의 시장동향

① 아르기닌

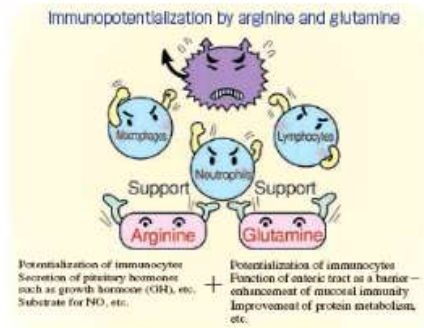
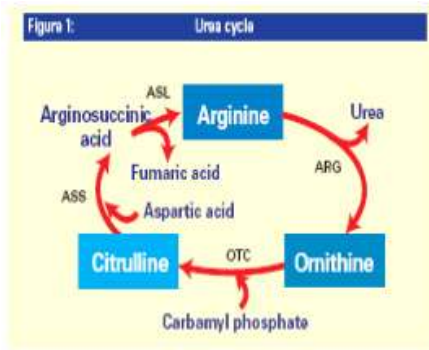
- 화학적 조성



Crystal Magnification : (x100)



- 결정구조: 사방정계
- $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ , mol wt 174.2 C 41.37%, H 8.1%, N 32.16%, O 18.37%
- pH: 알칼리(pH11~12)
- 맛: 쓴맛(사용에 제한점 가짐)
- 특징: 수용액에 잘 녹으며, Ethanol에는 소량 녹는다.
- 최대 유효섭취량은 18~20g/day이고 최소 유효섭취량은 6~8g/day(성인기준)이다.
- 조건부 필수 아미노산으로 분류된다.
- 유아는 아르기닌을 체내 합성할 수 없기 때문에 보충해주어야 한다.
- Nitric Oxide 합성에 필요하다.
- 뼈/조직 회복에 필요하다.
- 성기능 불능 및 불안 등 다양한 의약품 사용에 대한 연구가 진행되고 있다.
- 비영양 분야 중 하나로 치아 통증완화 목적의 치약에 사용된다(아르기닌 8%).
- 생체 내 오르니틴 회로의 구성성분(간에서 해독작용)이다.
- 갑상선의 활동강화로 T-cell의 생성을 증진(면역증강)시킨다.



<간기능개선> <면역력증강>  
 Figure 4-5 . 아르기닌의 주요 생리활성 역할.

• 기능성현황

Table 4-4. 나라별 아르기닌 시장 현황 조사

No	Function	Sub-function					
1	CVD Prevention	● Heart Health(Supplements)	● Anti-Aging/Aging-Well				
		● Heart Health	● Antioxidant				
		● Blood Pressure	● DHA				
		● Diabetes	● Omega-3				
		● Diabetic	● Senior Citizens(55+)				
		● Weight Management	● Low Sugar				
		● Women's Health	● Low Carb				
		● Female	● HFCS Free				
		2	Weight Management	● Low GI	● Low Cholesterol		
				● Low Calorie	● No Trans Fats		
				● Low Fat	● No Added Sugar		
				● Sugar Free	● Added Fibre		
● Digestive/Liver Health	● Kidney/Bladder Health						
● Energy and Stamina	● Sexual Health						
3	Liver Health			● Energy/Alertness	● Men's Health		
				● Sports & Recovery	● Male		
				● Immune Health(Supplements)	● Allergy		
				● Immune Health	● Anti-Cancer		
				4	Men's Health	● Digestive/Gut Health	● Prebiotic
						● Children(5-12)	● Baby formula(0-6 months)
		● Children	● Baby formula(6-12 months)				
		● Joint Health	● Bone Health				
		5	Immune Health			● Joint Health(Supplements)	● Bone Health(Supplements)
						● Brain-Mood Health	● Mental Acuity
						● Brain Health	● Insomnia
						● Skin Health	● Oral Health
6	Gut Health					● Skin Health(Supplements)	● Oral Health(Supplements)
						● Eye Health	● Lung Health
						● Eye Health(Supplements)	● Organic
						● Natural	● Indulgent and Premium
				7	Infancy	● No Additives/Preservatives	● Cat food
						● Dog food	

• 국내·외 인정 현황

- 국내 : 식품 첨가물 공전 및 대한약전 등재
- 미국 : GRAS 등재 원료(GRN NO. 317)로서 FCC, USP에 등재
  - ※ GRAS(Generally Recongnized as Safe) : 미국 FDA 신고의 식품원료 규정
- 유럽 : 유럽연합(EU)의 회원국은 현재 27개국  
 현재 식품 첨가물, 식품 효소, 식품 향료에 대한 EU의 공통 허가 절차 규칙을 따름  
 ARG을 포함한 아미노산의 경우, 회원국에 따라 제한적으로 식품(영양강화제) 및 Food supplement에 사용 가능하다.

• 섭취량 관련 안전성 근거 문헌

- NOAEL(최대 무독성량, No Observable Adverse Effect Level) : 42 g/d
- LOAEL(최저 유해용량, Lowest Observed Effect Level) : 42 g/d
- OSL(관측된 안전량, Observed Safe level) : 20 g/d
- ULS(보충제의 상한 섭취량, Upper Levels for Supplement) : 20 g/d
- DRI(영양섭취기준, Dietary Reference Intake) : 3~6 g/d(미국, 성인기준)

• 제조방법





Figure 4-6 . 아르기닌의 제조 공정.

• 시장조사

Table 4-5. 나라별 아르기닌 시장 현황 조사

회사명/국가	사업영역	제품	제품사진
CHAMPION NUTRITION/ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전문 운동선수, 보디빌더 및 일반 운동층을 위한 스포츠 및 에너지 영양제품업체</li> <li>• Sports &amp; Energy 관련 Nutritional Powder, Drink, Supplement 제품 등</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: Met Max 외 241종</li> </ul>	
NUTRICIA/ 네덜란드	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1900년초 유아용 포뮬러로 시작한 임상영양제품 업체</li> <li>• Danone 계열사</li> <li>• Pediatric GI/Allergy, Metabolic, Neurology 관련 제품 등</li> <li>• 연구개발에 기초를 둔 세계 3위 제약사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: Nutrica Nutrilon Milk Formula 외 192종</li> <li>• Brand: Neocate, Fortimel, Nutrison, Infatrini 등</li> </ul>	
NOVARTIS/ 스위스	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 연구개발에 기초를 둔 세계 3위 제약사</li> <li>• Oral feeding, Tube feeding formulas, CVD 관련 제품 등</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: Diabetisource AC formula 외 102종</li> </ul>	

ABBOTT/ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전 연령의 영양, 진단 및 의학적 치료까지 생명에 관한 모든 서비스를 제공하는 업체</li> <li>• Oral feeding, Tube feeding formulas, Baby formula/Milk 관련 제품 등</li> <li>• 음료, 조리식품, 유제품, 영양, 아이스크림, 과자, 동물사료 및 의약품의 제품 관련 글로벌 식음료 회사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: Similac HW Plus Hydrolyzed Whey Protein Formula for Infants 외 90종</li> <li>• Brands : Ensure, Gain, PediaSure, Pedialyte 등</li> </ul>	
NESTLE/ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baby Formula/Milk, Nutritional Powders &amp; Drinks, Oral Feeding, Tube Feeding Formulas 관련 제품 등</li> <li>• 독일의 유아용 식품 회사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: Nestle Nan H.W. One Hydrolyzed Whey Protein : Infant Formula 외 60종</li> </ul>	
MILUPA/ 독일	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Danone 계열사</li> <li>• Baby Formula/ Milk, Oral Feeding 관련 제품 등</li> <li>• 스포츠 영양 제품 업체</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: Milupo Aptamil 1 Infant Milk 외 57종</li> </ul>	
EAS/ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Creatine monohydrate supplementation 주력</li> <li>• 2005년 Abott에 인수되어 sports bars, drink mixes 제품위주로 생산됨</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: MHP Probiotic-SR 외 43종 (Maximum Human Performance)</li> </ul>	
NOW/ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 미국의 건강기능식품업체</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: NOW L-Arginine 외 39종</li> </ul>	
OLIMP LABORATORI ES/ 폴란드	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 스포츠 영양제품 업체</li> <li>• Arginine은 부재료로 쓰임</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: Olimp Sport Nutrition Argi Power 외 36종</li> </ul>	
WYETH NUTRITIONA L INC/ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제약회사인 Wyeth의 영양사업부</li> <li>• 유아 및 여성건강관련 제품 및 스포츠 제품업체: Arginine은 스포츠제품에 집중되어 있음</li> <li>• 60여개 국가 진출</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: Thermo Male 외 35종</li> </ul>	
GNC/ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세계적으로 가장 큰 영양보충제 소매점: 비타민, 미네랄, 허브류, 스포츠영양, 다이어트 제품 개발</li> <li>• 48여개 국가진출</li> <li>• 1886년 콜라를 개발하기 시작한 음료회사로 현재 400여 가지가 넘는 브랜드 보유</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: GNC Pro Performance RapidDrive Arginine 5000외 20종</li> </ul>	
COCA COLA/ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 일본을 중심으로한 말레이시아, 한국의 아시아 국가에서 Arginine음료가 선보임</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: Aquarius Oasis Low Calories Sports Drink 외 17종</li> </ul>	
FRESENIUS KABI/ 독일	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유럽과 미국 등 세계적으로 유명한 임상영양 제품 업체: 경관급식 및 주사제 등</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: Fresenius Kabi Reconvan 외 12종</li> </ul>	
MEIJI/ 일본	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 일본의 유명 제과 업체</li> <li>• 음료, 캔디, Bar형태로 Arginine이 사용됨</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginine 관련 제품: Meiji Oishii Supple Aminosan + Maca Banana Bar 외 11종</li> </ul>	
Amway/ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IBO(독립자영업가)를 통하여 영양, 건강, 미용, 생활용품 등의 관련제품들을 전세계 유통</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1) 뉴트리 단백질: - 9가지 필수아미노산 제공하는 단백질 보충용</li> </ul>	

Forever Living Products International, Inc./ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 뉴트리라이트 등 27가지 브랜드 보유</li> <li>• 전세계 64개국 진출</li> <li>• 국내 최대 다단계 판매 기업</li> <li>• 2009년 매출액: 84억 달러(빌리언달러 클럽 멤버)</li> <li>• 음료, 화장품, 건강기능식품, 개인위생용품 등(알로에 및 벌꿀 관련제품 취급)</li> <li>• 전세계 145개국 이상 진출</li> <li>• 2009년 매출액: 17억 달러(빌리언달러 클럽 멤버)</li> </ul>	<p>제품</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Arginine 700mg/12.5g</li> <li>- 국내 구매 가능</li> </ul> <p>2) Lite 'N Go Meal Replacement Slice:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 저지방, 고에너지, 고단백, 고식이섬유소 식사대용Bar</li> </ul> <p>1) ARG1+TML-Arginine &amp; Vitamin Complex</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Arginine의 기능성 강조</li> <li>- Arginine 5g/10g(1회 섭취량)</li> </ul>	
Herbalife/ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Distributor를 통하여 과학기술에 기초한 체중조절, 영양보충, 스킨 및 헤어케어 제품 유통</li> <li>• 전세계 73개국 진출</li> <li>• 2009년 매출액: 23억 달러(빌리언달러 클럽 멤버)</li> </ul>	<p>1) 루이스 이그나로 나이트웍스 TM비타민 C,E엽산</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Arginine보다는 비타민 C,E,엽산의 기능성 강조</li> <li>- 해외에서는 남성 성기능 강조</li> <li>- Arginine 5.16g/16g(1회 섭취량)</li> </ul>	
Nature's Sunshine Products/ 미국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 천연 건강기능식품, 치즈, 주방기구, 미용 및 개인 위생용품 제조 및 판매</li> <li>• Synergy Worldwide 보유: 건강기능 식품의 Direct marketing company로 국내 진출함</li> </ul>	<p>1) Proargi~9<sup>PLUS</sup></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 Claim: 건강기능식품(비타민보충용)</li> <li>- Arginine 및 심혈관계 전문가의 강한 R&amp;D활동 기초</li> <li>- L-Arginine 5g/12g(1포)</li> </ul>	

• 수요현황

Table 4-6. 현재 수요(2011/2012, 톤)

지역	의약	의약외				총계	구성비
		식품/건설	화장품	사료	소계		
북미	600	1670	400	190	2260	2860	39
중국	700	500	200	75	775	1475	20
유럽	325	850	300	115	1265	1590	22
일본	200	300	180	80	560	760	10
기타	150	270	150	30	450	500	8
소계	1975	3590	1230	490	5310	7285	100

Table 4-7. 향후전망(2017/2018)

지역	의약	의약외				총계	구성비
		식품/건설	화장품	사료	소계		
북미	977	2665	638	303	3606	4583	35
중국	1602	1145	458	172	1775	3376	26
유럽	482	1261	445	171	1877	2360	18
일본	300	450	270	120	840	1141	9

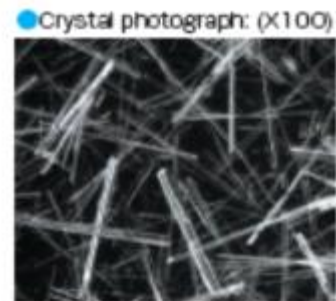
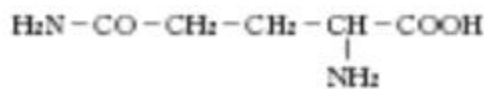


기타	428	771	428	86	1285	1712	13
소계	3789	6292	2239	852	9383	13172	100

- 사료: 사료 제조와 애완동물 사료에 아르기닌이 사용(600톤)된다.
- 제약용: 수액, 주사제, 처방약의 쓴맛과 역겨운 맛을 마스킹(북미와 중국이 주요시장)한다.
- 유럽과 북미: 보디빌딩 목적의 스포츠 영양제품과 영양보충용 제품의 주요 시장(제품 형태:단백질 분말, 바, 셰이크 타입)이다.
- 성기능 개선과 유지를 위한 캡슐과 알약 제품시장은 유럽보다 미국, 중동, 중국이 크다.
- 중국, 북미, 유럽에서는 화장품 부분에서 추가적인 수요를 보인다.
- 시세이도, 로레알 등이 아르기닌 화장품을 시장에서 판매중이며 아지노모토도 자체 브랜드 제품을 판매 중이다.

## ② 글루타민

- 화학적 조성
- 결정 구조:사방정계



- $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ , mol wt 146.14. C 41.09%, H 6.9%, N 19.17%, O 32.84%
- 1 g용해시킬 때 20.8 mL 물(30°C), 38.5 mL 물(18°C), 56.7 mL 물(0°C)이 필요하다.
- 특징: 물에 조금 녹으며 ethanol과 diethyl ether에는 녹지 않는다.
- 수용액상의 pH:4.5~6.0
- 맛: 감칠맛(우마미)
- 복용량은 보통 3.5~7 g/day이고, 장수술 전/스트레스 조건에서는 10~40 g/day이다.
- 체내 가장 풍성한 아미노산으로 체내 합성되기 때문에 비필수아미노산으로 분류되었으나 최근 조건적 필수 아미노산으로 인식되고 있다.
- 상처 치유 및 회복(외상 및 중환자는 장내 공급/ 수술 후 감염 관리시는 보충제 형태)에 이용된다.
- 스포츠 영양(과도한 운동을 하는 사람의 면역체계 강화)으로 이용된다.
- 열에 불안정하기 때문에 가열된 가공식품에는 적절치 않다.
- 최근 연구에 따르면 1% 글루타민 공급시, 저체중 또는 젖을 뗀 아기돼지의 장 건강에 도움을 주고, 모돈의 치사율을 감소시키고 모유량을 증가시킨다.

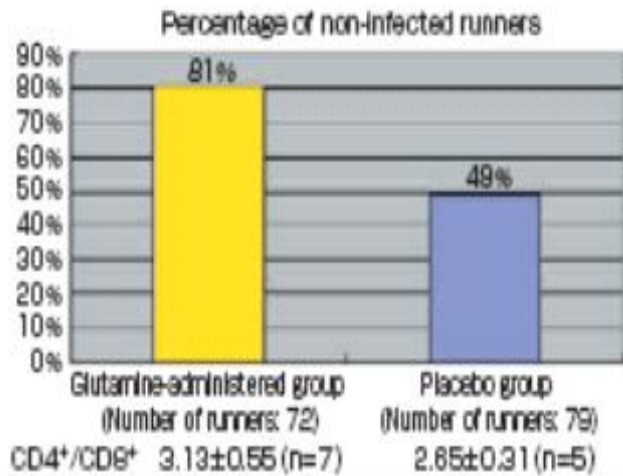


Figure 4-7. 글루타민을 복용하였을 때 감염 질환의 발병 변화.

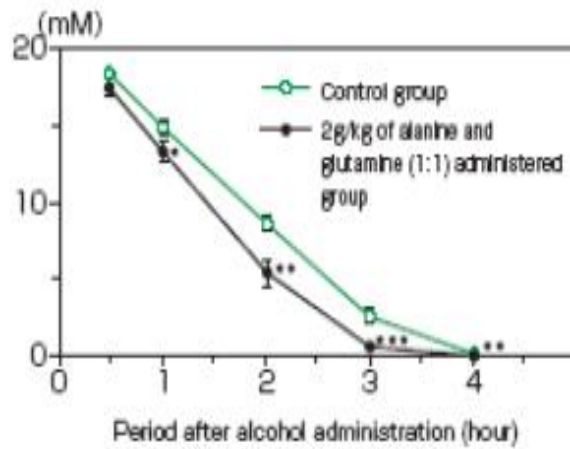


Figure 4-8. 알라닌과 글루타민의 혈중 알코 농도에 미치는 영향 분석.

• 수요현황

Table 4-8. 현재 수요(2011/2012, 톤)

지역	의약	의약외			총계	구성비
		식품/건설	화장품	사료		
북미	612	1830	150	1980	2592	41
중국	479	1218	84	1302	1781	28
유럽	200	1000	61	1061	1261	20
일본	144	150	50	200	344	5
기타	97	241	22	263	360	6
소계	1532	4439	367	4806	6338	100

Table 4-9. 향후전망(2017/2018,톤)

지역	의약	의약외			총계	구성비
		식품/건식	화장품	사료		
북미	792	2411	190	2601	3393	42
중국	617	1614	106	1720	2337	29.4
유럽	244	1222	75	1297	1541	13.3
일본	172	179	60	239	411	9.2
기타	154	382	35	417	571	6.1
소계	1979	5808	466	6274	8253	100

③ BCAA(Branched Chain Amino Acid)

- L-valine, L-leucine, L-isoleucine은 생체 내에 존재하는 물질이다.
- 근육을 구성하는 아미노산 가운데 35%에 해당해서, 근육의 유지, 증강을 위해서 중요하다.
- 운동 시 젖산의 생성억제와 집중력 향상 등 운동활동 향상 작용 및 간기능 개선 작용을 한다.
- BCAA가 에너지원으로 이용될 때는 pyruvate 생성을 거치지 않고 직접 TCA사이클로 들어가 근육피로와 관련있는 젖산이 생성되지 않는다.
- 최적 섭취 비율은 발린:류신:이소류신=1:2:1로 여겨진다.
- 체내에서 단백질 합성에 최적인 비율은 발린:류신:이소류신=1.2:1.8:1이다.
- 근육 내에서도 잘 대사된다. 특히 운동시간과 운동강도에 따라 효율적으로 이용될 수 있다.
- 단백질합성촉진: 류신이 단백질인자 mammalian target of rapamycin(m-TOR)의 signal활성을 거쳐 단백질 합성을 촉진한다.
- 근육손상억제: 근육조직내 효소인 creatine kinase와 젖산 탈수소효소 활성상승이 BCAA섭취에 의해 억제된다.
- 간기능개선: 간기능 저하시 뇌에서의 방향족 아미노산 유입량이 증가하여 뇌에서의 아미노산 조성에도 변동이 생긴다.
- 내장지방연소를 도운다.
- 인슐린 분비를 촉진한다.
- BCAA는 특히 장과 면역시스템에서 체내 세포분화에 도움을 주는 영양물질로 알려진 글루타민 의 합성을 촉진하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Pratell et al., 2000).
- BCAA는 간에 문제가 있거나 간성뇌증 환자를 대상으로 질소축적 및 단백질 합성기능을 향상시킴으로서 단백질 절약효과를 나타낸 것으로 보고된다(Pratell et al., 2000).
- BCAA는 간성뇌증 환자의 간성혼수 치료에 효과적임을 입증하였으며 이는 단백질 대사의 개선에 기인한 것으로 알려진다(Yamamoto et al., 1999).
- BCAA는 호흡조절에 긍정적 영향을 미치는 것으로 나타났으며 이는 중추신경계에서

세로토닌 수준의 감소에 기인하는 것으로 알려진다(Pratell et al., 2000).

- BCAA의 간 재생시 증식을 촉진하는 기전에 대한 연구 결과, BCAA는 간세포 증식 촉진능을 갖고 있는 것으로 밝혀졌다.
- BCAA중 특히 leucine의 경우, 충분한 단백질을 포함한 식이요법과 함께 섭취할 시 질소평형 유지에 도움 및 단백질 합성을 증가시킨다고 알려져 있으며 또한 인슐린과 prolactin의 분비에 영향을 미치는 것으로 보고된다(Harbans et al., 1995).
- BCAA는 만성간염환자에 대해 알부민 대사장애 개선 효과를 나타낸 것으로 보고된다(Takeshita et al., 2012).
- BCAA중 특히 leucine의 경우 단백질대사에 있어 동화작용을 하며, 인체 근육 내 단백질 합성속도를 증가시키고 단백질 분해를 억제시키는 역할을 한다고 알려져 있다(Blomstrand et al., 2006).
- BCAA는 골격근에서의 인슐린 저항성을 갖는 환자의 당화혈색소 수치(HbA1c value)를 개선하는 긍정적 효과를 나타낸 것으로 보고된다(Takeshita et al., 2012).
- BCAA의 섭취는 간경변증에 걸린 비만환자의 간암 위험성을 줄여주는 화학적 예방법이 될 수 있으며 이는 인슐린 저항성의 개선과 관계가 깊다(Shimizu et al., 2009).
- BCAA는 mRNA의 번역과 신호전달경로의 조절을 통해 단백질 번역을 위한 특정 mRNA의 선별과 같은 기능을 조절할 수 있는 것으로 보고되었으며 이는 곧 BCAA가 유전자 발현과 관계가 있음을 의미한다(Liu et al., 2013).
- BCAA의 섭취는 격렬한 운동 후 말초 혈액 단핵세포의 증식능력 회복에 도움을 주며 또한 혈중 글루타민 농도를 일정하게 유지하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Bassit et al., 2002).

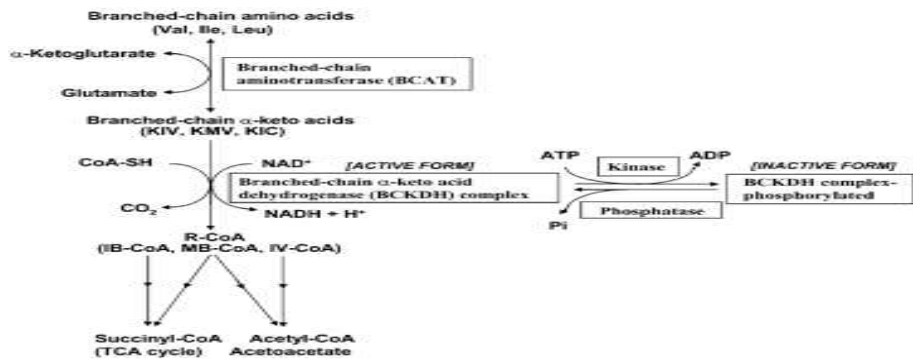
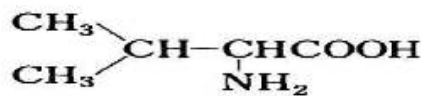


Figure 4-9. 분지 아미노산의 주요 대사 경로.

④ 발린



- 천연 발린은 무색 관상의 결정이다.
- C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> mol wt 117.15. C 51.26% H 9.46%, N 11.96%, O 27.31%

- 녹는점은 315°C이다.
- D-발린은 아주 단맛, L-발린은 단맛+쓴맛을 나타낸다.
- 물에는 잘 녹으나 에탄올에는 잘 녹지 않는다.
- 섭취를 통해서만 가능한 필수 아미노산으로 분류된다.
- 근육조직 회복, 지속력 강화, 및 에너지 공급에 필수적이다.
- 영유아의 최적 성장 및 성인의 질소 균형 유지에 필수적이다.
- 스포츠 영양 제품 및 보충제에 근육 형성 및 단백질 대사 목적으로 사용된다.
- 혈당과 blood insulin레벨에 영향을 미친다.
- 동물의 총 비가공 단백질을 줄이고 아미노산 구성 밸런스를 맞추기 위해 필요하다.
- 수요현황

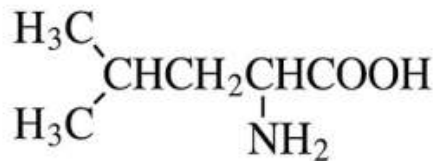
Table 4-10. 현재 수요(2011/2012, 톤)

지역	의약	의약외				총계	구성비
		식품/건식	화장품	사료	소계		
북미	120	500	15	200	715	835	28
중국	50	120	10	700	830	880	29
유럽	70	150	5	800	955	1025	34
일본	30	80	5	50	135	165	5
기타	35	50	5	30	85	120	4
소계	305	900	40	1780	2720	3025	100

Table 4-11. 향후전망(2017/2018)

지역	의약	의약외				총계	구성비
		식품/건식	화장품	사료	소계		
북미	180	600	20	230	850	1030	26
중국	90	180	15	1000	1195	1285	32
유럽	110	180	10	1000	1190	1300	32
일본	60	100	8	80	188	248	6
기타	50	70	7	40	117	167	4
소계	490	1130	60	2350	3540	4030	100

⑤ 류신



- C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub> mol wt 131.17. C 54.94% H 9.99%, N 10.68%, O 24.39%
- L형은 백색의 광택이 있는 육방정계이다.
- 녹는점은 293~295°C, 145~148°C(승화)이다.
- 에탄올에는 녹지 않는다.
- 단맛을 나타낸다.
- 근육형성과 sterol 합성의 중요한 생리학적 기능을 가진다.

- 근육형성에 대한 역할은 명백하지만 아직 연구가 미비하다.
- 현재 발린과 이소류신과 함께 4:1:1의 비율로 혼합한 제품들에 적용되고 있다.
- 식품첨가물로 유럽내 E641, 향미증강제로 사용 중이다.
- 마른 조직을 보호한다.
- 운동중 에너지를 공급한다.
- 운동 중 정신력을 강화시킨다.
- 질소 균형을 유지한다.
- 스포츠 영양에 있어 류신의 중요성은 알려져 있으나, 과학적 연구는 미비한 실정이다.
- 수요현황

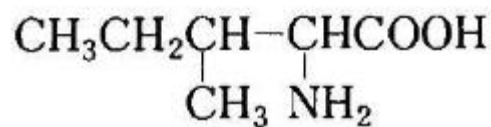
Table 4-12. 현재 수요(2011/2012, 톤)

지역	의약	의약외				총계	구성비
		식품/건식	화장품	사료	소계		
북미	150	600	10	5	615	765	47
중국	65	150	5	40	195	260	16
유럽	60	200	2	25	227	287	17
일본	25	100	2	5	107	132	8
기타	40	150	1	5	156	196	12
소계	340	1200	20	80	1300	1640	100

Table 4-13. 향후전망(2017/2018)

지역	의약	의약외				총계	구성비
		식품/건식	화장품	사료	소계		
북미	250	700	15	15	730	980	46
중국	100	200	10	50	260	360	17
유럽	90	250	5	30	285	375	17
일본	30	130	5	8	143	173	8
기타	70	180	3	10	193	263	12
소계	540	1460	38	113	1611	2151	100

⑥ 이소류신



- 섭취를 통해서만 가능한 필수 아미노산으로 분류된다.
- 포도당 생성과 ketone 형성 대사 기능이 있다.
- 이소류신, 류신의 대사는 비오틴이라는 비타민이 필요하며, 비오틴이 부족할 때는 불완전한 대사와 다양한 생리학적 부작용이 발생할 수 있다.
- 근육조직 생성, 폐모글로빈 생성, 혈당과 혈전 생성을 조절한다.
- 일일 권장 섭취량(RDA)은 10 mg/kg이다.
- 수요현황

Table 4-14. 현재 수요(2011/2012, 톤)

지역	의약	의약외				총계	구성비
		식품/건식	화장품	사료	소계		
북미	100	600	10	5	615	715	47
중국	40	150	5	30	185	225	15
유럽	55	200	2	20	222	277	18
일본	20	100	2	5	107	127	8
기타	35	150	1	3	154	189	12
소계	250	1200	20	63	1069	1533	100

Table 4-15. 향후 전망(2017/2018)

지역	의약	의약외				총계	구성비
		식품/건식	화장품	사료	소계		
북미	150	700	12	8	720	870	44
중국	80	200	8	40	248	328	17
유럽	70	250	5	30	285	355	18
일본	25	130	5	8	143	168	9
기타	50	180	3	5	188	238	12
소계	375	1460	33	91	1584	1959	1200

① CGF

- CGF란 클로렐라 성장 촉진 인자로 클로렐라 추출물 안에 포함 되어 있는 분자량 5000~10000 정도의 뉴클레오타이드가 주요 성분이다.
- CGF는 수용성 S-nucleotide-adenosylpeptide complex로 세포의 단백질 합성 공장인 리포솜과 에너지 생성 공장인 미토콘드리아 구조를 유지 및 복원하는 세포재생의 중요 성분이다.
- 유아, 어린이 및 동식물의 성장 촉진, 면역 증강 및 항균력 증강, 뇌졸중 개선 및 예방, 세포재생 등의 효과가 있는 것으로 알려졌다.
- 암의 면역성립에 주요 역할을 하는 Helper-T-cell을 활성화하여 면역력 증진에 도움을 준다.
- 상처회복 및 조직 복원에 필요한 leucine, arginine, lysine, isoleucine등의 필수아미노산을 함유하고 있으며, 사람각질형성 세포의 EGFR에 대한 ligand로 작용하여 피부 조직 복원 및 재생에 관여한다.
- 미토콘드리아에서의 키토크롬 합성 및 기능 회복을 통해 파괴된 간세포 재생을 촉진하고 영양소를 공급하여 간 기능개선 효과를 기대할 수 있다.

Table 4-16. CGF의 생리활성 성분

화학구조의 특징	실험레벨의 기능
다당단백복합체(균체외) 50% 이상의 galactose를 함유하는 다당류와 단백질의 복합체, 다당류 함유율 약 60% 평균분자량 20만	생체 방어 기능 (항종양, 항감염)
당단백-1, 당과 단백질의 구성비 1:1	항종양
단백질의 α-helix 함량 19% 분자량 12만	항종양
당단백-1의 가수분해물, 분자량 4만 5,000	세포부활
단백질의 α-helix 함량 40%, 당은 β-polysaccharide	성장촉진
핵산 단백질복합체	
RNA 단백질복합체 분자량 1만~1만 5,000	
핵산관련물질, 분자량 5천 이상	





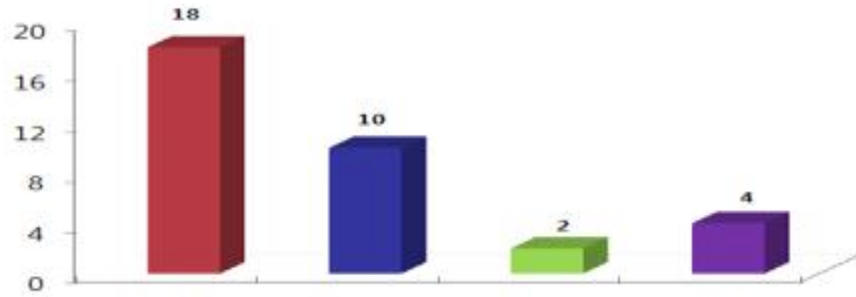


Figure 4-10. 발효홍삼 제품별 발효 홍삼 제조 방법 사용 현황.

• 시장조사

Table 4-17. 주요 발효홍삼 제품의 종류 및 성분 함량



제품명	제품 사진	제조원	성분	비고
화타 발효홍삼		화타	지케이발효홍삼(홍삼,국내산)0.6%, 홍삼농축액(고형분 65%, 국내산)0.55%, <i>B.Jongum</i> BGN4분말 등	compound K, Rh1, Rh2
화타 CK 百丸			발효홍삼분말, 녹용 등	C-K
화타 CK-100 PLUS			100% 발효홍삼분말	C-K 일본수출제품
메타레드진 壽		메타볼랩	6년근 발효홍삼농축액 10.5%, 녹용 농축액 4%, 당귀, 산수유, 숙지황, 복분자, 영지등	노약자, 중년부부
메타레드진 剛			6년근 발효홍삼농축액 10.5%, 녹용농축액 2%, 복분자, 산사자, 구기자, 오미자, 가시오가피등	중년남성
메타레드진 美			6년근 발효홍삼농축액 10.5%, 녹용농축액 2%, 석류, 당기, 백작약, 황기, 백출, 백봉령 등	여성
메타레드진 智			6년근 발효홍삼농축액 10.5%, 녹용농축액 2%, 석청포, 복분신, 백작약, 황기 숙지황 등	청소년 및 수험생
발효홍삼 보		웅진식품	발효홍삼농축액 100%	

발효홍삼 단		발효홍삼분말, 홍삼분말, 마키분말, 산수유분말, 녹용추출분말, 당귀, 영지분말, 백복령분말
발효홍삼 기		발효홍삼분말, 홍삼농축액, 황기추출물, 감초추출물, 백복령추출물, 구기자농축액, 천궁농축액
발효홍삼기 키즈		복령, 원지, 인삼, 진피, 석창포, 당귀, 감초
어린이 홍삼왕		6년근 국산 홍삼농축액 10%, 6년근 국산 발효홍삼농축액 1%
발효홍삼 분		홍삼농축액 90%, 발효홍삼농축액 10%
김정문 홍삼큐텐		발효홍삼농축액, 백포도농축액, 아가베시럽 등
6년근 발효홍삼 자운비		김정문 알로에 발효홍삼분말 5%, 홍삼추출액 10.474%, 벌꿀(국산), 이소말토올리고당, 건지황농축액, 백복령분말, 천문동농축액, 맥문동농축액, 지골피농축액
		6년근 발효홍삼 자운비

### ③ MCT Oil

- MCT oil 및 이를 함유한 제품의 종류는 아래의 표와 같으며 주로 특수의료용도식품 및 수액제 등으로 이용되고 있다.
- MCT 파우더 및 오일(액상) 제품의 경우 음료나 음식에 첨가하여 섭취하도록 권장하고 있으며 MCT oil 활용도의 범위가 점차 넓어지고 있다.
- 국내의 경우 대상 웰라이프를 비롯하여 정식품 그린비아, 한국메디칼푸드 등에서 MCT oil을 적용한 뉴트리션 제품을 판매 중에 있다.

Table 4-18. 주요 MCT oil 제품의 종류 및 성분 함량

구분	제품명	제품사진	제조원	성분	비고
열량 및 영양공급용 의료용도식품	메디푸드 MCT오일		메디푸드	MCT 99.9% 카놀라유	
수액제	리포MCT		한미약품	100mL 중 Purified soybean oil(EP) 5g(10%) / 10g(20%) Medium Chain Triglyceride(EP) 5g(10%) / 10g(20%)	
특수의료용도 식품	뉴케어 하이프로틴		대상 웰라이프	열량구성비(%) - 단백질:지방:탄수화물=	단백질 영양보충,

				26:27:47 MCT oil함유, 비타민, 미량영양소함유	균형영양식
	뉴케어 화이바		대상 웰라이프	필수지방산 및 MCT oil을 함유하여 지방대사 도움. 열량구성비(%)- 단백질:지방:탄수화물= 16:31:53 식이섬유 함유 원활한 지방대사를 위해	장관기능개 선 배변에 문제 있는 환자
	뉴케어 300TF		대상 웰라이프	MCT오일 함유 열량구성비(%)- 단백질:지방:탄수화물= 16:27:57	등장성 균형영양식
열량 및 영양공급용 의료용도식품	MCT 파우더		산쿄(일본) 대상웰라 이프(판매)	MCT(일본산), 텍스트린, 가공전분, 무단백질	분말형태, 음료나 음식에 첨가하여 섭취 비투석 신장질환자 용
	그린비아 알디		정식품 그린비아	MCT oil함유	고단백 균형영양식
특수의료용도 식품	그린비아 하이프로틴		정식품 그린비아	MCT oil함유	식이섬유함 유 등장성 균형영양식
	그린비아 화이바		정식품 그린비아	MCT oil함유	식이섬유함 유 등장성 균형영양식

(3) Stock 제품 개발(BCAA, 아르기닌, 글루타민을 이용한 제품)

- Stock 제품의 보존성 검증(유화력 안정성실험, 유통기한 설정실험, 세균발육 실험 등)
  - Gel type 아미노산 보충제(BCAA, 아르기닌)
  - 뉴케어 적용(BCAA)
  - 영양푸딩 적용(BCAA)
  - 아미노 분말 스틱(BCAA, 아르기닌)

(가) Gel type 아미노산 보충제(BCAA, 아르기닌)

① 개발 방향

- 간편하고 안전한 방법으로 아미노산(BCAA, 아르기닌)을 보충한다.
- 항산화작용, 면역조절 등 건강증진에 도움이 되는 특수의료용도식품의 제품을 개발한다.
- 블루베리농축액을 사용하여 항산화기능을 부각한다.

② LAB TEST 후 생산 라인을 적용하여 실험생산을 실시(100 kg/1 batch)한다.

(BCAA 믹스: 류신 0.5%, 발린 0.25%, 이소류신 0.25%)

• 실험생산 배합비 - 1

No	원 료 명	비율(%)
1	아르기닌	17
2	말토덱스트린	3
3	BCAA 믹스	2
4	블루베리농축액	16
5	비타민 C	1.5
6	비타민 E	0.5
7	사과산	7
8	정백당	25
9	블루베리향	0.15
10	정제수	27.85

- 공정 중 아미노산 응집 및 침전 확인
- 실험생산 실패

• 실험생산 배합비 - 2

No	원 료 명	비율(%)
1	아르기닌	12
2	말토덱스트린	3
3	BCAA 믹스	1
4	포도농축액	11
5	블루베리농축액	10
6	비타민 C	1.5
7	비타민 E	0.5
8	사과산	8
9	정백당	14
10	저감미당	19
11	블루베리향	0.15
12	포도향	0.1
13	정제수	18.75

- 용해, 분산 적합, 관능(비린 맛, 쓴맛) 저하
- 실험생산 완료

③ 공정도

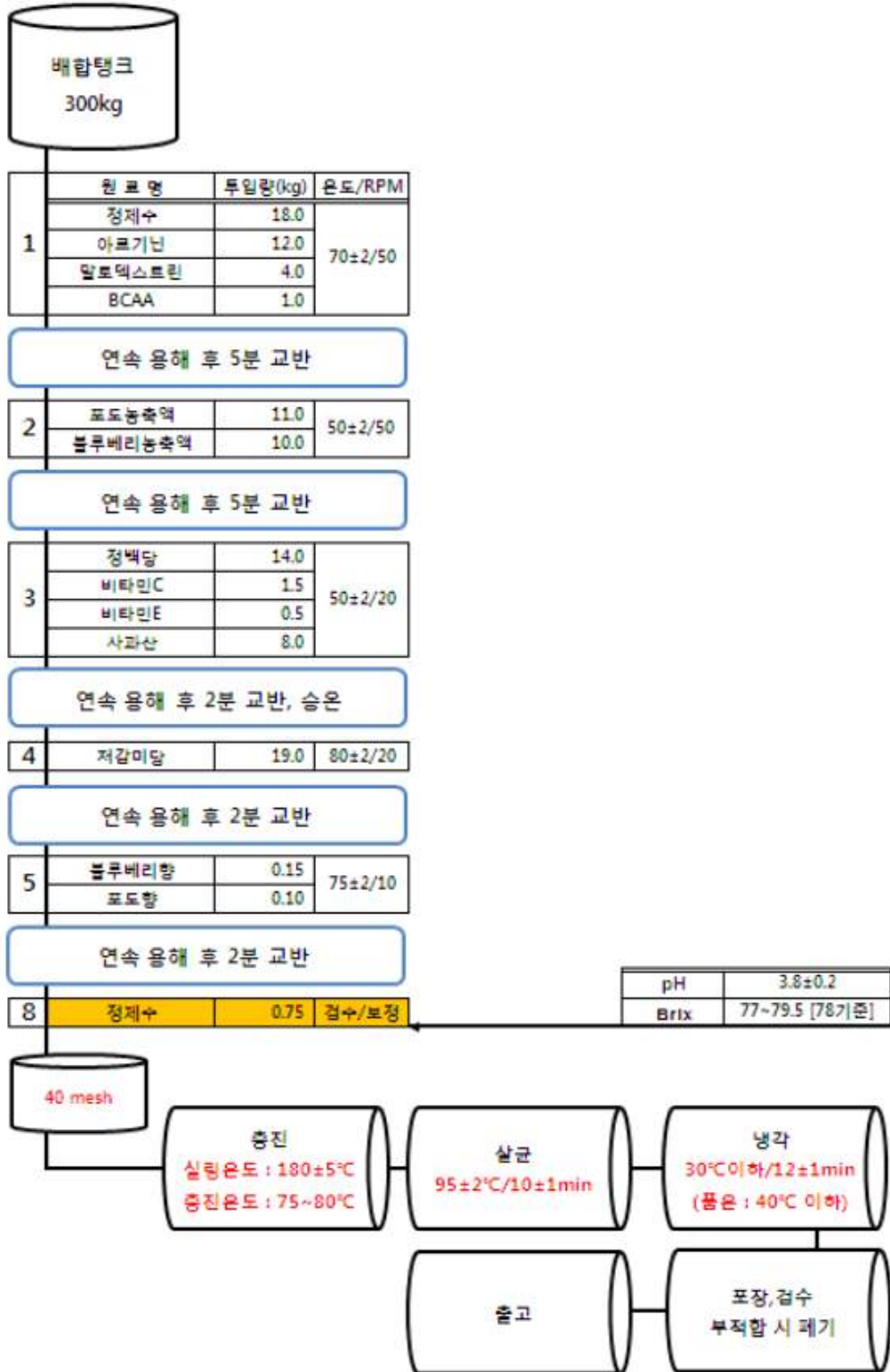


Figure 4-11. Gel type 아미노산 보충제 주요 공정도.

④ 보존성 검증

• 살균 확인

- 미생물 검사 확인

- 1 batch 内 Lot별 [초(A), 중(B), 말(C)] 각 10EA 샘플링, 3반복

Table 4-19. Gel type 아미노산 보충제 미생물 검사 결과

Lot	일반세균 10 <sup>-1</sup>	일반세균 10 <sup>-3</sup>	진균 10 <sup>-1</sup>	진균 10 <sup>-3</sup>
A-1	ND	ND	ND	ND
A-2	1	ND	ND	ND
A-3	ND	ND	ND	ND
A-4	ND	ND	ND	ND
A-5	2	ND	ND	ND
A-6	ND	ND	ND	ND
A-7	ND	ND	ND	ND
A-8	ND	ND	ND	ND
A-9	1	ND	ND	ND
A-10	ND	ND	ND	ND
B-1	ND	ND	ND	ND
B-2	ND	ND	ND	ND
B-3	1	ND	ND	ND
B-4	ND	ND	ND	ND
B-5	ND	ND	ND	ND
B-6	3	ND	ND	ND
B-7	ND	ND	ND	ND
B-8	ND	ND	ND	ND
B-9	1	ND	ND	ND
B-10	ND	ND	ND	ND
C-1	ND	ND	ND	ND
C-2	ND	ND	ND	ND
C-3	ND	ND	ND	ND
C-4	1	ND	ND	ND
C-5	ND	ND	ND	ND
C-6	1	ND	ND	ND
C-7	ND	ND	ND	ND
C-8	ND	ND	ND	ND
C-9	ND	ND	ND	ND
C-10	ND	ND	ND	ND

- 색일반세균수 : 11(규격 10<sup>2</sup>이하/mL)

- 진균류 : 음성(규격 없음)

- pH : 3.7

- Aw : 0.8이하

→ 미생물 안전성 확인

• 색차 확인

Table 4-20. Lot 별 색차

Lot. \ 색차 값	L	a	b
A-2	72.38	13.15	4.08
A-4	72.31	13.03	4.25
A-6	71.54	12.82	3.92
B-1	73.20	13.26	3.89
B-5	71.98	13.31	3.77
B-10	72.51	12.69	4.16
C-1	72.16	12.93	4.26
C-2	72.22	12.89	4.00
C-6	73.09	13.09	4.01
평균	72.38	13.01	4.04

(L : + White~Black, a : + Red~Green, b : + Yellow~Blue)

Table 4-21. 보존 온도 및 보존 일수에 따른 색차 변화

보존 온도	항목 보존 일수	brix	pH	색차			$\Delta^*ab$
		%	mV	L	a	b	
45°C	0	68.7	3.62	72.38	13.01	4.04	13.62
	5	68.7	3.7	72.33	15.2	4.12	15.75
	10	68.52	3.69	72.21	16.9	4.32	17.44
	15	68.67	3.71	71.56	18.24	4.36	18.75
	20	68.7	3.8	70.9	19.31	4.51	19.83
	25	68.72	3.79	68.53	20.1	4.6	20.62
	30	68.7	3.82	66.9	21.5	4.71	22.01
55°C	0	68.67	3.71	72.38	13.01	4.04	13.62
	1	68.71	3.76	71.29	13.56	5.62	14.68
	2	68.67	3.8	70.89	14.23	6.18	15.51
	3	68.73	3.69	67.94	14.69	7.25	16.38
	4	68.7	3.66	65.28	14.71	8.32	16.90
	5	68.7	3.8	64.42	14.77	11.23	18.55
	6	68.73	3.68	63.69	14.82	17.27	22.76

Table 4-22. 45°C, 55°C 색도 변화(3EA 샘플 평균값 적용)

항목 보존 온도	보존 일수	$\Delta^*ab$	관능	항목 보존 온도	보존 일수	$\Delta^*ab$	관능
45°C	5	15.750	○	55°C	1	14.680	○
	10	17.440	○		2	15.510	○
	15	18.750	○		3	16.380	○
	20	19.830	○		4	16.900	○
	25	20.620	X		5	18.550	○
	30	22.010	X		6	22.760	X

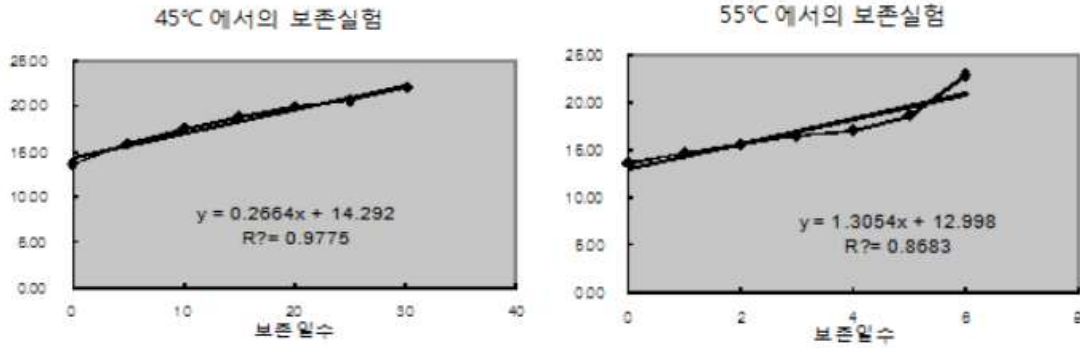


Figure 4-12. 45°C, 55°C 색도 변화 정도 비교.

- 위의 결과로 품질과 보존기간과는 어느 정도 비례관계를 가지므로 비효소적 갈변반응을 주로 하는 0차 반응이라고 할 수 있으며 약간의 1차 반응적 성질을 띤다.
- 유통기한 설정

가. 0차 반응 계산 시

1. 저장기간과 품질 관계는 비례관계이므로 보존일수로 계산

45°C에서 보존일수 : 20.79일

55°C에서 보존일수 : 5.00일

2.  $Q_{10}$  Value = 45°C에서 보존일수 / 55°C에서 보존일수

$$Q_{10} = 4.158$$

3. 상온(25°C)에서의 보존일수

$$= 55^\circ\text{C 보존일수} \times Q_{10}^r \text{ [r} = (55-25)/10]$$

$$= 732.935406(\text{약 } 24.43\text{개월})$$

나. 1차 반응으로 간주 시

1. D-Value ;  $\log(N_0/N_m) - (T_m - T_0)/D_T$

$$D_{45} = -122.58988$$

$$D_{55} = -37.267042$$

2. Z-Value ;  $\log(D_{45}/D_{55}) = (45-55)/Z$

$$Z = 19.3375089$$

3.  $Q_{10}$  Value =  $10^{10/Z} = 3.289498$

4. 45°C 보존 실험 상에서 상온(25°C) 보존일수

$$= 45^\circ\text{C 보존일수} \times Q_{10}^r \text{ [r} = \Delta T/10 = (45-25)/10]$$

$$= 408.017429(\text{약 } 13.60\text{개월})$$

5. 55°C 보존 실험 상에서 상온(25°C) 보존일수

$$= 55^\circ\text{C 보존일수} \times Q_{10}^r \text{ [r} = (55-25)/10]$$

$$= 322.792861(\text{약 } 0.76\text{개월})$$

다. 위의 결과에 따라 유통기한을 10개월로 설정할 수 있다.



⑤ 관능 평가

• 관능평가 실시

- 관능 기관: 자사 청정원 리서치팀
- 평가 샘플: Gel type 샘플, 경쟁사
- 조사 대상: 평균 54세 남자 45명
- 검사 일시: 2014년 02월 17일
- 검사 장소: 대상주식회사 신설동 대강당(서울시 신설동)
- 시료 준비: 샘플 수령 후 상온 보관 및 제시
- 평가 시간: 13:00(30명) 17:00(15명)
- 척도 : 9점 척도



Figure 4-12. 관능 평가 대상 제품(좌; Gel type 샘플, 우; 경쟁사 gel type 제품).

• 관능평가지 작성

### Geltype 아미노산 제품 관능 검사

(성별 :                   )                   (나이 :                   )

본 제품은 혈행개선 면역력 개선을 도와주는 마르기닌 5g을 함유한 기능성 식품입니다. 해당 제품의 용량은 30mL 으로 하루 1회 섭취 기준으로 제조 되었습니다.

■ 정도 :  
 ① 매우 약하다 ② 약한 편이다 ③ 조금 약하다 ④ 보통이다 ⑤ 조금 강하다 ⑥ 강한편이다  
 ⑦ 매우 강하다

■ 기호도 :  
 ① 매우 나쁘다 ② 나쁜 편이다 ③ 조금 나쁘다 ④ 보통이다 ⑤ 조금 좋다 ⑥ 좋은 편이다  
 ⑦ 매우 좋다

\*식후 30분 후 물과 함께 복용 하여 주세요.

항 목			
향 기호도			
단맛	정도		
	기호도		
신맛	정도		
	기호도		
비릿한맛	정도		
	기호도		
후미(뒷맛) 기호도			
목 넘김 기호도			
전체적 기호도			

• 제품을 구입할 의향이 있으십니까? 예 (    ) 아니오 (    )

구입을 하신다면 이유는 무엇입니까?

- 1 -

Figure 4-13. Geltype 아미노산 제품 관능 검사 지표.

• 관능평가 결과

Table 4-22. 관능평가 결과 요약

항 목	1 (Geltype아미노보충제)			2 (경쟁사)		
	평균	100점 환산점수	편차	평균	100점 환산점수	편차
색상 기호도	5.78	64.20	0.83	5.78	64.20	1.09
향 기호도	5.78	64.20	1.48	4.44	49.38	1.24
단맛	정도	6.56	72.84	5.78	64.20	2.44
	기호도	4.33	48.15	3.00	33.33	0.50
신맛	정도	5.11	56.79	5.33	59.26	1.22
	기호도	5.22	58.02	4.56	50.62	1.24
비릿한 맛 정도	4.33	48.15	1.12	4.67	51.85	2.00
후미(뒷맛) 기호도	4.67	51.85	1.80	3.89	43.21	2.20
목넘김 기호도	5.00	55.56	1.12	4.22	46.91	1.39
전체적 기호도	4.89	54.32	2.32	3.33	37.04	1.73

- 구매 의사

	인원 수(명)
구매	5
비구매	30
무응답	10

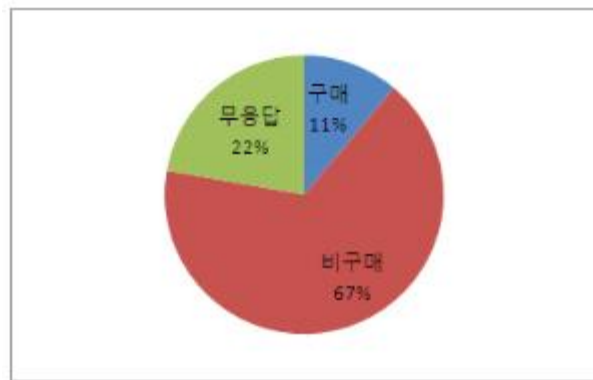


Figure 4-14. Geltype 아미노산 제품 관능 검사 결과 구매 의사도.

⑥ Geltype 아미노산 보충제 개발 결과

- 유통기한 테스트 경우 Brix, pH는 안정적이나 색차 테스트에서 가혹 실험 상 상품성 보유 기간이 45℃ 20일차, 55℃ 5일차 이며, 1차 반응적 성질로 인해 Q<sub>10</sub> value는 3.28을 확인하였다.
- 관능 테스트 결과, 경쟁사 제품 대비 전체적 기호도가 좋으나 비릿한 정도가 낮다.
- 상품성을 위해 최소 5.4(60점/100점) 이상이 되어야 하나 미달이며, 구매 의사도 낮다.
- 점성이 너무 높아 목넘김이 좋지 않으며 용해되지 않은 아미노산 잔여물이 입에 남아 입감이 좋지 않다. 아미노산 용해성 증진을 통해 입감 잔여물, 관능, 흡수력 증진 보완이 필요하다.

(가) 뉴케어 BCAA 적용

① 개발 방향

- 환자의 면역 증강을 위한 제품 개발
- 기존 뉴케어 화이버 제품에 적용 테스트 실시
- 공정도 및 살균 조건 변경을 통해 유효 안정성 확인

② LAB TEST 후 생산 라인 적용 실험생산 실시(10,000 kg/1 batch)

- 실험생산 배합비-1

No	원 료 명	비율(%)
1	류신	3.5
2	이소류신	1.75
3	발린	1.75
4	카제이나트륨	5.8
5	대두분리단백	1.2
6	대두화이버	1.5
7	말토덱스트린	10
8	채종유	3.0
9	유화제	0.2
10	비타민믹스	0.15
11	미네랄믹스	0.4
12	구연산칼륨	0.25
13	탄산수소나트륨	0.04
14	극미량미네랄믹스	0.01
15	카르니틴	0.02
16	염화칼륨	0.15
17	정제수	70.28

- 배합 탱크 內 BCAA 침전 확인
  - 침전물을 정제수로 2차 믹싱하여 균질기를 통과 시켰으나, 과부하 발생
  - 2차 균질까지하여, 실험생산 완료
- : 호모믹싱 2,000 rpm, 균질압 200 bar, 레토르트 2가지 조건 실시(126℃/5분, 126℃/10분)



Figure 4-15. 배합비-1에서의 배합 탱크 내부에서 침전된 BCAA.

• 실험생산 배합비 -2

No	원 료 명	비율(%)
1	류신	1.0
2	이소류신	0.5
3	발린	0.5
4	나트륨	6.5
5	대두분리단백	7.5
6	대두화이버	1.5
7	말토덱스트린	14
8	채종유	3.0
9	유화제	0.2
10	비타민믹스	0.15
11	미네랄믹스	0.4
12	구연산칼륨	0.25
13	탄산수소나트륨	0.04
14	극미량미네랄믹스	0.01
15	카르니틴	0.02
16	염화칼륨	0.15
17	정제수	64.28

- 배합 탱크 內 BCAA 용해 확인 결과 완전 분산, 용해(Figure 55)
- 용해, 분산 가능성 확인
- 호모믹싱 3,500 rpm, 균질압 350 bar, 레토르트 2가지 조건 실시(126℃/5분, 126℃/10분)

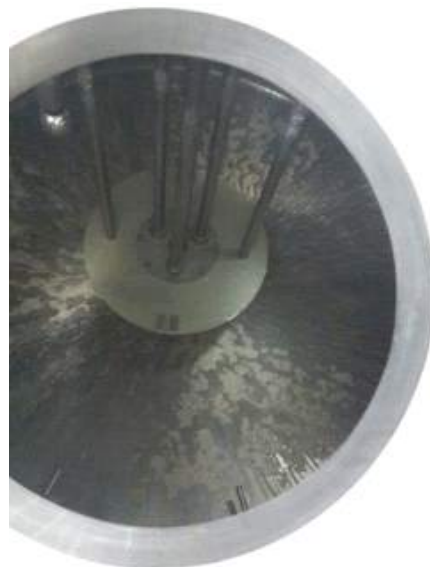


Figure 4-16. 배합비-2에서의 배합탱크 내 BCAA 완전 용해 확인.

③ 정도

뉴케어 BACC 제조공정도-1 : 10톤/1batch

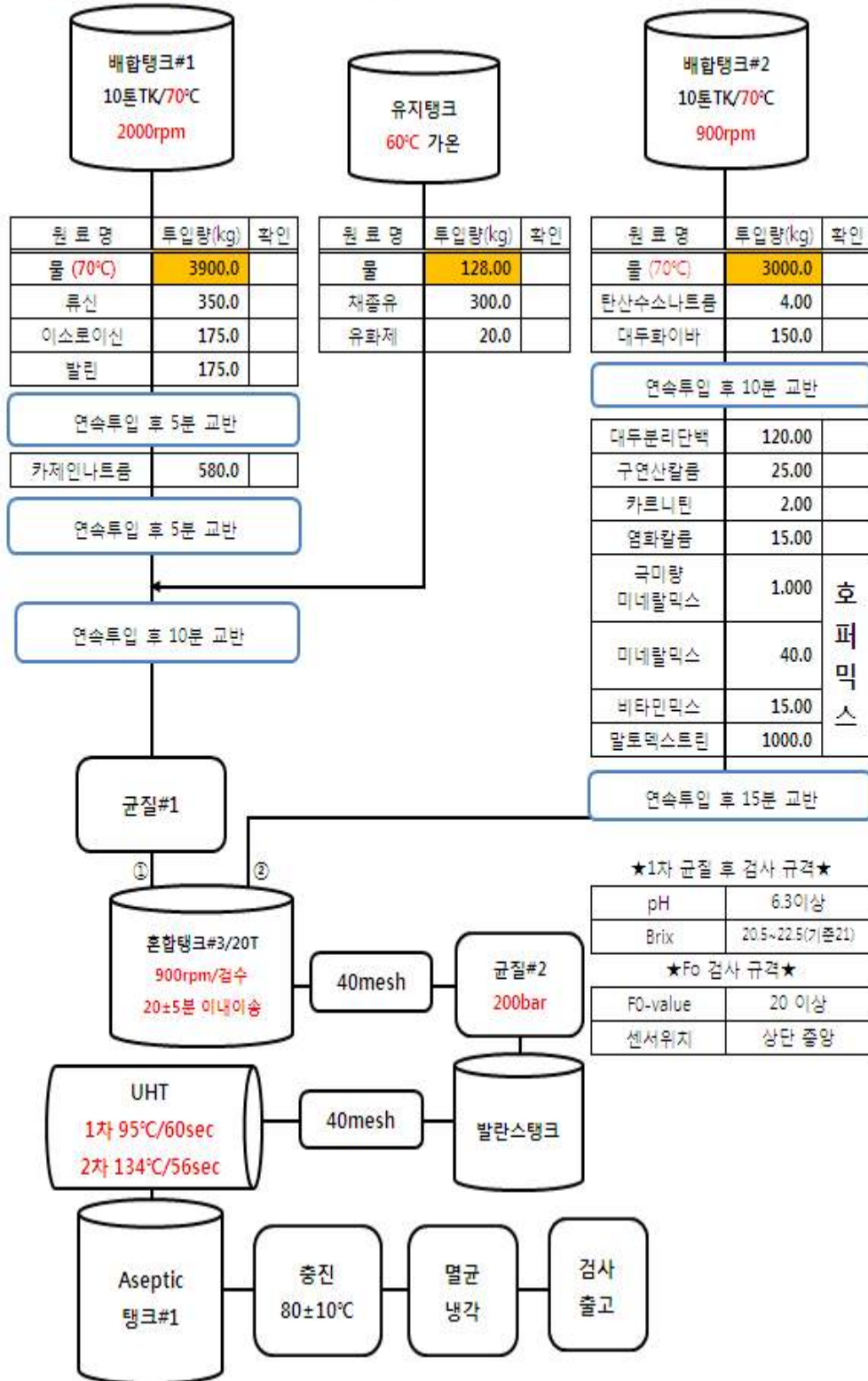


Figure 4-16. 배합비-1에 따른 BCAA 함유 뉴케어 제조 공정도.

뉴케어 BACC 제조공정도-2 : 10톤/1batch

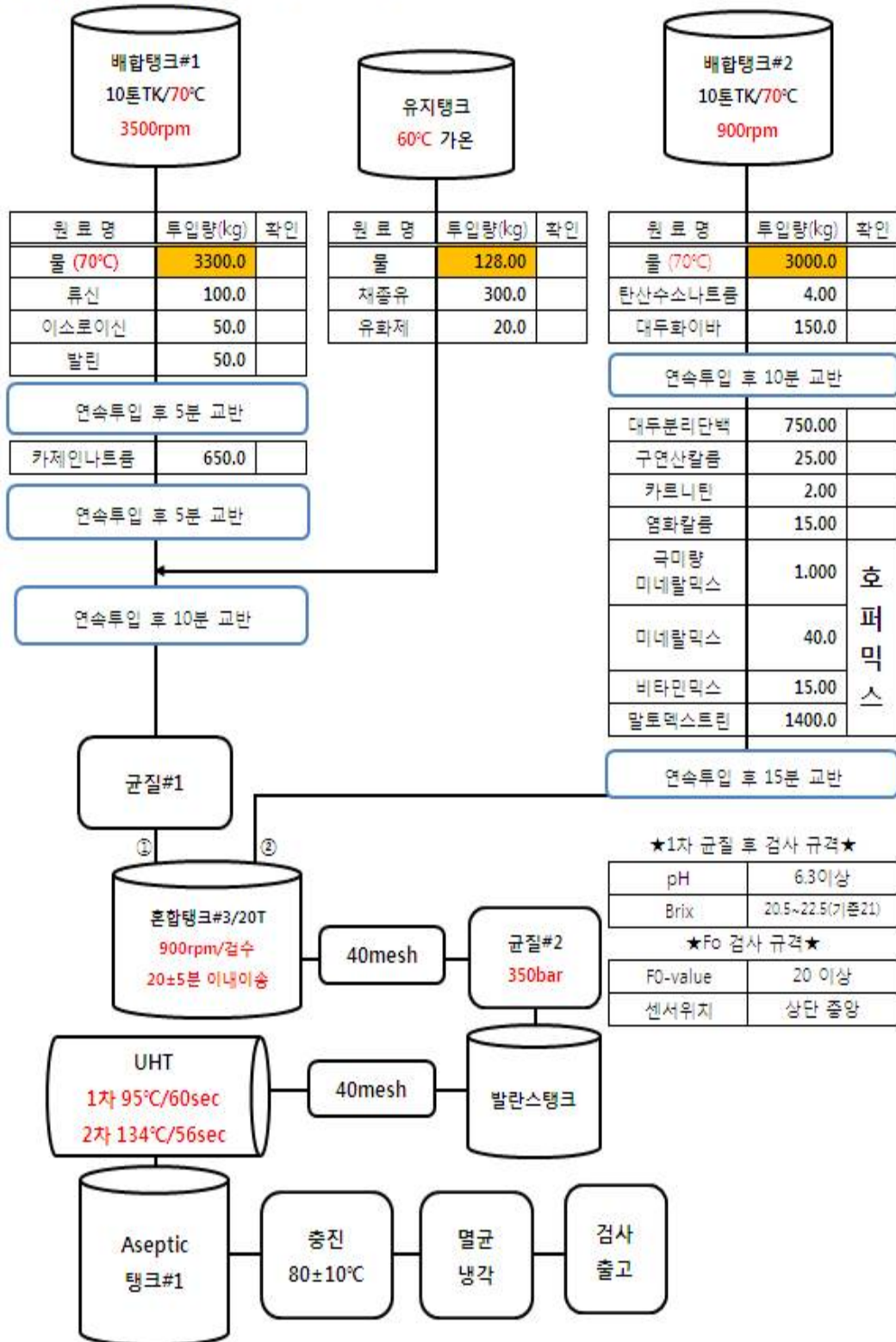


Figure 4-17. 배합비-2에 따른 BCAA 함유 뉴케어 제조 공정도.

④ 보존성 검증

• 레토르트 결과

- 조건 1: 126°C, 5분 공정
  - : 배합비-1  $F_0$  value : 14
  - : 배합비-2  $F_0$  value : 18

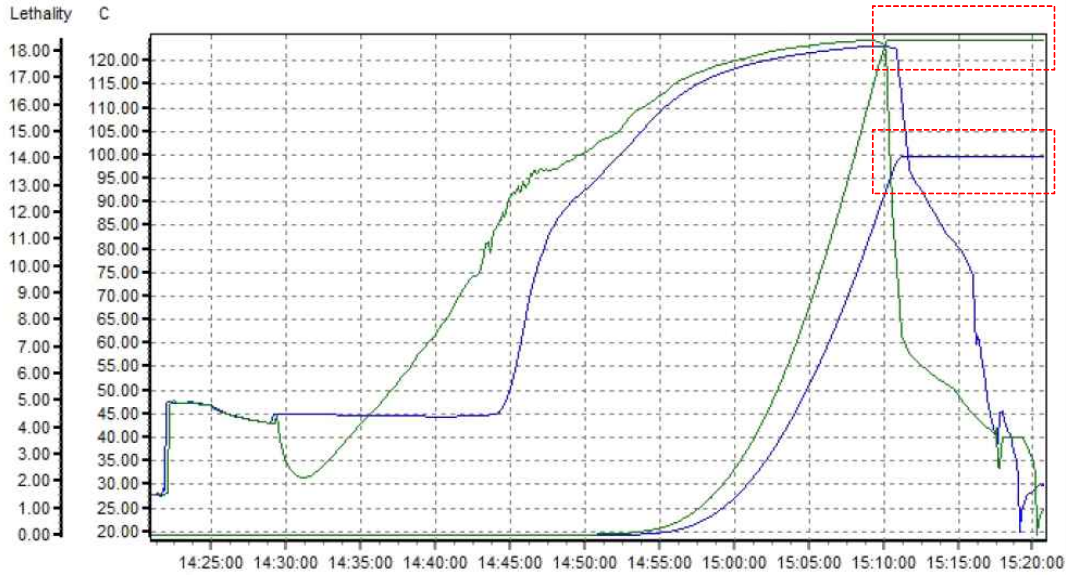


Figure 4-18. 126°C, 5분으로 살균시 배합비별  $F_0$  value 측정 결과.

- 조건 2: 126°C, 10분 공정
  - : 배합비-1  $F_0$  value : 27
  - : 배합비-2  $F_0$  value : 37

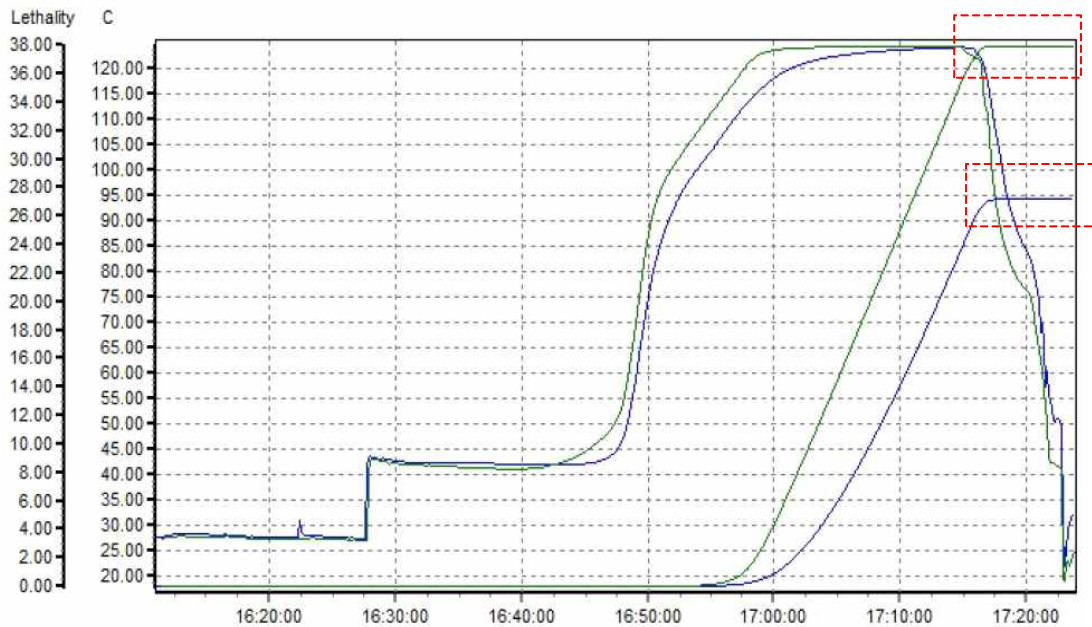


Figure 4-18. 126°C, 10분으로 살균시 배합비별  $F_0$  value 측정 결과.

- 미생물 안전성을 위해 자사는  $F_0$  value를 20이상으로 설정하고 있다.
- 배합비-1,2 모두 레토르트 126°C, 5분의  $F_0$  value값은 14, 18로 자사 규격을 이탈한다.
- 멸균 확인
  - 미생물 검사 확인
  - 1batch 內 Lot별 [초(A), 중(B), 말(C)] 각 5EA 샘플링, 3반복
  - 조건 1: 126°C, 5분 공정
    - : 배합비-1 고온미생물 : 82( $10^{-1}$ ), 52( $10^{-3}$ )
    - : 배합비-2 고온미생물 : 32( $10^{-1}$ ), 18( $10^{-3}$ )
  - 조건 2: 126°C, 10분 공정
    - : 배합비-1 고온미생물 : 불검출
    - : 배합비-2 고온미생물 : 불검출

Table 4-23. 126°C, 5분에서의 배합비-1 균 사멸 효과

Lot	일반세균 $10^{-1}$	일반세균 $10^{-3}$	내열성세균 $10^{-1}$	내열성세균 $10^{-3}$
AA-1	174	190	2	1
AA-2	163	154	0	0
AA-3	178	162	1	0
AA-4	156	167	8	6
AA-5	139	148	6	2
BA-1	129	118	38	21
BA-2	139	109	0	0
BA-3	121	95	0	0
BA-4	105	109	0	0
BA-5	109	125	0	0
CA-1	129	112	0	0
CA-2	110	130	2	1
CA-3	91	114	5	4
CA-4	89	104	20	17
CA-5	82	102	0	0

Table 4-24. 126°C, 5분에서의 배합비-2 균 사멸 효과



Lot	일반세균 $10^{-1}$	일반세균 $10^{-3}$	내열성세균 $10^{-1}$	내열성세균 $10^{-3}$
AA-1	48	9	1	0
AA-2	95	85	0	0
AA-3	73	87	0	0
AA-4	95	107	2	0
AA-5	71	90	0	1
BA-1	84	77	0	0
BA-2	106	95	4	5
BA-3	69	89	4	4
BA-4	78	76	7	2
BA-5	78	61	2	1
CA-1	92	80	3	2
CA-2	86	76	0	0
CA-3	76	60	4	1
CA-4	62	48	5	2
CA-5	59	55	0	0

Table 4-25. 126°C, 10분에서의 배합비-1 균 사멸 효과

Lot	일반세균 $10^{-1}$	일반세균 $10^{-3}$	내열성세균 $10^{-1}$	내열성세균 $10^{-3}$
AA-1	ND	ND	ND	ND
AA-2	ND	ND	ND	ND
AA-3	ND	ND	ND	ND
AA-4	ND	ND	ND	ND
AA-5	ND	ND	ND	ND
BA-1	ND	ND	ND	ND
BA-2	ND	ND	ND	ND
BA-3	ND	ND	ND	ND
BA-4	ND	ND	ND	ND
BA-5	ND	ND	ND	ND
CA-1	ND	ND	ND	ND
CA-2	ND	ND	ND	ND
CA-3	ND	ND	ND	ND
CA-4	ND	ND	ND	ND
CA-5	ND	ND	ND	ND

Table 4-26. 126°C, 10분에서의 배합비-2 균 사멸 효과

Lot	일반세균 $10^{-1}$	일반세균 $10^{-3}$	내열성세균 $10^{-1}$	내열성세균 $10^{-3}$
AA-1	ND	ND	ND	ND
AA-2	ND	ND	ND	ND
AA-3	ND	ND	ND	ND
AA-4	ND	ND	ND	ND
AA-5	ND	ND	ND	ND
BA-1	ND	ND	ND	ND
BA-2	ND	ND	ND	ND
BA-3	ND	ND	ND	ND
BA-4	ND	ND	ND	ND
BA-5	ND	ND	ND	ND
CA-1	ND	ND	ND	ND
CA-2	ND	ND	ND	ND
CA-3	ND	ND	ND	ND

CA-4	ND	ND	ND	ND
CA-5	ND	ND	ND	ND

• 점도

- 환자용균형영양식 특성상 점도 측정
- 조건 2: 126℃,10분 공정
  - : 배합비-1 152 cP
  - : 배합비-2 50.4 cP

뉴케어 + 류신 3% + 이소류신 1.75% + 발린 1.75%(126℃ 10분 레토르트)

Spindle	Speed(RPM)	Temperature(℃)	Run
RV-02	100	25	0:00:20
<b>DATA</b>			
Temperature(℃)	Viscosity(cp)	Torque(%)	
23.4	152	38	

뉴케어 + 류신 1% + 이소류신 0.5% + 발린 0.5%(126℃ 10분 레토르트)

Spindle	Speed(RPM)	Temperature(℃)	Run
RV-02	100	25	0:00:20
<b>DATA</b>			
Temperature(℃)	Viscosity(cp)	Torque(%)	
23.4	50.4	12.6	

(점도계: Brookfield RVDV-II+ Viscometer ,2번 spindle 사용, 100 rpm, 25℃ 측정)

: 환자용균형영양식의 섭취 방법은 크게 두 가지 방법으로 나뉜다. 첫번째는 경관 투여방법으로 의식이 있거나, 식사를 하시는 분 중 영양보충으로 섭취하는 방법이며, 두번째 방법은 의식이 없어 Feeding bag을 사용하여 코 또는 위로 tube를 이용하는 공급하는 방법이 있다.

이번 BCAA를 적용한 제품은 국내에서 가장 많이 판매되고 있는 뉴케어 화이바 제품으로 경관식에 속한다. 원활한 경관 식 공급 및 미생물 안전성을 위해서는 제품의 물성이 light하여야한다. 이를 위해 자사 규격으로 점조를 80 cP이하로 설정하고 있다.

: 배합비-1(126℃, 10분)은 점도 152 cP로 자사 규격 이탈 확인

- 유화분석 결과-Delta Backscattering(배합비-2 126°C/10분)

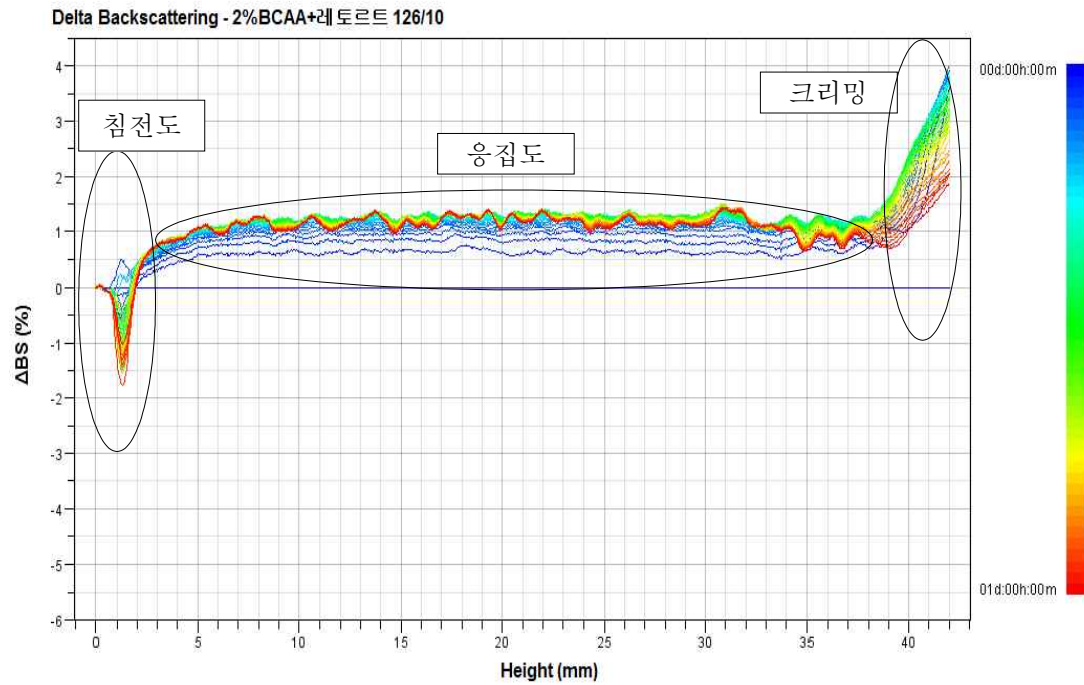


Figure 4-19. Delta backscattering 방법을 이용한 2% BCAA 함유 뉴케어 제품의 유화분석 결과.

: 침전, 응집, 크리밍 현상이 심함.

: 유화를 좋게 하기 위해 BCAA의 추가 연구 필요

- 색차 확인

Table 4-27. 배합비-2에서 126°C 10분 동안 살균 후 0~14일차까지 색도 변화

항목		brix	pH	점도	색차			
보존 온도	보존 일수	%	mV	cP	L	a	b	$\Delta^*ab$
45°C	0	21.27	6.43	52	72.03	4.77	15.95	16.65
	10	21.3	6.43	53	72.28	5.08	16.27	17.04
	20	21.6	6.31	56	72.36	5.86	18.05	18.98
	30	21.17	6.34	55	71.36	6.05	18.04	19.03
	40	24.67	6.3	54	71.49	6.06	18.33	19.31
	50	21.57	6.31	58	70.78	6.51	19.57	20.62
55°C	0	21.27	6.43	52	72.03	4.77	15.95	16.65
	1	21.31	6.34	55	71.83	5.41	16.49	17.35
	3	21.3	6.25	58	70.1	7.49	18.62	20.07
	6	21.53	5.91	58	70.6	8.06	20.39	21.93
	9	21.75	5.78	59	69.47	9.35	21.34	23.30
	12	21.56	5.81	60	68.51	9.98	23.31	25.36
	15	21.64	5.67	60	67.13	10.15	24.27	26.31

Table 4-28. 배합비-2에서 126°C 10분 동안 살균 후, 보존 온도 45°C, 55°C에서의 색도 변화

항 목		Δ*ab	Ph	항 목		Δ*ab	Ph
보존 온도	보존 일수			보존 온도	보존 일수		
45°C	STD	0	16.65	55°C	STD	0	16.65
		10	17.04			1	17.35
		20	18.98			3	20.07
		30	19.03			6	21.93
		40	19.31			9	23.30
		50	20.62			12	25.36
	60	21.45	X		15	26.31	X

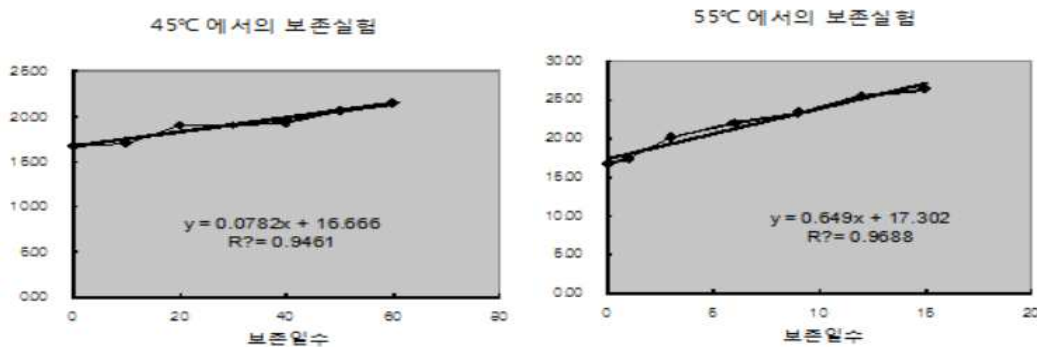


Figure 4-20. 45°C, 55°C 색도 변화 정도 비교.

- 위의 결과로 품질과 보존기간과는 어느 정도 비례관계를 가지므로 비효소적 갈변반응을 주로 하는 0차 반응이라고 할 수 있으며 약간의 1차 반응적 성질을 띤다고 할 수 있다.

가. 0차 반응 계산 시

1. 저장기간과 품질 관계는 비례관계이므로 보존일수로 계산

45°C에서 보존일수 : 50.62일

55°C에서 보존일수 : 3.00일

2.  $Q_{10}$  Value = 45°C에서 보존일수 / 55°C에서 보존일수

$$Q_{10} = 16.8733333$$

3. 상온(25°C)에서의 보존일수

$$= 55^\circ\text{C 보존일수} \times Q_{10}^r \quad [r = (55-25)/10]$$

$$= 59200.3611(\text{약 } 1973.35\text{개월})$$

나. 1차 반응으로 간주 시

1. D-Value ;  $\log(N_0/N_m) - (T_m - T_0)/D_T$

$$D_{45} = -269.18068$$

$$D_{55} = -98.603364$$

2. Z-Value ;  $\log(D_{45}/D_{55}) = (45-55)/Z$

$$Z = 22.9277789$$

3.  $Q_{10}$  Value =  $10^{10/Z} = 2.729934$

4. 45°C 보존 실험 상에서 상온(25°C) 보존일수

$$= 45^{\circ}\text{C} \text{ 보존일수} \times Q_{10}^r [r = \Delta T/10 = (45-25)/10]$$

$$= 623.307728(\text{약 } 20.78\text{개월})$$

5. 55°C 보존 실험 상에서 상온(25°C) 보존일수

$$= 55^{\circ}\text{C} \text{ 보존일수} \times Q_{10}^r [r = (55-25)/10]$$

$$= 100.844861(\text{약 } 3.36\text{개월})$$

다. 위의 결과에 따라 유통기한을 3개월로 설정할 수 있다.

• 영양성분

- 뉴케어 BCAA 0%

: 류신(305.64 mg/100 g), 이소류신(152.28 mg/100 g), 발린(194.48 mg/100 g) 함유

제 D2014080783 호			
검 사 성 적 서			
검체명	AMIFIB	제조일자 (유통기한)	(2015-07-01)
의뢰인	업체명 대상(주)	성 명	명형심
	주소	경기 이천시 바장면 표곡리 123-8	
제조번호		검수년월일	2014-08-19
검사의뢰목적	유통용	검체검수번호	D2014080783
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 용 계약자: 김 원 회			
시험항목	결과	검사담당자	
구성아미노산(티로신)(mg/100g)	76.74mg/100g	이주영	
구성아미노산(글리신)(mg/100g)	73.39mg/100g	이주영	
구성아미노산(세린)(mg/100g)	190.83mg/100g	이주영	
구성아미노산(알라닌)(mg/100g)	112.55mg/100g	이주영	
구성아미노산(글루탐산)(mg/100g)	841.00mg/100g	이주영	
구성아미노산(라이신)(mg/100g)	275.84mg/100g	이주영	
구성아미노산(모이신)(mg/100g)	305.64mg/100g	이주영	
구성아미노산(메티오닌)(mg/100g)	52.03mg/100g	이주영	
구성아미노산(발린)(mg/100g)	194.48mg/100g	이주영	
구성아미노산(아르기닌)(mg/100g)	94.76mg/100g	이주영	
구성아미노산(아스파라긴산)(mg/100g)	269.01mg/100g	이주영	
구성아미노산(이소류신)(mg/100g)	152.28mg/100g	이주영	
구성아미노산(트레오닌)(mg/100g)	145.21mg/100g	이주영	
구성아미노산(페닐알라닌)(mg/100g)	166.67mg/100g	이주영	
구성아미노산(프롤린)(mg/100g)	168.22mg/100g	이주영	
구성아미노산(히스티딘)(mg/100g)	114.19mg/100g	이주영	
구성아미노산(시스테인)(mg/100g)	3.94mg/100g	이주영	
구성아미노산(트립토판)(mg/100g)	33.79mg/100g	이주영	
지방산조성비(%)	Caprylic acid : 11.73%, Capric acid : 5.83%, Myristic acid : 0.14%, Palmitic acid : 4.15%, Pantoic acid : 0.17%, Stearic acid : 1.73%, Elaidic acid : 0.19%, Oleic acid : 50.41%, Linoleic acid : 0.24%, Linoleic acid : 16.78%, Arachidic acid : 0.49%, $\gamma$ -Linolenic acid : 0.44%, cis-11-	김원지	

귀하가 우리 연구원에 검사뢰뢰된 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 원 희

시험항목	결과	검사담당자
	Ricosenoic acid : 1.00%, e-Linolenic acid : 5.89%, cis-11,14-Eicosadienoic acid : 0.23%, Behenic acid : 0.27%, Lignoceric acid : 0.12%, Nervonic acid : 0.12% 이외의 지방산: 정량불가 (지방산 39MLX STD에 대한 총합으로 정량.)	

2014년 9월 1일

한국기능식품연구원



(사)한국기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.kfri.re.kr> 귀하부 11(02)1639-0400-1

Figure 4-21. BCAA 0% 함유 뉴케어 제품의 영양성분 분석 결과.

- 뉴케어 BCAA 2%

: 류신(1392.28 mg/100 g), 이소류신(713.39 mg/100 g), 발린(774.73 mg/100 g) 함유

: 2% BCAA(류신 1,000 mg, 이소류신 500 mg, 발린 500 mg) 첨가 시, 류신 1086.64 mg, 이소류신 561.11 mg, 발린 508.25 mg 검출 확인

: 배합비-2 영양성분 검출 확인 완료

제 D014080784 호			
검사성적서			
원재명	AMIN	제조일자 (유통기한)	2014-08-14
의뢰인	업체명 주소 경기 이천시 바장면 유곡리 125-8	성명	명형실
제조번호		접수년월일	2014-08-14
검사희곡품목	황고유	검체접수번호	D014080784
귀하가 우리 연구원에 검사희곡한 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자: 김 권 회			
시험항목	결과	검사담당자	
구성아미노산(타로신)(mg/100g)	119.97mg/100g	이주영	
구성아미노산(글리신)(mg/100g)	105.00mg/100g	이주영	
구성아미노산(세린)(mg/100g)	261.60mg/100g	이주영	
구성아미노산(알라닌)(mg/100g)	157.24mg/100g	이주영	
구성아미노산(글루탐산)(mg/100g)	1107.21mg/100g	이주영	
구성아미노산(라이신)(mg/100g)	380.85mg/100g	이주영	
구성아미노산(코이신)(mg/100g)	1392.28mg/100g	이주영	
구성아미노산(메티오닌)(mg/100g)	73.64mg/100g	이주영	
구성아미노산(발린)(mg/100g)	774.73mg/100g	이주영	
구성아미노산(아르기닌)(mg/100g)	128.15mg/100g	이주영	
구성아미노산(아스파라긴산)(mg/100g)	389.12mg/100g	이주영	
구성아미노산(익소코이신)(mg/100g)	713.39mg/100g	이주영	
구성아미노산(트레오닌)(mg/100g)	195.40mg/100g	이주영	
구성아미노산(페닐알라닌)(mg/100g)	224.41mg/100g	이주영	
구성아미노산(프롤린)(mg/100g)	130.89mg/100g	이주영	
구성아미노산(히스티딘)(mg/100g)	158.93mg/100g	이주영	
구성아미노산(시스테인)(mg/100g)	3.40mg/100g	이주영	
구성아미노산(트립토판)(mg/100g)	43.63mg/100g	이주영	
지방산조성비(%)	Myristic acid : 0.16%, Palmitic acid : 5.31%, Pantoic acid : 0.22%, Stearic acid : 2.13%, Elaidic acid : 0.19%, Oleic acid : 57.62%, Linoleic acid : 0.31%, Linoleic acid : 23.11%, Arachidic acid : 0.55%, γ-Linolenic acid : 0.63%, cis-11-Eicosenoic acid : 1.21%, α-Linolenic acid : 7.87%, cis-11,14-Eicosadienoic acid : 0.25%, Behenic acid : 0.32%, Lignoceric acid : 0.14%, Nervonic acid : 0.15% 이외의 지방산: 검출되지 않음 (지방산 37MIX STD에 대한 총합으로 정량.)	김준지	
귀하가 우리 연구원에 검사희곡한 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자: 김 권 회			
시험항목	결과	검사담당자	
베타시보스테롤(ng/g)	0.10ng/g	이수아	
브라시카스테롤(ng/g)	0.21ng/g	이수아	
스티그마스테롤(ng/g)	0.14ng/g	이수아	
캄페스테롤(ng/g)	0.09ng/g	이수아	
셀렌(ng/g)	0.47ng/g	남은진	
크롬(ng/g)	0.33ng/g	남은진	
칼리브렌(ng/g)	0.21ng/g	남은진	
2014년 9월 1일			
한국기능식품연구원			
(사)한국기능식품연구원 부속 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화 031-380-9400-1			

Figure 4-22. BCAA 2% 함유 뉴케어 제품의 영양성분 분석 결과.

- 뉴케어 BCAA 개발 결과

: 배합비-1의 경우는 고점도 물성에 의해 현 공정 및 설비로는 제품안전성 및 안정성 확보가 힘들 것으로 판단된다. 배합비-2 경우 배합비-1보다는 응집 및 침전이 적으나 turbiscan 측정 결과 유화가 불안정 하며, 특히 유통기한 內 pH 변화가 높아 유통기한이 3개월 밖에 되지 않는다.

BCAA가 액상에서 유화를 방해하는 것으로 보인다.

(가) 뉴케어 푸딩 적용

① 개발 방향

- 액상이 아닌 반고형 제품인 푸딩을 통한 BCAA을 보충
- 신제품 뉴케어 푸딩 제품에 적용 테스트 실시
- 한국인의 친숙한 딸기 맛을 사용 관능 보완 테스트 실시

② LAB TEST 후 생산 라인 적용 실험생산 실시(400 kg/1 batch)

- 실험생산 배합비

No	원 료 명	비율(%)
1	류신	0.1
2	이소류신	0.5
3	말린	0.5
4	정백당	16.00
5	썬크리머	8.00
6	돈피콜라겐	7.60
7	저감미당	5.50
8	말토덱스트린	3.00
9	딸기농축액	2.00
10	유단백가수분해물	1.50
11	치커리식이섬유	1.50
12	검믹스	1.00
13	미네랄프리믹스	0.60
14	구연산	0.50
15	비타민C	0.30
16	구연산나트륨	0.20
17	딸기향	0.20
18	비타민프리믹스	0.15
19	구연산칼륨	0.10
20	사과산	0.10
21	요쿠르트향	0.10
22	레드칼라	0.04
23	정제수	50.51

- 용해 및 분산, 침전 양호 확인
- 공정 중 특이사항 없음
- 실험생산 완료



③ 공정도

뉴케어 푸딩 생산 공정도 (400kg/1batch)

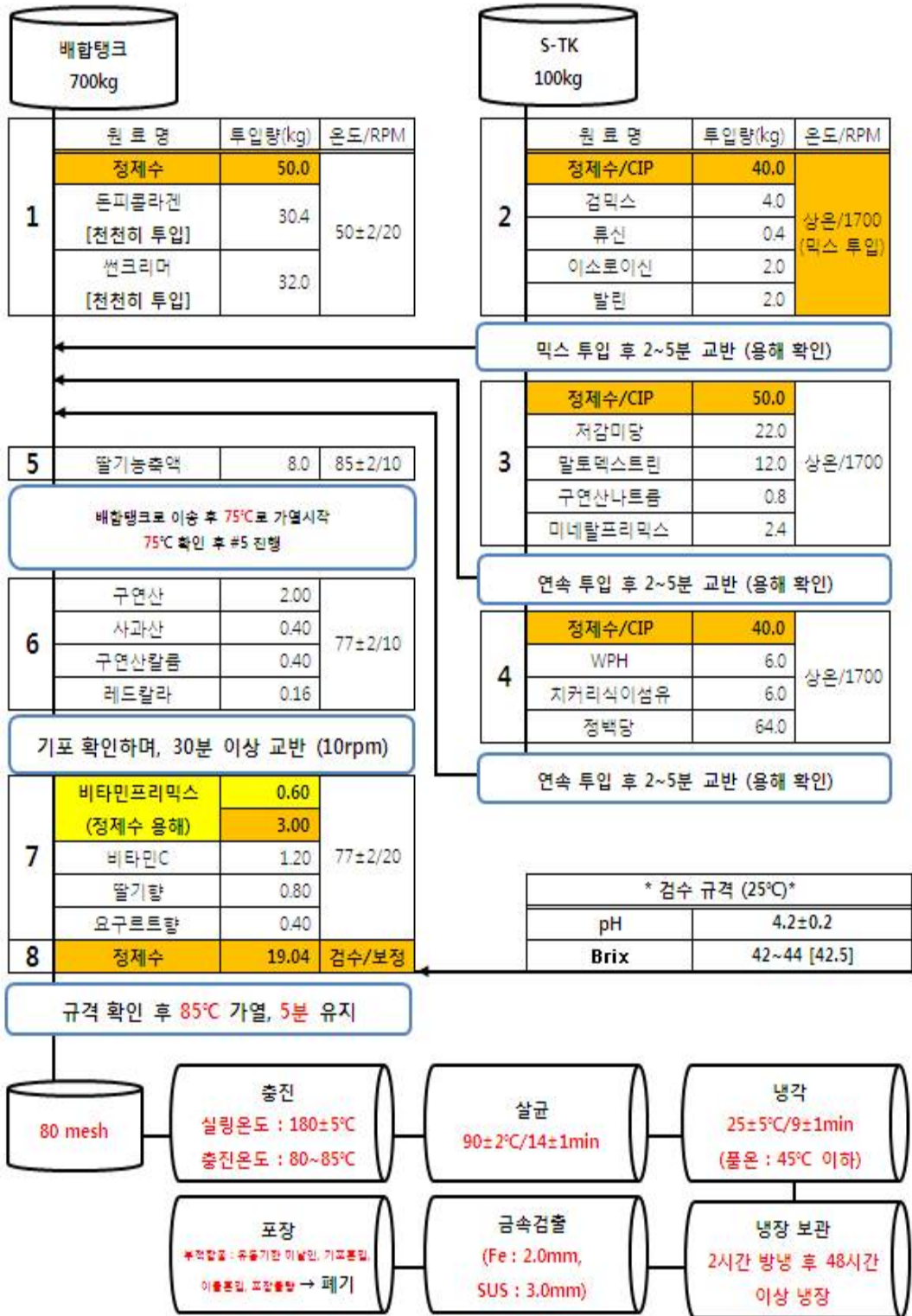


Figure 4-22. BCAA 함유 뉴케어 푸딩 제조 공정도.

④ 보존성 검증(유화력 안정성실험, 유통기한 설정실험\_색차, 세균발육 실험 등)

• 살균 확인

- 미생물 검사 확인

Table 4-29. 1 batch 内 Lot별 [초(A), 중(B), 말(C)] 각 10 EA 샘플링, 3반복

Lot	일반세균 10 <sup>-1</sup>	일반세균 10 <sup>-3</sup>	진균 10 <sup>-1</sup>	진균 10 <sup>-3</sup>
A-1	1	NA	NA	NA
A-2	NA	NA	NA	NA
A-3	1	NA	NA	NA
A-4	NA	NA	NA	NA
A-5	NA	NA	NA	NA
A-6	NA	NA	NA	NA
A-7	1	NA	NA	NA
A-8	NA	NA	NA	NA
A-9	NA	NA	NA	NA
A-10	NA	NA	NA	NA
B-1	1	NA	NA	NA
B-2	NA	NA	NA	NA
B-3	NA	NA	NA	NA
B-4	NA	NA	NA	NA
B-5	2	NA	NA	NA
B-6	NA	NA	NA	NA
B-7	NA	NA	NA	NA
B-8	NA	NA	NA	NA
B-9	NA	NA	NA	NA
B-10	NA	NA	NA	NA
C-1	NA	NA	NA	NA
C-2	NA	NA	NA	NA
C-3	NA	NA	NA	NA
C-4	NA	NA	NA	NA
C-5	NA	NA	NA	NA
C-6	NA	NA	NA	NA
C-7	NA	NA	NA	NA
C-8	NA	NA	NA	NA
C-9	1	NA	NA	NA
C-10	NA	NA	NA	NA

: 뉴케어 푸딩 제품의 경우 gelype 아미노산 보충제와 동일하게 레토르트 공정이 불가하여, 제품 pH를 4.5이하로 산성으로 제조하여 일반미생물을 차단 할 수 있도록 개발, 그러나 산성제품의 경우 진균(곰팡이)가 취약 할 수 있어서 일반세균과 진균(곰팡이) 검사를 한다.

- 일반세균수 : 7(규격 10<sup>2</sup>이하/mL)

- 진균류 : 음성(규격 없음)

- pH : 4.3

- Aw : 0.87이하

→ 미생물 안전성 확인

• 색차 확인

Table 4-30. 뉴케어 푸딩의 lot 별 색차비교

Lot. \ 색차 값	L	a	b
A-1	54.97	12.32	27.10
A-3	54.00	13.01	26.87
A-8	54.26	12.51	27.02
B-3	54.81	12.81	27.11
B-5	53.61	12.23	27.61
B-9	54.88	12.48	27.00
C-2	54.69	12.33	27.61
C-6	55.01	12.41	26.88
C-10	54.73	12.50	28.01
평균	54.55	12.51	27.25

(L : + White~Black, a : + Red~Green, b : + Yellow~Blue)

Table 4-31. 뉴케어 푸딩의 보존 일수에 따른 보존 온도별 색차비교

항목		brix	pH	색차			
보존 온도	보존 일수	%	mV	L	a	b	$\Delta^*ab$
45°C	0	42.3	4	54.42	12.4	27.2	29.89
	5	42.1	4.01	54.4	12.38	27.05	29.75
	10	42.5	4.1	54.01	13.42	27.15	30.29
	15	42.3	4	54.32	13.53	28.11	31.20
	20	42.4	4.1	54.1	14.48	28.31	31.80
	25	42	4.05	53.98	14.52	28.98	32.41
	30	42.4	4.03	54.51	15.63	29.01	32.95
55°C	0	42.4	4.01	54.42	12.4	27.2	29.89
	4	42.1	3.86	56.82	13.55	28.21	31.30
	8	42.5	3.67	58.2	14.9	28.61	32.26
	12	42.3	3.59	59.61	16.41	28.51	32.90
	16	42.2	3.39	60.82	18.68	29	34.50
	20	42.1	3.02	62.75	21.53	28.98	36.10
	24	42	2.9	64.82	25.31	29.51	38.88

Table 4-32. 뉴케어 푸딩의 보존 온도 45°C, 55°C에서의 색도 변화 비교

항목		$\Delta^*ab$	관능	항목		$\Delta^*ab$	관능
보존 온도	보존 일수			보존 온도	보존 일수		
45°C	STD	29.89	○	55°C	STD	29.89	○
	5	29.75	○		4	31.30	○
	10	30.29	○		8	32.26	○
	15	31.20	○		12	32.90	X
	20	31.80	○		16	34.50	X
	25	32.41	○		20	36.10	X
	30	32.95	X		24	38.88	X

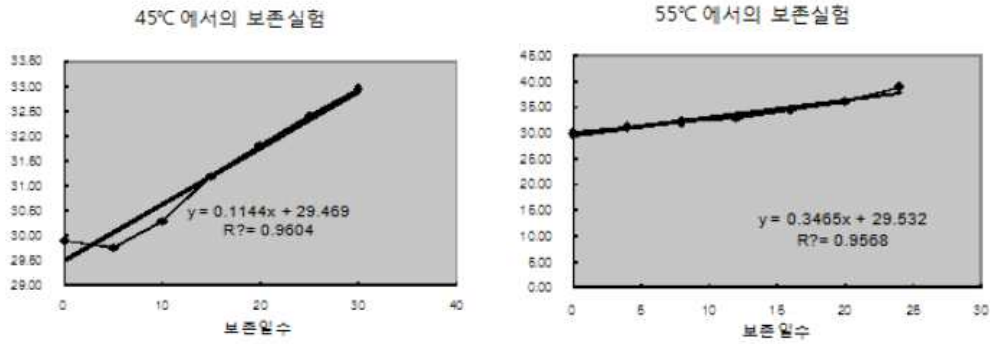


Figure 4-23. 45°C, 55°C 색도 변화 정도 비교.

- 위의 결과로 품질과 보존기간과는 어느 정도 비례관계를 가지므로 비효소적 갈변반응을 주로 하는 0차 반응이라고 할 수 있으며 약간의 1차 반응적 성질을 띤다고 할 수 있다.

가. 0차 반응 계산 시

1. 저장기간과 품질 관계는 비례관계이므로 보존일수로 계산  
 45°C에서 보존일수 : 25.70일  
 55°C에서 보존일수 : 8.00일
2.  $Q_{10}$  Value = 45°C에서 보존일수/55°C에서 보존일수  
 $Q_{10} = 3.2125$
3. 상온(25°C)에서의 보존일수  
 $= 55^\circ\text{C}$  보존일수  $\times Q_{10}^r$  [ $r = (55-25)/10$ ]  
 $= 475.380063$ (약 15.85개월)

나. 1차 반응으로 간주 시

1. D-Value ;  $\log(N_0/N_m) - (T_m - T_0)/D_T$   
 $D_{45} = -711.17451$   
 $D_{55} = -241.41143$
2. Z-Value :  $\log(D_{45}/D_{55}) = (45-55)/Z$   
 $Z = 21.312039$
3.  $Q_{10}$  Value =  $10^{10/Z} = 2.945902$
4. 45°C 보존 실험 상에서 상온(25°C) 보존일수  
 $= 45^\circ\text{C}$  보존일수  $\times Q_{10}^r$  [ $r = \Delta T/10 = (45-25)/10$ ]  
 $= 382.806252$ (약 12.76개월)
5. 55°C 보존 실험 상에서 상온(25°C) 보존일수  
 $= 55^\circ\text{C}$  보존일수  $\times Q_{10}^r$  [ $r = (55-25)/10$ ]  
 $= 351.038092$ (약 11.70개월)

다. 위의 결과에 따라 유통기한을 10개월로 설정할 수 있다.

⑤ 관능 평가

• 관능평가 실시

- 관능평가 전문기관 센소메트릭스 주식회사 의뢰
- 평가 샘플: 아미노 푸딩(딸기), 경쟁사(파인애플)
- 조사 대상: 60세 이상 남녀
- 검사 일시: 2014년 04월 17일
- 검사 장소: (주)센소메트릭스 관능검사 센터(서울특별시 영등포구)
- 시료 준비: 샘플 수령 후 상온 보관 및 제시
- 평가 인원: 36명 남성:(13명) 여성:(23명)
- 평가 시간: 14:00(16명) 15:00(14) 16:00(4) 17:00(2)
- 척도 : 9점 척도



Figure 4-23. 관능 평가 대상 제품(좌; 푸딩 샘플, 우; 경쟁사 푸딩 제품).

• 관능평가지 작성

푸딩, 성별: [ ]남 [ ]여 / 나이: \_\_\_\_\_세 / 이름: \_\_\_\_\_, 제품번호: 146.

본 설문은 **센소메트릭스**에서 진행되는 푸딩에 대한 조사로, **[푸딩의 맛]에 대하여 평가**의 주시권 됩니다.

응답된 내용은 향후 보다 나은 푸딩 제품을 제공하는 데 소중한 자료로 사용될 것입니다. 설문지의 모든 응답은 경당이 없으며, 응답 내용은 단지 통계자료로만 활용하게 될 것입니다.

< 설문 진행 순서 및 주의 사항 >

- 1) 앞에 놓여진 **블록** **읽어볼** **원칙**을 **반드시** **확인**해 주시기 바랍니다.
- 2) 제시된 음료의 변화와 설문지에 적힌 번호가 일치하는지 확인하시고, **푸딩의 맛**을 보면서 **질문에 차례대로 응답**해 주시기 바랍니다.

※ 응답 체크 요령:

- [질문의 형태는 좋아하는 정도]를 묻는 질문과 [강도(세기)를 묻는 질문]으로 구성되어 있습니다.
- [좋아하는 정도를 묻는 질문]의 경우 **원칙이 싫어하는 방향이고, 오른쪽이 좋아하는 방향**입니다.
- [강도(세기)를 묻는 질문]의 경우 **원칙으로 강수를 낮게하고, 오른쪽으로 강수를 강하게하며, 가운데는 보통 정도(세기)**입니다.

③ 설문 응답 시 **옆에 붙여 적대 대화를 나누지 마시고**, 설문에 응해 주시기 바랍니다.

▶ **전체적으로** 평가하는 질문입니다.

1. **전체적으로 평가할 때 이 푸딩은 얼마나 마음에 드세요?** (전체적인 향과 맛, 색상, 입안 느낌, 뒷맛 포함).

대단히 싫다, 싫다, 싫지도 않다, 좋지도 않다, 좋다, 대단히 좋다

▶ **눈으로 보고** 평가하는 질문입니다.

2. **눈으로만 볼 때 이 푸딩은 얼마나 마음에 드세요?** (색상 등).

대단히 싫다, 싫다, 싫지도 않다, 좋지도 않다, 좋다, 대단히 좋다

▶ **향을 맡으며 (향)** 평가하는 질문입니다.

3. **향으로만 평가할 때 이 푸딩은 어느 정도 좋아하세요?**

대단히 싫다, 싫다, 싫지도 않다, 좋지도 않다, 좋다, 대단히 좋다

▶ **마시면서 (맛)** 평가하는 질문입니다.

4. **맛으로만 평가할 때 이 푸딩은 어느 정도 좋아하세요?**

대단히 싫다, 싫다, 싫지도 않다, 좋지도 않다, 좋다, 대단히 좋다

제품번호: 146

4.1. 단맛의 강한 정도는 어때요?  
 매우 약하다  약하다  보통이다  강하다  매우 강하다

4.2. (★) 단맛이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 매우 약하면 좋겠다  약하면 좋겠다  보통이면 좋겠다  강하면 좋겠다  매우 강하면 좋겠다

4.3. 신맛의 강한 정도는 어때요?  
 매우 약하다  약하다  보통이다  강하다  매우 강하다

4.4. (★) 신맛이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 매우 약하면 좋겠다  약하면 좋겠다  보통이면 좋겠다  강하면 좋겠다  매우 강하면 좋겠다

4.5. 과일맛의 강한 정도는 어때요?  
 매우 약하다  약하다  보통이다  강하다  매우 강하다

4.6. (★) 과일맛이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 매우 약하면 좋겠다  약하면 좋겠다  보통이면 좋겠다  강하면 좋겠다  매우 강하면 좋겠다

제품번호: 146

4.7. 분유맛의 강한 정도는 어때요?  
 매우 약하다  약하다  보통이다  강하다  매우 강하다

4.8. (★) 분유맛이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 매우 약하면 좋겠다  약하면 좋겠다  보통이면 좋겠다  강하면 좋겠다  매우 강하면 좋겠다

▶ 마시면서 (식감) 평가하는 질문입니다.

6. 입안에서의 느낌(맛 제외)만으로 평가할 때 이 푸딩을 어느 정도 좋아하세요?  
 대단히 싫다  싫다  중지도 않다  중다  대단히 좋다

6.1. 텁텁함의 강한 정도는 어때요?  
 매우 약하다  약하다  보통이다  강하다  매우 강하다

6.2. (★) 텁텁함이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 매우 약하면 좋겠다  약하면 좋겠다  보통이면 좋겠다  강하면 좋겠다  매우 강하면 좋겠다

제품번호: 146

▶ 먹고(삼키고) 나서 평가하는 질문입니다.

6. 마시고 난 후의 뒷맛으로 평가할 때 이 푸딩을 어느 정도 좋아하세요?  
 대단히 싫다  싫다  중지도 않다  중다  대단히 좋다

6.1. 가루느낌의 강한 정도는 어때요?  
 매우 약하다  약하다  보통이다  강하다  매우 강하다

6.2. (★) 가루느낌이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 매우 약하면 좋겠다  약하면 좋겠다  보통이면 좋겠다  강하면 좋겠다  매우 강하면 좋겠다

Figure 4-24. 뉴케어 푸딩 제품 관능 검사 지표.

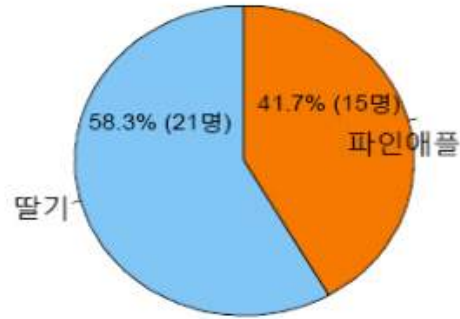
• 관능평가 결과

Table 4-33. 뉴케어 푸딩의 종합 선호 및 기호

제품명	종합선호		종합기호	
	순위빈도	평균(9 점 척도)	CCI(100 점 척도)	종합관정
딸기	21	6.61	99.3	1
파인애플	15	6.42	93.8	2

● 종합선호:

### 종합선호



유의성 검정 [ p value: 0.40503 ]

● 평가 의견

딸기 = 파인애플 (at  $\alpha = 0.20$ )

Figure 4-25. 뉴케어 푸딩 제품의 종합선호도.

=====

=

### ◆ 관능품질 지수 분석

=====

◎ 관능품질 수용도 지수(Consumer Acceptability Index: CAI)

[ Cutoff score: CAI > 0.9 ]

딸기 파인애플

1 1

◎ 관능품질 선호도 지수(Consumer Preference Index: CPI)

[ Cutoff score: CPI > 0.9 ]

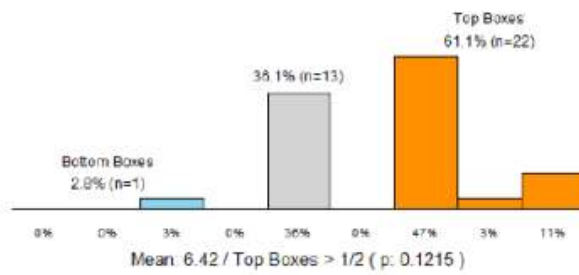
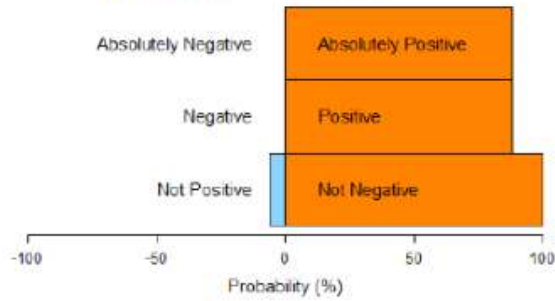
딸기 파인애플

0.9856 0.8785

◎ 관능품질 선호도 지수(Consumer Preference Index: CPI)

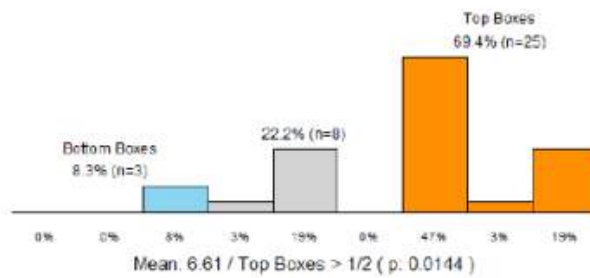
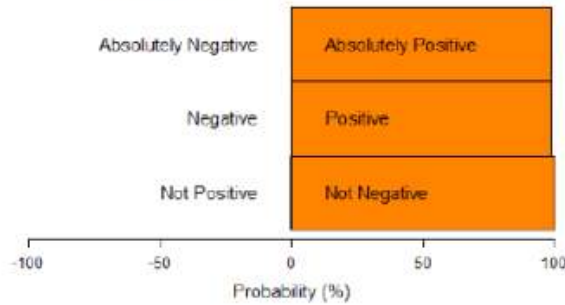
**Chun & Cho Index (CCI): 파인애플**

CCI (phobia) : 93.8 (0)



**Chun & Cho Index (CCI): 딸기**

CCI (phobia) : 99.3 (0.7)





※ 세부 종합기호 CCI: 파인애플

세부 종합기호 CCI: 파인애플



※ 세부 종합기호 CCI: 딸기

세부 종합기호 CCI: 딸기



Figure 4-26. 뉴케어 푸딩 제품의 관능품질 선호도(의미: 0~:확실히부정적, 10~:상당히 부정적, 20~:대체로 부정적, 30~:다소 부정적, 40~:약간 부정적 50~:약간 긍정적, 60~:다소 긍정적, 70~:대체로 긍정적, 80~:상당히 긍정적, 90~:확실히 긍정적).

◆ 주요특성 개선점 분석( Ideal Profile Method: IPM)

◎ 주요 특성의 기호도에 대한 영향력 분석

☞ 관능품질 개선방향: 딸기

관능품질 개선방향: 딸기

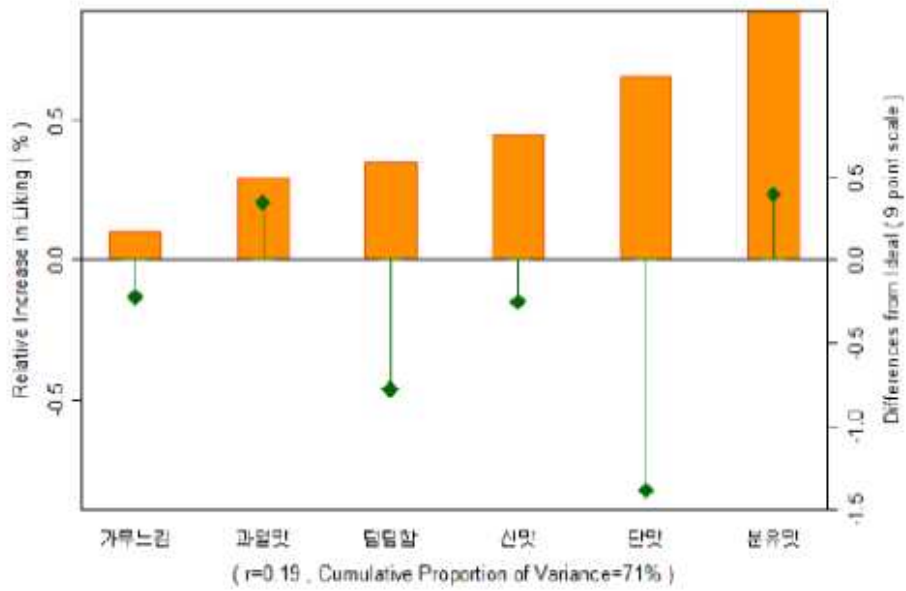


Figure 4-27. 뉴케어 푸딩(딸기) 제품의 관능품질 개선방향 지표.

⑥ 영양성분 결과

제 02014080730 호				검 사 성 적 서	
검체명	아메노푸딩		제조일자 (유통기한)	2014-08-14	
의뢰인	업체명	대삼(주)	상 명	명형칩	
	주소	경기 이천시 마장면 표교리 125-8			
제조번호			접수년월일	2014-08-18	
삼사의뢰목적	참고용		검체접수번호	02014080730	
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자: 김 원 희					
시험항목		결과	검사담당자		
구성아미노산(티로신)(mg/100g)		20.49mg/100g	이주영		
구성아미노산(글리신)(mg/100g)		1362.56mg/100g	이주영		
구성아미노산(세린)(mg/100g)		312.74mg/100g	이주영		
구성아미노산(알라닌)(mg/100g)		659.82mg/100g	이주영		
구성아미노산(글루탐산)(mg/100g)		1066.91mg/100g	이주영		
구성아미노산(라이신)(mg/100g)		482.20mg/100g	이주영		
구성아미노산(프롤린)(mg/100g)		1412.82mg/100g	이주영		
구성아미노산(페티오닌)(mg/100g)		67.88mg/100g	이주영		
구성아미노산(발린)(mg/100g)		829.28mg/100g	이주영		
구성아미노산(아르기닌)(mg/100g)		465.40mg/100g	이주영		
구성아미노산(아스파라긴산)(mg/100g)		442.08mg/100g	이주영		
구성아미노산(아소르티닌)(mg/100g)		716.76mg/100g	이주영		
구성아미노산(트레오닌)(mg/100g)		299.12mg/100g	이주영		
구성아미노산(페닐알라닌)(mg/100g)		176.45mg/100g	이주영		
구성아미노산(프롤린)(mg/100g)		325.47mg/100g	이주영		
구성아미노산(히스티딘)(mg/100g)		89.17mg/100g	이주영		
구성아미노산(시스테인)(mg/100g)		2.19mg/100g	이주영		
구성아미노산(트립토판)(mg/100g)		24.36mg/100g	이주영		
유리아미노산(포어신)(mg/100g)		16.72mg/100g	이주영		
유리아미노산(아소르티닌)(mg/100g)		9.10mg/100g	이주영		
유리아미노산(발린)(mg/100g)		9.78mg/100g	이주영		
열량(Kcal/100g)		177.54Kcal/100g	한아름		
탄수화물(%)		29.21%	한아름		
조단백질(%)		11.62%	이경민		
조지방(%)		1.58%	주은선		
나트륨(mg/100g)		126.23mg/100g	남은선		
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자: 김 원 희					
시험항목		결과	검사담당자		
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(mg/g)		228.33mg/g	김희윤		
포화지방산(g/100g)		1.18g/100g	김은지		
트랜스지방산(g/100g)		불검출	김은지		
폴리페놀(mg/100g)		1.87mg/100g	이현아		
2014년 8월 28일					
한국기능식품연구원					
<small>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <a href="http://www.khri.or.kr">http://www.khri.or.kr</a> 전화번호: 02-6207-1100 FAX: 02-628-0400-1</small>					

Figure 4-28. 뉴케어 푸딩 제품의 영양성분 분석 결과.

⑦ 뉴케어 푸딩 적용 결과

- 관능 테스트 결과 경쟁사 제품 대비 전체적 기호도가 좋으나 큰 차이가 없다. 용해되지 않는 BCAA의 쓴맛과 비린 맛을 마스킹 하기 위해 사용된 농축액 및 콜라겐의 텁텁한 맛을 내어 입감이 좋지 않다. 영양성분은 이론치와 동일하게 확인했다.

(가) 아미노 분말 스틱(BCAA, 아르기닌)

① 개발 방향

- 겔형태의 문제점 보완(목넘김, 끈적거림) 물에 믹스 하여 섭취
- 유동층 과립을 하여 쉽게 용해되어 간편하게 아미노산을 섭취하는 피로 개선 제품
- 블루베리농축액 사용하여 항산화기능을 부각

② LAB TEST 후 생산 라인 적용 실험생산 실시(100 kg/1 batch)

No	원 료 명	비율(%)
1	류신	1
2	이소류신	0.5
3	발린	0.5
4	L-아르기닌	30
5	세립당	22.8
6	유당	12.8
7	크랜베리농축분말	1
8	적포도과즙향분말	3
9	딸기엑스분말	1
10	블루베리분말	2
11	포도향분말	1.5
12	수크랄로오즈	0.04
13	토마틴	0.1
14	효소처리스테비아	0.4
15	구연산	13
16	사과산	1
17	비타민C	6
18	비타민E	1
19	산화아연	0.05
20	엽산	0.01
21	마카	0.5
22	제3인산칼슘	0.7
23	레드비트	1
24	CMC-Na	0.1
	합계	100

- 용해성을 위해 유동층 과립을 실시하였으나, 분진 및 입자 응집이 심하여 과립 불가
- BCAA 함량 조정 후 2차 실험 진행

③ 공정도

아미노 분말 스틱 생산 공정도 (600kg/1batch)

1) 분체 계량

No	원료	투입량(kg)
1	류신	1.00
2	이소류신	0.50
3	발린	0.50
4	L-아르기닌	30.00
5	세립당	22.80
6	유당	12.80
7	적포도과즙말분말	3.00
8	크랜베리농축분말	1.00
9	말기엑스분말	1.00
10	블루베리분말	2.00
11	포도향분말	1.50
12	구연산	13.00
13	사과산	1.00
14	마카	1.50
15	레드비트	1.00
16	비타민C	6.00
17	비타민E	1.00
18	산화아연	0.05
19	엽산	0.01
20	제3인산칼슘	0.70

2) 바인더

No	바인더 원료	투입량(kg)
1	물	18.0
2	CMC-Na	0.10
3	세립당	22.80
4	수크랄로스	0.04
5	트마틴	0.10
6	포스저리스테비아	0.40
7	레드비트	1.00

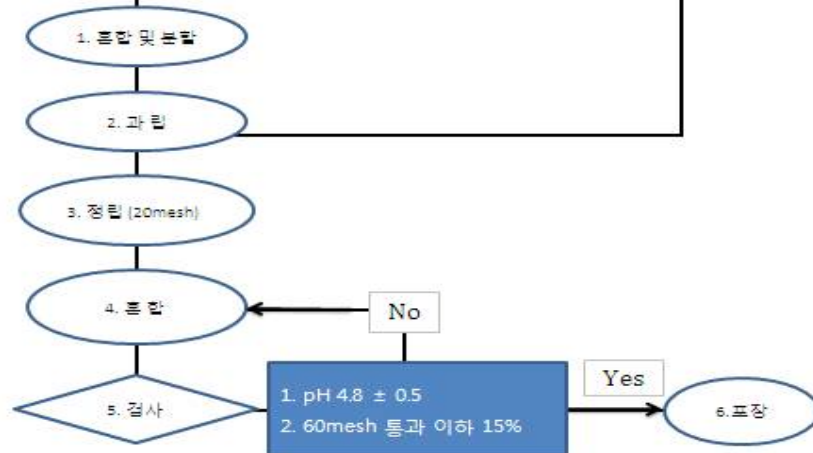


Figure 4-30. BCAA 함유 아미노 분말 스틱 제조 공정도.

\* 과립 시 주요 사항\*

사별 조립용 원료를 제외한 모든 원료를 25호체망으로 사별한다.

조립 혼합원료 무게대비 약 17.6%의 정제수에 조립용 원료를 용해한다. 조립조건은 아래와 같이 설정한다.

급기온도 67 ± 5℃

ChamberTemp. 43 - 47℃

액분사량 0.6

분사압 3.8

건조 조립액 분무가 완료되면 80℃ 이상으로 승온하여 최종수분 5% 이하로 관리한다.

혼합 조립 후 드럼미것로 혼합한다.

충전 정립이 완료된 내용물은 스틱충전기(2way)로 17g이 되도록 충전한다.

충전 스틱 길이 50mm \* 150mm

Table 4-34. BCAA 함유 아미노 분말 스틱 공정 테스트 내용-1차시도

시간 (분)	급기온 도 (°C)	내부온 도 (°C)	배기온 도 (°C)	개 도( %)	액 량	분사압 력	수분함량
예열6	85			30	1.1	2.5	
시작	75	42	41	30	1.1	2.5	-과립 전: 0.8%
5	75	37	36	30	1.1	2.5	-과립 후: 1.46%
10	70	37	36	35	1.1	3	
15	70	37	36	45	0.9	3	
20	70	58	54	45	0.9	3	-최종중량: 93.92
25	70	45	44	45	0.9	3	kg
30	70	45	44	45	0.9	3	

- 응집 발생 : 바인더 양 줄임 - 2차 테스트 시 바인더양 50% 설정 예정
- 바인더 조절 실패: 정제수(27.86 kg) → 실분무량 15 kg

Table 4-35. BCAA 함유 아미노 분말 스틱 공정 테스트 내용-2차시도

시간 (분)	급기온 도 (°C)	내부온 도 (°C)	배기온 도 (°C)	개 도( %)	액 량	분사압 력	수분함량
시작	70	48	47	35	0.8	3	
5	70	49	48	35	0.8	3	
10	70	49	48	35	0.4	3	-과립 전: 1.1%
15	65	49	48	35	0.4	3	-과립 후: 1.9%
20	75	50	48	50	0.4	3	-최종중량: 94.48
25	75	55	48	50	0.4	3	kg
30	70	50	48	50	0.4	3	
건조 15	75	68	65				
건조 30	80	75	73				
건조 50	85	80	78				

- 유동층 과립 제조 시 BCAA의 분진 비산으로 개발이 어렵다.
- 원인: BCAA 원료가 뭉치면서 유동성에 영향을 미친다.
- 조치: 작업 진행 중인 원료 14메쉬망으로 체과, 통과분만 유동층 조립을 실시한다.
- 건조 중간 샘플은 유동중인 원료를 일부 취하여 사용한다. 목표 수분 1% 이하로 하여 작업을 진행하였다. 온도가 상승 할수록 과립물 색상이 연보라 → 분홍색 쪽으로 변화 되었다. 건조 50분 경과 후 원료 회수, 20호 체로 사별, 통과분만 충전에 메쉬망에 잔류된 원료는 뭉침 현상, 일부 녹음 등 문제가 보인다.
- 유동층 과립한 원료에 대해서는 5 g 스틱 포장 후 영양성분 및 유통기한 설정 테스트를 진행하였다.

④ 존성 검증

- 미생물 확인

Table 4-36. 1 batch 내의 lot별(초(A), 중(B), 말(C)] 각 10EA 샘플의 미생물 확인

Lot	일반세균 10 <sup>-1</sup>	일반세균 10 <sup>-3</sup>	대장균군	바실러스세레우스
A-1	36	ND	음성	ND
A-2	21	ND	음성	1
A-3	44	ND	음성	ND
A-4	12	2	음성	ND
A-5	23	ND	음성	ND
A-6	65	ND	음성	ND
A-7	43	ND	음성	ND
A-8	80	ND	음성	ND
A-9	11	ND	음성	ND
A-10	35	ND	음성	ND
B-1	13	ND	음성	ND
B-2	21	1	음성	ND
B-3	ND	ND	음성	ND
B-4	ND	ND	음성	ND
B-5	32	ND	음성	ND
B-6	21	ND	음성	ND
B-7	23	ND	음성	ND
B-8	26	4	음성	ND
B-9	31	ND	음성	ND
B-10	ND	ND	음성	ND
C-1	ND	ND	음성	ND
C-2	43	ND	음성	ND
C-3	35	3	음성	ND
C-4	ND	ND	음성	ND
C-5	ND	ND	음성	1
C-6	43	2	음성	ND
C-7	23	ND	음성	ND
C-8	10	ND	음성	ND
C-9	25	ND	음성	ND
C-10	ND	ND	음성	ND

- 일반세균수 : 적합(규격 20<sup>4</sup>이하/g)
- 대장균군 : 음성(규격 음성)
- 바실러스세레우스(규격 100 이하/g)
- pH : 4.4
- 미생물 안전성 확인

Table 4-37. 보존 온도별 보존 일수에 따른 미생물의 OD 측정 결과

항목	보존 온도	보존 일수	OD	관능	항목	보존 온도	보존 일수	OD	관능
45°C	STD	0	0.685	○	55°C	STD	0	0.685	○
		1	0.698	○			1	0.711	○
		4	0.691	○			2	0.802	○
		6	0.687	○			4	0.760	○
		8	0.747	○			6	0.903	X
		11	0.796	○			7	0.872	X
		15	0.710	○					
		18	0.794	○					
		20	0.730	○					
		22	0.783	○					
		25	0.774	○					
		26	0.879	X					
		28	0.760	X					

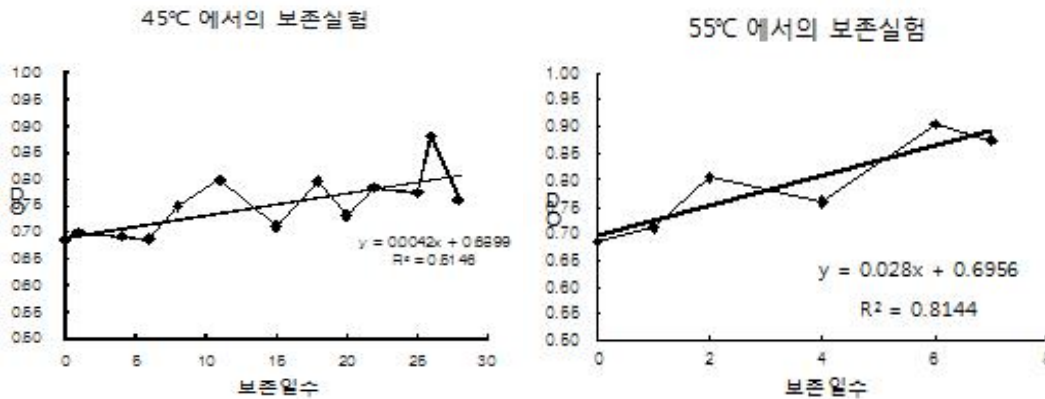


Figure 4-31. BCAA 함유 아미노 분말 스틱의 보존 온도별(45°C, 55°C) 미생물의 OD 값 분석.

- 위의 결과로 품질과 보존기간과는 어느 정도 비례관계를 가지므로 비효소적 갈변반응을 주로 하는 0차 반응이라고 할 수 있으며 약간의 1차 반응적 성질을 띤다고 할 수 있다.

가. 0차 반응 계산 시

1. 저장기간과 품질 관계는 비례관계이므로 보존일수로 계산  
 45°C에서 보존일수 : 25.00일  
 55°C에서 보존일수 : 4.00일
2.  $Q_{10}$  Value = 45°C에서 보존일수 / 55°C에서 보존일수  
 $Q_{10} = 6.142506$
3. 상온(25°C)에서의 보존일수  
 = 55°C 보존일수  $\times Q_{10}^r$  [ $r = (55-25)/10$ ]  
 = 943.2595(약 31.44개월)

나. 1차 반응으로 간주 시



1. D-Value ;  $\log(N_0/N_m) - (T_m - T_0)/D_T$

$$D_{45} = -471.2501$$

$$D_{55} = -90.19786$$

2. Z-Value ;  $\log(D_{45}/D_{55}) = (45-55)/Z$

$$Z = 13.92651$$

3.  $Q_{10}$  Value =  $10^{10/Z} = 5.224626$

4. 45°C 보존 실험 상에서 상온(25°C) 보존일수

$$= 45^\circ\text{C 보존일수} \times Q_{10}^r [r = \Delta T/10 = (45-25)/10]$$

$$= 682.4179 (\text{약 } 22.75 \text{개월})$$

5. 55°C 보존 실험 상에서 상온(25°C) 보존일수

$$= 55^\circ\text{C 보존일수} \times Q_{10}^r [r = (55-25)/10]$$

$$= 580.4435 (\text{약 } 19.35 \text{개월})$$

다. 위의 결과에 따라 유통기한을 18개월로 설정할 수 있다.

⑤ 영양성분 결과

- 류신(503 mg/100 g), 이소류신(247 mg/g), 발린(219 mg/g), 아르기닌(293.23 mg/g) 함유


제 D2014080562 호				검 사 성 적 서	
검체명	AMINO M-4		제조일자 (유통기한)	2014-08-12	
의뢰인	업체명	대상(주)	성명	명형섭	
	주소	경기 이천시 마장면 표교리 125-8			
제조번호			접수년월일	2014-08-13	
검사의뢰목적	참고용		검체접수번호	D2014080562	
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자: 김 천 희					
시험항목	결과	검사담당자			
열량(Kcal/100g)	392.74Kcal/100g	한아름			
탄수화물(%)	64.41%	한아름			
조단백질(%)	30.58%(L-아르기닌 유래 단백질 29.32%포함)	이경민			
조지방(%)	1.42%	주은선			
나트륨(mg/100g)	34.81mg/100g	남은진			
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(mg/g)	409.57mg/g	김혜윤			
포화지방산(g/100g)	0.01g/100g	김은지			
트랜스지방산(g/100g)	0.00g/100g	김은지			
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	이현아			
유리아미노산(로이신)(mg/g)	5.03mg/g	이주영			
유리아미노산(이소로이신)(mg/g)	2.47mg/g	이주영			
유리아미노산(발린)(mg/g)	2.19mg/g	이주영			
유리아미노산(아르기닌)(mg/g)	293.23mg/g	이주영			
2014 년 9 월 4 일 한국 기능 식품 연구원 					
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khssi.re.kr 전화번호 031-628-2100 FAX(031)628-0400-1					

Figure 4-32. BCAA 함유 아미노 분말 스틱의 영양성분 분석 결과.

⑥ 아미노 분말 스틱 개발 결과

: BCAA 원료 사용 시 분말제품이 유리하다.

과립 제조시 분진 비산 문제 발생, 유통기한은 18 개월로 가능하나, 물에 용해시 BCAA 부유 현상이 발견된다.

나. 난용성 소재의 가용화 기술개발을 통한 생체이용률이 향상된 분지아미노산의 상품화  
(가) 리포솜 분말(비정제)

- 개발된 분지아미노산-붕입 리포솜 분말은 hydrophobic phase의 lipid에 레시틴과 콜레스테롤을 4:1의 비율로 혼합하여 만든 리포솜 분말(비정제, C)과 레시틴과 베타시토스테롤을 4:1의 비율로 혼합하여 만든 리포솜 분말(비정제, B) 총 두 가지임
- 콜레스테롤을 사용하여 제조한 리포솜 분말(비정제, C)과 베타시토스테롤을 사용하여 제조한 리포솜 분말(비정제, B)은 성상, BCAA 함량, 맛, 용해성 등 원료의 일반적인 특성에서는 유의적 차이가 없었음.

- Proto-type 제품은 콜레스테롤을 사용하여 제조한 리포솜 분말(비정제, C)과 베타스테롤을 사용하여 제조한 리포솜 분말(비정제, B) 원료를 모두 사용하여 제조하였음

- 리포솜 분말(비정제, C)

- ① BCAA 아미노산 분말 오렌지맛
- ② BCAA 균형영양 분말 누룽지맛
- ③ BCAA 클리어 음료

- 리포솜 분말(비정제, B)

- ① BCAA 영양푸딩
- ② BCAA 뉴케어 검은깨맛

• 성상 확인

- 리포솜 분말(비정제)은 미색의 동결건조 분말로, 입자는 고운 편이나 입자 뭉침 현상이 일부 발생됨.



Figure 4-34. BCAA(좌) 및 리포솜 분말(비정제)(우)의 성상.

- 리포솜 분말(비정제)은 BCAA 원료 자체에 비해 분진 날림이 개선되어 생산 및 섭취 편의성이 증대될 것으로 보임.



Figure 4-35. BCAA(좌) 및 리포좀 분말(비정제)(우).

• BCAA 함량

- 리포좀 분말(비정제)의 BCAA 함량은 11.8%로 원료 순도는 높지 않음.
- 리포좀 내 BCAA의 함유률도 2.6%로 낮은 편임.

Table 4-38. BCAA와 리포좀 분말(비정제) 비교

	BCAA	리포좀 분말(비정제)
BCAA 함량	100%	11.8%
리포좀 내 BCAA 함유률	(Leu : Ile : Val = 2:1:1)	2.6%

• 관능

- 리포좀 분말(비정제)의 관능은 쓴맛을 내는 BCAA의 함량이 11.8%로 낮고, 이 중 2.6%의 BCAA는 리포좀 내에 함유되어 있어 쓴맛이 감소하며, 리포좀 제조 과정에서 감미료인 트레할로스와 설탕이 추가 사용되어 100% BCAA에 비해 쓴맛이 다소 개선되었음.

• 일일섭취량

- BCAA의 기능성 소구를 위해서는 BCAA로서 1일 3~5 g 섭취가 필요함.
- ① BCAA(발효생성 아미노산 복합물)는 식약처에서 지구성 운동 시 피로 개선에 도움을 줄 수 있다는 기능성(생리활성기능 2등급)으로 기능성원료 인정(개별인정)을 받았으며, 이 때의 일일섭취량은 4.7~5 g 임.
- ② Natural Medicines Comprehensive Database에 의하면 BCAA의 성인을 위한 추정 평균 요구량(estimated average requirement: EAR)은 68 mg/kg/day로 이를

50~80 kg 성인 기준으로 환산 시 일일섭취량은 약 3.4~5.4 g 임.

③ 운동능력을 평가한 많은 임상연구에서 보충제로 사용된 BCAA의 일일섭취량은 5 g 이상임

(J. Nutr. 2004, 134(6), 1583S-1587S).

④ 시중에 판매되는 BCAA 제품의 일일섭취량은 1~6 g으로 다양하며, Leucine :

Isoleucine : Valine의 비율이 2:1:1이며, 일일섭취량이 5 g인 제품이 가장 많음.

- 리포솜 분말(비정제)의 BCAA 함량은 11.8%로 BCAA의 기능성을 소구할 수 있도록 1일 3~5 g의 BCAA를 섭취하기 위해서는 100 g 분말제품 기준으로 25.5~42.4 g의 리포솜 분말(비정제)을 섭취해야 함.

① 리포솜 분말(비정제)로서 섭취량이 매우 많기 때문에 BCAA의 기능성을 소구할 수 있는 제품 개발 및 적용이 어려울 것으로 보임.

② 개선 방법

i. BCAA의 기능성을 소구하지 않는 제품 개발

→ BCAA를 단순 첨가한 제품으로 마케팅적으로 설명하기 어려워 실효성이 없음.

ii. 리포솜 분말(비정제)의 BCAA 함량 증가

→ 리포솜 분말로서 일일섭취량을 줄임으로써 맛 마스킹이 용이하고 원재료비 상승요인이 감소함.

iii. 리포솜 분말에 봉입된 BCAA의 생체 내 흡수율이 기존 BCAA 대비 증가

→ 리포솜 분말로서 일일섭취량을 줄임으로써 맛 마스킹이 용이하고 원재료비 상승요인이 감소함.

• 원료 안전성

- 리포솜 분말(비정제, C) 제조에 사용되는 콜레스테롤은 식품공전과 식품첨가물공전에 모두 등재되어 있지 않은 원료임.

→ 식약처 민원질의를 통해 원료 사용 가능여부 확인 예정.

- 리포솜 분말(비정제, B) 제조에 사용되는 베타시토스테롤은

목화씨기름(면실유)으로부터 만들어진 식물스테롤로 콜레스테롤 대신 hydrophobic phase의 lipid에 사용하여도 유사한 성상과 BCAA 함량, 맛, 용해성 등을 보이는 것으로 확인함.

- 리포솜 분말(비정제) 제조에 사용되는 유기용매인 초산에틸(ethyl acetate)과 헥산(hexane)은 식품첨가물공전에 등재되어 있으나 공전에서 허가된 용도로 사용되지 않았기 현재 법규상으로는 사용이 불가함.

→ 3차년도 대량생산 연구 진행 시, 리포솜 분말(비정제) 원료 자체를 식품첨가물로 허가받아 진행 예정.

Table 4-39. 리포솜 분말(비정제) 제조시 사용되는 원료명 및 사용 근거

원료명	사용 근거	비고
L-로이신	식품첨가물공전(제2015-5호) II. 화학적합성품, 천연첨가물	

	<p>및 혼합제제류</p> <p>제 3. 품목별 성분규격 및 보존기준</p> <p>가. 화학적합성품. 353. L-로이신</p>	
L-이소로이신	<p>식품첨가물공전(제2015-5호)</p> <p>II. 화학적합성품, 천연첨가물 및 혼합제제류</p> <p>제 3. 품목별 성분규격 및 보존기준</p> <p>가. 화학적합성품. 191. L-로이신</p>	
L-발린	<p>식품첨가물공전(제2015-5호)</p> <p>II. 화학적합성품, 천연첨가물 및 혼합제제류</p> <p>제 3. 품목별 성분규격 및 보존기준</p> <p>가. 화학적합성품. 68. L-로이신</p>	
레시틴	<p>식품첨가물공전(제2015-5호)</p> <p>II. 화학적합성품, 천연첨가물 및 혼합제제류</p> <p>제 3. 품목별 성분규격 및 보존기준</p> <p>나. 천연첨가물. 16. 레시틴</p> <p>건강기능식품공전(제2014-204호)</p> <p>제 3. 개별 기준 및 규격</p> <p>2. 기능성 원료. 2-18. 레시틴</p>	
콜레스테롤	<p>식품공전 및 식품첨가물공전에 등재되어 있지 않음</p>	<p>식품 제조에 사용 가능한지 식약처 민원 질의 필요</p>
베타시토스테롤	<p>식품공전(제2015-4호)</p> <p>제 5. 식품별 기준 및 규격</p> <p>14. 식용유지류</p> <p>(9) 목화씨기름(면실유)</p>	<p>베타시토스테롤은 목화씨기름(면실유)을 생산하는 공정 중 탈취공정 중에 생긴 증류물임</p>
초산에틸 (ethyl acetate)	<p>식품첨가물공전(제2015-5호)</p> <p>II. 화학적합성품, 천연첨가물 및 혼합제제류</p> <p>제 3. 품목별 성분규격 및 보존기준</p> <p>가. 화학적합성품. 244. 초산에틸</p>	<p>① 초산에틸은 아래의 식품 또는 용도 이외에 사용하지서는 아니 된다.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 착향의 목적</li> <li>2. 초산비닐수지의 용제</li> <li>3. 건강기능식품의 기능성 원료 추출 또는 분리</li> </ol>

	<p>목적: 0.05g/kg 이하(초산에틸로서 잔류량)</p> <p>② 위의 3가지 용도에 모두 해당하지 않음</p> <p>③ 리포솜 분말(비정제) 원료 자체를 식품첨가물로 등재 하는 방법 검토</p>
<p>헥산 (hexane)</p>	<p>식품첨가물공전(제2015-5호) II. 화학적합성품, 천연첨가물 및 혼합제제류 제 3. 품목별 성분규격 및 보 존기준 나. 천연첨가물. 93. 헥산</p> <p>① 헥산은 아래의 식품 또는 용도 이외에 사용하여서는 아니 된다.</p> <p>1. 식용유지 제조 시 유지 성분의 추출 목적: 0.005g/kg 이하(헥산으 로서 잔류량)</p> <p>2. 건강기능식품의 기능성 원료 추출 또는 분리 등의 목적: 0.005g/kg 이하(헥산으로서 잔류 량)</p> <p>② 위의 3가지 용도에 모두 해당하지 않음</p> <p>③ 리포솜 분말(비정제) 원료 자체를 식품첨가물로 등재 하는 방법 검토</p>
<p>트레할로스</p>	<p>식품공전(제2015-4호) [별표 1] 식품에 사용할 수 있 는 원료의 목록 3. 기타원료</p>
<p>설탕</p>	<p>식품공전(제2015-4호) 제 5. 식품별 기준 및 규격 5. 설탕</p>

• 원료 안정성

- 일반적으로 식품 제조에 사용되는 식품 또는 식품첨가물 원료는 대부분 상온 보관이며, 상온 보관 시 2~3년의 유통기한을 보장하고 있음.
- 그러나 현재 개발된 리포솜 분말(비정제)은 4℃에서 냉장 보관해야 하는 원료로 일반적인 원료 창고에서의 보관이 어려워 냉장창고 보관을 위한 추가 비용이 발생됨.
- 또한 냉장 보관 시의 유통기한도 약 3주 정도로 짧아 추후 원료 생산 및 유통이 쉽지 않음.

- 따라서, 3차년도 대량생산 연구 진행시, 현재 사용하고 있는 동결건조(FD) 공정에서 분무건조(SD) 공정으로 변경하여 상온에서의 유통기한을 2년 이상 보장할 수 있도록 연구 진행 예정.

\* 동결건조(FD): 수용액이나 물을 포함하는 시료를 동결하고 그 온도의 수증기압 이하로 감압하여 물을 승화시켜 건조하는 방법으로 분무건조(SD)에 비해 가공비가 비싸고 생산량이 많지 않음

\* 분무건조(SD): 액체 상태의 원료를 뜨거운 바람 중에 분무 분산시켜 열풍으로 급속히 건조하여 분말화하는 방법으로 산업계에서 많이 쓰임

• 용해성

- 리포솜 분말(비정제)의 경우, 액상 표면에 뜨고 가라앉지 않아 용해가 어려운 BCAA 원료 자체의 특성이 개선되어 물에 용해 시, 일반적인 BCAA에 비해 빨리 가라앉아 제품 적용 시 섭취 편의성이 증대될 것으로 보임.



Figure 4-36. 2% 농도로 물에 용해시킨 BCAA(좌) 및 리포솜 분말(비정제)(우).

- 그러나, BCAA가 물에 완전히 용해되었을 때에는 용액이 투명한데 반해, 리포솜 분말(비정제) 분말의 경우 물에 용해시켜도 불투명한 상태를 유지함.



Figure 4-37. 2% 농도로 물에 완전히 용해시킨 BCAA(좌) 및 리포솜 분말(비정제)(우).



- 일반적인 아미노산 제품의 섭취 방법처럼 리포솜 분말(비정제)을 шей커에 넣고 흔들어 용해시켰을 때 거품 발생이 심함.
- 이는 리포솜 분말(비정제) 제조에 사용된 유화제인 레시틴 함량이 높기 때문으로 판단됨.
- 완제품 섭취 시, 거품 발생은 소비자 기호도를 떨어뜨리기 때문에 이를 고려한 제품개발이 필요할 것으로 보임.



Figure 4-38. 리포솜 분말(비정제)의 거품 발생 정도.

(나) PROTO-TYPE 개발1(BCAA 아미노산 분말 오렌지맛)

• 개발 방향

- 면역증진, 세포/체단백 합성에 필요한 아미노산을 간편하고 맛있게 섭취할 수 있는 분말 타입의 제품으로 1포(50 g)를 물 200 mL에 섞어서 섭취.
- 식품유형: 특수의료용도등식품(열량 및 영양공급용 의료용도식품)
- BCAA, 아르기닌의 쓴맛 마스킹을 위해 시트러스 계열의 오렌지맛 선정.
- 분말제품의 분진 날림 및 용해성 개선을 통한 섭취 편의성 증대를 위해 유동층조립기를 이용하여 과립 공정 진행.
- 아미노산의 기능성 소구.

① BCAA(분지아미노산)

- 근육에서 쓰이는 에너지 공급원으로 근육 단백질의 분해 억제 및 단백질 합성 촉진.
- 세포성 면역 향진 및 바이러스 저항성 상승.

② L-글루타민

- 면역세포의 질소 및 에너지 공급원으로 체내 면역력 증진.
- 점막세포의 주요 에너지원, 세포재생에 도움을 주며, 병원체 침투를 막아 체내 면역력 증진
- 질소평형을 positive로 변경하여 체내 단백질 합성 증가.
- 간세포 글루타치온의 전구물질

③ L-아르기닌

- 면역세포 및 성장호르몬의 분비를 증가시켜 면역기능 개선에 도움.

- NO 생성을 유도하여 혈관이완을 통해 혈행개선에 도움.
- 콜라겐 생성을 촉진시켜 상처 치유 및 피부건강에 도움.

• 개발 방법

- 배합비 개발

- ① 리포좀 분말(비정제, C) 및 L-아르기닌 원료 자체의 쓴맛 마스킹을 위해 구연산, 사과산 등 유기산과 시트러스 계열의 오렌지맛 분말, 오렌지향 분말 사용.
- ② Lab test를 통해 실험생산 배합비 확정.
- ③ 공장의 생산라인을 적용하여 실험생산 실시(100 kg/1 batch)

Table 4-40. BCAA 아미노산 분말 오렌지맛 배합비

No	원료명	비율(%)
1	L-글루타민	*
2	미립당	*
3	무수구연산	*
4	사과산	*
5	L-아르기닌	*
6	말토덱스트린	*
7	오렌지맛분말	*
8	<b>리포좀 분말(비정제, C)</b>	<b>51</b>
9	오렌지향	*

- 실험생산

- ① 조립용 원료를 제외한 모든 원료를 25 mesh로 사별하여 더블콘 믹서에서 30분간 혼합.
- ② 조립액은 혼합원료 무게 대비 18~20% 중량으로 CMC-Na을 40% 주정에 30분간 용해.
- ③ 조립 조건: 유동층조립기 사용

급기 온도(°C)	70±5
내부 온도(°C)	42~50
액 분사량	0.4~0.5
분사압(bar)	3.5~3.8

- ④ 조립액 분무가 완료되면 75~80°C로 승온하여 최종 수분 1.5% 이하로 관리.
- ⑤ 조립 및 건조가 완료된 조립물은 20 mesh로 정립.
- ⑥ 정립이 완료된 내용물은 스틱충전기(2 way)로 50 g이 되도록 충전.

Table 4-41. BCAA 아미노산 분말 오렌지맛 과립 조건

시간	급기온도 (°C)	내부온도 (°C)	배기온도 (°C)	개도 (%)	액량	분사압 (bar)	수분 함량 (%)
시작	75	42	34	25	0.4	3.5	과립 전: 1.2%
5	65	49	48	30	0.4	3.8	
10	65	49	48	30	0.4	3.8	
15	70	49	48	32	0.5	3.8	
20	75	50	48	35	0.5	3.8	
25	75	55	48	35	0.5	3.8	
30	75	50	48	35	0.5	3.8	
건조 30	75	68	65				과립 후: 1.5%
건조 60	80	75	73				

- 공정도

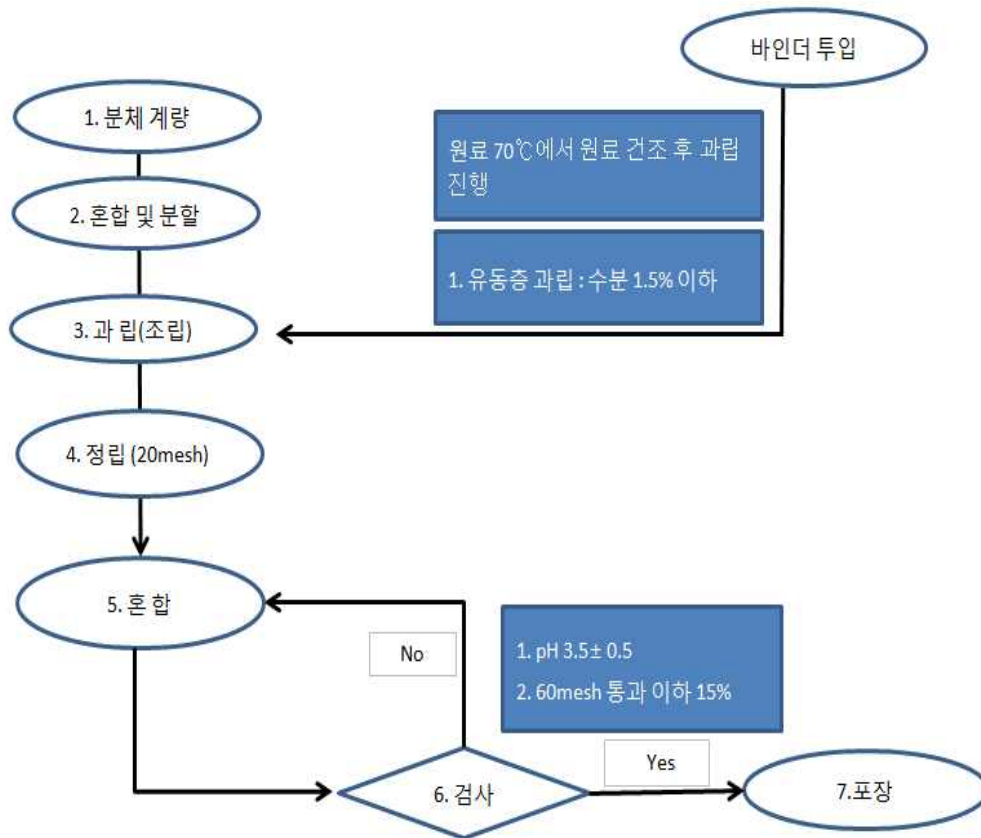


Figure 4-39. BCAA 아미노산 분말 오렌지맛 제조공정도.



Figure 4-40. 더블콘 믹서(600 kg/1 batch).



Figure 4-41. 유동층조립기(100 kg/1 batch).



Figure 4-42. BCAA 아미노산 분말 오렌지맛 Proto-type 제품.

- 개발 결과
- 규격

Table 4-42. BCAA 아미노산 분말 오렌지맛 제품 규격

검 사 항 목		법적기준	자가기준	비고
관능평가 기준	성 상	고유의 색력과 향미를 지닌 분말로서 이미.이취가 없어야 한다.	고유의 색력과 향미를 지닌 분말로서 이미.이취가 없어야 한다.	
이화학적 기준	PH	-	pH 3.5 ± 0.5	
	입도	-	60 mesh 통과 이하 15%	
	수분	10% 이하	4% 이하	
	타르색소	불검출	불검출	
미생물학적 기준	일반세균(cfu/ml)	20,000 이하 /g	10,000 이하 /g	
	대장균군(cfu/ml)	음성	음성	
	바실러스 세레우스(cfu/ml)	100 이하 /g	100 이하 /g	
영 양 소	열량	3 kcal/g 이상	81 kcal 이상	
	조단백질	표시량 이하이어야 한다.	18 g 이하	
	조지방	표시량 이상이어야 한다.	0 g 이상	
	기타 영양소	-	1. 탄수화물 : 6.4 g (표기사항 8 g/ 표기사항 80% 이상) 2. 당류 : 0 g (표기사항 0 g/ 0.5 g 미만시 0 표기) 3. 포화지방산 : 0 g (표기사항 0 g/ 0.5 g 미만시 0 표기) 4. 트랜스지방산 : 0 g (표기사항 0 g/ 0.2 g 미만시 0 표기) 5. 콜레스테롤 : 0 mg (표기사항 0 mg/2 mg 미만시 0 표기) 6. 나트륨 : 0 mg (표기사항 0 mg/5 mg 미만시 0 표기) 7. 비타민C: 80 mg (표기사항 100 mg/ 표기사항 80% 이상) 8. L-글루타민 : 5.6 g (표기사항 7 g/ 표기사항 80% 이상) 9. L-아르기닌 : 2.4 g (표기사항 3 g/ 표기사항 80% 이상) 10. L-코이신 : 0.6 g (표기사항 0.75 g/ 표기사항 80% 이상) 11. L-이소코이신 : 0.3 g (표기사항 0.375 g/ 표기사항 80% 이상) 12. L-발린 : 0.375 g (표기사항 0.375 g/ 표기사항 80% 이상)	생산시 공인기관 또는 자가 분석 실시
	내용량(g)	표시량 이상이어야 한다	27 g 이상	

- 관능

- ① 전체 배합비 중 리포좀 분말의 비율이 51%로 높고 감미료, 유기산, 과즙분말, 향분말 등 맛을 잡을 수 있는 원료를 넣을 수 있는 비율이 부족해 맛 마스킹이 다소 부족함.
- ② 리포좀의 배합 비율을 줄이거나(단, BCAA의 기능성 소구가 어려움), 리포좀 분말(비정제, C)의 BCAA 함량을 높여 추가적인 관능 개선을 해야 할 것으로 보임.
- ③ 현재의 배합비는 원재료비 비율이 높고 관능이 다소 부족하여 현재 개발된 제품으로는 제품 적용 및 산업화가 어려울 것으로 보임.

- 미생물

Table 4-43. BCAA 아미노산 분말 오렌지맛[초(A), 중(B), 말(C)] 각 10EA 샘플의 미생물 확인

- ① 일반세균: 적합(법적 규격: 20,000 이하/g, 자사 규격: 10,000 이하/g)
- ② 대장균군: 적합(법적 규격: 음성, 자사 규격: 음성)
- ③ 바실러스 세레우스: 적합(법적 규격: 100 이하/g, 자사 규격: 100 이하/g)

- pH: 적합 → pH 3.7(자사 규격: pH 3.5 ± 0.5)

- 수분함량: 적합 → 과립 후 1.5%(법적 규격: 10% 이하, 자사 규격: 과립 후 1.5% 이하)



Figure 4-43. 적외선 수분측정기.

- 유통기한 설정

- ① 50℃ 및 60℃의 가혹보존 실험결과, 제품의 색도 측정값 및 관능평가를 근거로 하여 BCAA 아미노산 분말 오렌지맛의 유통기한을 상온 12개월로 산정함.
- ② 이는 일반적인 아미노산 분말 제품의 유통기한인 상온 24개월보다 낮은 수치임.

Table 4-44. BCAA 아미노산 분말 오렌지맛 50℃ 및 60℃ 가혹 보존실험 결과

Lot	일반세균 10 <sup>-1</sup>	일반세균 10 <sup>-3</sup>	대장균군	바실러스세레우스
A-1	ND	ND	음성	ND
A-2	14	ND	음성	ND

A-3	ND	ND	음성	ND
A-4	12	ND	음성	ND
A-5	23	1	음성	ND
A-6	ND	ND	음성	ND
A-7	30	ND	음성	ND
A-8	11	ND	음성	ND
A-9	11	2	음성	ND
A-10	ND	ND	음성	ND
B-1	9	ND	음성	ND
B-2	ND	ND	음성	ND
B-3	10	ND	음성	ND
B-4	ND	2	음성	ND
B-5	32	ND	음성	ND
B-6	21	ND	음성	ND
B-7	ND	ND	음성	ND
B-8	ND	ND	음성	ND
B-9	31	3	음성	ND
B-10	ND	ND	음성	ND
C-1	ND	ND	음성	ND
C-2	32	4	음성	ND
C-3	13	ND	음성	ND
C-4	20	ND	음성	ND
C-5	ND	ND	음성	ND
C-6	41	ND	음성	ND
C-7	23	ND	음성	ND
C-8	ND	1	음성	ND
C-9	14	ND	음성	ND
C-10	ND	ND	음성	ND

50℃				60℃			
항목 보존온도	보존일수	색도 (L값)	관능여부	항목 보존온도	보존일수	색도 (L값)	관능여부
	0	85.500	○		0	85.500	○
	2	83.550	○		2	80.450	○
	4	82.640	○		4	76.340	○
	6	82.440	○		6	74.650	○
	8	81.570	○		8	71.410	○
	10	80.380	○		10	70.100	×
	12	80.100	○				
	14	79.290	○				
	16	77.170	×				

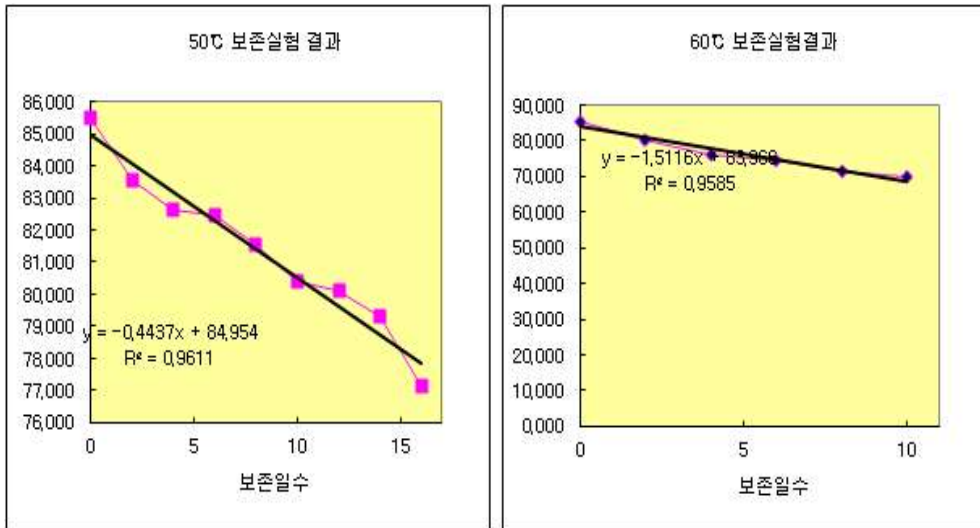


Figure 4-43. BCAA 아미노산 분말 오렌지맛 50°C 및 60°C 가혹 보존실험 결과 그래프

가. 1차 반응으로 간주하여 보존기간 계산

1. D-Value :  $\log(N_0/N_m) = (T_m - T_0) / DT$

D50 = 488.58398

D60 = 127.86566

2. Z-Value :  $\log(D_{60}/D_{50}) = (50-60) / Z$

Z = 17.176662

3. Q10 Value =  $10^{10/Z} = 3.8210727$

4. 50°C 보존실험 결과 상온(25°C) 보존일수

= 50°C 보존일수 × Q10<sup>r</sup> [ r =  $\Delta T/10 = (50-25)/10$  ]

= 570.8122 일 (약 19.0271 개월)

Figure 4-44. BCAA 아미노산 분말 오렌지맛 50°C 및 60°C 가혹 보존실험 정상 변화.

- 영양성분 분석

- ① 공인기관(한국기능식품연구원)에서 HPLC를 이용한 유리아미노산 함량 분석결과, L-로이신 86.29 mg/g, L-이소로이신 35.36 mg/g, L-발린 33.00 mg/g을 함유한 것으로 분석되어 이론치와 동등한 함량을 확인함.
- ② 이를 통해, 리포솜 분말(비정제, C)은 제품에 적용했을 때 파괴되지 않고 안정하게 함량을 유지하는 것으로 보임.
- ③ 그러나 실제 설정한 유통기한(12개월) 중 리포솜 분말(비정제, C)의 L-로이신, L-이소로이신, L-발린의 함량이 표시량의 80% 이상 유지되는지는 추가 실험을 통해 확인이 필요할 것으로 보임.





제 D2015071493 호

## 검 사 성 적 서

검체명	BCAA아미노산오렌지맛	제조일자 (유통기한)	2015-07-17
의뢰인	업체명	대상(주)	
	주 소	서울 농대문구 원호대로 26 (신철동)	
	성 명	명형심	
제조번호		검수년월일	2015-07-22
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2015071493

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자: 김 원 피

시험항목	결과	검사담당자
열량(Kcal/100g)	392.50Kcal/100g	한아름
단수피복(%)	31.26%	한아름
조단백질(%)	65.75%	이경민
포지방(%)	0.54%	이선정
나트륨(mg/100g)	8.89mg/100g	김세미
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(mg/g)	10.30mg/g	김혜윤
포화지방산(g/100g)	0.01g/100g	김은지
트랜스지방산(g/100g)	불검출	김은지
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	이현아
비타민C(mg/100g)	361.85mg/100g	박상진
L-글루타민(mg/g)	233.64mg/g	이주영
L-아르기닌(mg/g)	125.37mg/g	이주영
L-로이신(mg/g)	86.29mg/g	이주영
L-이소모이신(mg/g)	35.36mg/g	이주영
L-발린(mg/g)	33.00mg/g	이주영

2015년 8월 4일

한국기능식품연구원

(사)한국기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호: 051-628-9400-1

Figure 4-45. BCAA 아미노산 분말 오렌지맛 영양성분 공인기관 성적서.

- 고찰

- 원료 및 관능

- ① 리포솜 분말(비정제, C)의 BCAA 함량이 11.8%(w/w)이므로 BCAA로서 1일 3~5 g을 섭취하기 위해서는 전체 배합비 중 리포솜 분말이 51~68%(1포 50 g 중 리포솜 분말로서 25.5~34 g) 비율로 함유되어야 함.
- ② 이러한 배합비는 전체 원료 중 리포솜 분말의 비율이 너무 높아 감미료, 유기산, 과즙분말, 향분말 등 맛을 잡을 수 있는 원료를 넣을 수 있는 비율이 부족해 마스킹이 어렵고, 원재료비 비율이 높아지기 때문에 제품 적용 및 산업화를 위해선 추가 실험이 필요함.  
→ 현재 개발된 배합비는 맛 마스킹이 완료되지 않은 상태로 추가적인 관능 개선이 필요함.
- ③ 따라서, 리포솜 분말의 제품 적용 및 산업화를 위해서는 리포솜 분말(비정제, C)의 BCAA 함량이 현재 개발된 11.8% 보다 유의하게 향상되어야 할 것으로 보임.  
→ 기존에 자사에서 판매되는 아미노산 제품(뉴케어 큐랙트)의 경우 1포 27 g의 제품이나 리포솜 분말(비정제, C)을 함유하는 제품으로 개발 시, 1포의 중량을 최소 50 g으로 늘려야 제품 개발이 가능할 것으로 보여, 소비자 섭취 편의성이 떨어지고 원재료비 상승이 불가피함.
- ④ 단, 리포솜의 생체 내 흡수율이 BCAA 원료 자체에 비해 유의적으로 향상될 경우, 배합비 중 리포솜 분말의 비율을 줄일 수 있어 제품 적용이 가능할 것으로 판단됨.

- 용해성

- ① 리포솜 분말(비정제, C)의 경우, 액상 표면에 뜨고 가라앉지 않아 용해가 어려운 BCAA 원료 자체의 특성이 개선되어 제품 적용 시 섭취 편의성이 증대될 것으로 보임.
- ② 그러나, 리포솜 분말(비정제, C)을 물에 용해했을 때의 투명도는 BCAA가 물에 완전히 용해되었을 때의 투명도 보다 좋지 않아, 이를 개선한 제품 개발이 필요함.

- 분진 날림 및 원료 흐름성

- ① 리포솜 분말(비정제, C)은 BCAA 원료 자체에 비해 분진 날림이 많이 개선되어 적절한 과립 조건을 설정하여 유동층조립기에서 과립을 한다면 생산 및 섭취 편의성이 증대될 것으로 보임.
- ② 그러나 리포솜 분말(비정제, C) 자체의 흐름성이 좋지 않아 생산 시, 흐름성이 좋은 원료와 혼합하여 생산하거나, 리포솜 분말(비정제, C) 원료의 제조시 과립공정을 추가하는 방법을 추가 검토해야 할 것으로 판단됨.

(다) PROTO-TYPE 개발2(BCAA 균형영양 분말 누룽지맛)

- 개발 방향

- 분말 타입의 식사대용 및 간식용 제품으로 1포(100 g)를 물 150 mL에 섞어서 섭취
- 완전균형영양식으로 영양병원, 영양원, 재가환자 대상 제품
- 식품유형: 특수의료용도 등 식품(환자용 균형영양식)
- 한국인에게 가장 친숙한 맛 누룽지맛으로 선정
- 단백질의 용해성 향상 및 지방(오일)의 분말화를 위해 Spray Dry를 이용

• 개발 방법

- 배합비 개발
  - ① 누룽지맛, 견과류맛, 곡물맛 등을 적용하여 Lab test  
→ 맛 마스킹, 소비자 선호도 등을 고려하여 누룽지맛 최종 선정
  - ② Lab test를 통해 실험생산 배합비 확정
  - ③ 공장의 생산라인을 적용하여 실험생산 실시(100 kg/1 batch)

Table 4-45. BCAA 균형영양 분말 누룽지맛 배합비

No	원료명	비율(%)
1	말토덱스트린	*
2	카제이나트륨	*
3	카놀라유	*
4	치커리 식이섬유	*
5	고화방지분당	*
6	MCT oil	*
7	대두레시틴	*
8	구연산칼륨	*
9	염화마그네슘	*
10	염화칼륨	*
11	제3인산칼슘	*
12	황산아연	*
13	황산동	*
14	황산제1철	*
15	제2인산칼륨	*
16	황산망간	*
17	요오드칼륨	*
18	염화콜린	*
19	L-카르니틴	*
20	타우린	*
21	비타민 프리믹스	*
22	누룽지향	*
23	리포솜 분말(비정제, C)	25.5

- 실험생산

- ① 전 원료를 탱크에 용해하여 조제
- ② 여과기를 통과시켜 불순물 제거
- ③ 72~80℃에서 15~20분간 살균
- ④ 고압균질기로 균질

- ⑤ Spray Dry로 분무하여 건조
- ⑥ 분무건조가 완료된 내용물은 충전기로 100 g이 되도록 충전

- 공정도

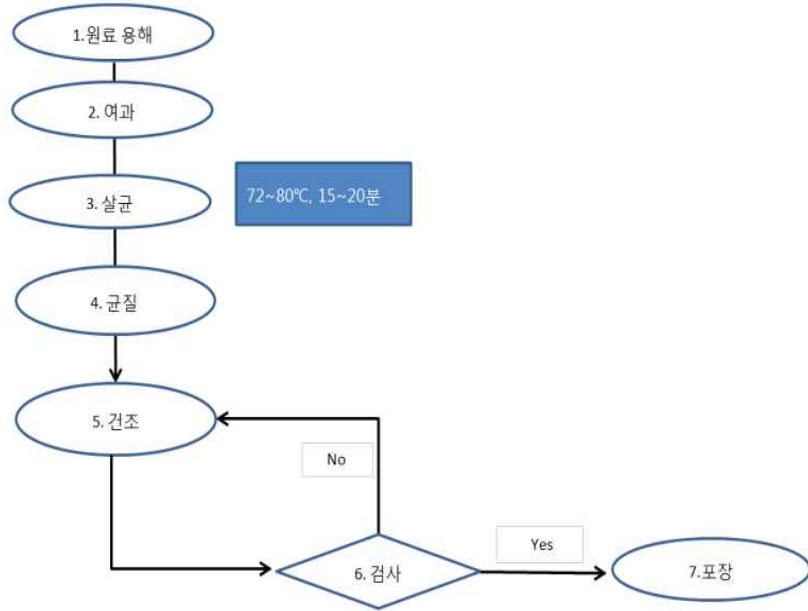


Figure 4-46. BCAA 균형영양 분말 누룽지맛 제조공정도.



Figure 4-47. Spray Dry(2 kg/1 batch).



Figure 4-48. Spray Dry(15 kg/1 batch).



Figure 4-49. BCAA 균형영양 분말 누룽지맛 Proto-type 제품.

• 개발 결과

- 규격

Table 4-46. BCAA 균형영양 분말 누룽지맛 제품 규격

검사항목	법적기준	자가기준	비고
관능평가 기준	성상	고유의 색택과 향미를 지닌 분말로서 이미,이취가 없어야 한다	고유의 색택과 향미를 지닌 분말로서 이미,이취가 없어야 한다
	입도	-	60 mesh 통과 이하 15%
	수분	10% 이하	4% 이하
	타르색소	불검출	불검출
미생물학적 기준	일반세균(cfu/ml)	20,000 이하 /g	10,000 이하 /g
	대장균군(cfu/ml)	음성	음성
	바실러스 세레우스(cfu/ml)	100 이하 /g	100 이하 /g
	조단백질	표시량 이상이어야 한다	15 g 이상
	조지방	표시량 이상이어야 한다.	11 g 이상
		1. 탄수화물: 53.6 g (표기사항 67 g/ 표기사항 80% 이상) 2. 당류: 8 g (표기사항 8 g/ 가장 가까운 1 g 단위로 표기) 3. 포화지방산: 2.5 g (표기사항 2.5 g/ 5 g 이하시 가장 가까운 0.1 g 단위로 표기) 4. 트랜스지방산: 0 g (표기사항 0 g/ 0.2 g 미만시 0 표기) 5. 콜레스테롤: 0 mg (표기사항 5 mg 미만/5 mg 미만시 5 mg 미만으로 표기) 6. 나트륨: 200 mg (표기사항 200 mg/120 mg 초과시 가장 가까운 10 mg 단위로 표기) 7. 식이섬유: 4 g (표기사항 4 g/ 그대로 표기하거나 가장 가까운 1 g 단위로 표기) 8. 칼슘: 280 mg (표기사항 280 mg/ 표시량 이상) 9. 인: 230 mg (표기사항 230 mg/ 표시량 이상)	생산시 공인기관 또는 자가 분석 실시
	기타 영양소	10. 칼륨: 296 mg (표기사항 370 mg/ 표기사항 80% 이상) 11. 마그네슘: 72 mg (표기사항 90 mg/ 표기사항 80% 이상) 12. 아연: 5.2 mg (표기사항 5.2 mg/ 표시량 이상) 13. 철: 4 mg (표기사항 4 mg/ 표시량 이상) 14. 구리: 0.27 mg (표기사항 0.34 mg/ 표기사항 80% 이상) 15. 망간: 0.64 mg (표기사항 0.8 mg/ 표기사항 80% 이상) 16. 요오드: 104 ug (표기사항 130 ug/ 표기사항 80% 이상)	

		<b>17. 비타민A: 107 ug RE</b> (표기사항 107 ug RE/ 표시량 이상) <b>18. 비타민E: 19 mg a-TE</b> (표기사항 19 mg a-TE/ 표시량 이상) <b>19. 비타민K: 62 ug</b> (표기사항 78 ug/ 표기사항 80% 이상) <b>20. 비타민B1: 1.1 mg</b> (표기사항 1.1 mg/ 표시량 이상) <b>21. 비타민B2: 5.6 mg</b> (표기사항 5.6 mg/ 표시량 이상) <b>22. 비타민B6: 1.6 mg</b> (표기사항 1.6 mg/ 표시량 이상) <b>23. 비타민B12: 5 ug</b> (표기사항 6.3 ug/ 표기사항 80% 이상) <b>24. 비타민C: 37 mg</b> (표기사항 37 mg/ 표시량 이상) <b>25. 판토텐산: 2.8 mg</b> (표기사항 3.5 mg/ 표기사항 80% 이상) <b>26. 나이아신: 10.9 mg NE</b> (표기사항 10.9 mg NE/ 표시량 이상) <b>27. 엽산: 140 ug</b> (표기사항 140 ug/ 표시량 이상) <b>28. 비오틴: 16.8 ug</b> (표기사항 21 ug/ 표기사항 80% 이상) <b>29. L-로이신: 1.2 g</b> (표기사항 1.5 g/ 표기사항 80% 이상) <b>30. L-이소로이신: 0.6 g</b> (표기사항 0.75 g/ 표기사항 80% 이상) <b>31. L-발린: 0.6 g</b> (표기사항 0.75 g/ 표기사항 80% 이상)	
내용량(g)	표시량 이상이어야 한다	100 g 이상	

- 관능

- ① 전체 배합비 중 리포솜 분말의 비율이 25.5%로 높고 누룽지맛의 특성상 구연산, 사과산 등 유기산을 사용할 수 없기 때문에 마스킹이 특히 어려움.
- ② 리포솜의 배합 비율을 줄이거나(단, BCAA의 기능성 소구가 어려움), 리포솜 분말(비정제, C)의 BCAA 함량을 높여 추가적인 관능 개선을 해야 할 것으로 보임.
- ③ 현재의 배합비는 원재료비 비율이 높고 관능이 다소 부족하여 현재 개발된 제품으로는 제품 적용 및 산업화가 어려울 것으로 보임.

- 미생물

Table 4-47. BCAA 균형영양 분말 누룽지맛[초(A), 중(B), 말(C)] 각 10EA 샘플의 미생물 확인

Lot	일반세균 10 <sup>-1</sup>	일반세균 10 <sup>-3</sup>	대장균군	바실러스세레우스
A-1	28	2	음성	ND
A-2	ND	ND	음성	ND
A-3	40	ND	음성	ND
A-4	ND	ND	음성	ND
A-5	21	ND	음성	ND
A-6	20	ND	음성	ND
A-7	31	3	음성	ND
A-8	ND	ND	음성	ND
A-9	10	ND	음성	ND
A-10	15	ND	음성	ND
B-1	ND	ND	음성	ND
B-2	18	ND	음성	ND
B-3	21	1	음성	ND
B-4	ND	ND	음성	ND
B-5	26	ND	음성	ND
B-6	21	ND	음성	ND
B-7	ND	ND	음성	ND
B-8	20	ND	음성	ND
B-9	12	ND	음성	ND
B-10	ND	ND	음성	ND
C-1	13	ND	음성	ND
C-2	16	ND	음성	ND
C-3	ND	ND	음성	ND
C-4	ND	ND	음성	ND
C-5	22	ND	음성	ND
C-6	27	3	음성	ND
C-7	23	ND	음성	ND
C-8	ND	ND	음성	ND
C-9	ND	ND	음성	ND
C-10	28	5	음성	ND

① 일반세균: 적합(법적 규격: 20,000 이하/g, 자사 규격: 10,000 이하/g)

② 대장균군: 적합(법적 규격: 음성, 자사 규격: 음성)

③ 바실러스 세레우스: 적합(법적 규격: 100 이하/g, 자사 규격: 100 이하/g)

- 수분함량: 적합 → 3.5%(법적 규격: 10% 이하, 자사 규격: 4% 이하)

- 유통기한 설정

① 50℃ 및 60℃의 가혹보존 실험결과, 제품의 색도 측정값 및 관능평가를 근거로 하여



BCAA 균형영양 분말 누룽지맛의 유통기한을 상온 10개월로 산정함.

② 이는 일반적인 환자용 균형영양식 분말 제품의 유통기한인 상온 18개월보다 낮은 수치임.

Table 4-47. BCAA 균형영양 분말 누룽지맛 50℃ 및 60℃ 가후 보존실험 결과

50℃			60℃			
항 목	색도	관능여부	항 목	색도	관능여부	
보존온도	보존일수	(L값)	보존온도	보존일수	(L값)	
	0	84.100	○	0	84.100	○
	2	83.430	○	2	76.410	○
	4	80.470	○	4	65.870	○
	6	80.500	○	6	62.750	○
	8	76.220	○	8	61.840	○
	10	74.520	○	10	58.610	×
	12	74.200	○			
	14	72.700	○			
	16	69.090	×			

가. 1차 반응으로 간주하여 보존기간 계산

1. D-Value :  $\log(N_0/N_m) = (T_m - T_0) / DT$

D50 = 252.9181

D60 = 74.891493

2. Z-Value :  $\log(D_{60}/D_{50}) = (50-60) / Z$

Z = 18.919778

3. Q10 Value =  $10^{10/Z} = 3.3771273$

4. 50℃ 보존실험 결과 상온(25℃) 보존일수

= 50℃ 보존일수 × Q10<sup>r</sup> [ r =  $\Delta T/10 = (50-25)/10$  ]

= 419.17808 일 (약 13.9726 개월)

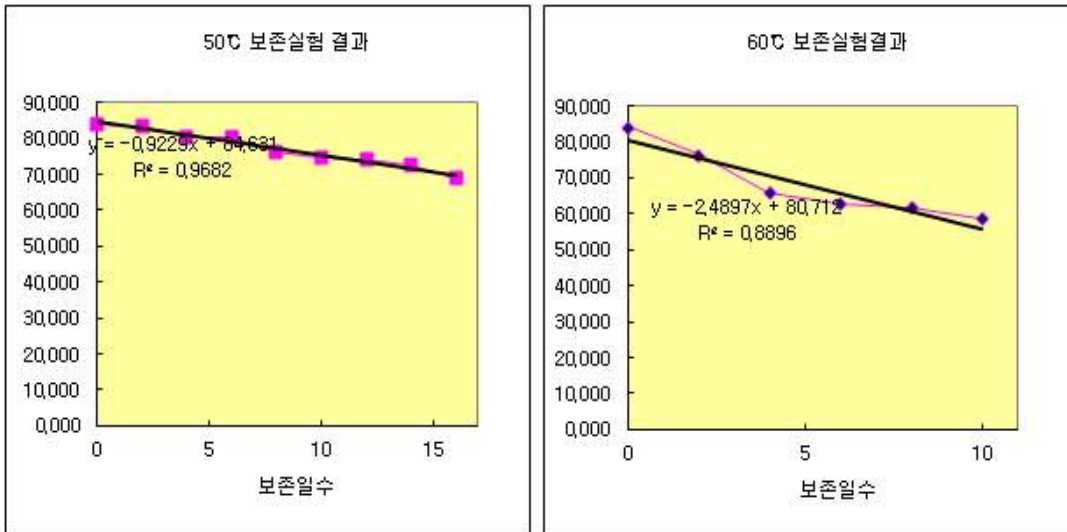


Figure 4-50. BCAA 균형영양 분말 누룽지맛 50°C 및 60°C 가혹 보존실험 결과 그래프



Figure 4-51. BCAA 균형영양 분말 누룽지맛 50°C 및 60°C 가혹 보존실험 색상 변화.

- 영양성분 분석

- ① 공인기관(한국기능식품연구원)에서 HPLC를 이용한 유리아미노산 함량 분석결과, L-로이신 15.12 mg/g, L-이소로이신 8.37 mg/g, L-발린 6.37 mg/g을 함유한 것으로 분석되어 이론치와 동등한 함량을 확인함.
- ② 이를 통해, 리포솜 분말(비정제, C)은 제품에 적용했을 때 파괴되지 않고 안정하게 함량을 유지하는 것으로 보임.
- ③ 그러나 실제 설정한 유통기한(10개월) 중 리포솜 분말(비정제)의 L-로이신, L-이소로이신, L-발린의 함량이 표시량의 80% 이상 유지되는지는 추가 실험을 통해 확인이 필요할 것으로 보임.

제 D2015071494 호

## 검사 성적서

검체명	BCAA균형영양농저맛	제조일자 (유통기한)	2015-07-17
의뢰인	업체명	대상(주)	
	주소	서울 동대문구 천호대로 26 (신선동)	
	상명	명형집	
제조번호		검수년월일	2015-07-22
검사의뢰목적	참고용	검체검수번호	D2015071494

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 원 회

시험항목	결과	검사담당자
열량(Kcal/100g)	427.37Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	67.36%(식이섬유 4.23% 함유)	한아름
조단백질(%)	15.88%	이경민
조지방(%)	11.43%	이선정
나트륨(mg/100g)	198.80mg/100g	김세미
당류(과당,포도당,자당,엿아당,유당)(mg/g)	76.36mg/g	김혜윤
포화지방산(g/100g)	2.47g/100g	김은지
트랜스지방산(g/100g)	0.03g/100g	김은지
콜레스테롤(mg/100g)	3.90mg/100g	이현아
식이섬유(%)	4.23%	이경민
칼슘(mg/100g)	282.26mg/100g	김세미
인(mg/100g)	238.95mg/100g	김세미
칼륨(mg/100g)	378.59mg/100g	김세미
마그네슘(mg/100g)	91.07mg/100g	김세미
아연(mg/100g)	5.27mg/100g	김세미
철(mg/100g)	4.02mg/100g	김세미
구리(mg/100g)	0.34mg/100g	김세미
망간(mg/100g)	0.80mg/100g	김세미
요오드( $\mu$ g/100g)	130.02 $\mu$ g/100g	김세미
비타민A( $\mu$ g RE/100g)	107.29 $\mu$ g RE/100g	정제영
비타민D( $\mu$ g/100g)	불검출	정제영
비타민E(mg $\alpha$ -TE/100g)	19.89mg $\alpha$ -TE/100g	최지원
비타민K( $\mu$ g/100g)	78.25 $\mu$ g/100g	최지원
비타민B1(mg/100g)	1.14mg/100g	김수희
비타민B2(mg/100g)	5.60mg/100g	김수희

귀하가 우리 연구원에 감사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 원 희

시험항목	결과	검사담당자
비타민B6(mg/100g)	1.68mg/100g	김수희
비타민B12( $\mu$ g/100g)	6.32 $\mu$ g/100g	김영숙
비타민C(mg/100g)	37.42mg/100g	박상진
판토텐산(mg/100g)	3.57mg/100g	박상진
나이아신(mgNE/100g)	10.92mgNE/100g	김영숙
엽산( $\mu$ g/100g)	140.47 $\mu$ g/100g	김영숙
비오틴( $\mu$ g/100g)	21.42 $\mu$ g/100g	박상진
L-로이신(mg/g)	15.13mg/g	이주영
L-이소로이신(mg/g)	8.37mg/g	이주영
L-발린(mg/g)	6.37mg/g	이주영

2015년 8월 11일

한국기농식품연구원



(사)한국기농식품협회 무인 한국기농식품연구원 <http://www.khni.or.kr> 전화 02-950-1100 FAX(02)950-0400-1

Figure 4-52. BCAA 균형영양 분말 누룽지맛 영양성분 공인기관 성적서.

- 고찰

- 원료 및 관능

- ① 리포솜 분말(비정제, C)의 BCAA 함량이 11.8%(w/w)이므로 BCAA로서 1일 3~5 g을 섭취하기 위해서는 전체 배합비 중 리포솜 분말이 25.5~42.2%(1포 100 g 중 리포솜 분말로서 25.5~42.2 g) 비율로 함유되어야 함.
- ② 이러한 배합비는 전체 원료 중 리포솜 분말의 비율이 너무 높아 마스킹이 어렵고, 원재료비 비율이 높아지기 때문에 제품 적용 및 산업화를 위해선 추가 실험이 필요함.  
→ 현재 개발된 배합비는 맛 마스킹이 완료되지 않은 상태로 추가적인 관능 개선이 필요함.
- ③ 따라서, 리포솜 분말의 제품 적용 및 산업화를 위해서는 리포솜 분말(비정제, C)의 BCAA 함량이 현재 개발된 11.8% 보다 유의하게 향상되어야 할 것으로 보임.  
→ 기존에 경쟁사에서 판매되는 환자용 균형영양식의 경우 1포 47~49 g의 제품이나 리포솜 분말(비정제, C)을 함유하는 제품으로 개발 시, 1포의 중량을 최소 100 g으로 늘려야 제품 개발이 가능할 것으로 보여, 소비자 섭취 편의성이 떨어지고 원재료비 상승이 불가피함.
- ④ 단, 리포솜의 생체 내 흡수율이 BCAA 원료 자체에 비해 유의적으로 향상될 경우, 배합비 중 리포솜 분말의 비율을 줄일 수 있어 제품 적용이 가능할 것으로 판단됨.

- 용해성

- ① 리포솜 분말(비정제, C)의 경우, 액상 표면에 뜨고 가라앉지 않아 용해가 어려운 BCAA 원료 자체의 특성이 개선되어 제품 적용 시 섭취 편의성이 증대될 것으로 보임.

- 분진 날림

- ① 리포솜 분말(비정제, C)은 BCAA 원료 자체에 비해 분진 날림이 많이 개선되어 생산 및 섭취 편의성이 증대될 것으로 보임.

(라) PROTO-TYPE 개발2(BCAA 클리어 음료)

- 개발 방향

- 환자의 수술 전 에너지 공급을 통해 수술 후 빠른 회복을 돕는 제품으로, 기존 뉴케어 노엔피오 제품을 베이스로 개발.
- 특수의료용도 등 식품 유형.

- 개발 방법

- Lab test 후 생산 라인 적용 실험생산 실시(1,500 kg/1 batch).
- 리포솜 분말(비정제, C)을 0.5% 함유하도록 하여 다음과 같은 제조공정도(Fig 43.)순서에 따라 제품 생산 진행.

① 실험생산 배합비

Table 4-48. BCAA 클리어 음료 배합비

No	원료명	비율(%)
1	리포솜 분말(비정제, C)	0.5
2	퓨어텍스	***
3	말토덱스트린	***
4	결정과당	***
5	구연산나트륨	***
6	구연산칼륨	***
7	무수구연산	***
8	사과향	***
9	수크랄로스	***
10	토마틴	***



Figure 4-53. 뉴케어 생산라인(10ton/batch).



Figure 4-54. BCAA 클리어 음료 Proto-type 제품.

② 제조공정도

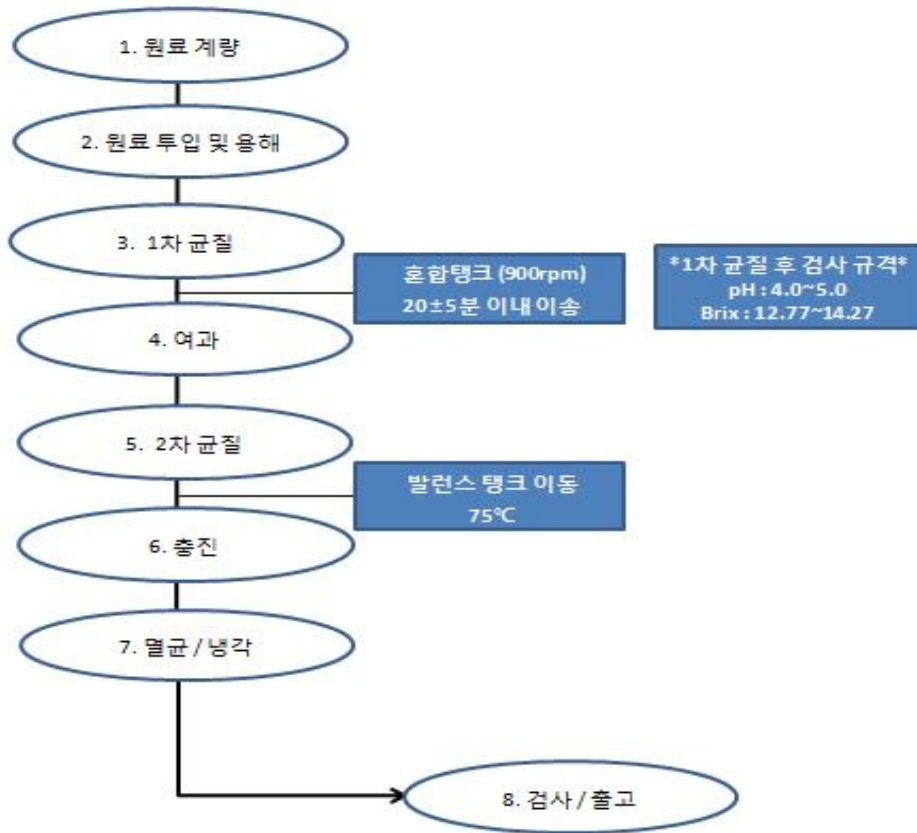


Figure 4-55. BCAA 클리어 음료 제조공정도.

• 개발 결과

- 균 확인

① 미생물 검사 확인

· 조건: 126°C, 5분 공정

· 미생물학적 안정성을 확보하고자 일반세균, 내열성세균 및 발육고온균 검사를 식품공전법에 따라 진행하였으며 그 결과는 다음과 같음.

: 일반세균: 2제품 각 10 CFU/mL(생산lot별 5개 샘플x3반복 진행)

내열성세균: 불검출(생산 lot별 5개 샘플x3반복 진행)

: 발육고온균: 불검출(생산 lot별 3개 샘플x5반복 진행)

· 일부 제품에서 일반세균이 검출되었으나 반복 실험 결과, 제품 내 미생물 잔존으로 보기 어려움. 또한 일반세균의 법적규격인 100 CFU/mL이하를 만족시킴으로 문제되지 않음.

Table 4-49. BCAA 클리어 음료의 126°C, 5분에서의 일반세균, 내열성세균 사멸 효과

Lot	일반세균 $10^{-1}$	일반세균 $10^{-3}$	내열성세균 $10^{-1}$	내열성세균 $10^{-3}$
A1-1-1	ND	ND	ND	ND
A1-1-2	ND	ND	ND	ND
A1-1-3	1	ND	ND	ND
A1-2-1	ND	ND	ND	ND
A1-2-2	ND	ND	ND	ND
A1-2-3	ND	ND	ND	ND
A1-3-1	ND	ND	ND	ND
A1-3-2	ND	ND	ND	ND
A1-3-3	ND	ND	ND	ND
A1-4-1	ND	ND	ND	ND
A1-4-2	ND	ND	ND	ND
A1-4-3	ND	ND	ND	ND
A1-5-1	ND	ND	ND	ND
A1-5-2	ND	ND	ND	ND
A1-5-3	ND	ND	ND	ND

Table 4-50. BCAA 클리어 음료의 126°C, 5분에서의 발육고온균 사멸 효과

Lot	일반세균 $10^{-1}$	일반세균 $10^{-3}$	내열성세균 $10^{-1}$	내열성세균 $10^{-3}$
B1-1-1	ND	ND	ND	ND
B1-1-2	ND	ND	ND	ND
B1-1-3	1	ND	ND	ND
B1-2-1	ND	ND	ND	ND
B1-2-2	ND	ND	ND	ND
B1-2-3	ND	ND	ND	ND
B1-3-1	ND	ND	ND	ND
B1-3-2	ND	ND	ND	ND
B1-3-3	ND	ND	ND	ND
B1-4-1	ND	ND	ND	ND
B1-4-2	ND	ND	ND	ND
B1-4-3	ND	ND	ND	ND
B1-5-1	ND	ND	ND	ND
B1-5-2	ND	ND	ND	ND
B1-5-3	ND	ND	ND	ND



Lot	발육고온균 $10^{-2}$	Lot	발육고온균 $10^{-2}$
B1-1-1	ND	A1-1-1	ND
B1-1-2	ND	A1-1-2	ND
B1-1-3	ND	A1-1-3	ND
B1-1-4	ND	A1-1-4	ND
B1-1-5	ND	A1-1-5	ND
B1-2-1	ND	A1-2-1	ND
B1-2-2	ND	A1-2-2	ND
B1-2-3	ND	A1-2-3	ND
B1-2-4	ND	A1-2-4	ND
B1-2-5	ND	A1-2-5	ND
B1-3-1	ND	A1-3-1	ND
B1-3-2	ND	A1-3-2	ND
B1-3-3	ND	A1-3-3	ND
B1-3-4	ND	A1-3-4	ND
B1-3-5	ND	A1-3-5	ND

- 유화분석 결과: Delta Backscattering

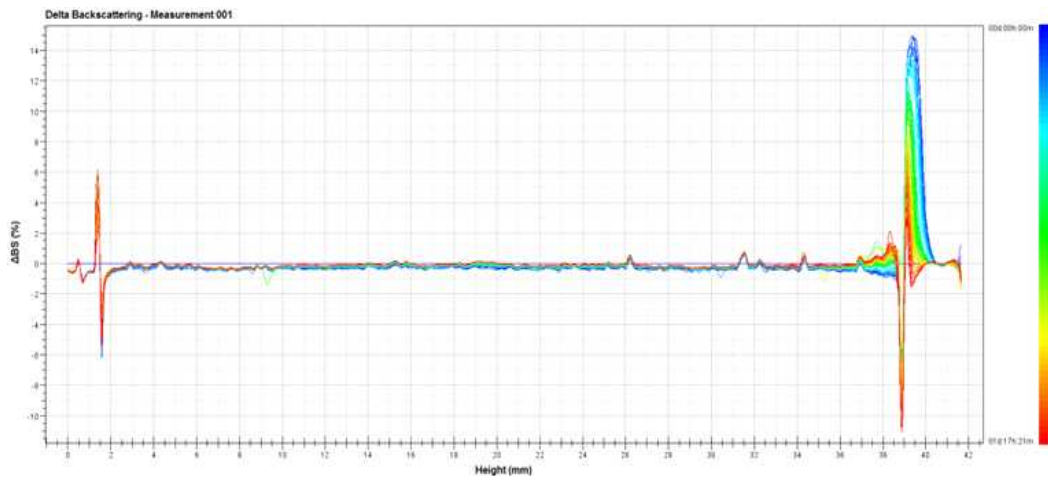


Figure 4-56. 뉴케어 클리어 음료의 유화분석 결과.

- 리포솜 함유 뉴케어 클리어타입 음료의 유화분석 결과, 봉입되지 않은 BCAA입자의 움직임으로 인해 정확한 data를 얻지 못함.

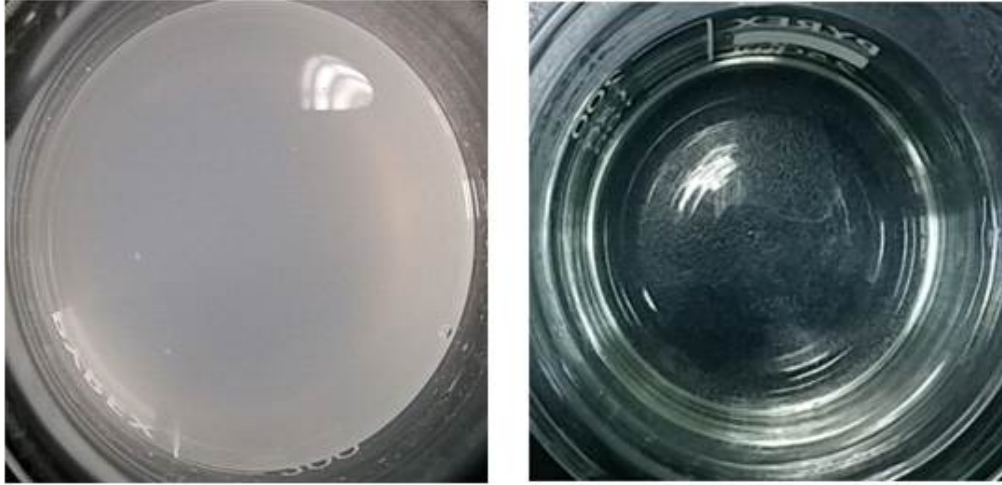


Figure 4-57. 레토르트 후 BCAA 클리어 음료(왼쪽) 및 3차년도 목표 제품 양상 사진(오른쪽).

- 126℃에서 5분간 레토르트 진행 결과, 위의 그림(왼쪽)과 같이 리포솜 분말(비정제, C)을 0.5% 사용하였음에도 불구하고 투명도가 좋지 않음.
- 또한 BCAA입자로 추정되는 흰색 부유물이 제품 내 잔존하는 것을 확인함.
- 이는 제품의 품질 상 불량으로 판단되며, 리포솜 분말의 특성상 클리어 타입에 적용하기 힘들 것으로 예상됨.

- 색차 확인

Table 4-51. BCAA 클리어 음료의 보존 온도별 보존 일수에 따른 brix, pH, 점도, OD 값 비교

보존 온도	항목 보존 일수	brix	pH	점도	OD
		%	mV	cP	
45℃	0	13.72	4.63	15.5	0.719
	4	13.80	4.66	16.2	0.810
	8	13.82	4.70	18.3	0.950
	12	13.75	4.76	17.2	1.700
	14	13.78	4.82	18.5	1.950
55℃	0	13.70	4.63	15.2	0.719
	4	13.68	4.70	17.5	1.000
	8	13.74	4.75	20.0	1.450
	12	13.80	4.79	21.2	1.800
	14	13.83	4.85	20.5	2.300

- 유통기한 설정

① 45℃, 55℃ 가혹보존 실험결과 제품의 관능평가 및 OD측정값을 근거로 하여 BCAA 클리어음료의 유통기한을 상온 6개월로 산정함.

Table 4-52. BCAA 클리어 음료의 45°C 및 55°C 가혹 보존실험

항 목		OD	관능여부	항 목		OD	관능여부	비 고
보존온도	보존일수			보존온도	보존일수			
45°C	0	0.719	○	55°C	0	0.719	○	
	4	0.810	○		4	1.000	○	
	8	0.950	○		8	1.450	○	
	12	1.700	x		12	1.800	x	
	14	1.950	x		14	2.300	x	

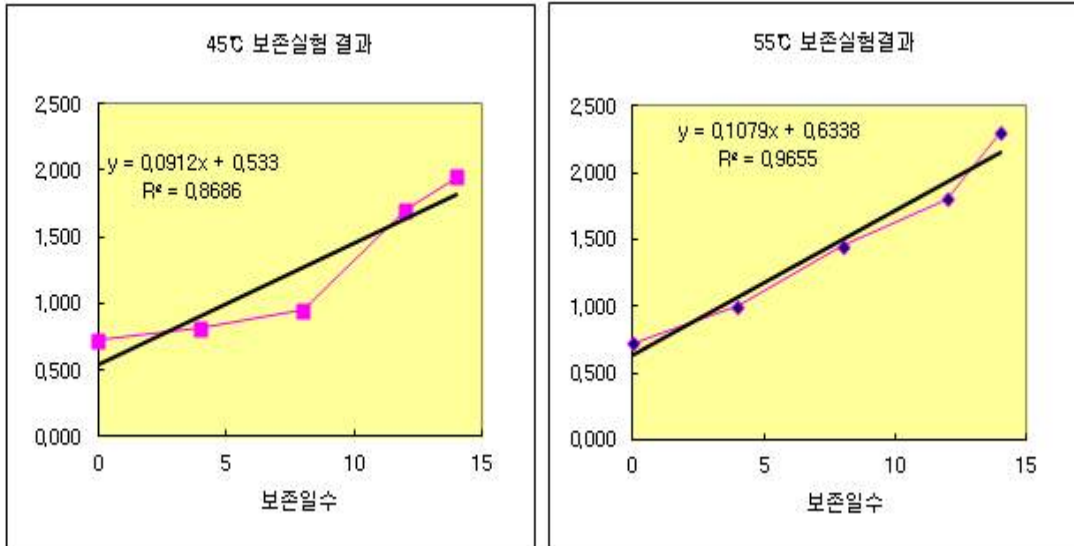


Figure 4-58. BCAA 클리어 음료의 45°C 및 55°C 가혹 보존실험 결과 그래프.

가. 1차 반응으로 간주하여 보존기간 계산

1. D-Value :  $\log(N_0/N_m) = (T_m - T_0) / DT$   
 $D_{45} = -115.7075$   
 $D_{55} = -45.95602$

2. Z-Value :  $\log(D_{55}/D_{45}) = (45 - 55) / Z$   
 $Z = 24.936458$

3. Q10 Value =  $10^{10/Z} = 2.5177886$

4. 55°C 보존실험 결과 상온(25°C) 보존일수  
 = 55°C 보존일수  $\times Q_{10}^r$  [  $r = \Delta T / 10 = (45 - 25) / 10$  ]  
 = 201.17692 일 (약 6.705897 개월)

- 영양성분 결과(원본 도착시 재 첨부 예정)

① 유리아미노산 함량 분석 결과, 로이신(2.48 mg/g), 이소로이신(1.11 mg/g), 발린(1.19 mg/g) 함유.


제 D0015080873 호			
검 사 성 적 서			
업체명	BCAA클리어음료	제조사 (유통기한)	
의뢰인	업체명	대상(주)	
	주소	경기 이천시 바장면 표교리 125-8	
	상명	명형삼	
제조번호		접수년월일	2015-08-13
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D0015080873
귀사가 우리 연구원에 검사의뢰한 검체는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자:김 천 희			
시험항목	결과	검사담당자	
열량(Kcal/100g)	52.56Kcal/100g	한아름	
탄수화물(%)	12.47%	한아름	
포도당(%)	0.40%	이경민	
포지방(%)	0.12%	이선정	
나트륨(mg/100g)	40.14mg/100g	김세미	
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(mg/g)	18.10mg/g	김혜윤	
포화지방산(g/100g)	불검출	김은지	
트랜스지방산(g/100g)	불검출	김은지	
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	이원아	
칼륨(mg/100g)	85.70mg/100g	김세미	
유리아미노산(로이신)(mg/g)	2.48mg/g	이주영	
유리아미노산(이소로이신)(mg/g)	1.11mg/g	이주영	
유리아미노산(발린)(mg/g)	1.19mg/g	이주영	
2015년 8월 27일			
한국농식품연구원 			
<small>(사)한국농림기술통합회 부설 한국농식품연구원 http://www.knri.re.kr 전화 02-970-5200 FAX 02-970-0400-1</small>			

Figure 4-59. BCAA 클리어 음료의 영양성분 공인기관 성적서.

- 고찰

- ① 리포솜 분말(비정제, C) 함유 클리어 타입 음료 제품의 경우, 126℃에서 5분간 레토르트 진행 결과 제품 내 BCAA 입자로 추정되는 흰 입자 부유물을 확인하였으며 이는 제품 내 물성안정성을 낮추는 것으로 보임
- ② 리포솜 분말을 0.5% 사용하였음에도 불구하고 리포솜 분말을 용해시켰을 때의 투명도가 좋지 않아 클리어 타입 음료 제품으로 출시되기 어려울 것으로 판단됨
- ③ 추가 실험을 통해 리포솜 분말의 함량을 0.1%까지 낮추어도 투명도가 낮음을 확인하였으며 0.1%의 리포솜 함량으로는 BCAA의 기능성을 소구하기 어려울 것으로 판단됨. 따라서 클리어 타입 음료로의 제품 적용은 추가 실험이 필요함

(마) PROTO-TYPE 개발3(BCAA 영양푸딩)

- 개발 방향

- 간식용 반고형 타입의 1차년도 개발 제품을 개선한 것으로 리포솜 분말(비정제, B) 함유.
- 요양병원, 요양원, 재가환자를 대상으로 한국인이 좋아하는 파인애플 맛 푸딩 제품 개발.
- 캔디류 식품 유형.

- 개발 방법

- Lab test 후 생산 라인 적용 실험생산 실시(400kg/1batch).
- 리포솜 분말(비정제, B)을 1.5% 함유하도록 하여 다음과 같은 제조공정도(Fig 24.)순서에 따라 제품 생산 진행.
- 사용 원료는 리포솜 분말(비정제, B) 외 정백당, 돈피콜라겐, 말토덱스트린 등이 사용되었으며, 사용된 배합비는 Table 4-53와 같음.
- 





Figure 4-60. 푸딩 배합라인.



Figure 4-61. 충전, 포장라인.

① 실험생산 배합비

Table 4-53. BCAA 영양푸딩 배합비

No	원료명	비율(%)
1	리포솜 분말(비정제, B)	1.5
2	정백당	*.**
3	썬크리머	*.**
4	돈피콜라겐	*.**
5	저감미당	*.**
6	말토덱스트린	*.**
7	딸기농축액	*.**
8	유단백가수분해물	*.**
9	치커리식이섬유	*.**
10	검믹스	*.**
11	미네랄프리믹스	*.**
12	구연산	*.**
13	비타민C	*.**
14	구연산나트륨	*.**
15	향(사과,파인애플,망고)	*.**
16	비타민프리믹스	*.**
17	구연산칼륨	*.**
18	사과산	*.**
19	요쿠르트향	*.**
20	레드칼라	*.**
21	정제수	*.**

- 제조 공정 중 용해, 분산 및 침전 양호 확인
- 공정 중 특이사항 없음
- 파인애플 맛 푸딩 실험생산 완료



Figure 4-62. BCAA 영양푸딩 Proto-type 제품.

② 공정도



Figure 4-63. BCAA 영양푸딩 제조공정도.

- 개발 결과
  - 살균 확인

Table 4-54. BCAA 영양푸딩의 미생물 기준규격

검사 항목		제품 규격	비고
미생물학적 기준	자가 기준	진균수 1g 당 10 이하 (10개 제품 중 3개 이하, 3EA*10이하)	생산 Lot. 별 자가분석 실시 (실험시 10개 샘플을 취한다) (진균 테스트는 상부 5ml, 10g 채취 실험)
	법적 기준	일반세균(cfu/ml)	1 ml당 100 이하
		대장균군(cfu/ml)	음성
		바실러스 세레우스(cfu/ml)	1g 당 100 이하
			생산 Lot. 별 자가분석 실시
			월 1회 공인기관 의뢰



① 미생물 검사 확인

Table 4-55. BCAA 영양푸딩[초(A), 중(B), 말(C)] 각 10EA 샘플의 미생물 확인

Lot	일반세균 10 <sup>-1</sup>	일반세균 10 <sup>-3</sup>	진균 10 <sup>-1</sup>	진균 10 <sup>-3</sup>
A-1	NA	NA	NA	NA
A-2	NA	NA	NA	NA
A-3	NA	NA	NA	NA
A-4	NA	NA	NA	NA
A-5	NA	NA	NA	NA
A-6	1	NA	NA	NA
A-7	NA	NA	NA	NA
A-8	NA	NA	NA	NA
A-9	1	NA	NA	NA
A-10	NA	NA	NA	NA
B-1	NA	NA	NA	NA
B-2	NA	NA	NA	NA
B-3	NA	NA	NA	NA
B-4	1	NA	NA	NA
B-5	NA	NA	NA	NA
B-6	NA	NA	NA	NA
B-7	NA	NA	NA	NA
B-8	1	NA	NA	NA
B-9	NA	NA	NA	NA
B-10	NA	NA	NA	NA
C-1	NA	NA	NA	NA
C-2	NA	NA	NA	NA
C-3	NA	NA	NA	NA
C-4	NA	NA	NA	NA
C-5	NA	NA	NA	NA
C-6	NA	NA	NA	NA
C-7	1	NA	NA	NA
C-8	NA	NA	NA	NA
C-9	NA	NA	NA	NA
C-10	NA	NA	NA	NA

- 뉴케어 푸딩 제품의 경우 레토르트 공정이 불가하므로 제품의 pH를 4.5이하(산성)으로 제조하여 일반미생물을 차단 할 수 있도록 개발.
- 미생물학적 법적기준으로 일반세균(10<sup>2</sup>/mL 이하), 대장균군(음성), 바실러스 세레우스(10<sup>2</sup>/g이하)로 규정하고 있음. 하지만 산성 제품의 경우 진균(곰팡이)에 취약할 수 있으므로 자가규격으로 진균(10/g 이하로 규정)검사를 동시에 진행.
- 일반세균은 각 생산 lot별 3반복씩 진행하였으며, 검출된 lot의 경우 1 CFU/mL로서 법적규격 10<sup>2</sup>/mL 이하를 만족시킴. 진균류의 경우 모두 음성, 제품의 pH는 4.28로 미생물 안정성을 확인하였음.

- 색차 확인

Table 4-56. BCAA 영양푸딩의 Lot별 색차 비교

Lot. \ 색차 값	L	a	b
A-1	27.96	-1.98	13.20
A-2	28.01	-2.00	13.11
A-3	28.11	-1.88	13.25
B-1	27.85	-1.90	13.17
B-2	27.98	-2.05	13.30
B-3	28.05	-2.10	13.15
C-1	27.80	-1.85	13.14
C-2	28.15	-1.95	13.02
C-3	27.77	-1.92	13.22
평균	27.96	-1.96	13.17

(L : + White~Black, a : + Red~Green, b : + Yellow~Blue)

Table 4-57. BCAA 영양푸딩의 보존 온도별 보존 일수에 따른 brix, pH, 색차 비교

항목	brix	pH	색차				
			brix	pH	L	a	b
보존 온도	보존 일수	%	mV	L	a	b	△*ab
45℃	0	29.30	4.28	27.90	-2.00	13.15	
	2	29.55	4.28	27.65	-1.75	13.30	0.29
	4	29.65	4.28	27.58	-0.95	13.85	1.26
	6	29.45	4.28	27.40	-0.32	14.05	1.91
	8	29.35	4.27	24.80	1.15	15.53	3.95
	10	29.38	4.27	23.55	1.50	17.95	5.94
55℃	0	29.12	4.28	27.96	-1.98	13.20	
	2	29.20	4.28	27.75	-1.40	13.55	0.68
	4	29.48	4.27	27.40	-1.10	13.87	1.11
	6	29.61	4.28	27.11	-0.14	14.26	2.12
	8	29.45	4.27	26.50	1.25	16.75	4.80
	10	29.53	4.26	22.84	1.86	18.87	6.85

- 유통기한 설정

① 45℃, 55℃ 가혹보존 실험결과 제품의 관능평가 및 색도 측정치를 근거로 하여 BCAA 푸딩의 유통기한을 상온 10개월로 산정함

Table 4-58. BCAA 영양푸딩의 45℃ 및 55℃ 가혹 보존실험 결과

항 목		색도 (L값)	관능 여부	항 목		색도 (L값)	관능 여부
보존 온도	보존 일수			보존 온도	보존 일수		
45℃	0	27.900	○	55℃	0	27.960	○
	2	27.650	○		2	27.750	○
	4	27.580	○		4	27.400	○
	6	27.400	○		6	27.110	○
	8	24.800	×		8	26.500	○
	10	23.550	×		10	22.840	×

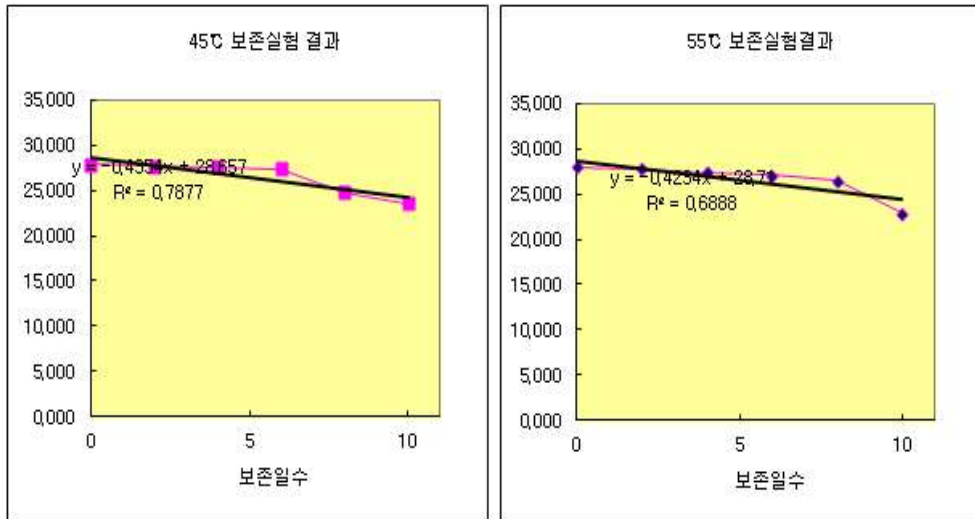


Figure 4-64. BCAA 영양푸딩의 45°C 및 55°C 가혹 보존실험 결과 그래프.

**가. 1차 반응으로 간주하여 보존기간 계산**

1. D-Value :  $\log(N_0/N_m) = (T_m - T_0) / DT$

D45 = 1273.2949

D55 = 429.34499

2. Z-Value :  $\log(D_{55}/D_{45}) = (45 - 55) / Z$

Z = 21.18094

3. Q10 Value =  $10^{10/Z} = 2.9656684$

4. 55°C 보존실험 결과 상온(25°C) 보존일수

= 55°C 보존일수 × Q10<sup>r</sup> [ r =  $\Delta T/10 = (45 - 25)/10$  ]

= 302.92594 일 (약 10.09753 개월)

- 관능평가(푸딩)

① 관능평가 실시

- 관능 기관: 자사 청정원 리서치팀
- 평가 샘플: BCAA 영양푸딩(파인애플), 경쟁사(파인애플)
- 조사 대상: 40~50대 61명(남자:21명, 여자:40명)
- 검사 일시: 2015년 7월 6일
- 검사 장소: 대상주식회사 신설동 대강당(서울시 신설동)
- 시료 준비: 샘플 수령 후 상온 보관 및 제시
- 조사 방법: Blind test, Paired comparison test, Sequential monadic test
- 시료 제시: 인당 푸딩 각 한 개씩 제시
- 척도: 7점 척도

### ② 관능평가지 작성

**BCAA영양푸딩 제품 관능 검사**

(성별 :                   )                   (나이 :                   )

본 제품은 혈행개선 면역력 개선을 도와주는 마르기닌 5g을 함유한 기능성 식품입니다.  
해당 제품의 용량은 30mL 으로 하루 1회 섭취 기준으로 제조 되었습니다.

■ 정도 :  
 ① 매우 약하다 ② 약한 편이다 ③ 조금 약하다 ④ 보통이다 ⑤ 조금 강하다 ⑥ 강한편이다  
 ⑦ 매우 강하다

■ 기호도 :  
 ① 매우 나쁘다 ② 나쁜 편이다 ③ 조금 나쁘다 ④ 보통이다 ⑤ 조금 좋다 ⑥ 좋은 편이다  
 ⑦ 매우 좋다

\*식후 30분 후 물과 함께 복용 하여 주세요.

항목			
향 기호도			
단맛	정도		
	기호도		
신맛	정도		
	기호도		
비릿한맛	정도		
	기호도		
후미(뒷맛) 기호도			
목 넘김 기호도			
전체적 기호도			

• 제품을 구입할 의향이 있으십니까? 예 ( ) 아니오( )

구입을 하신다면 이유는 무엇입니까?

- 1 -

Figure 4-65. BCAA 영양푸딩 관능평가지.

### ③ 관능평가 결과

#### · 기호도 결과

Table 4-59. 관능평가 결과 요약

제품	전체적 기호도	선호도 <sup>1)</sup>	기호도 (점수가 높을수록 좋음)				적당도 <sup>2)</sup> (4점에 가까울수록 좋음)	
			외관	맛	목넘김	뒷맛	색상	단맛
경쟁사	4.0* (57점)	58%* (32명)	4.1*	4.1*	4.6*	4.0*	3.9* [4=적당]	4.4 [4<강함]
BCAA 영양푸딩	3.3* (47점)	42%* (23명)	3.4*	3.4*	3.7*	3.3*	4.1* [4=적당]	4.2 [4<강함]
유의수준 $\alpha=0.05$ 기준	0,000 차이있음	0,000 차이있음	0,000 차이있음	0,000 차이있음	0,000 차이있음	0,000 차이있음	0,047 차이있음	0,064 차이없음

- ▶ 선호도1) : 선호하는 시료가 없다고 응답한 비율은 10%
- ▶ 적당도2) : 각 속성이 적당한 정도에 해당되면 [4=적당]으로 표시, 그러나 평균이 4.0보다 유의적( $\alpha=0.05$ )으로 크면 [4<강함], 작으면 [4>약함]으로 표시함.
- ▶ 유의수준 0.05에서 유의한 차이가 있음을 나타내는 표시: \*

· 구매 의사

	인원 수(명)
구매	11
비구매	44
무응답	6

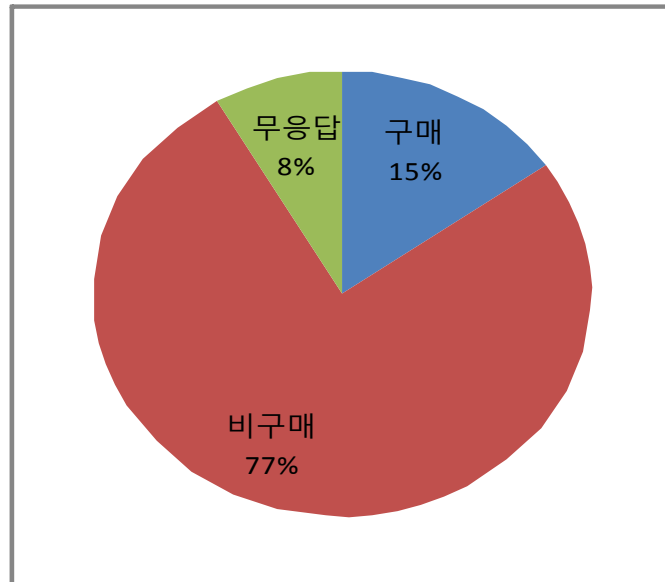


Figure 4-66. BCAA 영양푸딩 제품 관능검사 결과 구매 의사도.

- 영양성분 결과

① 유리아미노산 함량 분석 결과, 로이신(737.20 mg/100 g), 이소로이신(393.88 mg/100 g), 발린(358.07 mg/100 g) 함유


제 D2015072211 호			
검 사 성 적 서			
검체명	BCAA아미노산젤리	제조일자 (유통기한)	2015-07-28
의뢰인	업체명	대상(주)	
	주 소	서울 동대문구 천호대로 26 (신설동)	
	성 명	명형섭	
제조번호		접수년월일	2015-07-31
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2015072211
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. <span style="float: right;">검사관련 총 책임자:김 천 희</span>			
시험항목	결과	검사담당자	
열량(Kcal/100g)	115.40Kcal/100g	한아름	
탄수화물(%)	20.70%	한아름	
조단백질(%)	7.52%	이정민	
조지방(%)	0.28%	이선경	
나트륨(mg/100g)	30.51mg/100g	김세미	
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(mg/g)	172.86mg/g	김혜윤	
포화지방산(g/100g)	불검출	김은지	
트랜스지방산(g/100g)	불검출	김은지	
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	이현아	
L-발린(mg/100g)	358.07mg/100g	이주영	
L-로이신(mg/100g)	737.20mg/100g	이주영	
L-이소로이신(mg/100g)	393.88mg/100g	이주영	
2015 년 8 월 13 일 한국기능식품연구원 			
<small>(사)한국건강기능식품협회 부원 한국기능식품연구원 <a href="http://www.khsl.re.kr">http://www.khsl.re.kr</a> 전화번호 031)628-2000 FAX(031)628-0400-1</small>			

Figure 4-67. BCAA 영양푸딩 영양성분 공인기관 성적서.

• 고찰

① 관능 평가 결과 경쟁사 제품과 자사제품(리포솜 함유 푸딩)간 큰 차이는 보이지 않았으나, 전체적 기호도 및 세부 항목에서 모두 낮음을 확인함. 작년도의 경우

용해되지 않는 BCAA를 그대로 사용하였으나, 당해 연도의 경우 BCAA-붕입 리포솜 분말을 사용하여 쓴맛을 일부 마스킹 함으로써 관능이 다소 개선된 것으로 보임

② 하지만 제품에 사용된 리포솜 분말은 붕입률 약 20%정도의 비정제 분말이므로 쓴맛과 텁텁한 맛을 완전히 마스킹하기에는 아직 부족한 것으로 판단됨

③ 향후 리포솜의 BCAA 붕입률을 높이는 것을 목표로 추가 연구가 필요할 것으로 보임

(바) PROTO-TYPE 개발2(BCAA 뉴케어 검은깨맛)

- 개발 방향
  - 환자의 면역 증강을 위해 분지아미노산-붕입 리포솜 분말(비정제, B)첨가 후 제품 개발 진행.
  - 기존 뉴케어 검은깨맛 제품에 적용 테스트 실시.
  - 제품 개발 완료 후 유효 안정성 확인 및 관능 평가 실시.
- 개발 방법
  - LAB TEST 후 생산 라인 적용 실험생산 실시(1,500 kg/1 batch).
  - 리포솜 분말(비정제, B)을 0.5% 함유하도록 하여 다음과 같은 제조공정도(Figure 82)순서에 따라 제품 생산 진행.
  - 사용원료 및 비율은 배합비에 명시되어 있으며, 자사 뉴케어 검은깨맛 대비 당 함량 및 검은깨페이스트 함량을 증가시켜 제품 개발을 진행함.



Figure 4-68. 뉴케어 PILOT(50kg/1batch).



Figure 4-69. 뉴케어 생산라인(10ton/1batch).



① 실험생산 배합비-1

Table 4-60. BCAA 뉴케어 검은깨맛 배합비

No	원료명	비율(%)
1	리포솜 분말(비정제, B)	0.5
2	구연산칼륨	*,**
3	젤란DS	*,**
4	백설탕	*,**
5	카라기난	*,**
6	대두분리단백	*,**
7	채종유	*,**
8	옥수수유	*,**
9	말토덱스트린	*,**
10	미네랄믹스	*,**
11	탄산칼슘	*,**
12	비타민프리믹스	*,**
13	화이버줄	*,**
14	이소말토올리고당	*,**
15	저감미당	*,**
16	검은깨향	*,**
17	검은깨페이스트	*,**
18	윈터멜론티향	*,**
19	염화칼륨	*,**

- 배합 탱크 내 리포솜 분말(비정제, B) 비잔존 확인(Figure 81)
- 1차 균질(150 bar) 후 2차 균질(400 bar) 진행
- UHT실시(1차:95°C/60sec, 2차:136°C/30sec)
- UHT 완료 후 126°C, 7분간 레토르트 실시



Figure 4-70. 배합탱크 내부 사진.



Figure 4-71. BCAA 뉴케어 검은깨맛 Proto-type 제품.

② 공정도

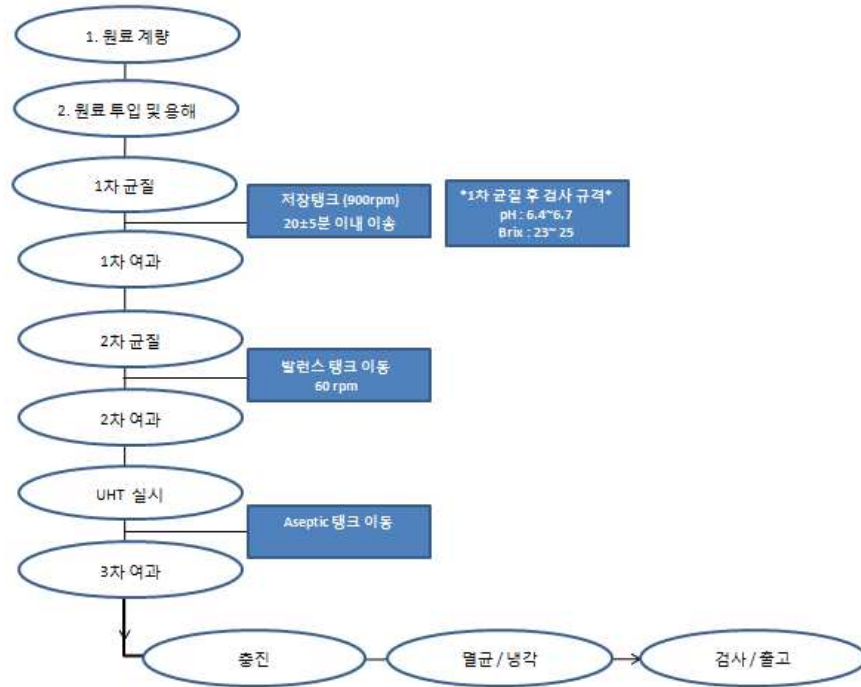


Figure 4-72. BCAA 뉴케어 검은깨맛 제조공정도.

- 개발 결과
  - 보존성 검증
- ① 레토르트 결과
  - 126°C, 7분 공정
  - F<sub>0</sub> value : 20.56

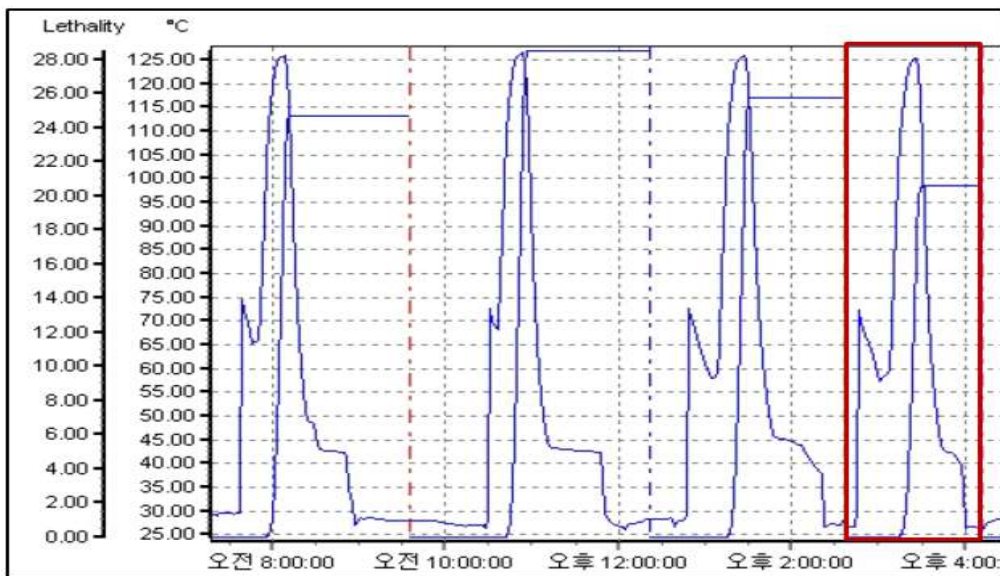


Figure 4-73. BCAA 뉴케어 검은깨맛 126°C, 7분으로 살균 시 F<sub>0</sub> value 측정 결과.

· 미생물 안정성 확보를 위해 자사는 F<sub>0</sub> value를 121℃ 구간에서 10 이상으로 설정하고 있음.

(센서위치: 상단 중앙). 본 배합비에 따라 126℃, 7분간 레토르트를 거친 제품의 F<sub>0</sub> value는 20.56으로서 자사 규격을 만족시킴을 확인.

② 미생물 검사 확인

· 조건: 126℃, 7분 공정

· 미생물학적 안정성을 확보하고자 일반세균, 내열성세균 및 발육고온균 검사를 식품공전법에 따라 진행하였으며 그 결과는 다음과 같음.

: 일반세균: 1제품 10 CFU/mL(생산lot별 5개 샘플x3반복 진행)

: 내열성세균: 불검출(생산lot별 5개 샘플x3반복 진행)

: 발육고온균: 불검출 (생산lot별 3개 샘플x5반복 진행)

· 일부 제품에서 일반세균이 검출되었으나 반복 실험 결과, 제품 내 미생물 잔존이 아닌 실험기기 및 외부환경으로 인한 오염으로 판단됨.

Table 4-61. BCAA 뉴케어 검은깨맛 126℃, 7분에서의 일반세균, 내열성세균 사멸 효과

Lot	일반세균10 <sup>-1</sup>	일반세균10 <sup>-3</sup>	내열성세균10 <sup>-1</sup>	내열성세균10 <sup>-3</sup>
B1-1-1	ND	ND	ND	ND
B1-1-2	ND	ND	ND	ND
B1-1-3	ND	ND	ND	ND
B1-2-1	ND	ND	ND	ND
B1-2-2	ND	ND	ND	ND
B1-2-3	ND	ND	ND	ND
B1-3-1	ND	ND	ND	ND
B1-3-2	ND	ND	ND	ND
B1-3-3	ND	ND	ND	ND
B1-4-1	ND	ND	ND	ND
B1-4-2	ND	ND	ND	ND
B1-4-3	ND	ND	ND	ND
B1-5-1	ND	ND	ND	ND
B1-5-2	ND	ND	ND	ND
B1-5-3	ND	ND	ND	ND

Lot	일반세균 $10^{-1}$	일반세균 $10^{-3}$	내열성세균 $10^{-1}$	내열성세균 $10^{-3}$
A1-1-1	ND	ND	ND	ND
A1-1-2	ND	ND	ND	ND
A1-1-3	1	ND	ND	ND
A1-2-1	ND	ND	ND	ND
A1-2-2	ND	ND	ND	ND
A1-2-3	ND	ND	ND	ND
A1-3-1	ND	ND	ND	ND
A1-3-2	ND	ND	ND	ND
A1-3-3	ND	ND	ND	ND
A1-4-1	ND	ND	ND	ND
A1-4-2	ND	ND	ND	ND
A1-4-3	ND	ND	ND	ND
A1-5-1	ND	ND	ND	ND
A1-5-2	ND	ND	ND	ND
A1-5-3	ND	ND	ND	ND

Table 4-62. BCAA 뉴케어 검은깨맛 126℃, 7분에서의 발육고온균 사멸 효과

Lot	일반세균 $10^{-1}$	일반세균 $10^{-3}$	내열성세균 $10^{-1}$	내열성세균 $10^{-3}$
B1-1-1	ND	ND	ND	ND
B1-1-2	ND	ND	ND	ND
B1-1-3	ND	ND	ND	ND
B1-2-1	ND	ND	ND	ND
B1-2-2	ND	ND	ND	ND
B1-2-3	ND	ND	ND	ND
B1-3-1	ND	ND	ND	ND
B1-3-2	ND	ND	ND	ND
B1-3-3	ND	ND	ND	ND
B1-4-1	ND	ND	ND	ND
B1-4-2	ND	ND	ND	ND
B1-4-3	ND	ND	ND	ND
B1-5-1	ND	ND	ND	ND
B1-5-2	ND	ND	ND	ND
B1-5-3	ND	ND	ND	ND

Lot	발육고온균 $10^{-2}$	Lot	발육고온균 $10^{-2}$
A1-1-1	ND	B1-1-1	ND
A1-1-2	ND	B1-1-2	ND
A1-1-3	ND	B1-1-3	ND
A1-1-4	ND	B1-1-4	ND
A1-1-5	ND	B1-1-5	ND
A1-2-1	ND	B1-2-1	ND
A1-2-2	ND	B1-2-2	ND
A1-2-3	ND	B1-2-3	ND
A1-2-4	ND	B1-2-4	ND
A1-2-5	ND	B1-2-5	ND
A1-3-1	ND	B1-3-1	ND
A1-3-2	ND	B1-3-2	ND
A1-3-3	ND	B1-3-3	ND
A1-3-4	ND	B1-3-4	ND
A1-3-5	ND	B1-3-5	ND

③ 점도 측정

Table 4-63. BCAA 뉴케어 검은깨맛 점도 측정 결과

Spindle	Speed(RPM)	Temperature(°C)	Run
RV-02	100	25	0:00:20
<b>*위의 조건에서 측정 결과*</b>			
Temperature(°C)	Viscosity(cP)	Torque(%)	
24.5	53.2	38	

- 물성 확인을 위해 점도 측정(조건: 24~25°C, RV-02 spindle, 100 rpm)
- 본 연구에서 개발한 리포솜 함유 뉴케어 검은깨맛 음료의 경우 환자 및 일반인도 영양보충을 위해 경구식으로 섭취 가능한 음료로서 제품의 물성 특성 중 점도는 중요한 요소 중 하나임.
- 자사 규격으로 점도를 65 cP 이하로 설정하고 있으며 본 제품의 경우 점도가 53.2 cP로서 자사 규격을 만족시킴을 확인함.

④ 유화분석 결과 : Delta Backscattering

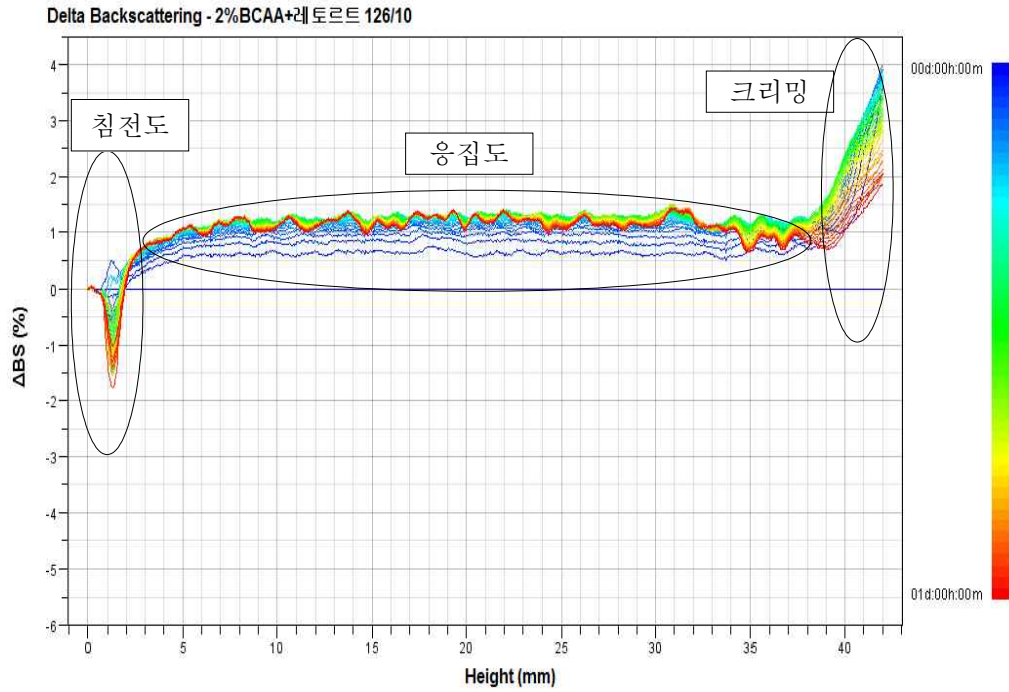


Figure 4-74. 1차년도 개발 제품(2% BCAA 함유 뉴케어)의 유화분석 결과.

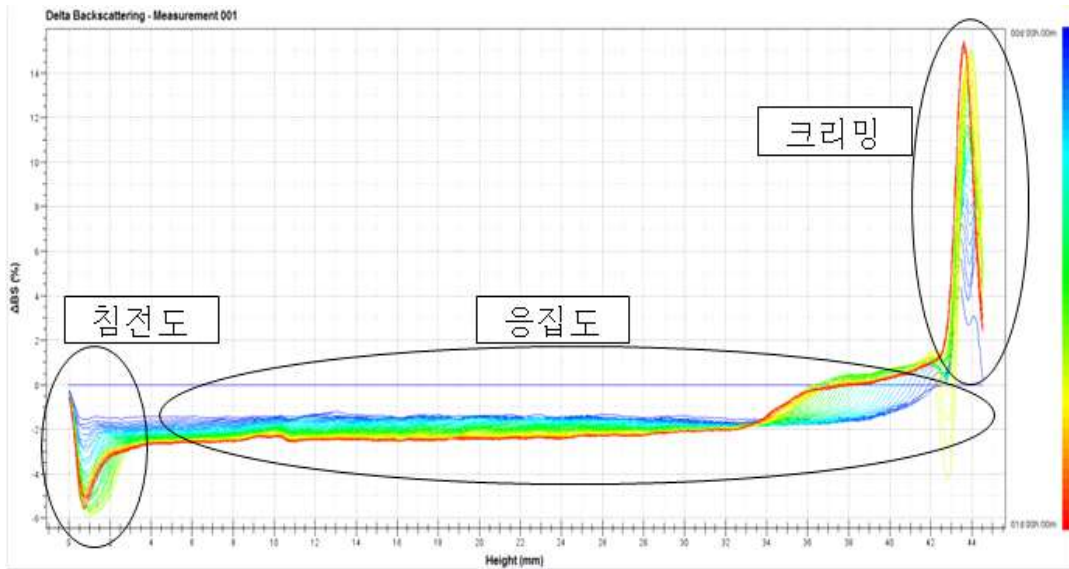


Figure 4-75. 2차년도 개발 제품(BCAA 뉴케어 검은깨맛)의 유화분석 결과.

- 1차 년도 대비, 2차 년도 리포좀 분말(비정제, B)을 첨가한 제품의 경우 응집 현상이 다소 개선되었으나, 침전 및 크리밍 현상은 여전히 발생
- : 유화안정성 개선을 위한 추가 연구가 필요



Figure 4-76. 레토르트 후 BCAA 뉴케어 검은깨맛의 메시망 통과 직후 사진(왼쪽) 및 메스실린더 10일간 보관 후 사진(오른쪽).

- 레토르트(126°C, 7분)후 제품의 크리밍 및 침전현상이 심해지는 것으로 판단되며 유화가 불안정함을 확인(Figure 4-76).
- 레토르트 후 위의 그림(왼쪽)과 같이 입자간 뭉침 현상을 확인

⑤ 색차확인

Table 4-64. BCAA 뉴케어 검은깨맛의 보존 온도별 보존 일수에 따른 brix, pH, 점도, 색차 비교

항목		brix	pH	점도	색차			
보존 온도	보존 일수	%	mV	cP	L	a	b	△*ab
45°C	0	24.87	6.5	54.4	56.48	3.44	13.91	
	4	24.81	6.48	55.5	56.90	3.85	15.25	1.40
	8	24.90	6.42	57.4	56.10	4.15	15.58	1.81
	12	24.88	6.40	58.2	56.28	4.38	15.80	2.11
	14	24.87	6.41	59.1	56.55	4.48	16.08	2.41
55°C	0	24.87	6.5	54.4	56.48	3.44	13.91	
	4	24.82	6.44	56.4	57.7	3.99	15.39	1.58
	8	24.91	6.36	58	55.97	4.28	15.77	2.04
	12	24.89	6.38	63.2	56.38	4.54	16.04	2.40
	14	24.88	6.41	59.6	56.54	4.6	16.24	2.60



- 유통기한 설정

① 45°C, 55°C 가혹보존 실험결과 제품의 관능평가 및 색도 측정치를 근거로 하여 BCAA 뉴케어 검은깨맛 음료의 유통기한을 상온 6개월로 산정함.

② 이는 일반적인 뉴케어 제품의 유통기한인 상온 12개월보다 낮은 수치임.

Table 4-65. BCAA 뉴케어 검은깨맛의 45°C 및 55°C 가혹 보존실험 결과

항 목		색도 (L값)	관능 여부	항 목		색도 (L값)	관능 여부
보존 온도	보존 일수			보존 온도	보존 일수		
45°C	0	56.480	○	55°C	0	56.480	○
	4	56.350	○		4	56.300	○
	8	56.310	○		8	55.970	○
	12	56.280	○		12	52.540	x
	14	54.100	x		14	52.380	x

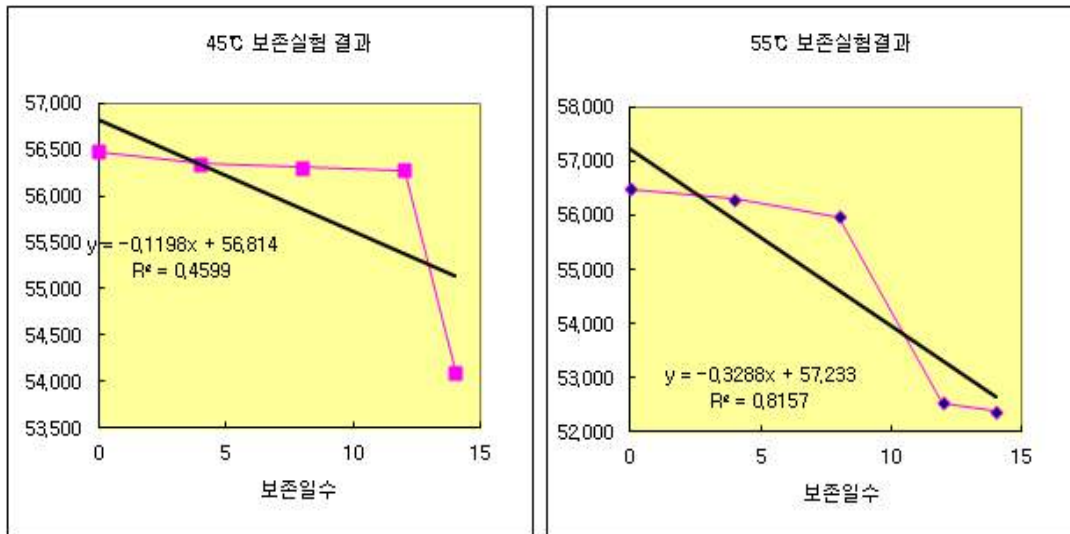


Figure 4-77. BCAA 뉴케어 검은깨맛의 45°C 및 55°C 가혹 보존실험 결과 그래프

가. 1차 반응으로 간주하여 보존기간 계산

1. D-Value :  $\log(N_0/N_m) = (T_m - T_0) / DT$   
 $D_{45} = 9087.3728$   
 $D_{55} = 3553.8577$

2. Z-Value :  $\log(D_{55}/D_{45}) = (45 - 55) / Z$   
 $Z = 24.525535$

3. Q10 Value =  $10^{10/Z} = 2.5570446$

4. 55°C 보존실험 결과 상온(25°C) 보존일수  
 $= 55^\circ\text{C}$  보존일수  $\times$  Q10<sup>r</sup> [  $r = \Delta T / 10 = (45 - 25) / 10$  ]  
 $= 209.11047$  일 (약 6.970349 개월)

- 관능평가

① 관능평가 실시

- 관능평가 전문기관 센소메트릭스 주식회사 의뢰
- 평가 샘플: 경쟁사(검은깨맛), 자사제품(뉴케어검은깨맛), BCAA 뉴케어 검은깨맛
- 조사 대상: 65세 이상
- 검사 일시: 2015년 7월 7일
- 검사 장소:(주)센소메트릭스 관능평가 센터(서울특별시 영등포구)
- 시료 준비: 상온 보관 후 제공
- 평가 인원: 33명(남자:13, 여자:20)
- 평가 시간: 14:00, 16:00
- 척도: 9점 척도

② 관능평가지 작성

**경험용표**

성별: [ ]남 [ ]여 / 나이: 만 \_\_\_\_\_ 세 / 이름: \_\_\_\_\_ / 번호 \_\_\_\_\_

본 설문은 **센소메트릭스**의 전향적인 목표로 인한 행사로, **[음료의 맛]에 대하여 평가**를 주시길 바랍니다.

추정된 내용은 향후 보다 나은 상품 개발을 제공하는 데 소중한 자료로 사용될 것입니다. 설문지 모든 응답은 정당이 없으며, 추정 내용은 단지 통계자료로만 활용하여 될 것입니다.

< 설문 진행 순서 및 주의 사항 >

- 1) 음차 할때 **물론 입안을 헹구고 시원하**게 하시길 바랍니다.
- 2) 정서적 **충격**을 유발할 수 있는 **비밀** 정보가 유출될 수 있으므로, **음료의 맛을**, **복합선 질문에 대해대로 응답**해 주시기 바랍니다.

▶ **조사 목적** 브랜

- [복합선 질문은 올바른 정보를 얻는 목적과 [복합선 질문을 얻는 목적]을 구분해 드립니다.
- [올바른 정보를 얻는 목적]에 **복합선 질문에 대한 답은 오로지 오로지** **올바른 정보**를 얻기 위함입니다.
- [복합선 질문을 얻는 목적]에 **복합선 질문으로 갈수록 정확하고, 오로지 오로지 갈수록 정확하며, 가운데는 보통 정도(예기)입니다.**

- 3) 복호 코드 시 **앞에 번호**와 **뒷부분**을 나누어 **미시**고 복호를 **확인**해 주시기 바랍니다.

본 설문지 중의 주셔서 대단히 감사드립니다. ♥

제품번호: **146.**

▶ 전체적으로 평가하는 질문입니다..

**1. 전체적으로 평가할 때 이 음료는 얼마나 마음에 드세요?..**  
(전체적인 색상, 향, 맛, 입안 느낌, 뒷맛 포함)

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 싫다	매우 좋다	보통 싫다	보통 좋다	매우 싫다	매우 좋다	매우 싫다	매우 좋다

▶ 향으로 보고 평가하는 질문입니다..

**2. 향으로만 볼 때 이 음료는 얼마나 마음에 드세요? (색상 등)**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 싫다	매우 좋다	보통 싫다	보통 좋다	매우 싫다	매우 좋다	매우 싫다	매우 좋다

---

**2.1. 색상의 강판 정도는 어떠한가요?**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다	약하다	보통이다	강하다	매우 강하다	매우 약하다	약하다	매우 강하다

**2.2. (\*)색상이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?..**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다	약하다	보통이다	강하다	매우 강하다	매우 약하다	약하다	매우 강하다

▶ 향을 맡으며 (향) 평가하는 질문입니다..

**3. 향으로만 평가할 때 이 음료를 어느 정도 좋아하십니까?**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 싫다	매우 좋다	보통 싫다	보통 좋다	매우 싫다	매우 좋다	매우 싫다	매우 좋다

제품번호: **146.**

▶ 마시면서 (맛) 평가하는 질문입니다...

**4. 맛으로 만 평가할 때 이 음료를 어느 정도 좋아하십니까?**

미안히 싫다      싫다      좋지도      좋아      미안히 좋아

-----

**4.1. 단맛의 강함 정도는 어때요?**

매우 약하다      약하다      보통이다      강하다      매우 강하다

**4.2. (\*) 단맛이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?.**

매우 약하면 좋겠다      약하면 좋겠다      보통이면 좋겠다      강하면 좋겠다      매우 강하면 좋겠다

-----

**4.3. 구수함의 강함 정도는 어때요?**

매우 약하다      약하다      보통이다      강하다      매우 강하다

**4.4. (\*) 구수함이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?.**

매우 약하면 좋겠다      약하면 좋겠다      보통이면 좋겠다      강하면 좋겠다      매우 강하면 좋겠다

제품번호: **146.**

▶ 마시면서 (심감) 평가하는 질문입니다...

**5. 입안에서의 느낌(맛 제외)만으로 평가할 때 이 음료를 어느 정도 좋아하십니까?**

미안히 싫다      싫다      좋지도 싫다      좋아      미안히 좋아

-----

**5.1. 텁텁함의 강함 정도는 어때요?**

매우 약하다      약하다      보통이다      강하다      매우 강하다

**5.2. (\*) 텁텁함이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?.**

매우 약하면 좋겠다      약하면 좋겠다      보통이면 좋겠다      강하면 좋겠다      매우 강하면 좋겠다

제품번호: **146.**

▶ 먹고(삼키고) 나서 평가하는 질문입니다...

**6. 마시고 난 후의 뒷맛으로 평가할 때 이 음료를 어느 정도 좋아하십니까?**

미안히 싫다      싫다      좋지도 싫다      좋아      미안히 좋아

-----

**6.1. 짝짝함 정도는 어때요?**

매우 짝짝하다      짝짝하다      보통이다      짝짝하다      매우 짝짝하다

**6.2. (\*) 짝짝한 정도가 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?.**

매우 짝짝하면 좋겠다      짝짝하면 좋겠다      보통이면 좋겠다      짝짝하면 좋겠다      매우 짝짝하면 좋겠다

Figure 4-78. BCAA 뉴케어 검은깨맛의 관능평가지.

③ 관능평가 결과

Table 4-66. BCAA 뉴케어 검은깨맛의 종합 선호 및 기호

제품명	종합 선호		종합 기호		종합 판정
	순위합	평균 (9점)	CCI(100점)		
BCAA 뉴케어 검은깨맛	58	6.45	91.6		1
경쟁사 검은깨맛	65	5.94	70.8		
뉴케어 검은깨맛 (자사)	75	5.88	67.6		

=====

◆ 관능품질 지수 분석

◎ 관능품질 수용도 지수(Consumer Acceptability Index: CAI)

[ Cutoff score: CAI > 0.9 ]

CAA 뉴케어 검은깨	경쟁사 검은깨맛	뉴케어 검은깨
1	1	1

◎ 관능품질 선호도 지수(Consumer Preference Index: CPI)

[ Cutoff score: CPI > 0.9 ]

BCAA 뉴케어 검은깨	경쟁사 검은깨맛	뉴케어 검은깨
0.9599	0.6358	0.5000

◎ 관능품질 CCI(Chun & Cho Index: CCI)

[의미: 0~: 확실히부정적, 10~:상당히부정적, 20~:대체로부정적, 30~:다소부정적, 40~:약간부정적, 50~:약간긍정적, 60~:다소긍정적, 70~:대체로긍정적, 80~:상당히긍정적, 90~: 확실히 긍정적

BCAA 뉴케어 검은깨	경쟁사 검은깨맛	뉴케어 검은깨
91.6	70.8	67.6

### Chun & Cho Index (CCI) : BCAA 뉴케어 검은깨맛

CCI (phobia) : 91.6 (0)

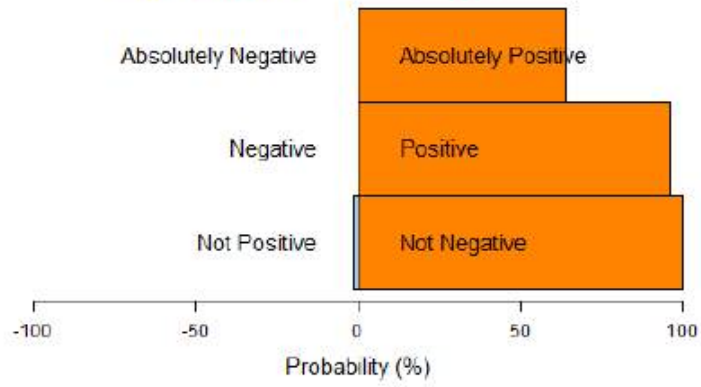


Figure 4-79. BCAA 뉴케어 검은깨맛의 관능 품질 선호도.

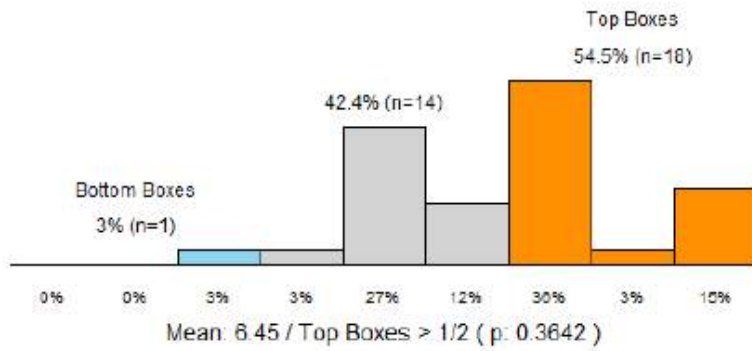


Figure 4-80. BCAA 뉴케어 검은깨맛의 세부 종합기호 분석.

### 세부 종합기호 CCI: BCAA 뉴케어 검은깨맛

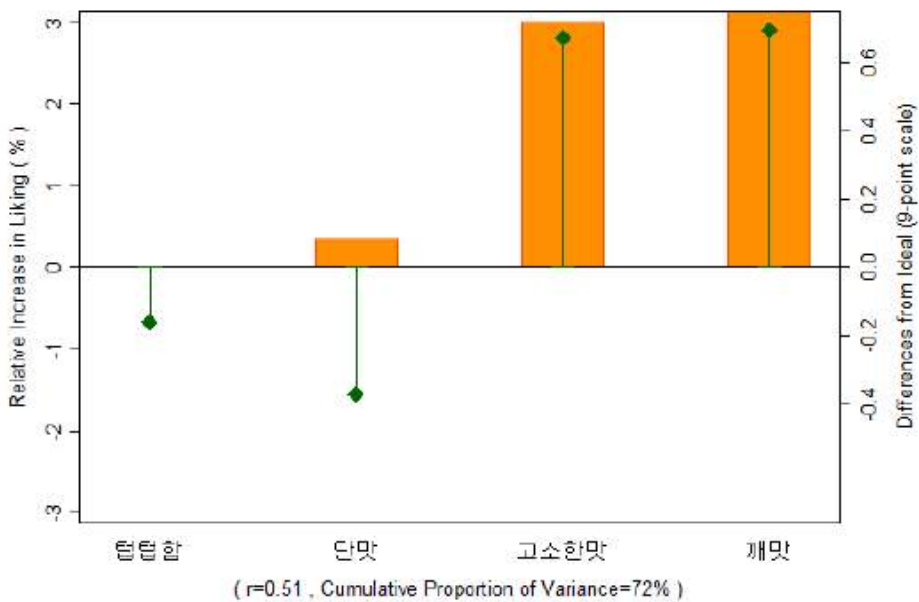


Figure 4-81. BCAA 뉴케어 검은깨맛의 주요 특성 개선점 분석.

#### ◆ 주요특성 개선점 분석 (Ideal Profile Method: IPM)

◎ 주요 특성의 기호도에 대한 영향력 분석

### 관능품질 개선방향 : BCAA 뉴케어 검은깨맛



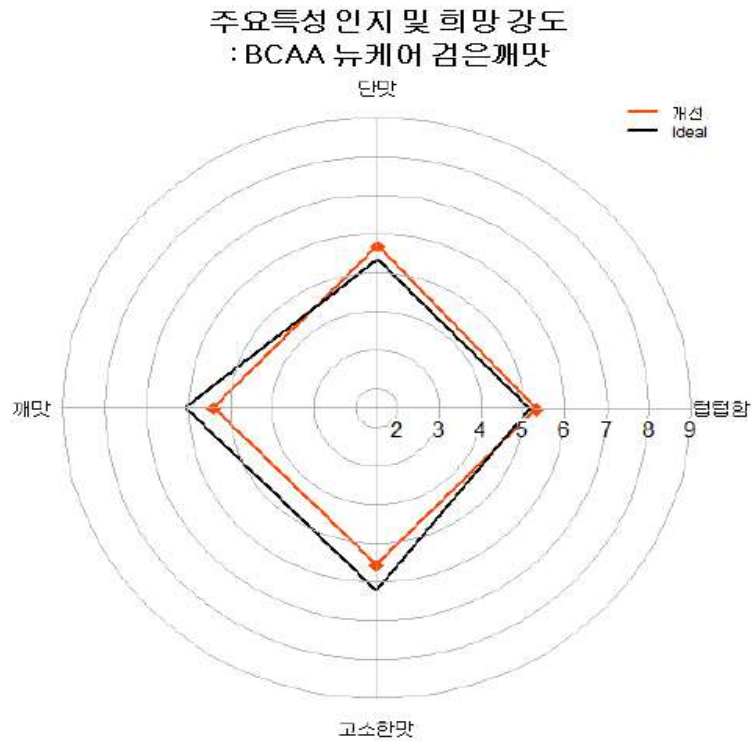


Figure 4-82. BCAA 뉴케어 검은깨맛 의 주요특성 인지 및 희망 강도 분석.

: 관능 평가 결과, 65세 이상 남녀 대상으로 세 제품간 선호/기호 차이는 뚜렷하지 않지만, BCAA 뉴케어 검은깨맛 음료 제품이 타 제품에 비해 경쟁력이 있고(CPI>0.9), 두 단계 높은 긍정수준을 보여 경쟁우위에 있는 것으로 판단됨  
: 60대 보다는 70대에서 BCAA 뉴케어 검은깨맛 음료 제품에 대한 종합 기호가 다른 제품들에 비해 상대적으로 높게 관찰되어 참조할 필요가 있음

- 영양성분 결과

- ① 유리아미노산 함량 분석 결과, 로이신(2.53 mg/g), 이소로이신(1.14 mg/g), 발린(1.24 mg/g) 함유

제 2019090874 호			
검 사 성 격 서			
신청명	BCAA 뉴케어검은깨맛		제출일자 (유통일자)
비밀번호	업체명	대일(주)	
	주소	경기 수원시 서달면 포곡리 129-4	
	영업	한정업	
제출번호		검수일월일	2019-09-23
검사처의특성	참고용	검체일수인고	2001090874
<p>귀하의 우리 연구원에 검사하신 제품은 다음과 같습니다. 검사결과를 확인하십시오.</p>			
시험항목		결과	검체명
열량(kcal/100g)		89.94kcal/100g	참깨맛
탄수화물(g)		18.27g	참깨맛
지방질(g)		1.24g	참깨맛
단백질(g)		0.28g	참깨맛
나트륨(mg/100g)		27.40mg/100g	참깨맛
당류(포도당, 과당, 자당, 배당, 유당)(mg/g)		18.49mg/g	참깨맛
포름산염(mg/100g)		0.22g/100g	참깨맛
포스포산염(mg/100g)		0.05g/100g	참깨맛
칼슘(mg/100g)		참깨맛	참깨맛
구아니딘(mg/100g)		0.22mg/g	참깨맛
유리아미노산(리시딘)(mg/g)		1.24mg/g	참깨맛
유리아미노산(발린)(mg/g)		1.24mg/g	참깨맛

2019년 09월 23일

한국기초식품연구원



Figure 4-83. BCAA 뉴케어 검은깨맛의 영양성분 공인기관 성적서

• 고찰

- ① 리포솜 함유 뉴케어 검은깨맛 제품의 경우, 생산 공정 중 배합탱크 내 리포솜 분말(비정제, B)이 잔존하지 않았으나, 레토르트 후 침전 및 응집 현상이 발생하며 유화가 불안정한 상태가 됨을 확인함
- ② 이는 봉입률 약 20%정도의 비정제 리포솜 분말을 제품에 적용함으로서 봉입되지 않은 다수의 BCAA가 제품의 유화를 방해하는 것으로 판단됨



- 서울대에서 채택한 Microfluidizer를 이용한 리포솜 제조 시스템과 2차년도 과기대에서 선정된 유화제 3종(Span80, Tween80, Lysolecithin)을 적용하여 Instant BCAA를 제조하였음.
- 유화제에 따라 성상이 위와 같이 다르게 나타났으며, 용해성은 20℃에서 Lysolecithin을 사용한 instant BCAA가 가장 높게 나타났으며, Tween80, Span80순으로 용해성이 낮아지는 것을 확인함.
- 침강 시간 측정 결과(5g/100ml기준), Lysolecithin적용 BCAA가 6.5분으로 가장 빠르게 나타났으며, Tween80, Span80순으로 침강 소요시간이 길어짐을 확인함.
- 위의 결과를 종합하여, Lysolecithin을 Instant BCAA stock 제품 개발에 적용하도록 함.

#### 다. 시제품 개발 및 대량생산 체계 구축

- 개발 방향
  - 반고형 타입의 2차년도 개발제품을 개선한 고령(환)자 대상 영양보충 간식으로 BCAA500mg(개당) 함유하고 있음.
  - 요양병원, 온라인 등을 통해 구입할 수 있으며, 날개로 먹을수 있는 날개형 타입과 병원이나 단체에서 다수에게 저렴하게 제공할 수 있는 판 젤리형의 두 종류 타입으로 개발.
  - 캔디류 식품 유형, 관능 평가 결과를 참고하여 선호도가 높은 망고맛, 복숭아맛 2종류로 제품 개발.
- 개발 방법
  - Lab test후 생산 라인 적용 실험생산 실시.
  - Instant BCAA를 500mg(개당)함유하도록 하여 다음과 같은 제조공정도(Fig. 4-84)순서에 따라 투입함.
  - 사용된 원료는 Instant BCAA외에 돈피콜라겐, 헬스리고, 치커리식이섬유 등이 사용되었으며, 사용된 합비는 다음과 같음.

#### Stock 제품 개발 및 대량생산 체계 구축

##### (1) Instant BCAA stock 제품 개발

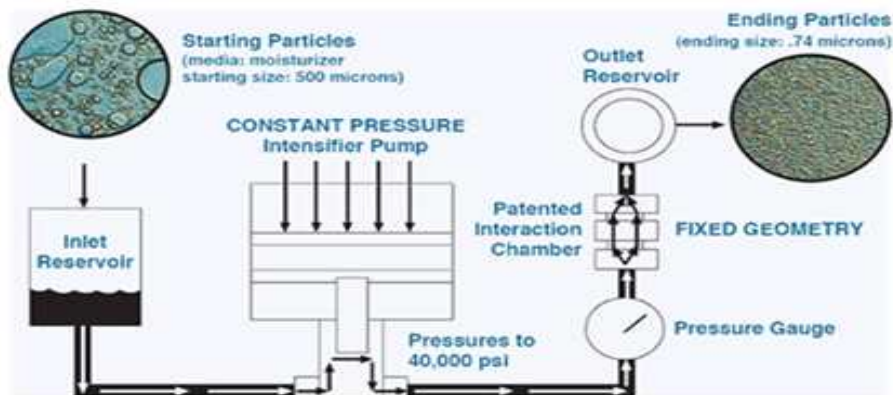


Figure 4-84. Microfluidizer를 이용한 리포솜 제조 시스템(서울대 제조 기술).

Table 4-67. 최적 유화제 탐색(2차년도 과기대 선정 유화제)

Surfactant	Span80	Tween80	Lysolecithin
HLB value	4.3	15.0	9.0
Water Soluble	Partly soluble	Soluble	Soluble

(가) 개발 방향

- 서울대에서 채택한 Microfluidizer를 이용한 리포솜 제조 시스템과 2차년도 과기대에서 선정한 유화제 3종(Span80, Tween80, Lysolecithin)을 적용하여 Instant BCAA를 제조하고자 함.

(나) 개발 방법

- BCAA(Leu : Ile : Val = 2:1:1)와 유화제(3종) 및 물을 첨가 후 고압 균질을 진행함. 균질 후 동결건조(FD) 방법을 검토한 결과, 생산 설비 적용 시 유틸리티 비용 증가로 인해 적용이 어려움.
- SD(Spray Dry)법을 적용한 결과, 농축시 결정이 생성됨을 확인함. 따라서 이 방법은 적용이 불가능함.
- 동결건조(FD) 및 SD법으로는 대량 생산 공정 구축의 어려움이 있음.
- 따라서 대상(주)에서는 유동층 과립기를 이용한 코팅기술을 개발하여 instant BCAA를 제조함.
- 유동층 과립기는 top-spray type과 bottom-spray type으로 크게 분류되며, bottom spray type을 사용하였을 때, 각각의 분말에 분무액이 입혀져 코팅되는 기술을 이용하여 instant BCAA 생산하기 위해 bottom-spray type을 선택하였음. (Fig. 4-85)

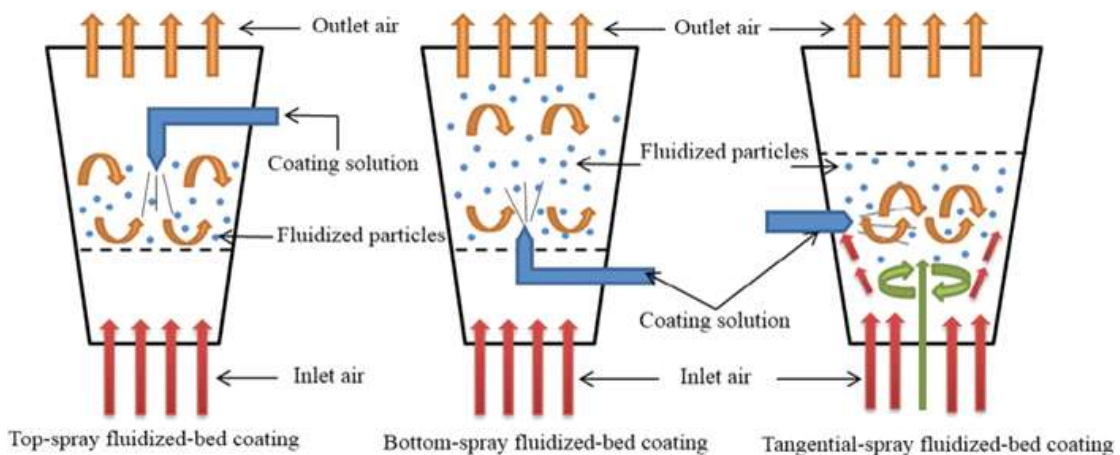


Figure 4-85. 유동층 과립기를 이용한 코팅기술의 원리.

- \* 동결건조(FD) : 수용액이나 물을 포함하는 시료를 동결하고 그 온도의 수증기압 이하로 감압하여 물을 승화시켜 건조하는 방법으로 분무건조(SD)에 비해 가공비가 비싸고 생산량이 많지 않음
- \* 분무건조(SD) : 액체 상태의 원료를 뜨거운 바람 중에 분무, 분산시켜 열풍으로 급속히 건조하여 분말화하는 방법으로 산업계에서 많이 쓰임
- \* 유동층 과립기: 유체를 이용하여 core 물질끼리 과립 혹은 다른 물질로 코팅하여 분말의 용해성, 흐름성 등을 향상시킬 수 있는 분말화 방법

(다) 실험 생산

① 실험 생산 배합비

Table 4-68. Instant BCAA 배합비

No	원료명	비율(%)
1	BCAA	99
2	유화제	1
3	정제수	45(바인더)

② 제조공정도



Figure4-86. Instant BCAA 제조공정도.

- ① 조립용 원료를 제외한 모든 원료를 25 mesh로 사별하여 더블콘 믹서에서 30분간 혼합.
- ② 조립액은 혼합원료 무게 대비 40~45% 중량으로 Tween80을 정제수에 30분간 용해.
- ③ 조립 조건: 유동층조립기 사용

급기 온도(°C)	70±5
내부 온도(°C)	42~50
액 분사량	0.4~0.5
분사압(bar)	3.5~3.8

- ④ 조립액 분무가 완료되면 75~80°C로 승온하여 최종 수분 5% 이하로 관리.







- ⑤ 조립 및 건조가 완료된 조립물은 20 mesh로 정립.
- ⑥ 조립이 완료된 내용물은 10kg 박스에 포장.



Figure 4-87. Instant BCAA 최종 제품 사진.

(라) 개발 결과

Table 4-69. 유화제 2종별 stock 제품 비교(유동층 과립기를 이용한 코팅 기술 적용)

	Span80	Tween80	Lysolecithin
BCAA함량	99%	99%	99%
성상			
용해성 (20°C)			
침강시간 (5g/100ml기준)	10.25(min)	8.75(min)	6.5(min)

- 서울대에서 채택한 Microfluidizer를 이용한 리포솜 제조 시스템과 2차년도 과기대에서 선정된 유화제 3종(Span80, Tween80, Lysolecithin)을 적용하여 Instant BCAA를 제조하였음.
- 유화제에 따라 성상이 위와 같이 다르게 나타났으며, 용해성은 20°C에서 Lysolecithin을 사용한 instant BCAA가 가장 높게 나타났으며, Tween80, Span80순으로 용해성이 낮아지는 것을 확인함.

- 침강 시간 측정 결과(5g/100ml기준), Lysolecithin적용 BCAA가 6.5분으로 가장 빠르게 나타났으며, Tween80, Span80순으로 침강 소요시간이 길어짐을 확인함.
- 위의 결과를 종합하여, Lysolecithin을 Instant BCAA stock 제품 개발에 적용하도록 함.

(2) 시제품 개발 및 대량생산 체계 구축

(가) Instant BCAA 적용 제품 개발1(뉴케어 망고젤, 복숭아젤 2종)

• 개발 방향

- 반고형 타입의 2차년도 개발제품을 개선한 고령(환)자 대상 영양보충 간식으로 BCAA 500 mg(개당) 함유하고 있음.
- 요양병원, 온라인 등을 통해 구입할 수 있으며, 날개로 먹을수 있는 날개형 타입과 병원이나 단체에서 다수에게 저렴하게 제공할 수 있는 관 젤리형의 두 종류 타입으로 개발.
- 캔디류 식품 유형, 관능 평가 결과를 참고하여 선호도가 높은 망고맛, 복숭아맛 2종류로 제품 개발.

• 개발 방법

- Lab test후 생산 라인 적용 실험생산 실시.
- Instant BCAA를 500 mg(개당)함유하도록 하여 다음과 같은 제조공정도(Fig.4-88)순서에 따라 투입함.
- 사용된 원료는 Instant BCAA외에 돈피콜라겐, 헬스리고, 치커리식이섬유 등이 사용되었으며, 사용된 배합비는 다음과 같음.

① 실험생산 배합비

Table 4-70. 뉴케어 망고젤, 복숭아젤 배합비

No	원료명	비율(%)
1	Instant BCAA	1.3
2	헬스리고	*.**
3	돈피콜라겐	*.**
4	결정과당	*.**
5	팔라티노스	*.**
6	유단백가수분해물	*.**
7	치커리식이섬유	*.**
8	검믹스	*.**
9	오렌지추출물	*.**
10	수크랄로스	*.**
11	사과산	*.**
12	카로틴색소	*.**
13	젓산칼슘	*.**
14	향(망고향, 복숭아향)	*.**
15	농축액(망고, 복숭아)	*.**
16	정제수	*.**

② 제조공정도



Figure 4-88. 뉴케어 망고젤, 복숭아젤 제조공정도.

- 개발 결과
  - 최종 제품 개발 및 신제품 출시 완료



맛있는 고단백 영양 간식 대상 Wellife

## 뉴케어 복숭아젤



**● 제품 특징**

- 고단백(6g/100g 당), 고식이성유(4.5g/100g 당), 고칼슘(100mg/100g 당) 제품입니다.
- BCAA를 500mg(100g 당)을 첨가했습니다.  
(L-노로발린 25mg, 호박산 200mg, 알민 125mg)
- 부드러운 식감으로 저작이 불편하거나 연하곤란이 있으신 분도 드실 수 있습니다.
- 망고젤, 복숭아젤은 당류 3.5g(100g 당)으로 혈당 걱정을 줄였습니다.
- 복숭아, 망고 2가지 맛이 있습니다.

Figure 4-89. 출시 완료된 뉴케어 망고젤, 복숭아젤 제품 브로셔.

- 최종 제품 규격서

관리번호	완제품 검사규격 뉴케어 고단백 젤리 100g, 1kg		질		
			작성	검토	승인
			이준희	이규환	한재갑
			16.02.16	16.02.16	16.02.16

1. 제품규격 (본질사항기준) : 한디류

검 사 항 목		제 품 규 격		비고
외관 검사 기준	포장 상태	외부에 찢고러진 곳이 없으며 적미, 표시 사항이 벗겨지거나 손상됨이 없으며 허미, 실링부가 누설 없이 깨끗해야 한다		입수항 검사는 포장 시 육안하여, 현장 관리자가 기록하고, 기록은 QA에서 최종 확인한다
견습용 기준	별첨 기준	성 상	고유한 색채와 향미를 지닌 액상으로 서 이며, 허미가 없어야 한다	생산 Lot 별 자가분석 실시
이화학적 기준	차라 기준	Brix(25°C)	29.5~31.5 (30)	생산 Lot 별 자가분석 실시
		pH(25°C)	4.4±0.2	
	별첨 기준	인공감미료	허용 외 불검출	연별 1회 공인기관 의뢰
		압착강도(Newton)	5 이하	
미생물 기준	별첨 기준	열변세균(kfu/ml)	1 ml당 10,000 이하	생산 Lot 별 자가분석 실시
		대장균군(kfu/ml)	음성	
염 양 소	별첨 기준	납	10 이하	연별 1회 공인기관 의뢰
		포도당	표시값 이상이어야 한다	
	참고 기준	기타(이외의 표시 열량소)	식품등의 표시기준 제4조 *식품등의 세부표시기준"에 적합하여야 한다	분기별 1회 공인기관 의뢰 (대상(주)연립2팀 의뢰) (생산 사 1박스 건강2팀 송부)
내용량(ml)		표시값 이상이어야 한다		생산 Lot 별 자가분석 실시
표기사항		식품위생법 표시기준에 적합할 것		
유통기한		유통기한 표시 100g: 8개월 / 1kg: 6개월		EX) 2014.07.08 까지

Figure 4-90. 뉴케어 망고젤, 복숭아젤 제품 규격서.



- 살균 확인

Table 4-71. 뉴케어 복숭아젤, 망고젤 제품의 미생물 기준규격

검사항목		제품규격	비고
미생물 기준	법적기준	일반세균(cfu/ml)	1ml당 10,000이하
		대장균군(cfu/ml)	음성
			생산 Lot별 자가분석 실시

① 미생물 검사 확인

· 자사는 미생물 안정성 확보를 위해 위와 같이 규격을 설정하고 있으며, 식품공전법에 따라 일반 세균 검사를 진행하였음.

· 생산 초, 중, 말 각 lot별 10개씩 검사를 진행하였으며, 일부 일반세균이 검출되었으나 규격 범위안에 만족시킴을 확인함.

Table 4-72. 뉴케어 망고젤[초(A), 중(B), 말(C)] 각 10EA 샘플의 미생물 확인

Lot	일반세균 10 <sup>-1</sup>	일반세균 10 <sup>-3</sup>	대장균군
A-1	NA	NA	음성
A-2	NA	NA	음성
A-3	NA	NA	음성
A-4	3	NA	음성
A-5	NA	NA	음성
A-6	NA	NA	음성
A-7	NA	NA	음성
A-8	NA	NA	음성
A-9	NA	NA	음성
A-10	NA	NA	음성
B-1	NA	NA	음성
B-2	7	NA	음성
B-3	NA	NA	음성
B-4	NA	NA	음성
B-5	NA	NA	음성
B-6	NA	NA	음성
B-7	NA	NA	음성
B-8	NA	NA	음성
B-9	NA	NA	음성
B-10	NA	NA	음성
C-1	NA	NA	음성
C-2	NA	NA	음성
C-3	NA	NA	음성
C-4	5	NA	음성
C-5	NA	NA	음성

C-6	2	NA	음성
C-7	NA	NA	음성
C-8	NA	NA	음성
C-9	NA	NA	음성
C-10	NA	NA	음성

Table 4-73. 뉴케어 복숭아젤[초(A), 중(B), 말(C)] 각 10EA 샘플의 미생물 확인

Lot	일반세균 10 <sup>-1</sup>	일반세균 10 <sup>-3</sup>	대장균군
A-1	NA	NA	음성
A-2	NA	NA	음성
A-3	NA	NA	음성
A-4	NA	NA	음성
A-5	NA	NA	음성
A-6	NA	NA	음성
A-7	3	NA	음성
A-8	NA	NA	음성
A-9	NA	NA	음성
A-10	NA	NA	음성
B-1	NA	NA	음성
B-2	NA	NA	음성
B-3	4	NA	음성
B-4	NA	NA	음성
B-5	NA	NA	음성
B-6	NA	NA	음성
B-7	2	NA	음성
B-8	NA	NA	음성
B-9	NA	NA	음성
B-10	NA	NA	음성
C-1	NA	NA	음성
C-2	NA	NA	음성
C-3	NA	NA	음성
C-4	NA	NA	음성
C-5	NA	NA	음성
C-6	NA	NA	음성
C-7	NA	NA	음성
C-8	NA	NA	음성
C-9	NA	NA	음성
C-10	NA	NA	음성

- 색차 확인

Table 4-74. 뉴케어 망고젤의 Lot별 색차 비교

Lot. \ 색차 값	L	a	b
A-1	29.99	8.20	38.84
A-2	30.10	7.95	38.95
A-3	30.18	8.15	38.70
B-1	29.80	8.24	38.75
B-2	30.15	7.90	39.10
B-3	29.85	8.10	38.77
C-1	29.50	8.45	38.65
C-2	30.26	8.05	38.68
C-3	30.42	8.20	38.90
평균	30.03	8.14	38.82

(L : + White~Black, a : + Red~Green, b : + Yellow~Blue)

Table 4-75. 뉴케어 복숭아젤의 Lot별 색차 비교

Lot. \ 색차 값	L	a	b
A-1	25.45	-0.19	15.04
A-2	25.40	-0.15	15.10
A-3	25.50	-0.22	15.13
B-1	25.38	-0.25	14.99
B-2	25.35	-0.30	15.28
B-3	25.65	-0.28	15.09
C-1	25.68	-0.14	15.24
C-2	25.48	-0.23	15.00
C-3	25.32	-0.18	14.89
평균	25.47	-0.22	15.08

(L : + White~Black, a : + Red~Green, b : + Yellow~Blue)

Table4-76. 뉴케어 망고젤의 보존 온도별 보존 일수에 따른 brix, pH, 색차 비교

항목		brix	pH	색차			
보존 온도	보존 일수	%	mV	L	a	b	△*ab
45℃	0	32.88	4.70	29.99	8.20	38.84	
	2	32.85	4.71	29.80	8.52	39.70	0.92
	4	32.90	4.71	29.35	9.92	40.45	2.36
	6	32.78	4.72	29.05	10.40	41.70	3.61
	8	32.79	4.73	28.82	11.25	42.65	4.88
	10	32.96	4.73	28.53	11.70	43.80	6.07
55℃	0	32.88	4.70	29.99	8.20	38.84	
	2	32.75	4.70	29.70	8.85	40.05	1.37
	4	32.97	4.71	28.20	10.25	41.20	3.13
	6	32.85	4.71	26.86	10.89	42.50	4.54
	8	32.87	4.72	26.40	11.18	43.75	5.74
	10	32.92	4.72	25.54	12.20	44.50	6.93

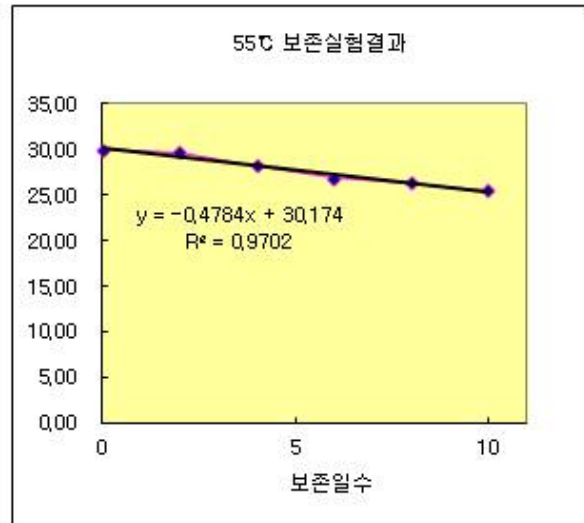
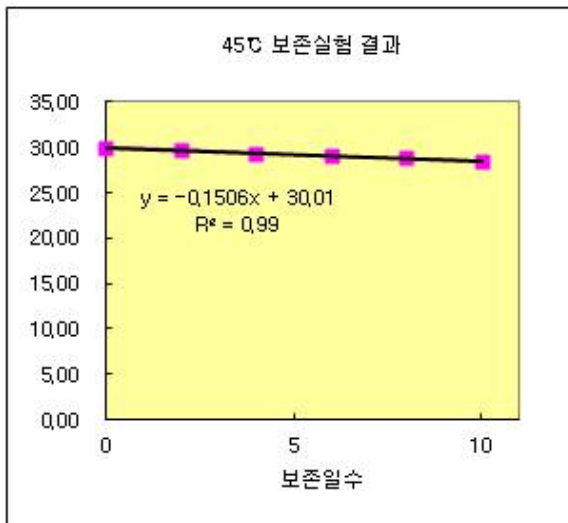
Table 4-77. 뉴케어 복숭아젤의 보존 온도별 보존 일수에 따른 brix, pH, 색차 비교

항목		brix	pH	색차			
보존 온도	보존 일수	%	mV	L	a	b	△*ab
45℃	0	30.22	4.66	25.45	-0.19	15.04	
	2	30.25	4.67	25.30	0.20	15.13	0.40
	4	30.18	4.67	25.06	0.80	15.25	1.01
	6	30.28	4.68	24.88	1.35	15.36	1.57
	8	30.35	4.68	24.50	2.46	15.48	2.69
	10	30.14	4.68	24.12	3.31	15.54	3.54
55℃	0	30.22	4.66	25.45	-0.19	15.04	
	2	30.38	4.66	25.10	0.75	15.88	1.26
	4	30.30	4.65	24.44	1.30	16.95	2.42
	6	30.25	4.67	22.88	2.15	17.50	3.40
	8	30.02	4.67	22.35	2.95	19.20	5.21
	10	30.35	4.67	21.10	3.81	20.70	6.93

- 유통기한 설정

Table 4-78. 뉴케어 망고젤의 45℃ 및 55℃ 가혹 보존실험 결과

항 목			관능 여부	항 목			관능 여부
보존 온도	보존 일수	색도 (L값)		보존 온도	보존 일수	색도 (L값)	
45℃	0	29.99	○	55℃	0	29.99	○
	2	29.80	○		2	29.70	○
	4	29.35	○		4	28.20	○
	6	29.05	○		6	26.86	○
	8	28.82	○		8	26.40	x
	10	28.53	x		10	25.54	x



가. 1차 반응으로 간주하여 보존기간 계산

1. D-Value :  $\log(N_0/N_m) = (T_m - T_0) / DT$

D45 = 578.62035

D55 = 208.89711

2. Z-Value :  $\log(D_{55}/D_{45}) = (45 - 55) / Z$

Z = 22.600848

3. Q10 Value =  $1010/Z = 2.7698821$

4. 55℃ 보존실험 결과 상온(25℃) 보존일수

= 55℃ 보존일수 × Q10<sup>r</sup> [ r =  $\Delta T/10 = (45 - 25)/10$  ]

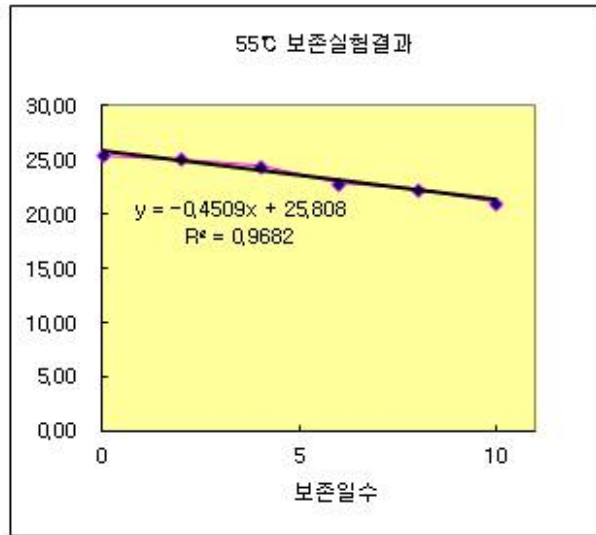
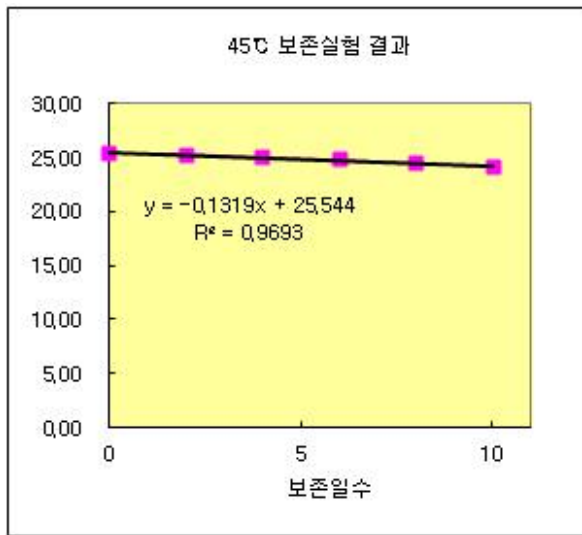
= 255.37783 일 (약 8.512594 개월)

나. 결 과

45℃, 55℃ 가혹보존 실험결과 제품의 관능평가 및 색도 측정치를 근거로 하여 뉴케어 망고젤의 유통기한을 상온 8개월로 산정함

Table 4-79. 뉴케어 복숭아젤의 45℃ 및 55℃ 가혹 보존실험 결과

항 목		색도 (L값)	관능 여부	항 목		색도 (L값)	관능 여부
보존 온도	보존 일수			보존 온도	보존 일수		
45℃	0	25.45	○	55℃	0	25.45	○
	2	25.30	○		2	25.10	○
	4	25.06	○		4	24.44	○
	6	24.88	○		6	22.88	○
	8	24.50	○		8	22.35	x
	10	24.12	x		10	21.10	x



가. 1차 반응으로 간주하여 보존기간 계산

1. D-Value :  $\log(N_0/N_m) = (T_m - T_0) / DT$

D45 = 605.26451  
D55 = 216.30149

2. Z-Value :  $\log(D_{55}/D_{45}) = (45 - 55) / Z$

Z = 22.377087

3. Q10 Value =  $10^{10/Z} = 2.7982447$

4. 55℃ 보존실험 결과 상온(25℃) 보존일수

= 55℃ 보존일수 × Q10<sup>r</sup> [ r = ΔT/10 = (45-25)/10 ]

= 261.96558 일 (약 8.732186 개월)

나. 결 과

45℃, 55℃ 가혹보존 실험결과 제품의 관능평가 및 색도 측정치를 근거로 하여 뉴케어 복숭아젤의 유통기한을 상온 8개월로 산정함

- 관능평가(뉴케어 젤리2종)

① 관능평가 실시

- 관능평가 전문기관 센소메트릭스 주식회사 의뢰
- 평가 샘플: 젤리 망고맛(자사), 복숭아맛(자사), 사과맛(경쟁사), 유자맛(경쟁사)
- 조사 대상: 50~80세 고령자 대상
- 검사 일시: 2015.12.16.
- 검사 장소:(주)센소메트릭스 관능평가 센터(서울특별시 영등포구)
- 시료 준비: 상온 보관 후 제공
- 평가 인원: 33명
- 평가 시간: 14:00, 16:00
- 척도: 9점 척도

② 관능 평가지 작성

제품명: [ ]명 [ ]여 / 나이: 만 \_\_\_\_\_세 / 이름: \_\_\_\_\_ / 번호 \_\_\_\_\_

본 설문은 **센소메트릭스**에서 진행하는 젤리에 대한 조사로,  
**[젤리의 맛]에 대하여 평가**해 주시기 바랍니다.

추정된 내용은 모두 보라색 젤리 제품인 것으로는 이 소용된 자료로 사용될 것입니다.  
 설문지 또는 응답은 정확히 필요하며, 추정 내용은 단지 통계자료로만 활용하게 될 것입니다.

< 설문 진행 순서 및 주의 사항 >.

- 1) 위에 붙여진 **물로 입안을 헹구고 시금치**를 주시기 바랍니다.
- 2) 젤리를 **빨고** 맛과 향을 느끼고 **맛과 향**을 느끼는 것만으로도 **젤리의 맛**을 느끼실 수 있습니다.
- 3) 젤리를 **빨고** **맛과 향**을 느끼고 **맛과 향**을 느끼는 것만으로도 **젤리의 맛**을 느끼실 수 있습니다.

※ 설문지 상의 주셔서 대단히 감사드립니다. ※

제품번호: **263**

▶ **전체적으로** 평가하는 질문입니다..

1. **전체적으로** 평가할 때 이 젤리는 얼마나 마음에 드세요?..  
 (전체적인 맛과 향, 색상, 입안 느낌, 맛 포함)

대단히 싫다.  싫다.  좀지드 싫다.  좋아.  대단히 좋아.

▶ **눈으로 보고** 평가하는 질문입니다..

2. **눈으로만** 볼 때 이 젤리는 얼마나 마음에 드세요? (색상 등)

대단히 싫다.  싫다.  좀지드 싫다.  좋아.  대단히 좋아.

▶ **향을 맡으며 (향)** 평가하는 질문입니다..

3. **향으로만** 평가할 때 이 젤리를 어느 정도 좋아하십니까?

대단히 싫다.  싫다.  좀지드 싫다.  좋아.  대단히 좋아.

---

3.1. 향의 강한 정도는 어떠한가요?

매우 약하다.  약하다.  보통이다.  강하다.  매우 강하다.

3.2. (\*) 향이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?

매우 약하다.  약하다.  보통이다.  강하다.  매우 강하다.

제품번호: 263.
제품번호: 263.

▶ 먹으면서 (맛) 평가하는 질문입니다..

4. 맛으로만 평가할 때 이 젤리를 어느 정도 좋아하십니까?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우	싫다	별로	별로	별로	별로	별로	별로	매우
좋다		싫지도	싫다		좋다		좋다	좋다

---

4.1. 단맛의 강한 정도는 어떻습니까?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우	매우	별로	별로	별로	별로	별로	별로	매우
좋다	좋다	별로	별로	별로	별로	별로	별로	좋다

4.2. (\*) 단맛이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?..

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우	매우	별로	별로	별로	별로	별로	별로	매우
좋다	좋다	별로	별로	별로	별로	별로	별로	좋다

---

4.3. 과일맛의 강한 정도는 어떻습니까?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우	매우	별로	별로	별로	별로	별로	별로	매우
좋다	좋다	별로	별로	별로	별로	별로	별로	좋다

4.4. (\*) 과일맛이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?..

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우	매우	별로	별로	별로	별로	별로	별로	매우
좋다	좋다	별로	별로	별로	별로	별로	별로	좋다

제품번호: 263.

▶ 먹고(삼키고) 나서 평가하는 질문입니다..

6. 먹고 난 후의 뒷맛으로 평가할 때 이 젤리를 어느 정도 좋아하십니까?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우	싫다	별로	별로	별로	별로	별로	별로	매우
좋다		싫지도	싫다		좋다		좋다	좋다

Figure 4-91. 뉴케어 젤리 관능평가지.



③ 관능평가 결과

- 연령대(인원수): 50대(22), 60대(5), 70대(6)
- 성별(인원수): 남(15): 여(18)

Table 4-80. 뉴케어 젤리의 종합선호 및 종합기호 결과

제품명	종합선호	종합기호	
	순위	평균(9점)	CCI(100점)
복숭아	80	5.85	77.0
망고	75	5.33	51.8
사과	81	5.06	41.0
유자	94	4.94	40.0

<참고>

\*종합선호-순위: 순위가 낮을수록 선호도가 높은 제품임

\*종합기호 평균: 9점 적도로 5점은 보통임

\*CCI: 9점 척도 데이터로부터 '긍정반응' 또는 '부정반응'을 의미하는 6가지 통계적 확률 값을 계산하여, 100점 만점의 긍정/부정 지표로 변환한 것

[의미: 0~:확실히 부정적, 10~:상당히 부정적, 20~:대체로 부정적, 30~:다소부정적, 40~:약간부정적, 50~:약간긍정적, 60~:다소긍정적, 70~:대체로긍정적, 80~:상당히긍정적, 90~:확실히긍정적]

: 당사의 경우 5.0/9.0(만점)이상의 종합기호점수를 제품 출시 전 허들로 정하고 있음. 환자식의 특성상 많은 영양성분 첨가로 인한 관능 구현의 어려움으로 일반식품과 다르게 운영되어지고 있음.

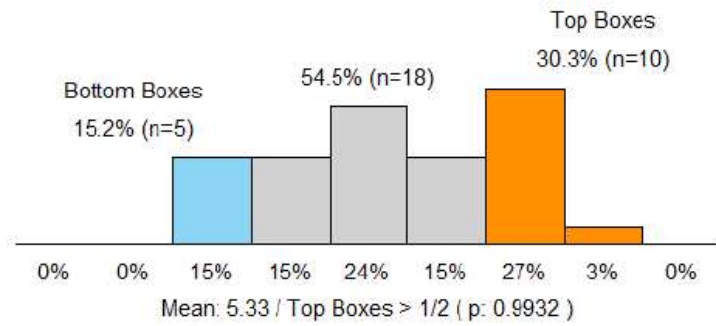
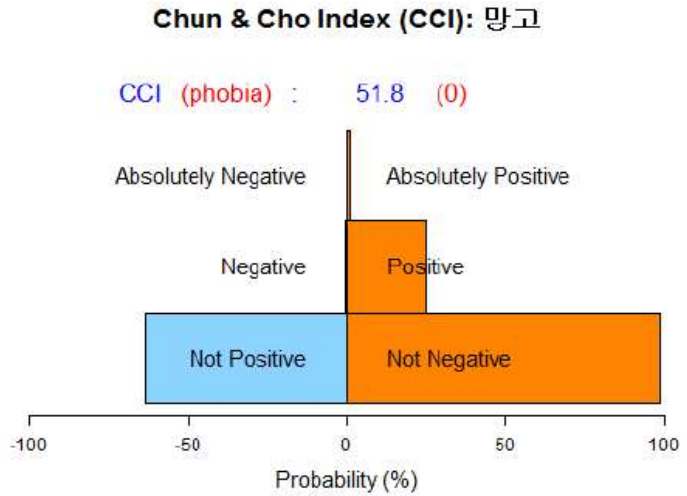


Figure 4-92. 뉴케어 젤리(망고맛) 세부 관능 품질 분석(CCI).



Figure 4-93. 뉴케어 젤리(망고맛) 세부 종합 기호(CCI).

### Chun & Cho Index (CCI): 복숭아

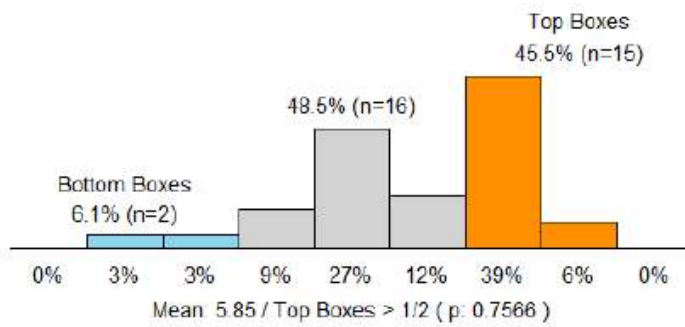
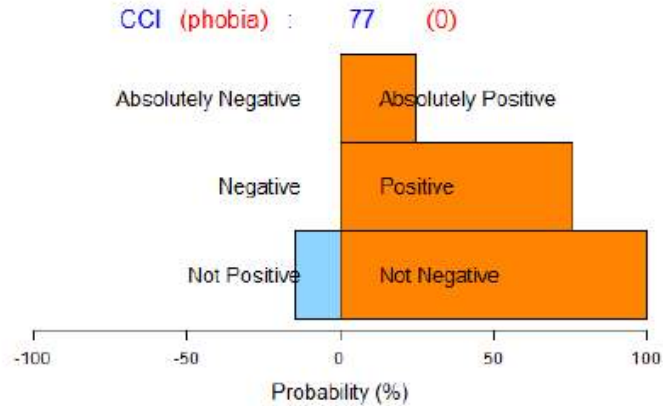


Figure 4-94. 뉴케어 젤리(복숭아맛) 세부 관능 품질 분석(CCI).



Figure 4-95. 뉴케어 젤리(복숭아맛) 세부 종합 기호(CCI).

◆ 주요특성 개선점 분석 (Ideal Profile Method: IPM)

◎ 주요 특성의 기호도에 대한 영향력 분석

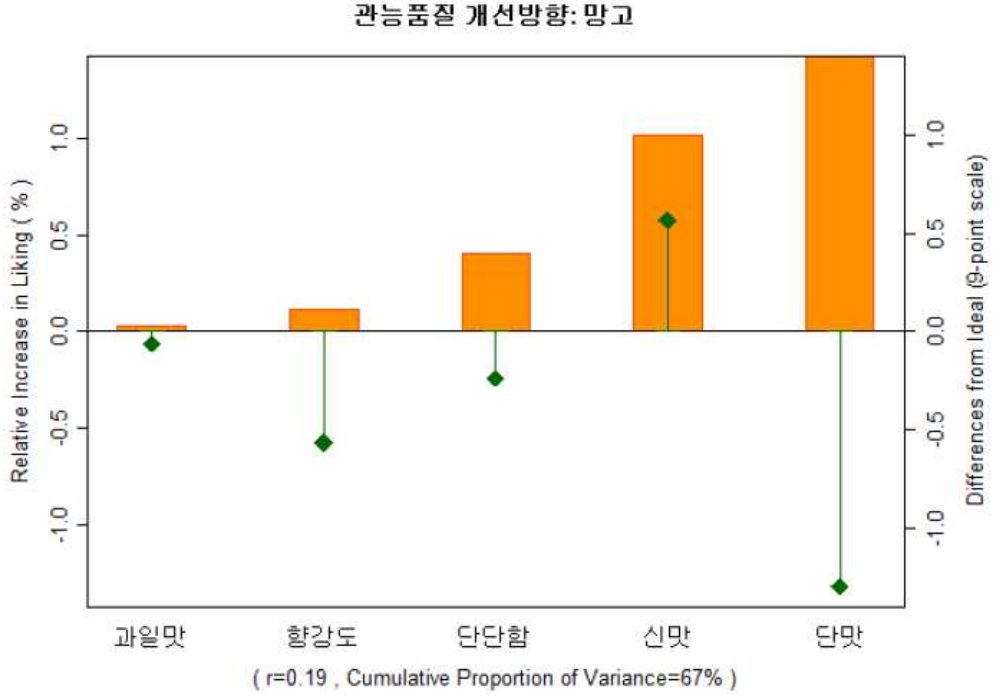


Figure 4-96. 뉴케어 젤리(망고맛) 관능 품질 개선 방향.

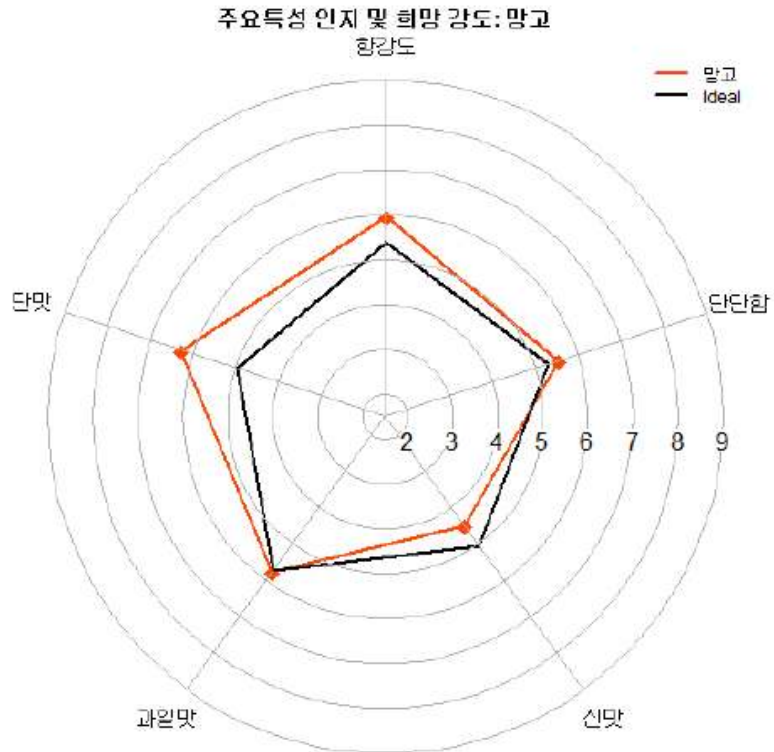


Figure 4-97. 뉴케어 젤리(망고맛) 소비자 개선 요구 방향.

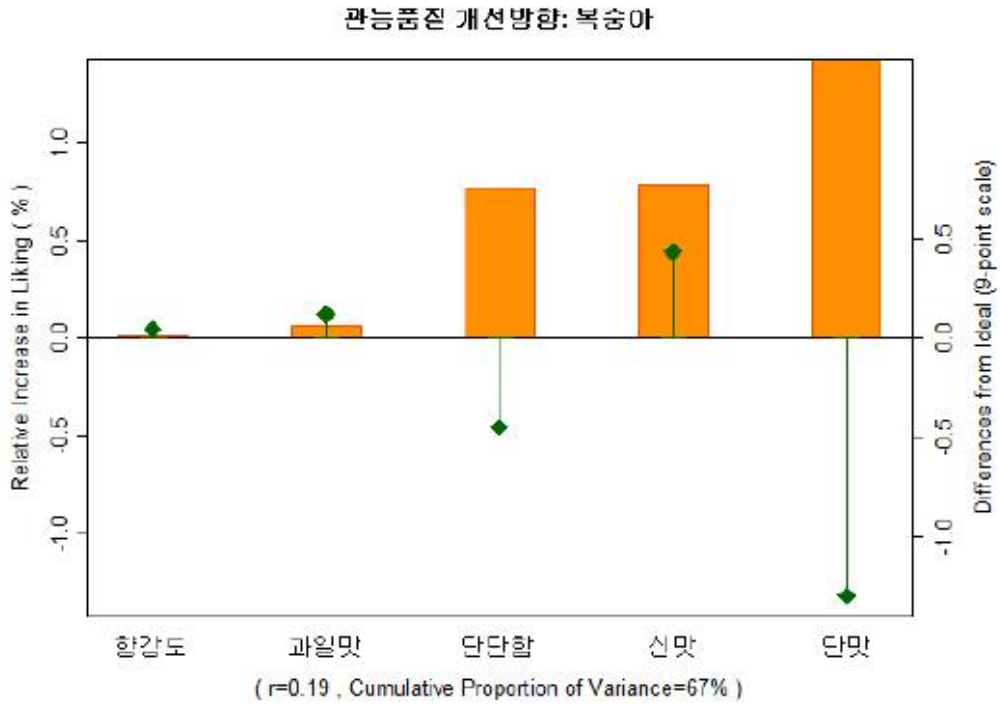


Figure 4-98. 뉴케어 젤리(복숭아맛) 관능 품질 개선 방향.

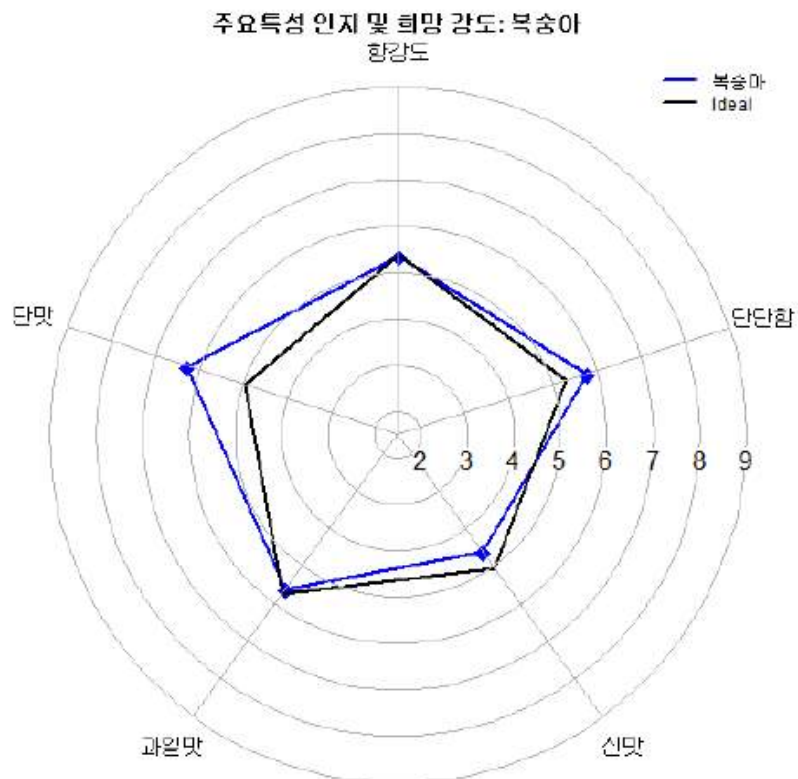


Figure 4-99. 뉴케어 젤리(복숭아맛) 소비자 개선 요구 방향.

- 뉴케어 젤리(망고맛)의 경우 종합기호는 약간 긍정적 수준, 외관기호는 확실히 긍정적 수준으로 높은 점수를 보임.
- 뉴케어 젤리(복숭아맛)의 경우 전반적으로 종합기호, 식감기호, 맛기호 모두 긍정적 수준을 보임. 다만 뒷맛기호는 약간 부정적임.
- 소비자 개선 요구 방향 조사 결과, 뉴케어 젤리(망고맛)의 경우에는 신맛은 강하게, 향강도 및 단맛은 약해지길 원하는 것으로 조사되었으며, 뉴케어 젤리(복숭아맛)의 경우에는 단맛이 약해지길 원하는 것으로 조사됨.
- 위와 같은 소비자 개선 요구 사항을 반영하여 제품 개선 및 출시 완료함.

- 영양성분 분석


제 D2016010725 호			
검 사 성 적 서			
검체명	뉴케어bcas젤리맛고	제조일자 (유통기한)	2016-01-13
뢰뢰인	업세명	대상(주)	
	주소	경기 이천시 아람면 표곡리 125-8	
	성명	명명성	
제번호		검수년월일	2016-01-14
검사의뢰목적	참고용	검체검수번호	D2016010725
귀하가 우리 연구원에 검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자: 김 권 희			
시험항목	결과	검사담당자	
열량(Kcal/100g)	99.29Kcal/100g	한아름	
탄수화물(%)	19.17%(식이섬유 4.51% 함유)	한아름	
프탄화물(%)	7.06%	이경민	
조지방(%)	0.04%	이선경	
나트륨(mg/100g)	32.62mg/100g	김세미	
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(mg/g)	39.29mg/g	김혜은	
포화지방산(g/100g)	0.01g/100g	김은지	
트랜스지방산(g/100g)	불검출	김은지	
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	이현아	
칼슘(mg/100g)	116.07mg/100g	김세미	
식이섬유(%)	0.66%	이경민	
식이섬유(%)	4.51%	조미주	
유리아미노산(이소모이신)(mg/100g)	125.81mg/100g	이주영	
유리아미노산(로이신)(mg/100g)	251.99mg/100g	이주영	
유리아미노산(발린)(mg/100g)	135.00mg/100g	이주영	
식품공전/제10.1.1.4.3. 식이섬유(가. 효소-중합법)/총식이섬유(TIF) 식품공전/제10.1.1.4.3. 식이섬유(나. 액체크로마토그래피를 이용한 수용성 식이섬유의 정량)			
2015년 2월 5일			
한국농식품연구원			
			
<small>(사)한국농식품연구원 부설 한국농식품연구원 <a href="http://www.knafi.re.kr">http://www.knafi.re.kr</a> 전화 02-950-1311 팩스 02-950-0400-1</small>			

Figure 4-100. 뉴케어 젤리 영양성분 공인기관 성적서.

(나) Instant BCAA 적용 제품 개발2(BCAA함유 분말 영양죽)

- 개발 방향
  - 분말 타입의 영양죽 형태로 식사대용 및 간식용 제품임. 1포(35g)를 물120~140ml에 섞어서 섭취. 1포당 200mg의 instant BCAA를 함유하고 있음.
  - 식품유형은 즉석섭취식품으로 물이나 두유 또는 균형영양식에 넣어서 함께 섭취 가능

함.

- 어르신에게 부족하기 쉬운 칼슘, 비타민B군 등이 함유된 21종의 비타민 및 미네랄을 함유하고 있음.
- 브로콜리 및 시금치를 함유하고 있으며, 자사 기술로 생산한 클로렐라 및 난소화성 말토덱스트린을 함유하여 관능 수준을 높여 instant BCAA자체의 쓴맛을 마스킹 하고자 함.
- 개발 방법
  - Lab test후 배합비 확정 및 생산 라인 적용 실험생산 실시(100kg/1batch).
  - Instant BCAA를 200mg(1포당)함유하도록 하여 다음과 같은 제조공정도(Fig.4-101)순서에 따라 투입함.
  - 사용된 원료는 Instant BCAA외에 알파미, 유미분, 텍스트린 등이 사용되었으며, 사용된 배합비는 다음과 같음.

① 실험생산 배합비

Table 4-81. BCAA함유 분말 영양죽 배합비

No	원료명	비율(%)
1	Instant BCAA	0.57
2	알파미	*.**
3	유미분	*.**
4	텍스트린	*.**
5	알파콘	*.**
6	WPI	*.**
7	결정과당	*.**
8	미네랄비타민믹스	*.**
9	식염	*.**
10	대두분리단백	*.**
11	보리순분말	*.**
12	치커리화이버	*.**
13	난소화성말토덱스트린	*.**
14	대상 클로렐라 원말	*.**
15	N-amino	*.**
16	콜라겐	*.**
17	정제수	*.**



② 제조공정도



Figure 4-101. BCAA함유 분말 영양죽 제조공정도.

- 혼합: 사별한 원료를 리본믹서로 15분간 혼합
- 혼합 후 검사: 규격 내 적합 여부 확인
- 충전 및 포장: 혼합이 완료된 원료는 충전기로 35g이 되도록 충전함

• 개발 결과



Figure 4-102. BCAA함유 분말 영양죽 최종 proto-type 제품.

- 최종 제품 규격서

검 사 항 목		법적기준	자가기준	비고
외관 평가 기준	포 장 상 태	포 외부에 찌그러진 곳이 없어야 하며, 표시 사항이 벗겨지거나 손상됨이 없어야 하며 입수량이 정확해야 한다	포 외부에 찌그러진 곳이 없어야 하며, 표시 사항이 벗겨지거나 손상됨이 없어야 하며 입수량이 정확해야 한다	
관능평가 기준	성 상	고유의 색택과 향미를 지닌 분말로 이미,이취가 없어야 한다	고유의 색택과 향미를 지닌 분말로 이미,이취가 없어야 한다	
	점 도	-	800cps- 900cps (7°C 냉수에 믹스 후 제품 온도 20°C RV형 점도계 (brookfield) No.2 spin 100rpm측정시)	
이화학적 기준	수분	8% 이하	7% 이하	
	멜라민	불검출	불검출	
	타르색소	불검출	불검출	
	염도	-	1.8% - 2.1% 이하	
미생물 규격	대장균군 (cfu/ml)	음성	음성	생산시 공인 기관 또는 자가 기관 분석 실시
	황색포도상구균	1g당 100 이하	1g당 100 이하	
	살모넬라	음성	음성	
	장염 비브리오균	음성	음성	
	바실러스 세레우스 (cfu/ml)	1,000 이하 /g	1,000 이하 /g	
	일반세균	100,000 이하 /g	100,000 이하 /g	
	E- coli O157: H7	음성	음성	
	클로스트리디움 퍼푸린젠스	음성	음성	
	리스테리아 모노사이토 제니스	음성	음성	
중금속 기준	납 (mg/kg)	불검출	불검출	
	카드뮴 (mg/kg)	불검출	불검출	
내용량(ml)		표시량 이상이어야 한다	35 - 37 g	
표기사항		식품위생법 표시기준에 적합할것	식품위생법 표시기준에 적합할것	
유통기한		○○○○.○○.○○	유통기한 날짜 표시 (유통기한 제조일로부터 18개월)	유통기한 날짜 표시

Figure 4-103. BCAA 함유 분말 영양죽 제품 규격서.

- 미생물 검사

Table 4-82. BCAA 함유 분말 영양죽 [초(A), 중(B), 말(C)] 각 10EA 샘플의 미생물 확인

Lot	일반세균 10 <sup>-1</sup>	일반세균 10 <sup>-3</sup>	대장균군	바실러스세레우스
A-1	ND	ND	음성	ND
A-2	ND	ND	음성	ND
A-3	ND	ND	음성	ND
A-4	13	ND	음성	ND
A-5	ND	ND	음성	ND
A-6	ND	ND	음성	ND
A-7	16	ND	음성	ND
A-8	ND	ND	음성	ND
A-9	ND	ND	음성	ND
A-10	ND	ND	음성	ND
B-1	ND	ND	음성	ND
B-2	ND	ND	음성	ND
B-3	ND	ND	음성	ND
B-4	8	ND	음성	ND
B-5	ND	ND	음성	ND
B-6	ND	ND	음성	ND
B-7	ND	ND	음성	ND
B-8	ND	ND	음성	ND
B-9	ND	ND	음성	ND
B-10	ND	ND	음성	ND
C-1	ND	ND	음성	ND
C-2	ND	ND	음성	ND
C-3	9	ND	음성	ND
C-4	ND	ND	음성	ND
C-5	ND	ND	음성	ND
C-6	ND	ND	음성	ND
C-7	6	ND	음성	ND
C-8	ND	ND	음성	ND
C-9	ND	ND	음성	ND
C-10	ND	ND	음성	ND

① 일반세균: 적합(법적 규격: 100,000 이하/g, 자사 규격: 100,000 이하/g)

② 대장균군: 적합(법적 규격: 음성, 자사 규격: 음성)

③ 바실러스 세레우스: 적합(법적 규격: 1000 이하/g, 자사 규격: 1000 이하/g)

- 색차 확인

Table 4-83. BCAA 함유 영양죽의 Lot별 색차 비교

Lot. \ 색차 값	L	a	b
A-1	84.96	-3.08	17.65
A-2	84.62	-3.10	17.70
A-3	84.43	-3.05	17.45
B-1	84.88	-2.90	17.88
B-2	85.12	-3.15	17.82
B-3	85.08	-2.85	17.80
C-1	84.77	-3.20	17.55
C-2	84.90	-2.82	17.60
C-3	84.92	-2.96	17.72
평균	84.85	-3.01	17.69

(L : + White~Black, a : + Red~Green, b : + Yellow~Blue)

- 관능평가(BCAA함유 분말 영양죽)

① 관능평가 실시

- 관능평가 전문기관 센소메트릭스 주식회사 의뢰
- 평가 샘플: BCAA미첨가 분말 영양죽, BCAA첨가 분말 영양죽
- 조사 대상: 50~80세 고령자 대상
- 검사 일시: 2015.11.07
- 검사 장소:(주)센소메트릭스 관능평가 센터(서울특별시 영등포구)
- 시료 준비: 상온 보관 후 제공
- 평가 인원: 31명
- 평가 시간: 14:00, 16:00
- 척도: 9점 척도

② 관능 평가지 작성

<p>성명: [ ]님 [ ]여 / 나이: 만 ____세 / 이름: _____ / 번호: _____</p> <p>본 설문은 센소메트릭스에서 진행되는 제품의 객관적 평가 검사로  <b>[영양죽의 맛]에 대하여 평가</b>해 주시길 부탁드립니다.</p> <p>충당원 내용은 양주 보다 나은 ____ 제품은 제공받는 데 소중한 자료로 사용됩니다.          설문지 모든 응답은 경당이 없으며, 응답 내용은 단지 통계자료로만 활용하게 될 것입니다.</p> <p>&lt; 설문 진행 순서 및 주의 사항 &gt;</p> <p>1) 원래 놀거리 <b>물론 입안을 헹구고 시켜주세요</b>가 중요합니다.</p> <p>2) 맛의 강도와 향미의 강도를 모두 평가해 달고하시고 <b>영양죽의 맛을 보면서 물속에 차려드릴 수있도록</b> 주시기 바랍니다.</p> <p>※ 주의 사항:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• [단맛]과 [쓴맛]을 좋아하는 정도를 묻는 질문은 [단맛(좋아)를 묻는 질문]으로 구성되어 있습니다.</li> <li>• [물어주는 정도로 묻는 질문]과 [물어주는 정도를 싫어하는 방향으로 물어보는 질문]이 혼재되어 있습니다.</li> <li>• [단맛(좋아)를 묻는 질문]과 [물어주는 정도로 물어보는 질문]을 <b>갈수록 약해지고, 오른쪽으로 갈수록 강해지며, 가운데는 보통 정도(중기)</b>입니다.</li> </ul> <p>3) 모든 질문 시 <b>설에 불과 절대 대항을 나누지 마시고</b> 꼭꼭 물어주시기 바랍니다.</p> <p>본 설문지 상에 주셔서 대단히 감사드립니다. 감사합니다.</p>	<p>제품번호: <b>263.</b></p> <p>▶ 전체적으로 평가하는 질문입니다..</p> <p>1. 전체적으로 평가할 때 이 제품을 얼마나 마음에 드세요?..          (중립적인 색상, 향미, 입안 느낌, 뒷맛 포함)</p> <p><input type="checkbox"/> 매우 싫다    <input type="checkbox"/> 싫다    <input type="checkbox"/> 보통    <input type="checkbox"/> 좋다    <input type="checkbox"/> 매우 좋다</p> <p>▶ 눈으로 보고 평가하는 질문입니다..</p> <p>2. 눈으로만 볼 때 이 제품을 얼마나 마음에 드세요? (색상 등)</p> <p><input type="checkbox"/> 매우 싫다    <input type="checkbox"/> 싫다    <input type="checkbox"/> 보통    <input type="checkbox"/> 좋다    <input type="checkbox"/> 매우 좋다</p> <p>▶ 마시면서(향미) 평가하는 질문입니다..</p> <p>3. 향미로만 평가할 때 이 제품을 어느 정도 좋아하십니까?</p> <p><input type="checkbox"/> 매우 약하다    <input type="checkbox"/> 약하다    <input type="checkbox"/> 보통이다    <input type="checkbox"/> 강하다    <input type="checkbox"/> 매우 강하다</p> <p>3.1. 단맛이 강한 정도는 어떨까요?</p> <p><input type="checkbox"/> 매우 약하다    <input type="checkbox"/> 약하다    <input type="checkbox"/> 보통이다    <input type="checkbox"/> 강하다    <input type="checkbox"/> 매우 강하다</p> <p>3.2. (*) 단맛이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?..</p> <p><input type="checkbox"/> 매우 약하다    <input type="checkbox"/> 약하다    <input type="checkbox"/> 보통이다    <input type="checkbox"/> 강하다    <input type="checkbox"/> 매우 강하다</p>
---	--

제품번호: **263.**

3.3. 곡물맛의 강한 정도는 어떠요?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다	약하다	보통이다	강하다	매우 강하다			

3.4. (\*) 곡물맛이 어떤 수준(정도)이면 더 좋겠습니까?..

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다	약하다	보통이다	강하다	매우 강하다			

---

3.5. 고소함맛의 강한 정도는 어떠요?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다	약하다	보통이다	강하다	매우 강하다			

3.6. (\*) 고소함맛이 어떤 수준(정도)이면 더 좋겠습니까?..

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다	약하다	보통이다	강하다	매우 강하다			

제품번호: **263.**

▶ 마시면서 (시금) 평가하는 질문입니다...

4. 입안에서의 느낌(맛 제외)만으로 평가할 때 이 제품을 어느 정도 좋아하셔요?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 싫다	싫다	조금 싫다	조금 좋다	좋다	매우 좋다		

---

4.1. 농도강의 강한 정도는 어떠요?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 좋다	좋다	보통이다	조금 좋다	조금 싫다	싫다	매우 싫다	

4.2. (\*) 농도강이 어떤 수준(정도)이면 더 좋겠습니까?..

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 좋다	좋다	보통이다	조금 좋다	조금 싫다	싫다	매우 싫다	

▶ 먹고(삼키고) 나서 평가하는 질문입니다...

5. 마시고 난 후의 뒷맛으로 평가할 때 이 제품을 어느 정도 좋아하셔요?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 싫다	싫다	조금 싫다	조금 좋다	좋다	매우 좋다		

▶ 두 제품을 비교 하면서 평가하는 질문입니다...

6. 맛 보신 두 제품 간 차이가 느껴지십니까?..  
(복합된 외관적 차이는 제외하고 맛/후맛 등)

차이가 있다.       차이가 없다.

( )       ( )

---

7. 두 제품의 외관을 제외한 차이점에 대해 자세히 적어주세요...  
(예: 000 000이 000이 더 달/짭/짜게 느껴진다...)

.....

---

▶ 개선점에 대해 평가하는 질문입니다...

8. 각 제품에 대해 개선점을 적어주세요...

**263:** \_\_\_\_\_

**709:** \_\_\_\_\_

Figure 4-104. BCAA 함유 분말 영양죽 관능평가지.

③ 관능평가 결과

- 연령대(인원수): 50대(11), 60대(15), 70대(5)
- 성별(인원수): 남(16): 여(15)

Table 4-84. BCAA 함유 영양죽의 종합선호 및 종합기호 결과

제품명	종합기호	
	평균(9점)	CCI(100점)
BCAA미첨가	6.58	98.4
BCAA첨가	6.26	94.9

<참고>

\*종합기호 평균: 9점 척도로 5점은 보통임

\*CCI: 9점 척도 데이터로부터 '긍정반응' 또는 '부정반응'을 의미하는 6가지 통계적 확률 값을 계산하여, 100점 만점의 긍정/부정 지표로 변환한 것

[의미: 0~:확실히 부정적, 10~:상당히 부정적, 20~:대체로 부정적, 30~:다소부정적, 40~:약간부정적, 50~:약간긍정적, 60~:다소긍정적, 70~:대체로긍정적, 80~:상당히긍정적, 90~:확실히긍정적]

Chun & Cho Index (CCI): 미첨가

CCI (phobia) : 98.4 (0)

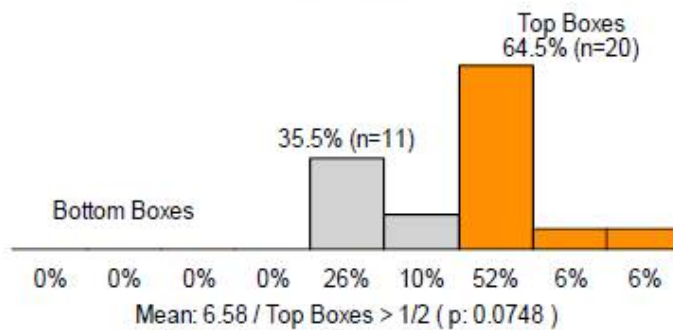
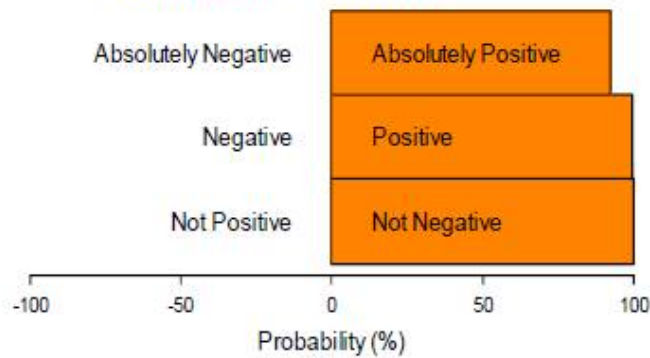


Figure 4-105. BCAA미첨가 분말 영양죽 세부 관능 품질 분석(CCI).

세부 종합기호 CCI: 미첨가

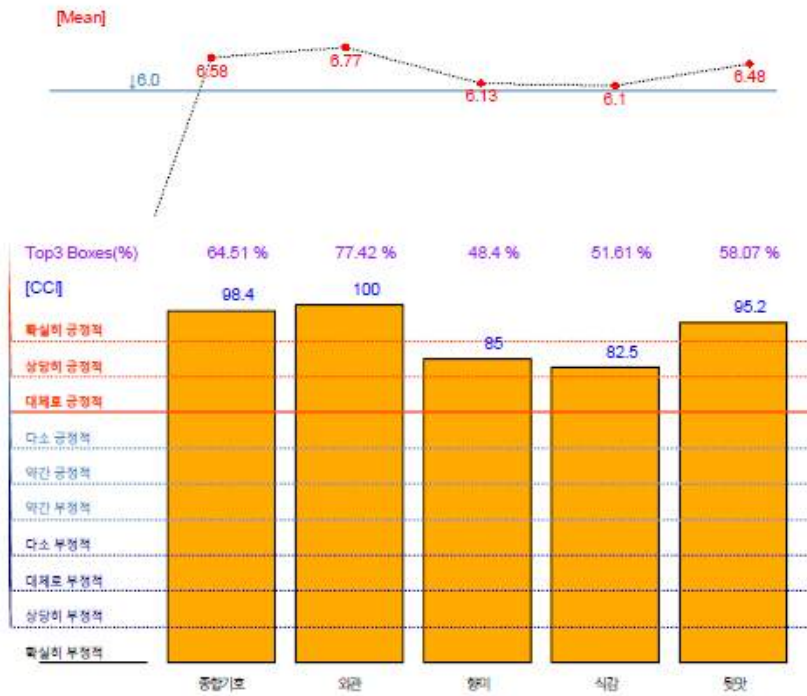


Figure 4-106. BCAA미첨가 분말 세부 종합 기호(CCI).

Chun & Cho Index (CCI): 첨가

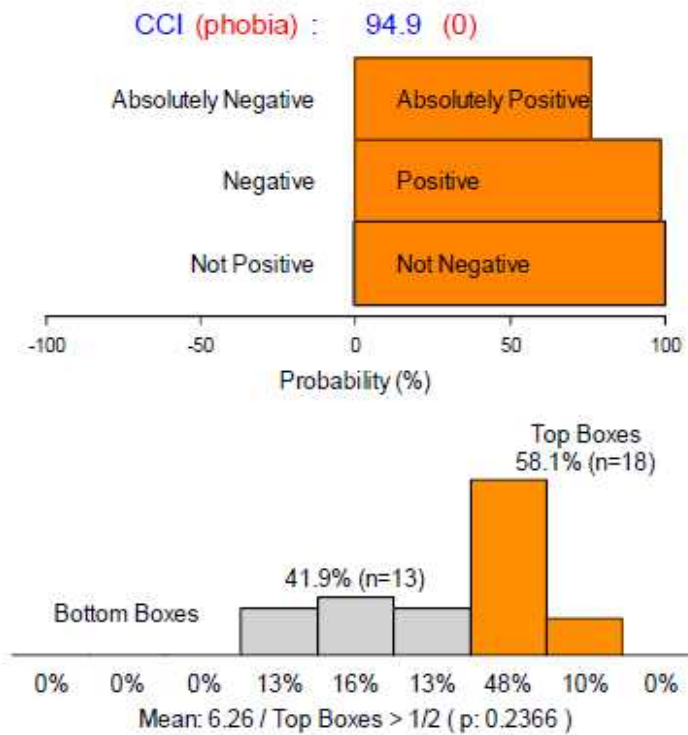


Figure 4-107. BCAA함유 분말 영양죽 세부 관능 품질 분석(CCI).



세부 종합 기호 CCI: 첨가

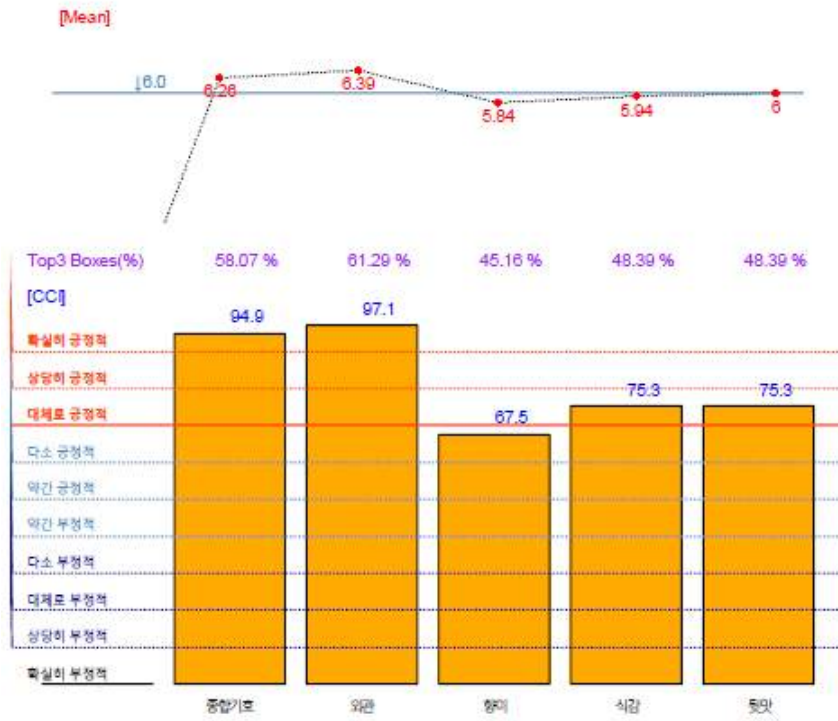


Figure 4-108. BCAA 함유 분말 세부 종합 기호(CCI).

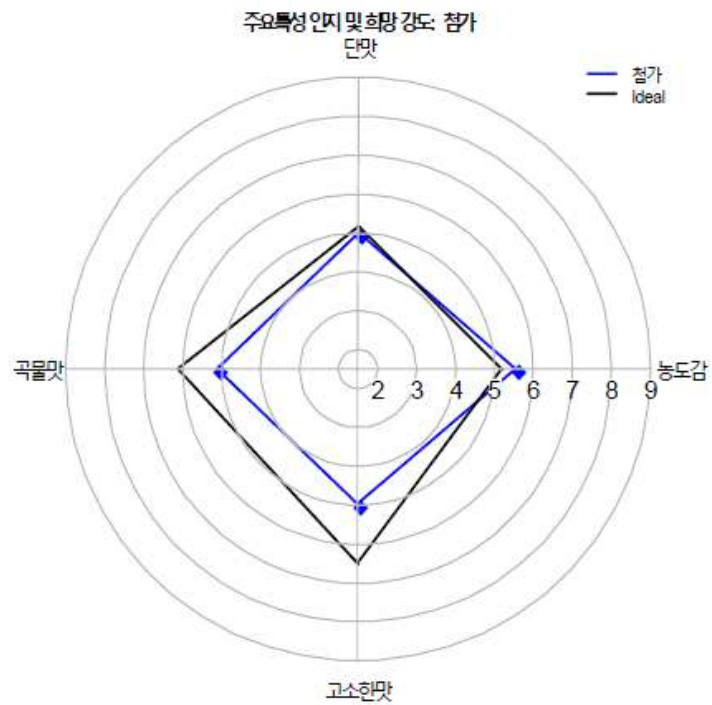


Figure 4-109. BCAA 함유 분말 영양숙의 소비자 개선 요구 방향.

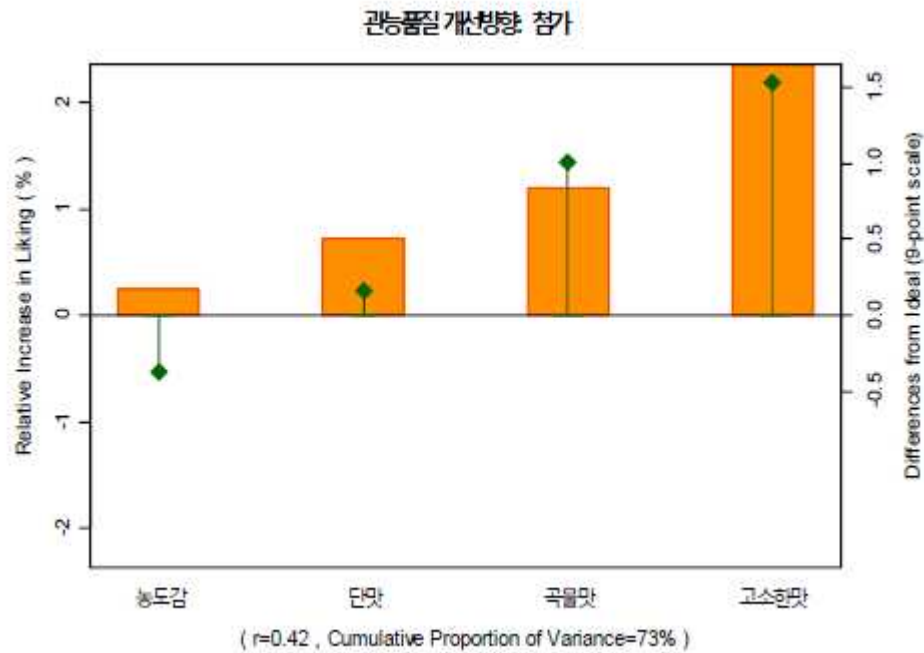


Figure 4-110. BCAA함유 분말 영양죽의 관능 품질 개선 방향.

- BCAA 미첨가 및 첨가 제품 비교 결과, CCI는 모두 90점 이상으로 확실히 긍정적 수준을 보임.
- 세부 종합 기호 분석 결과, 위의 두 제품 모두 종합기호, 외관, 향미, 식감, 뒷맛 항목에서 긍정적 수준을 보임.
- BCAA함유 분말 영양죽의 소비자 개선 요구 방향 분석 결과, 곡물맛과 고소한 맛이 강하게 변경되길 원하는 것으로 나타남. 따라서 위와 같은 소비자 개선 요구 방향을 반영하여 추가 제품 개선을 진행할 계획임.

- 영양성분 분석

제 D2016111572 호				<b>검 사 성 적 서</b>			
검체명		뉴케어데이필슈퍼그린(BCAA함유)		제조일자 (유통기한)			
의뢰인	업제명	대상(주)					
	주소	경기 이천시 마장면 표교리 125-8					
	성명	명형섭					
제조번호				접수년월일		2016-11-18	
검사의뢰목적				참고용		검체접수번호 D2016111572	
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.				검사관련 총 책임자: 김 천 희			
<b>시험항목</b>				<b>결과</b>		<b>검사담당자</b>	
열량(Kcal/100g)				412.69Kcal/100g		한아름	
탄수화물(%)				66.27%		한아름	
조단백질(%)				14.11%		남은진	
조지방(%)				10.13%		이선정	
나트륨(mg/100g)				523.30mg/100g		김세미	
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(mg/g)				94.28mg/g		박혜빈	
포화지방산(g/100g)				5.05g/100g		김은지	
트랜스지방산(g/100g)				0.05g/100g		김은지	
콜레스테롤(mg/100g)				불검출		김은지	
칼슘(mg/100g)				387.47mg/100g		김세미	
칼륨(mg/100g)				620.91mg/100g		김세미	
인(mg/100g)				452.50mg/100g		김세미	
아연(mg/100g)				3.86mg/100g		김세미	
비타민A(μg RE/100g)				762.84μg RE/100g		윤효선	
비타민B1(mg/100g)				0.94mg/100g		김수희	
비타민B2(mg/100g)				0.53mg/100g		김수희	
비타민B6(mg/100g)				0.68mg/100g		김수희	
비타민B12(μg/100g)				3.18μg/100g		김영옥	
비타민C(mg/100g)				50.84mg/100g		박상진	
구성아미노산(로이신)(mg/g)				20.62mg/g		이주영	
구성아미노산(이소로이신)(mg/g)				8.71mg/g		이주영	
구성아미노산(발린)(mg/g)				8.63mg/g		이주영	
2016년 12월 1일							
한국기능식품연구원							
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <a href="http://www.kbsi.re.kr">http://www.kbsi.re.kr</a> 전화번호 031-628-2200 FAX(031)628-0400-1							

Figure 4-111. BCAA함유 분말영양죽의 영양성분 공인기관 성적서.

(다) Instant BCAA 적용 제품 개발3(BCAA함유 검은깨맛 음료)

- 개발 방향
  - 식품의 유형은 환자용 균형영양식으로 식사대용 및 영양보충용 액상음료 형태임.
  - 23개의 미네랄 및 비타민을 함유하고 있으며, 환자의 면역 증강을 위해 instant BCAA를 캔당 200mg 함유하고 있음.
  - 고령자에게 부족하기 쉬운 칼슘 및 비타민D를 고함량 함유하고 있음.
  - 제품 개발 완료 후 유효 안정성 확인 및 외부 관능평가 실시(고령자 대상).
- 개발 방법
  - Lab test후 배합비 확정 및 생산 라인 적용 실험생산 실시(1500kg/1batch).
  - Instant BCAA를 캔당 200mg함유하도록 하여 다음과 같은 제조공정도(Fig.4-111)순서에 따라 투입함.
  - 사용된 원료는 Instant BCAA외에 대두분리단백, 말토덱스트린 등이 사용되었으며, 사용된 배합비는 다음과 같음.

① 실험생산 배합비

Table 4-85. BCAA함유 검은깨맛 음료 배합비

No	원료명	비율(%)
1	Instant BCAA	0.1
2	구연산칼륨	*,**
3	젤란DS	*,**
4	백설탕	*,**
5	카라기난	*,**
6	대두분리단백	*,**
7	채종유	*,**
8	옥수수유	*,**
9	말토덱스트린	*,**
10	미네랄믹스	*,**
11	탄산칼슘	*,**
12	비타민프리믹스	*,**
13	화이버졸	*,**
14	이소말토올리고당	*,**
15	저감미당	*,**
16	검은깨향	*,**
17	검은깨페이스트	*,**
18	염화칼륨	*,**

② 제조공정도

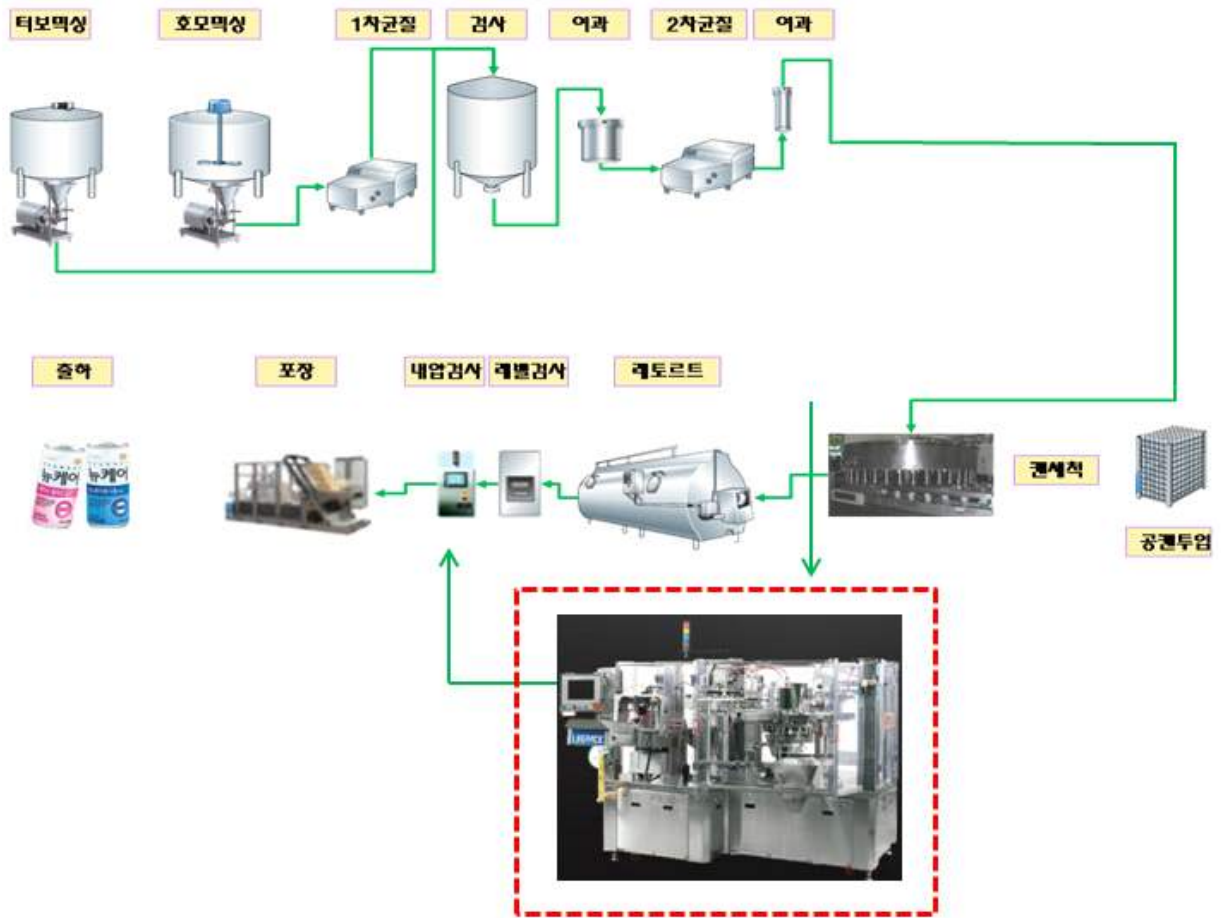


Figure 4-112. BCAA함유 검은깨맛 음료 제조공정도.

- 배합 탱크 내 instant BCAA용해 확인
- 1차 균질(150 bar) 후 2차 균질(400 bar) 진행

· 개발 결과



Figure 4-113. BCAA함유 검은깨맛 음료 최종 proto-type 제품.

- 보존성 검증

① 레토르트 결과

- 126°C, 11분 공정
- F<sub>0</sub> value : 21.57

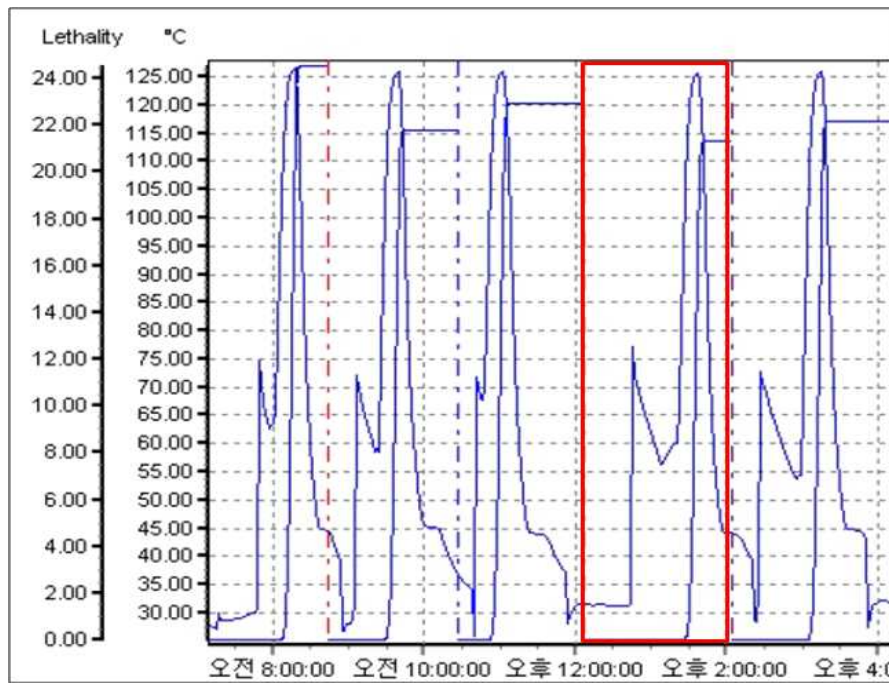


Figure 4-114. BCAA함유 검은깨맛 음료 126°C, 11분 살균 시 Fo value 측정 결과.

- 자사는 미생물 안정성 확보를 위해 F<sub>0</sub> value를 121°C구간에서 10 이상(센서위치:상단중앙)으로 설정하고 있음. 본 배합비에 따라 126°C, 11분간 레토르트를 거친 제품의 F<sub>0</sub>

value는 21.57로서 자사 규격을 만족시킴을 확인함.

- 살균 확인

Table 4-86. BCAA 함유 검은깨맛 음료의 미생물 기준규격

미생물학적 기준	공통 기준	세균발육(35°C,10일)	음성	품목당 3개/1회 별 자가분석 실시 (가온보존테스트실시, QA팀 결과 보고)
	법적 기준	일반세균(cfu/ml)	100이하	2개/ Lot. 별 자가분석 실시
		대장균군(cfu/ml)	음성	2개/ 품목.일, 자가분석 실시
		바실러스 세레우스(cfu/ml)	100이하	2개/ 품목.월 공인기관 또는 자가분석 실시

① 미생물 검사 확인

· 조건: 126°C, 11분 공정

· 자사는 미생물 안정성 확보를 위해 위와 같이 규격을 설정하고 있으며, 일반세균, 내열성세균, 발육고온균 검사를 식품공전법에 따라 진행하였으며 그 결과는 다음과 같음.

> 일반세균: 3반복 중 1샘플 30CFU/mL(생산lot별 5개 샘플x3반복 진행)

> 내열성세균: 3반복 중 1샘플 10CFU/mL(생산lot별 5개 샘플x3반복 진행)

> 발육고온균: 5반복 중 1제품에서 양성 반응(생산lot별 3개 샘플x5반복 진행)

· 일반세균 및 내열성세균 검사 결과 각 3반복 중 1샘플에서 양성반응 확인. 발육고온균의 경우에도 5반복 중 1샘플에서 양성반응을 확인하였으나, 반복실험 결과 불검출을 확인하였으며 외부환경으로 인한 오염으로 판단됨.

Table 4-87. BCAA 함유 검은깨맛 음료 126°C, 11분으로 살균 시 일반세균, 내열성세균 사멸 효과

Lot	일반세균 $10^{-1}$	일반세균 $10^{-3}$	내열성세균 $10^{-1}$	내열성세균 $10^{-3}$
A1-1-1	ND	ND	ND	ND
A1-1-2	ND	ND	ND	ND
A1-1-3	ND	ND	ND	ND
A1-2-1	ND	ND	ND	ND
A1-2-2	ND	ND	ND	ND
A1-2-3	ND	ND	ND	ND
A1-3-1	ND	ND	ND	ND
A1-3-2	3	ND	ND	ND
A1-3-3	ND	ND	ND	ND
A1-4-1	ND	ND	ND	ND
A1-4-2	ND	ND	ND	ND
A1-4-3	ND	ND	ND	ND
A1-5-1	ND	ND	ND	ND
A1-5-2	ND	ND	ND	ND
A1-5-3	ND	ND	ND	ND

Table 4-88. BCAA 함유 검은깨맛 음료의 126°C, 11분에서의 발육고온균 사멸 효과

Lot	일반세균 $10^{-1}$	일반세균 $10^{-3}$	내열성세균 $10^{-1}$	내열성세균 $10^{-3}$
B1-1-1	ND	ND	ND	ND
B1-1-2	ND	ND	ND	ND
B1-1-3	ND	ND	ND	ND
B1-2-1	ND	ND	1	ND
B1-2-2	ND	ND	ND	ND
B1-2-3	ND	ND	ND	ND
B1-3-1	ND	ND	ND	ND
B1-3-2	ND	ND	ND	ND
B1-3-3	ND	ND	ND	ND
B1-4-1	ND	ND	ND	ND
B1-4-2	ND	ND	ND	ND
B1-4-3	ND	ND	ND	ND
B1-5-1	ND	ND	ND	ND
B1-5-2	ND	ND	ND	ND
B1-5-3	ND	ND	ND	ND

Lot	발육고온균 $10^{-2}$	Lot	발육고온균 $10^{-2}$
B1-1-1	ND	A1-1-1	ND
B1-1-2	ND	A1-1-2	양성
B1-1-3	ND	A1-1-3	ND
B1-1-4	ND	A1-1-4	ND
B1-1-5	ND	A1-1-5	ND
B1-2-1	ND	A1-2-1	ND
B1-2-2	ND	A1-2-2	ND
B1-2-3	ND	A1-2-3	ND
B1-2-4	ND	A1-2-4	ND
B1-2-5	ND	A1-2-5	ND
B1-3-1	ND	A1-3-1	ND
B1-3-2	ND	A1-3-2	ND
B1-3-3	ND	A1-3-3	ND
B1-3-4	ND	A1-3-4	ND
B1-3-5	ND	A1-3-5	ND



-점도 측정

Table 4-89. BCAA함유 검은깨맛 음료 점도 측정 결과

Spindle	Speed(RPM)	Temperature(°C)	Run
RV-02	100	25	0:00:20
<b>*위의 조건에서 측정 결과*</b>			
Temperature(°C)	Viscosity(cP)	Torque(%)	
24.7	56.4	40	

- 물성 확인을 위한 점도 측정(조건: 24~25°C, RV-02 spindle, 100 rpm)
- 본 연구에서 개발한 BCAA함유 검은깨맛 음료의 경우 일반인 및 환자들도 섭취 가능한 경구용 영양음료로서 점도는 제품의 품질 특성 중 매우 중요한 요소중 하나임.
- 자사 규격으로 점도를 65 cP 이하로 설정하고 있으며 본 제품의 경우 점도가 56.4 cP로서 자사 규격을 만족시킴을 확인함.

- 유화 분석 결과 : Delta Backscattering

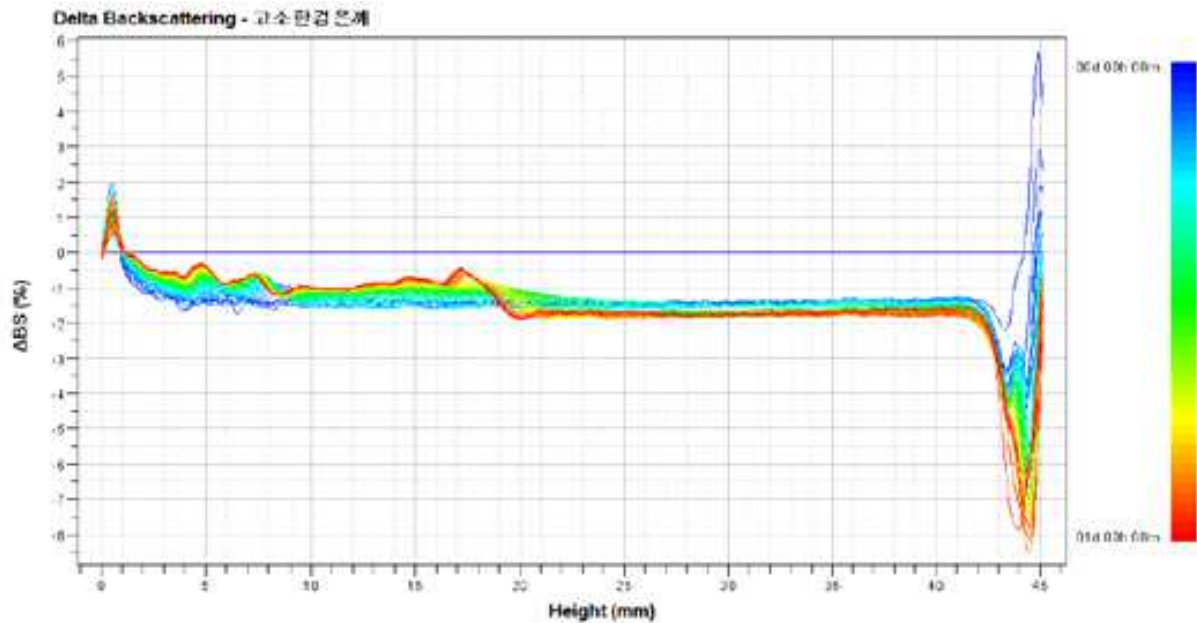


Figure 4-115. BCAA함유 검은깨맛 음료 제품의 유화분석 결과

- BCAA함유 검은깨맛 음료 제품의 유화 분석 결과(24시간), 응집 현상은 다소 개선된 것으로 보이나 BCAA입자 및 고함량의 검은깨 페이스트로 인해 침전현상이 발생하는 것으로 분석 됨.

- 관능평가(BCAA함유 검은깨맛 음료)

① 관능평가 실시

- 관능평가 전문기관 센소메트릭스 주식회사 의뢰
- 평가 샘플: BCAA미첨가 검은깨맛 음료, BCAA첨가 검은깨맛 음료
- 조사 대상: 50~80세 고령자 대상
- 검사 일시: 2015.11.07
- 검사 장소:(주)센소메트릭스 관능평가 센터(서울특별시 영등포구)
- 시료 준비: 상온 보관 후 제공
- 평가 인원: 31명
- 평가 시간: 14:00, 16:00
- 척도: 9점 척도

② 관능 평가지 작성

제품번호: **473**

성별: [ ]남 [ ]여 / 나이: 만 [ ]세 / 이름: [ ] / 번호: [ ]

본 설문은 센소메트릭스에서 진행되는 음료에 대한 조사로,  
**[음료의 맛]에 대하여 평가**를 주시길 바랍니다.

응답된 내용은 상주 보다 나은 음료 개발을 제공하는 데 소중한 자료로 사용될 것입니다.  
 설문지 또한 응답은 정답이 없으며, 응답 내용은 단지 통계자료로만 활용하게 될 것입니다.

< 설문 진행 순서 및 주의 사항 >

- 1) 앞에 붙어있는 **물**은 입안을 헹구고 시판과 유사하게 마십니다.
- 2) 정시의 **음료**와 비교하여 **색상**과 **향**의 차이가 있는지를 확인하시고 **음료의 맛**을 보면서 **질문**에 **차별**이 없도록 주시게 부탁드립니다.

= 불만 항목 포함 =

- [향과 맛]은 **향**이라는 항목과 **맛**이라는 항목과 [향(색기)은 **향**이라는 항목]으로 구분되어 있습니다.
- [향이라는 항목은 **향**이라는 항목]의 경우 **향**이라는 항목이고, **오른쪽이 좋아**라는 방향입니다.
- [향(색기)은 **향**이라는 항목]의 경우 **향**이라는 항목이고, **오른쪽은 향수**를 향해서, **가운데는 보통** 정도(세기)입니다.

- 3) 모든 불만 사항에 **불만**과 **질문**을 나누지 마시고 **질문**에 **불만**을 주시게 부탁드립니다.

♡ 설문지 응답 주셔서 대단히 감사합니다. ♡

---

▶ **전체적으로** 평가하는 질문입니다...

1. 전체적으로 평가할 때 이 음료는 얼마나 마음에 드세요?  
 (전체적인 색상, 향, 맛, 입안 느낌, 뒷맛 포함)

매우 싫다.  싫다.  중간 정도  좋다.  매우 좋다.

▶ **향**으로 **분류** 평가하는 질문입니다...

2. 향으로만 볼 때 이 음료는 얼마나 마음에 드세요? (색상 등)

매우 싫다.  싫다.  중간 정도  좋다.  매우 좋다.

2.1. 색상의 강함 정도는 어떠요?  
 약하다.  보통이다.  강하다.

2.2. (★) 색상이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 약하다.  보통이다.  강하다.

▶ **향**을 **말**으며 (향) 평가하는 질문입니다...

3. 향으로만 평가할 때 이 음료를 어느 정도 좋아하세요?

매우 싫다.  싫다.  중간 정도  좋다.  매우 좋다.

제품번호: **473.**

▶ 마시면서 (맛) 평가하는 질문입니다...

4. 맛으로 만 평가할 때 이 음료를 어느 정도 좋아하십니까?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 대단히 싫다                      싫다                      좋지도 싫지도 않다                      좋다                      대단히 좋다

4.1. 단맛의 강함 정도는 어때요?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 약하다                      약하다                      보통이다                      강하다                      아주 강하다

4.2. (★) 단맛이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 약하면 좋겠다                      약하면 좋겠다                      보통이면 좋겠다                      강하면 좋겠다                      아주 강하면 좋겠다

4.3. 구수함의 강함 정도는 어때요?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 약하다                      약하다                      보통이다                      강하다                      아주 강하다

4.4. (★) 구수함이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 약하면 좋겠다                      약하면 좋겠다                      보통이면 좋겠다                      강하면 좋겠다                      아주 강하면 좋겠다

4.3. 깨맛의 강함 정도는 어때요?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 약하다                      약하다                      보통이다                      강하다                      아주 강하다

4.4. (★) 깨맛이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 약하면 좋겠다                      약하면 좋겠다                      보통이면 좋겠다                      강하면 좋겠다                      아주 강하면 좋겠다

제품번호: **473.**

▶ 마시면서 (식감) 평가하는 질문입니다...

5. 입안에서의 느낌(맛 제외)만으로 평가할 때 이 음료를 어느 정도 좋아하십니까?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 대단히 싫다                      싫다                      좋지도 싫지도 않다                      좋다                      대단히 좋다

5.1. 텀텀함의 강함 정도는 어때요?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 약하다                      약하다                      보통이다                      강하다                      아주 강하다

5.2. (★) 텀텀함이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 약하면 좋겠다                      약하면 좋겠다                      보통이면 좋겠다                      강하면 좋겠다                      아주 강하면 좋겠다

5.3. 농도감 정도는 어때요?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 좋다                      좋다                      보통이다                      적다                      아주 적다

5.4. (★) 농도감이 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 강하면 좋겠다                      강하면 좋겠다                      보통이면 좋겠다                      적으면 좋겠다                      아주 약하면 좋겠다

제품번호: **473.**

▶ 먹고(삼키고) 나서 평가하는 질문입니다...

6. 마시고 난 후의 뒷맛으로 평가할 때 이 음료를 어느 정도 좋아하십니까?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 대단히 싫다                      싫다                      좋지도 싫지도 않다                      좋다                      대단히 좋다

6.1. 깔끔함 정도는 어때요?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 약하다                      약하다                      보통이다                      강하다                      아주 강하다

6.2. (★) 깔끔한 정도가 어떤 수준(정도) 이면 더 좋겠습니까?  
 1  2  3  4  5  6  7  8  9  
 아주 약하면 좋겠다                      약하면 좋겠다                      보통이면 좋겠다                      강하면 좋겠다                      아주 강하면 좋겠다

Figure 4-116. BCAA 함유 검은깨맛 음료 제품의 관능평가지.

③ 관능평가 결과

- 연령대(인원수): 50대(11), 60대(15), 70대(5)
- 성별(인원수): 남(16): 여(15)

Table 4-90. BCAA 함유 검은깨맛 음료의 종합선호 및 종합기호 결과

제품명	종합기호	
	평균(9점)	CCI(100점)
BCAA미첨가	5.77	58.7
BCAA첨가	5.26	47.1

<참고>

\*종합 기호 평균: 9점 척도로 5점은 보통임

\*CCI: 9점 척도 데이터로부터 '긍정반응' 또는 '부정반응'을 의미하는 6가지 통계적 확률 값을 계산하여, 100점 만점의 긍정/부정 지표로 변환한 것

[의미: 0~:확실히 부정적, 10~:상당히 부정적, 20~:대체로 부정적, 30~:다소부정적, 40~:약간부정적, 50~:약간긍정적, 60~:다소긍정적, 70~:대체로긍정적, 80~:상당히긍정적, 90~:확실히긍정적]

Chun & Cho Index (CCI): 미첨가

CCI (phobia) : 58.7 (0)

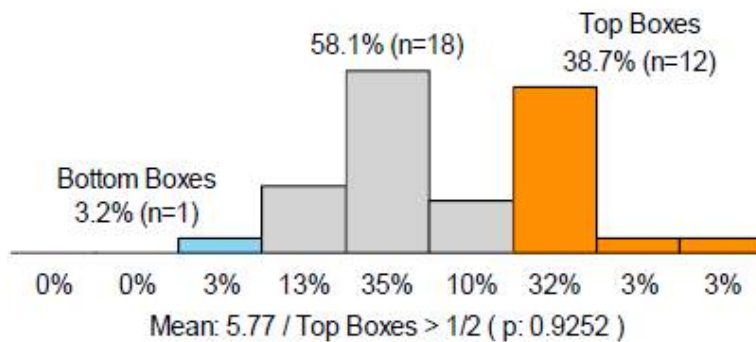
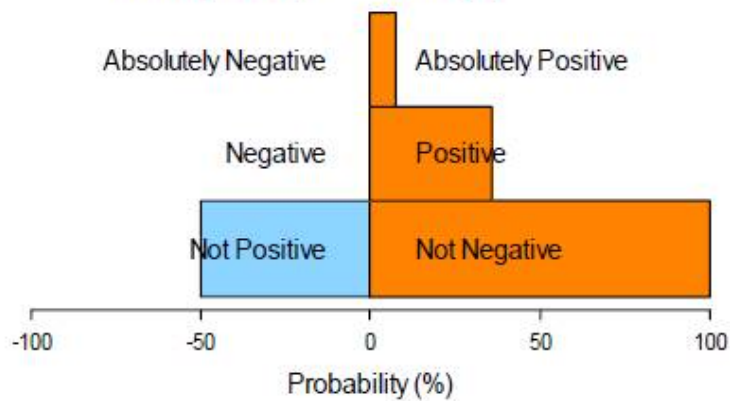


Figure 4-117. BCAA미첨가 검은깨맛 음료 세부 관능 품질 분석(CCI).



Figure 4-118. BCAA미첨가 검은깨맛 음료 세부 종합 기호(CCI).

### Chun & Cho Index (CCI): 첨가

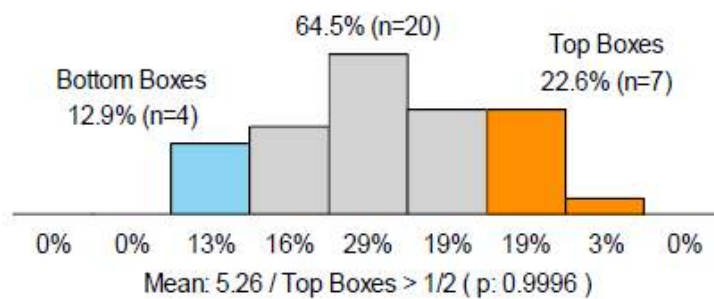
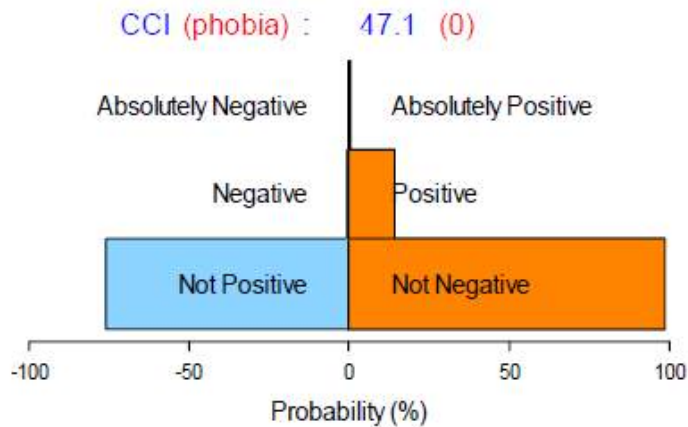


Figure 4-119. BCAA 첨가 검은깨맛 음료 세부 관능 품질 분석(CCI).



Figure 4-120. BCAA첨가 검은깨맛 음료 세부 종합 기호(CCI).

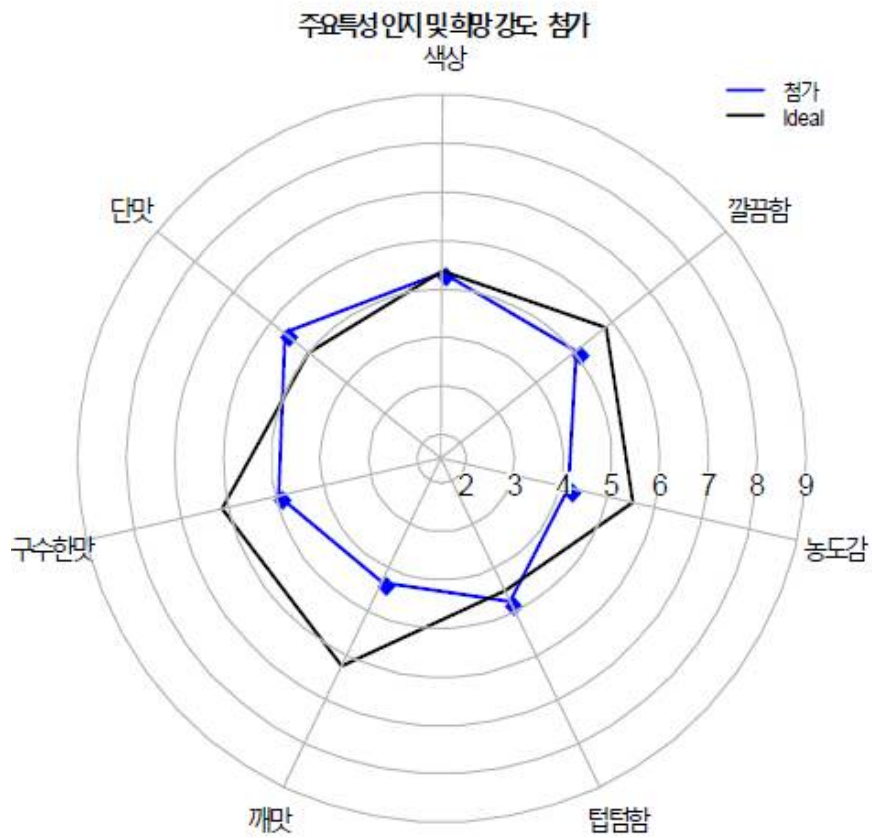


Figure 4-121. BCAA함유 검은깨맛 음료의 소비자 개선 요구 방향.

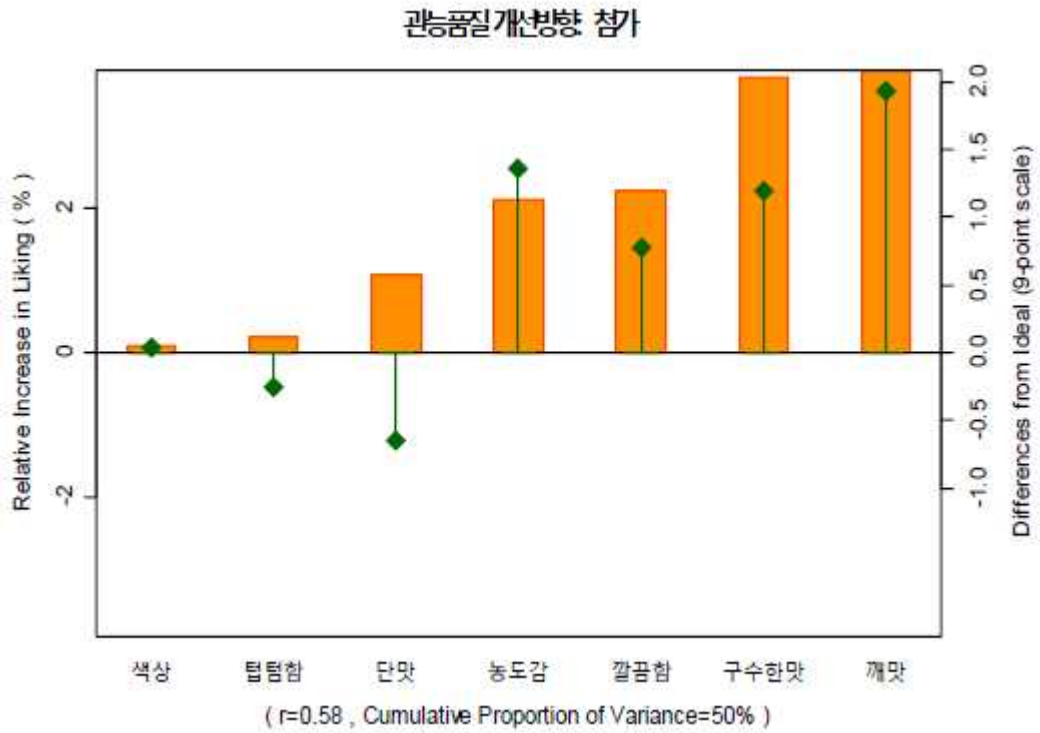


Figure 4-122. BCAA함유 검은깨맛 음료의 관능 품질 개선 방향.

- BCAA 미첨가 제품의 경우 향, 맛, 식감 모두 긍정적 수준을 보인 반면 BCAA첨가 제품의 경우 맛, 식감은 긍정적 수준을 보였으나, 뒷맛의 부정적 의견이 많아 개선이 필요할 것으로 보임.
- BCAA첨가 제품의 경우 ‘풍미가 좋지 않아 먹기 어렵다’, ‘뒷맛이 좋지 않고 텁텁하다’, ‘뒷맛의 쓴맛이 남는다’ 와 같은 소비자 의견이 나왔으며, 소비자 개선 요구 방향 조사 결과, 뒷맛의 짙음함, 구수한맛, 깨맛, 농도감이 강하게 변경되길 원하는 것으로 나타남.
- 이와 같은 결과는 BCAA특유의 향과 맛(쓴맛)에서 기인한 것으로 보이며, 이에 대한 마스킹 및 소비자 개선 요구사항을 반영한 추가 개선이 필요할 것으로 판단됨.

- 영양성분 분석

제 D2016111573 호		<b>검 사 성 적 서</b>	
검체명	뉴케어고소한검은깨(BCA함유)	제조일자 (유통기한)	
외뢰인	업체명	대상(주)	
	주 소	경기 이천시 마장면 표교리 125-8	
	성 명	명형섭	
제조번호		접수년월일	2016-11-18
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016111573

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
열량(Kcal/100g)	100.97Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	16.71%(식이섬유 2.88% 함유)	한아름
조단백질(%)	3.38%	남은진
조지방(%)	2.93%	이선정
나트륨(mg/100g)	40.79mg/100g	김세미
당류(과당,포도당,자당,백아당,유당)(mg/g)	24.95mg/g	박혜빈
포화지방산(g/100g)	0.34g/100g	김은지
트랜스지방산(g/100g)	0.01g/100g	김은지
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	김은지
식이섬유(%) [가법]	2.61%	김은영
식이섬유(%) [나법]	2.88%	조미주
칼슘(mg/100g)	99.08mg/100g	김세미
인(mg/100g)	88.71mg/100g	김세미
칼륨(mg/100g)	91.15mg/100g	김세미
마그네슘(mg/100g)	24.66mg/100g	김세미
철(mg/100g)	1.94mg/100g	김세미
염소(mg/100g)	96.27mg/100g	이소영
아연(mg/100g)	1.26mg/100g	김세미
구리(mg/100g)	0.12mg/100g	김세미
망간(mg/100g)	0.16mg/100g	김세미
비타민A( $\mu$ g RE/100g)	117.31 $\mu$ g RE/100g	윤효선
비타민B1(mg/100g)	0.40mg/100g	김수희
비타민B2(mg/100g)	0.25mg/100g	김수희
비타민B6(mg/100g)	0.34mg/100g	김수희
비타민B12( $\mu$ g/100g)	1.96 $\mu$ g/100g	김영옥



귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 원 희

시험항목	결과	검사담당자
비타민C(mg/100g)	34.92mg/100g	박상진
비타민D( $\mu$ g/100g)	1.55 $\mu$ g/100g	윤효선
비타민E(mg $\alpha$ -TE/100g)	1.61mg $\alpha$ -TE/100g	최지원
비타민K( $\mu$ g/100g)	11.58 $\mu$ g/100g	최지원
엽산( $\mu$ g/100g)	45.15 $\mu$ g/100g	김영옥
나이아신(mgNE/100g)	3.22mgNE/100g	김영옥
판토텐산(mg/100g)	0.53mg/100g	박상진
비오틴( $\mu$ g/100g)	24.18 $\mu$ g/100g	박상진
구성아미노산(로이신)(mg/g)	2.79mg/g	이주영
구성아미노산(이소로이신)(mg/g)	1.42mg/g	이주영
구성아미노산(발린)(mg/g)	1.49mg/g	이주영

[식이섬유]식품공전/제10.1.1.4.3. 식이섬유(가. 효소-중량법)/총식이섬유(TDF)

[식이섬유]식품공전/제10.1.1.4.3. 식이섬유(나. 액체크로마토그래피를 이용한 수용성 식이섬유의 정량)

2016 년 12 월 1 일

한국기능식품연구원



[사]한국건강기능식품협회 무궁 한국기능식품연구원 <http://www.kfsi.re.kr> 전화번호 031-628-2000 FAX(031)628-0400-1

Figure 4-123. BCAA 함유 검은깨맛 음료의 영양성분 공인기관 성적서.

(라) Instant BCAA 적용 제품 개발4(BCAA함유 발효녹즙 부추마늘삼채)

- 개발 방향
  - 식품의 유형은 과·채 주스로 BCAA를 함유한 발효녹즙의 형태임.
  - 소화기능이 좋지 않은 직장인 혹은 만성 피로를 호소하는 분 대상으로 제품 개발.
  - BCAA, 아르기닌, 부추, 흑마늘, 삼채, 밀싹, 보리싹, 마카 등 활력소재를 함유하고 있음.
  
- 개발 방법
  - Lab test후 배합비 확정 및 생산 라인 적용 실험생산 실시(40kg/1batch).
  - Instant BCAA를 함유하도록 하여 다음과 같은 제조공정도(Fig.4-124)순서에 따라 투입 함.
  - 사용된 원료는 Instant BCAA외에 클로렐라 채소혼합발효즙, 배 농축액 등이 사용되었으며, 사용된 배합비는 다음과 같음.

① 실험생산 배합비

Table 4-91. BCAA함유 발효녹즙 부추마늘삼채 배합비

No	원료명	비율(%)
1	Instant BCAA	0.004
2	유기케일(즙)	***
3	부추흑마늘삼채등혼합발효즙	***
4	클로렐라채소혼합발효즙	***
5	과인애플농축액	***
6	배농축액	***
7	DS식물발효추출원액	***
8	메이플시럽	***
9	레몬농축과즙	***
10	정제수	***

② 제조공정도

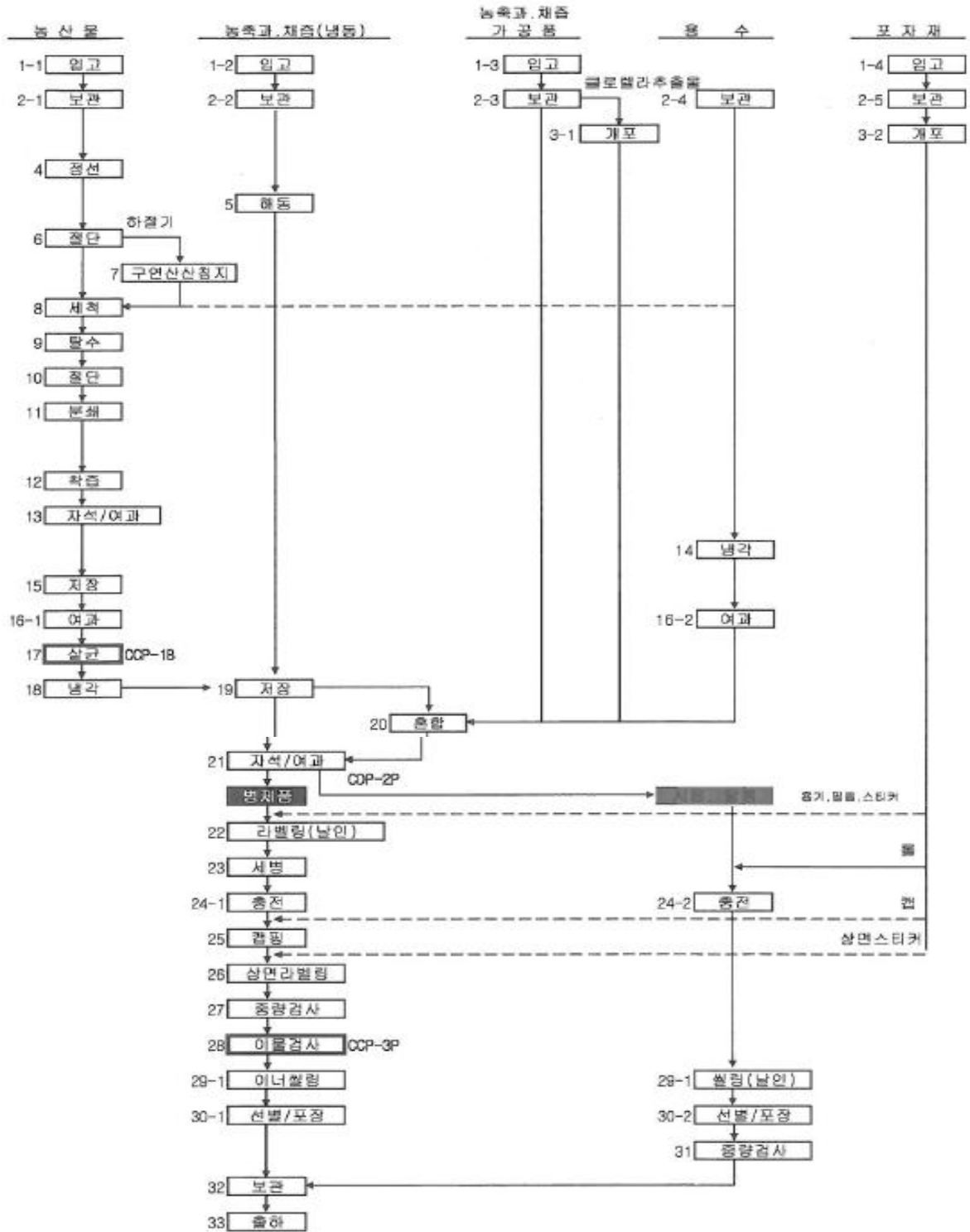


Figure 4-124. BCAA 함유 발효농축 부추마늘삼채 제조공정도.

• 개발 결과



Figure 4-125. BCAA 함유 발효녹즙 부추마늘삼채 최종 출시 제품 및 표지.

▶ 원재료명 및 함량

유기케일 17%(국산), 부추마늘삼채 등 혼합발효즙 8% (클로렐라추출물, 부추 21%, 흑마늘 4%, 삼채 2%, 밀싹, 보리싹, 마카농축액, 아르기닌, BCAA 혼합제제, 이소말토올리고당, 식물성유산균), 파인애플농축액, 배농축액, 클로렐라채소혼합발효즙, DS 식물발효추출원액, 메이플시럽, 레몬농축액

▶ 원재료 설명

1. 부추, 흑마늘, 삼채, 밀싹, 보리싹을 함께 식물성유산균으로 발효하였습니다.
2. 50가지의 산야초를 발효시킨 식물발효원액도 함께 담았습니다.
3. 아르기닌, BCAA도 함께 함유되어 활력충전 효과 UP!

Figure 4-126. BCAA 함유 발효녹즙 부추마늘삼채의 원재료명 및 제품 설명.

- 최종 제품 규격서

	제 품 규 격		문서번호		
			2016-09-28		
	발효녹즙 부마삼		개정일자		
			Ver. 2		
		개정번호			
		페이지			
		1/1			
<p>1. 적용 범위</p> <p>본 규격은 당사입장에서 생산하는 과·채물료(가열하지 아니한 제품 및 가열하지 아니한 원료가 함유된 제품)에 대하여 적용한다.</p>					
<p>2. 규격 기준</p>					
검사항목	검사방법	규격기준			비고
		기준	단위	검사주기	
성상	관능검사	고유의 색깔과 향미를 가지고 에미, 이취가 없어야 한다.		1회/일	자가검사
이물	X-ray법	1) 유리 : 불검출 2) 금속성 이물의 경우 : sus 2.0 mm 이상 불검출		1회/일	자가검사
당도	굴절당도계법	10.2 ± 1.0	Brix%	1회/일	자가검사
납	ICP법	0.3 이하	ng/kg	1회/일	위탁검사
카드뮴		0.1 이하	ng/kg	1회/일	위탁검사
세균수	식품공전	100,000 이하	CFU/mL	1회/일	자가검사
장출혈성대장균		음성	-	1회/일	자가검사
<i>B. cereus</i>		1,000 이하	CFU/mL	1회/일	자가검사
<i>Salmonella</i> spp.		음성	-	1회/년	자가검사
황색포도상구균		음성	-	1회/년	자가검사
<i>L. monocytogenes</i>		음성	-	1회/반기	자가검사
<i>C. parvuligans</i>		음성	-	1회/년	자가검사
보존료		GC/HPLC법	불검출	-	1회/년
잔류농약	안식향산으로서 0.6 이하		g/kg	위탁검사 {가열하지 아니한 원료가 함유된 제품}	
	파라옥시안식향산으로서 0.1 이하		g/kg		
잔류농약	불검출	-	1회/년	위탁검사	
<p>3. 보관 방법</p> <p>제품 냉동보관(2 ℃ ± 2)에 보관한다.</p>					

Figure 4-127. BCAA함유 발효녹즙 부추마늘삼채 제품 규격서.



③ 관능평가 결과

■ 부추 발효녹즙 관능평가 결과 (20160708)

no	성별	연령	색상		향		단맛		신맛		쓴맛		묵넘김		진함		만족도		전체결과	
			A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	남	50	3	4	3	3	3	4	3	4	3	3	3	4	3	4	3	4	3.0	3.8
2	남	40	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	4	3	4	3.9	3.8
3	남	50	4	4	3	3	4	4	4	3	3	3	3	4	4	4	3	3	3.6	3.5
4	여	40	5	4	3	3	4	4	3	2	3	3	4	4	3	3	4	3	3.6	3.3
5	여	50	4	4	5	4	4	2	4	4	4	4	3	4	4	3	3	4	3.9	3.6
6	여	40	5	5	4	4	3	4	4	4	5	5	3	4	4	3	3	4	3.9	4.1
7	남	40	4	4	4	4	4	5	4	5	4	5	4	5	4	4	4	5	4.0	4.6
8	남	50	4	4	4	3	3	3	3	4	2	3	3	3	3	3	3	3	3.1	3.3
9	남	50	3	4	4	3	4	3	4	3	4	3	3	4	4	3	4	2	3.8	3.1
10	여	50	4	4	3	4	4	4	4	4	3	3	4	4	4	4	4	4	3.8	3.9
11	남	30	3	3	3	3	3	4	4	4	4	2	2	3	4	3	4	3.0	3.5	
12	여	50	3	3	3	3	2	2	3	2	3	3	4	4	1	1	3	3	2.8	2.6
13	여	50	3	4	3	4	4	3	3	3	3	3	4	3	3	4	3	2	3.3	3.3
14	여	40	2	4	2	5	3	5	2	5	2	5	3	5	2	4	2	4	2.3	4.6
15	남	40	3	3	3	3	4	5	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3.1	3.9
16	남	40	4	3	2	3	3	4	4	3	3	4	4	3	4	3	3	4	3.4	3.4
17	남	40	3	3	3	5	3	5	3	3	4	4	3	5	4	2	3	4	3.3	3.9
18	남	40	3	3	2	3	3	2	4	4	3	4	3	4	3	3	3	4	3.0	3.4
19	여	50	3	4	3	4	3	4	4	4	3	4	3	4	3	3	4	4	3.3	3.9
20	남	40	4	4	4	3	4	3	4	3	5	3	5	3	4	3	5	3	4.4	3.1
21	남	30	5	5	5	4	5	4	5	4	4	5	5	5	3	5	5	4	4.6	4.5
22	남	40	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	3	3	3	3	3.3	3.3
23	여	30	4	4	2	3	3	4	4	3	3	3	4	5	4	4	3	4	3.4	3.8
24	여	30	4	3	3	3	3	4	3	4	2	4	2	4	3	4	2	4	2.8	3.8
25	남	50	2	5	3	4	2	4	3	3	3	3	3	4	3	4	3	4	2.8	3.9
26	여	50	4	4	4	4	3	4	3	5	4	4	3	5	3	3	3	4	3.4	4.1
27	남	50	3	4	4	3	4	2	4	2	4	2	3	3	3	3	3	3	3.5	2.8
28	여	50	4	5	3	4	3	3	3	4	3	3	4	4	3	4	3	4	3.3	3.9
29	여	50	4	4	3	3	2	2	4	4	3	3	4	4	4	4	3	3	3.4	3.4
30	여	50	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	5	3	4	3	5	3	4.3	3.0
31	남	50	4	3	5	4	3	3	4	4	3	3	5	5	4	3	4	3	4.0	3.5
32	남	50	4	4	4	3	4	3	4	3	4	4	4	2	3	4	5	4	4.0	3.4
33	남	50	4	3	4	4	4	2	4	4	5	3	5	5	4	4	4	3	4.3	3.5
합계			121	126	112	116	112	115	119	118	110	114	121	132	111	113	113	118	115	119
평균			3.7	3.8	3.4	3.5	3.4	3.5	3.6	3.6	3.3	3.5	3.7	4.0	3.4	3.4	3.4	3.6	3.48	3.61

Figure 4-129. BCAA함유 발효녹즙 부추마늘삼제A, B 제품의 세부 항목별 관능평가 점수(5점 척도).

Table 4-92. BCAA함유 발효녹즙 부추마늘삼제A, B 제품의 세부 항목별 종합 기호도(5점 척도)

시료	색상	향	단맛	신맛	묵넘김	전반적기호
①	3.67	3.39	3.39	3.61	3.67	3.53
②(선택)	3.82	3.52	3.48	3.58	4.00	3.66
p-value	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005

- 영양성분 분석


제 D2016080205 호			
<b>검 사 성 적 서</b>			
검체명	활력승전발효녹즙부추마늘삼채	제조일자 (유통기한)	2016-08-03 (2016-08-05)
의뢰인	업체명	대상(주)	
	주 소	서울 동대문구 권포대로 26 (신설동)	
	성 명	명행립	
제조번호		검수년월일	2016-08-03
검사의뢰목적	광고용	검체접수번호	D2016080205
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. <span style="float: right;">검사관련 총 책임자: 김 원 희</span>			
<b>시험항목</b>	<b>결과</b>	<b>검사담당자</b>	
열량(Kcal/100g)	36.82Kcal/100g	한아름	
단수화물(%)	8.55%	한아름	
조단백질(%)	0.43%	남은진	
조지방(%)	0.10%	이선정	
니트림(ng/100g)	8.18ng/100g	김세미	
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(ng/g)	67.28ng/g	이지연	
포화지방산(g/100g)	0.00g/100g	김은지	
트랜스지방산(g/100g)	불검출	김은지	
콜레스테롤(ng/100g)	불검출	이현아	
유리아미노산(로이신)(ng/100g)	1.87ng/100g	이주영	
유리아미노산(이소로이신)(ng/100g)	1.99ng/100g	이주영	
유리아미노산(발린)(ng/100g)	3.74ng/100g	이주영	
2016 년 8 월 17 일 <b>한국기능식품연구원</b>			
			
[사]한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <a href="http://www.khfi.or.kr">http://www.khfi.or.kr</a> 전화번호 051-628-0400-1			

Figure 4-130. BCAA 함유 발효녹즙 부추마늘삼채 제품의 영양성분 공인기관 성적서.



(마) Instant BCAA 적용 제품 개발5(BCAA함유 간편한 민들레 녹즙)

- 개발 방향
  - 식품의 유형은 과·채 주스로 BCAA를 함유한 녹즙의 형태임.
  - 간기능 개선 및 염증제거에 효과적인 소재를 적용하여 스트레스나 음주 등으로 지치고 피곤한 남성을 대상으로 제품 개발.
  - 간에 좋은 소재로 밀크씨슬, BCAA 등을 함유하고 있음.
- 개발 방법
  - Lab test후 배합비 확정 및 생산 라인 적용 실험생산 실시(40 kg/1batch).
  - Instant BCAA를 함유하도록 하여 다음과 같은 제조공정도(Fig.4-131)순서에 따라 투입 함.
  - 사용된 원료는 Instant BCAA외에 민들레등식물혼합추출액, 유기케일, 유기명일엽 등이 사용되었으며, 사용된 배합비는 다음과 같음.

① 실험생산 배합비

Table 4-93. BCAA함유 간편한 민들레 녹즙 배합비

No	원료명	비율(%)
1	Instant BCAA	0.07
2	민들레등식물혼합추출액	*,**
3	유기케일	*,**
4	유기명일엽	*,**
5	DS식물발효추출원액	*,**
6	파인애플농축액	*,**
7	클로렐라채소혼합발효즙	*,**
8	정제수	*,**

② 제조공정도

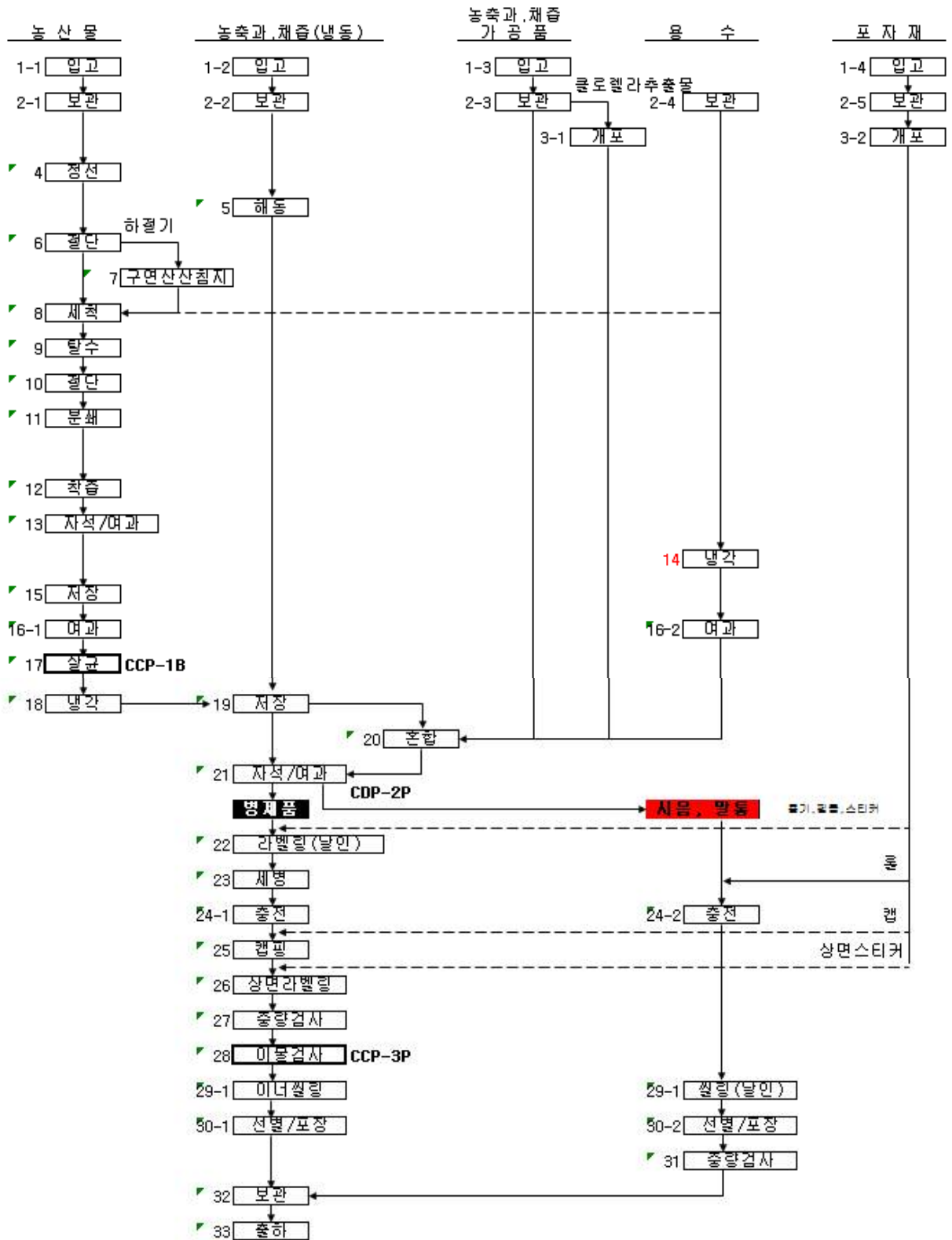


Figure 4-131. BCAA 함유 간편한 민들레 녹즙 제조공정도

• 개발 결과



Figure 4-132. BCAA함유 간편한 민들레 녹즙 최종 출시 제품 및 표지.

▶ 원재료명 및 함량

민들레등식물혼합추출액 30%(민들레,대추,감초,인진쑥,작약 등 19가지 한약재료, 수용성 밀크씨슬, **BCAA**)

▶ 원재료 설명

1. 민들레에는 콜린, 이노시톨, 실리마린 등 간에 좋은 성분들이 풍부하게 들어있어 간에 지방이 축적되는 것을 막아주는데 도움을 줄 수 있습니다.
2. 수용성 밀크씨슬은 간세포의 신진대사를 촉진, 간 세포의 파괴를 막아 간건강 유지 및 강화, 알코올 해독을 원활하게 하여 숙취해소에도 좋습니다.

▶ 제품 특징

1. 간에 좋은 민들레를 19가지 한약재료와 함께 추출한 녹즙입니다.
2. 국산 토종 흰 민들레를 사용하여 효과를 더욱 배가 시켰습니다.
3. **수용성 밀크씨슬과 BCAA를 추가로 함유하여 간에 좋습니다.**
4. 각종 스트레스와 야근/회식으로 지치고 피곤한 현대인을 위한 녹즙입니다.

Figure 4-133. BCAA함유 간편한 민들레 녹즙의 원재료 및 제품 특징.

- 최종 제품 규격서

	제 품 규 격		문서번호																																																																																													
			개정일자																																																																																													
	간편한 민들레 녹즙		개정번호																																																																																													
			페이지																																																																																													
				2018-03-31																																																																																												
				Ver.5																																																																																												
				1/1																																																																																												
<p>1. 적용 범위</p> <p>본 규격은 당사업장에서 생산하는 과,채용료(가열하지 아니한 채형 및 가열하지 아니한 원료가 함유된 제품)에 대하여 적용한다.</p>																																																																																																
<p>2. 규격 기준</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">검사항목</th> <th rowspan="2">검사방법</th> <th colspan="3">규격기준</th> <th rowspan="2">비고</th> </tr> <tr> <th>기준</th> <th>단위</th> <th>검사주기</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>형상</td> <td>관능검사</td> <td colspan="2">고유의 색택과 향미를 가지고 예미, 이취가 없어야 한다.</td> <td>1회/일</td> <td>자기검사</td> </tr> <tr> <td>이물</td> <td>X-ray법</td> <td colspan="2">1) 유리 : 불검출 2) 금속성 이물의 경우 : sus 2.0 mm 이상 불검출</td> <td>1회/일</td> <td>자기검사</td> </tr> <tr> <td>당도</td> <td>굴절당도계법</td> <td>6.8 ± 0.8</td> <td>Brix%</td> <td>1회/일</td> <td>자기검사</td> </tr> <tr> <td>납</td> <td rowspan="2">ICP법</td> <td>0.3 이하</td> <td>ng/kg</td> <td>1회/일</td> <td>위탁검사</td> </tr> <tr> <td>카드뮴</td> <td>0.1 이하</td> <td>ng/kg</td> <td>1회/일</td> <td>위탁검사</td> </tr> <tr> <td>세균수</td> <td rowspan="8">식품공전</td> <td>100,000 이하</td> <td>CFU/mL</td> <td>1회/일</td> <td>자기검사</td> </tr> <tr> <td>장출혈성대장균</td> <td>음성</td> <td>-</td> <td>1회/일</td> <td>자기검사</td> </tr> <tr> <td><i>B. cereus</i></td> <td>1,000 이하</td> <td>CFU/mL</td> <td>1회/일</td> <td>자기검사</td> </tr> <tr> <td><i>S. aureus</i> spp.</td> <td>음성</td> <td>-</td> <td>1회/년</td> <td>자기검사</td> </tr> <tr> <td>황색포도상구균</td> <td>음성</td> <td>-</td> <td>1회/년</td> <td>자기검사</td> </tr> <tr> <td><i>L. monocytogenes</i></td> <td>음성</td> <td>-</td> <td>1회/반기</td> <td>자기검사</td> </tr> <tr> <td><i>C. parvuligenus</i></td> <td>음성</td> <td>-</td> <td>1회/년</td> <td>자기검사</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">보존료</td> <td rowspan="3">GC/HPLC법</td> <td>불검출</td> <td>-</td> <td rowspan="3">1회/년</td> <td>위탁검사 (가열하지 아니한 제품)</td> </tr> <tr> <td>면식황산으로서 0.6 이하</td> <td>g/kg</td> <td>위탁검사 (가열하지 아니한 원료가 함유된 제품)</td> </tr> <tr> <td>파라옥시안식황산으로서 0.1 이하</td> <td>g/kg</td> <td></td> </tr> <tr> <td>공유농약</td> <td></td> <td>불검출</td> <td>-</td> <td>1회/년</td> <td>위탁검사</td> </tr> </tbody> </table>					검사항목	검사방법	규격기준			비고	기준	단위	검사주기	형상	관능검사	고유의 색택과 향미를 가지고 예미, 이취가 없어야 한다.		1회/일	자기검사	이물	X-ray법	1) 유리 : 불검출 2) 금속성 이물의 경우 : sus 2.0 mm 이상 불검출		1회/일	자기검사	당도	굴절당도계법	6.8 ± 0.8	Brix%	1회/일	자기검사	납	ICP법	0.3 이하	ng/kg	1회/일	위탁검사	카드뮴	0.1 이하	ng/kg	1회/일	위탁검사	세균수	식품공전	100,000 이하	CFU/mL	1회/일	자기검사	장출혈성대장균	음성	-	1회/일	자기검사	<i>B. cereus</i>	1,000 이하	CFU/mL	1회/일	자기검사	<i>S. aureus</i> spp.	음성	-	1회/년	자기검사	황색포도상구균	음성	-	1회/년	자기검사	<i>L. monocytogenes</i>	음성	-	1회/반기	자기검사	<i>C. parvuligenus</i>	음성	-	1회/년	자기검사	보존료	GC/HPLC법	불검출	-	1회/년	위탁검사 (가열하지 아니한 제품)	면식황산으로서 0.6 이하	g/kg	위탁검사 (가열하지 아니한 원료가 함유된 제품)	파라옥시안식황산으로서 0.1 이하	g/kg		공유농약		불검출	-	1회/년	위탁검사
검사항목	검사방법	규격기준					비고																																																																																									
		기준	단위	검사주기																																																																																												
형상	관능검사	고유의 색택과 향미를 가지고 예미, 이취가 없어야 한다.		1회/일	자기검사																																																																																											
이물	X-ray법	1) 유리 : 불검출 2) 금속성 이물의 경우 : sus 2.0 mm 이상 불검출		1회/일	자기검사																																																																																											
당도	굴절당도계법	6.8 ± 0.8	Brix%	1회/일	자기검사																																																																																											
납	ICP법	0.3 이하	ng/kg	1회/일	위탁검사																																																																																											
카드뮴		0.1 이하	ng/kg	1회/일	위탁검사																																																																																											
세균수	식품공전	100,000 이하	CFU/mL	1회/일	자기검사																																																																																											
장출혈성대장균		음성	-	1회/일	자기검사																																																																																											
<i>B. cereus</i>		1,000 이하	CFU/mL	1회/일	자기검사																																																																																											
<i>S. aureus</i> spp.		음성	-	1회/년	자기검사																																																																																											
황색포도상구균		음성	-	1회/년	자기검사																																																																																											
<i>L. monocytogenes</i>		음성	-	1회/반기	자기검사																																																																																											
<i>C. parvuligenus</i>		음성	-	1회/년	자기검사																																																																																											
보존료		GC/HPLC법	불검출	-	1회/년	위탁검사 (가열하지 아니한 제품)																																																																																										
	면식황산으로서 0.6 이하		g/kg	위탁검사 (가열하지 아니한 원료가 함유된 제품)																																																																																												
	파라옥시안식황산으로서 0.1 이하		g/kg																																																																																													
공유농약		불검출	-	1회/년	위탁검사																																																																																											
<p>3. 보관 방법</p> <p>제품 냉동장고(2 ℃ ± 2)에 보관한다.</p>																																																																																																

Figure 4-134. BCAA 함유 간편한 민들레 녹즙 제품 규격서.

- 관능평가(BCAA 함유 간편한 민들레 녹즙)

① 관능평가 실시

- 자사 내 직원 대상 관능평가 실시
- 평가 샘플: BCAA 함유 간편한 민들레 녹즙(자사) 1종, 경쟁사 1종
- 검사 일시: 2016.03.11
- 시료 준비: 냉장 보관 후 제공
- 평가 인원: 총 35명
- 척도: 5점 척도

② 관능 평가지 작성

**관능 만족도 조사**

1. 본인의 성별은? (여권식)    1) 남성    2) 여성    3) 30대    4) 40대    5) 50대 이상

2. 본인의 연령은(여권식)    1) 20대    2) 30대    3) 40대    4) 50대 이상

**\*\* 샘플을 잘 살펴보고 맛 보신 후, 질문에 솔직하게 답해주시기 바랍니다.(5점 만점) \*\***

3. 색깔에 대한 만족도는?

A: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

B: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

4. 향에 대한 만족도는?

A: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

B: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

5. 단맛에 대한 만족도는?

A: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

B: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

6. 신맛에 대한 만족도는?

A: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

B: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

7. 쓴맛에 대한 만족도는?

A: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

B: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

8. 부드러운 데면(촉감) 만족도는?

A: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

B: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

9. 진한 정도에 대한 만족도는?

A: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

B: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

10. 전체적인 만족도는?

A: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

B: 1) 매우 싫다    2) 싫다    3) 보통    4) 좋다    5) 매우 좋다

11. 제품에 대해 하시고픈 말씀을 자유롭게 말씀해주세요

소중한 참여에 감사 드립니다.  
수고하셨습니다.

Figure 4-135. BCAA 함유 간편한 민들레 녹즙 관능평가 설문지.

③ 관능평가 결과

■ 간편한 민들레 관능평가 결과 (20160311)

- 5가지 항목에 대한 만족도 조사  
 - 5점 척도 : 1 매우 싫다 2 싫다 3 보통 4 좋다 5 매우 좋다

no	성별	연령	색상		향		단맛		신맛		쓴맛		목넘김		진한		전체		평균	
			A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	남	50	3	5	5	4	3	3	4	4	4	4	3	4	4	3	3	4	3.625	3.875
2	남	50	3	4	3	3	3	4	3	3	3	3	3	4	3	3	3	4	3	3.5
3	남	50	2	4	3	3	2	4	3	3	3	4	3	4	4	3	3	3	2.875	3.5
4	남	50	4	4	4	3	4	3	3	3	4	4	2	4	4	3	3	3	3.5	3.375
5	남	50	4	4	4	3	3	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4	3.625	3.875
6	여	50	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	3.625
7	여	50	4	4	4	3	4	3	4	3	4	2	5	3	4	4	5	4	4.125	3.25
8	여	50	5	3	4	4	4	3	4	3	4	3	4	4	4	4	4	3	4.125	3.375
9	여	40	4	4	4	3	4	3	5	5	4	4	4	4	4	3	4	4	4.125	3.75
10	여	40	4	4	4	3	4	3	4	3	4	3	5	5	4	4	4	3	4.125	3.5
11	남	50	4	3	4	2	4	3	4	3	4	2	4	2	4	3	4	2	4	2.5
12	남	50	5	3	4	2	5	2	4	3	3	3	5	3	4	3	5	3	4.375	2.75
13	남	50	2	5	3	3	2	4	2	4	3	3	3	5	2	5	3	5	2.5	4.25
14	남	50	2	4	2	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2.75	3.25
15	남	40	4	2	4	3	3	2	3	3	3	1	3	2	3	3	4	2	3.375	2.25
16	남	30	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	3	4	3	3.5	3.25
17	남	40	3	3	2	2	3	3	2	2	4	3	4	3	4	2	3	2	3.125	2.5
18	여	50	4	4	4	3	4	2	4	4	4	3	4	2	4	3	4	3	4	3
19	여	50	4	4	4	3	4	4	3	3	3	4	4	4	4	4	4	3	3.75	3.625
20	여	40	4	4	3	4	4	3	3	3	3	3	4	3	4	4	4	4	3.625	3.5
21	여	30	4	4	4	3	4	3	3	3	4	3	3	4	5	3	4	3	3.875	3.25
22	여	30	3	3	4	2	3	3	3	3	3	2	4	2	4	3	4	2	3.5	2.5
23	남	40	4	4	3	3	4	2	3	3	4	2	4	2	5	2	4	1	3.875	2.375
24	여	50	4	4	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	3	3.875	3.625
25	남	50	4	2	4	3	3	2	4	2	4	2	3	4	4	2	4	2	3.75	2.375
26	남	50	3	3	3	3	2	1	4	2	4	2	3	4	4	3	3	2	3.25	2.5
27	여	40	4	5	3	4	2	4	3	4	3	4	2	4	3	5	3	5	2.875	4.375
28	여	50	4	5	4	4	3	4	4	5	3	3	5	5	2	2	4	4	3.625	4
29	여	50	4	4	4	4	2	4	3	4	2	3	4	4	3	2	2	4	3	3.625
30	남	50	3	3	4	3	4	3	3	3	4	3	4	3	3	3	3	3	3.5	3
31	남	40	4	4	4	3	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4	2	2	3.125	3
32	남	50	4	3	4	3	3	3	3	3	3	3	4	3	3	4	3	4	3.375	3.25
33	여	40	4	4	3	3	4	3	3	3	3	3	4	3	4	3	3	4	3.5	3.25
34	남	50	3	4	3	4	2	4	4	5	3	4	3	4	4	3	3	3	3.125	3.875
35	남	40	4	3	3	3	3	4	4	3	3	4	3	4	3	4	3	3	3.25	3.625
합계			129	131	125	110	115	108	119	116	120	108	128	123	130	114	124	111	124	115
평균			3.7	3.7	3.6	3.1	3.3	3.1	3.4	3.3	3.4	3.1	3.7	3.5	3.7	3.3	3.5	3.2	3.54	3.29

Figure 4-136. BCAA함유 간편한 민들레 녹즙(자사) 및 경쟁사 제품의 세부 항목별 관능평가 점수(5점 척도).

Table 4-94. BCAA함유 간편한 민들레 녹즙(자사) 및 경쟁사 제품의 세부 항목별 종합 기호도(5점 척도)

시료	색상	향	단맛	신맛	목넘김	전반적기호
①(선정)	3.69	3.57	3.29	3.40	3.66	3.54
②	3.74	3.14	3.09	3.31	3.51	3.17
p-value	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005


제 D2016032394 호 <span style="font-size: 1.5em; font-weight: bold;">검 사 성 적 서</span>			
업체명	관련현명들레	제조일자 (유통기한)	2016-03-29 (2016-04-02)
뢰뢰인	업체명	대성(주)	
	주 소	서울 동대문구 천호대로 26 (성일동)	
	상 명	덜헝헝	
제조번호		검수년월일	2016-03-29
검사의뢰목적	황고유	검체검수번호	D2016032394
귀하가 우리 연구원에 검사뢰기한 결과는 다음과 같습니다. <span style="float: right;">검사관련 총 책임자: 김 권 외</span>			
시험항목	결과	검사담당자	
열량(Kcal/100g)	24.11Kcal/100g	한아름	
탄수화물(%)	4.51%	한아름	
포도당질(%)	1.09%	김은영	
조지방(%)	0.19%	이선정	
나트륨(mg/100g)	15.22mg/100g	이은이	
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(mg/g)	40.60mg/g	이지연	
포화지방산(g/100g)	0.00g/100g	김은지	
트랜스지방산(g/100g)	불검출	김은지	
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	이현아	
유리아미노산(포아신)(mg/100g)	37.37mg/100g	이주영	
유리아미노산(이소모이신)(mg/100g)	20.08mg/100g	이주영	
유리아미노산(발린)(mg/100g)	22.76mg/100g	이주영	
2016년 4월 11일 <span style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">한국기능식품연구원</span>			
			
(사)한국기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <a href="http://www.kfci.re.kr">http://www.kfci.re.kr</a> 전화: 02-431-8324-0400-1			

Figure 4-137. BCAA 함유 간편한 민들레 제품의 영양성분 공인기관 성적서.

(3) Instant BCAA 적용 제품개발

- Instant BCAA를 함유한 2종의 젤(뉴케어 망고젤, 뉴케어 복숭아젤) 형태 제품 및 2종의 녹즙 형태(활력충전 발효녹즙 부추마늘삼채, 간편한 민들레) 제품을 포함하여 총 4종의 제품을 최종 출시하여 판매함.
- 출시 약 8개월동안 총 2억8천만원 수준의 매출액을 달성하였으며, 이 후 3년간 13억원 이상의 매출액을 달성할 것이라고 판단됨. (Fig. 4-138)
- 연구결과를 통해 개발된 instant BCAA 식품 소재를 활용한 최종 제품화는 사회·경제적 측면에서 매우 큰 의미를 가짐.

구분	제품명	제품사진	제품 출시일	매출액 (개발후 현재까지)	향후 3년간 매출 목표
1	뉴케어 망고젤		16.04	4천3백만원	2억원
2	뉴케어 복숭아젤		16.04	4천1백만원	2억원
3	활력충전발효녹즙 부추마늘삼채		16.10	4천6백만원	3억원
4	간편한 민들레		16.05	1억5천만원	6억원
총 매출액 합계				2억8천만원	13억원

Figure 4-138. 연구결과를 활용한 최종 4종 제품의 매출액 및 향후 목표.



## 제5절. 연구성과

### 가. 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식재산권		기술이전	-사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용홍보		기타 (타연구용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
										SCI	비SCI						
최종목표	4	4	1	3					11		6		4		2		
1차년도	목표	1		1					2		-		1		2		
	실적	4		1			2		3		5		1		2		
2차년도	목표	3	1						4		3		1				
	실적	1					3		7		7		3		1		
3차년도	목표		3		3				5		3		2				
	실적	2	1				1		4		7		3				
소계	목표	4	4	1	3				11		3		4		2		
	실적	7	1	1			6		14		19		7		3		
종료 1차년도				1					1		2		2				
종료 2차년도									1								
종료 3차년도																	
종료 4차년도																	
종료 5차년도																	
소계				1					2		2		2				
합계		7	1	1			6		14		19		7		3		

### 나. 지식재산권

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격], **신품종, 프로그램개발** 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별 로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다]

구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	마이크로유체 칩을 이용한 나노크기의 알지네이트 하이드로겔의 제조방법	대한민국	장관식, 박경민, 홍성철, 정호섭, 김기성	2014.09.17	10-2014-0123662				
2	분지아미노산을 유효성분으로 함유하는 항산화 기	대한민국	백현동, 장관식, 최승준,	2014.09.17	10-2014-0123655				

	능성 식품, 사료 및 약학적 조성물		이규환, 이재훈, 진혜주, 김다희						
3	분지아미노산을 유효성분으로 함유하는 염증 개선 기능성 조성물	대한민국	백현동, 장관식, 박은주, 최승준, 이규환, 이재훈, 진혜주, 김다희	2014.11.17	10-2014-0160317				
4	분지아미노산을 유효성분으로 함유하는 암예방 및 항암 기능성 조성물	대한민국	백현동, 장관식, 박은주, 진혜주, 이규환, 최승준, 이재훈, 김다희	2014.11.17	10-2014-0160297				
5	신규의 동결건조 보조제 및 새로운 인지질 용해용 혼합용매를 이용한 리포솜 동결분체의 제조방법	대한민국	장관식, 박경민, 홍성철, 양은혜	2015.09.18	10-2015-0132128	장관식, 박경민, 홍성철, 양은혜	2016.12.13	10-1687735	
6	분지쇄 아미노산을 포함하는 액상 현탁조성물 및 그 제조방법	대한민국	최승준, 홍시락	2016.01.20	10-2016-0006822				
7	신규의 동결건조 보조제 및 새로운 인지질 용해용 혼합용매를 이용한 리포솜 동결분체의 제조방법	PCT	장관식, 박경민, 양은혜	2016.09.13	PCT/KR2016/010387				

다. 논문게재 및 학술회의 발표

(1) 논문게재

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1 (2014)	A new method for determining	J. Food	최승준,	38(3)	영국	Wiley-Blackwell	SCI

	the emulsion stability index by backscattering light detection	Process Eng.	장관식				
2 (2014)	Double-layered microparticles with enzyme-triggered release for the targeted delivery of water-soluble bioactive compounds to small intestine	Food Chem.	박경민, 장관식	161	영국	Elservier SCI Ltd.	SCI
3 (2014)	Citral degradation in micellar structures formed with polyoxyethylene-type surfactants	Food Chem.	박성준, 최승준	170(1)	영국	Elservier SCI Ltd.	SCI
4 (2015)	Characterization of Physicochemical Properties of Spray-dried Solid Dispersions Loaded with Unmodified Crystalline Fenofibrate	Curr. Pharm. Anal.	Abid Mahmood Yousaf, 윤철순, 최한곤, 장관식	11(2)	아랍에미 레이트	Bentham Science Publ. Ltd.	SCI
5 (2015)	Effect of Sodium Taurocholate on Omeprazole Buccal Adhesive Tablet: Physicochemical Characterization and Pharmacokinetics in Hamster	Curr. Pharm. Anal.	조관형, 최한곤, 오의철, 장관식	11(2)	아랍에미 레이트	Bentham Science Publ. Ltd.	SCI
6 (2015)	AOT/isooctane reverse micelles with a microaqueous core act as protective shells for enhancing the thermal stability of Chromobacterium viscosum lipase	Food Chem.	홍성철, 박경민, 장관식	179	영국	Elservier SCI Ltd.	SCI
7 (2015)	Influence of the hydrophilic head size and hydrophobic tail length of surfactants on the ability of micelles to stabilize citral	J. Sci. Food Agric.	홍시락, 박성준, 최승준	98(9)	영국	Wiley-Bl ackwell	SCI
8 (2015)	Solid self-nanoemulsifying drug delivery system(SNEDDS) for enhanced oral bioavailability of poorly water-soluble tacrolimus: physicochemical characterisation and pharmacokinetics	J. Microencapsul.	서영기, 최한곤, 윤철순, 장관식	32(5)	영국	Informa healthcare	SCI
9 (2015)	Selective Production of 1-Monocaprin by Porcine Liver Carboxylesterase-catalyzed Esterification: Its Enzyme Kinetics and Catalytic Performance	Enzyme Microb. Technol.	박경민, 장관식	82	미국	Elsevier Science INC	SCI
10 (2015)	Antioxidative and Nitric Oxide Scavenging Activity of Branched-Chain Amino Acids	Food Sci. Biotechnol.	진혜주, 백현동	24(4)	대한민국	한국식품 과학회	SCI
11 (2016)	Erythorbyl laurate as a potential food additive with multi-functionalities: Interfacial characteristics and antioxidant activity	Food Chem.	박경민, 이민주, 장관식	215	영국	Elservier SCI Ltd.	SCI
12 (2016)	Rapid and sensitive determination of lipid oxidation using the reagent-kit based on spectrophotometry(FOODLAB <sup>fat</sup> system)	J. Chem.	권창우, 박경민, 장관식	DoI:10.11 55/2016/ 1468743.	미국	Hindawi Publishin g Corp.	SCI
13 (2016)	Influence of lysolecithin and Tween 80 on the colloidal stability of branched chain amino acids in a nanosuspension system	Food Chem.	홍시락, 최승준	221	영국	Elservier SCI Ltd.	SCI
14 (2016)	Effect of cosolvent and surfactant on the solubility and stability of citral in a beverage model	Appl. Biol. Chem.	박주원, 최승준	59(3)	한국	한국응용 생명화학 회	SCI

(2) 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표 (학술회의명을 세부적으로 진부(건별로) 기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록.- 본 연구과제의 수행결과로 발표한 것만 기재합니다.)					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	The 4th International Conference on Engineering and Applied Science	조민제, 장판식	2014.07.23	삿포로	일본
2	2014년도 한국식품과학회 제81차 학술대회 및 정기총회	진혜주, 백현동	2014.08.25	광주	대한민국
3	2014년도 한국식품과학회 제81차 학술대회 및 정기총회	홍성철, 장판식	2014.08.26	광주	대한민국
4	2014년도 한국식품과학회 제81차 학술대회 및 정기총회	박성준, 최승준	2014.08.26	광주	대한민국
5	17th World Congress of Food Science and Technology & EXPO	최승준, David Julian McClements	2014.08.19	몬트리올	캐나다
6	47회 한국축산식품학회 정기학술 발표대회	진혜주, 백현동	2015.05.22	전주	대한민국
7	2015년도 한국식품과학회 제 82회 정기총회 및 학술대회	박성준, 최승준	2015.06.04	부산	대한민국
8	2015년도 한국식품과학회 제 82회 정기총회 및 학술대회	조민제, 장판식	2015.06.05	부산	대한민국
9	IFT15 Annual Meeting & Food Expo	이재훈, 백현동	2015.07.13	시카고	미국
10	IFT15 Annual Meeting & Food Expo	진혜주, 백현동	2015.07.13	시카고	미국
11	IFT15 Annual Meeting & Food Expo	박성준, 최승준	2015.07.14	시카고	미국
12	13th Euro Fed Lipid Congress	홍성철, 장판식	2015.09.29	피렌체	이탈리아
13	2016년도(사)한국응용생명화학학회 국제학술대회 및 제105차 정기총회	홍시락, 최승준	2016.06.16	제주도	대한민국
14	2016년도 한국식품과학회 제 83회 정기총회 및 학술대회	유형석, 백현동	2016.08.17	대구	대한민국
15	2016년도 한국식품과학회 제 83회 정기총회 및 학술대회	유형석, 백현동	2016.08.17	대구	대한민국
16	2016년도 한국식품과학회 제 83회 정기총회 및 학술대회	홍성철, 장판식	2016.08.18	대구	대한민국
17	2016년도 한국식품과학회 제 83회 정기총회 및 학술대회	김성화, 최승준	2016.08.18	대구	대한민국
18	18th World Congress of Food Science and Technology & EXPO	홍시락, 최승준	2016.08.22	더블린	아일랜드
19	18th World Congress of Food Science and Technology & EXPO	박주원, 최승준	2016.08.22	더블린	아일랜드

라. 기술거래 및 기술료

기술거래(이전)					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
1	노하우(전용실시권)	광산관기법을 이용한 실제 유화식품제의 유지지수 및 유화안정성의 신속 측정 기술	주식회사 대상	2014.09.16	2,000,000

마. 교육 및 지도활용 내역

교육 및 지도활용 내역				
번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도

바. 사업화

기술사업화								
번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용 창출	R&D 기여율
1	뉴케어망고젤	망고맛의 환자식 젤리	(주)대상	사업화	발생	4천3백만원	1	100
2	뉴케어 복숭아젤	복숭아맛의 환자식 젤리	(주)대상	사업화	발생	4천1백만원	1	100
3	발효녹즙 부추마늘삼채 (녹즙)	남성 건강기능 식품	(주)대상	사업화	발생	4천6백만원	1	100
4	간편한 민들레(녹즙)	건강기능식품	(주)대상	사업화	발생	1억5천만원	1	100

① 뉴케어 망고젤

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	4천3백만원
			향후 3년간 매출	2 억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 30 % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 35 % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		20 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		15 위

② 뉴케어 복숭아젤

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	4천1백만원
			향후 3년간 매출	2 억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 30 % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 35 % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		20위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		15위

③ 발효녹즙 부추마늘삼채(녹즙)

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	4천6백만원
			향후 3년간 매출	3 억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.24 % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 0.3 % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		20 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		15 위

④ 간편한 민들레(녹즙)

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	1억 5천만원
			향후 3년간 매출	6 억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.16 % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 0.2 % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		15 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		10 위

사. 기술 및 제품 인증

기술 및 제품 인증						
구분	인증분야	인증기관	인증내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증번호		

아. 인력활용/양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인력 양성	2014		1			1		1				
1	인력 양성	2015		3			2	1	3				
1	인력 양성	2016		3			1	2	3				

자. 정책활용 내역

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도

차. 홍보/전시

(1) 홍보실적

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	방송홍보	KBS1 “무엇이든 물어보세요”	무엇이든 물어보세요에 출연하여 “알고 쓰면 고소함이 두배! ‘기름’에 관한 TV 강연에서 본 연구의 내용인 난용성 소재의 가용화 기술에 대한 홍보를 진행함	2014.01.28
2	방송홍보	EBS “EBS 특강”	EBS 특강에 출연하여 “내 몸의 윤활유 ‘불포화지방’에 관한 TV 강연에서 본 연구와 관련 연구결과에 대한 홍보를 진행함	2014.09.30
3	방송홍보	KBS1 “아침마당”	아침마당에 출연하여 “10년 더 젊게 사는 식습관”에 관한 TV 강연에서 본 연구와 관련 연구결과에 대한 홍보를 진행함	2015.02.12

(2) 전시회 등 참여



전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도

(3) 기타 활용 및 홍보실적

기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)			
번호	일자	활용명칭	활용내역

카. 기타

(1) 국제화 협력성과

국제화 협력성과								
번호	유치기간	국적	학위	진공	파견기간	파견국	학위	진공

(2) 타 연구개발사업에의 활용

타 연구개발사업에의 활용					
번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도

(3) 포상 및 수상 실적

포상 및 수상실적					
종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일자	포상기관

## 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

### 제1절 목표달성도

#### 1. 연도별 연구개발 목표 및 달성도

- 난용성 생리활성 소재인 분지아미노산의 생체이용률 개선을 위하여, 다양한 형태의 생리활성 개선 소재 발굴을 위한 연구를 1세부 및 1협동이 진행하였음. 1세부 및 1협동에서 연구개발한 생리활성 개선 소재에 대한 생리활성평가를 2협동에서 진행함으로써 유기적으로 협동연구가 잘 진행되었음. 최종적으로 식품에 적용하기 위하여 1세부 및 1협동의 소재 개발 기술을 적용한 제품이 3협동(주식회사 대상)에서 개발되어 상품화가 잘 진행된 것으로 판단함.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	분지아미노산-붕입 리포솜 설계 및 물리화학적 특성 분석	분지 아미노산의 특성을 고려한 맞춤형 리포솜 설계 및 붕입효율 분석법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hydrodynamic focusing 기술의 microfluidic chip 기반 리포솜 제조 기술 개발</li> <li>• Ninhydrin을 통한 분지아미노산 정량법 확립 및 GPC를 이용한 분리·정제를 통한 붕입효율 분석법 확립</li> </ul>
		분지 아미노산-붕입 리포솜의 물리화학적 특성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DLS 분석법을 통한 리포솜 형태 분석 및 TEM을 통한 리포솜 형태 분석</li> </ul>
		분지 아미노산의 붕입효율 극대화를 위한 방안 모색	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phospholipid 종류에 따른 리포솜의 안정성 및 입도분포 개선</li> </ul>
		표면코팅 및 리간드 수식에 의한 분지아미노산-붕입 리포솜의 안정성 및 방출특성 개선	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cholesterol 첨가를 통한 리포솜 안정성 및 방출특성 개선</li> </ul>
	기능성 분지아미노산의 액상 소재화를 위한 고안정성 유화 기술 개발	고안정성 나노/마이크로에멀전 형성을 위한 최적조건의 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고안정성 나노/마이크로에멀전 제조를 위한 유화제의 탐색</li> </ul>
		나노/마이크로에멀전의 이화학적 특성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Turbiscan을 통한 나노/마이크로에멀전의 입도분석법 확립</li> </ul>
		나노/마이크로에멀전 입자크기와 유화안정지수 또는 유화분리 속도와의 관계 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 나노/마이크로에멀전 입자크기와 유화안정지수 또는 유화분리 속도와의 관계 평가</li> </ul>
		나노/마이크로에멀전 제조 공정의 유효반응변수 결정 및 유의적인 변화범위 설정을 위한 예비실험	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 나노/마이크로에멀전의 외부요인(pH 및 저장기간)에 대한 저장안정성 확인</li> </ul>
	분지아미노산의 분석법 확립 및 <i>in vitro</i> 및 <i>ex vivo</i> 상에서의 생리활성 검증	분지아미노산의 분석법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식품첨가물 공전에 따른 분지아미노산 분석</li> <li>• HPLC를 이용한 분지아미노산 분석법 확립</li> </ul>
		분지아미노산의 <i>in vitro</i> 상에서의 생리활성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i> 상에서의 항산화 활성 검증</li> <li>• <i>In vitro</i> 상에서의 항염 활성 검증</li> </ul>
		분지아미노산의 <i>ex vivo</i> 상에서의 생리활성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RAW 264.7 macrophages를 이용한 nitric oxide 생성 저해 정도 확인</li> <li>• Real-time PCR을 이용한 염증관련 후보 유전자 발현 정도 확인</li> <li>• 백혈구 및 대장 조직 DNA 손상(comet assay)연구</li> </ul>

	난용성 소재의 가용화 기술 개발 및 조성비 선정	국내외 인정·허가 사용 현황 및 제품 현황 조사	100	• 난용성 소재 가용화 기술 개발 위한 국내외 인정·허가 사용 현황 및 현황조사
		난용성 소재 가용화 기술 개발을 위한 자문 및 현황 조사	100	• 원료 특성(특징,성상,물성 등) 및 기능성분(지표성분) 자료 조사
		Stock 제품 개발	100	• BCAA,아르기닌 적용 Stock 제품 개발 및 기존 제품 적용
		Stock 제품의 보존성 검증	100	• BCAA,아르기닌 적용 제품 보존성 검증
		가용화 기술 및 특허 출원	50	• 가용화 기술 이전 1건 완료
2차년도 (2014)	분지아미노산-붕입 리포솜 제조 및 이를 탑재한 미세캡슐화 기술개발	분지아미노산-붕입 리포솜 제조 및 특성제어 연구	100	• 대량생산을 위한 리포솜 제조 공정 개선 • Ion surfactant 첨가에 의한 분산안정성 개선 • 리포솜의 식품용도를 위한 원료성분 대체 • 식품가공학적 편의를 위한 리포솜 분말화
		리포솜-탑재 미세캡슐화 기술개발 및 최적화	100	• 나노입자(manoparticle) 제조공정 구축 • 마이크로입자(microbead) 제조공정 구축
		리포솜-탑재 미세캡슐의 이화학적 특성 규명	100	• 온도변화에 따른 저장안정성 분석 • 방출특성(pH-stimulus release) 분석 • 형태학적 관찰 및 수율분석
		표면코팅에 의한 리포솜-탑재 미세캡슐의 안정성 및 방출특성 개선	100	• 키토산 및 poly-L-lysine에 의한 표면코팅 • 미세캡슐의 안정성 및 방출특성 분석
	분지아미노산의 생체이용률 증대를 위한 액상 맞춤형 소재 및 식품 개발	분지아미노산을 함유한 나노/마이크로에멀전의 전처리 조건 확립	100	• 분지아미노산의 이화학적 특성 분석에 근거한 최적의 유화제 및 유지류 탐색 • 선정된 유화제 및 유지류의 혼합 최적 조건 탐색
		분지아미노산을 함유한 나노/마이크로에멀전의 제조공정 확립을 통한 고농도 액상화	100	• HLB value에 따른 최적 유화제의 선정 및 유의적 농도 범위 탐색 • 유화안정성에 유용한 공정변수(유화액의 조성비 및 균질화 조건등)의 선정 및 최적 조건 확립
		분지아미노산을 함유한 나노/마이크로에멀전의 이화학적 특성 분석	100	• Turbiscan을 통한 분지아미노산을 함유한 나노/마이크로에멀전 분석 • 분지아미노산을 함유한 나노/마이크로에멀전의 유화안정지수 및 분리속도와와의 관계 평가
	리포솜-탑재 미세캡슐 및 나노/마이크로에멀전 기술을 통해 제조된 기능성 분지아미노산의 생체이용률 평가 및 생리활성 검증	<i>Ex vivo</i> 상에서의 생체이용률 평가	100	• Caco-2, MDCK 세포주를 이용한 식품소재화 된 분지아미노산의 세포내흡수효율 측정
		식품소재화 된 발린, 류신 및 이소류신의 <i>in vitro</i> 상에서의 생리활성 검증	100	• <i>In vitro</i> 상에서의 항산화 활성 검증 • <i>In vitro</i> 상에서의 항염 활성 검증
		식품소재화 된 발린, 류신 및 이소류신의 <i>ex vivo</i> 상에서의 생리활성 검증	80	• RAW 264.7 macrophages를 이용한 nitric oxide 생성 저해 정도 확인 • Real-time PCR을 이용한 염증관련 후보 유전자 발현 정도 확인 • 다양한 암세포주에 대한 세포독성 측정 연구
	특수집단의 기호도, 아미노산 제품 개발 및 관능평가	기능 최적화 제품 설계/가공기술 연구 및 개발	100	• BCAA적용 기능 최적화 제품 설계 및 PILOT 적용 및 PROTO-TYPE 개발
		시제품의 보존 및 유화안정성 검증	100	• PROTO-TYPE제품 유화도측정(TUBISCAN), 색차, OD, 미생물테스트 등을 통한 보존성 및 유화안정성 검증

3차년도 (2015)		제품의 기능에 적합한 목표고객을 대상으로 한 관능 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>제품 중 보존성 및 유화 안정성 검증 통과 제품에 대하여 관능평가 실시</li> </ul>
		기능성분(지표성분)의 규격 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료의 생산공정과 원료 특성, 분석 오차를 고려하여 기능성분(함량) 규격 확립</li> </ul>
		유해물질에 대한 규격 및 시험방법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>「건강기능식품의 기준 및 규격」, 「식품의 기준 및 규격」, 「축산물의 가공기준성분규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」, 국제식품규격위원회(Codex Alimentations Commission, CAC)규정, AOAC방법 등에 따라 국내·외에서 공인된 방법을 사용</li> </ul>
	분지아미노산-붕입 리포솜 제조 및 특성제어 연구	산업적 생산을 위한 scale-up factor 규명 및 표준화	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Liquid mediated lyophilization(LML) 용매 최적화</li> <li>소제화된 리포솜의 제품 적용 안정성 확인</li> <li>제품 가공적성 향상을 위한 리포솜 제조공정 개선</li> </ul>
		분지아미노산-붕입 리포솜을 탑재한 미세캡슐의 저장안정성(pH 및 온도) 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>분지아미노산-붕입 리포솜의 pH 안정성 평가</li> <li>분지아미노산-붕입 리포솜의 온도 안정성 평가</li> </ul>
		<i>In vitro</i> 소화모델에서의 중심물질 방출특성 및 방출률 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>유사 소화모델(소장)에서의 리포솜의 방출특성 분석</li> <li>표면코팅을 통한 리포솜의 소화기계 안정성 개선</li> </ul>
	나노/마이크로에멀전 제조 기술을 통하여 가용화된 분지아미노산의 안정성 평가	분지아미노산을 함유한 나노/마이크로에멀전의 분산안정성 향상 방법 탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>분지아미노산의 이화학적 특성에 근거한 최적 분산안정제 탐색</li> <li>나노/마이크로에멀전의 용해도 향상 효과 증대를 위한 최적 분산안정제 탐색</li> </ul>
		분지아미노산을 함유한 나노/마이크로에멀전의 저장안정성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>분산안정제 첨가에 따른 고농도 분지아미노산 용액의 용해도 향상 정도 분석</li> <li>분산안정제 첨가에 따른 고농도 분지아미노산 용액의 분산안정성 향상 정도 분석</li> <li>외부요인(pH, 저장온도 등)에 대한 저장안정성 확인</li> </ul>
	생산된 시제품의 <i>in vivo</i> 상에서의 생체이용률 평가 및 생리활성 검증	동물실험을 통해 시제품의 함유되어 있는 분지아미노산의 흡수효율 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>시제품에 함유되어 있는 분지아미노산의 함량 측정 연구(HPLC 법)</li> <li>동물실험을 통해 분지아미노산의 회장 소화율을 측정하여 시제품의 난용성 생리활성 소재 흡수효율 측정 연구</li> </ul>
		동물실험을 통한 시제품의 면역증강 효과 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>백혈구 및 대장 조직 DNA 손상 측정 연구</li> <li>Real-time PCR 이용한 염증 관련 후보 유전자 발현 정도 확인</li> <li>혈장 지용성 항산화 비타민 분석 연구</li> <li>적혈구 내 항산화 효소활성 측정 연구</li> </ul>
	난용성 소재의 가용화 기술개발을 통한 생체이용률이 향상된	생체 이용률 평가를 통한 feedback으로 보다 향상된 stock 제품 및 시제품의 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>고형제품(분말제품) : 산화방지 및 보존성의 향상, 불필요한 맛을 차단한 분지아미노산(Leusine, Isoleusine, Valine) 고형화 제품</li> </ul>

	분지아미노산의 상품화			<ul style="list-style-type: none"> <li>• 면역증강 및 세포, 체단백 합성, 혈행 개선에 도움을 주는 제품</li> <li>• 액상제품 : 리포솜 탑재 기술을 통한 변화하기 쉬운 식품 소재의 안정화, 식품소재의 방출속도 조절, 제조공정의 개선 및 물성 향상 등의 장점을 지닌 액상제품</li> <li>• 에너지 보충제품, 남성 건강 및 체중조절용 제품</li> </ul>
		stock제품 대량 생산체제 구축	100	• BCAA stock제품 대량 생산 공정 구축을 통한 판매 가능한 stock 제품 확보
		특수의료용도등식품 대량 생산 체제 구축	100	• 분말, 반고형, 액상 등 제형별 대량 생산 공정 구축 및 제품 개발
		stock제품 및 완제품 원가 분석	100	• 제조 원가 및 인건비 등 생산 단가 분석
		안전성 및 안정성에 관한평가	100	• BCAA stock제품, 완제품의 안전성(미생물-대장균군, 세균, 바실러스세레우스), 안정성(유통기한 설정시험) 등을 평가
		영양성분 및 BCAA 함량 분석	100	• 제품군별 BCAA 함량 분석
		2차 년도에 이어 목표고객을 대상으로 한 관능평가 시행	100	• 50여명 이상의 예비소비자를 대상으로 관능평가 시행
		시장진출을 위한 아미노산 적용 제품의 개발 완료	100	• 대량생산 구축 및 원가 분석, 관능 평가를 통한 시장성 있는 최종 제품 개발

## 제2절 관련분야 기여도

### 2. 학문·기술적 측면

- 신기술 선점 및 국제적 기술우위: 마이크로유체 기반 리포솜 제조기술과 나노/마이크로에멀전 제조기술을 통하여 난용성소재의 생체이용률을 증대시키는 연구를 수행함. 또한, 기존에 밝혀지지 않은 분지아미노산의 항염, 항산화, 항암효과를 규명함으로써 분지아미노산의 활용 가능성을 증대시킴. 따라서, 본 연구를 기반으로 난용성 소재 및 분지아미노산의 식품 소재로의 활용에 대한 선도적인 역할을 함.
- 학술적 기초 연구자료 제공: 난용성 소재 및 분지아미노산의 식품 소재로의 활용에 대한 선도적인 연구를 통해 기능성 및 난용성 소재 분야에 관한 학술적으로 유의미한 연구결과를 도출하였으며, 이와 관련하여 국제저명학술지에 다수의 논문(14편)을 발표함으로써 연계연구의 기초 자료를 제공함.
- 전문 연구인력 양성: 본 연구과제는 난용성 소재의 생체이용률 증대를 위한 소재 개발 및 기능성 평가로서, 소재개발부터 대량생산 공정 구축 및 제품화까지 가능한 전문인력 5명을 양성하였으며, 기능성 검증 및 독성평가가 가능한 전문인력 2명을 양성하였음.
- 정량적 달성 성과: SCI급 저널 논문게재 14편, 학술회의 발표 19건(국내 11건, 국외 8건)

### 3. 산업·경제적 측면

- 산업재산권 획득: 난용성 소재의 생체이용률을 증대시키기 위한 기술인 리포솜 및 나노/마이크로에멀전 제조기술과 관련하여 국내 특허 3건 및 국외 PCT 특허 1건을 출원하였으며, 현재 1건이 등록된 상태임. 또한, 분지아미노산의 기능성과 관련한 국내 특허 3건을 추가적으로 출원하는 등의 산업적 우위를 점하기 위한 지식재산권을 확보함.
- 신규시장 창출: 본 연구를 통해 개발된 리포솜 및 나노/마이크로에멀전은 다양한 생리활성 소재의 흡수율을 증대하여 생체이용률을 개선할 수 있으며, 건강기능식품 산업체(3협동 주식회사 대상)와 연계연구를 통하여 이를 적용한 제품 4종을 출시함. 이러한, 소재개발에서부터 제품화 출시까지 여러 단계를 거치면서, 관련 산업의 연구 인력 및 일자리 창출에 이바지를 했으며, 향후 고부가가치 식품소재로서 활용도가 높을 것으로 예상됨.
- 정량적 달성 성과: 특허(출원.등록) 국제 PCT 특허 포함 7건 출원, 1건 등록, 제품화 4종, 기술이전 2건

## 5. 연구결과의 활용계획

코드번호

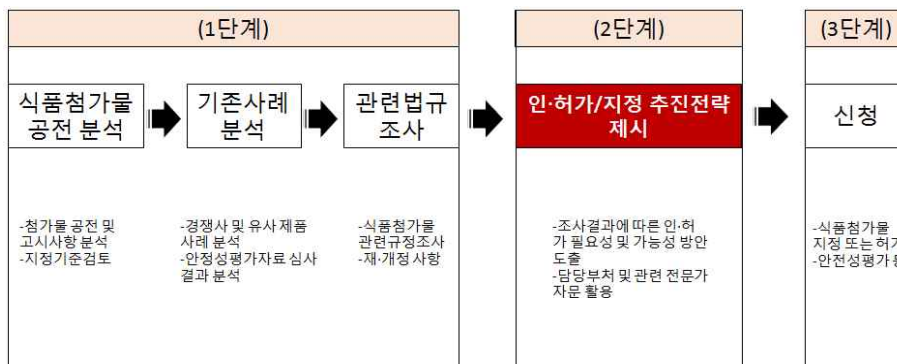
D-07

### 제1절 추가 연구의 필요성

- 본 연구에서는 리포솜 및 나노/마이크로에멀전을 이용하여 분지아미노산의 생체이용률이 증대된 기능성 식품소재를 개발함. 생체이용률 증대를 검증하기 위하여, 항염, 항암, 항산화력을 확인하였으며, 개발된 식품소재의 경우 기존 분지아미노산이 지니고 있는 효능을 2~5배 증대시킬 수 있는 것으로 확인됨. 또한, 산업적 적용을 위하여 기능성 식품소재의 산업적 생산공정을 구축하였으며, 개발된 기술이 적용된 제품을 출시하였음. 하지만, 제조된 리포솜을 식품산업에 적용하기 위해서는 현재 사용하고 있는 유기용매에 대한 대체기술을 개발할 필요가 있음.
- 본 연구에서 활용한 microfluidic 기술의 scale up을 위한 추가적인 연구와 보다 경제성을 확보할 수 있는 대량생산 공정을 위한 다양한 나노화 기술에 대한 연구가 필요함.
- 본 연구 결과물인 분지아미노산-담재 리포솜은 3협동인 주식회사 대상과 협력을 통하여 식품첨가물 소재로 인증받기 위한 추가적인 생체내 안정성(독성평가) 진행 및 유기용매 대체 제조시스템에 대한 연구가 필요함.
- 본 연구에서 개발된 리포솜 및 나노/마이크로에멀전 기술의 경우 난용성 소재인 분지아미노산의 생체이용률을 증가시킴을 확인하였으며, 이러한 연구결과를 토대로, 다양한 난용성 소재로 생체이용률이 낮은 기능성 소재(ex 커큐민, 글루타민, 아르기닌 등)에 적용하여 고부가가치 식품소재로의 개발을 위한 추가적인 연구가 필요함.

### 제2절 기업화 추진방안

- 리포솜은 식품에 사용되기 위해서는 식품첨가물 공전 및 고시사항 분석을 통해 인허가가 검토되어야 함. 이는 리포솜에 대한 안전성 평가심사 결과 분석을 진행하여야 함. 기존 사례를 통해 리포솜이 식품첨가물로 새롭게 인허가를 받을 수 있는 지 확인 후, 식품첨가물 관련 규정의 재·개정 사항을 조사하여 담당부처 및 전문가의 자문을 통한 인허가 방안을 도출할 것임. 인허가가 완료되면 다양한 기능성식품 업체들과의 산업화를 추진할 예정임.



<리포솜 인허가 추진전략 체계>

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

### 제1절 난용성 소재의 기능성 향상을 위한 리포솜 및 나노/마이크로에멀전 제조 기술개발

#### 1. 리포솜

##### (1) 리포솜 제조를 위한 마이크로유체 플랫폼 개발

- Hydrodynamic focusing을 발생시킬 수 있는 마이크로유체 시스템을 이용하여, 나노 입자를 합성한 최초의 연구를 발표함. 기존의 방법에 비해, 혼합시간을 단축하여, 균일성이 향상된 나노입자를 제조하였으며, 캡슐 효율성도 아울러 향상 시켰음.
- Karnik et al., *Nano Letters* 8:2906-2912(2008)

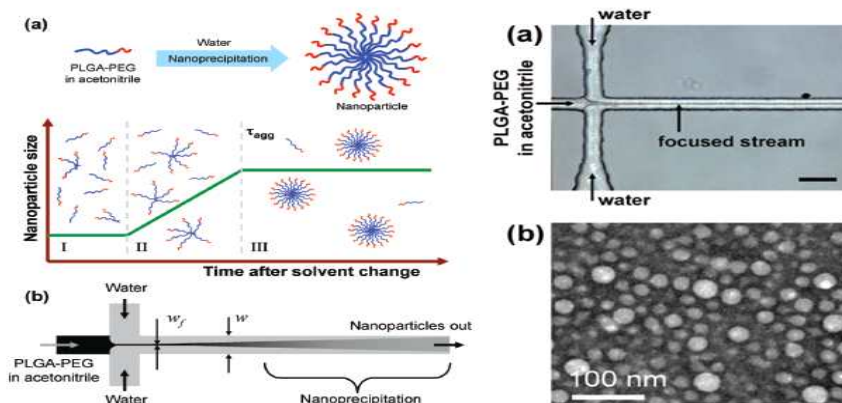


Figure 1. Hydrodynamic focusing을 이용한 나노 입자의 제조.

##### (2) 마이크로유체 플랫폼 기반 리포솜 물성 조절

- Hydrodynamic focusing을 발생시킬 수 있는 마이크로유체 칩을 이용하여, 리포솜을 합성한 연구를 발표함. 채널의 형태와 규격, 그리고 유속의 비율들을 조절하여, 리포솜의 물성(크기)을 조절할 수 있음을 보임.
- Michael Gaitan et al., *ACS Nano* 4:2077-2087(2010)

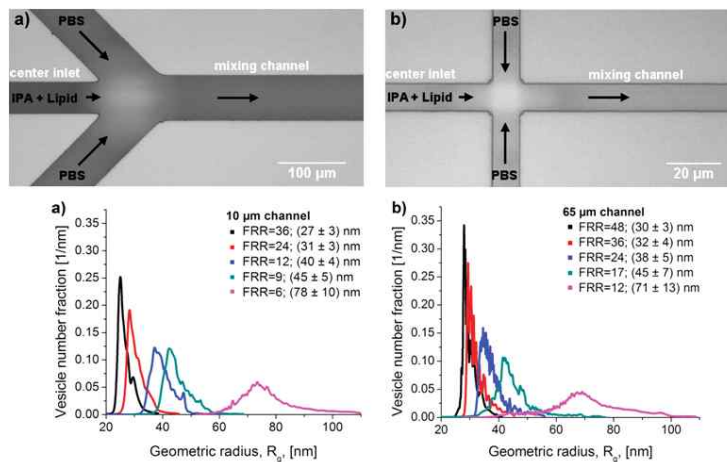


Figure 2. Hydrodynamic focusing을 이용한 리포솜의 제조.



(3) Microvortex 기반 리포솜 합성

- Microvortex을 발생시킬 수 있는 마이크로유체 시스템을 이용하여, 나노 입자를 합성한 연구를 발표함. 기존의 방법보다 더욱 더 많은 양의 나노 입자를 제조할 수 있었으며, 유속 조절과 이를 통한, Vortex의 구조 변화를 통해, 나노 입자의 크기를 조절할 수 있음을 발표함.
- Kim YongTae et al., *Nano Letters* 12:3587-3591(2012)

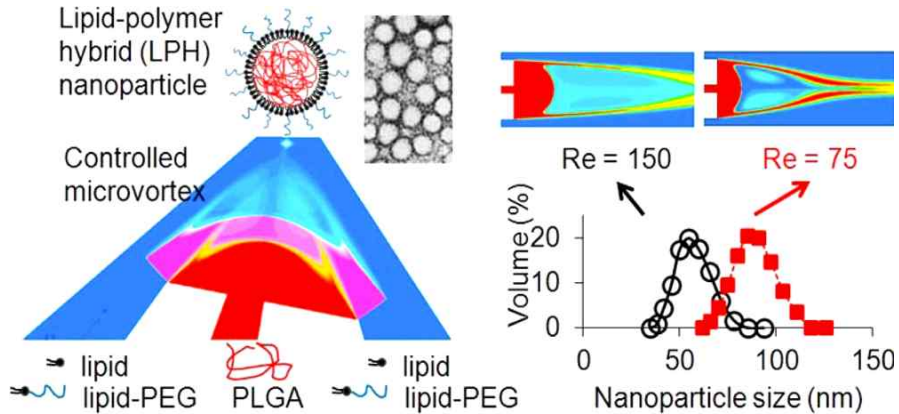


Figure 3. Microvortex을 이용한 나노 입자의 제조.

(4) Jet turbulence 기반 리포솜 제조

- Jet turbulence을 발생시킬 수 있는 마이크로유체 시스템을 이용하여, 나노 입자를 제조한 연구를 발표함. 기존의 방법에 비해, 대량으로 나노 입자를 균일하게 생산할 수 있었으며, 고분자 나노입자, 리포솜, 자성 나노 입자 등 다양한 나노입자들을 합성할 수 있었음.
- Omid C. Farokhzad et al., *ACS Nano* 4:1671-1679(2014)

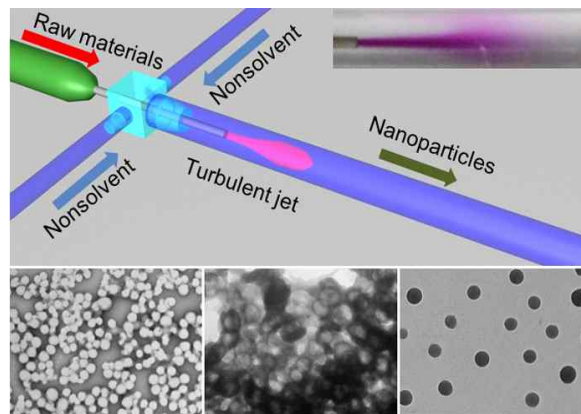


Figure 4. Jet Turbulence을 이용한 나노 입자의 제조.

(5) 유중수적형 에멀전을 이용한 alginate-hydrogel 제조

- 유중수적형(w/o)의 에멀전 제조 방법을 이용하여, 나노 크기 형태의 alginate-hydrogel 제조 방법을 발표함. 기존 alginate-hydrogel 연구는 대체로 생체 이용을 위한 hydrogel의 안정성과 관련된 연구가 주로 진행되었으나, 본 연구에서는

나노 크기의 alginate-hydrogel을 형성함. 하지만 형성된 나노 크기의 alginate-hydrogel은 단일한 크기보다는 다양한 입자의 크기가 제조되는 한계가 있음(약 400 - 1,000 nm, 주로 1,000 nm).

- Jerome P. Paques et al., *Food Hydrocolloids* 31:428-434(2013)

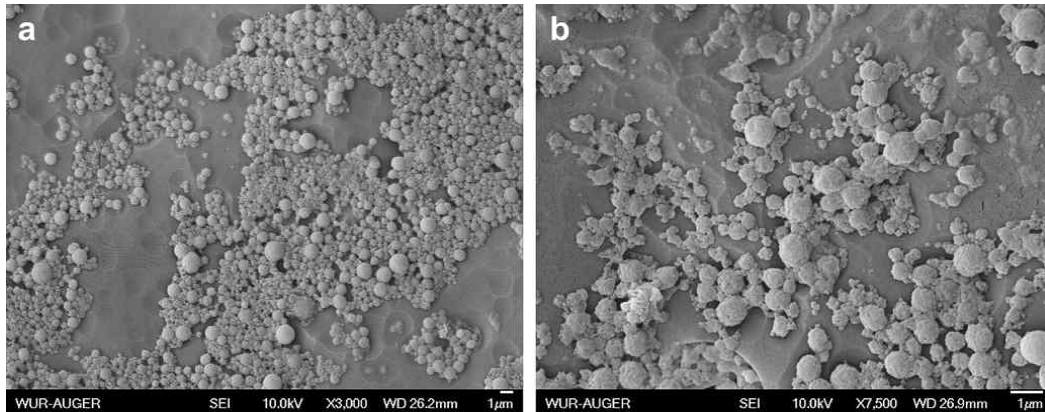


Figure 5. 수중유적형 에멀전을 이용한 나노 크기의 alginate hydrogel 입자.

(6) *In vivo* 실험을 통한 liposome 함유 물질의 생체이용률 증대

- Film 방법을 이용하여 lipid 종류에 따른 다양한 octreotide 함유 리포솜을 제조하고, *in vivo* 실험을 통하여 octreotide의 섭취율을 살펴본 결과, octreotide만을 경구섭취 하였을 때 보다 리포솜을 통하여 섭취하였을 때 1.5배 이상의 섭취율이 나타남.
- Johannes Parmentier et al., *International Journal of Pharmaceutics* 415:150-157(2011)

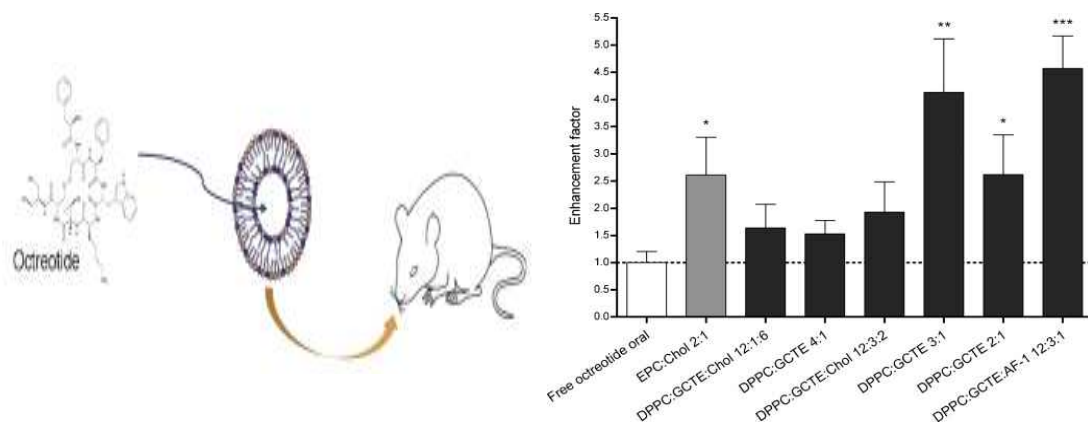


Figure 6. *In vivo* 실험을 통한 리포솜 함유 물질의 bioavailability 증가.

## 2. 나노/마이크로에멀전

(1) Nanoemulsion 제조 및 nanoemulsion의 구조적 및 물리화학적 특성

- 현재까지 연구를 통해 발표된 nanoemulsion 제조 방법을 정리함. 고에너지 및 저에너지 방법에 따라 제조되는 nanoemulsion의 구조적, 물리화학적 및 물성적 특성을 예측하고, nanoemulsion의 안정성을 평가하는 방법을 제안함. Nanoemulsion의 지용

성 의약품 및 식품 기능성 물질을 위한 전달체로서의 높은 효능성은 인정하지만, 그 전에 생체 내 잠재독성, 즉 안전성에 대한 광범위한 연구가 필요하다고 제안함.

- D. Julian McClements, *Therapeutic Delivery* 4:841-857(2013)
- D. Julian McClements & Jiajia Rao, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51:285-330(2011)

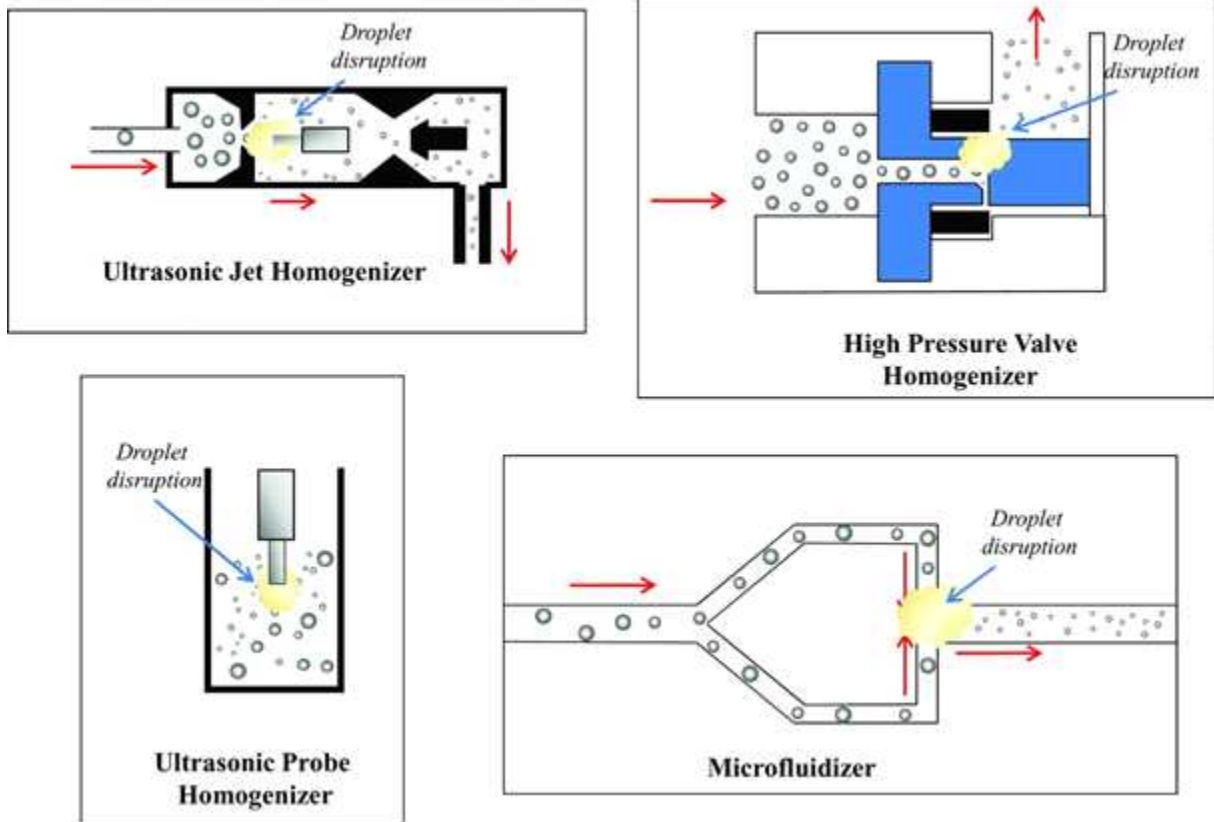


Figure 7. 고에너지 방법을 통한 식품 nanoemulsion을 제조할 때 사용되는 특수 기계장치의 도식.

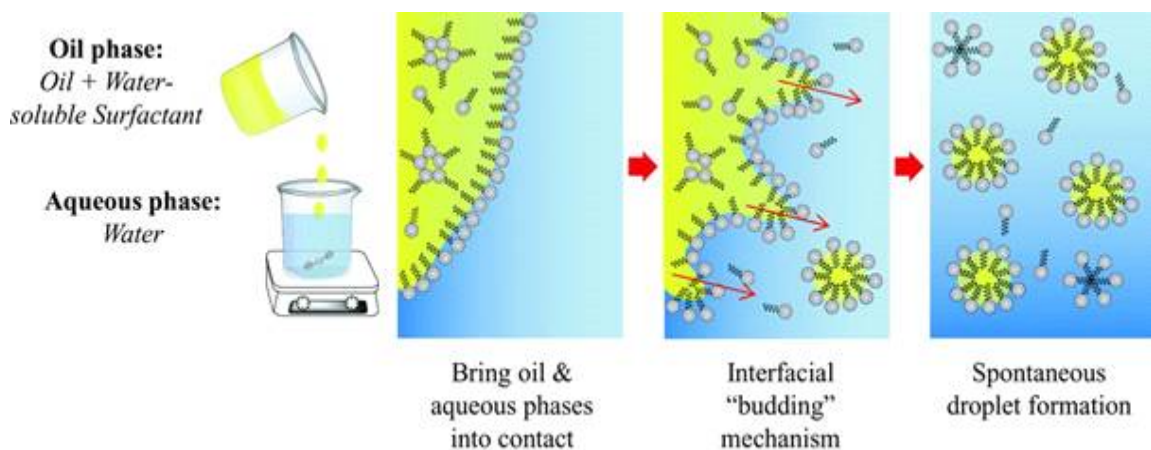


Figure 8. 자발적 nanoemulsification의 기작을 설명하기 위하여 제안된 모델.

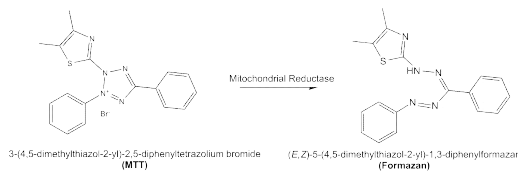
## 제2절 난용성 소재의 생리활성 검증기술

### 1. 생리활성 검증기술

#### (1) MTT assay를 통한 세포독성 측정

- MTT assay는 세포의 대사 활성을 간접적으로 측정 가능한 비색법의 일종이다. 세포막의 NAD(P)H-의존 산화환원효소의 활성 정도는 살아있는 세포의 수를 대변할 수 있다. 빛에 민감한 성질을 가진 노란색의 수용성 기질인 MTT, 즉 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 는 일반적으로 진핵 세포내의 소기관인 미토콘드리아의 reductase에 의해 불용성인 formazan으로 환원되는데, 죽은 세포의 경우 미토콘드리아의 기능 상실로 MTT가 formazan으로 환원될 수 없음. 또한 그 생성량은 세포의 대사 속도와 배양 환경에 의해 영향을 받음. 이를 DMSO와 같은 유기용매에 용해시키고 그 흡광도를 이용하여 세포 독성 정도를 비색정량함. 일반적으로 흡광도는 분광광도계를 이용하여 500-600 nm의 파장에서 측정함.
- Mosmann et al., *Journal of Immunology Methods* 65:55-63(1983)

(A)



(B)

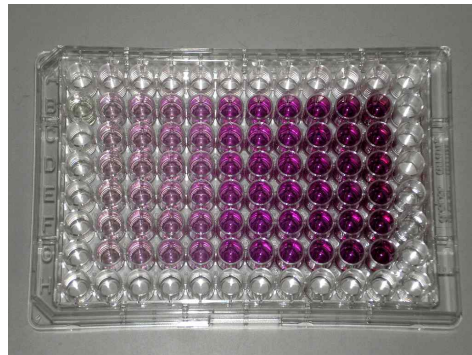


Figure 9. MTT assay를 이용한 cytotoxicity 측정

#### (2) Griess test

- Griess test는 화학적 분석법으로 solution 내의 nitrite ion을 검출하는데 이용된다. Nitrite ion은 Griess 시약과 반응하면 붉은 색을 띄는데 특정 파장범위에서의 흡광도를 분광광도계를 이용하여 측정함으로써 solution 내의 nitrite ion의 함량을 간접적으로 측정하는 비색정량법이다. 일반적으로 Griess reagent는 동량의 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in distilled water와 1% sulphanilamide in 5% phosphoric acid의 혼합액을 지칭한다.
- 비색정량법이기 때문에 일반적으로는  $\text{NaNO}_2$  standard curve의 회귀식을 이용하여 간접적으로 nitrite ion의 함량을 측정한다.
- Green LC et al., *Analytical Biochemistry* 126:131-138(1982)

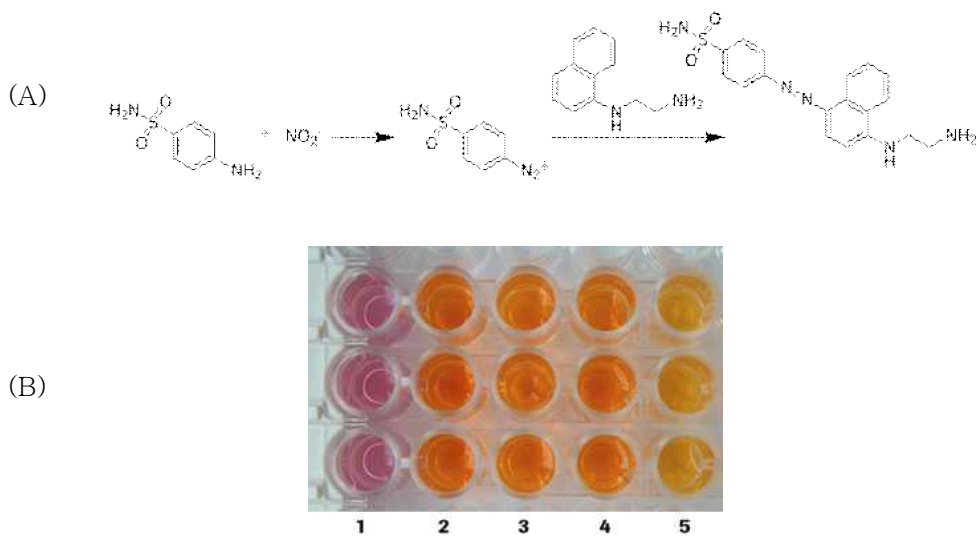


Figure 10. Griess reaction을 이용한 nitrite ion의 비색정량

(3) Comet assay

- Single-cell gel-electrophoresis(SCGE) assay로 잘 알려진 comet assay는 활성산소에 의한 산화적 스트레스 유발 시 세포내의 DNA 손상 정도를 직접적으로 확인할 수 있는 유용한 지표로 사용하고 있음. 산화적 스트레스 유발에 의한 DNA의 손상 정도는 핵으로부터 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA 함량(% tail intensity)으로 나타냄.
- McKenna et al., *DNA Repair* 2:879-890(2003)

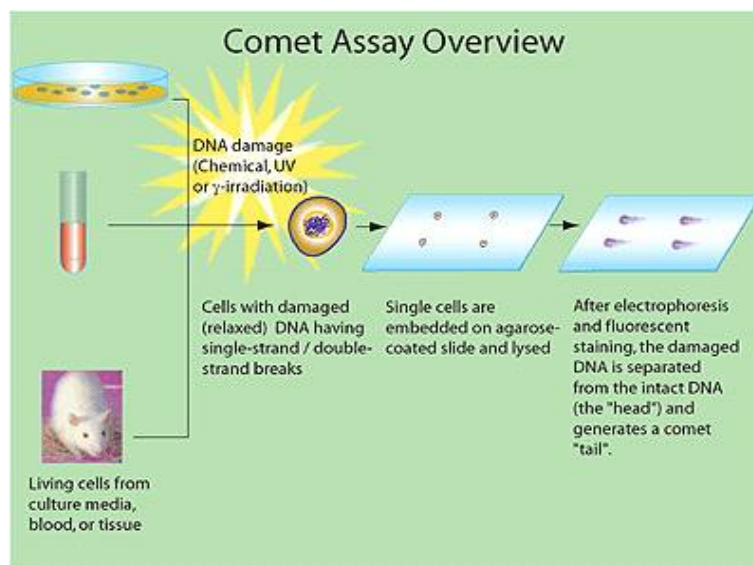


Figure 11. Comet assay를 이용한 DNA 손상 정도의 측정

(4) RT-PCR and Real-time qPCR

-일반적으로 RNA의 발현 정도를 확인하는 방법 중 하나로 목적하는 RNA에 해당하는 특정 primer를 이용하여 상보적 서열의 DNA(cDNA)로 역전사 시킨 후 이를 주형으로 이용하여 연

왜 중합 반응을 이용하여 증폭시켜 그 발현량을 상대적으로 확인하는 방법임.

- 중합효소 연쇄 반응의 순서는 3단계로 이루어짐. 열을 이용하여 두 가닥의 DNA를 분리하는 열변성 과정(denaturation)을 거친 후, 온도를 낮추어 primer가 증폭을 원하는 서열 말단에 결합(annealing)하게 하고, 다시 열을 약간 올려서 DNA를 합성하는 중합 반응(polymerization or extension)을 일으킴. 열변성 과정은 보통 95°C에서 열을 이용하여 2가닥의 DNA의 상보적인 염기의 수소결합을 1가닥으로 떨어뜨리는 과정이며, 결합 반응은 약 55~65°C에서 한 가닥의 DNA에 primer가 상보적인 염기서열에 결합하는 과정임. 마지막으로 중합 반응은 한 가닥의 DNA(주형 DNA)에 시발체가 붙은 다음의 염기에 DNA 중합효소(polymerase)를 이용하여 주형 DNA의 상보적인 염기를 합성하여 두 가닥의 DNA으로 연장시킴. 그 후 다시 열변성 과정, 결합 반응, 중합 반응을 반복하여 DNA를 증폭하게 됨. 중합효소 연쇄 반응 1회를 시행하면 유전 물질은 2배로 증폭됨. 따라서 반응의 반복에 의한 기하급수적인 증폭이 가능하고, 중합효소 연쇄 반응을 n회를 반복하면 이론상으로 2의 n승배의 유전자가 증폭됨.
- RT-PCR의 경우 end-point 방법으로 최종적으로 완료된 product에 목적하는 특정 cDNA(RNA)의 발현 정도를 agarose gel과 EtBr과 같은 DNA의 염색제를 이용하여 가시화하고 가시화한 밴드의 두께 또는 강도를 통해 상대적 정량을 하는 방법임.
- Real-time PCR의 경우 SYBR과 같은 형광물질을 이용하여 DNA를 증폭시키면서 증폭 산물을 동시에 검출가능함. 일반적으로 목적 DNA(RNA)의 발현 정도를 기준이 되는 house keeping gene(reference gene)의 발현 정도와 비교하여  $\Delta\Delta C_q$  계산법을 이용하여 상대적 정량을 실시함.
- Real-time PCR은 증폭이 완료된 후, 목적하는 DNA마다 녹는점이 다름을 이용하여 순차적으로 온도를 낮추어 melting curve를 도출하고 그 DNA의 purity 또한 검증함.
- Ririe K.M. et al., *Analytical Biochemistry* 245: 154-160(1997)
- Stephen A. et al., *Clinical Chemistry* 55: 611-622(2009)

### 제3절 식품중 기능성 물질의 효능 증대를 위한 리포솜 및 나노/마이크로에멀전 적용 기술

#### 1. 국외 기술개발 현황

##### (1) Unilever(네덜란드)

- 아이스크림에 나노에멀전 기술을 이용해서 제품의 조직감을 향상시킨 저지방 아이스크림을 개발: 제품의 맛이나 조직감의 손상없이 지방의 사용을 16%에서 1% 수준으로 줄이는 것이 가능
- 일부 가공 식품에 비타민 및 미네랄 함량 강화 목적으로 이미 상용화

##### (2) Aquaznova(독일)

- 비타민 C, E, 코엔자임 Q10, 식물추출물, isoflavone, flavonoid, carotenoid, 정유(essential oil), 방부제, 색소, 기타 생물 기능성 물질을 캡슐화하기 위하여 30 nm 미셀을 사용하여 나노기술 기반의 전달체(carrier) 시스템을 개발: 생리 기능성 물질의 효과와 생체이용률이 증가된다고 보고
- 코엔자임 Q10을 제품에 사용하고 있으며, 미셀 형태의 제품은 'NovaSol'이란 상표로

2006년 이래 판매

(3) Biodelivery Science International(미국)

- 콩과 칼슘으로부터 유도된 직경 50 nm의 코일형 나노입자로 의약품, 비타민, 리코펜,  $\omega$ -3 지방산 등을 직접 세포로 전달할 수 있는 nanocochleate를 개발
- $\omega$ -3 지방산을 제품의 향이나 맛의 변화없이 nanocochleate를 이용하여 케이크, 머핀, 파스타, 수프, 쿠키 등에 적용 가능

(4) BASF(독일)

- 나노크기의 합성 카로티노이드를 제조하고 판매에 관하여 미국 FDA의 GRAS를 획득
- 캡슐화한 합성 나노 카로티노이드를 레모네이드, 과일주스, 마가린 등에 사용하기 위하여 세계적으로 주요한 식품, 음료회사에 판매

(5) Salvona Technology(미국)

- 통상 잘 혼합되지 않는 여러 기능성 물질(수용성 및 지용성 성분)을 생체 내로 전달하고 몸 안에서 성공적으로 방출하도록 고안된 'Multisal'이라는 다성분 전달 시스템 개발
- 독자적인 분산기술로 직경이 약 10-500 nm의 소수성 나노구체를 제조한 후, 나노구체를 직경 20-25  $\mu$ m의 마이크로구조체(수분 또는 pH 민감성 높은 소재로 제조)에 캡슐화하며, 이 캡슐 속에서 나노구체가 균질하게 분산되도록 설계
- 마이크로구조체는 수분을 만나면 용해되어 나노구체와 기타 성분들을 생체 내로 방출

(6) Nutralease(이스라엘)

- 자가응집에 의한 나노 크기의 액상제품(nano-sized self-assembled liquid system)을 이용하여 영양소를 세포로 전달하는 기술을 개발
- Shemen 회사에서는 이 기술을 응용해서 카놀라 기능성 오일을 체내에 전달하는 시스템을 판매

## 7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
<input type="radio"/> 해당사항 없음	



## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
○ 해당사항 없음								

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행 실적

코드번호	D-11
------	------

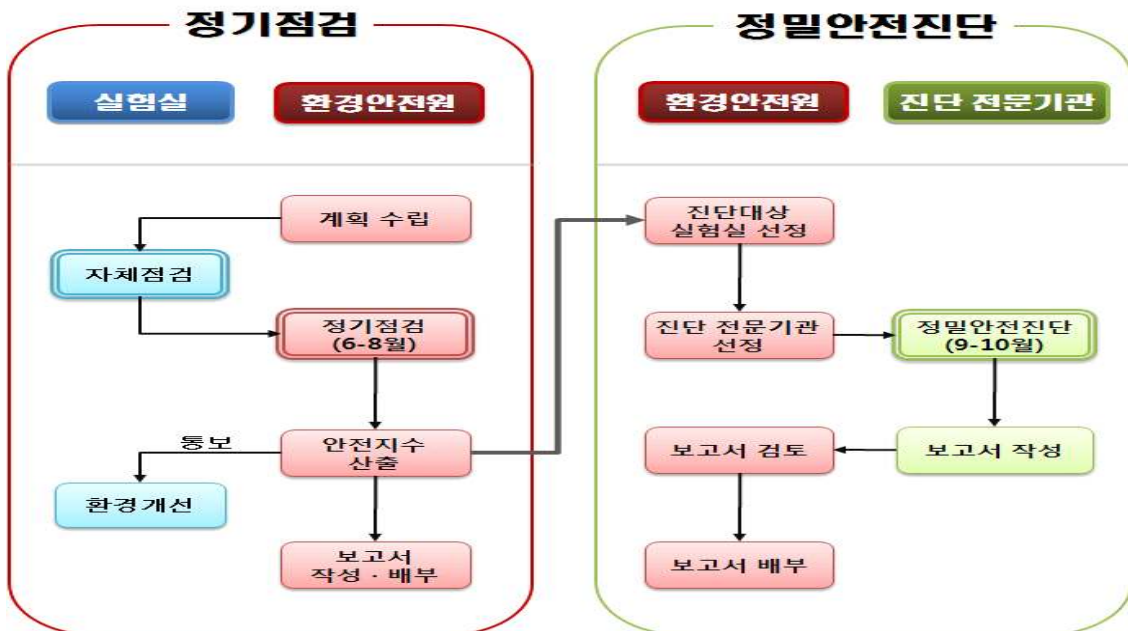
### ■ 제1세부: 서울대학교

#### 1. 실험실 안전관리 개요

##### 가. 목 적

서울대학교 이공계 실험실 및 미술대학 작업장의 안전사고 예방 및 연구 활동 종사자를 보호하기 위하여 환경안전교육, 실험실 안전점검, 안전사고 대응 대책수립 등 안전한 실험실 환경조성 및 연구 활동 종사자의 건강보호와 안전을 확보하고자 함

##### 나. 실험실 안전점검 체계



#### 라. 연구·실험실 안전관리 추진 계획

##### 가. 연구 활동 종사자 환경안전교육 실시

연구실 안전 환경 조성에 관한 법률」 및 「환경안전관리규정」에 의거 연구 활동 종사자를 대상으로 실험실 안전 환경 조성 및 사고예방을 위한 환경안전교육 실시

##### 1) 정기 교육

이공계 및 미술대 대학원 신입생을 대상으로 년2회 집체교육 실시

- 기간 : '16년 2월, 8월
- 대상 : 이공계 대학원생, 연구원 및 미술대학 대학원생
- 내용 : 환경안전관리 외 14과목(전공별 12과목 수강)

##### 2) 온라인 교육

정기교육을 수강하지 못한 연구 활동 종사자를 대상으로 온라인 안전교육 실시

- 기간 : '16년 3월, 9월
- 대상 : 이공계 대학원생, 연구원 및 미술대학 대학원생

- 내용 : 환경안전관리 외 14과목(전공별 12과목 수강)

3) 수시 교육

실험실 사고 발생, 신입 연구원 채용 등 실험실 안전교육이 필요시 기관의 요청에 의해 실시

- 기간 : 수시

- 대상 : 이공계 대학원생, 연구원 및 미술대학 대학원생, 직원 등

- 내용 : 기관에 요청에 따라 상이함

나. 실험실 안전점검 실시

연구실 안전 환경 조성에 관한 법률에 의거 이공계 대학, 연구소 실험실 및 미술대학 작업장을 [표1]과 같이 실험 특성에 따라 유형별로 분류하여 일상점검, 정기점검, 특별안전점검, 정밀안전진단을 실시

[표1] 안전점검 실험실 수(2011년)

A유형 실험실	B유형 실험실	C유형 실험실	D유형 실험실	합계
328	364	269	292	1,253

\* 실험실 분류 기준 :

A형 : 미생물 및 동물(LMO), 방사성동위원소 물질 등을 사용하는 실험실

B형 : 화학약품 등을 사용하는 실험실

C형 : 기계·전기 설비 등을 사용하는 실험실

D형 : 실험·실습을 수행하지 않는 설계·컴퓨터 관련 등의 실험실

1) 일상점검

연구개발 활동 전 연구개발 활동에 사용되는 실험 약품 및 장비의 이상 유무 점검

- 기간 : 년중

- 실시자 : 연구 활동 종사자

- 내용 : 실험실별 특성에 맞는 점검표 작성 후 점검 실시

2) 정기점검

실험실 안전점검 체계에 따라 매년 정기점검실시하고, 그 결과 「서울대학교 실험실안전 白書」를 배포하여 부적합 사항에 대하여 개선요구

- 기간 : '16년 5월 ~ 9월

- 실시자 : 환경안전원

- 내용 : 실험실 안전점검 프로그램을 사용하여 분야별 항목 점검

3) 특별안전점검

폭발사고, 화재사고 등 연구 활동 종사자의 안전에 치명적인 위험을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우에 총장의 지시에 의해 실시

- 기간 : 년중 필요시

- 실시자 : 총장의 지시에 의거 환경안전원 실시 또는 외부기관에 의뢰

- 내용 : 위험요인별 점검

4) 정밀안전진단

정기점검 실시 후 도출된 위해요인에 대하여 외부 전문기관에 진단을 의뢰하여 위해요인의 개선방향 및 안전관리방안 수립

- 기간 : '12년 11월
- 실시자 : 외부전문 진단기관
- 내용 : 정기점검 후 선정된 중점 점검항목 및 연안법에 규정된 점검항목 진단

다. 실험실 안전사고 대응 및 예방

실험실에서 발생하는 안전사고에 적절히 대응하여 그 피해를 최소화 하고 유사 사고 방지를 위해 대책을 수립

1) 화학약품 누출 대응 장비함 설치

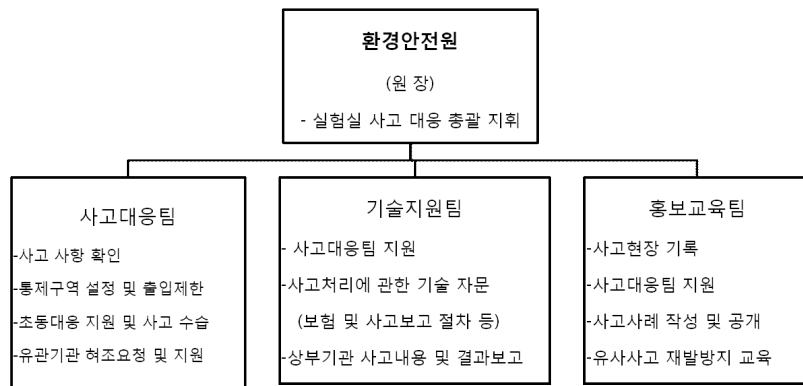
화학약품 누출 및 폐수용기 폭발 등의 사고 발생 시 신속한 대응 및 확산 방지를 위해 「화학약품 누출 대응 장비함」을 설치

- 기간 : '12년 1월 중
- 설치수량 : 34개(자연대 외 16개 기관)
- 비치장비 : 케미컬 흡착재, 보호장갑, 마스크 등 8종

2) 실험실 안전사고 대응 및 처리 매뉴얼 보완 및 사고 대응 훈련 실시

실험실 안전사고 대응 및 처리 매뉴얼에 따라 사고 전파, 조치하며 실험실 안전사고 대응훈련을 실시하여 유사사고 발생 시 대응능력 향상

- 실험실 안전사고 대응조직



3) 실험실 사고사례 전파

실험실 안전사고에 대한 경각심을 높이고 유사사고 예방하기 위해 국·내외 대학과 연구기관에서 발생하는 사고를 수집하여 학내 대학원생 및 연구원 등 연구 활동 종사자에게 이메일을 통해 전파

4) 실험실 사고처리 흐름도 및 비상연락스티커 제작 배포

실험실사고 발생시 신속하고 정확하게 처리할 수 있도록 일련의 사고처리 흐름도 및 비상연락스티커 제작 배포

라. 생물(LMO) 실험실 안전관리

「유전자변형생물체 국가간 이동 등에 관한 법률(2008.1)」과 보건복지부 「실험실 생물안전지침(2006.12)」에 따라 실험실내 생물안전 확보를 위하여 생물실험에 대한 신고·허가/안전교육/안전점검을 「서울대학교 생물안전관리」체계로 운영

1) 병원체 및 LMO 실험실 안전교육

- 기간 : '16년 2월 ~ 8월
- 대상 : 생물안전등급 2등급 이상 연구 활동 종사자

- 내용 : 생물안전에 관한 이론교육(3시간) 및 실무교육 병행

2) LMO 실험실 안전점검

2등급 이상 생물안전연구시설(LMO)에 대하여 교과부와 공동으로 점검 실시 및 점검 후 개선

마. 방사선 실험실 안전관리

방사선물질 취급 연구 활동 종사자 및 실험실 안전관리를 위해 교육, 점검, 관리 프로그램 구축

1) 방사선 안전교육

- 기간 : '12년 2월
- 대상 : 방사선물질 취급 연구 활동 종사자
- 내용 : 방사선안전이론교육(6시간)과 방사선취급 실습교육 병행

2) 방사선 실험실 안전점검

방사선사용 장소에 대한 정밀안전점검을 실시하여 현장 안전지도 활동 확대

- 기간 : '16년 5월, 10월
- 실시자 : 환경안전원 방사선 안전 관리자
- 내용 : 방사선안전점검 표준지침서에 따라 전용장비를 이용하여 점검

3) 방사선안전관리 프로그램 구축

- 방사선피폭(사고)으로 인한 건강상의 영향을 평가하고 이상 시 신속 정확하게 대처할 수 있는 비상대응 체계 운영
- 방사선안전 사고사례 및 유사사고 방지대책을 신속하게 전파할 수 있는 온라인 정보공유 시스템 구축 운영
- 방사성물질의 구매, 보관, 사용, 폐기까지의 추적관리 프로그램 개발, 방사성 물질의 불법유통으로 인한 방사선사고 예방

바. 실험실 환경개선사업 실시

실험실내 화학약품은 대부분 개방형 시약장에 보관되고 있어 실내 공기오염이 가중되어 연구활동종사자의 건강을 위협받고 있으며 또한 인화성물질을 실험실내 다량보관하고 있어 화재시 대형화재로의 위험이 높아 교과부에서 지원하는 실험실 환경개선사업을 통해 밀폐형시약장과 인화성 화학약품 저장 캐비닛을 각 기관에 배포하여 실험실 환경을 개선하도록 유도

사. 실험폐기물관리 강화

1) 실험폐수 관리강화 및 발생 저감 노력

실험실에서 발생하는 실험폐수 관리를 위해 처리의뢰부터 반출까지의 이력을 추적 관리하는 실험폐수처리내역 프로그램 구축 및 실험폐기물 발생 저감을 위해 환경안전교육 실시

2) 방사성폐기물 관리강화

- 방사성폐기물의 분류항목을 보다 세분화하고, 현장 안전점검을 강화하여 방사성폐기물 발생 최소화
- 방사선이용 분야별 표준 실험 절차서를 개발·보급하여 불필요한 방사성폐기물 발생 방지

3) 생물(의료)폐기물 관리 강화

- 생물(의료)폐기물의 수집 및 분류에 관한 교육 실시 및 실험실내 에어로졸 발생 최소화를 위한 폐기물용기 덮개 배포

아. 공기오염도 조사 실시

연구·실험실내 공기오염도 조사를 통해 부적합 실험실에 대하여 환경개선을 기관에 요청하여 안전하고 쾌적한 실험실 환경을 구축

- 기간 : '16년 9월 ~ 12월
- 대상 : 학내 연구·실험실 중 예비조사를 통해 대상자 선정
- 내용 : 미세먼지, 휘발성유기화합물, 포름알데히드, 이산화탄소 등 7가지 항목

자. 실험실 통합관리 프로그램 구축

기관별, 건물별, 층별, 실험실별로 위험요소 파악 및 안전관리 현황을 용이하게 파악하여, 실험실 안전사고를 예방하고, 쾌적한 실험실 환경을 조성 하고자 함

- 관악/연건 1,500여개 실험실 대상 기관별, 건물별, 층별, 실험실별 위험지도(Campus hazard map)을 작성
- 위험요소 현황파악 및 실험실 안전점검에 활용
- 위험구역 대상 중점 관리구역 설정
- 화학물질관리시스템 구축
- 폐수 관리 시스템 구축
- 화재 등 사고발생 시 위험물질 정보 제공

차. 연구 활동 종사자 특수건강검진 실시

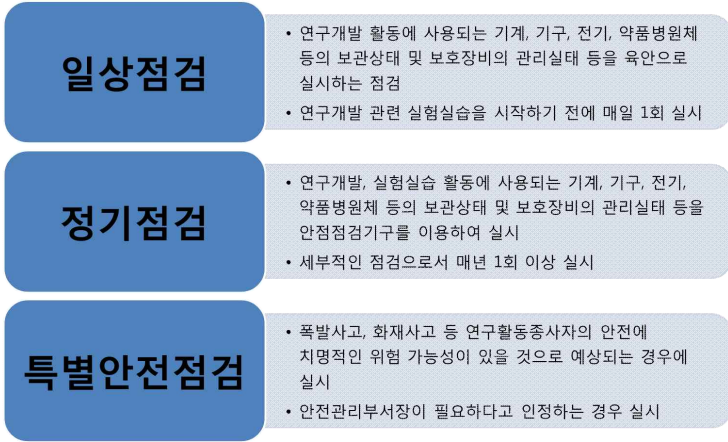
연안법 제18조 4항에 따라 「산업안전보건법 시행령」 제29조 및 동법 시행규칙 별표 12의2 「특수건강진단 대상 유해인자」 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구 활동 종사자를 모니터링하여 특수건강검진 실시

**□제1협동: 서울과학기술대학교**

**1. 실험실 안전 점검 체계**

- 2012년 3월 1일 제정공포된 ‘서울과학기술대학교 연구실안전관리규정’에 따라 본 연구가 진행될 연구실의 안전환경을 관리 및 개선하며 연구활동종사자를 보호하고 연구에 전념할 수 있도록 할 예정임
- 각 대학의 연구실 안전관리에 관한 임무를 수행하기 위하여 대학의 장은 대학안전관리 총괄책임자가 되고, 각 학(부)과장은 학(부)과 안전관리책임자로 되며, 각 연구실에는 안전담당자 정, 부를 지정하여, 연구실 안전관리를 책임짐
- 연구실의 안전사고 예방을 위하여 연구실 안전표식을 연구실 내부에 부착하여 실험실 구성원으로 하여금 숙지하도록 함

안전 확보 및 환경위해 요소를 제거하기 위한 주기적인 안전점검 실시 계획



2. 교육 훈련

가. 개요

- 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 확보하여 실험 및 연구 활동에 기여하고, 또한 연구실 안전 환경 조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강하고자 함
- ‘서울과학기술대학교 연구실안전관리규정’은 교내 연구 활동 종사자에게 의무적으로 매년 ‘연구실 안전교육’의 수강을 강제하고 있음

나. 교육대상

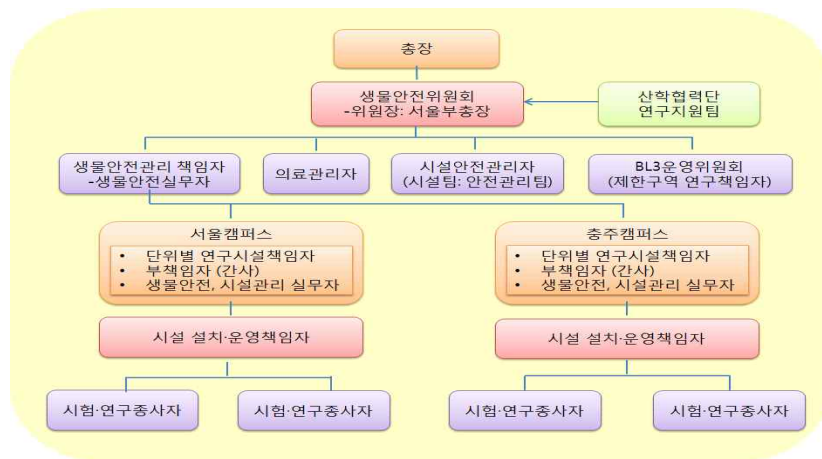
- 교수, 대학원생, 실험조교, 전문 직원, 소속연구원 및 실험참여 학부생 등

다. 교육구분

- 정기교육 : 방학기간 중 1회 출석 수업 실시
- 연구실 안전교육을 이수한 자에게 연구실 안전교육 이수증명서를 교부하며, 미 이수한자에 대하여 연구실 출입을 제한하여 실험실 안전을 도모함

□제2협동: 건국대학교

1. 실험실 안전 점검 체계



2. 교육 훈련

가. 생물안전교육

- 목적 : 시험·연구용 LMO 안전관련 정보교류의 장을 마련하여 LMO 연구 종사자의 안전의식 제고 및 제도의 조기정착 도모
- 대상 : 생물 관련 연구 책임자 및 종사자 전원
- 교육 기간 : 1년에 최소한 1회 생물안전 교육 이수  
(교수, 직원 : 1회/3년, 석사과정 : 1회/2년, 박사과정 : 1회/3년, 연구원 : 1회/3년)

교내 연구시설 설치·운영 점검표 작성 - 5회/1주 작성, 분기별로 제출

생물 실험		
항 목	결 과	작성요령
각 실험실에는 생물 안전수준 (Biosafety level, BSL)은?	<input type="checkbox"/> level 1 <input type="checkbox"/> level 2 <input type="checkbox"/> level 3 <input type="checkbox"/> level 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• level 1: 건강한 성인에게는 질병을 일으키지 않는 것으로 알려진 생물체를 다루는 경우 예) E. coli, Bacillus subtilis, Naegleria gruberi, Infectious canine hepatitis virus</li> <li>• level 2: 사람에게 감염되었을 경우 중세가 심각하지 않고 예방 또는 치료가 비교적 용이한 질병을 일으킬 수 있는 생물체를 다루는 경우 예) Measles virus, Salmonellae, Toxoplasma spp., Hepatitis B virus, 장관 병원성 E. coli, Vibrio cholerae</li> <li>• level 3: 사람에게 감염되었을 경우 중세가 심각하거나 치명적일 수도 있으나 예방 또는 치료가 가능한 질병을 일으킬 수 있는 생물체를 다루는 경우 예) M. tuberculosis, St. Louis encephalitis virus, Coxiella burnetii SARS virus, Brucella abortus</li> <li>• level 4: 사람에게 감염되었을 경우 중세가 매우 심각하거나 치명적이며 예방 또는 치료가 어려운 질병을 일으킬 수 있는 생물체를 다루는 경우 예) Ebola Zaire, Marburg virus, Rift Valley Fever</li> </ul>
실험실에 생물안전표지가 부착되어 있는가?	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	•작성요령: 미생물 실험을 하는 경우 출입문에 생물안전표지를 부착하여야 함 *생물안전표지 참조
유전자 재조합 실험을 실시하고 있는가?	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	•작성요령: 실험 과정에 유전자를 재조합하는지의 여부
	관리가 관동록하였는가? <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	•작성요령: level 1, 2 신고, level 3, 4 등록
사용하는 바이러스 벡터명은 무엇인가? ( )	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	•작성요령: 유전자 재조합에 사용하는 바이러스 벡터명을 기록
	실험자는 바이러스 벡터의 위험성을 인지하고 있는가? <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	•작성요령: 유전자 재조합에 사용하는 바이러스 벡터명의 위험성을 인지시 '예' 그렇지 않으면 '아니오'
생물학적 안전수준 2 이상 실험 시 연구활동 종사자 현황을 규정에 맞게 보관 및 취급하고 있는가?	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	•작성요령: 생물학적 안전수준 2이상 실험시 월정보관 규정 준수시 '예' 그렇지 않으면 '아니오'
실험 후 생물학적 폐기물을 지정된 방법으로 폐기하고 있는가? (실험에 사용된 소모품 포함)	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	•작성요령: 생물실험에 사용된 소모품을 일반폐기물과 혼합처리시 '아니오', 위탁처리 '예' (주사기바늘, 날카로운 실험장비의 분리수거) *참고: (감염성 폐기물) 감염성 폐기물 위탁처리업체에 위탁처리 (결과 및 취급) 실험폐기물 처리 및 결과 방법 숙지

나. 온라인상의 안전 교육

- 대상 : 실험실을 출입하는 모든 이용자
- 안전교육 시간 및 수료인정시간 : 1년에 12시간 이상 교육인정기간은 수료증을 받는 날부터 6개월 간
- 연구실 안전교육 과정 : 연구실 안전교육(수료 시 6개월) - 모든 연구 활동 종사자 야간 잔류자 안전교육(수료 시 1년) - 야간에 교내에 잔류하는 종사자

다. 실험실 환경 안전 점검

- 실험실 안전 관리 규정에 의거 실험실의 위험 정도에 따라 A, B, C로 관리 등급을 분류함



실험실 위험 등급

위험등급	점검주기	분류기준
A 등급	분기 1회	가연성 가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성동위원소, 위험성 높은 장비가 설치된 실험실
B 등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성 가스, 소량의 폐수발생 실험실 등
C 등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실 등

**□ 제3협동: 대상주식회사**

**1. 연구소 내 실험실 안전 수칙**

가. 연구실험실 안전수칙

- 실험기계기구, 전기기구 등의 가동시는 자리를 비우지 말 것
- 실험기계기구의 가동중에는 정비, 청소를 하지 말 것
- 실험기계기자재의 조정이나 정지시 막대기를 사용하지 말 것
- 고압가시용기 밸브는 서서히 열고, 서서히 잠그도록 할 것
- 내용을 모르는 실험기계기구, 전기기구에 함부로 손대지 말 것
- 모든 실험용기계기구, 전기기구는 담당자 이외에 손대지 말 것
- 관계자 외 출입통제구역은 허가없이 출입하지 말 것

나. 연구실험실 일반 안전수칙

- 연구실험시 규정된 실험복장 및 보호구를 착용함
- 시약 및 실험기구, 기자재는 점검후 사용함
- 실험실내 안전한 통로를 확보하고, 주위환경은 항상 정리정돈 함
- 인화성물질 및 폭발성물질이 있는 장소에서는 화기취급을 하지 않음
- 위험표시구역은 무단출입을 하지 않음
- 담배는 흡연 장소에서만 피워야 함
- 모든 실험기자재, 기계전기기구는 취급요령을 숙지후에 취급함
- 실험기자재, 기계전기기구 가동중에는 청소, 정비, 점검을 해서는 안됨
- 연구실험실내 인화성액체 등 위험물을 최소량만 비치함
- 연구실험실내 유독물질을 방치하지 않음
- 화학, 화공물질, 연구실험기자재는 던져서 주고받지 않음
- 공동의 연구실험은 서로 긴밀한 협조를 하면서 함
- 자리이탈 및 교대시에는 연구실험에 대한 내용을 확실하게 인수인계함
- 모든 안전수칙과 안전표시(라벨), 위험표지를 준수함

**2. 연구소 내 위해시약 관리 규정 교육 및 준수**

가. 정기교육 및 특별 교육 실시

- 연구소내 실험실에서는 수많은 화학물질을 취급하고 있으며, 이들 화학 물질은 언제든지 화재, 폭발, 중독 등의 사고가 유발될 수 있는 유해 물질을 용하고 있으므로 정기 교육을 통하여 사전에 예방함

- 교육프로그램 다변화를 통하여 정기적으로 안전교육을 시행함
- 실험 특성을 고려한 특별교육을 실시
- 신입 연구원의 경우 연구실험실 출입을 위한 사전교육 실시
- 온라인 동영상 교육을 통하여 시간, 장소에 구애받지 않고 항시 안전교육을 실시함

### 3. 실험 폐기물 처리

구분	종류	사 진	처리 방법	관련법
사업장 일반 폐기물	대기환경보전법, 수질환경보전법, 폐기물관리법과 관련하여 발생되는 폐기물을 제외한 폐기물		일반폐기물 처리방법으로 배출	
폐 수	할로겐족폐수 (불소, 염소, 브롬, 요오드)	 종류별로 각각 다른통에	자연계수집장  or 폐수수집장	[폐기물관리법] [수질환경보전법]
	비할로겐족폐수 (할로겐족 외) + 유기용매 (알콜, 아세톤, 벤젠, 톨루엔, 솔벤트, 헥산 등)			
	중금속폐수 (납, 구리, 비소, 카드뮴 등)			
	폐산, 폐알칼리 (수분 90% 이상)			
의료폐기물	조작물류폐기물 (실험동물사체)		처리요청서작성 ↓ 수집장 보관	[폐기물관리법]
	병리계폐기물 손상성폐기물		전용 종이박스에 모아 수집장으로	
	주사바늘 (only 주사바늘)		바늘전용박스에 모아 수집장으로	

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Double-layered microparticles with enzyme-triggered release for the targeted delivery of water-soluble bioactive compounds to small intestine	서울대학교	주저자	Food Chem.	4.052	2014.10.15	중복사사	SCI (6회인용)
2	논문	Antioxidative and Nitric Oxide Scavenging Activity of Branched-Chain Amino Acids	건국대학교	주저자	Food Sci. Biotechnol.	0.699	2015.08.31	중복사사	SCI (1회인용)
3	논문	Influence of lysolecithin and Tween 80 on the colloidal stability of branched chain amino acids in a nanosuspension system	서울과학기술대학교	주저자	Food Chem.	4.052	2017.04.15	중복사사	SCI
4	특허 (등록)	신규의 동결건조보조제 및 새로운 인지질 용해용 혼합용매를 이용한 리포솜 동결분체의 제조 방법	서울대학교	발명인	대한민국	-	2016.12.13	단독사사	-
5	특허 (출원)	Method for production of liposome powder with novel freeze drying supplement and novel solvent for phospholipid	서울대학교	발명인	PCT	-	2016.09.13	단독사사	-

## 11. 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음	

## 12. 참고문헌

	코드번호	D-14
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aynie, I., VAUTHIER, C., CHACUN, H., FATTAL, E., &amp; COUVREUR, P.(1999). Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. <i>Antisense and Nucleic Acid Drug Development</i>, 9(3), 301-312.</li> <li>• Bansal, S., Kashyap, C. P., Aggarwal, G., &amp; Harikumar, S.(2012). A comparative review on vesicular drug delivery system and stability issues. <i>International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry</i>, 2(3), 704-713.</li> <li>• Cha, D. S., &amp; Chinnan, M. S.(2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. <i>Critical reviews in food science and nutrition</i>, 44(4), 223-237.</li> <li>• Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L., Aitken, R., &amp; Watkins, R.(2008). Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. <i>Food additives and contaminants</i>, 25(3), 241-258.</li> <li>• Choi, S. J., Won, J. W., Park, K. M., &amp; Chang, P. S.(2014). A New Method for Determining the Emulsion Stability Index by Backscattering Light Detection. <i>Journal of Food Process Engineering</i>, 37(3), 229-236.</li> <li>• Comunian, T. A., Abbaspourrad, A., Favaro-Trindade, C. S., &amp; Weitz, D. A.(2014). Fabrication of solid lipid microcapsules containing ascorbic acid using a microfluidic technique. <i>Food chemistry</i>, 152, 271-275.</li> <li>• Comunian, T. A., Thomazini, M., Alves, A. J. G., de Matos Junior, F. E., de Carvalho Balieiro, J. C., &amp; Favaro-Trindade, C. S.(2013). Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. <i>Food Research International</i>, 52(1), 373-379.</li> <li>• Duncan, T. V.(2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. <i>Journal of colloid and interface science</i>, 363(1), 1-24.</li> <li>• George, M., &amp; Abraham, T. E.(2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. <i>Journal of controlled release</i>, 114(1), 1-14.</li> <li>• Huang, H., Dunne, M., Lo, J., Jaffray, D. A., &amp; Allen, C.(2013). Comparison of computed tomography-and optical image-based assessment of liposome distribution. <i>Mol Imaging</i>, 12(3), 148-160.</li> <li>• Imran, M., Revol-Junelles, A.-M., Martyn, A., Tehrany, E. A., Jacquot, M., Linder, M., &amp; Desobry, S.(2010). Active food packaging evolution: transformation from micro-to nanotechnology. <i>Critical reviews in food science and nutrition</i>, 50(9), 799-821.</li> </ul>		

- Jeon, O., Samorezov, J. E., & Alsberg, E.(2014). Single and dual crosslinked oxidized methacrylated alginate/PEG hydrogels for bioadhesive applications. *Acta biomaterialia*, 10(1), 47–55.
- Jesorka, A., & Orwar, O.(2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 1, 801–832.
- Krämer, S., & Wunderli-Allenspach, H.(2003). No entry for TAT(44 - 57) into liposomes and intact MDCK cells: novel approach to study membrane permeation of cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Biomembranes*, 1609(2), 161–169.
- Lee, J.-B., Ahn, J., Lee, J., & Kwak, H.-S.(2003). The microencapsulated ascorbic acid release in vitro and its effect on iron bioavailability. *Archives of pharmacal research*, 26(10), 874–879.
- Lee, K. H., Lee, P. M., & Siaw, Y. S.(1993). Immobilization of aminoacylase by encapsulation in poly L lysine stabilized calcium alginate beads. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 57(1), 27–32.
- Li, C., Zhang, Y., Su, T., Feng, L., Long, Y., & Chen, Z.(2012). Silica-coated flexible liposomes as a nanohybrid delivery system for enhanced oral bioavailability of curcumin. *International journal of nanomedicine*, 7, 5995.
- Machado, A. H., Lundberg, D., Ribeiro, A. J., Veiga, F. J., Miguel, M. G., Lindman, B. r., & Olsson, U.(2013). Encapsulation of DNA in Macroscopic and Nanosized Calcium Alginate Gel Particles. *Langmuir*, 29(51), 15926–15935.
- Mozafari, M. R.(2006). *Nanocarrier technologies: frontiers of nanotherapy*: Springer.
- Paques, J. P., van der Linden, E., van Rijn, C. J., & Sagis, L.(2013). Alginate submicron beads prepared through w/o emulsification and gelation with CaCl<sub>2</sub> nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 428–434.
- Park, K. M., Sung, H., Choi, S. J., Choi, Y. J., & Chang, P.-S.(2014). Double-layered microparticles with enzyme-triggered release for the targeted delivery of water-soluble bioactive compounds to small intestine. *Food chemistry*, 161, 53–59.
- Parmentier, J., Thewes, B., Gropp, F., & Fricker, G.(2011). Oral peptide delivery by tetraether lipid liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 415(1 - 2), 150–157.
- Rehm, B. H.(2009). Alginates: biology and applications.
- Salamanca-Buentello, F., Persad, D. L., Martin, D. K., Daar, A. S., & Singer, P. A.(2005). Nanotechnology and the developing world. *PLoS Medicine*, 2(5), e97.

- Takahashi, M., Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y., & Wada, K.(2009). Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(19), 9141-9146.
- Yi, C., Fu, M., Cao, X., Tong, S., Zheng, Q., Firempong, C. K., Jiang, X., Xu, X., & Yu, J.(2013). Enhanced oral bioavailability and tissue distribution of a new potential anticancer agent, Flammulina velutipes sterols, through liposomal encapsulation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(25), 5961-5971.
- 고상훈,(2008). 식품 소재 나노물질의 개발. *Safe Food*, 3:1-7.
- 김세훈, 김범식, 고상훈.(2014). 나노기술응용식품의 정의 및 적용 범주. *식품과학과 산업*, 47:2-11.
- 김종태, 김철진, 조용진, 김양하, 김인환, 최애진.(2008). 고기능성 식품나노체 제조기술. *식품과학과 산업*, 41:33-45.
- 미래창조과학부, 나노기술연구협의회, 국가나노기술정책센터.(2014). *국가나노기술지도 총괄보고서*
- 유명애.(2014). 나노기술응용식품의 국제 연구 및 산업화 동향. *식품과학과 산업*, 47:21-37.
- 조황희, 소대섭, 전주용, 최봉기.(2006). 나노기술 영향평가에 관한 국내외 동향. *혁신 Brief* 16:1-32.
- 최승준.(2014) 식품나노소재로서의 나노에멀전. *식품과학과 산업*, 47:12-20.
- Forgiarini, A., Esquena, J., Gonzalez, C., & Solans, C.(2001). Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. *Langmuir*, 17(7), 2076-2083.
- Garti, N., & Benichou, A.(2001). Double emulsions for controlled-release applications: progress and trends. *Encyclopedic handbook of emulsion technology*. New York: Marcel Dekker. p, 377-407.
- Genovese, D., Lozano, J., & Rao, M.(2007). The rheology of colloidal and noncolloidal food dispersions. *Journal of food science*, 72(2), R11-R20.
- Gu, Y. S., Decker, E. A., & McClements, D. J.(2004). Influence of ι-carrageenan on droplet flocculation of β-lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsions during thermal processing. *Langmuir*, 20(22), 9565-9570.
- Gu, Y. S., Regnier, L., & McClements, D. J.(2005). Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β-lactoglobulin-ι-carrageenan membranes. *Journal of Colloid and interface Science*, 286(2), 551-558.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., McClements, D. J., & Decker, E.

- A.(2005). Increasing the oxidative stability of liquid and dried tuna oil-in-water emulsions with electrostatic layer-by-layer deposition technology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(11), 4561-4566.
- Ko SH.(2008). Nanomaterials for food products. *Safe Food*, 3:1-7.
  - McClements, D., & Decker, E.(2000). Lipid oxidation in oil in water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of food science*, 65(8), 1270-1282.
  - McClements, D. J.(2013). Nanoemulsion-based oral delivery systems for lipophilic bioactive components: nutraceuticals and pharmaceuticals. *Therapeutic delivery*, 4(7), 841-857.
  - McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J.(2007). Emulsion based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of food science*, 72(8), R109-R124.
  - McClements, D. J., & Rao, J.(2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(4), 285-330.
  - Morales, D., Gutiérrez, J. M., Garcia-Celma, M., & Solans, Y.(2003). A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. *Langmuir*, 19(18), 7196-7200.
  - Moreau, L., Kim, H.-J., Decker, E. A., & McClements, D. J.(2003). Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin-pectin membranes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(22), 6612-6617.
  - Mun, S., Decker, E. A., & McClements, D. J.(2005). Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan layers. *Langmuir*, 21(14), 6228-6234.
  - Ogawa, S., Decker, E. A., & McClements, D. J.(2004). Production and characterization of O/W emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan-pectin multilayered membranes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(11), 3595-3600.
  - Prince, L. M.(1975). Microemulsions versus micelles. *Journal of Colloid and interface Science*, 52(1), 182-188.
  - Ruckenstein, E., & Chi, J.(1975). Stability of microemulsions. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 71, 1690-1707.
  - Schulman, J. H., Stoeckenius, W., & Prince, L. M.(1959). Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. *The Journal of*

*Physical Chemistry*, 63(10), 1677–1680.

- Weiss, J., Decker, E. A., McClements, D. J., Kristbergsson, K., Helgason, T., & Awad, T.(2008). Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, 3(2), 146–154.