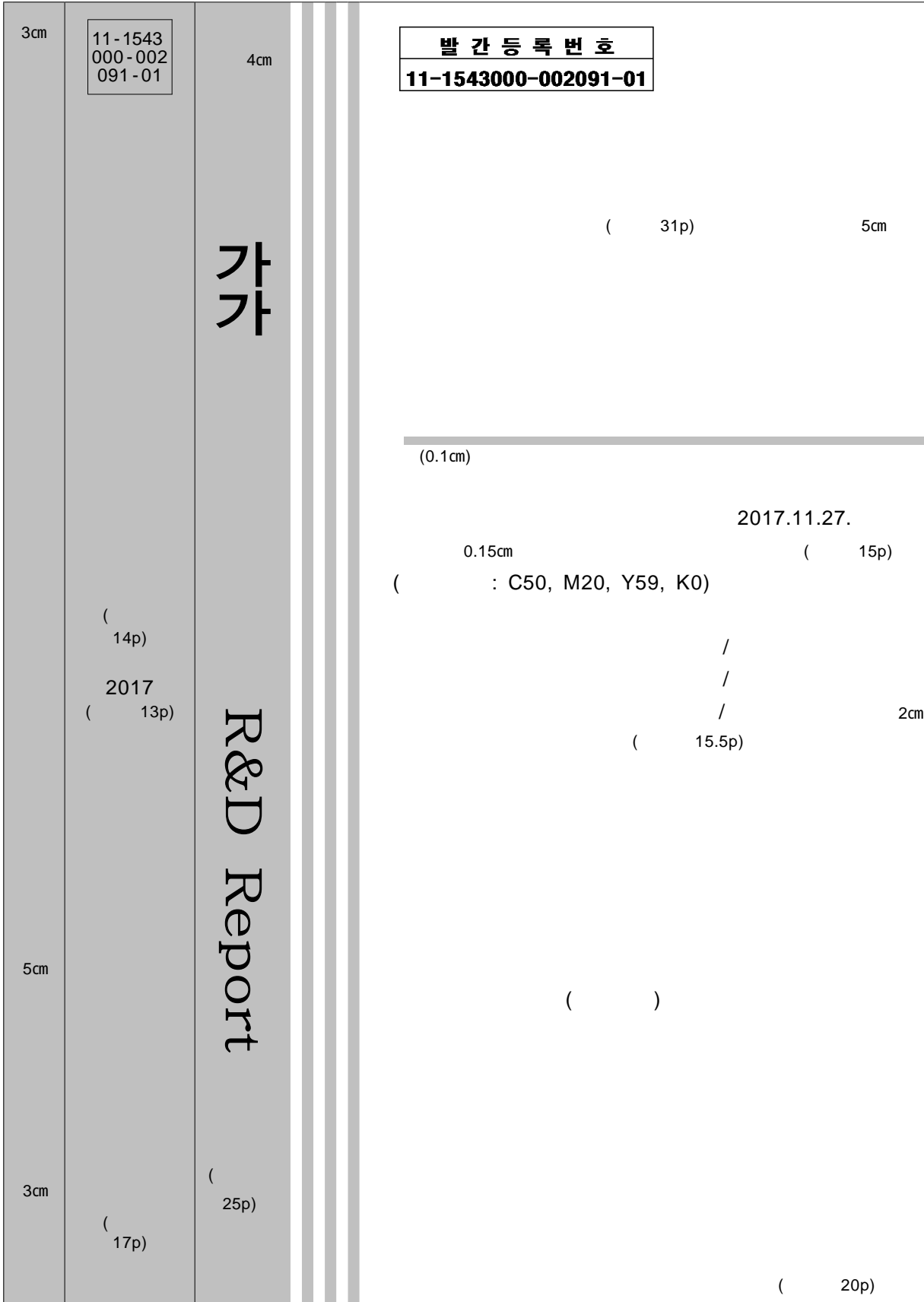


(뒷면) (옆면)

(앞면)



제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “저분자 펩타이드와 커큐민을 이용한 나노식품 제조기술의 산업체 상용화 연구 및 제품개발”(개발기간 : 2014. 11. 28. ~ 2017. 11. 27.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 11. 27.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단	서정향
세부연구기관명 : 건국대학교 산학협력단	서정향 (인)
협동연구기관명 : 계명대학교 산학협력단	남재열 (인)
참여기관명 : (주)오뚜기	이강훈 (인)
참여기관명 : (학교법인)건국유업	조남영 (인)
참여기관명 : 에덴식품영농조합법인	송재철 (인)

주관연구책임자 : 최미정
세부연구책임자 : 배호재
협동연구책임자 : 김준태
참여기관책임자 : 김승욱, 정태일, 김경욱

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	314058-3	해당 단계 연구 기간	2014. 11. 28. - 2017. 11. 27.	단 계 구 분	(최종단계)/ (총 3 단 계)
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구 과 제 명	대 과 제 명	저분자 펩타이드와 커큐민을 이용한 나노식품 제조기술의 산업체 상용화 연구 및 제품 개발			
	세 부 과 제 명	아·초임계수 처리된 기능성 올리고펩타이드 나노 제형 공정의 산업체 상용화 기술개발 개발된 나노소재 및 제품의 세포독성·체내안전성 평가 및 생리활성 효능 커큐민 나노 에멀전의 대량 생산화를 위한 최적 공정기술 확립 및 제품 개발			
연구 책임자	최 미 정	해당단계 참 여 연구원 수	총: 40명 내부: 27명 외부: 13명	해당단계 연구 개발비	정부: 300,000 천원 민간: 100,000 천원 계: 400,000 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총:113명 내부: 81명 외부: 32명	총 연구개발비	정부: 900,000 천원 민간: 300,000 천원 계 :1,200,000 천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	(1세부) 건국대학교			참여기업명 : 에덴식품영농조합법인, 건국유업	
	(2세부) 건국대학교				
	(1협동) 계명대학교			참여기업명 : ㈜오뚜기	
<ul style="list-style-type: none"> ○ pilot scale 콜라겐 펩타이드 리포솜 제조 공정 확립 및 이화학적 특성 분석 ○ 콜라겐 펩타이드 리포솜이 첨가된 유자음료의 pilot scale 제조 및 이화학적 특성 분석 ○ 펩타이드 및 리포솜이 첨가된 돼지고기 패티의 이화학적 특성 및 항산화 작용 분석 ○ 강황추출물 나노에멀전의 pilot scale로의 제조공정 확립 ○ 실제식품에 대한 강황추출물 나노에멀전 분말의 안정성평가 및 시제품 제조 ○ 펩타이드 리포솜 및 강황추출물 나노에멀전의 분말화 ○ 다중층 구조의 나노 소재 제조(3중층 펩타이드 리포솜, 다층구조 나노에멀전) ○ 개발된 나노소재 및 제품의 세포독성·체내안전성 평가 ○ 동물 실험을 통한 개발 및 선정된 나노식품의 체내 안전성 평가 ○ 개발된 나노소재 및 제품의 생리활성 효능규명(항염증, 항비만, 항산화 등) ○ 정량성과: 특허출원 3(4), 특허등록 2(1), 기술이전 1(1), 제품화 2(2), SCI논문 7(6.5), 비SCI 1(1), 학술발표 11(25), 인력양성 13(14), 홍보전시 1(1), 연구활용 6(6) 				보고서 면수 298쪽 (별첨 포함 432쪽)	

< 국문 요약문 >

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구의 목적: 나노식품 제조기술의 산업체 상용화 연구 및 제품 개발 ○ 연구의 내용: <ul style="list-style-type: none"> - Lab scale단위 나노소재의 pilot scale 제조공정 최적화 - 개발된 나노식품 기술(펩타이드 리포솜, 강황추출물 나노 에멀전)에 대한 공장 시스템 현장 적용 및 상용화 - 산업화된 식품소재 및 제품에 대한 나노식품에 대한 안전성, 기능성 검증 				
연구 개발성과	<p>< 주관 / 1세부 ></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Pilot scale 콜라겐 펩타이드 리포솜 제조 공정 확립 및 이화학적 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 초고속균질기 8,000 rpm, 초음파 처리 60 W, 펩타이드 농도 6% ○ 콜라겐 펩타이드 리포솜이 첨가된 유자음료의 pilot scale제조 및 이화학적 특성 분석 : 500 nm (10 L제조 가능/ 실제 대량생산 시 적용 가능) ○ 펩타이드 리포솜 첨가 유자음료 분말화(수율 72%) ○ 다중층 구조의 나노 소재 제조(3중층 펩타이드 리포솜, 다층구조 나노에멀전) <p>< 1협동 ></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 강황추출물 나노에멀전의 pilot scale로의 제조공정 확립(입자크기 : 137 nm) <ul style="list-style-type: none"> - 최적 제조 조건 : stirring(75℃ 2 hr) 후 초음파 처리(3~5 hr) ○ 실제식품에 대한 강황추출물 나노에멀전 분말의 안정성평가 및 시제품 제조 <p>< 2세부 ></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 개발된 나노소재 및 제품의 세포독성·체내안전성 평가 및 생리활성 효능규명 ○ 동물 실험을 통한 개발 및 선정된 나노식품의 체내 안전성 평가 결과 <ul style="list-style-type: none"> - 식이량 변화, 장기중량, 혈액학적 독성 등이 검출되지 않음(강황 추출물 나노에멀전) ○ 개발된 나노소재 및 제품의 생리활성 효능규명(항염증, 항비만, 항산화 등) <ul style="list-style-type: none"> - 항염, 항비만, 항노화 효과 확인(펩타이드 리포솜) - 항염, 항산화, 항노화, 지방독성 억제 효과 확인(강황 추출물 나노 에멀전) <p>< 전체 정량성과 ></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 특허출원 3(4), 특허등록 2(1), 기술이전 1(1), 제품화 2(2), SCI논문 7(6.5), 비SCI 1(1), 학술발표 11(25), 인력양성 13(14), 홍보전시 1(1), 연구활용 6(6) 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 나노 소재의 pilot scale 단위 제조를 통한 산업화 가능성 및 제품 적용 가능성 확인 ○ 펩타이드 리포솜의 항비만 기능성 효과 활용 ○ 우유, 이온음료에 대한 강황추출물 나노에멀전 분말의 안정성평가 및 햄, 백세강황환 시제품 제조 항비만 				
중심어 (5개 이내)	나노식품	독성평가	생리활성	대량생산	상용화

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Objective: Commercial commercialization of nano food manufacturing technology and product development. ○ Contents of the study: <ul style="list-style-type: none"> - Optimization of Pilot scale nano material manufacturing process. - Application and commercialization of the developed nano food technology (peptide liposome, turmeric extract nano-emulsion) to field. - Safety and functional investigation of nano foods for industrialized food products. - Develop commercially available nano food technology. 					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Optimal manufacturing process and physicochemical characterization of pilot scale collagen peptide liposome. ○ Optimal manufacturing condition and characterization of pilot scales of yuja beverage with collagen peptide liposome. ○ Analysis of physicochemical properties and antioxidant activity of peptide and liposome added pork patties. ○ Optimization of manufacturing process of pilot nanoemulsion of turmeric extract as pilot scale. ○ Stability evaluation and prototype production of turmeric extract nano-emulsion powder on food. ○ Powdering of peptide liposome and turmeric extract nanoemulsion. ○ Manufacture of multi-layered nanomaterials (triple-layered peptide liposome, multi-layered nanoemulsion) ○ To evaluate the cytotoxicity and internal safety of the developed nanomaterials and products and identify their physiological activities. ○ Safety evaluation of selected nano foods of in vivo experiments ○ Identification of physiologically active effects of developed nanomaterials and products (anti-inflammatory, anti-obesity, antioxidant, etc.) 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Identification of industrial applicability and product applicability by manufacturing pilot scale unit of nano material ○ Utilizing the anti-obesity functional effect of peptide liposome ○ Evaluation of the nanoemulsion powder stability of turmeric extracts in milk and ionic drinks and production of prototype of ham, turmeric pill. 					
Keywords	Nano food	Toxicity evaluation	Physiological activity	Scale-up	Commercialization	

국문 요약문 - 제1세부

(아·초임계수 처리된 기능성 올리고펩타이드 나노 제형 공정의 산업체 상용화 기술개발)

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구의 목적: 기존에 최적화된 lab scale에서의 리포솜 제형화 기술 및 어피콜라겐 가수분해 기술을 융합하여 pilot scale과 대량생산을 할 수 있는 scale-up된 plant scale에서도 안정성과 기능성을 유지하는 올리고 펩타이드 리포솜의 대량생산 formulation을 개발 ○ 연구의 내용: <ul style="list-style-type: none"> - 콜라겐 펩타이드 리포솜의 제조 조건 확립 - 콜라겐 펩타이드 리포솜 제조의 plant scale 적용 최적 공정 과정 확립 - 콜라겐 펩타이드 나노리포솜 이용한 기능성 제품 개발 - 지표물질의 분리 정제 - 지표성분 분석법 개발 및 적용 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 콜라겐 펩타이드 리포솜의 pilot scale 제조공정 확립 및 저장기간에 따른 안정성평가 결과, 1차 균질은 초고속 균질 처리(8,000 rpm, 3분), 2차균질 조건으로 초음파 처리(60 W, 3 min), 펩타이드 농도(6%)로 최적 조건을 설정하고 입자크기는 600 nm정도로 형성됨. 같은 조건에서 Lab scale 리포솜 제조와 비교시 입자크기는 2배가량 증가함. ○ 콜라겐 펩타이드 리포솜이 첨가된 유자음료의 pilot scale제조 및 이화학적 특성 분석결과 입자크기는 2~3 um정도로 나타남. ○ 리포솜 안정성 증진을 위한 0.1% 키토산 용액 및 0.25% HMP 용액을 최적농도로 사용하여 다중층 리포솜 제조 결과 입자크기는 다소 크게 나타남. ○ 펩타이드 및 리포솜이 첨가된 유자음료의 분말화 수율이 60%(유자음료)에서 72%(리포솜을 첨가한 유자음료)로 증가함. ○ 펩타이드 및 리포솜이 첨가된 돼지고기 패티의 이화학적 특성 및 항산화 작용 분석결과 펩타이드를 첨가한 돼지고기 패티에서 무첨가군에 비해 항산화 작용이 관찰됨. 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 아·초임계수 처리를 위한 고압열수처리용 고압고온 반응기 ○ 기술 이전을 통한 에덴식품의 유자음료 분말화 mix 관련 상품 연구 가능성 ○ 펩타이드 리포솜의 항비만 기능성 효과 활용 					
중심어 (5개 이내)	나노식품	콜라겐펩타이드	리포솜	대량생산	상용화	

국문 요약문 - 제2세부

(개발된 나노소재 및 제품의 세포독성·체내안전성 평가 및 생리활성 효능)

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발된 나노소재 및 제품의 세포독성·체내안전성 평가 및 생리활성 효능규명 ○ 다양한 조직유래 세포주 및 일차 배양 세포를 대상으로 나노식품의 세포 독성 및 유전독성 평가 ○ 개발된 나노 소재의 세포주 대상 세포 독성 평가를 통한 독성 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 커큐민 소재 및 유자 샘플의 세포 독성 여부에 대해 세포주를 대상으로 잠재적 독성의심 나노물질과의 비교·분석 ○ 개발된 나노 소재의 일차배양세포 대상 세포 독성 평가를 통한 독성 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 콜라겐 펩타이드 및 커큐민 소재 세포독성 여부에 대해 일차 배양 세포를 대상으로 잠재적 독성의심 나노물질과의 비교·분석 - 세포독성 측정법으로 LDH assay, MTT assay, Live/Dead assay를 적용 ○ 개발된 나노 소재의 세포주 대상 세포 유전 독성 평가 및 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 콜라겐 펩타이드 및 커큐민 소재의 유전독성 여부에 대해 잠재적 독성의심 나노물질과의 비교·분석을 시행, 개발된 나노소재의 유전독성 가능성 평가 - 유전 독성 측정법으로 Comet assay를 적용 세포종류별 독성 및 유전독성 여부에 대한 database 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 세포종류별 독성 및 유전독성 여부 (세포 종류별 대비 나노소재의 농도별 viability data 테이블 구축) ○ 동물 실험을 통한 개발 및 선정된 나노식품의 체내 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 소동물을 이용한 공장화 공정에서 생산된 나노 소재의 반복 투여 독성 평가 - 소동물 실험 결과와 세포 독성 결과 database와의 연계를 통한 나노식품의 구조·독성 상관관계 도출 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ Plant scale로 개발된 기능성 유자 샘플의 세포독성·체내안전성 평가에 대한 논문 게재 및 학술성과 ○ Plant scale로 개발된 기능성 커큐민 샘플의 세포독성·체내안전성 평가에 대한 논문 게재 및 학술성과 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 초임계수 분해 기술이라는 국내외 식품분야에 응용되지 않은 새로운 기술영역을 도입한 나노 소재 식품의 세포독성 및 체내안전성 양상을 입증함으로써, 향후 관심을 갖는 사업체를 통한 사업 확장 기대 및 학술적 방향 제시 					
중심어 (5개 이내)	콜라겐펩타이드 리포솜	강황추출물 나노에멀전	세포독성	생리활성		

국문 요약문 - 제1협동

(커큐민 나노에멀전의 대량 생산화를 위한 최적 공정기술 확립 및 제품 개발)

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 커큐민 나노에멀전의 대량 생산화를 위한 최적 공정기술 확립 ○ 향기성분 masking과 저장 안정성 증진을 위한 캡슐화 기술 개발 ○ 제품 내 나노물질 검증 및 분석법 개발 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 50%의 에탄올을 사용하였을 경우 최대 440.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$의 커큐민이 추출되었으며, 물을 사용한 경우에는 4.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$의 커큐민이 추출되었다. 하지만, 2%의 레시틴을 혼합한 물에 ultrasonication을 10분 병행 처리한 조건에서는 388.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$로 높은 농도의 커큐민이 추출됨 ○ 강황추출물 나노에멀전의 최적 제조 조건은 오일 : 유화제 : 물의 비율이 7.5 : 7.5 : 85이며, HLB 값이 10.6인 조건으로, 평균 입자크기와 제타전위는 30 mL의 lab scale에서는 97.1 nm와 -24.9 mV이며, 10 L의 plant scale에서는 137.6 nm와 -33.5 mV를 나타냄 ○ 최적 조건에서 제조된 강황추출물 나노에멀전을 수용성 키토산으로 코팅한 후 입자의 변화를 측정한 결과 2.5%의 수용성 키토산 조건에서 입자크기는 200 nm 이하를 보이며, 제타전위가 +30 mV를 보여 안정한 상태를 보임 ○ 강황추출물 나노에멀전과 키토산 코팅한 경우 순수한 강황추출물에 비해 pH 변화와 염농도의 변화에 따른 커큐민의 분해를 유의적으로 억제함 ○ 강황추출물 나노에멀전을 적용한 햄 시제품을 개발하여 무처리 제품, 커큐미노이드 첨가 제품, 강황분말 첨가 제품, 강황추출물 분말 첨가제품과 관능평가를 비교하였을 때 강황추출물 나노에멀전을 첨가한 제품이 무처리 제품과 유사한 점수를 받아 제품개발 가능성 ○ 식품모사용매와 유통되는 식품에 함유된 강황추출물 나노에멀전의 검증 및 분석을 위해 혼합 전후의 입자크기, 제타전위, 형태분석, 함량변화 및 열안정성 등을 비교하였다. 또한 순수한 커큐민을 혼합한 경우 저장 조건에 따라 커큐민의 분해로 인해 커큐민의 함량이 50%이상 감소하는데 비해 나노에멀전으로 혼합된 경우에는 10% 미만의 감소를 보임 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 강황추출물 나노에멀전을 적용한 음료, 분말, 환 등의 다양한 제품으로의 상용화에 활용 					
중심어 (5개 이내)	강황추출물 나노에멀전	대량생산	캡슐화	나노물질 검증	상용화	

< SUMMARY - SP1 >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<p>○ Objective: Development of a mass production formulation of oligopeptide liposome that maintains stability and functionality even on a scale-up plant scale capable of pilot scale and mass production by blending liposome formulation technology and hydrolysis technology.</p> <p>○ Contents of the study:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Optimal manufacture conditions for collagen peptide liposomes. - Development of functional products using oligopeptide nanoliposome. - separation and purification of indicator substances. - Development and application of surface composition analysis method. 					
Results	<p>○ The pilot scale manufacturing process of collagen peptide liposome and the stability evaluation according to storage period. The manufacturing condition was determined by high speed homogenization (1st, 8,000 rpm, 3 min), ultra sonication (2nd, 60 W, 3 min), peptide concentration (6%) and its particle size was showed about 600 nm. Under the same manufacturing conditions, particle size increased about twice as compared to Lab scale liposome preparation.</p> <p>○ The pilot scale of the citrus beverage with collagen peptide liposomes and the analysis of physicochemical properties showed that the particle size was about 2 ~ 3 um.</p> <p>○ The particle size of the multi-layered liposomes is slightly larger than single-layered liposomes. multi-layered liposomes was made with the 0.1% chitosan solution and the 0.25% HMP solution as optimal concentration respectively for the improvement of liposome stability.</p> <p>○ Powder yield of yuja beverage with peptides and liposomes increased from 60%(yuja beverage) to 72%(yuja with liposomes).</p> <p>○ The physicochemical properties and antioxidant activities of the pork patties containing the peptides and liposomes showed antioxidative activity in the pork patties containing the peptides compared to the no-additives group.</p>					
Expected Contribution	<p>○ High pressure high temperature reactor for sub and super-critical water.</p> <p>○ Study on the mix products of yuja beverage powder.</p> <p>○ Utilizing the anti-obesity functional effect of peptide liposome.</p>					
Keywords	Nano food	Collagen peptide	Liposome	Scale-up	Commercialization	

〈 SUMMARY – SP2 〉

		코드번호			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Toxicity assessment and efficacy verification of developed nanomaterials and products ○ Assessment of cytotoxicity and genotoxicity of nano foods in various tissue-derived cell lines and primary cultured cells 1. Toxicity evaluation of the developed nanomaterials by evaluating cell cytotoxicity against cell lines <ul style="list-style-type: none"> - Comparison of the cytotoxicity of curcumin and citron samples against cell lines with potential toxicity suspected nanomaterials 2. Toxicity assessment of cytotoxicity of primary cultured cells of developed nanomaterials <ul style="list-style-type: none"> - Comparison of the cytotoxicity of curcumin and citron samples against primary cultured cells with potential toxicity suspected nanomaterials - LDH assay, MTT assay, Live/Dead assay using cytotoxicity 3. Genotoxicity of the developed nanomaterials by evaluating cell cytotoxicity of cell lines <ul style="list-style-type: none"> - Evaluation of potential genotoxicity of curcumine and citron samples in comparison with potential nanomaterials - Comet assay using genotoxicity 4. Construction of a database on toxicity and genotoxicity by cell type <ul style="list-style-type: none"> - Toxicity and genotoxicity of each cell type (Establishment of viability data table by concentration of cell type and nanomaterial) 5. Safety evaluation of nano foods using in-vivo assay <ul style="list-style-type: none"> - Assessment of single-dose toxicity of plant scale nanomaterials products using small animals - Assessment of repeated dose toxicity of plant scale nanomaterials products using small animals - Derive structure-toxicity correlation of nano food through linkage between In-vivo test results and cytotoxicity results 				
Results	○ Papers and Scientific Achievements on Cytotoxicity and Safety Evaluation of plant scale functional curcumin and citron samples				
Expected Contribution	○ Expand the business through business entities that are interested in the future by demonstrating the cytotoxicity and safety of nanomaterial foods that incorporate new technological fields called a supercritical water decomposition technology				
Keywords	Collagen peptide liposome	Tumeric extract nanoemulsion	Cytotoxicity	Biological activity	

〈 SUMMARY – CP1 〉

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Establishment of optimal process technology for mass production of curcumin-loaded nanoemulsion ○ Development of encapsulation technology for masking and storage stability of curcumin ○ Development and validation of nanomaterials in food products 					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ The maximum curcumin content of 440.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was extracted by 50% ethanol whereas only 4.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ curcumin was extracted when pure water was used. High concentration of curcumin was extracted at a concentration of 388.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the case of ultrasonication for 10 min in 2% lecithin mixed water. ○ The optimum formulation of turmeric extract nanoemulsion were obtained when oil: emulsifier: water ratio of 7.5: 7.5: 85 and HLB value of 10.6. The average particle size and zeta potential were 97.1 nm and -24.9 mV for the lab scale of 30 mL and 137.6 nm and -33.5 mV for the plant scale of 10 L, respectively. ○ 2.5% water soluble chitosan coating was the optimum condition to obtain the small particles of less than 200 nm and high zeta potential of + 30 mV. ○ Curcumin degradation was significantly inhibited in various pHs and salt concentration after nanoemulsion and chitosan coating compared to the pure turmeric extract. ○ Turmeric extract nanoemulsion applied canned ham was very similar sensory score to the control while the other samples such as curcuminoid, turmeric, and turmeric extract showed lower sensory score. ○ The verification and analysis of the turmeric extract nanoemulsion contained in the food simulants and the food product were investigated by the comparing the particle size, zeta potential, morphological change, curcumin content, and thermal stability before and after mixing. As a result, the curcumin content was significantly decreased by more than 50% when the pure curcumin was applied whereas the curcumin content was maintained less than 10% loss when the nanoemulsion was applied to the products. 					
Expected Contribution	○ It can be used for commercialization of various products such as beverage, powder, and ball to which turmeric extract nanoemulsion is applied.					
Keywords	Turmeric extract nanoemulsion	Mass production	Encapsulation	Verification of nanomaterials	Commercialization	

CONTENTS

Chapter 1. Introductcion of project	13
Chapter 2. Domestic and foreign present condition of the research	26
Chapter 3. Research progresses & results	55
Chapter 4. Goal achievement & level of contribution	283
Chapter 5. Plans for future application	291
Chapter 6. Foreign scientific and technological intelligence	292
Chapter 7. Security grade of R&D outputs	292
Chapter 8. Research facility & equipment status	292
Chapter 9. Implementation of safety measures	292
Chapter 10. Typical research achievement of the project	293
Chapter 11. Etc.	294
Chapter 12. Refference	295

<Attachment>

1. Nano-foods market research report.
2. Report for spreading and spreading nano technology
3. Optimal process report in mass production system.
4. Report of Step-by-step field application test results report using nano material advancement and food

〈 목 차 〉

제1장. 연구개발과제의개요	13
제2장. 국내외 기술개발 현황	26
제3장. 연구수행 내용 및 결과	55
제4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	283
제5장. 연구결과의 활용계획 등	291
제6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	292
제7장. 연구개발성과의 보안등급	292
제8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	292
제9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	292
제10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	293
제11장. 기타사항	294
제12장. 참고문헌	295

<별첨1> 나노식품 시장조사 보고서

<별첨2> 나노개발기술의 현장 보급 및 확산을 위한 관련 연구 보고서

<별첨3> 대량생산 체제에서 최적 공정 확립 보고서

<별첨4> 나노소재 고도화 및 시제품(식품)을 활용한 단계별 현장 실증(적용)시험 결과 보고서

제1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

1. 연구개발 목표

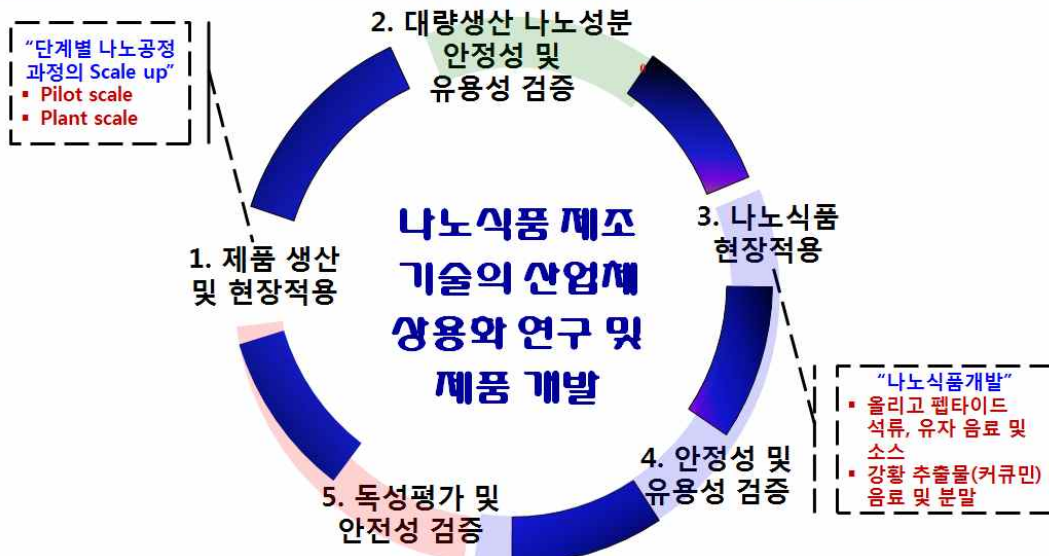


그림 1-1-1. 총괄 연구 목표

- 나노식품 제조기술의 산업체 상용화 연구 및 제품 개발(그림 1-1-1)
 - 개발된 나노식품 기술에 대한 공장 시스템 현장 적용 및 상용화
 - 산업화된 식품소재 및 제품에 대한 나노식품에 대한 안정 및 안전성, 효능 검증
 - 실현 가능한 나노식품 기술 기업체 상용화 및 현장보급
 - 국가, 산업의 기술 혁신을 도모할 수 있는 신소재 개발 기술 육성

2. 세부 및 협동 과제별 목표

가. 제 1세부 : 아·초임계수 처리된 기능성 올리고펩타이드 나노 제형 공정의 산업체 상용화 기술 개발



그림 1-1-2. 제 1세부 목표

- 기존에 최적화된 lab scale에서의 리포솜 제형화 기술 및 콜라겐 가수분해 기술을 융합하여 pilot scale과 대량생산을 할 수 있는 scale-up된 plant scale에서도 안정성과 기능성 유지하는 올리고 펩타이드 리포솜의 대량생산 formulation을 개발한다. 최종 제품에서도 lab scale제조와 동일한 올리고 펩타이드 리포솜의 물리·이화학 특성을 관찰하고 안정성과 기능성 발현되는 공정기술 및 검증기술을 확립한다(그림 1-1-2).

나. 제 1협동 : 개발된 나노소재 및 제품의 세포독성·체내안전성 평가 및 생리활성 효능 규명

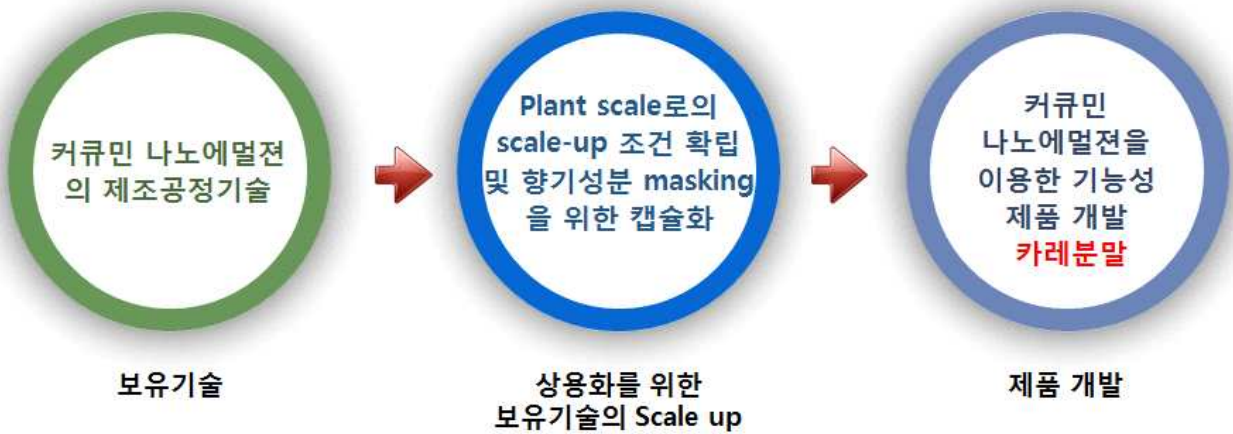


그림 1-1-3. 제 1협동 목표

- 기존에 확립되어 있는 lab scale에서의 커큐민 나노에멀전 제조기술을 pilot scale과 대량생산을 할 수 있는 scale-up된 plant scale에서도 안정한 상태를 유지하는 커큐민 나노에멀전을 대량 생산하여, 기능성 음료 및 카레 분말 형태의 제품을 개발한다(그림 1-1-3).

다. 제 2세부 : 커큐민 나노에멀전의 대량 생산화를 위한 최적 공정기술 확립 및 제품 개발



그림 1-1-4. 제 2세부 목표

- 제1세부 및 제1협동에서 개발·선정된 나노소재 및 제품의 in vitro, in vivo 검증 및 상호 검증을 통한 안정성을 조사하고자 한다. 세포 및 동물에서의 항암, 항염증, 항산화, 항노화 및 성인병 예방 기능의 효과를 검증하고, 식품 및 화장품 등의 실용화 제품을 개발하여 대량 생산 및 제품의 산업화를 본 연구의 주요 목표로 한다(그림 1-1-4).

2절. 연구개발의 필요성

1. RFP에서 제시한 필요성

- 나노 기술의 식품 분야에 접목되기 시작한 이래 나노식품개발에 관한 연구 분야가 확대 되어 가고 있으며 그 수요가 해마다 증가하고 있음.
- 해외에서는 유수의 대학과 산업체가 공동 컨소시엄을 형성하여 장기 프로젝트로 다양한 식품 가공 기술에 나노기술을 접목시켜 안전성과 기능성이 담보된 양질의 식품을 현장에서 판매하고 있음 (예: Kraft사와 대학간, Nestlé 사례 등).
- 그에 비해 국내에서는 산업체 현장에 실제 적용된 기술은 매우 미흡한 현실임
- 따라서, 선행 연구가 되어있는 나노기술 중 시장 파급효과가 크나, 민간투자가 어려운 공공기반 및 원천기술 검증, 적용 연구를 통해 실질적으로 현장에서 적용 가능한 기술 인지를 규명하고, 그에 따른 나노식품 소재 및 제품 개발을 통하여 국내 나노식품 시장 확대와 신규 시장 창출을 견인할 필요성 제기
- 산업체에서 현장 적용되어 개발된 소재 및 제품의 안정성 및 효능 규명과 그에 따른 안정성 확보 필요
- 기능성 식품개발 적용뿐만 아니라 식품이 지니고 있는 관능적인 특성 (맛, 색, 향 등)을 보다 증진시킬 수 있는 기술 개발에 나노기술을 적용시켜 산업체 현장 적용 성공 사례를 적극적으로 만들어갈 필요

2. 나노식품 상용화 기술 개발의 필요성

가. 나노기술의 증대와 식품 산업으로의 issue화

- 나노기술은 IT, BT 기술과 함께 첨단제조기술에 바탕은 둔 신제조업의 개발 및 발전에 중추적인 분야로 지난 2000년 초반부터 세계 각국에서 많은 연구와 산업화를 위한 노력을 하고 있다. FAO에서 정의 하는 나노식품은“나노기술을 활용하여 식품시스템을 구축하고 고안하여 유용물질을 생산하거나 건강증진에 도움이 되는 신소재를 이용한 기능성 식품”으로 정의하였다(표 1-2-1).
- 2012년 식품의약품안전처에서 발표한 나노식품의 정의는 “식품의 제조·가공에 나노기술이 이용되거나, 나노 소재가 첨가된 식품을 말한다. 식품분야에서는 1 μm 미만의 입자로 미세화 하여도 그 성분이 가지는 본연의 특성과 다른 성질이 발현될 수 있기에 크기에 대한 정의를 다소 크게 잡았음을 시사한 바이다.
- 현재의 식품산업에서 나노식품은 나노 크기의 carotenoid와 라이코펜, 반응성 있는 성분을 운반하는 나노크기의 자가 조립형 캡슐, 영양 보충제(pharmaceuticals), 식품분자의 향미와 향기를 유지하는 나노폴리머 캡슐, 마가린, 아이스크림, 버터 등 콜로이드 상에 사용되는 영양전달캡슐 등이 있다. 최근 여성들에게 인기를 끌고 있는 것은 나노 화장품이다. 이미 나노는 현대인에게 준 생활용어로 자리잡아가고 있을 만큼 중요한 식품군이며 점점 성장시켜야 할 산업이다.

표 1-2-1. 나노기술 및 해당산업 (나노기술연감, 2007)

전략 기술명	해당 산업	국가 나노기술중합발전 계획의 관련 나노바이오 기술	관련 제품의 예
난치병 극복 기술	나노의료	<ul style="list-style-type: none"> • 나노바이오 진단 • 나노바이오 치료 • 나노바이오 극한 분석 (나노 바이오 극한 제어의 일부) • 암정복용 종합 전략 기술 	나노바이오 칩/센서, 나노 입자 조영제, 나노바이오 이미징 기기, 램프어칩 등
생체모방 및 극한제어	NT-BT-IT 융합산업	<ul style="list-style-type: none"> • 나노바이오 정보 • 나노바이오 에너지 • 나노바이오 생체모방 및 극한 제어 (나노바이오 극한제어의 일부) 	삼입형 진단 센서, 생체에 너지 배터리, 생체 대체 재료 등
바이오 융합 생활소재	나노기반 소비재 산업 (생필품, 농림, 수산)	<ul style="list-style-type: none"> • 나노바이오 생필품 • 나노바이오 농림 • 나노바이오 수산 	나노식품, 나노살충제, 해양모니터링 나노센서 등

- 이러한 추세에 맞추어 세계적으로 나노식품 개발에 관한 연구 분야가 확대되어 가고 있으며 그 수요가 해마다 증가하고 있다. 하지만 학술적 연구와 기술개발에 집중되어 나노 기술의 농업생산이나 식품산업의 응용은 아직 초기 단계로 보인다. 연구적인 측면에서는 선진국에 비해 나노기술에 대한 노력은 활발하나 해외에 비해 제품화가 부족하며 고부가가치 시장은 여전히 미성숙한 상태이다. 또한 우리나라 식품산업 중 나노식품분야는 다른 제품군에 비해 연구와 지원은 상대적으로 미미한 실정이다.
- 또한 해외에서는 다양한 식품가공기술에 나노기술을 접목시켜 안정성과 기능성이 담보가 된 양질의 식품을 판매하고 있는 반면 국내에서는 산업체 현장에 실제 적용되는 기술의 최적화가 이루어져 있지 않고, 이를 증명할 나노소재에 대한 검증 방법 및 실행이 미흡한 실정이다. 다시 말해 나노식품 전반에 있어서 나노식품의 상용화는 아직 초기단계에 이르렀다고 판단된다. 국가에서도 이를 극복하기 위한 전략적인 로드맵을 발표하기도 하였다(그림1-2-1).

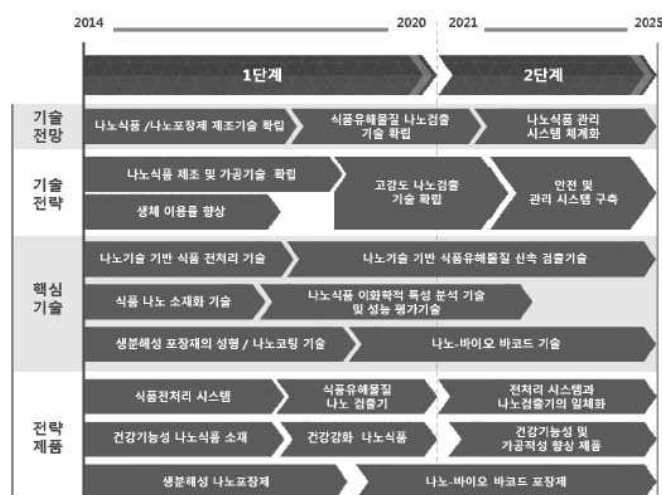


그림 1-2-1. 미래창조과학부에서 발표한 식품 나노기술 전략로드맵(국가나노기술지도총괄보고서, 2014).

나. 해외 우수 대기업들의 식품 중심 나노 기술 개발 - “품질 개선 연구 중심”

- 식품의 관능적인 특성을 개선하기 위해 나노 기술을 식품에 적용 시키고 있다. Kraft와 미국 유수의 대학들이 컨소시움을 2000년대 초반 결성하여 식품이 지니고 있는 맛이나 색, 특히 향미성분 포집 기술에 나노기술을 접목시켜 식품의 고품질화에 적용시키고 있다. 또한 다국적 기업인 Nestlé는 스위스 로잔의 식품중앙연구소에서 나노기술에 대한 집중 연구 부서를 따로 설치해 두어 나노식품기술에 대한 원천기술을 확보하고 있다. 이를 기반으로 아이스크림 제조기술이나 사탕 및 검류에 나노기술을 접목시켜 프리미엄급 제품개발에 심혈을 기울이고 있다(그림 1-2-2).

Kraft Foods,
apply nanotechnology to food production and packaging

"Nanotek" research consortium
was established in January 2000 with 15 universities and national research labs

Consortium participants: include Harvard, the University of Nebraska, the University of Connecticut, Los Alamos and Argonne national laboratories, the Universities of Seville and Malaga in Spain and Uppsala University in Sweden.




Heinz H. J. Heinz

"Flavor and color enhancement. Foodservice sector is incorporating nanotech into smart dispensers and smart meals, and the use of nanomaterials in packaging"



Nestlé
Good Food. Good Life

Nestlé may soon be able to use nanotechnology to make artificial noses and mouths for tasting foods, and to make packaging that prevents microbial growth.

Nanoparticles, particles whose size is measured in nanometers, could also help Nestlé control the texture, flavor release and rate at which nutrients are absorbed by the body (a process called bioavailability)

Nestlé is screaming for smoother ice cream. Scientists working in the field of nanotechnology are helping them make it.



Unilever

Fish Oil Cookies

Some of the benefits of eating fish rich in omega-3 fatty acids are:

- lowering cholesterol levels
- lowering triglycerides levels more powerfully than other polyunsaturated fatty acids
- inhibiting the clotting of blood
- helping slow the process of atherosclerosis
- helping to prevent certain cancers
- helping to counteract immune disorders

"Seeking ways to mix large amounts of Omega-3 into foods like crackers or tomato sauce that cant normally hide the fishy flavor and in which the fragile oils more readily break down"



그림 1-2-2. 해외 우수 대기업의 식품 나노 기술 개발 사례.

- 이와는 다르게 국내 식품 나노기술은 주로 식품영양 전공자들이 기존에 알려져 있는 기능성 생리활성 물질을 나노 입자화 하여 미량에서 최대의 약리 효과를 볼 수 있는 기능성 식품 개발에 치중되어 있다. 하지만 이러한 기술도 상용화되어 시판되는 제품은 찾아보기 힘들다. 그림 1-2-3에서 보면 전 세계적으로 상품수가 증가하고 있으며, 2010년 미국의 경우 국내의 5배 이상의 다양한 나노 제품이 상품화 되었다.

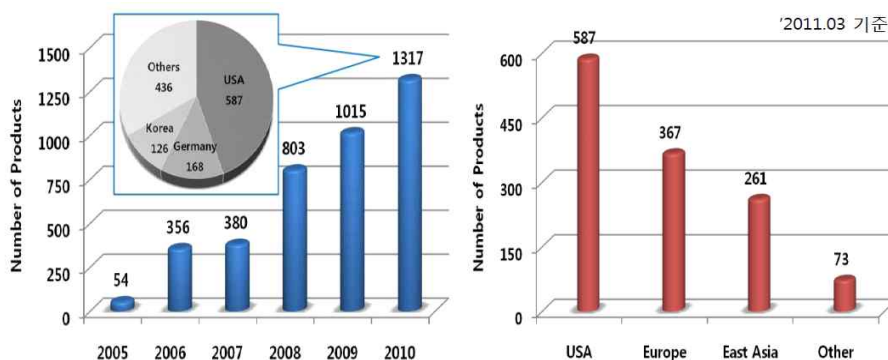


그림 1-2-3 국내·외 나노 제품 수 현황.

다. 국내 Lab 단위에서 검증된 나노식품의 다양한 우수성

○ 앞서 설명한 대로 나노에 대한 관심이 높아지고 있고, 나노기술에 대한 연구가 계속 이루어지고 있으며 다양한 산업분야에서는 이를 활용하기 위한 산업화에 대한 노력이 지속적으로 이뤄지고 있다. 나노기술은 식품산업에서 기능성 식품을 보다 효율적으로 체내 발현시킬 수 있는 장점을 지니고 있다. 이 외에도 나노기술이 식품에 적용되었을 때 얻을 수 있는 이점과 잠재력에 대해 알아볼 필요가 있다(표 1-2-2).

표 1-2-2. 식품산업에서 나노기술 혁신방향 및 제품군
(국가나노기술지도총괄보고서, 2014)

제품	혁신방향	기술개발 트렌드	나노기술 적용 영역	나노기술에 대한 요구사항
식품유해물질 검출기	실시간 검출	휴대형	시료 전처리와 검출기 일체형	미세유체구조/나노구조체
		고감도	나노임자 소재	나노임자 소재/생체인식물질 고정화
식품이력 바코드	식품유통 정보화	복제, 제거 불가능	나노-바이오 바코드	생체물질의 나노 캡슐화
식품 포장재	친환경 식품안전	항균 생분해성 포장재	생분해성 포장소재, 고향균 천연소재	천연항균제의 안정화
기능성 식품	고기능성	질병발생 위험 감소, 노화 억제	식품소재의 생체내 안정화 증대	식품소재의 나노 스키텔, 나노 캡슐화

○ 나노성분의 생리활성 물질의 체내 흡수율 증진

- 나노기술이 적용된 소재의 큰 장점은 소화흡수율의 증가, 식품의 자연적 고유성분을 물성 변화 없이 인체에 전달, 소량으로 영양성분의 효율적 이용이 가능하다는 것이다. 나노화 된 영양소는 표면적이 증가하여 소화효소의 작용을 많이 받으며 생체 이용률이 수 배로 높아지므로 적은 양으로 충분한 효과를 거둘 수 있다. 또한 지용성 생리활성 물질은 기계적인 자극이나 외부 환경에 따라 산화 될 수 있고, 고분자 물질일 경우 인체 내로 흡수가 용이하지 않다. 따라서 나노 제형화를 통해 이를 극복할 수 있다.

○ 생리활성 물질 전달 기능 시스템

- 전달 시스템의 개발은 코팅 기술과 함께 발달 되었는데 유산균을 소장까지 전달시키는 제품이 좋은 예이다. 이러한 전달시스템은 비타민이나 항산화물질과 같은 생물학적 활성 성분의 저하 없이 효율적으로 체내에 도달할 수 있도록 하며, 활성성분이 체내에서 분비되는 속도를 조절하여 최적의 수준으로 유지하는 데에 도움을 준다.(그림 1-2-4).

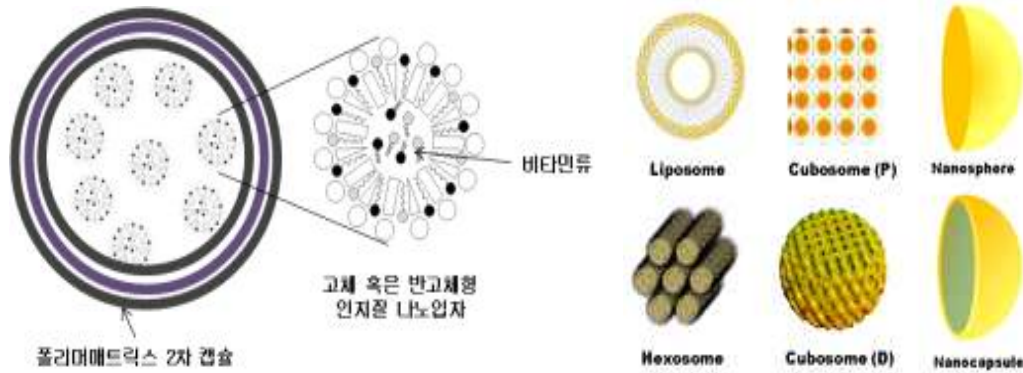


그림 1-2-4 다양한 캡슐화 형태.

○ 식품의 저장성 개선

- 치즈, 얇게 썬 고기와 베이커리 등 표면이 상하기 쉬운 음식에는 항균제가 처리된 포장재를 많이 사용한다. 항균기능이 있는 계피의 에센셜 오일을 이용하여 식품 포장필름 등의 제조가 가능하다. 플라스틱 병과 나일론 식품 필름에 들어간 나노 점토는 포장재를 강화시키고 가스 투과성을 낮춘다. 나노-보강 배리어는 산소에 민감한 식품을 신선하게 보관하고 제조업체의 포장비용을 감소시킨다.

○ Nanoencapsulation 기술을 통한 식품 품질개선

- 식품과학자들은 다중 에멀전 및 나노 입자 포집 기술을 통해 퍼짐성(spreadability)과 안정성이 이러한 다중 에멀전을 통해 향상된다고 한다. 예를 들어 나노기술이 활용된 저지방 마요네즈는 별도의 안정제나 유화제가 없어도 요구되는 맛과 느낌을 충족시킨다. 또한 나노에멀전은 다양한 저지방 제품 개발에 활용이 가능하다.

라. 국내 나노 기술의 식품 산업 적용의 부재

- 실험실 단위에서 개발 및 규명된 나노식품의 공장 적용 실현 가능한 기술 개발이 매우 부족한 상태로 실질적인 기술 개발이 필요하다. 약리학 분야에서 나노기술은 이미 오래 진행되어온 분야로 현재 식품분야로 넘어와 식품산업에서 약간의 기술을 차용하고 있는 가운데 실험실 단위에서 소량으로 제조된 제품에 대한 연구는 이미 다수의 논문을 통해 발표되어 온 실정이다.
- 나노식품에 대한 기술이 식품 소재 범위나 그에 따른 기술이 광범위하게 산재 되어 있으나, 문제는 산업체 현장 적용할 만한 기술은 매우 미흡한 실정으로 산업체 현장에 적용해 보면 나노 크기가 제조되지 않거나, 수율에서 현저히 떨어진다.
- 식품의약품안전청에서는 표 1-2-3과 같이 나노식품에 대해 정의하였고, 산업체에서는 이 조건이 준하는 나노식품을 제조해야 한다. 하지만, 아직 국내에는 나노식품의 품질을 검증하는 시스템이 확립되어 있지 않았다.
- 더욱이 시중에 판매되는 나노식품 대부분은 나노기술 적용이 제대로 되지 않은 경우이다. 기능성을 지닌 미세입자 분말 형이 대부분이고 물에 재수화 했을 때는 나노 크기 범위에 속하지 않는 경우가 많다. 또한 별도의 코팅처리가 안된 나노 입자는 다양한 pH 환경의 소화기를 통과하면서 분해되거나 변성되어 기능성을 발현하지 못한 채 흡수된다.

표 1-2-3. 식품의약품안전처에서 발표한 나노식품의 정의
(제48회 식품의약품안전열린포럼, 식약처)

분야	용어	정의
나노 식품의약품 안전관리 기본계획 ('11~'14)	나노기술	물질을 나노미터 크기의 범주에서 조작, 분석하고 이를 제어함으로써 새롭거나 개선된 물리적, 화학적, 생물학적 특성을 나타내는 소재, 소자 또는 시스템(이하 소재 등이라 한다)을 만들어 내는 과학기술
	나노크기	한 면이 약 1nm ~ 100nm 범위의 크기
식품	나노기술 응용 식품	식품의 제조·생산·가공·조리·저장·포장 등의 과정에서 직접 또는 간접적으로 나노기술이 적용된 식품(건강기능식품 포함), 식품첨가물, 기구 또는 용기·포장 등을 말한다

마. 제품화된 나노 소재가 포함된 식품의 품질, 효능 및 안전성 규명 필요성

○ 나노기술의 현장적용 부족

- 지난 수년 동안 식품관련 학계 및 연구기관에서 식품 나노 소재의 제조에 대한 관심이 급격히 높아지고 수많은 연구가 활발히 진행되고 있으나, 식품산업에서 제조공정, 가격 등 대량생산의 어려움으로 인하여 제품의 생산은 극히 미미한 실정이다. 나노기술이 발달하는 속도에 비해 산업체 현장에 실제 적용되는 기술은 매우 미흡하며 또한 선행연구가 되어있는 나노기술이 실질적으로 현장에서 적용 가능한지 검증사례가 거의 없을 뿐 아니라 검증하는 방법도 확립되지 않았다.

○ 나노식품의 유용성 검증의 필요성

- 생리기능성 증진을 위한 나노 기술 뿐만 아니라 식품 가공 기술 자체 적용의 나노기술 필요하다. 과대 포화된 기능성 식품 시장의 개발 한계를 극복하기 위해 나노기술이 많이 응용되어 제품이 출시되고 있으나 그에 따른 유용성 검증은 여전히 필요한 상태이다.
- 면역, 항노화, 항암, 두 물질 혼합화를 통한 나노 복합화 등의 복잡한 용어로 혼재되어 있는 기존의 기술을 넘어서 소비자들이 쉽게 접근할 수 있는 제품을 개발하여 기존 제품과 차별화가 될 수 있는 나노식품이 개발되어 국민 건강 증진에 도움을 줄 수 있다.
- 특히 약리학에서 나노 크기라는 미세 성분이 최종 제품에 적용했을 때 응집 현상에 의해 입자 크기가 커지거나 혹은 다른 성분에 흡착되어 크기가 지니는 긍정적인 효과상쇄될 수도 있다. 따라서 최종 제품의 나노 소재 성분의 유용성 검증이 필요하다.

○ 최종 나노 제품 내의 나노 소재 검증 시스템 부재

- 산업체에서 개발된 나노식품의 경우 최종 제품에 따라서 여러 가지 성분과 다양한 형태로 시제품이 개발되는데 그 가운데 적용하고자 하는 성분의 나노화 성공여부와 제품내 차지하고 있는 비율, 유통기간 등을 제시할 수 있는 규명 개발이 필요로 한다.
- 또한 실제 시중에서 판매되는 나노식품 중에는 식료품 라벨에 나노 물질이 표기돼 있지만 실제 들어 있지 않는 경우도 있기 때문에 식료품에 함유된 나노 물질을 확인하는 일이 더 어렵다. 일반적으로 식료품 제조 과정에서 나노 입자가 생겨날 수 있지만, 나노 입자 대부분은 바로 덩어리가 되며 그 순간부터 더 이상 나노 물질이 아니게 된다. 그러므로 소비자가 섭취하고 소화 흡수 할 때 까지 나노의 특성을 가진 입자로 유지 되는지 안정성 및 기능성 검증이 반드시 필요하다.

- 대표적인 제품으로는 노화 방지의 기능성을 광고하는 은 나노와 금 나노 등의 소재 포함 건강보조식품이다. 노화를 방지한다고 대대적으로 광고된 물질이 실제 나노 크기 인지 입증된 적 없으며, 건강보조식품은 광고효과를 내기 위해 특정 고객층을 대상으로 과장 광고를 하는 경우가 많아 이를 관리 감독할 수 있는 분석법이 필요하다.

○ 나노소재의 안전성 규명

- 나노식품에 대한 독성 부분은 나노식품의 발전과 함께 항상 뜨거운 관심을 갖게 하는 주제이다. 일반적으로 유기물을 이용한 나노식품 소재의 안전성은 천연물 소재를 기반으로 하기에 안전하다. 그렇다 하더라도 크기와 농도에 따른 발생할 수 있는 부작용 문제에 대해 함께 연구가 진행되어 제품 개발이 이루어져야 하는데 이를 뒷받침 해줄 수 있는 근거 자료로 연구가 함께 수반되어야 한다.

바. 수용성 기능성 올리고 펩타이드와 지용성 커큐민의 나노식품 소재 선정 이유

○ 사회적 배경

- 빠른 고령사회 진입속도로 노화 및 고령화 사회는 인류의 중대한 관심사이고, 우리나라는 매우 빠른 속도로 고령화 사회로 가고 있다. 보통 전체 인구 중 65세 이상이 인구의 70%이상이면 고령화 사회, 14%이상이면 고령사회, 20%이상이면 초고령 사회라고 한다. 우리나라는 2000년에 고령화 사회로 접어들었으며, 2018년도에 고령화, 2026년에는 초고령으로 진입할 것으로 예측하고 있다. 평균수명의 증가와 사망률의 하락으로 대부분의 OECD국가들에서 65세 이상의 노인인구가 빠르게 늘어나 고령화 시대가 되고 있다.
- 콜라겐의 개발이 시급하고 가장 중요한 이유는 콜라겐은 노화가 진행됨에 따라 그 흡수율과 대사과정이 감퇴한다는 것이다. 인체 내 다양한 효소에 의해 분해되어 아미노산 형태 또는 펩타이드 형태로 흡수되는데 나이가 들면서 양질의 단백질을 섭취한다고 해도 위장 운동이 저하되고 위장으로 혈액을 운반하는 혈관이 수축되어 혈류량을 감소시켜 소화흡수율이 떨어지게 되며, 대사 능력 또한 저조해 진다.
- 커큐민은 항암효과, 숙취해소, 항산화, 항염증 등 다양한 기능성이 밝혀져 있는 소재이며, 최근에는 두뇌효과와 치매예방 효과도 보고되고 있다. 그러나 커큐민은 낮은 용해도로 인해 흡수율 및 생체이용율이 매우 낮아 기존의 커큐민 제품들은 아무리 많이 섭취하여도 효과가 거의 없다.
- 인구구조의 고령화, 웰빙트렌드에 대한 관심 증가로 기능성과 친환경성을 강조한 제품에 대한 수요가 증가하고 있다. 따라서 고령자의 활동적인 삶을 영위하는데 도움을 줄 수 있도록 기능성 소재 및 기술력이 집약된 산업이 발달될 전망이다. 노인과 여성들을 위한 올리고 펩타이드 음료 및 커큐민이 함유된 기능성 분말제품을 개발하고자 한다.

○ 어류 소재 수용성 올리고 펩타이드의 우수성

- 일반적으로 단백질의 저분자인 폴리펩타이드는 물에 용해되지 않으나 올리고 펩타이드는 물에 잘 용해되어 투명성을 가질 수 있으며, 점성과 기포성이 강력한 성질을 가지고 있어 식품가공에서 여러 분야에서도 널리 이용될 수 있는 신소재 물질이다.
- 특히 어류 부산물에서 콜라겐을 추출할 수 있는 부위로는 지느러미, 뼈와 껍질에 해당한다. 껍질에는 전체 콜라겐 대비 약 20%의 type I 콜라겐의 추출이 가능하며, 따라서 어류 껍질은 수율 및 생산 단가 측면에서 매우 효과적인 펩타이드 원료로 사용될 수 있다. 어류 콜라겐 펩타이드는 표 1-2-4에서 보듯이 식품의약품안전처에서 인정하는 혈압저하에 가장 효과적인 기능성 원료이다.

표 1-2-4. 원료별 콜라겐의 아미노산 조성 비교

(단위: %)

구분	마린 콜라겐	돈피 콜라겐	우피 콜라겐
Glycine	24.4-26.7	20.0-30.5	21.0-27.5
Proline	9.3-13.3	13.0-15.5	13.5-15.7
Hydroxyproline	7.3-7.7	11.0-13.5	12.0-14.5
Glutamic acid	5.7-9.3	7.2-11.7	10.0-11.6
Alanine	5.4-8.9	4.9-9.1	8.0-9.0
Arginine	9.1-12.0	8.6-9.7	8.0-9.0
Asparagine	4.6-5.5	4.6-5.5	4.5-7.0
Serine	3.0-3.5	2.9-4.1	3.2-4.2
Lysine	2.7-3.2	2.7-4.3	3.5-4.6
Threonine	2.9-3.0	1.6-2.3	2.0-2.4
Leucine	2.1-2.9	2.4-3.2	3.0-3.5
Valine	1.9-2.3	2.3-2.8	2.2-3.4
Methionine	1.0-1.6	0.4-0.9	0.6-0.9
Isoleucine	0.9-1.5	1.0-1.9	1.5-1.8
Phenylalanine	1.4-1.4	1.4-2.3	2.2-2.5
Hydroxylysine	0.5-0.7	0.6-1.0	0.8-1.2
Tyrosine	0.2-0.6	0.2-0.9	0.2-1.0
histidine	0.4-0.5	0.9-1.0	0.7-0.8
Cystein	0.0-0.5	0.0-0.1	0.0-0.0

출처: (주) 쉐텍

표 1-2-5. 건강기능식품의 기능성원료 인정된 혈압저하 원료 현황
(식품의약품안전처, 2016)

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항	
1	펩타이드	제2004-1호	생리활성기능 2등급	① Peptide ② Val-Tyrosine	바릴티로신 으로서 250~400 µg/일	의약품(고혈압치료제) 복용 시 섭취에 주의	
2	가쓰오부시 올리고펩타이드	제2006-13호	생리활성기능 2등급	Leu-Lys-Pro-Asn -Met	가쓰오부시 올리고펩타이드 로서 1.5 g/일 (Leu-Lys-Pro -Asn-Met 로서 5 mg/일)	① 임신부, 수유부는 섭취 불가 ② 어린이 노인, 신부전이 있는 사람, 혈압약을 복용하는 경우 섭취 시의사와 상담	
		제2006-16호					
3	카제인 가수분해물	제2006-19호	생리활성기능 2등급	Phe-Phe- Val-Ala-Pro-Phe- Pro-Glu-Val-Phe- Gly-Lys	카제인 가수분해물 로서 4,000 mg/일	① 임신부, 수유부는 섭취 불가 ② 어린이 노인, 신부전이 있는 사람, 혈압약을 복용하는 분야 섭취 시의사와 상담	
		제2009-22호			VPP(Val-Pro-Pro) 및 IPP(Ile-Pro-Pro)		-
		제2010-6호			IPP(Ile-Pro-Pro) 으로서 1.8~3.6 mg/일		
4	올리브잎 추출물	제2006-25호	생리활성기능 2등급	Oleuropein	올리브잎추출물 추출물 EFLA843 로서 500~1,000 mg/일 (Oleuropein로서 90~180 mg/일)	혈압약을 복용하는 분은 섭취 시 의사와 상담	
	올리브잎추출물 추출물	제2014-9호			올리브잎추출물 로서 500~1,000 mg/일 (Oleuropein 으로서 90~180 mg/일)		
5	코엔자임Q10 (고사민, 엘로로 전환)	제2009-26호	생리활성기능 2등급	Coenzyme Q10	코엔자임Q10 으로서 90~100 mg/일	-	
		제2009-36호				-	
		제2008-43호				영유아, 임신부 섭취 불가	
		제2008-44호				-	

- 올리고 펩타이드는 체내에서 안지오텐신 I 변환효소의 활성을 낮추어주어 혈압을 낮추는 것으로 작용기전이 제안되고 있다. 특히 고혈압을 유발시킨 동물에 가쓰오부시 올리고 펩타이드를 섭취시켰을 때, 혈압이 유의적으로 감소되는 것이 관찰되었다는 연구보고가 있다(폴무원생활건강(주), 가쓰오부시 올리고 펩타이드). 어류 유래 펩타이드는 혈압저하 이외에도 항고혈압, 라디칼 소거능, Ferric 환원능, 지질 과산화 억제, 간암세포의 항산화 효소 함량 증가 등의 기능성을 갖고 있다(표 1-2-6).

표 1-2-6. 어류 콜라겐 유래 펩타이드 기능성

콜라겐 원료	가수분해 효소	활성 (<i>in vivo/in vitro</i>)	참고문헌
생선 껍질	alcalase, protease E, collagenase	IC ₅₀ 2.6 μM (Gly-Pro-Leu) IC ₅₀ 17 μM (Gly-Pro-Met) 항고혈압/ACE 저해 활성	Byun and Kim (2001)
오징어 tunic	alcalase	IC ₅₀ 90 μM 항고혈압/ACE 저해 활성	Aleman et al. (2011)
생선 껍질	alcalase, pronase E, collagenase	지질 과산화 억제 t-BHP ¹ 노출에 대한 세포 생존력 증가	Kim et al. (2001)
오징어 껍질	trypsin	라디칼 소거능 t-BHP 노출에 대한 세포 생존력 증가	Mendis et al. (2005)
생선 껍질	trypsin	라디칼 소거능, 지질 과산화 억제 간암세포의 항산화 효소 함량 증가	Kim (2005)

○ 올리고 펩타이드의 직접 식품 적용의 한계

- 낮은 생체이용율과 안정성: 펩타이드는 거대분자이며 산화, 가수분해, 탈아민화 반응 등에 의하여 화학적으로 분해되기 쉬우며 안정성이 낮고 생체 이용률이 낮기 때문에 기존의 전통적인 제형으로는 의약품으로 개발하기가 매우 어렵다. 또한 생산적인 측면에 있어서 일반화학 합성법과는 완전히 다른 기술을 필요로 하기 때문에 약물개발에 있어서 생산시설 확충 및 투자비용이 큰 난관으로 작용하기도 한다.
- 효소에 의한 혹은 분자 간 상호작용에 의한 물리화학적 불안정성(경구용 이용 어려움): 효소에 의한 펩타이드 분해는 흡수 전 뿐만 아니라 흡수된 후에도 진행된다. 위장 관에 존재하는 단백질 분해효소에 의한 펩타이드의 분해 및 응집성 같은 화학적 불안정성으로 인하여 생체 이용률은 매우 낮게 된다. 또한 생체 내 다른 물질과의 상호작용은 펩타이드 약물의 분포 및 생리활성에도 영향을 미친다. 이를 극복하기 위하여 펩타이드 기본 구조가 변형되지 않고 유지할 수 있도록 나노 코팅 기술이 요구된다.
- 세포 조직 내로의 낮은 투과율: 저분자화 된 올리고 펩타이드 물질이 세포 안으로 들어가는 방법에는 세포를 가로질러서 투과하는 것과 세포사이의 간극을 투과하는 것이 있다. 펩타이드는 전하를 띠고 있기 때문에 소수성인 세포막을 투과할 수 없고, 세포사이의 간극은 매우 좁기 때문에 분자량 500 Da 이상인 펩타이드는 거의 투과할 수 없다.

○ 지용성 성분의 커큐민의 우수성

- 커큐민은 울금의 생리활성물질로서 항암효과, 숙취해소, 항돌연변이, 항산화, 항염증 등 여러 가지 기능이 밝혀지면서 기능성 소재로 각광받아 왔고, 영양학적인 측면에서 보면 비만 예방, 유방암, 대장암, 취장암 예방 효과, 항산화, 항염 등의 효과가 있었으며, 최근에는 두뇌효과에도 효과가 있어 알츠하이머 환자의 뇌에서 발견되는 플라크를 제거한다는 보고가 있다(그림 1-2-5).

- 강황의 뿌리에는 커큐미노이드라고 불리는 노란 색의 폴리페놀 색소 화합물이 0.5~6.5% 정도로 존재하는데 그 주성분이 커큐민이다. 커큐민은 카레, 겨자 등의 주된 천연 색소 성분이며, 고대로부터 향신료나 염증과 피부질환 등의 치료에 활용되었다.

Biological effect of Turmeric/Curcumin



그림 1-2-5. 커큐민의 주요 생물학적 효능

- 울금의 정유성분도 다채로운 작용을 하는데 대표적인 것으로 담즙의 분비를 활발히 하는 동시에, 콜레스테롤 용해작용에 의해 담도결석, 고지혈증, 고혈압, 동맥경화 등을 예방/개선하고, 건위작용 및 살균/항균작용도 뛰어나며 위궤양의 원인이 되는 헬리코박터 파이로리균을 제균하고 항암효과도 나타내고 있다.

○ 커큐민의 직접 식품 적용의 한계

- 강한 맛과 향: 커큐민은 이러한 다양한 기능성에도 불구하고 강한 맛과 독특한 향, 그리고 물에 대한 용해도와 생체이용률이 낮다는 단점으로 고부가가치 상품화에 제약을 받고 있으며, 현재 커큐민을 이용한 몇몇 제품들이 이미 상용화 된 상태이나 생체이용률을 고려하지 않은 채 상품만 출시되고 있는 실정이다.
- 낮은 체내 흡수율: 커큐민은 입자가 커서 체내 흡수율이 낮다는 단점이 있다. 일반 커큐민 제제는 체내 대사 및 배출이 빨라 생체 이용률에 한계가 있다. 또한 커큐민은 암 예방효과가 있다고 알려져 있지만 단순 섭취로는 체내 흡수 및 분포가 치료 농도에 미치지 못하는 단점이 있다.
- 분말형태의 연구 필요: 시중에 판매되는 커큐민 분말의 경우 커큐민을 자주 섭취할 수 있다는 장점이 있지만 용해도와 생체이용률 측면에 대한 연구결과는 제시되지 않고 있기 때문에 해당 제품의 커큐민 함량이 높다는 것만을 홍보하고 있다. 분말 형태에서 커큐민의 생체이용률은 매우 낮은 수준으로 수많은 연구결과들을 통해 이미 알려져 있다.
- 낮은 용해도: 커큐민은 난용성 물질로 물에는 약 0.6 µg/mL 이하만 용해되고, 에탄올에서는 약 1 mg/mL 까지 용해되는 것으로 보고되고 있다. 문헌상에서는 커큐민의 용해성을 높이기 위해 초고압 균질기를 사용하여 물에서의 용해도가 약 4.2 µg/mL로 다소 증가하고 있지만 아직까지 매우 낮은 용해도를 보이고 있어 응용에 제한이 되고 있다.

3절. 연구개발 범위

1. 아·초임계수 처리된 기능성 올리고펩타이드 나노 제형 공정의 산업체 상용화 기술 개발(제 1세부)

- 아·초임계수 처리된 기능성 올리고 펩타이드 나노 제형 공정의 산업체 상용화 기술 개발
 - 올리고 펩타이드 나노리포좀 제조공정의 pilot scale 공정 조건 확립
 - 올리고 펩타이드 리포좀 제조의 plant scale 적용 최적 공정 과정 확립
 - 올리고 펩타이드 나노리포좀 이용한 기능성 제품 개발
- 올리고 펩타이드 나노식품적용 및 적용된 제품의 나노 분석법 개발
 - 지표물질의 분리 정제
 - 지표성분 분석법 개발 및 적용

2. 개발된 나노소재 및 제품의 세포독성·체내안전성 평가 및 생리활성 효능규명(제 2세부)

- 개발된 나노소재 및 제품의 독성평가
 - 다양한 조직유래 세포주 및 일차 배양 세포를 대상으로 나노식품의 세포독성 및 유전독성 평가
 - 동물 실험을 통한 개발 및 선정된 나노식품의 체내 안전성 평가
- 개발된 나노소재 및 제품의 생리활성 효능규명
 - 콜라겐 펩타이드 및 커큐민 소재의 효능 규명
 - Plant scale 소재의 효능 규명
 - 개발된 나노 제품의 생리활성 규명

3. 커큐민 나노에멀전의 대량 생산화를 위한 최적 공정기술 확립 및 제품 개발(제 1협동)

가. 동물성 단백질 고압효소분해기술 개발

- 커큐민 나노에멀전의 대량 생산화를 위한 최적 공정기술 확립 및 제품 개발
 - 커큐민 나노에멀전의 제조공정의 pilot scale 공정 조건 확립
 - Plant scale로의 scale-up 조건 확립 및 향기성분 masking을 위한 캡슐화
 - 커큐민 나노에멀전을 이용한 기능성 제품 개발
- 커큐민 나노식품적용 및 적용된 제품의 나노 분석법 개발
 - 지표물질의 분리 정제
 - 지표성분 분석법 개발 및 적용

제2장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

1절 기능성 펩타이드 관련 나노 식품시장 분석 및 기술 경향 분석

1. 국내 및 해외 나노식품 시장 및 기술 현황 분석

가. 국내외 나노식품산업 현황 및 유통 조사

- 한국은 2002년 12월 '나노기술개발촉진법'을 발표하였고, 이어서 2003년 6월에는 시행령을 발표하여 나노기술 육성을 위한 법적인 근거를 확립하였으며, 국가차원의 나노기술 정책을 지속적, 체계적으로 추진하기 위해 범정부 차원의 중장기정책을 수립하여 추진하여 왔다(김중태 등, 2008, 조용진 등, 2007).
- 이에 비해, 나노기술을 식품 분야에 응용하는 소위 '식품나노기술'은 태동 시기부터 타 분야에 비해 다소 늦은 추세로, 식품 분야에서 나노급 기술의 연구는 오래 전부터 이루어져 왔음에도 불구하고 식품나노기술의 개념 정의, 연구범위 설정, 응용분야 제시, 파급효과 분석 등은 최근에 들어서 활발히 논의되고 있는 추세이다.

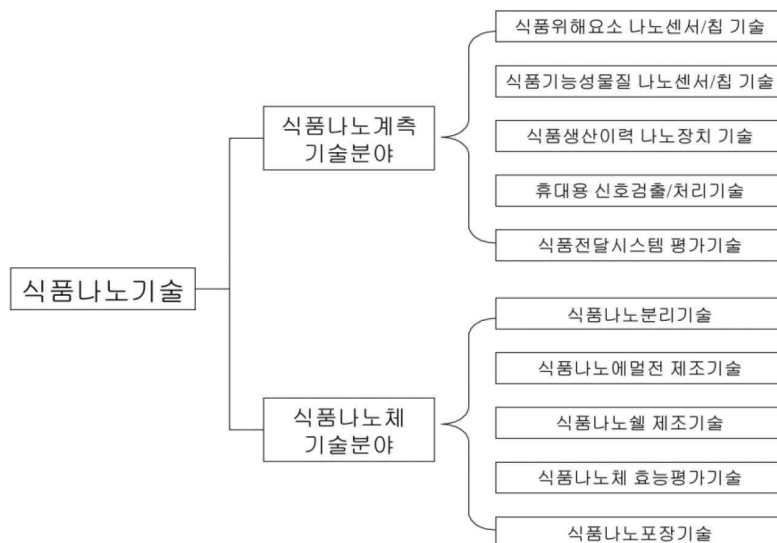


그림 2-1-1. 나노식품기술 계통도

- 국내 나노식품기술 현황 및 국내 나노식품 특허 현황은 다음과 로드맵과 같이 요약될 수 있다.

미래 전망	<ul style="list-style-type: none"> ○ 나노바이오 검지 및 치료 기술을 이용하여 암 등 난치병 정복 ○ 나노바이오 농림수산, 나노바이오 전자, 로봇, 등 새로운 나노바이오 기술을 바탕으로 하는 블루 오션 산업 창출 ○ 나노바이오 에너지, 환경영향평가 기술을 이용한 생체 친화적인 환경/에너지 구현
제품/기능	
년도	2006 2008 2010 2012 2014 2016 2018 2020
핵심 기술/중분류	검지 및 정제 나노 검지체 기술 → 바이오 물질 검지 실현 → 임상 실험 및 신뢰성 향상 → 나노바이오 진단 시스템 나노 수송, 분리, 반응 기술 → 바이오 물질 나노 정제 기술
	치료 및 임플란트 약물전달용 나노구조체 기술 → 표적지향 나노 약물전달 기술 → 임상 실험 생체 친화적 나노구조체 기술 → 나노구조체를 이용한 치료 기술 → 임상 실험 생체 친화적인 표면 처리 기술 → 생체적합 임플란트 나노소자 및 인공장기 개발
	정보 바이오 분자 전자회로 제작 기술 → 바이오 분자 전자회로 특성 최적화 → 바이오 전자회로 응용기술 바이오 분자를 이용한 정보처리 및 저장 원천기술 → 바이오 정보 응용 기술
	에너지 바이오 매스 에너지 변환 원천 나노 기술 → 바이오 에너지 나노 활용 기술
	극한제어 및 분석 극한 분석 기술 → 단위 생체 구조 분석 → 단위 생체 구조 분석 장비 극한 제어 기술 → 단위 생체 구조 제어 → 단위 생체 구조 제어 장비 생체친화적 무기물 표면처리 기술 → 무기물-바이오 분자 융합 기술 → 바이오 대체 물질 개발
	생필품 식품, 화장품 및 그 밖의 생필품 나노 처리 기술 → 나노 생필품 → 안전성 및 환경영향 평가
	농림 동식물용 나노바이오 센서 및 칩 → 농작물 및 가축 병 조기 진단 기술 가축용 약물 및 살충제 나노 전달체 기술 → 환경 친화적인 가축 치료 및 살충제 개발 농식품 및 농림 재료 나노처리 기술 → 나노 농식품 및 사료 개발
	수산 호르몬 및 항생제의 나노전달체 → 환경 친화적인 수산 호르몬 및 항생제 식품 특성 감지 나노바이오 센서 → 수산 식품 안전성 평가 기술
	종합나노바이오 기술-암정복용 초고감도 나노 센서 및 진단 칩 기술 → 암 발병 조기 진단 및 예측 기술 → 임상 실험 및 신뢰성 향상 나노구조를 이용한 초고감도 바이오 이미징기술 암세포 인식체 기술 → 표적 지향적 암치료 기술 지능형 약재/분자 전달체
안전성, 영향 평가 및 표준화 나노구조의 인체 영향 평가 기술 → 나노기술 안전성 평가 기술 → 나노제품 안전성 및 환경 영향 평가 기술 나노구조의 환경 영향 평가 기술 → 나노제품 환경 영향 평가 기술 나노 재료 규격 표준화 → 나노 소자 성능 및 규격 표준화 → 나노 바이오 기기 규격 표준화	
기타 주변 기술	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바이오 재료 처리 기술 ○ 초정밀 제어 및 분석 공정장비 제작 기술 ○ 고속 정보처리 기술
변화인자	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생명 윤리 관련 법령 ○ 식약청, FDA, 등에서 수행하는 안전성 평가 관련 법령 ○ 전세계적인 나노기술 표준화 동향

그림 2-1-2. 나노식품기술분야 총괄기술지도
(출처: 교육과학기술부, 국가나노기술지도).

표 2-1-1. 국내 주요 나노식품 특허 현황
(주요 나노 기술의 현황과 산업화 동향, 2008, 한국과학기술정보원)

출원번호	출원인	발명의 명칭
10-2002-0064416	(주)우립랜드	프로폴리스와 토코페롤을 함유하는 나노스피어 조성물
10-2003-0009941	(주)아미노젠	천연식이섬유와 기능성 소재를 함유하는 항비만조성물 및 이를 유효성분으로 하는 다이어트 식품의 제조
10-2003-0021447	미지테크(주)	나노 은 입자가 첨가된 껌 및 그 제조방법
10-2004-0017803	김상현	숯과 질석으로 구성된 살균수 및 맥반석, 게르마늄, 은나노로 구성된 살균수에 의해 세척 살균되어진 살균란과 그의 세척 및 살균 방법.
10-2004-0059008	이석기	식품, 제과용 고기능성 포장재를 위한 나노복합 수성코팅제 및 그 제조방법
10-2004-0062150	노일근	나노나이프를 이용한 저온추출법으로 꽃송이버섯으로부터 베타글루칸을 추출하는 방법
10-2004-0065666	엔티엔비티(주)	식품소재, 건강기능식품소재 또는 한방약재를 나노입자로 제조하는 방법 및 상기 나노입자를 포함하는 조성물
10-2004-0083674	(주)나노소울	나노화된 허브 추출물의 제조방법 및 이를 포함하는 조성물
10-2004-7014857	(주)유진사이언스	식품스테롤 함유 식품 및 이의 제조방법
10-2005-0032526	서정옥	나노여과를 이용하여 제조된 발효식품 및 이의 제조방법
10-2005-0033034	서정옥	나노여과를 이용하여 제조된 김치주스 및 이의 제조방법
10-2005-0036050	김재열	나노 수산화알루미늄이 함유된 식품 포장재 및 그 제조방법
10-2005-0059308	서정옥	나노여과를 이용하여 제조된 밥알이 없는 식혜 및 이의제조방법
10-2005-0064942	한솔제지주식회사	항균성 식품 포장용 종이 및 그의 제조방법
10-2005-0065126	박근호	은-나노 입자를 혼합, 적용한 소맥분 제조방법
10-2005-0073045	오희범	은나노 흡수패드
10-2005-0087823	권동찬	은나노가 함유된 포장용 필름의 제조방법
10-2005-0095098	엄정옥	기능성 항균 식품 포장용 원지 및 그 제조 방법
10-2007-0006718	이래철	그라비아 인쇄된 은나노 항균 포장재 필름 및 그 제조방법
10-2007-0024979	조선대학교 산학협력단	발효식품용 포장재
10-2007-0085751	한양대학교 산학협력단	약물전달용 인체유래 재조합 젤라틴 나노입자
10-2008-0004914	(주)한국인삼공사	미크론 이하 크기의 홍삼 나노성분을 함유한 기능성 음료
10-2008-0004915	(주)한국인삼공사	미크론 이하 크기의 홍삼 나노입자를 함유한 기능성 음료
10-2008-0004917	(주)한국인삼공사	미크론 이하 크기의 홍삼 나노분말을 함유한 기능성 음료

○ 현재로서는 표 2-1-2 에 제시된 바와 같이 실제 나노식품의 매출액은 ₩ 33,259 (단위 백만원)로 나노 의약품에 비해 1/4 수준이다.

표 2-1-2. 국내 나노 산업별 매출액 비교 (나노융합산업조사, 2012)

	구분	나노매출액 ('12, 백만원)	나노매출증가율 ('11~'12, %)	나노매출비중 ('12, %)
나노 바이오·의료	나노의약품	125,755	9.5	13.6
	나노바이오기기 및 장비	32,252	24.3	51.5
	나노화장품	63,792	-2.8	49.2
	나노농수산식품	33,259	4.2	35
	나노생체삽입소재	37,954	14.6	32.9
	의료 및 의료용 소모품	387	1.7	77.1
	계	293,399	7.9	22.1
나노장비·기기	일반목적장비용 나노부품	246,224	24.2	41.2
	나노제조공정 장비	1,864,748	14.8	62.1
	나노측정분석 장비	205,982	40.4	11.4
	계	2,316,954	17.6	42.8
중분류 평균		5,767,838	12.8	36.3

○ 그러나, 전세계 나노 식품 시장 규모는 다음 도표에 제시된 바와 같이 계속 성장 추세이다(그림 2-1-3).

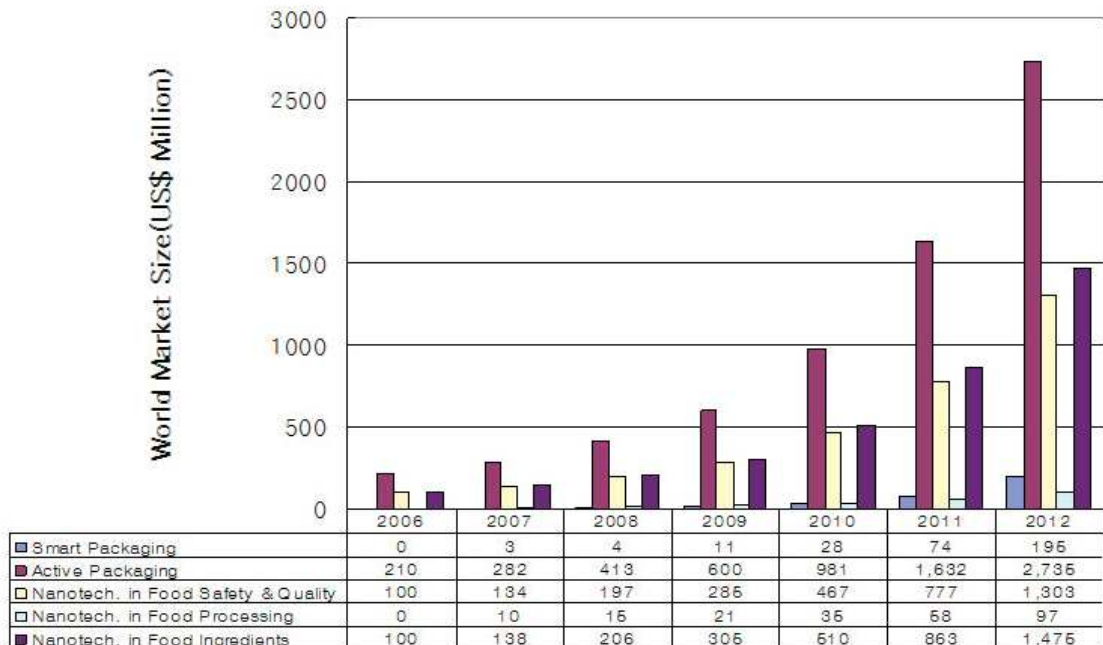


그림 2-1-3. 나노식품관련 시장의 규모 전망 (Cientifica, “ The Nanotechnology Opportunity Report”, 3rd Ed., Jun. 2008).

- 따라서, 정부는 다음과 같은 나노기술 산업화 전략을 바탕으로 식품나노 가공 기술에 관한 연구 개발에 많은 투자를 하고 있다(그림 2-1-4).



그림 2-1-4. 나노 융합 2020 신산업 발전 전략
(미래창조과학부, 나노기술 산업화 전략).

나) 나노식품 가공 기술 조사

- 나노기술은 농업, 식품가공, 식품포장, 식품모니터링 등 식품사슬의 전 분야에 무한한 잠재적 응용 가능성이 있다. 예컨대, 나노기술을 식품에 적용하면 다음과 같은 이점을 기대할 수 있다(한국과학기술정보원, 2008).
- 지방, 탄수화물, 칼로리 함량을 줄이거나, 단백질, 섬유질, 비타민 함량을 증가시킴으로써 소프트 드링크, 아이스크림, 초콜릿과 같은 식품을 건강식품으로 판매 가능한 방법을 제공시켜왔다.
- 강화된 향미제, 색소, 영양 첨가제의 제조, 생산성의 증가 및 가공비용의 저감할 수 있다.
- 개인의 기호(색, 맛, 감촉)와 건강(알러지 등) 및 영양조건(필요 영양성분)에 맞춘 개인화 식품의 개발 가능하다.
- 부패, 세균, 영양분 손실을 탐지하여 포장 및 식품 변질에 대응하고(항균제, 향미제, 색소, 영양 보조제를 방출하는 포장) 식품 유통기간 연장할수 있다.
- 국내 업체 관련 대표적 나노식품 가공 기술은 다음과 같다.
- (주) 나노테크월드: 식품원료를 30 nm ~ 600 nm 크기로 분쇄하는 장치를 개발했으며, 식품원료를 나노 입자형태로 분쇄할 수 있다는 점이 특징이다. 식물, 곡물, 어패류는 물론 광물, 비금속 광물, 세라믹 소재 등도 나노 단위 분쇄가 가능하다고 한다. 현재 「홍삼분말」· 「칼슘분말」 제품 등이 상용화 되어 있다.

- 나노플러스, 나노바이오, 아하코리아: 은나노를 물에 섞어 농약처럼 뿌려주는 제품을 개발해, 시판하고 있다. 이들 업체는 은나노를 이용해 제조한 농산물에서 농약 성분이 없음을 국립농산물품질연구원으로 인정받은 바 있다.

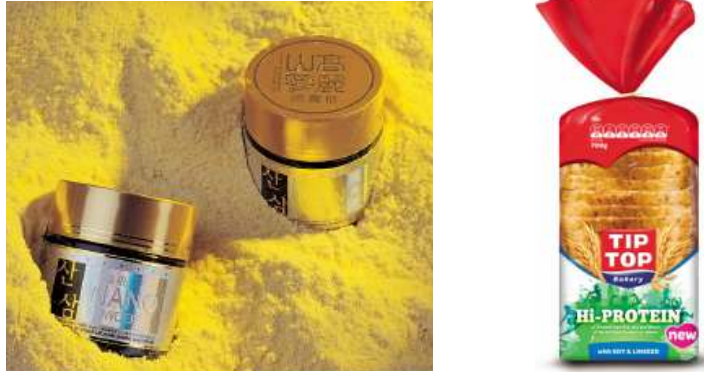


그림 2-1-5. Ge비스로시스트의 산삼배양근 나노파우더(왼쪽)와 George Weston Foods사의 Tip Top-up 제품(오른쪽).

- (주) 나노지오다임: 나노 이산화티탄 농축액을 개발하여 판매하고 있다. 동사는 빛을 차단하는 썬크림 등에 사용하는 이산화티탄을 10~12 nm 크기로 쪼개 잎에 뿌려주면 오히려 광합성을 촉진시키고 자외선을 차단해 저항력을 상승시켜 준다고 말한다. 희석된 이산화티탄액을 잎에 뿌리면 잎이 두꺼워지면서 농산물의 성장발육이 촉진되고 잔병에 잘 견디며, 과실은 당도가 높아진다고 한다.
- 해외 업체 관련 대표적 나노식품 가공 기술은 다음과 같다.
- 나노필터 기술 (Kraft's NanoteK Consortium, 미국): 알리지 반응을 일으키는 분자들은 가두고 적합한 분자만을 소비자에게 도달하게 하는 '스마트' 나노필터에 대해 연구하고 있다.
- 식용 나노코팅 (Sono-Tek Corp, 미국): 식용 나노 코팅제는 육류, 치즈, 과일, 야채, 과자, 빵, 패스트푸드 등에 사용되어 습기나 가스 교환에 대한 차단을 제공하며, 색소제, 향미제, 향산화제, 효소, 갈변 억제제(anti-browning agent)로 작용할 수 있으며, 또한 포장 개봉 후에라도 제조 식품의 유통기간을 증대할 수 있다.
- 나노 에멀션/캡슐화 기술 (Nestle, 스위스): 지방 감축과 향미를 유지하면서도 나노 에멀션 기반의 저지방 아이스크림을 개발하고 있다고 알려져 있으며, 일부 가공 식품의 비타민 및 미네랄 함량을 강화하고 가공육의 제조 속도를 높이기 위해 나노 영양강화 첨가물이 사용되고 있다.
- George Weston Foods(호주): 'Tip Top-up'이라는 인기 있는 빵을 판매하고 있는데, 이 빵은 Omega 3 지방산이 풍부한 참치 어유의 마이크로캡슐(140-180 μ m, 상품명: Nu-Mega Driphorm)을 함유하고 있다(Nu-mega 2007). 참치 오일이 마이크로캡슐로 싸여있기 때문에 소비자는 그 어유의 맛을 느끼지 못하지만, 위에 이르면 방출되어 소화된다. 그러나 Aquanova, Zymes와 같은 기업은 Nu-Mega 보다 크기가 4000배나 작은 30~40 nm 나노캡슐의 Omega 3를 제공하고 있다.

○ BASF(독일): 2002년 BASF는 식품첨가물로서 리코펜(lycopene)이라 불리는 나노크기의 합성 카르티노이드(cartenoid, 당근이나 토마토 속에 존재하는 붉은 색소로 항산화작용)를 제조하고 판매에 관한 미 FDA의 GRAS(Generally Recognized as Safe, 일반적으로 안전하다고 인정되는 식품첨가물)를 획득했다. BASF는 캡슐화한 이 합성 나노 카르티노이드를 레모네이드(lemonade), 과일 주스, 마가린등에 사용하기 위해 세계적으로 주요한 식품, 음료회사에 판매하고 있다.

다) 나노제형 관련 기술 현황

○ 나노에멀전 제형 기술: “의약품 위주 나노에멀전”

- 국내 원료의약품 1위 기업 파일약품은 ‘나노에멀전’이라는 자체개발 기술을 기반으로 건강기능식품과 화장품 시장에서 새 영역을 개척하겠다는 목표를 가지고 있다. 나노에멀전 기술을 이용하면 기름에는 용해되고 물에는 용해되지 않는 지용성 물질을 물에 잘 녹는 30-100 nm의 나노사이즈 입자로 생산할 수 있다.
- 뉴트리연구소에서 진행된 초고압균질기 밸브 타입에 따른 coenzyme Q10 나노에멀전의 제조 및 안정성 연구에서 초고압균질기를 이용한 에멀전화 방법은 다른 유화 공정들 보다 더 작은 입자를 제조하는데 있어 생성효율이 우수하며 나노에멀전을 산업적으로 대량 생산하기에 적합한 것으로 알려져 있다.
- 한국콜마가 고밀도 나노 농축 다중 에멀전 신기술에 대한 특허를 획득했다. 본 신기술은 사람 피부의 각질을 구성하고 있는 세라마이드, 콜레스테롤 및 인지질을 이용하여 피부 생체지질과 유사한 조성물을 가지면서 30-100 nm (10억분의 1미터)의 사이즈로 고밀도, 고농축 하였으며, 다중 캡슐링 기술을 통해 불안정한 활성성분을 안정화시키고 피부 흡수율과 보습력을 극대화시켜 피부에 주는 활성성분의 유효농도를 10배 이상으로 안정하게 만들어 효과를 향상시키는 것은 물론 사용감을 탁월하게 만들었다는 특징이 있다.
- 나노큐어텍 나노-바이오 퓨전 부설연구소와 한림대학교 의과대학 구강악 안면 외과학교실에서 공동 연구한 나노에멀전이 잇몸염증의 예방 및 치료에 미치는 효과에 대한 연구 목적은 부작용이 없으면서도, 생체친화적인 성분을 이용하여 잇몸 질환에 나노에멀전이 신속하게 흡수되어 효과를 발휘할 수 있는 나노 비타민C, E 프로폴리스 복합 성분의 효능에 관한 연구이다.

○ 학술연구에 국한된 리포솜 제형화 기술

- 연세대학교 식품생물 공학과에서는 대두 lecithin을 이용하여 리포솜을 조제하여 효소를 포집하고 특정 조건에서 효소의 방출속도를 촉진함으로써 식품공업에서 응용성을 개발하고자 그 기초 연구를 수행하였다. 포집효율이 우수한 것으로 알려진 dehydration-rehydration (DR)방법으로 리포솜을 조제하였으며, 모델효소로는 lysozyme을 선택하였다. 리포솜의 조제 조건이 효소의 포집효율에 미치는 영향을 검토하였으며, 리포솜 내의 효소의 유출 속도를 조절하기 위하여 lecithin vesicle 내의 lysozyme의 유출에 미치는 외부 환경 인자의 변화 및 유출 촉진제 첨가의 영향을 조사하였다.
- 전주대학교 생명과학부에서 철분강화 식품첨가제용 리포솜을 제조함으로써 ferrous sulfate와 hemin을 혼합한 철분 함유 리포솜의 철분 생체이용성을 증진하고자 하였다. 이러한 철분 함유 리포솜을 제조하는데 가장 큰 문제점은 ferrous sulfate의 자체 산화와 ferrous sulfate와 hemin으로 인한 리포솜의 지질산화로 지적되었고, 최종적으로 리포솜에 ascorbic acid와 토코페롤의 항산화제를 복합하여 사용함으로써 제품 내에서 철분으로 인

한 반응성을 최소화하였다.

- 경남대학교 식품공학과에서는 ascorbic acid의 불안정성을 극복하기 위하여 탈수화/재수화의 방법을 이용하여 soybean phosphatidyl choline으로 제조한 리포솜에 ascorbic acid를 미세캡슐화 하였다. ascorbic acid는 48.6%의 효율로 리포솜내에 포집되었다. 리포솜 내에서의 ascorbic acid는 수용액에서보다 안정성이 매우 증대되었다. 예로 pH 5.0의 acetate buffer에서의 ascorbic acid는 7일 경과 후에 대부분이 산화되지만 같은 조건에서 리포솜에 미세캡슐화 되었을 경우는 40일 경과하여도 22.8%가 환원된 상태를 유지하였다.
- 호서대학교 식품생물공학과에서는 나노리포솜을 이용한 astaxanthin의 안정화를 본 연구에서는 이중 결합을 가진 불포화화합물로 제조나 저장 시 열과 산화(빛)에 의해 쉽게 파괴되어 활성이 감소하여 응용범위에 한계가 있는 아스타잔틴의 안정성 향상을 위하여 나노리포솜 제형기술을 이용하였다. 아스타잔틴을 포집하여 나노리포솜 제조 시 포집 전의 아스타잔틴에 비해 열에 대한 안정성이 2배 정도 향상되고, UV 안정성 또한 3배 향상된 것을 확인하였다.
- 경북대학교에서 연구한 리놀레산을 함유하는 키토산 코팅된 나노리포솜 및 이의 제조방법에 관한 내용은 공액리놀레산을 함유하는 키토산 코팅된 나노리포솜은 물 또는 수성용매에 대한 용해성 및 분산성이 현저히 개선되어 공액리놀레산이 가지는 체중조절 효과뿐만 아니라 다양한 생리활성의 효과를 극대화시킬 수 있으므로 비만 및 심혈관 질환 등 체지방의 증가로 발생할 수 있는 질병의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품, 식품 및 동물사료의 제조에 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

○ 나노기술의 학술성과

- '11년 우리나라의 나노분야 SCI급 논문수는 전년대비 10.2% 증가한 3,334편으로 세계 3위이며, '11년도 : 1위 중국(11,871), 2위 미국(10,657), 4위 일본(3,200), 5위 인도(3,018) <출처 : 미국 Thomson사의 SCIE Data Base('12.1 기준)> (그림 2-1-6).



그림 2-1-6. SCI 논문건수 및 국가순위변화
(국가과학기술위원회, 2012년도 국가나노기술발전시행계획안)

○ 나노기술의 산업화 현황

- 국내 나노기업은 중소기업을 중심으로 꾸준히 증가하여 관련 기업의 수는 2005년 약 154개에서 2009년 약 184개로 보고 되었다. 2009년 기준으로 이중 나노소재 분야가 35.1%로 가장 많았고, 이어서 나노공정(18.2%), 나노측정(11.7%), 나노소자(8.7%), 나노바이오(12.0%), 기타(13.7%)의 순으로 보고되었다.

- 현재 690여개의 나노기술 관련 기업대상 설문조사 결과 359개 응답 기업 중 대기업 16.4%(59개), 중소기업 83.6%(300개) 차지했으며, 나노소재 기업이 54%(192개) 가장 많고, 나노공정/장비19%(69개), 나노에너지/환경 11%(40개), 나노바이오 9%(32개), 나노소자 5%(19개), 기타 2%(7개)였다. 응답 기업의 최근 3년간 연간 매출액은 '08년 8,033억원에서 '09년 8,993억원, '10년 9,340억원으로 2년 사이에 16.3% 상승하였다(표 2-1-3).

표 2-1-3. 식품의약품안전처의 나노 관련 사업 현황

(단위 : 백만원)

사업명	2011	2012	2013 계획
나노독성평가를 위한 기술개발	1,680	1,800	1,370
식품, 의약품 중 나노물질 위해평가 기술 선진화		100	250
식품용 나노소재의 분류 체계화 및 이화학적 특성연구		200	

라) 기능성 펩타이드 및 다양한 단백질 건강기능 식품 조사

- 현재 국내에 출시되어 있는 기능성 펩타이드 및 다양한 단백질 건강기능식품은 다음과 같이 요약될 수 있다(표 2-1-5).

표 2-1-4. 국내 출시된 기능성 펩타이드 함유 건강기능식품

농심	대두 펩타이드를 함유한 콩라면, 가락생라면, 건면세대	
해태	대두추추물을 함유한 '고소한 아침두유'	
CJ	대두 펩타이드를 부원료로 함유한 다이어트 기능성 음료 '팻다운'	

RMS	10 kDa 미만 대두 단백질 가수분해물을 함유한 체중 감량 보조제 ‘디 포르테’ 출시	
매일 유업	유단백질을 대두단백질로 대체한 분유제품 ‘엡솔루트 소이’ 출시 및 판매 중	
남양	분리대두단백을 물로 추출하는 신공법 G20 공법을 적용한 ‘유기농 아기랑 콩이랑’ 출시	
Zetrition	대두단백질로 구성된 헬스 보충제 ‘Zet Max Soy’ 출시	

마) 기능성 펩타이드 소재 신개발 기술

○ 기능성 펩타이드 소재 신개발 기술은 표 3-1-5에 제시되어 있다.

표 2-1-5. 기능성 펩타이드 소재 신개발 기술 및 특성

물리적 가수분해 기술	처리 조건	보고된 효과
초고압 처리기술	-20~80°C 0.1~600 MPa	일부 가수분해 효소활성 강화
고압열수 처리기술	140~180°C 2~5 MPa	콜라겐의 젤라틴화 및 콜라겐의 일부 가수분해
아임계수 처리기술	200~300°C 22~37.5 MPa	단백질 가수분해 (whey, rice bran 등)
초임계수 처리기술	374°C 이상 37.5 MPa 이상	유기물 가수분해 및 아미노산 분해

- 최근 각광받고 있는, 기능성 펩타이드 소재 신개발 기존의 산처리 등에 의한 기존의 화학적 방법에서 탈피하여 물리적인 방법을 이용하므로 보다 자연적이고 친환경적인 특성을 지니고 있다.
- 대표적 기술은 아임계 및 초임계를 이용한 저분자 펩타이드화 기술로서, 다음과 같이 요약될 수 있다.
- 아·초임계를 처리 기술: 물의 경우, 임계점 이상의 압력(22.1 MPa, 218 기압)과 온도(374℃)에서는 액상의 물과 기체상의 물간의 경계가 뚜렷이 구별되지 않는데 이때의 물을 초임계수라 한다. 또한 임계점보다 낮은 근방의 영역을 아임계수라고 부른다. 초임계수는 액상 물과 달리 표면장력이 거의 없고 점도와 밀도 또한 액상일 때 보다 훨씬 낮은 특성이 있다. 그리고 극성이 매우 강한 액상 물에 비해 초임계수는 유전상수(Dielectric constant)가 낮은 관계로 수소결합이 약해져서 비극성의 성질을 띠게 되어 유기 용매와 같은 작용을 할 수 있다. 또한 초임계수의 이온장도(Ion strength)는 액상 물에 비해 월등히 높아서 수소 이온 농도가 액상 물의 30배 이상인 것으로 알려져 있다. 아임계수는 유기물의 용해 작용과 강한 가수분해 작용을 가지며 이온장도는 통상의 물의 유전율의 값은 80 정도인데 비하여, 아임계수의 유전율은 20~30 정도가 되어, 기름을 녹이는 것에 사용되는 메탄올에 가깝게 되기 때문에, 기름을 녹이는 성질을 가지게 된다. 또한 임계수의 온도 영역인 250℃ 정도에서는 물이 매우 큰 이온장도를 가져 수소이온과 수산화물 이온으로 분리하는 비율이 커지기 위해 강한 분해력을 가지게 된다. 이를 이용한 유기물(전분이나 단백질)을 아미노산이나 올리고 펩타이드로 분해되고 고형분이 액상화 하는 기술개발을 가능케 한다.

마) 펩타이드 및 리포솜의 장내 흡수 및 소화에 관한 연구 동향

- 최근 리포솜에 화장품 분야뿐만 아니라 식품 분야에서도 관심이 높아짐에 따라서 리포솜의 소화 및 흡수에 관한 연구들이 이루어지고 있다. 기능성 성분을 리포솜으로 코팅하여 외부환경으로부터 보호 및 목표 지점까지의 운반하는 역할을 가지며 또한 나노리포솜은 작은 크기를 이용한 생체 흡수율 증가 효과까지 기대된다.
- Gong(2016) 등은 peptide를 포집하여 소화기관 조건 변화에 따른 리포솜 및 나노리포솜의 손실률을 확인하기 위해 release rate 및 소화모방실험 후 활성 측정 결과, 나노리포솜의 pH에 따른 안정성은 높았으며 체내흡수율이 가장 높은 것으로 보고하였다(그림 2-1-7, 8).

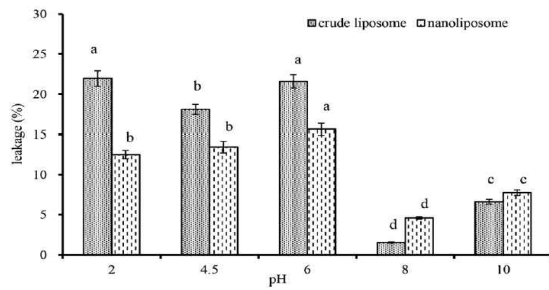


그림 2-1-7. pH 조건에 따른 리포솜 및 펩타이드 리포솜의 결핍률

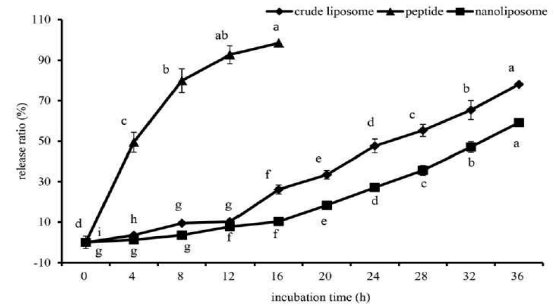


그림 2-1-8. 리포솜 및 펩타이드 리포솜의 release rate

- 또한 나노 리포솜으로 인슐린을 코팅하여 안정성을 관찰한 결과, 나노리포솜 코팅 인슐린의 안정성이 더 높은 것으로 연구됨(He et al., 2018).
- 리포솜으로 코팅된 Ginseng fruit saponin(GFS)의 안정성이 코팅하지 않은 GFS에 비해서 높게 나타났다(Fei et al., 2016).
- 이외에도 펩타이드 및 리포솜의 장내 흡수 기작과 관련한 연구들이 보고되고 있다. 일반적인 펩타이드는 장내에서 소화효소로 인해 분해되며 일부 펩타이드는 기저 외막을 통해서 수송된다. 이 경우 di, tripeptide는 운반체 매개 수송, 확산을 통해서 흡수되며, oligo peptide는 transcytosis와 확산을 통해서 흡수된다(Wada et al., 2014).
- Belouqui 등 (2016)은 나노입자 중합체와 지질성 나노입자 두 가지 유형에 따른 소장 벽에서 흡수되는 기작을 도식화하였다. 지질성 나노입자는 난용성 약물의 투과성 향상에 유용하며, 펩타이드 및 단백질 전달에 있어서는 중합체 나노입자가 유용하였다고 보고하였다(그림 2-1-9).

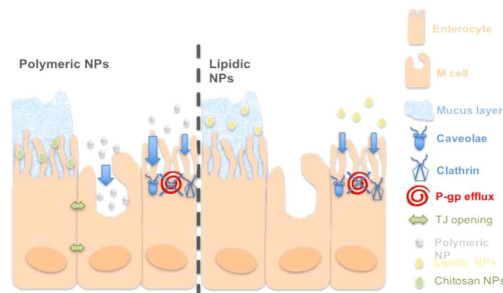


그림 2-1-9. 중합체 나노 입자 및 지질성 나노입자의 장내 수송 기전

2. 현장적용 가능 기술 다양한 나노 기술 조사

가) 나노기술 및 나노식품의 정의

“나노기술”이란 다음 각 목의 기술을 말한다. (나노기술개발촉진법 제2조 1항)

- 가. 물질을 나노미터 크기의 범주에서 조작·분석하고 이를 제어함으로써 새롭거나 개선된 물리적·화학적·생물학적 특성을 나타내는 소재·소자 또는 시스템(이하 “소재 등”이라 한다)을 만들어 내는 과학기술
- 나. 소재 등을 나노미터 크기의 범주에서 미세하게 가공하는 과학기술

“나노기술응용식품”이란 식품의 제조, 생산, 가공, 조리, 저장, 포장 등의 과정에서 직접 또는 간접적으로 나노기술이 적용된 식품(건강기능식품 포함), 식품첨가물, 기구, 또는 용기, 포장 등을 말한다.(제48회 식품의약품안전열린포럼, 식품의약품안전처)

나) 나노식품에 대한 연구동향

- 정부는 2001년 ‘나노기술종합발전계획’ 수립 이후, ‘나노기술개발촉진법’ 제정 등 나노기술개발을 위한 정책적 지원을 지속하여, 나노기술분야 정부 연간 지원액은 2001년 1,052억 원에서 2012년에는 2,834억 원 규모까지 확대되었으며 누적액 기준 2조 9천억 원 투자하고 있다(김석필 외, 2014).
- 적극적인 정부의 투자의 결과로 원천기술과 인력 및 인프라 확대의 성과는 어느 정도 달성하였으나, 시장진출 및 산업의 확대 등 본격적인 산업화 및 제품화 성과는 미진하다. 즉 국내에서는 실험실 단위에서 개발 및 규명된 나노식품의 공장 적용 실현 가능한 기술 개발이 매우 부족한 상태로 실질적인 기술 개발이 필요하다.
- 약리학 분야에서 나노기술은 이미 오래 진행되어온 분야로 현재 식품분야로 넘어와 식품산업에서 약간의 기술을 차용하고 있는 실정 가운데 실험실 단위에서 소량으로 제조된 제품에 대한 연구는 이미 다수의 논문을 통해 발표되어 온 실정이다.
- 나노식품에 대한 기술이 식품 소재 범위나 그에 따른 기술이 광범위하게 산재 되어 있고 산업체 현장 적용할 만한 기술은 매우 미흡한 실정으로 산업체 현장에 적용해 보면 나노 크기가 제조되지 않거나, 수율에서 현저히 떨어진다.
- 나노기술을 사용한 나노제품 개발 및 상용화 기술개발은 단순한 연구개발 지원 정책이 아닌 나노기술의 확장성 및 보편성을 고려해야 한다고 여러 연구기관에서도 지적하는 현황이다.
- 2003년부터 발행하는 나노연감자료를 바탕으로 조사한 나노기술 연구개발 활동 및 산업화 성과에 대한 연구보고서에 의하면 나노소재분야, 나노바이오, 나노소자, 나노기반, 나노에너지 및 환경 순으로 성과가 집계되었다고 한다(김석필 외, 2014).
- 연구수행주체는 대학이 대부분을 차지하고 있으며, 비중 또한 지속적으로 증가하고 있다고 한다. 그러나 대학의 상용화 성과는 2010년까지는 거의 없었으며, 2011년 0.5건, 2012년 1.7건으로 다소 증가하는 경향을 보였다.
- 이는 나노기술에 대한 전체적인 통계 결과이며, 이중 나노식품이 차지하는 비율은 하위 그룹에 속한다. 산업부에서 발표한 나노융합산업 관련 통계를 기초 자료로 활용하여 산업의 규모 및 성장률을 분석한 결과 나노융합 산업은 4개의 대분류와 16개 중분

류, 44개의 소분류로 구성된다.

- 표 2-1-6에서 보듯이 나노농수산물식품은 나노 바이오 및 의료에 속하며, 매출액은 33,259 백만원, 매출증가율은 4.2%로 하위 그룹이다. 나노농수산물식품인 속한 나노 바이오 및 의료 분야는 4개의 대분류 간에 가장 하위이다.

표 2-1-6. 나노융합산업 나노매출액, 나노매출증가율, 나노매출비중
(나노융합산업조사, 2012)

	구분	나노매출액 ('12. 백만원)	나노매출증가율 ('11-'12. %)	나노매출비중 ('12. %)
나노소재	나노원료소재	6,484,299	39.5	25.6
	나노가공소재	1,413,232	9	10.3
	나노복합소재	2,339,468	16.8	16.8
	계	11,137,000	27.7	19.1
나노전자	반도체용 나노소재	26,083,759	1.3	36.2
	센서용 나노소재	85,284	0.1	49
	디스플레이용 나노소재	49,826,166	2.1	57.7
	메니저용 나노소재	2,842,839	4.6	10.5
계	78,538,048	1.9	43	

	구분	나노매출액 ('12. 백만원)	나노매출증가율 ('11-'12. %)	나노매출비중 ('12. %)
나노 바이오·의료	나노의약품	155,755	9.5	13.6
	나노바이오기기 및 장비	32,262	24.3	51.5
	나노화장품	63,792	-2.8	49.2
	나노농수산물식품	33,259	4.2	35
	나노생체삽입소재	37,954	14.6	32.9
	의료 및 의료용 소모품	387	1.7	77.1
계	293,399	7.9	22.1	
나노장비·기기	일반목적장비용 나노부품	246,224	24.2	41.2
	나노제조공정 장비	1,864,748	14.8	62.1
	나노측정분석 장비	205,982	40.4	11.4
	계	2,316,954	17.6	42.8
중분류 평균	5,787,838	12.8	36.3	

- 그림 2-1-7에서 보듯이 나노농수산물식품은 나노매출액은 낮고 나노매출액 증가율도 낮은 분야로서 나노비중이 평균이하이다.

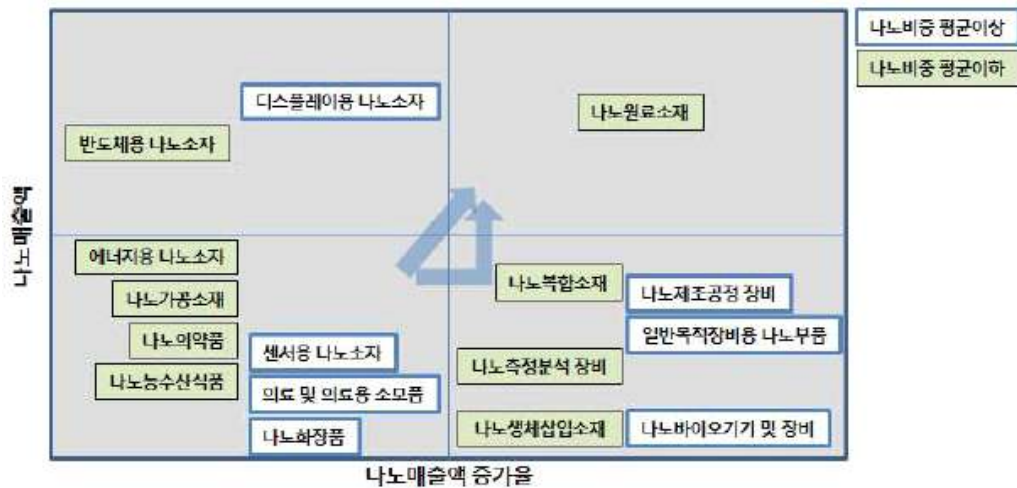


그림 2-1-10. 나노매출액 vs 나노매출액 기준 유형 분류(KISTEP. 연구보고 2014-016).

- 연구개발 투자현황을 살펴보면, 2011년 나노융합기업들의 연구개발 투자는 총 5조 9,280억원으로 2010년에 비해 10.2% 증가한 기록이 있었다. 이 중 대기업의 투자가 높았으며, 특히 전자부분의 집중도가 높은 것으로 나타났다. 즉 나노바이오 및 의료 분야에 속하는 나노농수산물식품은 투자 또한 미비한 것으로 사료된다.
- 다만, 매출액 대비 연구개발 투자의 비중은 6.4%이며, 4개의 대분류중 나노바이오 및 의료부가 가장 높은 수준으로 나타났다. 이는 나노농수산물식품의 발전 가능성이 높다는

것을 의미한다(표 2-1-7).

표 2-1-7. 매출액 대비 R&D투자의 비중(R&D 집약도)

(단위 : 백만원, %)

	나노R&D투자액			R&D집약도	
	2010년	2011년	기업규모별 비중 (2011년)	2010년	2011년
나노소재	114,111	156,503	2.7	1.3	1.4
중소기업	39,768	59,213	37.8	2.5	3.0
중견기업	9,761	15,352	9.8	2.1	4.1
대 기업	64,582	81,938	52.4	1.0	0.9
나노전자	5,160,852	5,633,331	95.0	6.7	7.2
중소기업	26,682	21,313	0.4	5.4	4.1
중견기업	11,006	13,203	0.2	1.4	1.4
대 기업	5,123,164	5,598,815	99.4	6.8	7.3
나노바이오·의료	20,507	24,267	0.4	7.5	8.3
중소기업	13,946	15,093	62.2	6.6	7.0
중견기업	6,500	9,100	37.5	11.8	12.5
대 기업	61	74	0.3	1.5	2.1
나노장비·기기	83,275	113,946	1.9	4.2	4.9
중소기업	63,944	75,284	66.1	6.5	6.7
중견기업	19,331	38,652	33.9	2.0	3.2
대 기업	0	10	0.0	-	0.5
합계	5,378,745	5,928,047	100.0	6.1	6.4
중소기업	144,340	170,903	2.9	4.4	4.5
중견기업	46,598	76,307	1.3	2.1	3.0
대 기업	5,187,807	5,680,837	95.8	6.3	6.6

- 나노융합업체의 국내 및 해외에 등록 또는 출원된 특허 수는 총 6,698건이며 이 중 나노바이오 및 의료가 차지하는 국내특허는 474건, 해외특허는 178건으로 집계되었다. 이는 4개의 대분류 중 가장 낮은 것으로 나타났으며, 가장 많은 특허를 발표한 분야는 나노장비 및 기기분야로 국내외 발표된 총 특허건수는 4,088건으로 전체의 약 45% 구성비를 나타냈다.
- 사업화 현황을 살펴보면, 나노융합제품의 제품화 수준은 2012년에 제조 및 판매단계라고 설문조사에 응답한 기업체가 74%였다. 또한 기업의 주력제품이 연구개발 및 시제품 생산단계라는 응답도 26%인 점을 감안하면, 향후 나노융합제품의 제품출시가 더욱 활발해 질 것이며, 나노농수산식품의 매출증가율도 증가 될 것으로 전망해 볼 수 있다.
- 나노융합제품은 2000년 이후로 시장에 출시되었고 해마다 증가하는 경향을 보이고 있다. 나노바이오 및 의료 분야의 경우 2008년 이후 26.8% 시장 출시율을 보였다.
- 국외의 경우 나노식품 시장을 식품가공(Food processing), 식품포장(Smart & Active Packaging), 식품안전·품질(Food Safety & Quality), 식품첨가물(Food Ingredient)로 나누고, 전체 시장의 규모는 2006년 4.1억 달러, 2007년 5.7억 달러로 추정되며, 2012년엔 58.1억 달러에 이를 것으로 전망하고 있다. 2012년 시장 규모를 분야별로 살펴보면 식품포장이 29.3억 달러로 가장 크고, 그 다음이 식품첨가물 14.8억 달러, 식품안전·품질 13.0억 달러, 식품가공 1.0억 달러 순이다. 각 부문 공히 향후 5년간 연평균 57~60%의 높은 성장률을 기대하고 있다.

다) 나노기술관련 나노농수산식품(건강기능식품포함, 업체, 기술법, 상품 등)

- 2013년 나노농수산식품의 생산 및 거래구조는 표 2-1-8과 같으며, 나노농수산 식품은

151억원의 매출액, 증감율이 -13.7%로 매출액이 전년도 대비 감소하는 결과를 나타냈다.

표 2-1-8. 나노농수산물식품의 생산 및 거래구조(억원, %)

분 류		나노매출액		증감율
		2011	2012	
NC	나노바이오·의료	4,406	4,444	0.9
NC01	나노의약품	1,634	1,450	-11.2
NC0101	나노치료제	383	406	6.0
NC0102	나노진단제	1,250	1,044	-16.5
NC02	나노바이오 기기 및 장비	660	676	2.4
NC0201	진단기기	87	87	-0.1
NC0202	분석기장비	573	589	2.8
NC03	나노화장품	1,585	1,767	11.5
NC0301	나노화장품	1,585	1,767	11.5
NC04	나노농수산물 식품	174	151	-13.7
NC0401	나노기능성식품	167	143	-14.5
NC0402	사료·비료·농약	7	7	5.7
NC05	나노생체 삽입소재	342	390	14.0
NC0501	임플란트	342	390	14.0
NC06	의료 및 연구용 소모품	11	11	0.0
NC0601	의료 및 연구용 소모품	11	11	0.0

- 국내에 나노농수산물식품의 대한 연구 및 사업화는 아직 매우 미비하고 상품 수 또한 부족한 실정이다. 기능성 펩타이드를 소재로 나노상품화 하는 경우 거의 없는 것으로 예상된다. 기능성 펩타이드 나노상품 뿐만 아니라 나노농수산물식품은 아직 종류가 다양하지 못하므로, 나노농수산물식품과 나노화장품 관련 제품에 대해 조사하였으며, 내용은 다음 표 2-1-9와 같다(나노인, 2014).

표 2-1-9. 나노 농수산물식품과 나노화장품

1	<p>Patch류 화장품</p> <p>제조사 : 필캠</p> <p>출시년도 : 2001</p> <p>나노융합산업분류 : NC03. 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
2	<p>Digital Media 소재(PVC 필름)</p> <p>제조사 : 필캠</p> <p>출시년도 : 1995</p> <p>나노융합산업분류 : NC03. 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cross cutting(코팅 등)</p>	

3	<p>나노칼슘 (7030칼슘프리미엄플러스)</p> <p>제조사 : 에이팩셀</p> <p>출시년도 : 2013</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Food & Drink(식음료)</p>	
4	<p>프로폴리스(프로폴리스캡셀)</p> <p>제조사 : 가보팜스</p> <p>출시년도 : 2005</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Food & Drink(식음료)</p>	
5	<p>주름방지크림</p> <p>제조사 : 이노스킨(주)</p> <p>출시년도 : 2009</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
6	<p>피부재생크림(키틴드레싱젤)</p> <p>제조사 : 이노스킨(주)</p> <p>출시년도 : 2009</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
7	<p>의약품원료(개암풀열매추출물)</p> <p>제조사 : (주)알엔에스</p> <p>출시년도 : 2010</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
8	<p>화장품원료(White-AK)</p> <p>제조사 : (주)알엔에스</p> <p>출시년도 : 2010</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	

9	<p>비누(닥터감)</p> <p>제조사 : (주)우노코스</p> <p>출시년도 : 2010</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
10	<p>인제로알칼슘</p> <p>제조사 : 인제나노판매주식회사</p> <p>출시년도 : 2011</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Food & Drink(식음료)</p>	
11	<p>인제키칼슘</p> <p>제조사 : 인제나노판매주식회사</p> <p>출시년도 : 2011</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Food & Drink(식음료)</p>	
12	<p>인제칼슘포르테N비타민 미네랄</p> <p>제조사 : 인제나노판매주식회사</p> <p>출시년도 : 2006</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Food & Drink(식음료)</p>	
13	<p>실버스탑</p> <p>제조사 : 나노플렉스</p> <p>출시년도 : 2012</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Home & Garden(저택/경원)</p>	

14	<p>나노 에멀전 베이스</p> <p>제조사 : 한국콜마</p> <p>출시년도 : 2012</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
15	<p>나노 리포좀 베이스</p> <p>제조사 : 한국콜마</p> <p>출시년도 : 2013</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
16	<p>나노대추추출액</p> <p>제조사 : ㈜코씨드바이오팜</p> <p>출시년도 : 2009</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
17	<p>Pristeen Claire</p> <p>제조사 : 리제론㈜</p> <p>출시년도 : 2012</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
18	<p>NanoClaire-GY</p> <p>제조사 : 리제론㈜</p> <p>출시년도 : 2012</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
19	<p>JH-Red</p> <p>제조사 : 선진화학</p> <p>출시년도 : 2010</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	

20	<p>SUNZnO-NAS</p> <p>제조사 : 선진화학</p> <p>출시년도 : 2006</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
21	<p>SUNSIL-Tin50</p> <p>제조사 : 선진화학</p> <p>출시년도 : 2010</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	<p>SUNSIL Tⁱⁿ50</p> 
22	<p>수용성 오메가3</p> <p>제조사 : 화일약품㈜</p> <p>출시년도 : 2007</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Food & Drink(식음료)</p>	
23	<p>CLA(TG) 70%/CLA(TG) 30%</p> <p>제조사 : 화일약품㈜</p> <p>출시년도 : 2007</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Food & Drink(식음료)</p>	
24	<p>CoQ10 98%/CoQ10 10%</p> <p>제조사 : 화일약품㈜</p> <p>출시년도 : 2007</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Food & Drink(식음료)</p>	
25	<p>마 한뿌리</p> <p>제조사 : ㈜제이크리에이션</p> <p>출시년도 : 2008</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Food & Drink(식음료)</p>	
26	<p>인삼 한뿌리</p> <p>제조사 : ㈜제이크리에이션</p> <p>출시년도 : 2004</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Food & Drink(식음료)</p>	

27	<p>홍삼 한뿌리</p> <p>제조사 : ㈜제이크리에이션</p> <p>출시년도 : 2004</p> <p>나노융합산업분류 : NC04, 나노농수산식품</p> <p>나노제품분류 : Food & Drink(식음료)</p>	
28	<p>아쿠아 코엔자임 큐텐</p> <p>제조사 : H&A파마켄</p> <p>출시년도 : 2007.7</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	
29	<p>아쿠아 실리콘</p> <p>제조사 : H&A파마켄</p> <p>출시년도 : 2007.8</p> <p>나노융합산업분류 : NC03, 나노화장품</p> <p>나노제품분류 : Cosmetics and personal care(화장품/관리제품)</p>	

3. 나노화 기술 및 관련 상용화 제품

- 농업과 식품산업에서 나노기술의 잠재력은 아직 완전히 발휘되지 않았으나, 이론적 지식에서 적용으로 점차 옮겨가고 있는 단계로 가까운 장래에 정밀농업의 필수불가결한 요소가 될 것으로 기대한다.
- 앞서 언급한 바와 같이 나노농수산식품 및 건강기능성식품은 현재 발전 중에 있다. 본 보고에는 현대 식품의약품안전처에서 발표한 나노 식품첨가물 제품과 나노첨가물 제품을 제시하고자 한다.

가) 나노 식품 첨가물 제품

- 식약처에서 발표한 나노 식품첨가물 제품 중 펩타이드 관련 나노제품으로는 피쉬콜라겐 제품은 총 5종이 조사되었다. 제품의 형태는 젤리 및 분말 형태이다.

나노 식품첨가물 제품

분류	제품명	제조 국가	나노 물질	제품 형태
식품 첨가물	차가버섯 분말	한국 (에이팩셀)	버섯 추출물	분말
	덴마크 나노 칼슘 우유	한국 (동원)	칼슘	액체
	청송셀레늄 사과	한국 (청송 기능성사과 영농조합)	selenium	고체
	씨앗 나노 콜라겐 뷰티 젤리	한국 (코스맥스바이오)	피쉬 콜라겐	젤리
	K-뉴트라 콜라겐 그레놀	한국 (아미코젠)	피쉬 콜라겐	분말
	거당산	한국 (나노텍바이오)	천연식물 엑기스	엑상
	나노 베타 글루칸 버섯환	한국 (인성제약)	베타글루칸	환
	나노 베타 일세 버섯환	한국 (인성제약)	하나바이오텍	환
	미테라피스트엑	일본	레티난	엑상
	Nanotea	중국 (Shenzhen Become Industry & Trade)	selenium (160nm)	액체
	NovaSol Rosemary	독일 (Aquanova)	carnosolic acid	캡슐
	Maternal water	스페인 (La Posta del Aguila)	silver	액체




나노 식품첨가물 제품

분류	제품명	제조 국가	나노 물질	제품 형태
식품 첨가물	Canola active oil	미국 (Shemen Industries)	canola oil (30nm)	액체
	Slim shake chocolate	미국 (RBC Life Science)	cacao clusters	고체
	Choco'la chewing gum	미국 (O' lala foods)	cacao	고체
	Humic and fulvic acids	미국 (Nano Health Solutions)	fulvic acid	액체
	Nano bio-sim	미국 (Nano health solution)	silicon dioxide	분말
	Aerosil	미국 (Evonil)	silica	고체
	Silpernat	미국 (Evonil)	silica	고체
	Silver- 22TM	미국 (RBC Life Sciences)	silver	콜로이드
	Nano bio silver	미국 (Nano Silver Technology)	silver (10nm)	액체
	MesoGold	미국 (Purest Colloids)	gold (70-120nm)	콜로이드
	MesoGold	미국 (Colloid for life LLC)	gold (65nm)	콜로이드
	m&m	미국	TiO2	고체
	Sugar powder	미국	TiO2	고체
	pop-tarts	미국	TiO2	고체

나노 식품첨가물 제품

분류	제품명	제조 국가	나노 물질	제품 형태
건강 기능 식품	겔콜라겐	한국 (경남제약)	피쉬 콜라겐	분말
	K-뉴트라 콜라겐 그래놀	한국 (아미코젠)	피쉬 콜라겐	분말
	씨앗 나노 콜라겐 뷰티 젤리	한국 (코스맥스 바이오)	피쉬 콜라겐	젤리
	디엔드 젯	한국 (뉴트리바이오텍)	CLA	액체
	거당상	한국 (나노텍바이오)	식물추출물	액체
	나노 베타 글루칸이 버섯한	한국 (연성제약)	베타글루칸	한
	나노 베타 알세 버섯한	한국 (연성제약)	베타글루칸	한
	미테라피스트엑	일본 (YAMAMORI MATSUSAKA)	레티난	액체
	Anabolic Vitakic	미국 (Muscletech)	multivitamin	캡슐
	라이프팩 나노	미국 (Pharmanex)	Lipo nutrient, carotenoid	캡슐
	NanoCoQ10	미국 (Pharmanex)	CoQ10	캡슐
	24Hr Microactive CoQ10	미국 (Genceutic naturals)	갈슘, 마그네슘	캡슐

나. 나노첨가물 제품

<p>나노첨가물 제품</p> <p>첨가물 제품</p> <p>제품명: Nano bio silver</p> <p>나노화한 성분: 은 (10nm)</p> <p>제품 형태: 액체</p> <p>제조사: Nano Silver Technology(미국)</p> <p>출처: 원문서 - Regain your health</p> <p>나노기술의 사용 목적: <ul style="list-style-type: none"> 항균 작용 </p> 	<p>나노첨가물 제품</p> <p>첨가물 제품</p> <p>제품명: Nano bio-sim</p> <p>나노화한 성분: Silicon dioxide</p> <p>제품 형태: 분말</p> <p>제조사: Nano health solution (미국)</p> <p>출처: 원문서 - Regain your health</p> <p>나노기술의 사용 목적: <ul style="list-style-type: none"> 항균작용 기능성 물질의 효과력 상승 </p> 
<p>나노첨가물 제품</p> <p>첨가물 제품</p> <p>제품명: Nanotea</p> <p>나노화한 성분: Selenium (160nm)</p> <p>제품 형태: 액체</p> <p>제조사: Shenzhen Become Industry & Trade Co., Ltd. (중국)</p> <p>출처: 기사 - REUTERS (2008. 7.30)</p> <p>나노기술의 사용 목적: <ul style="list-style-type: none"> 항균 작용, 항염증 작용 생리활성물질의 체내 흡수율 증가 </p>	<p>나노첨가물 제품</p> <p>첨가물 제품</p> <p>제품명: Humic and fulvic acids, Nano Humic and Fulvic Acids</p> <p>나노화한 성분: Fulvic acid</p> <p>제품 형태: 액체</p> <p>제조사: Nano Health Solutions (미국)</p> <p>출처:</p> <p>나노기술의 사용 목적: <ul style="list-style-type: none"> 기능성 물질의 효과 증가 </p> 

나노첨가물 제품

첨가물 제품


제품명	Meso Gold
나노화한 성분	Gold (70-120nm)
제품 형태	콜로이드
제조사	Purest Colloids (미국)
출처	기사 - PR Newswire (2013.2.25)
나노기술의 사용 목적	<ul style="list-style-type: none"> 항균 작용 제품의 변색 방지 효과 증진



나노첨가물 제품

첨가물 제품

제품명	Meso Gold
나노화한 성분	Gold (65nm)
제품 형태	콜로이드
제조사	Colloid for life LLC (미국)
출처	웹문서-The project on emerging Nanotechnologies
나노기술의 사용 목적	<ul style="list-style-type: none"> 금의 체내 흡수를 용이하게 함



나노첨가물 제품

첨가물 제품

제품명	Maternal water
나노화한 성분	silver
제품 형태	액체
제조사	La Posta del Aguila
출처	웹문서- The project on emerging Nanotechnologies
나노기술의 사용 목적	<ul style="list-style-type: none"> 항균 작용



나노첨가물 제품

첨가물 제품

제품명	Silver- 22TM
나노화한 성분	silver
제품 형태	콜로이드
제조사	RBC Life Sciences (미국)
출처	웹문서- The project on emerging Nanotechnologies
나노기술의 사용 목적	<ul style="list-style-type: none"> 은의 흡수를 도움



나노첨가물 제품

첨가물 제품


제품명	정송셀레늄사과
나노화한 성분	Selenium
제품 형태	고체
제조사	정송 기능성 사과 영농조합 (한국)
출처	기사- 영남일보(2012.2.25)
나노기술의 사용 목적	<ul style="list-style-type: none"> 셀레늄의 체내 흡수를 용이하게 함



나노첨가물 제품

첨가물 제품

제품명	Chocola chewing gum
나노화한 성분	cacao
제품 형태	고체
제조사	O' lala foods
출처	기사 - FORBES (2006.01.09)
나노기술의 사용 목적	<ul style="list-style-type: none"> 크림처럼 부드러운 식감 초콜렛 향 함유



나노첨가물 제품

첨가물 제품

제품명	Canola active oil
나노화한 성분	canola oil (30nm)
제품 형태	액체
제조사	Shemen Industries (미국)
출처	기사 - REUTERS (2008. 7.30)
나노기술의 사용 목적	<ul style="list-style-type: none"> 비타민, 미네랄,파이토케미컬의 소화 흡수를 도움.











나노첨가물 제품

첨가물 제품

제품명	에이백셀 봉입 환
나노화한 성분	홍밀
제품 형태	환
제조사	에이이백셀
출처	에이이백셀
나노기술의 사용 목적	<ul style="list-style-type: none"> 홍밀분말을 미세입자로 분쇄하여 소화증진 영양성분, 효능의 생체이용률 증대



<p>나노첨가물 제품</p> <p>첨가물 제품</p> <p>제품명 노루공영이 버섯 나노분말</p> <p>나노화한 성분 노루공영이 버섯</p> <p>제품 형태 분말</p> <p>제조사 영농조합법인 지강</p> <p>출처 G마켓, 블로그(mushblog)</p> <p>나노기술의 사용 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> 영양분 함량 증대 체내 흡수력 증가 	<p>나노첨가물 제품</p> <p>기능성 제품</p> <p>제품명 24Hr Microactive® CoQ10</p> <p>나노화한 성분 칼슘, 마그네슘</p> <p>제품 형태 캡슐</p> <p>제조사 Geneceutic naturals (미국)</p> <p>출처 웹문서- The project on emerging Nanotechnologies</p> <p>나노기술의 사용 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> Coenzyme Q10 흡수를 용이하게 함 열과 빛에 저항성을 가짐 
<p>나노첨가물 제품</p> <p>기능성 제품</p> <p>제품명 씨앗 나노 콜라겐 뷰티 젤리</p> <p>나노화한 성분 피쉬 콜라겐</p> <p>제품 형태 젤리</p> <p>제조사 코스맥스바이오㈜</p> <p>출처 G마켓</p> <p>나노기술의 사용 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> 콜라겐의 체내 흡수율을 높임 	<p>나노첨가물 제품</p> <p>기능성 제품</p> <p>제품명 K-뉴트라 글라겐 그레놀</p> <p>나노화한 성분 저분자 피쉬 콜라겐</p> <p>제품 형태 분말</p> <p>제조사 아미코젠㈜</p> <p>출처 K-nutra</p> <p>나노기술의 사용 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> 콜라겐 흡수율 증대 
<p>나노첨가물 제품</p> <p>기능성 제품</p> <p>제품명 거당산</p> <p>나노화한 성분 천연식물 액기스 추출</p> <p>제품 형태 액상</p> <p>제조사 나노텍바이오</p> <p>출처 블로그-나노텍바이오</p> <p>나노기술의 사용 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> 흡수율 향상 당뇨환자 대응식 	<p>나노첨가물 제품</p> <p>기능성 제품</p> <p>제품명 나노베타 글루코사민</p> <p>나노화한 성분 베타글루칸</p> <p>제품 형태 환</p> <p>제조사 인성제약㈜</p> <p>출처 하나바이오텍</p> <p>나노기술의 사용 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> 베타글루칸 추출효율 개선 
<p>나노첨가물 제품</p> <p>기능성 제품</p> <p>제품명 나노베타 잎채버섯환</p> <p>나노화한 성분 베타글루칸</p> <p>제품 형태 환</p> <p>제조사 인성제약 (한국)</p> <p>출처 하나바이오텍</p> <p>나노기술의 사용 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> 베타글루칸 추출효율 개선을 통한 원가절감 	<p>나노첨가물 제품</p> <p>기능성 제품</p> <p>제품명 미테라피스트렉</p> <p>나노화한 성분 레티난 (Lentianin)</p> <p>제품 형태 액상</p> <p>제조사 YAMAMORI INC. MATSUSAKA PL(일본)</p> <p>출처 기사-아이클뉴스</p> <p>나노기술의 사용 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> 소장에서의 흡수율을 증가시켜 생체 이용률을 극대화 

4. 농식품분야 나노기술과 제품

- 농업과 식품산업에서 나노기술은 아직 활발하게 상용화 되지 않았으나, 이론적 지식에서 적용으로 점차 옮겨가고 있는 단계로 가까운 장래에 농수산업 및 가공식품 분야에 필수 가공기술이 될 것으로 전망한다.

○ 최근 농촌진흥청에서는 농식품분야의 나노기술 적용 사례와 전망에 관한 미래전략 리포트(농촌진흥청, 2014)를 발표하며, 향후 농업과 식품산업에 적용되는 국내외 나노기술 및 연구현황 등을 발표하였다. 이를 바탕으로 상용화 가능한 나노기술에 대한 정보를 조사하였다.

가) 부문별 응용 가능한 나노기술

 <p>농업 Agriculture</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 효소/기질 상호반응을 확인하는 단일분자 검출기법 ■ 농약, 비료 및 기타 농화학물질의 효율적 수송을 위한 나노캡슐화 ■ 제어조건하에서의 식물생장호르몬의 수송 ■ 토양 조건과 작물 성장 모니터링을 위한 나노센서 ■ 보존관리와 추적을 위한 나노칩 ■ 동물과 식물의 병원체 검출을 위한 나노센서 ■ 백신을 수송하는 나노캡슐 ■ 식물로 DNA를 도입하는 나노입자(타겟형 유전공학)
 <p>식품 가공 Food Processing</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 요리용 오일과 같은 표준성분의 생체 이용성 증진 나노캡슐 ■ 나노 캡슐 처리된 향기 증가제 ■ 젤라틴 등 점성물질 나노입자와 나노튜브 ■ 육류 콜레스테롤을 대체하는 식물기반의 스테로이드 확산용 나노캡슐 ■ 식품으로부터 병원체나 유해화학물질을 선택적으로 제거 또는 결합하는 나노입자 ■ 영양성분의 확산과 유효성 증대를 위한 나노 유액제 및 나노입자
 <p>식품 포장 Food Packaging</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 식품유래 병원균 또는 화학물질을 검출하는데 항체와 반응하는 형광나노입자 ■ 온도, 습도, 시간모니터링을 위한 생분해성 나노센서 ■ 산소흡수와 손상을 방지하는 포장재로서의 나노필름과 나노점토 ■ 에틸렌을 감지하는 전기화학 나노센서 ■ 살균성, 항균성 표면코팅제(은, 마그네슘, 아연 나노입자) ■ 실리케이이트 나노입자로 만든 더 가볍고 강도 높고, 열에 강한 필름 ■ 흡수력이 개선된 호일
 <p>첨가제 Supplements</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 영양분 흡수력 증진을 위한 나노크기의 분말 ■ 약물 수송체로서 셀룰로오스 나노크리스탈 합성물 ■ 흡수성, 안정성, 목표도달 증진을 위해 뉴트라퀴티클의 나노캡슐화 ■ 식품의 색이나 맛에 영향 없이 양분이 보다 효과적으로 세포로 전달되도록 하는 나노코일레이트 ■ 나노드롭에 비타민 분자로 활성 분자 분산 및 흡수 증진

출처: 농촌진흥청, 나노기술: 농업의 신 개척지

나) 나노기술을 적용하여 개발된 제품들

제품	적용	개발 기관
나노 농약	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 배출조절을 위해 나노 캡슐화된 살충제 ✓ 효율성 향상을 위한 나노유화제 	BASF(독일)
버키볼 비료	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 버키볼(폴리린) 유래 암모니아 	교토대(일본)
나노입자	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 가공류에서 <i>Campylobacter jejuni</i> 균의 제거를 위한 특이흡착 나노입자 	클렘슨대(미국)
푸드 패키징	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 실리케이이트 나노입자로 된 에어증천 플라스틱 포장재 	바이엘(독일)
농업폐기물 활용	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 의류 강도향상을 위한 코튼 부산물 나노섬유 	코넬대(미국)
나노센서	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 포장식품의 오염 검출 ✓ 병원균 검출 	네슬레(미국) 등
정밀농업	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 토양상태와 작물 생육의 실시간 모니터링을 위한 글로벌 위치 추적시스템과 연결된 나노 센서들 	USDA(미국)
가축, 어류	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 나노수의약품(나노입자, 버키볼, 덴드리머, 약전달용 나노캡슐, 나노백신, 스마트양치기, 연못세정제(나노 체크(미국)), 사료(철분 나노입자)) 	코넬대 나노빅 (호주)

* 출처: Siddhartha S Mukhop dhyay, 2014, Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints

다) 식품산업에서의 나노기술 개발방향

제품	핵심방향	기술개발 트렌드	나노기술 적용영역	나노기술에 대한 요구사항
식품유해 물질 검출기	실시간 검출	휴대형	시료 전처리와 검출기 일체형	미세유체구조/ 나노구조체
		고감도	나노입자 소재	나노입자 소재/ 생체인식물질 고정화
식품이력 바코드	식품유통 정보화	복제 및 제거 불가능	나노-바이오 바코드	생체물질의 나노 캡슐화
식품 포장재	친환경 식품안전	항균 생분해성 포장재	생분해성 포장소재, 고향균 천연소재	천연항균제의 안정화
기능성 식품	고기능성	질병발생 위험 감소, 노화억제	식품소재의 생체 내 안정화 증대	식품소재의 나노 스케일 나노 캡슐화

* 출처: 제2기 국가나노기술지도 총괄보고서(2014. 2. 미래부)

2절 커큐민 관련 나노 식품시장 분석 및 기술 경향 분석

1. 국내 및 해외 나노식품 시장 분석

1) 나노 식품시장 분석 및 기술 경향 분석

- 나노기술은 모든 기술 및 산업분야에 혁신을 가능케 하는 기반기술로 10억분의 1 m라는 범주에서 다룰 수 있는 특징으로 인해 학문·산업 간의 구분 없이 응용이 가능하다.
- 우리나라의 나노기술정책은 2001년 제1차 나노기술종합발전계획을 수립하면서 본격적으로 추진되었으며, ‘나노기술개발촉진법’ 제 4조 및 동법시행령 제2 조에 따라 교육과학기술부가 매 5년마다 기술 및 산업 환경 변화 등을 감안하여 기본계획을 수정 및 보완해 오고 있다. 이를 바탕으로 지난 12년 동안 정부는 연구개발, 인프라, 인력양성을 위하여 약 2조 9,000억원을 투자하였다. 그 결과 나노기술이 최고 수준인 미국에 비해 2001년 25% 수준에서 2010년도에는 80% 수준까지 이르렀으며 우리나라의 나노기술이 세계 선두권에 진입한 것으로 평가받고 있다.
- 세계 나노시장 규모는 2020년 약 \$ 2.5조로 전망되며, 시장분야별로는 소재 및 소자분야가 전체 시장의 약 80%를 차지하며, 식품, 바이오, 의약 분야가 약 \$1,880억으로 약 8%를 차지하게 된다고 예측하고 있다.
- 농업 및 식품산업에서 나노기술의 잠재력은 아직 완전히 발휘되지 않았으나 이론적 지식에서 적용으로 점차 옮겨가고 있는 단계로 가까운 장래에 필수불가결한 요소가 될 것으로 기대되며, 특히 농산품의 생산, 가공, 저장, 포장, 수송의 각 단계에서 다방면으로 응용되고 있고, 제초제, 농약, 지료 사용량의 감축과 효율 증대, 방출 조절 및 타겟수송(target delivery) 기술은 정밀농업을 앞당길 것으로 전망된다.
- 과일약품(주)에서는 2014년 나노에멀전 수용화 기술을 개발하여 난용성 및 불용성 식품소재를 나노 수용화하였고, 나노 수용화를 위한 전용 GMP 공장에서 상용화 하고 있다. 현재까지 나노 수용화제품은 CoQ10-NEWS, CLA-NEWS, Omega 3-NEWS, PS-NEWS, Vitamin E 등이 있다.
- 아시아계 이주민이 많은 영국의 레스터히에서 결장암 진단을 받은 환자 500명을 조사 하던 중 아시아계는 단 2명에 불과한 사실을 확인한 적이 있는데, 나중에 알고 보니

아시아계 사람들이 많이 먹는 카레, 특히 커큐민 때문이라는 사실이 밝혀지기도 했다.

- 미국 텍사스 대학교 앤더사 암센터의 아가왈(Bharat Aggarwal)교수는 “흡연자를 대상으로 임상 실험을 한 결과, 한 달 동안 강황을 1.5g씩 섭취한 사람이 섭취하지 않은 사람에 비해 돌연변이 물질이 감소되는 것을 확인할 수 있었다”며 “인도 국민의 암 발생률이 미국인에 비해 현저하게 낮은 이유가 바로 여러 향신료를 사용한 카레를 주식으로 하는 식습관 때문일 것”이라고 발표한 바 있다.
- 실제 카레의 주성분인 커큐민과 함께 커큐민을 체내에서 흡수가 잘 되도록 나노입자 형태로 변형한 ‘나노커큐민’을 유방암을 유발한 실험쥐의 유관에 주입한 결과 탁월한 유방암 예방효과를 보았다는 국내 연구 결과가 있다. 최근에 강황이 알츠하이머형 치매에 효과가 있다는 것으로 알려지면서 많은 사람들의 관심과 연구대상이 되고 있다.
- 나노기술을 이용한 새로운 개념의 골다공증 치료기술이 국내 연구진에 의해 개발됐다. 권일근 경희대 치의학전문대학원 교수팀의 해당 연구 성과를 담은 논문은 미국 화학학회(ACS)에서 발간하는 세계적 권위지인 나노 분야 국제학술지 ACS 나노의 온라인 판에 최근 게재되었다.
- 치과대학 약안면생체공학교실 권일근 교수와 허동녕 박사는 건국대학교 수의과대학교 선희 교수팀과의 연구를 통해 금나노 입자에 골다공증 치료효과가 우수한 커큐민을 결합한 골다공증 치료용 나노입자 개발에 성공했다. 골다공증은 폐경기 여성에게 뿐만 아니라, 최근에는 운동부족, 과도한 흡연 및 음주로 인해 30-40대의 연령층에서도 빈번하게 발병하고 있다. 연구팀은 동인도산의 생강과에 속하는 식물인 강황에서 추출한 커큐민이 사이클로텍스트린이라는 물질에 강하게 결합하는 사실에 착안, 파골세포의 분화를 억제하고 조골세포의 분화촉진이 우수한 금나노 입자 표면에 사이클로 텍스트린을 이용하여 커큐민을 결합시켰다. 이렇게 만들어진 나노입자는 생체 내에서 골다공증의 주요 원인인 파골세포(osteoclast)의 형성 억제뿐만 아니라 조골세포(osteoblast)의 형성을 촉진시키는 상승작용에 획기적으로 개선된 치료 효능을 나타내었다.
- 우리나라는 최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 이에 따른 건강식품에 상상을 초월하는 열풍이 불고 있다. 이에 따라 건강식품업계는 건강 식품을 통한 영양소의 섭취와 그 효능을 느끼게 하는 아이디어 상품을 출시하고 있다. 최근에는 금, 은을 코팅한 쌀이 등장하는 등 코팅하는 성분도 계속 다양해지고 있으며 이에 따른 특허 출원도 많은 편이다. 이러한 코팅 쌀은 우리나라에서만 연구하는 것이 아니고, 이웃나라 일본에서도 활발한 연구로 다양한 영양을 함께 섭취를 위한 방법이 이루어지고 있다. 이중에 하나인 강황에 함유하는 건강에 매우 유용 성분인 수용성 커큐민을 코팅한 ‘강황 곡미’가 출시되어 각광을 받고 있다. ‘강황 곡미’는 커큐민을 추출 나노입자 크기를 조절할 수 있는 나노 입자 가공기술을 도입해 생체 내 흡수율을 극대화 하고 국내최고의 경기미 9분도 쌀을 위생 세척한 청결미를 투입, 수용성 커큐민을 3분간 코팅 건조하여 만들어 씻을 필요 없이 바로 일반 쌀에 섞어 밥을 할 수 있게 하였다. 또한 강황 쌀은 강황의 고유한 맵고 쓴 맛과 독한 향을 제거시켜 섭취 하는데 거부감을 없애고 김밥이나 쌀 케익 등 색다른 밥 요리에 감초 역할도 하고 있다. 강황 쌀은 주식용, 혼식용은 청경미에 코팅하였으며, 환자식용 강황 쌀은 현미에 커큐민을 코팅하여 제품화 되어 출시되고 있다.

2) 상용화 되지 않은 나노 기술 취합 및 기업 현장 적용 가능성 분석

- 현재의 식품산업에서 나노식품은 나노 크기의 카로티노이드와 라이코펜, 반응성 있는 성분을 운반하는 나노크기의 자가 조립형 캡슐, 영양 보충제(pharmaceuticals), 식품분자의 향미와 향기를 유지하는 나노폴리머 캡슐, 마가린, 아이스크림, 버터 등 콜로이드 상에 사용되는 영양전달캡슐 등이 있을 수 있다. 최근 여성들에게 인기를 끌고 있는 것은 나노 화장품이다. 이미 나노는 현대인에게 준 생활용어로 자리잡아가고 있을 만큼 중요한 식품군이며 점점 성장시켜야 할 산업이다.
- 식품산업에서 나노기술의 사용은 주로 입자나 캡슐의 형태로 제조된 영양성분을 빛이나, 산소, 온도 등의 외부 요인으로부터 영양성분의 파괴나 손실을 줄이고, 유용성, 생리 활성, 안정성의 증대 등의 장점을 가진다.
- 현재의 식품산업에서 나노식품은 나노 크기의 카로티노이드와 라이코펜, 반응성 있는 성분을 운반하는 나노크기의 자가 조립형 캡슐, 영양 보충제(pharmaceuticals), 식품분자의 향미와 향기를 유지하는 나노폴리머 캡슐, 마가린, 아이스크림, 버터 등 콜로이드 상에 사용되는 영양전달캡슐 등이 있을 수 있다. 최근 여성들에게 인기를 끌고 있는 것은 나노 화장품이다. 이미 나노는 현대인에게 준 생활용어로 자리잡아가고 있을 만큼 중요한 식품군이며 점점 성장시켜야 할 산업이다.
- Nestle (스위스)와 unilever (네덜란드) 등은 지방 감축과 향미를 유지하면서도 지방함량이 적은 나노 emulsion 기반의 아이스크림을 개발하고 있으며, 일부 가공식품에 미네랄 함량 강화를 목적으로 이미 사용되고 있다.
- Aquznova (독일) 사는 비타민 C, E, 코엔자임 Q10, isoflavone, flavonoids, carotenoids, phyto-extract, 정유 (essential oil), 방부제, 색소, 기타 생물활성 성분을 캡슐화하기 위하여 30 nm 미셀을 사용하여 나노기술 기반의 캐리어 시스템을 개발하고 CoQ 10을 NovaSol 이란 상표로 2006년부터 판매하고 있다(그림 2-2-1). 이러한 나노 캡슐화 기술을 통하여 생리활성 성분의 생체이용률을 증가 시켰다.



그림 2-2-1. 독일 Aquznova 사의 Novasol CoQ 10.

- George weston foods(호주) ‘Tim-top up’ 이라는 빵을 판매하고 있는데 이 빵은 오메가-3 지방산이 풍부한 참치 어유의 마이크로 캡슐 (140-180 μm , Nu-Mega driphom)을 함유하고 있다. 이로 인하여 참치유의 이취를 제거하고, 기능성을 빵 같은 식품에 첨가하는 기술을 개발하고 있다(그림 2-2-2).



그림 2-2-2. George weston foods의 Nu-mega 및 Nu-mega 적용식품.

- Salvona technology (미국) ‘Multisal’이라는 다성분 전달 시스템을 개발 하였다. 이 시스템은 통상 잘 혼합되지 않는 여러 개의 활성성분 (수용성 및 지용성 성분)을 생체내로 전달하고 생체 내에서 성공적으로 흡수될 수 있도록 고안되었다(그림 2-2-3).

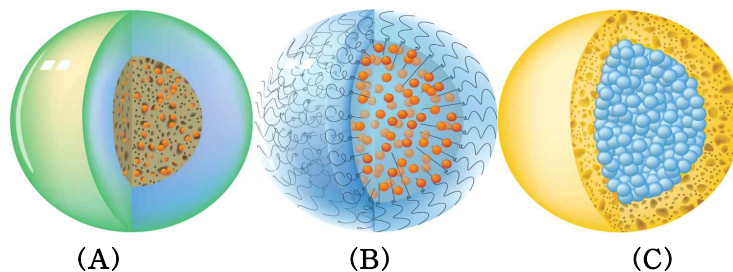


그림 2-2-3. Salvona technology사의 다성분 전달 시스템
(A) HydroSal™ (B) Salsphere™ (C) Multisal™.

- BASF (독일)은 리코펜이라 불리는 나노크기의 합성 카로티노이드를 레모네이드, 과일주스, 마가린 등에 이용하기 위하여 시도하고 있다.
- Bidelivery science international (미국) nanocochleate를 개발하여 특허를 출원하였으며, 이것을 콩과 칼슘으로부터 유도된 직경 50 nm의 코일형 나노입자로 영양분을 직접 세포내로 운반할 수 있는 기술이다. Nanocochleate를 통하여 오메가-3 지방산을 첨가하여도 맛과 풍미에 영향을 주지 않는 케익, 파스타, 쿠키 등을 제조할 수 있다(그림 2-2-4).

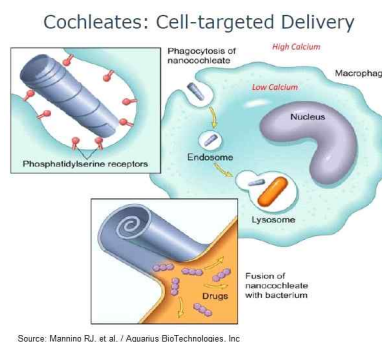


그림 2-2-4. Bidelivery science international (미국) nanocochleate.

**3) 분석된 나노식품 기술의 식품산업 현장적용 가능 우수 기술 발굴
(공장화 시스템 수정, 공장화를 위한 새로운 formulation 개발 등)**

- 해외 동향을 보면 2013년 나노제품 시장이 1조 달러 규모를 넘어섰고, 높은 성장률(성장률 연 40%)이 지속되어 2020년 3조 달러 규모 도달 전망되고, 세계적인 제조업 혁신 움직임과 맞물리면서 선진국들의 나노정책 중심도 선도 기술 확보로부터 나노기술의 산업화로 빠르게 전환중이다.
- 국내 현황을 보면 2014년 14nm 반도체 공정이 상용화 되는 등 나노기술이 적용된 부품, 제품의 시장규모가 나노산업을 별도 산업으로 볼 수 있는 수준에 도달하였으며 빠른 속도로 성장 중이다. 나노 산업은 연구개발 투자 비중이 높은 고부가가치 산업으로 우리나라는 나노기술 산업화의 기반이 되는 나노 기술력을 보유하고 있다. 나노 과학 기술 경쟁력은 세계 4위로 미국대비 76.4% 수준이다.
- 국가 산업전반의 혁신 및 신 시장 창출을 위해, 기존 기술력 향상에서 ‘나노기술 산업화’ 촉진을 위한 지원 중심으로 전환이 필요한 시점이다. 나노 기업은 신제품, 신 공장 개발을 위한 기술혁신 인프라(시설, 장비 등)지원, 정부의 투자 공백구간 리스크 분담을 희망한다. 사업화의 장애요인으로 기술적 어려움, 안전성과 성능 검증이 어렵고 정보가 부족함을 제기 하였다.

4) 식약처에서 권고된 나노식품 규정에 부합될 수 있는 제품 연구 및 적용 기술 개발

- 식품의약품안전처에서는 나노 제품 안전관리를 위한 과학적 기반 구축과 나노 물질의 안전성·독성 평가 연구를 강화하는 방향으로 연구하고 있다.
- 식품·의약품 중 나노기술 응용제품 안전성 평가기반 연구를 수행하고 있다. 나노 조영제, 항암제류의 안전성 평가 기술개발, 식품용 나노소재와 생체 내 물질의 상호작용, 나노칼슘의 90일 반복 투여 독성 시험등의 연구를 하였다.
- 나노물질의 독성 예측시험법 개발 연구를 수행하고, 나노 식·의약품의 과학적 위해평가 기반을 마련하고 있다. 식품용 나노소재의 형태별 표준측정법 확립연구와 대표 나노물질의 위해평가 선행연구를 통한 위해평가 단계별 관련 정보를 수집하고 있다.
- 식품·의약품 관련 나노물질 안전성 정보를 확보하기 위해서 나노물질 안전성연구 및 국내외 안전성 정보를 수집 및 OECD 제조나노물질시험법의 국제검증 연구에 참여하여 유럽공동연구센터(JRC) 주도 나노물질 세포독성시험 국제검증 연구를 수행 중이다.

제3장. 연구수행 내용 및 결과

제 1세부

아·초임계수 처리된 기능성 올리고 펩타이드 나노 제형 공정의 산업체 상용화 기술 개발

주관기관 : 건국대학교

총괄책임자 최미정

1절 아·초임계수 처리된 기능성 올리고 펩타이드 나노 제형 공정의 산업체 상용화 기술 개발

1. 아·초임계수를 이용한 어류 올리고 펩타이드 pilot scale에서의 제조 조건 확립

가. 어류 부산물(참치)의 전처리 과정 확립

- 어류 부산물인 참치 어피의 경우, 해체 후에도 지질 및 비늘 등이 그대로 남아있기 때문에 이를 제거하기 위한 전처리 과정이 요구된다. 이를 전처리하지 않고 사용 시에는 아·초임계 처리 시 단백질의 탄화 및 지방 산패 등으로 이취 발생 및 펩타이드 순도의 저하가 문제가 되기 때문에 반드시 제거되어야 한다.
- 어피 부산물은 국내 참치 수입 업체인 튜나 팩토리로부터 참치(눈다랑어)의 어피를 제공 받은 후, 전처리를 위하여 100°C의 열수를 이용하여 지방 및 비늘을 제거 후 약 3 cm 간격으로 세절하였다. 아·초임계 처리를 위하여 시료를 증류수와 2:1 비율로 혼합 후, 블랜더를 이용하여 22,000 rpm에서 30초간 분쇄 후 어피 콜라겐 원액을 제조하였다(그림 3-1-1).



전처리 전 어피

전처리 후 어피

그림 3-1-1. 어류 부산물(참치)의 전처리 전 후 사진.

나. 아임계수 및 효소 가수분해 공정을 이용하여 어피 올리고 펩타이드 제조

- 본 연구에서 아·초임계 처리는 최대 3×10^4 kPa-400°C 의 고압 및 고온 처리가 가능한 batch type pilot scale의 아·초임계 처리 장치를 주문 제작하였다(그림 3-1-2). 아·초임계 처리 장치는 최대 780 ml의 시료를 처리할 수 있는 실린더 타입 내열·내압 용기와 외부 히팅 장치 및 냉각 장치로 구성되어 있다. 전처리된 어피 콜라겐 원액은 밀폐 유리 용기에 포장 후, 표 3-1-1의 조건과 같이 처리 되었다. 최적 압력, 최적 온도 및 공정 시간 등의 최적 공정 확립을 위해서, 압력 트랜스 듀서와 K-type 온도 센서를 설치하여 처리 과정 중 압력 및 온도 변화 관찰이 가능하게 설계되었고 압력 및 온도 데이터는 data acquisition system (34970 A, Agilent, USA)를 통하여 스프레드시트 파일로 기록 하였다. 온도 및 압력 데이터는 추후 process intensity 및 공정 모델화를 위하여 사용되었다.

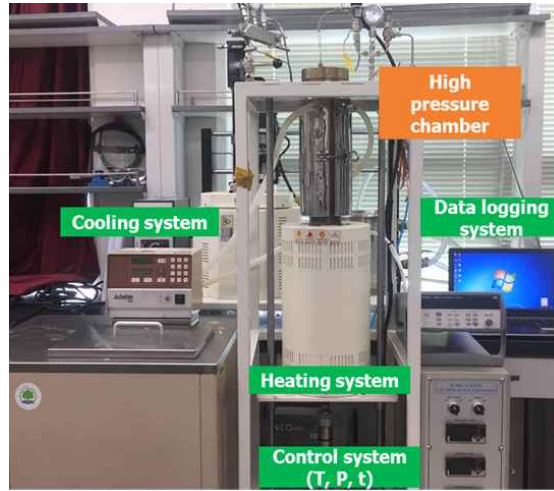


그림 3-1-2. Batch-type pilot scale 아·초임계 처리 장치.

표 3-1-1. 아임계 처리 조건

Pressure (kPa)	Temperature (°C)	Total processing time (min)	Holding time (min)
350	150	71	10
660	170	81	10
1100	190	93	10
2100	210	111	10
2600	230	126	10
3900	250	143	10

○ 아·초임계 처리 과정 중 압력 및 온도 변화 곡선이 그림 3-1-3에 제시되어 있다. 본 연구에서 아임계 조건은 물의 온도 상승 및 이에 따른 부피 증대에 의한 압력 증대로 유도되었으므로, 온도와 압력은 비례 관계로 증대된 것을 볼 수 있다. 목표 압력 및 온도에 도달한 후에는 모든 조건에서 동일하게 10 분의 공정시간을 (그래프상 평형선) 유지하였다.

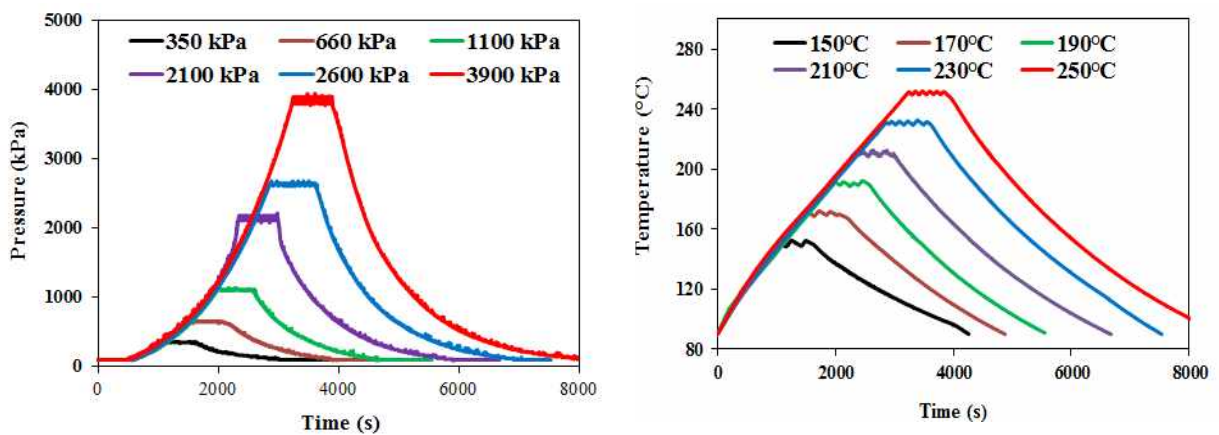


그림 3-1-3. 아·초임계 처리 공정 중 압력(왼쪽) 및 온도(오른쪽) 변화 곡선.

- 아임계 처리 과정 중 공정 최적화를 위해서, 시료가 고압 및 고온 상태에 노출된 정도를 수치화하기 위하여 시간 대 압력 및 온도 곡선을 적분기법을 활용하여 pressure dose 및 temperature dose를 계산하였다. pressure dose 및 temperature dose는 수치 해석 및 모델링 프로그램을 이용하여 그림 3-1-4와 같이 자체적으로 계산 프로그램을 코딩하였다.

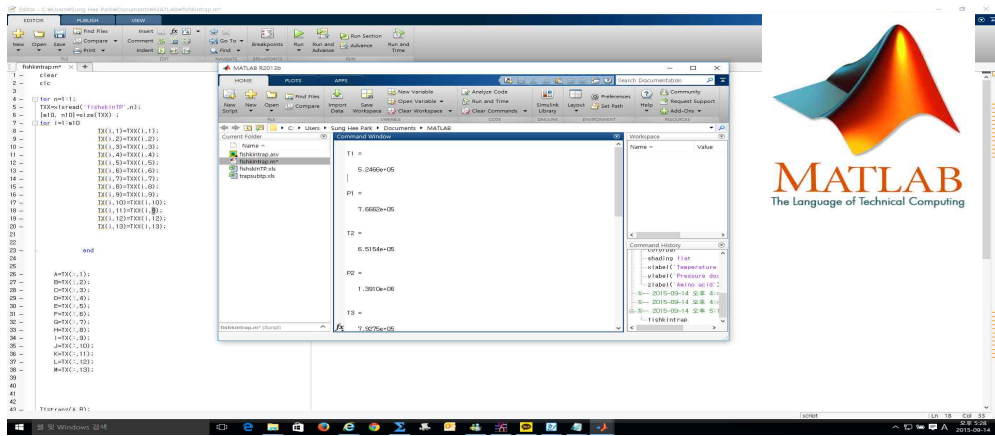


그림 3-1-4. 공정 최적화를 위한 수치해석 모델 코딩.

- 그 결과는 표 3-1-2에 제시되어 있다. 150°C & 350 kPa 처리 조건에서 pressure dose 및 temperature dose는 각각 5.25×10^5 kPa·s 및 7.67×10^5 °C·s를 나타내었다. 처리 온도 및 압력 조건을 250°C & 3900 kPa 로 증대 시에는 pressure dose 및 temperature dose는 각각 14.57×10^5 kPa·s 및 103.17×10^5 °C·s로 증가하였다. process intensity의 경우, 어피 가수분해 효율 외에도 에너지 효율 측면에서도 활용되어야 하기 때문에 추후 가수분해 효율과의 비교 분석을 통해 최적 압력 및 온도 조건을 설정하는데 활용되었다. 본 연구에서의 아임계 처리 과정 중 최적 압력 및 온도는 190°C & 1100 kPa의 조건으로 판명되었다. 최적 압력 및 온도 확립에 대한 자세한 내용은 유리 아미노산 분석에 기술되어 있다.

표 3-1-2. 아임계 처리 공정 최적화를 위한 pressure & temperature dose

Subcritical conditions	Pressure dose (kPa·s)	Temperature dose (°C·s)
350 kPa & 150°C	5.25×10^5	7.67×10^5
660 kPa & 170°C	6.52×10^5	13.91×10^5
1100 kPa & 190°C	7.93×10^5	23.68×10^5
2100 kPa & 210°C	10.11×10^5	45.49×10^5
2600 kPa & 230°C	12.32×10^5	68.99×10^5
3900 kPa & 250°C	14.57×10^5	103.17×10^5

- 공정 과정별 단백질 가수분해물의 수율은 초기 조단백 함량(18%)에서 전처리 후 밀봉 어피 콜라겐의 단백질 함량 (1.19%)로부터 얻어진 유리 아미노산 함량의 수율로 계산되었으며, 자세한 내용은 유리 아미노산 분석에 기술되어 있다.

다. 가수분해물의 정제 및 정제물의 이화학적 특성 분석

(1) 분획

○ 아임계 처리된 단백질 가수분해물은 3 kDa stirred cell을 이용하여 filtration 하였다.

(2) 유리 아미노산

○ 유리 아미노산 분석을 위하여 유리시료의 상층액(125 μ L)을 0.2125 M sodium phosphate buffer(pH 8.2) 2 mL과 0.01% 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS) 1mL에 넣은 후 50°C에서 30분 간 가열하였다. 실온에 방냉하여 온도를 낮춘 후 0.1 M sodium sulfite 1mL과 반응시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 유리 아미노산 함량의 기준은 L-leucine을 이용하였다.

○ 그림 3-1-5는 아·초임계 처리후의 유리 아미노산 함량의 변화를 나타내고 있다. 콜라겐 등의 고분자량의 단백질이 가수 분해되면 유리 아미노산의 함량은 유의적으로 증대되는 것으로, 초기 control 아미노산 함량 3687 ppm으로부터 유의적으로 증가하여 250°C-3900 kPa 처리 시, 최대 6286 ppm까지 증대되는 것으로 나타났다. 190°C-1100 kPa 처리 시에는 5130 ppm의 아미노산 함량을 나타내었다. 일반적 기능성 올리고 펩타이드 제품 제조 시에는 적정 아미노산 함량은 5000 ppm으로, 본 연구에서는 190°C-1100 kPa 처리가 어 피 콜라겐의 가수 분해에 최적 조건으로 간주 될 수 있다. 또한 지나치게 높은 압력과 온도를 사용 시에는 에너지 효율 측면에서 바람직하지 않다는 점에서, 190°C-1100 kPa 처리가 최적 조건으로 고려될 수 있다고 예상된다. 초기 콜라겐 원액의 조단백 함량 (1.19%)로부터 간접적으로 계산된, 유리 아미노산의 ppm 농도에 의한 수율은 150°C-350 kPa: 31%, 170°C-660 kPa: 34%, 190°C-1100 kPa: 43%, 210°C-2100 kPa: 46%, 230°C-2600 kPa: 51%, 250°C-3900 kPa: 52%로 나타났다. 아임계 처리 시, 처리 온도와 압력이 증가할수록 유리 아미노산의 수율은 증대하였지만, 경제성과 탄화 현상 등에 의한 부작용을 고려하여 190°C-1100 kPa가 최적 조건으로 사료된다.

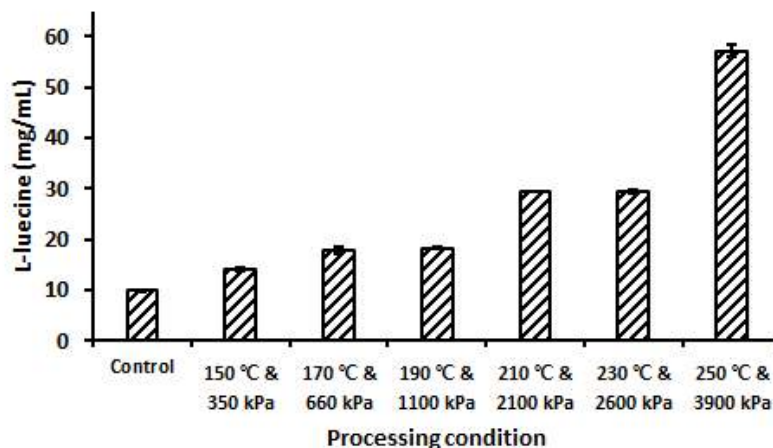


그림 3-1-5. 아임계 처리 공정 후 유리 아미노산 함량 변화.

○ 아임계 처리 공정 중 에너지 효율 최적화를 위하여, 유리 아미노산 함량 변화를 Pressure (P) 및 temperature (T) dose를 통해 2nd order polynomial regression으로 3차원 그래프화 하였으며 그 결과는 그림 3-1-6에 제시되어 있다. 3차원 그래프를 통하여

분석한 결과, 유리 아미노산은 압력과 온도가 동시에 증가하는 아임계 조건에서 synergistic 효과에 의해 효율적으로 함량이 증대된 것으로 나타나, 본 연구에서 사용된 아임계 조건이 단백질 가수 분해에 효율적임을 입증하였다.

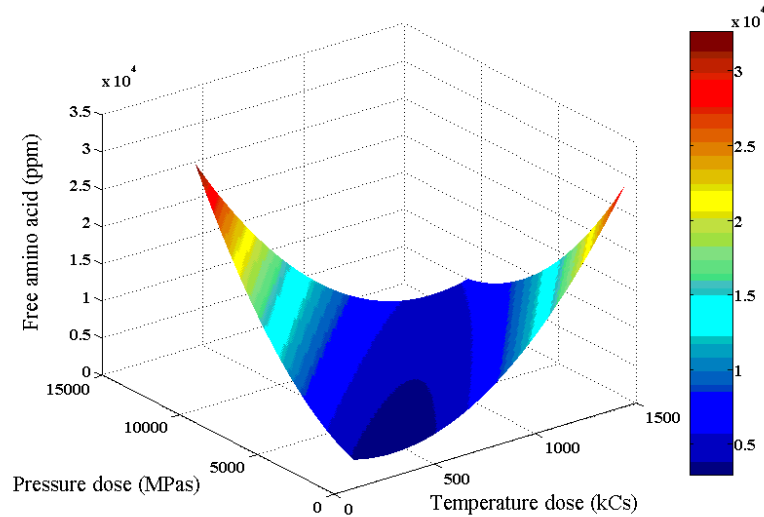


그림 3-1-6. 아임계 처리 공정 중 pressure & temperature dose에 의한 유리 아미노산 함량의 변화.

(3) 단백질 함량

- 단백질 함량은 bovine serum albumin 시약을 이용하여 540 nm의 흡광도에서 뷰렛 반응을 이용하여 측정하였다.
- 아·초임계 처리가 어피 콜라겐의 단백질 함량 변화에 미치는 영향이 그림 3-1-7에 제시되어 있다. 초기 control 어피 원액은 23.9%의 BCA 함량을 나타내었다. 150°C-350 kPa 및 170°C-660 kPa 조건은 BCA 함량이 control 보다 증대된 것으로 나타났다. 이는 온도 증가에 의한 어피 콜라겐의 응집 (aggregation) 효과에 의한 것으로 추정되며, 이후 압력 및 온도가 증가 유의적으로 감소하여 250°C-3900 kPa 조건에서는 6.6%까지 BCA 함량이 감소한 것으로 분석되었다. 이는 아초임계 처리가 어피 콜라겐의 단백질을 가수분해하여 저분자화 하는데 우수한 효율을 보인 것으로 분석된다.

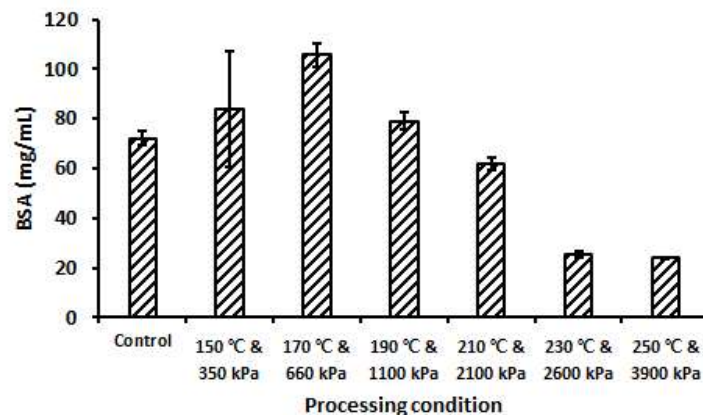


그림 3-1-7. 아임계 처리 공정 후 단백질 함량 변화.

(4) 단백질 겔 전기영동

- 전기영동은 12% 또는 20% acrylamide gel (EzWayTMPAG, KOMA Biotech Inc., Seoul, Korea)을 이용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)방법으로 시행하였다. 어피 가수분해물은 10% glycerol, 2% SDS, 0.003% bromophenol blue, 5% β -mercaptoethanol과 63 mM Tris (pH 6.85)을 함유한 KTG020 sample buffer (KOMA Biotech Inc., Seoul, Korea)와 각각 50 μ L씩 혼합하였다. 샘플은 95°C에서 5분간 반응 후 20 μ L씩 gel의 각 칸에 로딩하였다. 펩타이드의 분리는 140 V의 일정 전압 하(\sim 1 h)에서 시행되었다.
- 단백질 겔 전기영동 결과는 그림 3-1-8에 제시되어 있다. standard는 control의 경우 저분자부터 고분자 영역까지 명확한 band를 보여주고 있다. 아·초임계 처리 시 처리 압력 및 온도가 증가함에 따라 band는 점차로 고분자 영역의 band는 점차로 희미해지는 특성을 보였으며, 190°C-2100 kPa 이상에서는 어떠한 band 도 확인할 수 없었다.

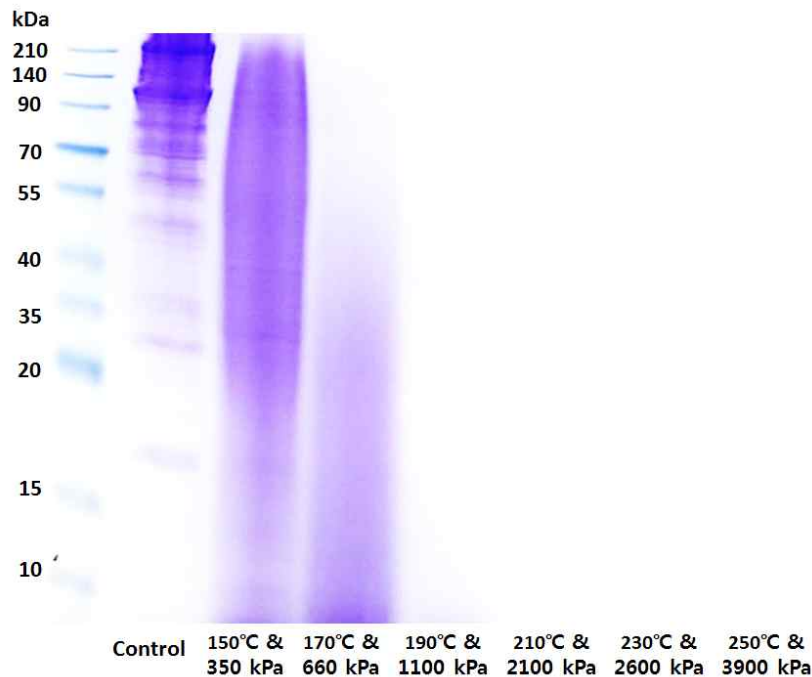


그림 3-1-8. 아·초임계 처리 공정 후 SDS-PAGE 패턴 변화.

(5) pH

처리 조건이 pH의 변화에 미치는 영향이 그림 3-1-9에 제시되어 있다. 초기 control 어피 콜라겐 원액의 pH는 7.40을 나타내었으며, 210°C-2100 kPa 까지는 특이적 변화 추세를 관찰할 수 없었다. 230°C-2600 kPa 처리 조건부터는 유의적으로 증대하여, 250°C-3900 kPa 처리 시에는 최대 8.1까지 증대하였다. pH의 급격한 증가는 콜라겐 단백질 변성 및 탄화 현상에 기인하는 것으로 아·초임계 처리시 과도한 온도의 증가는 바람직하지 않다는 것을 입증한다.

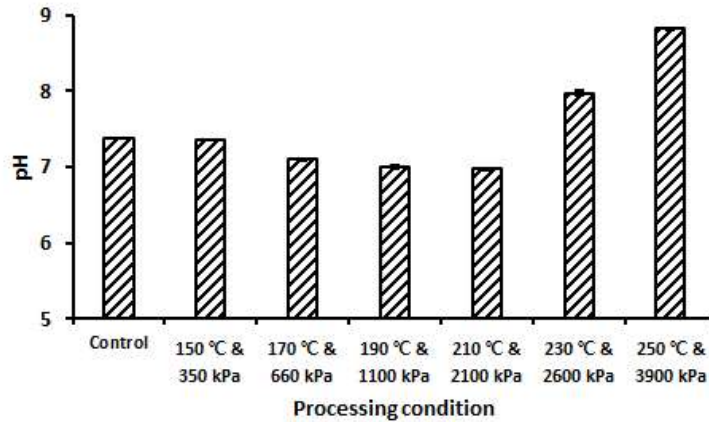


그림 3-1-9. 아·초임계 처리 공정 후 pH 변화.

(6) 색도

- 색도는 chroma meter (CR-400, Minolta, Japan)을 사용하여 standard plate 로 calibration 한 후, L* (lightness), a* (redness) 및 b* (yellowness)를 측정하였다.
- 처리 조건이 색도의 변화에 미치는 영향은 그림 3-1-10에 제시되어 있다. control 어피 원액의 경우, 35.50의 L* value를 나타내었으며 170°C-660 kPa 조건부터 유의적으로 감소하였다. 이는 콜라겐 원액이 가수분해를 통하여 저분자화 함으로써 빛의 투과율이 높아져 L* value가 증대된 것으로 분석된다. a* value의 경우, 아임계 처리 조건에 따른 특이적인 추세 변화를 볼 수 없었다. b* value의 경우, 190°C-1100 kPa 조건부터 급격히 증대되었다. 이는 콜라겐의 가수 분해와 함께 탄화 현상이 나타나는 시점으로 분석될 수 있다. 따라서, 190°C-1100 kPa 이상으로 아임계 조건을 설정하는 것은 탄화 현상 측면에서 바람직하지 않은 것으로 사료된다.

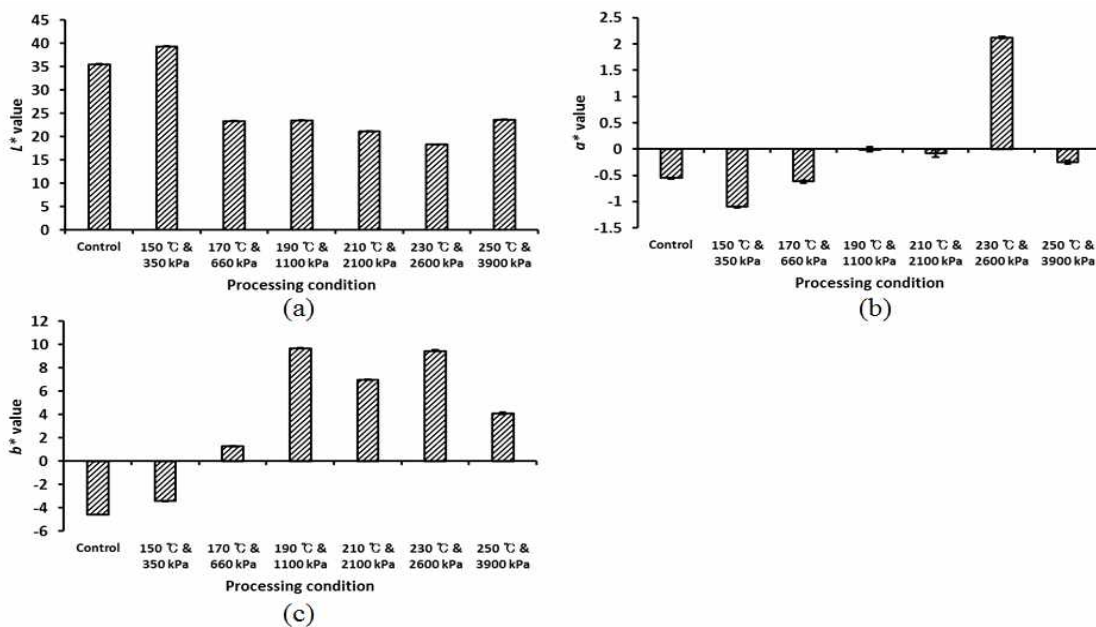


그림 3-1-10. 아·초임계 처리 공정 후 색도 변화.
(a)L* value, (b)a* value, (c)b* value.

(7) 외관

○ 디지털 카메라를 이용하여 이미지화 한 아임계 처리 후의 외관이 그림 3-1-11에 제시되어 있다. control 어피 원액부터 170°C-660 kPa 조건까지는 전반적으로 백색의 탁한 부유물 형태를 나타내고 있으나, 190°C-1100 kPa 조건부터 색도가 전반적으로 맑고 투명한 형태를 보여 주었다. 아임계 조건이 210°C-2100 kPa 이상으로 증대되면서 부터는 색도가 갈색의 형태를 띄면서 탄화 현상이 증대되는 경향을 보여주었다. 따라서, 본 연구의 실험 조건에는 아임계 처리시 온도 및 압력을 과도하게 높이는 것은 바람직하지 않으며 190°C-1100 kPa 조건이 최적점으로 사료된다.

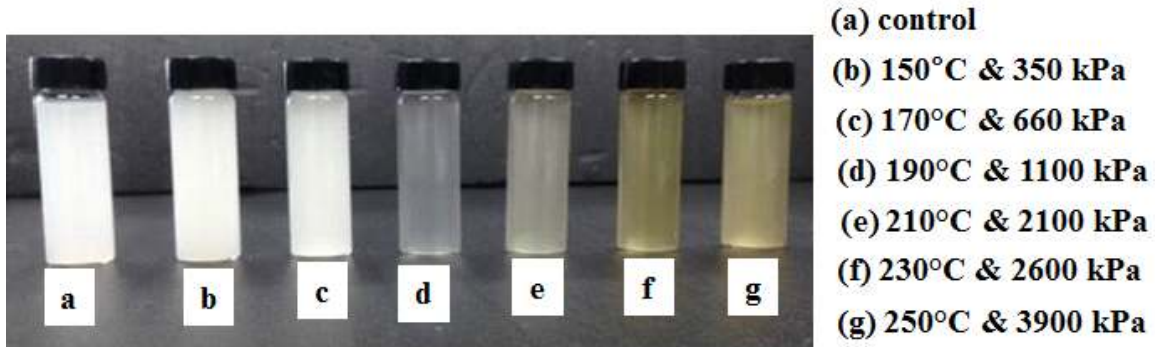


그림 3-1-11. 아·초임계 처리 공정 후 외관 변화.

라. 어피 원액 농도에 따른 가수 분해 효율의 비교

○ 그림 3-1-12에는 초기 어피 원액 농도를 7%에서 66%까지 변화 시 분획 후의 유리 아미노산 함량의 변화가 제시되어 있다. 본 연구에서는 아임계 처리 후 3 kDa stirred cell을 이용하여 분획하였기 때문에 초기 원액 농도에 의한 아미노산 함량 변화는 어피 원액 농도에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그러나, 전체 공정 수율 측면에서는 초기 어피 농도가 높을수록 공정 cycle를 줄일 수 있기 때문에 공정 효율을 증대될 것으로 사료된다.

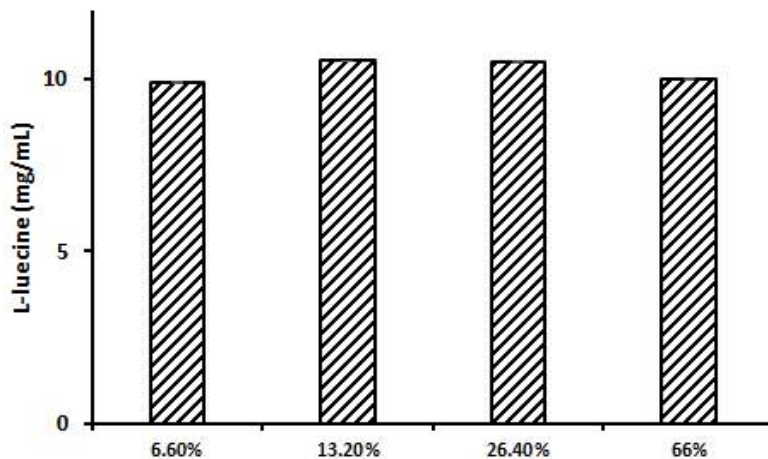


그림 3-1-12. 아·초임계 처리 공정 시 초기 어피 농도에 따른 유리 아미노산 함량 변화.

마. 연속식 아·초임계 처리 장치

- 그림 3-1-13에는 연속식 아·초임계 처리 장치가 제시되어 있다. 연속식 장치는 시료 주입 및 아초임계 처리 후 시료의 배출을 in-let valve, out-let valve 및 feeding pump를 이용하여 연속적으로 처리할 수 있도록 제작되었고,



그림 3-1-13. 연속식 아·초임계 처리 장치.

2. Pilot scale의 올리고 펩타이드 나노리포솜 최적 제조 공정 확립

가. 최적화된 Lab scale 공정을 pilot scale로 확대하기 위한 검증 테스트

(1) Pure materials 및 Blank 리포솜 제조 및 특성 분석

- 시판하는 2%의 fish collagen (FC, Naticol 4000, Mw 4000, Neo cremar) 및 2% lecithin (Lipoid, Germany)을 각각 10,000 rpm, 1 min 조건의 초고속 균질법(IKA T25, Germany) 및 12,000 Psi, 1 cycle 균질 조건의 Microfluidization (Picomax, Micronox, Korea)으로 균질하였다. 그리고 4% FC과 4% lecithin을 혼합 후 동일 조건으로 균질하여 2% FC liposome을 제조하였다. pure 물질 및 FC리포솜은 동적광산란을 원리로 작동하는 Zeta-sizer (Nano-ZS90, Malvern® Instrument Ltd., UK)를 이용하여 pure 물질의 입자크기(nm) 및 전하(mV), 입자분산도(polydispersity index, PdI)를 측정하였다. 이 때 모든 분석을 3회 반복을 시행하였다.
- 균질 없는 pure FC는 1 μ m 이상의 크기를 나타냈으며, 초고속 균질시 50%이상 감소하는 결과를 보였다. microfluidization 공정을 한 경우 약 700 nm크기를 나타내어, 초고속 균질보다 200 nm정도 크게 측정되었다. pure lecithin을 이용하여 두 가지 균질공정을 통해 약 700 nm의 blank 리포솜을 약 150 nm으로 감소시키는 효과를 얻었다. 입자전하 측정 결과 pure FC, blank 리포솜, FC 리포솜은 각각 -2.5 mV, -35 mV, -13 mV의 나타냈다. 입자분산도의 경우, 모든 처리구에서 균질 전 0.6 이상, 균질 후 0.4 이하를 나타내었다(그림 3-1-14).

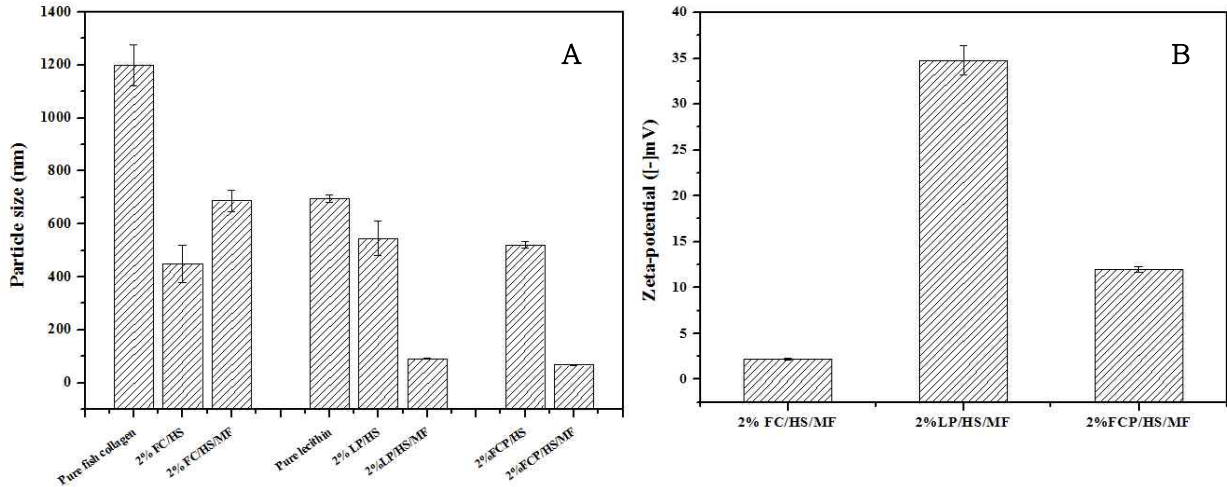


그림 3-1-14 균질방법에 따른 pure 물질 및 FC리포솜의 입자크기(A) 및 입자전하(B)(HS: high speed homogenization, MF: microfluidization, FCP: fish collagen liposome, LP: liposome (blank)).

- 2% FC리포솜의 경우 초고속 균질은 약 560 nm, microfluidization은 약 150 nm을 나타내어, high-energy emulsification 통해 리포솜의 크기가 100~200 nm 수준으로 제조됨을 재확인하였다.

(2) 2% lecithin 과 다양한 농도의 FC를 이용한 FC 리포솜 제조

- 2%로 lecithin 농도가 용해성이 우수하며, 작은 입자크기의 리포솜 제조가 가능하다는 선행연구 결과를 바탕으로 다양한 농도의 FC를 혼합하여 FC리포솜의 제조하였다. 이 때 사용한 다양한 균질조건은 5,000/7,500/10,000/15,000 Psi 와 1 cycle이며, 다양한 농도의 FC 중 최적의 농도를 찾고, 또한 pilot scale의 제조 시 에너지 절감을 위한 균질조건을 확립하기 위하여 진행하였다.
- 초고속 균질기(IKA T25, Germany)과 Microfluidizer(Picomax, Micronox, Korea)를 이용하여 각각 균질하였으며, 다양한 조건으로 처리된 FC리포솜은 동적광산란을 원리로 작동하는 Zeta-sizer (Nano-ZS90, Malvern Instrument Ltd., UK)를 이용하여 pure 물질의 입자크기(nm) 및 전하(mV), 입자분산도(polydispersity index, PdI)를 측정하였다. 이 때 모든 분석은 3회 반복 시행하였다.

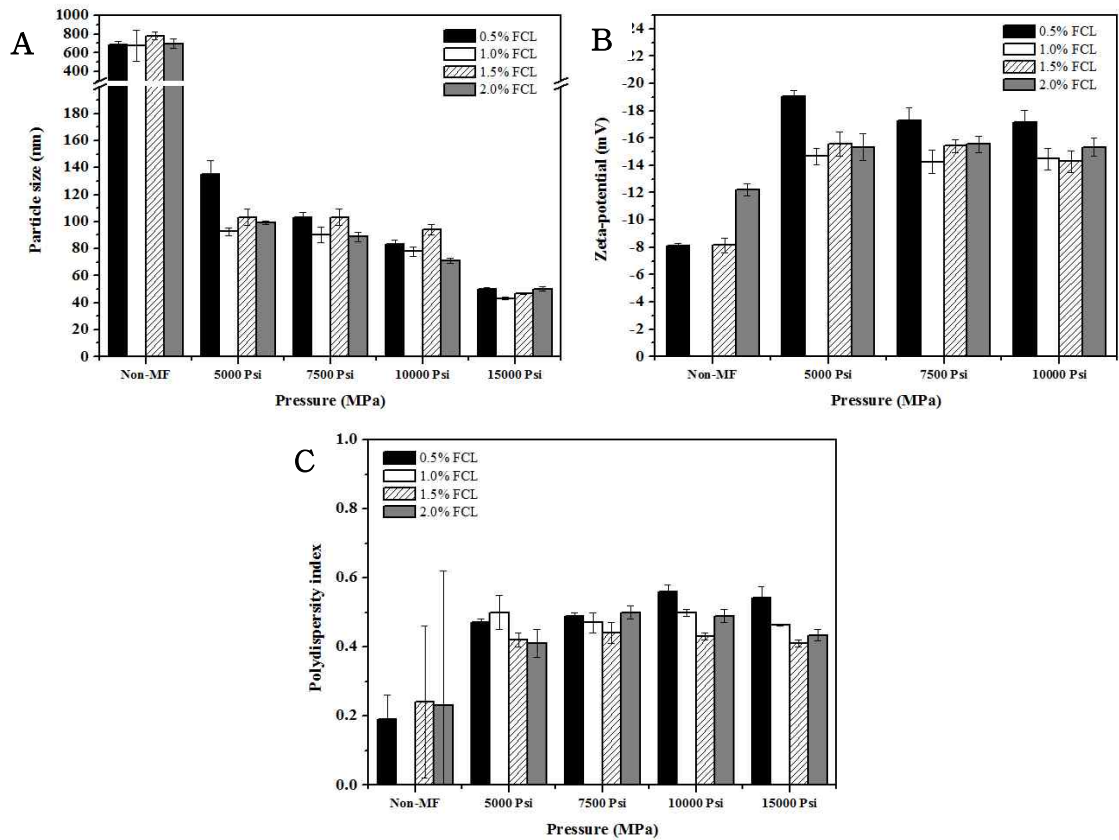


그림 3-1-15. 균질조건에 따른 다양한 농도의 FC 리포솜의 입자크기(A) 및 전하(B), 입자분산도(C).

- 다양한 농도의 FC리포솜의 입자크기는 5000 Psi, 1 cycle의 균질 조건으로 약 100 nm 수준의 FC리포솜의 제조가 가능함을 확인하였으며, 이때 입자전하와 입자분산도는 각각 -15 mV, 0.5 수준으로 균질조건에 따른 눈에 띄는 차이가 나타나지 않았다. 다만 0.5% FC의 경우 다른 농도의 FC리포솜에 비해 사이즈가 크고, 입자전하가 높고, 입자 분산도도 높게 측정되었다. 상용화를 위한 FC리포솜은 100 nm 이하 입자크기는 불필요하다 판단하며, microfluidization을 이용한 pilot scale FC리포솜 제조시 5,000 Psi 압력도 충분하다고 사료된다. 다만, microfluidization 공정은 최종적으로 생산효율에 영향을 미치는 것으로 판단되기 때문에 초고속 균질법을 통하여 pilot scale의 FC리포솜을 제조하기로 결정하였다(그림 3-1-15).
- 입자크기 측정 후 100 nm 수준의 FC liposome을 선택하여 FC의 포집효율을 측정하였다. 이때 이용한 방법은 Sephadex gel separation과 BCA protein assay법을 선택하였다. Sephadex gel separation은 PD MiniTrap™ G-25 (sephadex G-25 medium, GE Healthcare, UK)을 사용하여 GE사의 표준 프로토콜에 따라 실행하였다. Sephadex gel separation통해 free FC를 제거하고, 리포솜에 포집된 FC는 0.1%의 Trion X-100을 이용하여 수거하였다. 수거된 포집된 FC%는 Sigma Aldrich에서 제공하는 BCA protein assay 표준법에 따라 실행하였다.

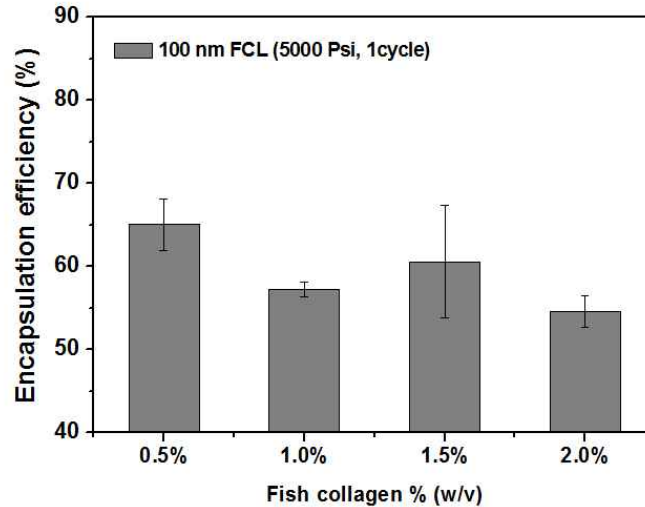


그림 3-1-16. 100 nm 수준의 FC리포좀의 FC포집효율.

○ 5000 Psi, 1 cycle의 균질 조건으로 제조된 약 100 nm 수준의 FC리포좀의 FC 포집효율을 측정된 결과 전체 샘플이 55% 이상의 포집효율을 나타냈다. 수용성 물질의 포집효율은 일반적으로 높지 않은 것을 감안했을 때 상당히 높은 효율인 것으로 사료된다(그림 3-1-16).

(3) 2% FC와 2% lecithin을 이용한 pilot scale의 1% FC 리포좀 제조

○ 2%로 lecithin 농도가 용해성이 우수하며, 작은 입자크기의 리포좀 제조가 가능하다는 선행연구 결과를 바탕으로 2%FC를 혼합하여 FC리포좀의 제조하였다. 이 때 사용한 다양한 균질조건은 20,000 rpm의 속도로 5/10/15/20/25/30 분의 균질조건으로 2 L의 FC리포좀을 제조하고, pilot scale의 제조 시 에너지 절감을 위한 균질조건을 확립하기 위하여 진행하였다. Pilot scale로 제조 시 총 공정시간은 약 7시간이며, 레시틴 및 FC를 용해시간을 제외한 균질시간은 최대 30분으로 설정하였다.

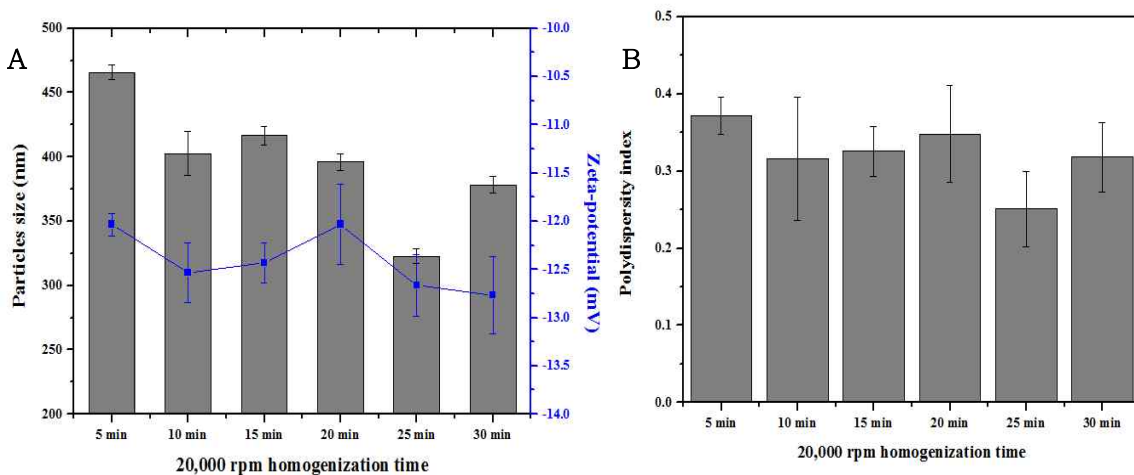


그림 3-1-17. 초고속 균질조건에 따른 Pilot scale의 FC리포좀의 입자크기(A) 및 입자 분산도(B).

- Pilot scale로 제조된 FC리포솜의 입자크기는 350-450 nm이며, 균질시간이 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 상기의 공정으로 충분히 본 연구과제에서 제시한 목표 입자크기인 약 500±50 nm로 제조가 가능함을 확인하였다. 이 때 입자전하는 약 -12 mV, 입자 분산도는 0.2-0.4로 측정되었다. Microfluidization 균질법으로 제조한 FC리포솜 보다 입자크기는 크나, 입자 분산도 낮아 monodisperse상태로 판단된다.

(4) 생산비용을 고려한 저가 lecithin 및 Tween20, low-energy emulsification을 이용한 FC리포솜 제조

- 상기의 연구를 통해, pilot scale의 FC리포솜 제조시 초고속 균질기(IKA T25, Germany)를 이용하여 충분히 목표 크기의 입자제조가 가능함을 확인하였다. 다만, 제조 공정시간이 오래 걸리는 것을 보완하기 위해 대형균질기(max. 40 L)를 도입하고, 대량생산 시 최종 생산비용을 고려한 저가 soybean lecithin (Deoiled Lecithin: Metarin™ P, Cargill)을 선택하였다. 대형균질기는 저가 soybean lecithin의 균질 조건을 설정한 후 이용하기로 결정하였고, magnetic stirrer를 이용한 low-energy emulsification의 효과를 알아보기 위해 다양한 농도의 Tween 20을 혼합하여 최적의 농도를 확인하였다.
- 저가 레시틴 이용한 FC리포솜은 magnetic stirrer를 이용하여 500 rpm, 12 h 균질 조건으로 약 900 nm의 입자크기와 0.4-0.6 수준의 입자분산도를 나타냈다. 다만, 장기 저장시 분리되는 것을 보완하기 위해 균질의 효율을 높이고, 입자의 크기 및 분산도를 향상시키기 위해 2% lecithin과 0.05, 0.1, 0.5, 1.0%(w/w)의 Tween 20 유화제를 혼합 및 low-energy emulsification 후 10일 동안 냉장저장하며 분리되는 정도와 입자크기 및 입자전하, 입자분산도를 측정하였다.

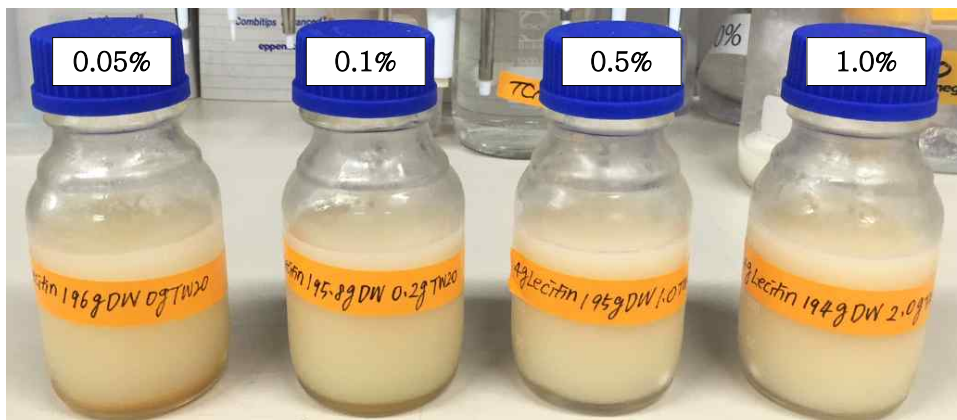


그림 3-1-18. 다양한 농도(w/w%)의 Tween 20이 첨가된 blank 리포솜.

- 그림 3-1-18에서 보듯이 0.5%(w/w)와 1.0%(w/w)의 Tween 20이 첨가된 경우 free 레시틴과 blank 리포솜이 분리 되지 않는 것을 확인 할 수 있다. 입자크기 및 전하, 입자 분산도는 표 3-1-3 과 같다. 10일 저장기간 후에도 분리되는 현상을 나타나지 않았으며, 입자사이즈와 입자전하가 다소 감소하는 경향을 보였다.

표 3-1-3. 0.5와 1.0(w/w%)의 Tween 20이 첨가된 2% blank liposome

	Particle size (nm)	Zeta-potential (-mV)	Polydispersity index
0.5% Tween 0 day	626.06±16.31	62.23±1.07	0.20±0.05
0.5% Tween 10 day	575.86±17.02	59.88±5.12	0.14±0.08
1.0% Tween 0 day	657.96±16.50	61.70±0.51	0.15±0.03
1.0% Tween 10 day	542.36±16.69	59.30±0.52	0.13±0.01

나. 대형 균질기를 통한 pilot scale의 FC리포솜 제조

(1) 대형균질기를 이용한 1 L의 다양한 농도 blank 리포솜 제조

- 대형균질기(WSB70ST,, Waring, China)를 이용하여 pilot scale의 10 L 1% blank 리포솜을 제조하기 위해 우선 1 L 량의 2, 4, 6, 8, 10%(w/v) 레시틴(Deoiled Lecithin: Metarin™ P, Cargill)은 상온에서 magnetic stirrer를 이용하여 500 rpm으로 완전히 용해 될 때 까지 균질하고, 5, 10, 15%(w/v) 레시틴은 60℃에서 700 rpm의 속도로 균질하여 blank 리포솜을 제조하였다(표 3-1-4). 본 실험에서는 완전히 용해되는 최대 농도를 찾는 것이 목적이었으며, 1 L의 고농도 레시틴 용액의 제조(stock solution)는 대용량 균질시 공정시간 및 에너지를 절약하기 위함이었다.

표 3-1-4. 다양한 농도의 blank 리포솜 제조 조건

Lecithin (w/v%)	Water (L)	Lecithine (g)	rpm	Melting temp.(℃)	Melting Time (min)
2	1	20	500	22-25	30
4		40			30
6		60			60
8		80			30
10		100			60
5		50			700
10	100	60			
15	150	30			

- 다양한 농도로 제조된 blank 리포솜은 동적광산란을 원리로 작동하는 Zeta-sizer (Nano-ZS90, Malvern® Instrument Ltd., UK)를 이용하여 입자크기(nm) 및 전하(mV), 입자분산도(polydispersity index, PDI)를 측정하였다. 이 때 각 조건에서 용해된 최고 농도 샘플만 측정하였으며, 모든 샘플은 100배 희석하였으며 분석은 3회 반복 시행하였다.
- 표 3-1-4에서 보듯이, 다양한 농도로 제조된 blank 리포솜은 모든 샘플이 최대 1시간 안에 모두 완전히 용해되었으며, 상온에서 최고 10%(w/v)레시틴, 60℃처리에서는 최고 15%(w/v)레시틴이 모두 용해되었다. 표 3-1-5는 각 조건에서 용해된 최고 농도의 blank 리포솜의 입자특성결과이다. 입자크기는 500-600 nm 사이며, 입자분산도는 0.2-0.3로 단분산상으로 관찰되었다. 다만, 입자전하의 경우 열을 가하여 용해시킨 경우(-26 mV) 상온에서 제조된 리포솜(-82 mV) 보다 유의적으로 낮게 측정되었다.

표 3-1-5. Blank 리포솜의 입자크기 및 입자전하, 입자분산도

Lecithin (w/v%) (Melting temp.)	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	PdI
10 (22-25°C)	595.90 ± 19.89	-82.20 ± 4.08	0.3 ± 0.01
15 (60°C)	526.90 ± 6.66	-26.40 ± 4.26	0.2 ± 0.03

(2) 대형균질기를 이용한 pilot scale 10 L의 1% blank 리포솜 제조

- 10 L의 blank 리포솜을 제조하기 위해 앞선 테스트에서 결정된 최적 용해조건을 이용하여 1 L의 10%(w/v)의 고농도 레시틴 용액의 제조(stock solution)하였다. 최종적으로 10 L의 1%(w/v)의 blank 리포솜을 대형균질기(WSB70ST, Waring, China)로 제조하였다. 균질기 최대 rpm은 18000 이며, 속도는 총 9 단계로 조절가능하다. 이때 균질속도는 speed 4 (8000 rpm)와 speed 8 (16,000)로 임의로 설정하여 최적 균질속도를 찾고자 하였다.
- 1% blank 리포솜은 균질 시간 2, 4, 8, 10 분마다 채취하여 Zeta-sizer (Nano-ZS90, Malvern Instrument Ltd., UK)를 이용하여 입자크기(nm) 및 전하(mV), 입자분산도 (polydispersity index, PdI)를 측정하고, 모든 샘플은 100배 희석하였으며, 분석은 3회 반복 시행하였다.
- 최종적으로 대형균질기(WSB70ST, Waring, China)로 speed 4와 speed 8로 균질 된 10 L의 1%(w/v)의 blank 리포솜은 표 3-1-6과 같은 입자특성을 나타냈다. 균질시간이 증가 할수록 입자의 크기가 감소하는 경향을 보이고, 입자전하는 균질속도가 빠를수록 다소 높은 것으로 측정되었다. 다만, 균질 속도에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다. 본 실험을 통해 선정된 최적 균질 속도는 공정효율을 고려하여 speed 4로 결정하였다.

표 3-1-6. Pilot scale 1% blank 리포솜의 입자크기 및 입자전하, 입자분산도

Emulsification time (min)	Particle size (nm)	Zeta-potential (mV)	Polydispersity index
Speed 4			
1	453.20± 8.25	-45.00±0.57	0.20±0.03
2	405.90±12.78	-44.90±0.25	0.20±0.03
4	393.80± 7.01	-41.30±0.72	0.20±0.02
10	342.60± 4.86	-37.70±2.19	0.20±0.02
Speed 8			
1	422.80±9.55	-38.00±0.67	0.20±0.05
2	397.30±4.07	-45.40±2.25	0.20±0.02
4	360.20±8.39	-67.30±1.07	0.20±0.05
10	328.40±4.75	-47.90±4.21	0.20±0.03

(3) 대형균질기를 이용한 pilot scale 10 L의 1%, 2%, 3% blank 리포솜 제조

- 앞서 제시한 lab scale 리포솜 제조시 최적 농도조건으로 2% blank 및 FC리포솜으로 선정하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 pilot scale로 10 L의 1, 2, 3%의 blank 리포솜을 제조하였고, 리포솜 제조과정은 1% blank 리포솜 제조공정과 동일하다. 1 L의 10, 20, 30% (w/v)의 고농도 레시틴 용액의 제조(stock solution) 후 대형균질기를 이용하여 앞선 실험에서 선정된 최적 균질 속도 speed 4로 10 L의 1, 2, 3%의 blank 리포솜을 제조하였다.
- 1, 2, 3%의 blank 리포솜은 균질 시간 2, 4, 8, 10 분마다 채취하여 Zeta-sizer (Nano-ZS90, Malvern Instrument Ltd., UK)를 이용하여 입자크기(nm) 및 전하(mV), 입자분산도(polydispersity index, PDI)를 측정하고, 모든 샘플은 100배 희석하였으며, 분석은 3회 반복 시행하였다.
- 표 3-1-7에서 보듯이, 농도가 높을수록 또한 균질 시간이 길수록 입자 사이즈가 다소 감소되는 경향을 보였다. 다만, 2%와 3%의 차이는 거의 없는 것으로 관찰되었다. 전체적으로 목표 입자크기인 500 nm보다 작은 입자크기이며, 입자전하는 ±30 mV이상으로 안정된 값을 나타냈다. 그리고 입자 분산도는 0.2 이하로 단분산상을 나타내는 것으로 측정되었다.

표 3-1-7. 다양한 농도의 pilot scale blank 리포솜의 입자크기 및 입자전하, 입자분산도

Emulsification time (min)	Particle size (nm)	Zeta-potential (mV)	Polydispersity index
1% blank liposome			
1	422.80±9.55	-38.00±0.67	0.20±0.05
2	397.30±4.07	-45.40±2.25	0.20±0.02
4	360.20±8.39	-67.30±1.07	0.20±0.05
10	328.40±4.75	-47.90±4.21	0.20±0.03
2% blank liposome			
1	292.80±3.65	-40.90±1.13	0.10±0.03
2	296.10±2.72	-0.20±0.19	0.10±0.01
4	290.50±5.80	-40.60±0.10	0.10±0.04
10	287.90±3.93	-49.80±0.40	0.10±0.02
3% blank liposome			
1	295.40±1.11	-56.10±0.72	0.22±0.01
2	286.10±4.21	-0.10±0.08	0.23±0.01
4	276.40±2.26	-46.6±3.23	0.22±0.01
10	261.90±2.66	-55.80±1.36	0.18±0.02

(4) 대형균질기를 이용한 pilot scale 10 L의 1%, 2% FC 리포솜 제조

- 앞서 수행한 최적화된 Lab scale 공정을 pilot scale로 확대하기 위한 검증 테스트에서 lab scale 리포솜 제조시 2% blank 및 FC리포솜으로 선정하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 pilot scale로 10 L의 1, 2, 3%의 blank 리포솜을 제조하였고, 최종적으로 2%의 농도가 lab scale로 제조된 2% 리포솜과 유사한 것으로 판단되었다. 2% 레시틴과 1% FC를 이용하여 pilot scale의 FC리포솜 제조하였다.
- 제조 공정은 다음과 같다. 1 L의 증류수에 10%의 FC를 용해시킨 후 20%의 레시틴을 뒤 이어 용해시킨다. 완전히 용해 후 10배 희석하여 최종 농도가 각각 1% FC, 2% 레시

턴이 되게 한 후 최적 균질속도인 speed 4로 균질하여 FC리포솜을 제조한다. 리포솜은 균질 시간 2, 4, 8, 10 분마다 채취하여 Zeta-sizer (Nano-ZS90, Malvern® Instrument Ltd., UK)를 이용하여 입자크기(nm) 및 전하(mV), 입자분산도(polydispersity index, PdI)를 측정하고, 모든 샘플은 100배 희석하였으며, 분석은 3회 반복 시행하였다.

- Pilot scale FC리포솜의 입자크기 및 입자전하, 입자분산도는 표 3-1-8과 같다. 입자크기는 앞선 실험과 마찬가지로 균질시간이 길어질수록 작아지는 경향을 나타냈다. 또한 입자의 분산도 값도 균질시간에 따라 감소하는 결과를 나타냈다. 입자 전하의 경우는 처리구 간의 큰 차이가 없는 것으로 측정되었다.

표 3-1-8. Pilot scale FC리포솜의 입자크기 및 입자전하, 입자분산도

Emulsification time (min)	Particle size (nm)	Zeta-potential (mV)	Polydispersity index
1	315.40±7.63	-33.70±0.10	0.40±0.01
2	286.00±8.86	-35.40±1.70	0.30±0.03
4	264.30±4.30	-33.80±1.10	0.30±0.02
10	224.40±1.60	-32.90±0.60	0.20±0.01

3. Pilot scale에 의한 올리고 펩타이드 리포솜 안정성 분석

가. 키토산 및 펙틴을 이용한 2중층 FC리포솜 제조

(1) 2중층 FC리포솜 제조

- Chun 등(2013)과 Jo 등(2015)에 따르면, non-layer 리포솜은 외부 환경에 의해 쉽게 파괴되어 저장안정성이 좋지 않으며, 다중층 리포솜인 경우 외부환경 및 저장기간에 따라 안정적으로 유지하는 것으로 관찰되었다.
- 또한 펩타이드의 조성, 전하, 구조 등에 따라 지질과의 상호작용이 다양하게 나타난다는 보고(Galdiero 등, 2013)와 리포솜에 포집시 리간드에 의해 리포솜의 외곽에 침착된다는 연구보고가 있다(Katja Petkau-Milroy & Luc Brunsveld, 2013). 그러므로 본 연구에서는 강한 양전하와 음전하를 띠는 키토산과 펙틴을 이용하여 FC리포솜에 다중층을 형성하고자 하였다(그림 3-1-19).

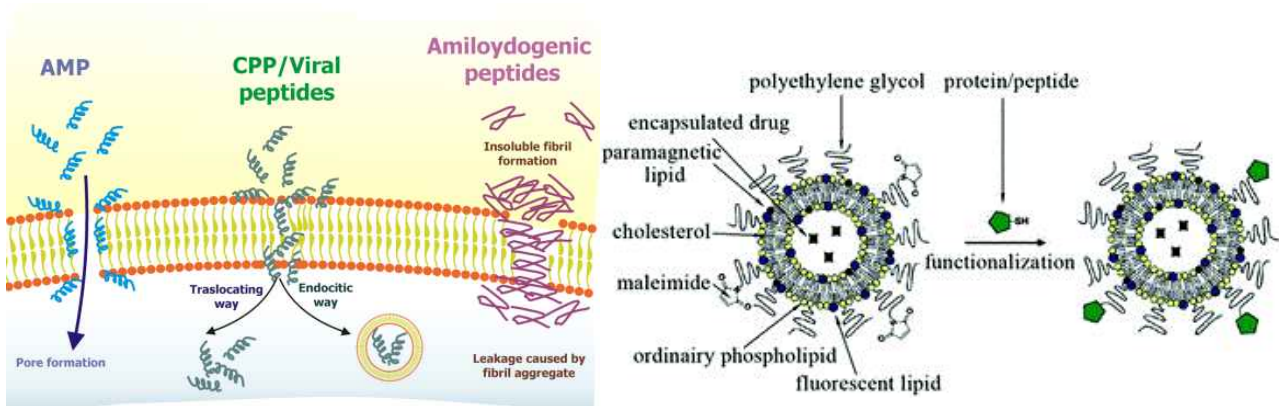


그림 3-1-19. 리포솜 포집과 펩타이드.

(2) 키토산-FC리포솜 제조

- FC리포솜의 안정성을 향상시키기 위해 양전하를 띠는 키토산을 이용하여 FC리포솜에 정전기적 침착성 원리를 이용하여 레이어를 형성하고자 하였다. 재료는 다음과 같다.
 1. Sodium Acetate JUNSEI 98.50% 1kg (Japan)
 2. Acetic Acid SAMCHUN 99.50% (PyeongTaek, Korea)
 3. Sodium Phosphate Dibasic SIGMA 99.00% (Japan)
 4. Potassium Phosphate Monobasic SAMCHUN 99.00% (PyeongTaek, Korea)
 5. Chitosan from crab shells deacetylated SAMCHUN 85% (PyeongTaek, Korea)
 6. Fish Skin Powder (Naticol 400) (Seoul, Korea)
 7. Lecithine (Deoiled Lecithin: Metarin™ P, Cargill)
- Acetate buffer 용액제조: 키토산 용해를 위한 acetic acid 5M 0.85 g과 sodium acetate 5M 0.60 g을 500 mL 증류수에 녹여 pH 3의 acetate buffer 용액을 제조하였다.

표 3-1-9. FC 리포솜 코팅을 위한 다양한 농도의 키토산

Ingredients	Chitosan (%)											
	Control	0.0001	0.0005	0.001	0.10	0.03	0.05	0.50	1	2	4	5
2%												
FC리포솜 (mL)	20				20	20	20	20	20	20	20	20
Acetate buffer (mL)	20	1)	2)	3)	20	20	20	20	20	20	20	20
Chitosan (g)	0				0.02	0.005	0.01	0.1	0.2	0.4	0.8	1

1) 1/100 dilution of 0.01 solution 2) 1/100 dilution of 0.05% solution 3) 1/100 dilution of 0.1% solution

- FC리포솜을 완전히 코팅하기 위한 최소의 키토산 농도를 찾기 위해 2%의 FC리포솜 용액에 다양한 농도 0.0001-5 %(w/v)의 키토산 용액을 1:1(v:v)비율로 혼합한다(표 3-1-9). 다양한 농도의 키토산으로 코팅된 2중층 FC리포솜은 Zeta-sizer (Nano-ZS90, Malvern Instrument Ltd., UK)를 이용하여 입자크기(nm) 및 전하(mV), 입자분산도 (polydispersity index, PdI)를 측정하고, 모든 샘플은 100배 희석하였으며, 100배 희석할 때에는 어피+레시틴, 버퍼 용액을 각각 18 mL씩 넣은 뒤 희석할 용액 4 mL를 넣고, 10 배 희석할 때에는 어피+레시틴, 버퍼 용액을 각각 9 mL 씩 넣은 뒤 희석할 용액을 22 mL 넣는다. 분석은 3회 반복 시행하였다.

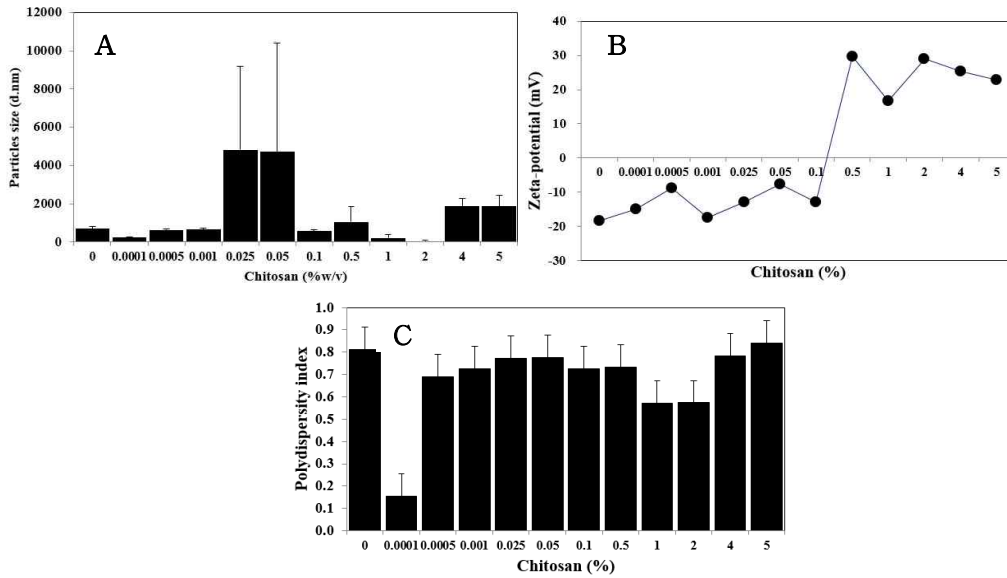


그림 3-1-20. 키토산 농도에 따른 2%의 FC리포솜의 입자크기(A) 및 입자전하(B), 입자분산도(C).

○ 그림 3-1-20에서 보듯이, 0.025%와 0.05%의 키토산으로 코팅된 FC리포솜의 입자 크기는 4 μm 이상으로 측정되었으며, 키토산들 끼리 응집이 되는 현상을 관찰되었다. 나머지 키토산 농도에서는 4%와 5%를 제외하고 1 μm 이하의 입자크기로 측정되었다. 정전기적 침착성 원리를 이용한 다중층 제조법에서는 연속적으로 코팅층을 형성하기 위해서 입자의 전하는 코팅 마다 반대의 전하로 변화시켜줘야 한다. 입자전하 결과를 보면, 0.1% 초과 키토산 농도부터 양전하(약 +30 mV)를 나타내며, 음전하의 FC리포솜을 양전하의 2중층 FC리포솜으로 변화시켰다. 입자분산도 결과를 보면 0.0001% 키토산 처리구를 제외하고 모두 0.6 이상의 값을 나타내면 다분산상으로 관찰되었다. 이는 코팅에 사용되지 않은 free 키토산, FC리포솜, 2중층 FC리포솜들이 공존하고 있는 것으로 판단된다. 전체적인 입자의 특성분석 결과분석을 통한 최적 혹은 최소의 키토산 농도는 0.5%로 판단되나, 입자의 크기가 1 μm 에 가까우며, 입자분산도가 높은 것으로 보아, 보완이 필요하다.

(3) 펙틴-FC리포솜 제조

- 펙틴을 용해시키기 위해 sodium phosphate dibasic 5 M 0.35 g과 potassium phosphate monobasic 5 M 0.734 g을 500 mL 증류수에 녹여 pH 7 phosphate buffer를 만든다.
- FC리포솜을 완전히 코팅하기 위한 최소의 펙틴의 농도를 찾기 위해 2%의 FC리포솜 용액에 다양한 농도 0.0001-5 %(w/v)의 펙틴 용액을 1:1(v:v)비율로 혼합한다. 다양한 농도의 펙틴으로 코팅된 2중층 FC리포솜은 Zeta-sizer (Nano-ZS90, Malvern Instrument Ltd., UK)를 이용하여 입자크기(nm) 및 전하(mV), 입자분산도(polydispersity index, PdI)를 측정하고, 모든 샘플은 100배 희석하였으며, 100배 희석할 때에는 어피+레시틴, 버퍼 용액을 각각 18 mL씩 넣은 뒤 희석할 용액 4 mL를 넣고, 10배 희석할 때에는 어피+레시틴, 버퍼 용액을 각각 9 mL 씩 넣은 뒤 희석할 용액을 22 mL 넣는다. 분석은 3회 반복 시행하였다.

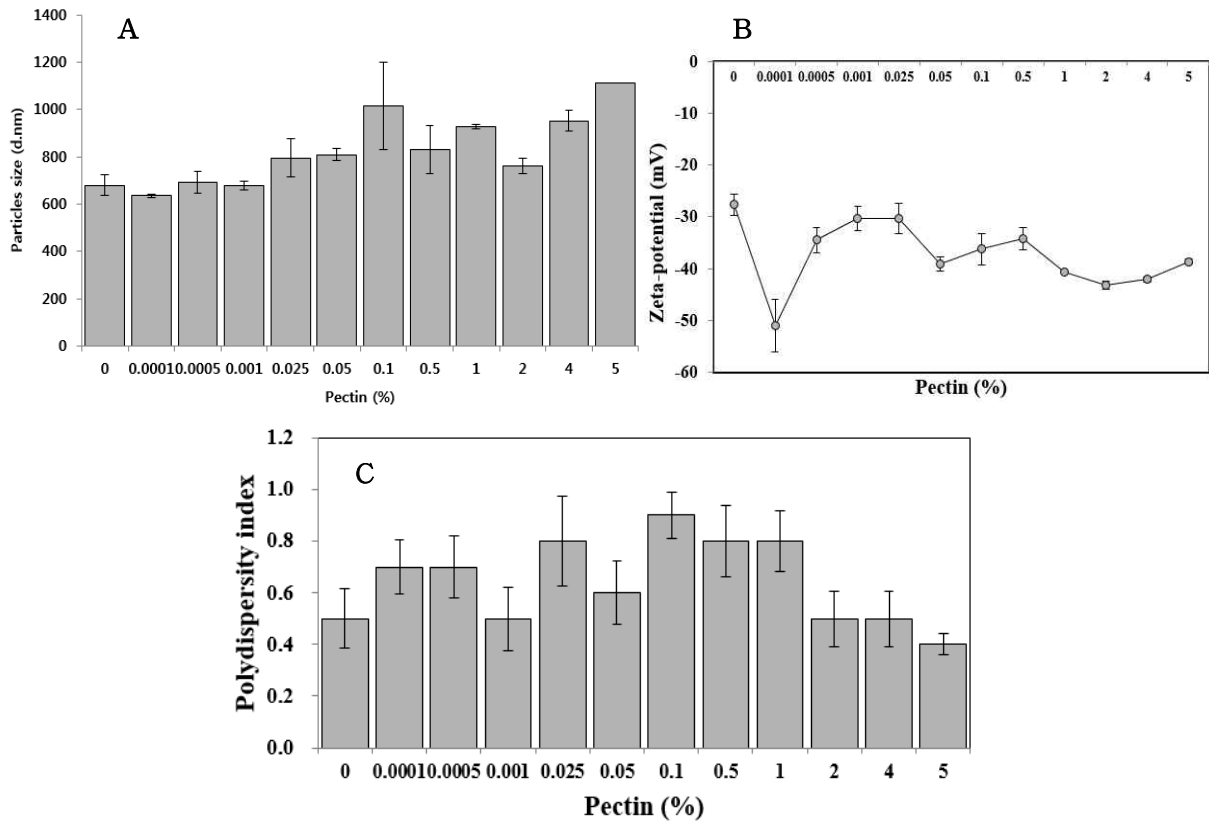


그림 3-1-21. 펙틴 농도에 따른 2%의 FC리포솜의 입자크기(A) 및 입자전하(B), 입자분산도(C).

- 그림 3-1-21에서 보듯이, 0.025%와 0.05%의 펙틴으로 코팅된 FC리포솜의 입자 크기는 650 nm - 1.1 μm 으로 측정되었으며, 키토산으로 코팅한 경우보다 입자크기가 작으며, 펙틴 농도에 따른 차이가 크지 않은 것으로 관찰되었다. 농도가 증가함에 따라 다소 증가하는 경향을 보였다. 입자전하에 대한 결과는 키토산 코팅과는 다른 관점으로 설명할 수 있다.
- 정전기적 침착성 원리를 이용한 키토산 코팅층을 형성과는 다르게 음전하를 띠는 FC리포솜 최외곽에 음전하의 펙틴을 침착시키고자 하였다. 이때 상대적인 전하의 차이를 이용하고자 하였다. 다만, 다른 연구와는 다르게 ligand 혹은 linker를 달아주거나 하진 않았지만, 앞서 설명한 바와 같이 리포솜 표면에 위치한 펩타이드와 펙틴의 결합을 예상해 보았다.

4. Scale up (10 L) 어피 펩타이드 리포솜 제조 공정 최적화

- 1차년에서 제조한 pilot scale(10L)의 리포솜은 어피 펩타이드가 첨가되지 않은 blank liposome으로 그 크기가 200 nm에서 300 nm의 크기 분포도를 나타내었다. 당해 년차에서는 어피 펩타이드를 직접 리포솜에 넣고 plant scale의 리포솜을 제작하고자 한다.
- 또한 본 세부과제 참여기업이 에텐식품의 유자즙 생산 공정 기준에 준하여 첨가되는 어피 펩타이드의 양을 계산하여 필요한 plant scale의 양을 선정하여 어피 펩타이드 리포솜 제조 공정 과정 최적화를 하고자 한다.

가. 어피 펩타이드 농도별 리포솜 제조

- 물 10 L에 어피 펩타이드를 농도별(6, 12, 24% w/v)로 첨가하여 용해한 뒤 레시틴 1%(w/v, 10 g)을 첨가하여 30분 동안 교반하여 완전히 용해시킨다. 이 후 High speed homogenizer를 사용하여 8,000 RPM에서 3분간 균질화를 진행하고, Ultra sonificator를 사용하여 30% 전력으로 3분간 2차 균질화를 진행하였다.
- 펩타이드 농도가 증가할수록 입자의 크기는 증가하였다. 특히 24%에서는 2 mm의 크기를 나타내었고, 12%에서 약 1000 nm의 크기를 나타내었다. 이는 기본적으로 pilot 단위에서 제조 시 약 300 nm의 크기에 비해 3배 정도 증가한 결과이다. Pdl 값은 0.2-0.4의 단분상 분포도를 나타내어 균일한 입자크기임을 알 수 있다(그림 3-1-22).
- 하지만 2012년 식약처에서 공표한 나노식품관리방안 가이드라인에서 제시한 submicron 입자의 크기 범주에 들어감으로 적합한 크기로 사료된다.
- 제타 전위 값은 펩타이드 첨가량이 증가함에 따라 절대 값이 증가하는 경향을 나타내었으나 전체적인 값의 양으로 보서는 유의적인 의미가 없는 수치이다.

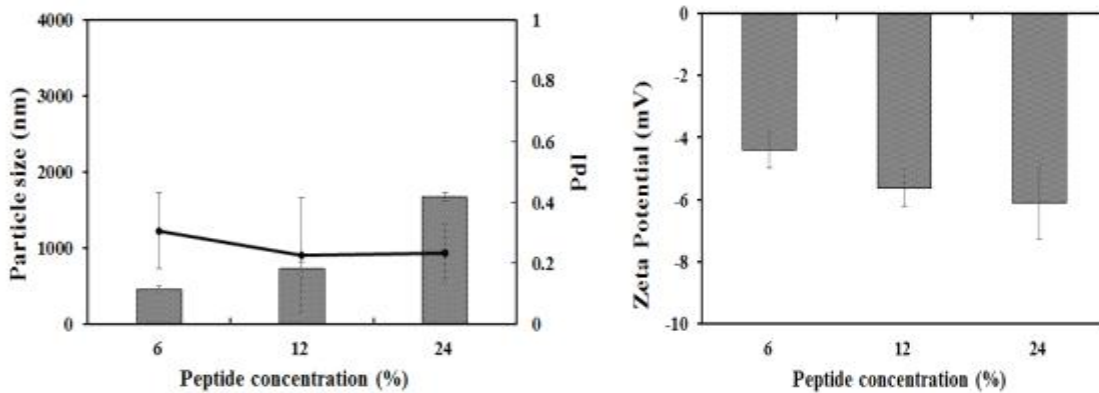


그림 3-1-22. 대량생산 시 어피 펩타이드 농도가 입자크기 및 제타전위에 미치는 영향. High speed homogenizer : 8000 rpm, 3 min, Ultra sonificator : 30% power, 3 min.

- 식약처에서 2012년에 공표한 나노식품관리방안 가이드라인에서 제시한 내용인 submicron입자의 크기 범주에 들어가도 특징이 바뀌어 효과를 보인다면 이는 나노식품 범주로 넣는다는 조항에 따라 적합한 크기로 사료된다.
- 제타 전위 값은 펩타이드 첨가량이 증가함에 따라 절대 값이 증가하는 경향을 나타내었으나 전체적인 값의 양으로 보서는 유의적인 의미가 없는 수치이다.
- 현미경 상에서 관찰된 입자들의 형상은 고른 크기를 보였고 일부 입자들이 aggregation 되어 다소 크게 나타나는 입자들도 관찰되었다. 펩타이드 농도간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(그림 3-1-23).

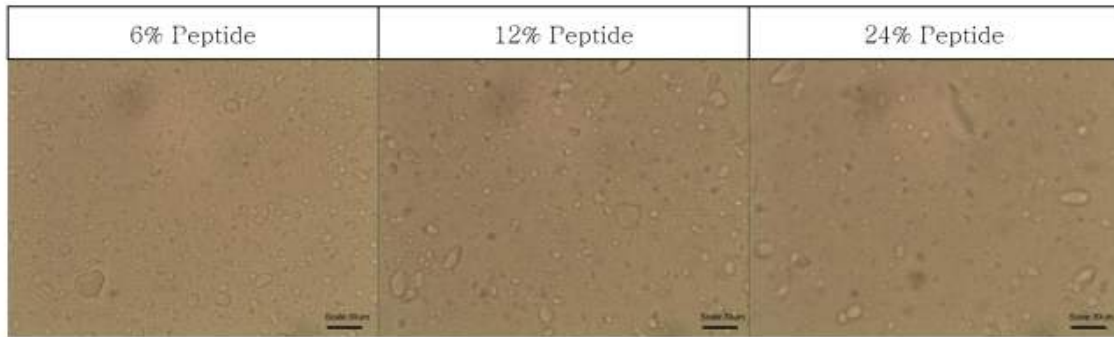


그림 3-1-23. 대량생산 된 어피 펩타이드 농도에 따른 현미경 관찰 (x400).
High speed homogenizer : 8000 rpm, 3 min, Ultra sonificator : 30% power, 3 min.

나. 균질 속도에 따른 어피 펩타이드 리포솜 제조

- 앞서 실행한 조건에서 12%의 농도를 최적 조건으로 삼아 고정한 후 대량생산 시 균질 속도에 따른 입자크기 변화를 관찰하였다. 물 10 L에 어피 펩타이드를 12%(w/v)로 첨가하여 용해한 뒤 레시틴 1%(w/v)을 첨가하여 30분 동안 교반하여 완전히 용해시킨다. 이후 High speed homogenizer를 사용하여 속도에 따라 (4,000, 8,000, 12,000 RPM)에서 3분간 균질화를 진행하고, Ultra sonificator를 사용하여 30% 전력으로 3분간 2차 균질화를 진행하였다.
- 초고속 균질기의 속도를 조절하여 입자크기를 관찰한 결과 속도에 따른 입자 변화는 나타나지 않았고, 그에 따른 전위차도 변화가 없었다. Peptide 농도가 증가할수록 제타 전위값은 다소 증가하는 경향을 나타낸 것에 반해, 펩타이드 농도가 일정한 상태에서 균질기의 속도를 높여 주었을 때 입자의 크기 변화도 일어나지 않아 제타 전위 값이 일정하게 유지되는 것으로 사료된다. 이는 랩 단위에서도 균질기가 어느 속도 이상이 되면 아무리 속도를 증가시켜도 입자크기가 작아지는 데는 영향을 미치지 못한다는 연구내용과 일치하는 바이다(그림 3-1-24).

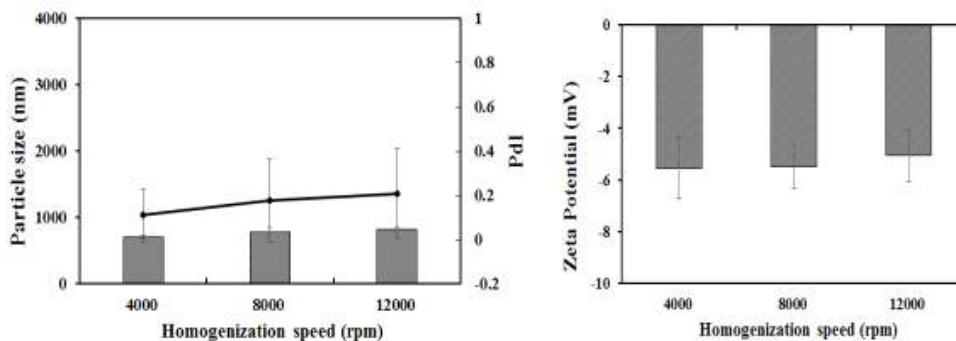


그림 3-1-24. 대량생산 시 균질기의 속도가 입자크기 및 제타전위에 미치는 영향.
Peptide 농도 : 12%, Ultra sonificator : 30% power, 3 min.

- 현미경 상에서 관찰된 입자들의 형상은 고른 크기를 보였고 균질기 속도 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(그림 3-1-25).

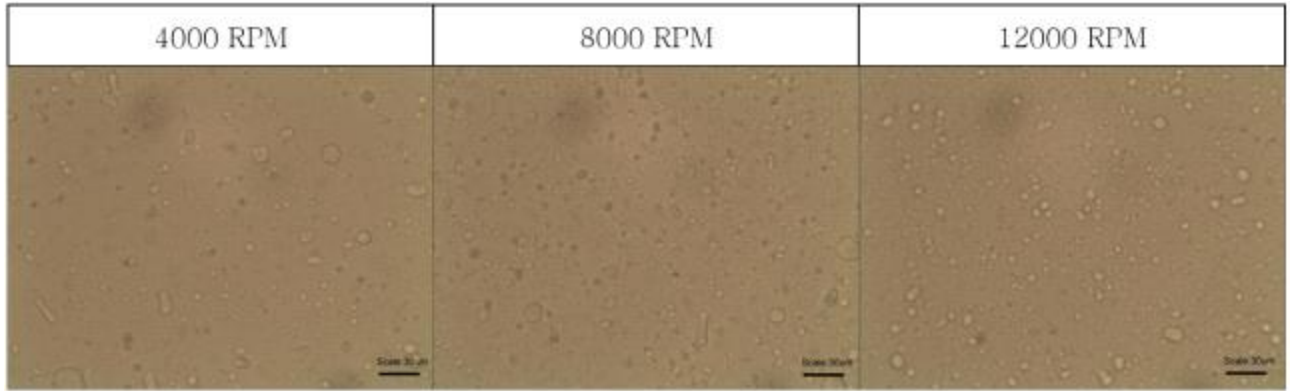


그림 3-1-25. 대량생산 시 균질기의 속도에 따른 현미경 관찰 (x400).
Peptide 농도 : 12%, Ultra sonicator : 30% power, 3 min.

다. 초음파와 균질기 전력에 따른 어피 펩타이드 리포솜 제조

- 균질기의 속도는 에너지 효율 면에서 8000 rpm을 최적 조건으로 잡아 초음파와 균질기의 전력을 조절하여 다음의 조건을 잡아 주었다. 물 10 L에 어피 펩타이드를 12%(w/v)로 첨가하여 용해한 뒤 레시틴 1%(w/v)을 첨가하여 30분 동안 교반하여 완전히 용해시킨다. 이 후 High speed homogenizer를 사용하여 8,000 RPM에서 3분간 균질화를 진행하고, Ultra sonicator를 사용하여 전력량(20%, 30%, 40%)에 따라서 3분간 2차 균질화를 진행하였다.
- 2차 균질기에 해당하는 sonification 처리는 전체적으로 입자의 크기를 1 mm로 균일하고 1차 균질 후 보다 작게 제조 되었다. 하지만 power에 따른 크기 변화는 나타나지 않았고, 제타전위 값도 동일하게 나타났다. 그러나 1 mm의 크기로 입자의 크기를 고정하기 위해서는 1차 균질과 함께 대량생산에서도 2차 균질이 필요함을 확인할 수 있었다(그림 3-1-26).

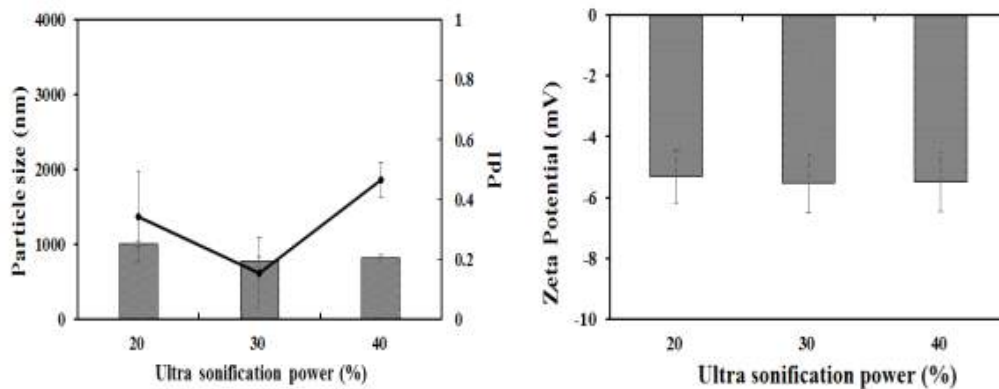


그림 3-1-26. 대량생산 시 2차 균질기(ultrasonification) power가 입자크기 및 제타전위에 미치는 영향. Peptide 농도 : 12%, High speed homogenizer : 8000 rpm, 3 min.

- 현미경 상에서 관찰된 입자들의 형상은 고른 크기를 보였고 균질기 power 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(그림 3-1-27).

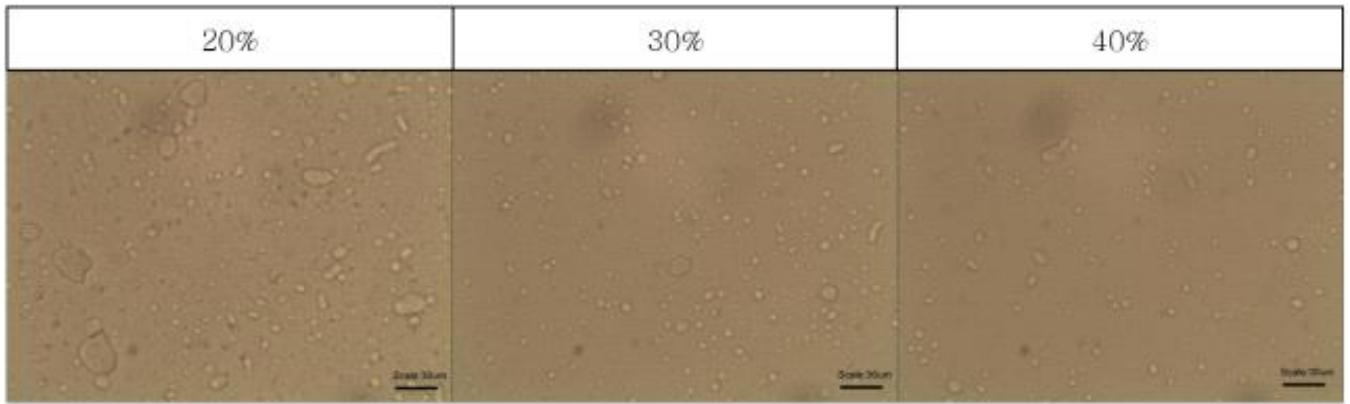


그림 3-1-27. 대량생산 시 ultrasonicator power에 따른 현미경 관찰 (x400).
Peptide 농도 : 12%, High speed homogenizer : 8000 rpm, 3 min

5. 제조용량에 따른 blank 및 펩타이드 리포솜의 최적 제조 공정

- 제조 용량에 따른 blank 및 펩타이드 리포솜의 제조 용량에 따른 최적 제조 조건을 다음 표 3-1-10에 기재하였다.

표 3-1-10. blank 리포솜 및 펩타이드 리포솜의 제조 및 저장 조건.

	Treatment	Condition	Treatment time
Primary homogenization condition	High speed homogenizer	4,000 rpm,	3 min
		8,000 rpm,	
		12,000 rpm	
Secondary homogenization condition	Ultra sonification	40 W,	3 min
		60 W,	
		80 W	
Peptide concentration	Concentration	3%,	
		6%,	
		12%,	
		24%	
Storage condition	Refrigeration	4°C	4 weeks

- Blank 및 펩타이드 리포솜의 균질 조건, 펩타이드 농도, 제조용량에 따른 입자크기, pdI, 제타전위의 이원 배치 분산 분석결과를 다음 표 3-1-20에 나타내었다.
- 1, 2차 균질에서는 제조 용량이 입자크기와 제타 전위에 유의적으로 가장 큰 영향을 미쳤으며($p < 0.001$), pdI는 2차 균질 조건에서 제조용량을 제외하고는 어떤 요인도 유의적으로 영향을 미치지 않았다($p > 0.05$). 펩타이드 농도에 따라서 리포솜을 제조하였을 때는 입자크기 및 제타 전위에 펩타이드 농도가 가장 크게 유의적으로 영향을 주었으며 ($p < 0.001$), pdI에는 유의적으로 영향을 미친 요인이 존재하지 않았다($p > 0.05$).

표 3-1-11. Blank 및 펩타이드 리포솜의 균질 조건, 펩타이드 농도, 제조용량에 따른 입자크기, pDI, 제타전위의 F-value.

		Particle size	PdI	Zeta potential
Primary homogenization condition	Homogenizer speed	359.83***	1.77	4.18*
	Manufacture scale	392.93***	0.29	33.73***
	Homogenizer speed +Manufacture scale	11.28***	0.99	2.96*
Secondary homogenization condition	Ultrasonification power	10.93***	2.29	18.18***
	Manufacture scale	3255.50***	35.62***	57.02***
	Ultrasonification power +Manufacture scale	5.44**	0.81	12.53***
Peptide concentration	Peptide concentration	673.82***	0.62	53.71***
	Manufacture scale	555.56***	0.72	1.97
	Peptide concentration +Manufacture Scale	148.47***	0.69	0.56

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

- 1차 균질 조건 및 제조용량에 따라 입자 크기 및 제타 전위를 측정된 결과를 그림 3-1-28에 나타내었다. 전반적인 입자크기는 300 nm에서 450 nm 사이에서 리포솜이 형성되었으며, 균질 속도가 증가할수록 입자크기가 유의적으로 감소하였으며, 제조용량이 증가할수록 입자크기가 증가하는 결과가 나타났다. PdI값은 균질 속도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 제타전위 측정결과 100 mL 단위로 제조하였을 때 균질속도가 증가함에 따라서 유의적으로 제타전위의 절대 값이 증가하였으나 8,000 rpm, 12,000 rpm에서는 균질속도에 따른 유의적 차이는 보이지 않았다.

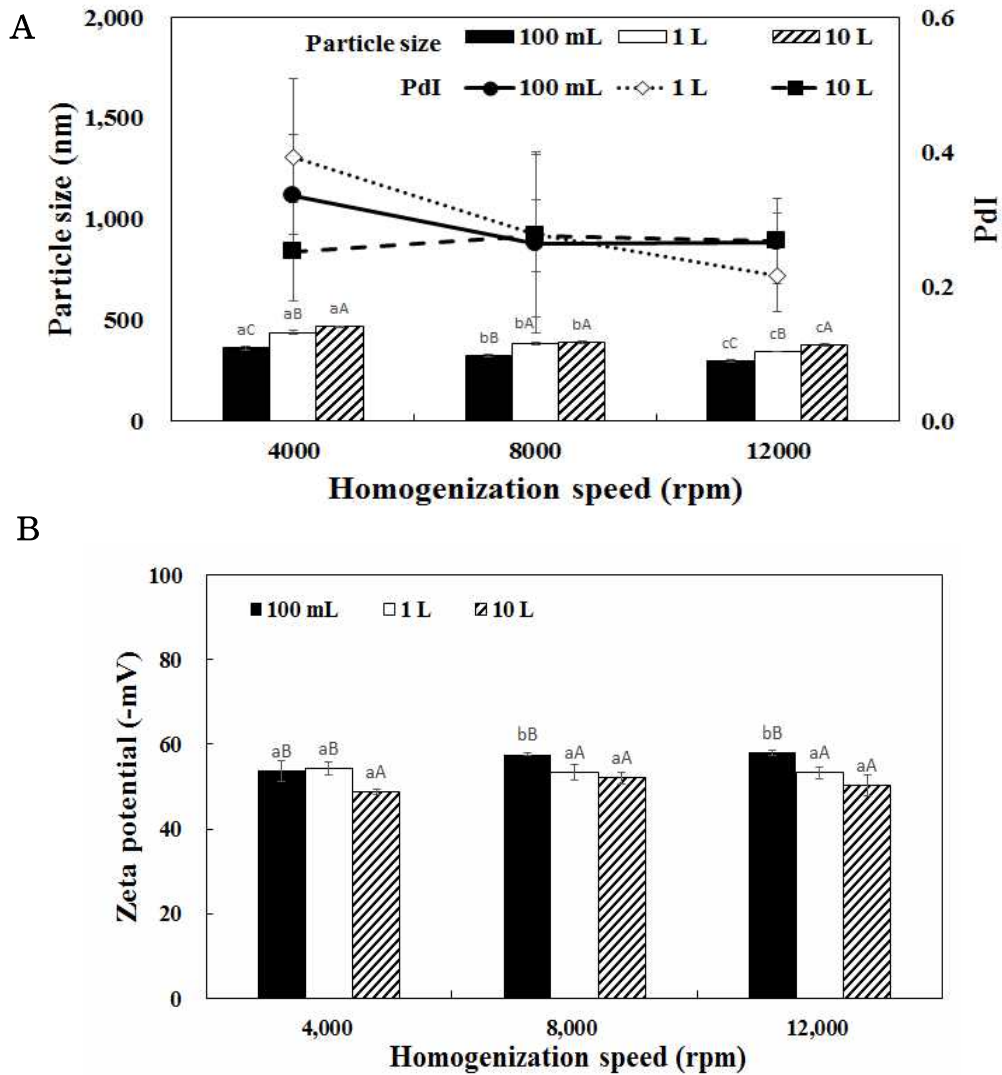


그림 3-1-28. 리포솜의 제조용량과 균질 속도에 따른 입자크기(A)와 제타전위(B)

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between homogenizer condition at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between manufacture scale at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

○ 2차 균질 조건 및 제조용량에 따라 입자 크기 및 제타 전위를 측정된 결과를 그림 3-1-29에 나타내었다. 2차 균질 후 전체적으로 입자크기는 감소하였으며 초음파 균질 전력이 증가함에 따라 입자크기는 감소하였으며, 또한 제조용량이 증가함에 따라서 입자크기 또한 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 초음파 균질기의 probe가 용액의 중앙에서 초음파를 처리하는 형태로 진행되기 때문에 용량이 커질수록 초음파가 영향이 적어진 것으로 생각된다. 또한 제조용량이 10 L일 때, 다른 제조 용량에 비해서 pDI값이 높은 것으로 나타났다. 제타 전위 측정 결과, 제조용량이 증가함에 따라서 증가하는 경향을 나타냈으며, 균질 전력에 따른 입자크기는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 40 W에 비해서 60 W와 80 W조건에서 제타 전위가 안정된 결과를 보였다. 산업적 공정비용을 고려할 때, 60 W를 최적 조건으로 선정하였다.

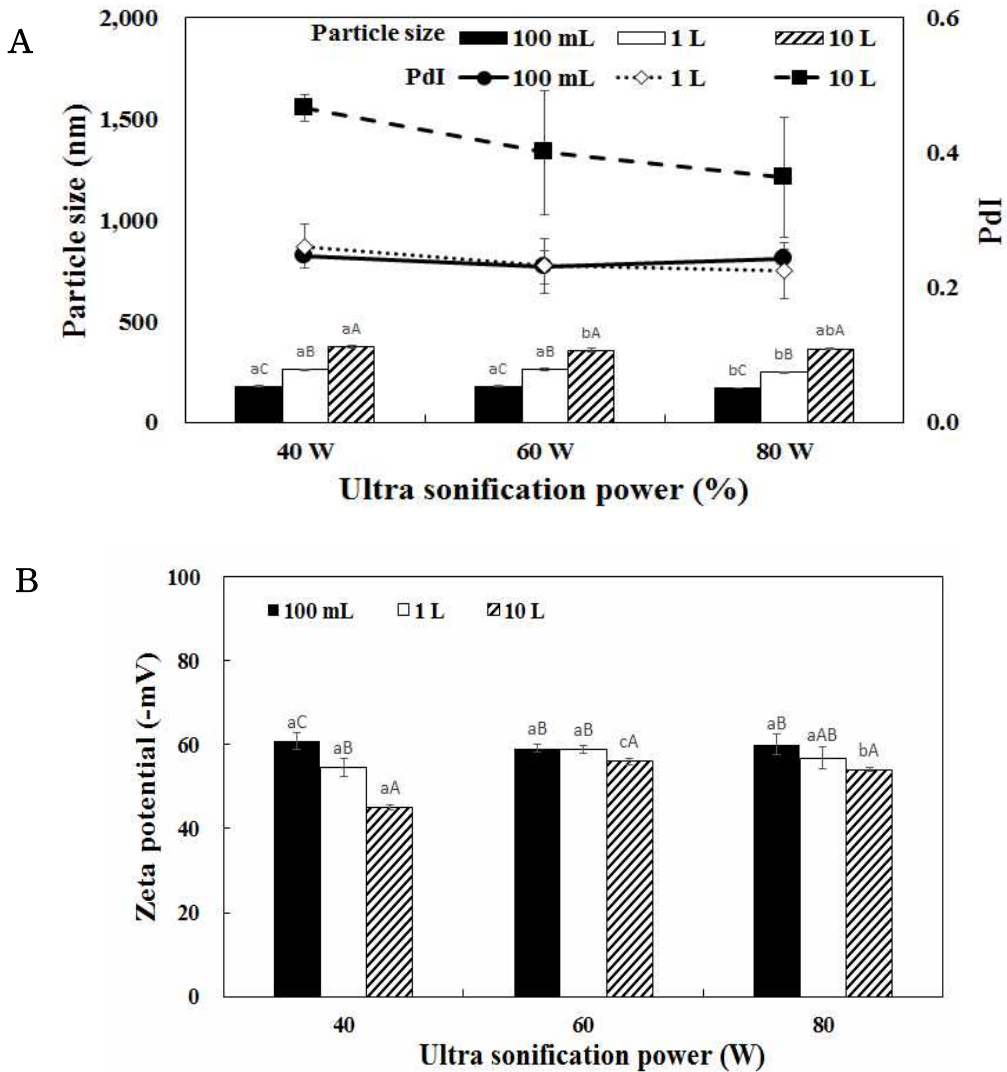


그림 3-1-29. 리포솜의 제조용량과 초음파 전력에 따른 입자크기(A)와 제타전위(B)

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between ultrasonicator condition at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between manufacture scale at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

- 펩타이드 첨가 농도가 및 제조 용량이 증가함에 따라서 리포솜의 입자크기는 유의적으로 증가하였으며, 제타 전위는 감소하는 경향이 나타났다. 제타전위 값의 경우 절대 값이 blank 리포솜에 비해서 크게 감소하였다. Prototype type으로 펩타이드를 제조하였을 때 3, 6% 펩타이드 리포솜은 430-480 nm의 크기를 나타내었고, 12%와 24%에서 각각 유의적으로 증가하는 경향이 나타났다($p < 0.05$). 특히 10 L 단위 제조에서 펩타이드 농도를 24%이상 첨가하였을 때, 입자크기는 1 mm 이상으로 크게 증가하였으며, 이에 따라 이후 저장 실험에서는 24%를 제외한 3, 6, 12% 세 가지 어피 펩타이드 농도를 설정하여 진행하였다(그림 3-1-30).

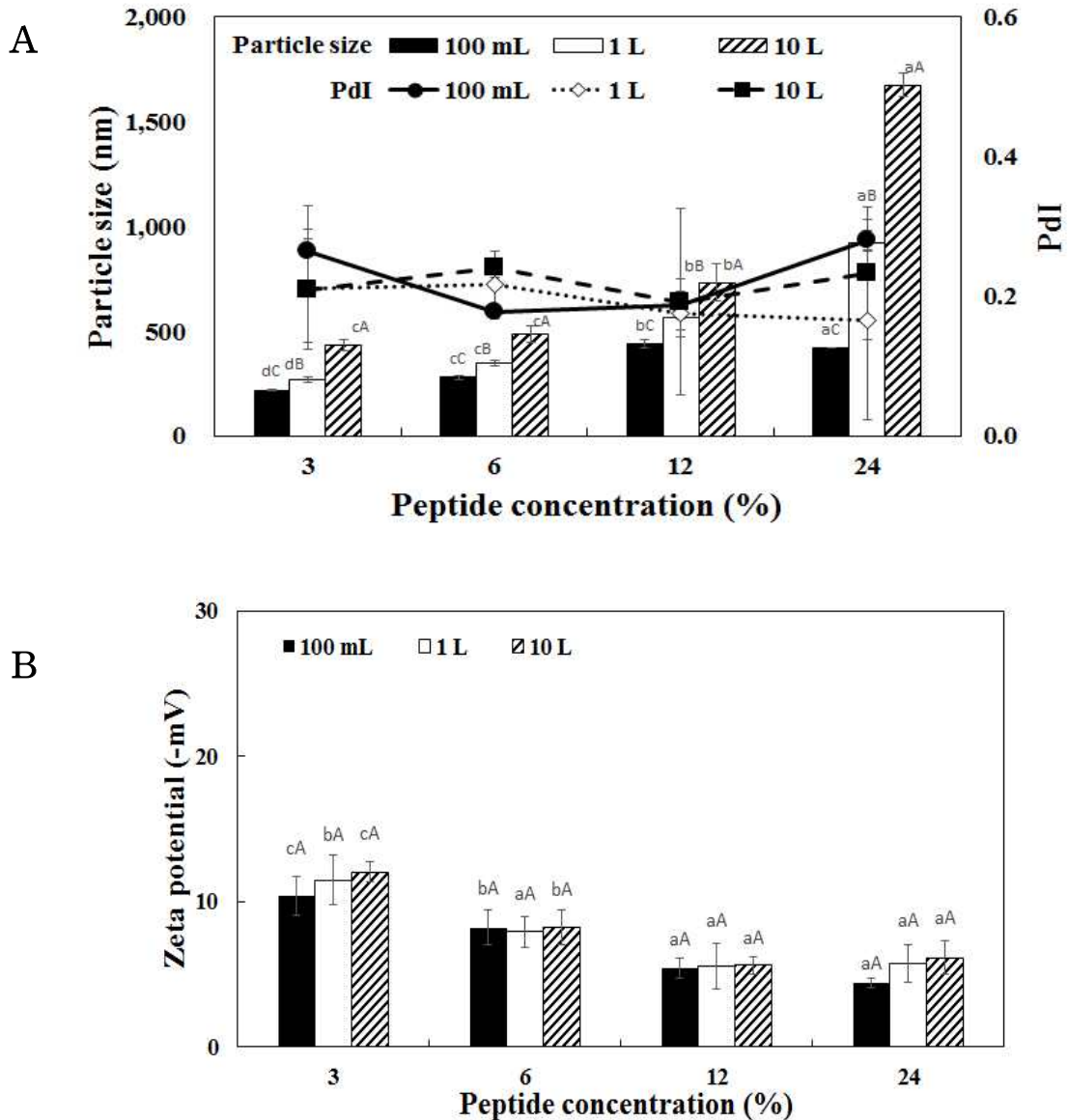


그림 3-1-30. 리포솜의 제조용량과 펩타이드 농도에 따른 입자크기(A)와 제타전위(B)

^{a-d}Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between manufacture scale at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

- 펩타이드 리포솜의 입자크기와 제타전위에 펩타이드 농도와 제조 용량, 저장 기간이 미치는 영향을 이원분석한 결과를 표 3-1-12에 나타내었다. 입자크기 및 제타전위는 농도, 제조용량, 저장기간 3가지 요인 모두에서 유의적으로 영향을 받는 것으로 나타났으며 ($p < 0.001$), 표 3-1-21의 펩타이드 제조 농도와 동일하게 펩타이드 농도가 입자크기와 제타 전위에 유의적으로 가장 큰 영향을 나타내었다($p < 0.001$). PDI는 저장기간에 가장 크게 유의적으로 영향을 받았으며($p < 0.001$), 펩타이드 농도와 제조 용량은 유의적으로 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다($p > 0.001$).

표 3-1-12. 펩타이드 리포솜의 펩타이드 농도, 제조용량, 저장기간에 따른 입자크기, pDI, 제타전위의 F-values.

	Particle size	PdI	Zeta potential
Peptide concentration	576.14***	0.01	223.87***
Manufacture scale	530.09***	0.23	107.94***
Storage period	18.13***	8.97***	110.61***
Peptide concentration +Manufacture scale	4.64***	0.39	38.24***
Peptide concentration +Storage period	7.88***	1.36	14.29***
Manufacture scale +Storage period	6.25***	1.23	25.32***
Peptide concentration +Manufacture scale +Storage period	6.11***	2.31*	10.37***

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

- 입자크기는 제조용량과 펩타이드 농도가 증가함에 따라서 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며, 저장기간이 증가함에 따라서 감소하였다. 제타전위는 저장기간이 증가함에 따라서 증가하였다. 10 L 용량으로 제조하였을 때 저장기간에 따라서 입자크기가 감소하였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 제타 전위는 펩타이드를 3, 6% 첨가하였을 때 저장기간이 증가함에 따라서 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며, 12%에서는 저장기간에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 추가적으로 실험을 진행하면서 12% 농도로 10 L로 제조한 리포솜은 3주 이상 저장하였을 시에 침전물이 발생하여 상대적으로 불안정한 것으로 생각되어 6% 농도의 어피 펩타이드 리포솜이 산업적으로 적용하기에 적절한 것으로 생각된다(그림 3-1-31,32,33).

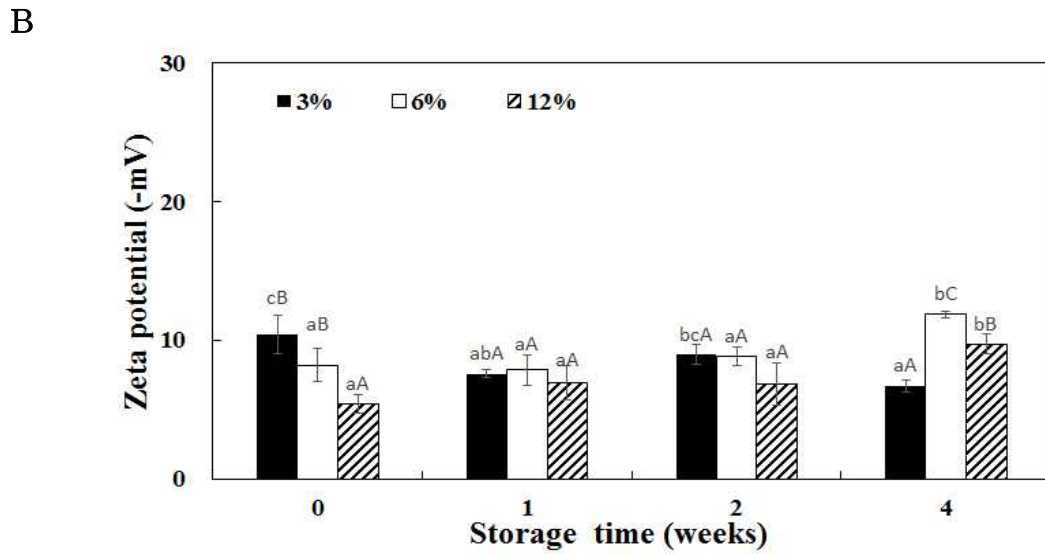
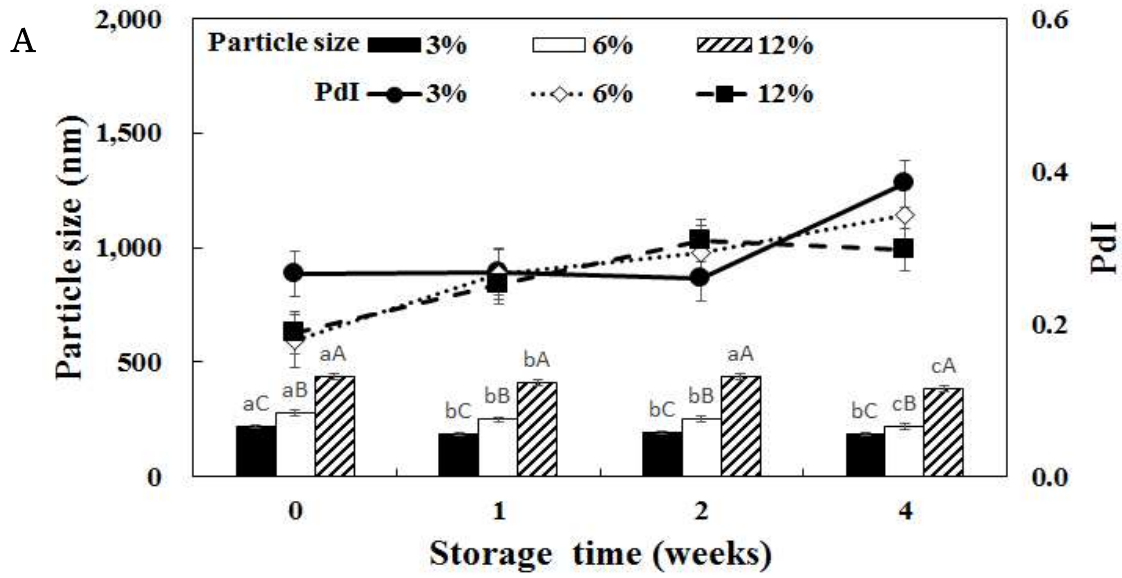


그림 3-1-31. 100 mL단위로 제조한 펩타이드 리포솜의 저장기간과 펩타이드 농도에 따른 입자크기(A)와 제타전위(B)

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between storage time at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

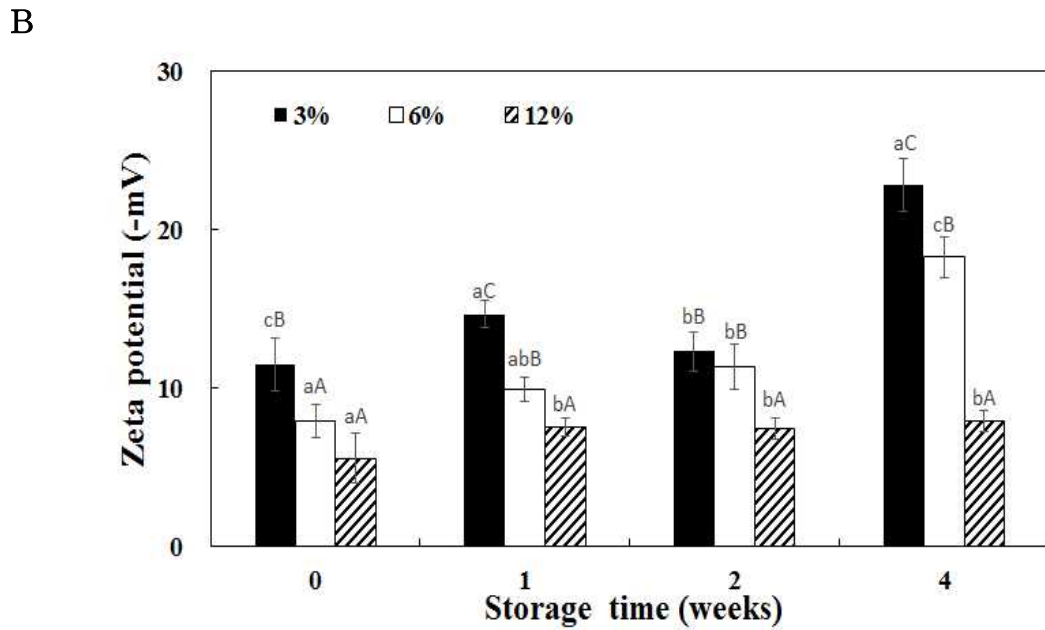
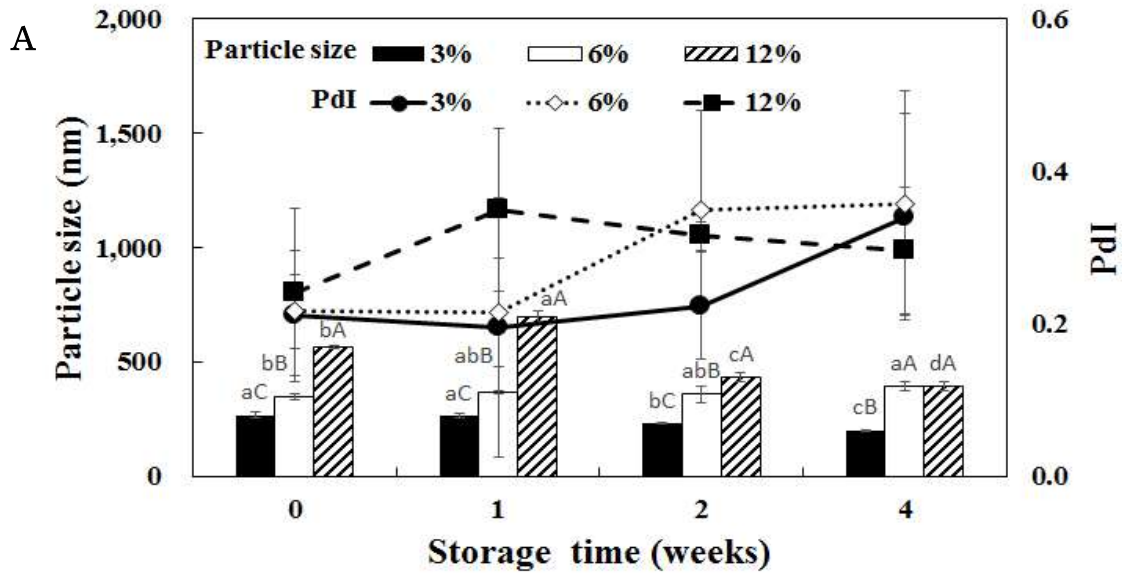


그림 3-1-32. 1 L단위로 제조한 펩타이드 리포솜의 저장기간과 펩타이드 농도에 따른 입자크기(A)와 제타전위(B)

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between storage time at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

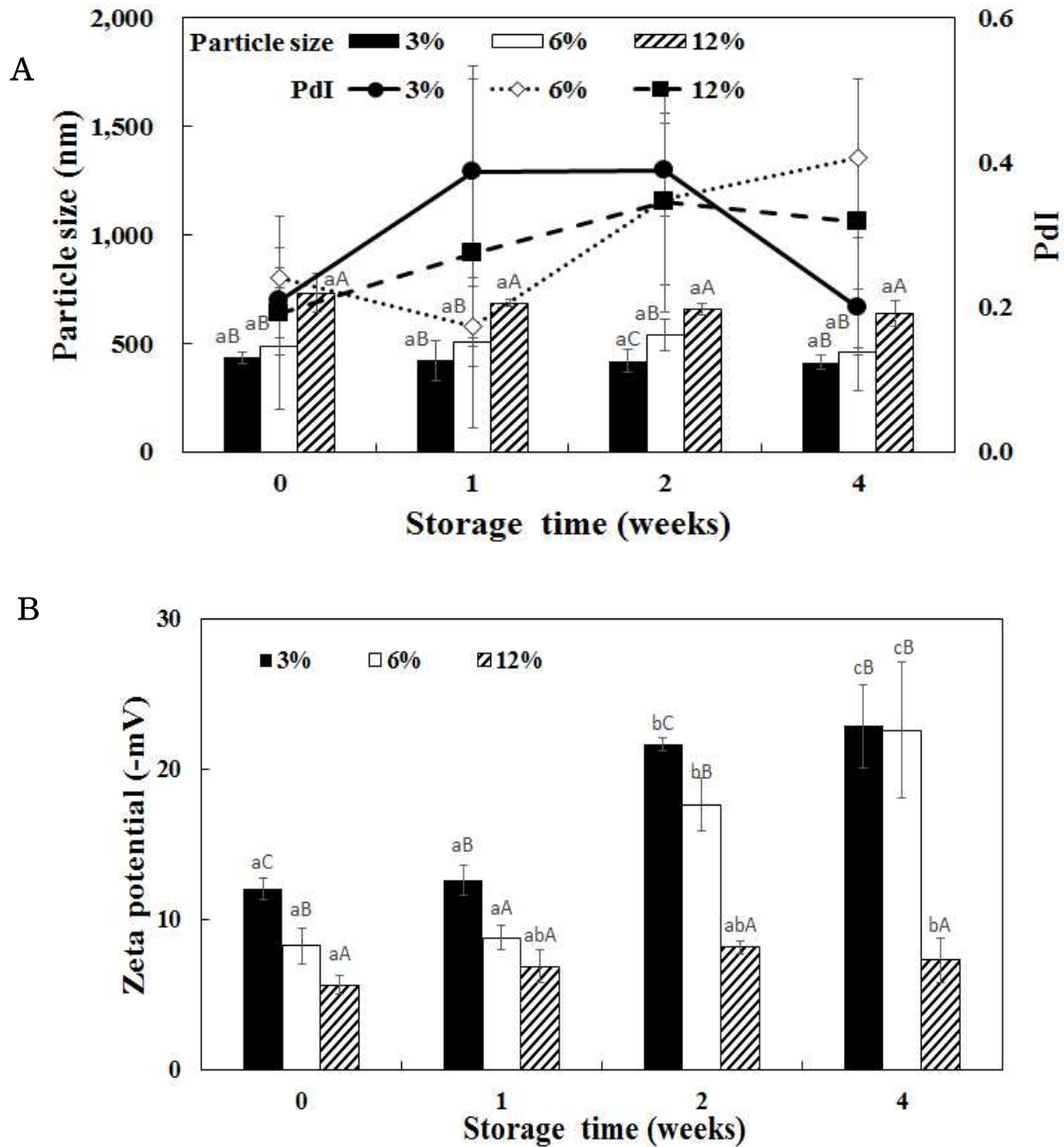


그림 3-1-33. 10 L단위로 제조한 펩타이드 리포솜의 저장기간과 펩타이드 농도에 따른 입자크기(A)와 제타전위(B)

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between storage time at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

6. Pilot scale 어피 펩타이드 리포솜 유자 주스 선행 조건

- 실제 현장에서 적용하기 전에 lab scale의 어피 펩타이드 리포솜과 유자 추출물을 혼합하여 입자 예비실험을 실시하였다.
- 어피 펩타이드 리포솜 제조를 위하여 레시틴(Metarin P, Cargill Texturizing Solutions, Hamburg, Germany)과 어피 펩타이드(Naticol 4000, WEISHARDT International, Graulhet, France)를 사용하였고, 제조한 어피 펩타이드 리포솜을 첨가하기 위한 유자 원액(그림 3-1-34)은 에덴식품 (Goheung, Korea)에서 제공받아 사용하였다.



그림 3-1-34. 에덴에서 제공 받은 유자 추출물(좌), 현재 시판중인 유자즙(우).

가. 농도별 어피 펩타이드가 코팅된 리포솜 제조

- 어피 펩타이드와 어피 펩타이드 리포솜 제조를 위한 펩타이드의 농도를 선정하고자 표 3-1-13과 같이 실시하였다. 펩타이드의 농도가 증가할수록 입자 크기는 blank liposome에 비해 증가하는 것을 알 수 있었다. 특히 12%가 첨가된 어피 펩타이드의 경우 500 nm의 크기로 6%의 농도의 비해 2배정도 크기가 증가하는 것을 알 수 있었다.
- 제타전위는 blank입자의 경우 레시틴이 지니고 있는 phosphorous의 음이온 전하로 강한 전하값을 나타내는 특성을 보이거나 어피 펩타이드가 포함된 제타 전위의 경우 그 절대값이 떨어지는 것을 알 수 있었다. 어피 펩타이드와 연합되어 레시틴이 지니고 있는 음전하 값이 상쇄되어 전하량이 떨어지는 것으로 생각된다. 이는 저장안정성에 다소 분리한 조건의 입자 형성이 될 수 있으리라 생각된다.

표 3-1-13. 6%와 12% 어피 펩타이드가 들어간 입자의 이화학적 특성

	Particle size (nm)	PdI	Zeta potential (mV)
Blank liposome	138.9 ± 5.40	0.24 ± 0.01	-55.03 ± 0.72
6% Liposome	296.8 ± 3.12	0.18 ± 0.01	-6.06 ± 0.37
12% Liposome	513.9 ± 22.20	0.16 ± 0.04	-5.80 ± 0.63

나. 어피 펩타이드 및 리포솜을 농도별로 첨가한 유자 음료의 입자 분석

- 어피 펩타이드 및 리포솜을 농도별로 첨가한 유자음료의 입자 크기, PdI (polydispersity index)와 제타 전위를 측정된 결과를 표 3-1-14에 나타내었다.
- 제타 전위 값은 입자의 안정성을 예측할 수 있는 값으로 보통 전하량의 부호 값과 상관 없이 절대값이 30이상일 때 안정성이 크고 분산이 오래 안정적일 것으로 예측한다. 따라서 본 실험에서 빈 리포솜의 제타 전위 절대값이 50 mv 이상으로 입자 분산이 매우 안정하지만, 제조한 어피 펩타이드 리포솜과 이를 혼합한 유자 음료에서는 입자의 안정성이 떨어지는 것을 알 수 있다.
- 코팅하지 않은 펩타이드의 농도별 유자와 혼합 후 입자 크기를 보면 크기가 2,200-2,600 nm의 크기를 나타내었다. 입자의 크기가 다분산상을 나타내어 0.6-0.7의 값을 나타내었다. 이는 어피 펩타이드를 첨가한 유자 음료 A와 B의 입자 크기가 약 2000 nm 이상이며 PdI 값이 0.3 이상인 다분산상으로 나타난 것은 입자가 큰 고형물로 구성되어 있는 유자로 인한 것으로 판단된다.

표 3-1-14. 유자음료의 입자 크기, PdI 및 제타전위

혼합 후 농도	Particle size (nm)	PdI	Zeta potential (mV)
3% peptide	2240.0 ± 241.20	0.68 ± 0.27	-4.27 ± 0.16
6% peptide	2697.7 ± 95.47	0.74 ± 0.19	-2.45 ± 0.36
3% Peptide Liposome	1647.3 ± 56.61	1.00 ± 0.00	-2.21 ± 0.53
6% Peptide Liposome	670.8 ± 15.28	0.22 ± 0.03	-2.90 ± 0.09

- 혼합비의 펩타이드 농도가 증가할수록 입자의 제타 전위값은 떨어지는 것을 볼 수 있었는데 이는 표 3-1-11에서 나타난 결과와 유사한 것을 볼 수 있다. 즉 blank 리포솜의 경우와 펩타이드 코팅 리포솜의 제타 전위값에서도 펩타이드 첨가시 전하 값은 낮아지는 현상과 동일한 결과를 나타냈다.
- 이에 반해 펩타이드가 코팅된 입자 크기 변화를 관찰하면 펩타이드만 첨가한 시료에 비해 입자의 크기가 감소한 것을 볼 수 있다. 3% 어피 펩타이드 리포솜이 함유된 유자 음료 D의 입자 크기(약 600 nm 대)는 유자 음료 제조 시 첨가한 6% 리포솜의 입자 크기(약 500 nm)와 비슷하게 나타난 것으로 보아, 유자 음료에 함유된 어피 펩타이드 리포솜이 유지되고 있음을 짐작할 수 있다. 따라서 이를 어피 펩타이드 리포솜의 최적 농도로 선정하여 다음 실험을 진행하였다.

다. 외관 관찰 및 저장시간 별 sedimentation 현상

- 농도별로 제조된 어피 펩타이드 혹은 펩타이드 코팅 리포솜을 유자와 1:1로 혼합하여 4주 동안 냉장 보관하면서 외관관찰을 통해 시간별 sedimentation을 관찰하였다(그림 3-1-35). 어피 펩타이드만 첨가된 경우 색의 변화가 대조구 유자추출액과 유사한 색을 나타내었으나, 어피 펩타이드 코팅 리포솜의 경우 색은 흰색으로 변화되었다.
- 모든 시료에서 시간이 4주후에 아래층으로 가라앉는 sedimentation현상을 관찰할 수 있었는데, 예외적으로 6%의 어피 펩타이드 코팅 리포솜의 경우는 매우 안정적으로 고형물이 가라앉지 않고 고르게 분산되어 있는 것을 알 수 있었다.
- 일반적으로 나노입자의 분산안정성을 판단하는데 있어 가장 기본적인 지표는 creaming 이나 sedimentation 현상을 외관으로 관찰하고, 저장하면서 분리층의 높이를 측정하면서 그에 대한 비율을 반영하여 판단한다. 본 시료들은 6%의 peptide가 코팅된 리포솜의 경우 분산 안정성이 뛰어나는 것을 볼 수 있었다. 따라서 본 시료를 최적 조건으로 삼아 plant scale에서 반영하였다.

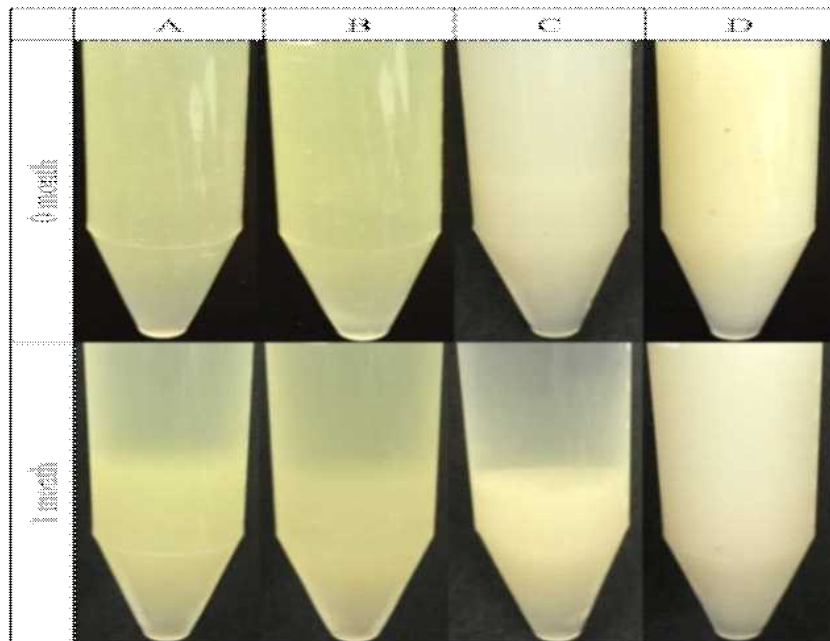


그림 3-1-35. 4°C에서 4주간 어피 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자음료의 외관;
 A: 3% 어피 펩타이드, B: 6% 어피 펩타이드,
 C: 3% 어피 펩타이드가 코팅된 리포솜, D: 6% 어피 펩타이드가 코팅된 리포솜.

라. 저장 기간에 따른 안정성 분석

- 어피 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자음료의 입자 크기, PdI와 제타 전위를 저장 기간에 따라서 측정한 결과를 표 3-1-15에 나타내었으며, 입자크기 분산도를 그림 3-1-36,37,38,39에 나타내었다.
- 유자 음료의 입자들은 시간이 지날수록 분산도가 높아져 퍼지고 있으며, 이는 안정성이 점점 떨어지고 있다는 것을 의미한다. 특히 어피 펩타이드 리포솜에서 두드러지게 나타났다. 어피 펩타이드 리포솜을 첨가한 유자음료의 경우, 1주차까지는 단분산상을 나타내었으나 2주차 이후부터 다분산상의 분포도를 나타내었다.

- 저장 기간 동안 모든 시료에서 입자크기가 감소하는 경향을 보였는데, 이는 앞에서 보이는바와 같이 시간이 지남에 따라 응집 현상이나 침전물이 발생하여 입자 크기가 감소한 것으로 사료된다. 어피 펩타이드 리포솜을 첨가한 유자음료의 경우 저장 기간 동안 입자 크기의 변화가 거의 없었으며, 이는 큰 변화 없이 리포솜이 유지된 것으로 사료된다. 입자 전위는 모든 시료가 앞서 농도에 따라 실험한 결과와 비슷한 결과가 나타났으며, 저장 기간에 따른 큰 변화는 보이지 않았다.
- 어피 펩타이드 리포솜을 첨가한 유자음료를 저장하였을 때, 저장기간 동안 입자크기에는 큰 변화가 관찰되지 않았으나, 2주차 이후부터 다분산상의 분포도를 나타내어 이 시기부터 리포솜의 안정성이 불안정해진 것으로 생각된다.

표 3-1-15. 저장기간에 따른 입자크기 PdI 및 제타 전위

		Storage (week)			
		0	1	2	4
대조구	D (nm)	2878.33±136.96	2551.67±172.11	2525.67±14.29	2081.33±108.70
	PdI	0.19±0.06	0.28±0.12	0.27±0.02	0.25±0.01
	z-potential (mV)	-2.30±0.26	-2.66±0.35	-2.34±0.13	-2.58±0.32
6% 펩타이드	D (nm)	2273.33±64.05	2055.00±160.18	2181.67±21.96	1260.33±165.85
	PdI	0.32±0.04	0.19±0.07	0.09±0.13	0.23±0.07
	z-potential (mV)	-2.43±0.05	-3.44±0.39	-3.78±0.54	-3.26±0.33
6% 펩타이드 -리포솜	D (nm)	2573.67±306.44	2317.00±97.78	2527.00±112.97	2598.33±158.18
	PdI	0.31±0.02	0.25±0.21	0.25±0.21	0.40±0.08
	z-potential (mV)	-3.43±0.41	-2.79±0.28	-2.18±0.12	-3.32±0.22
6% 리포솜	D (nm)	1248.00±200.00	1260.33±165.85	845.03±19.97	562.97±54.85
	PdI	0.24±0.08	0.48±0.46	0.43±0.06	0.38±0.09
	z-potential (mV)	-5.34±0.30	-4.75±0.46	-5.20±0.21	-5.05±0.29

- 결론적으로 유자 및 어피 펩타이드만 첨가된 그래프의 경우 시간에 따라 안정된 입자크기를 나타내고, 어피 펩타이드가 코팅된 리포솜 자체는 시간에 따라 입자의 크기가 감소되면서 다분산상이 되는데 이는 전형적인 리포솜 해리 현상으로 설명할 수 있다. 어피 펩타이드가 코팅된 리포솜이 첨가된 유자의 경우는 대체로 안정적이거나 4주 때는 입자의 aggregation이 일어나 크기가 증가하였다.

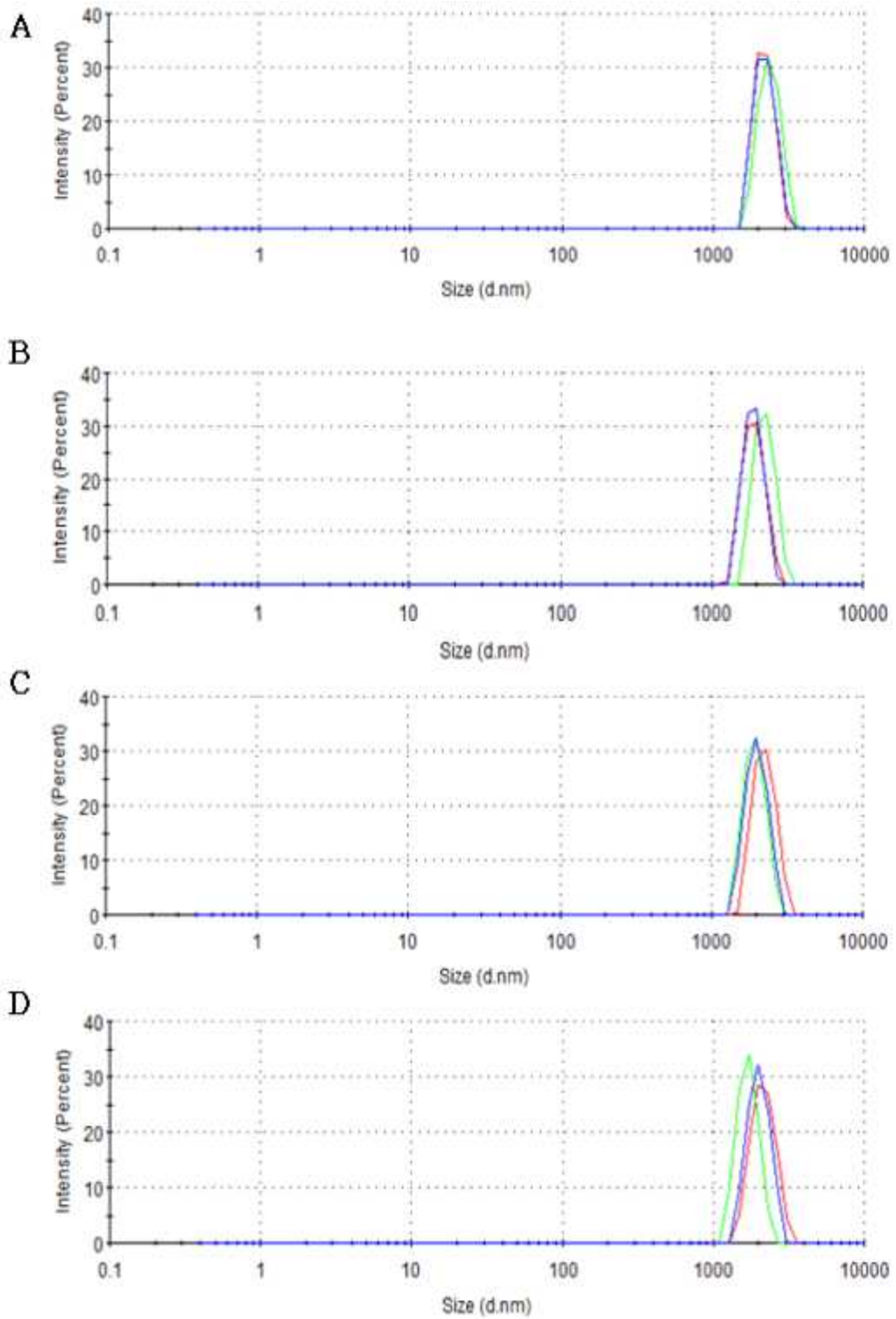


그림 3-1-36. 저장기간에 따른 대조구(유자음료)의 입자분산도;
A: 0주, B: 1주, C: 2주, D: 4주.

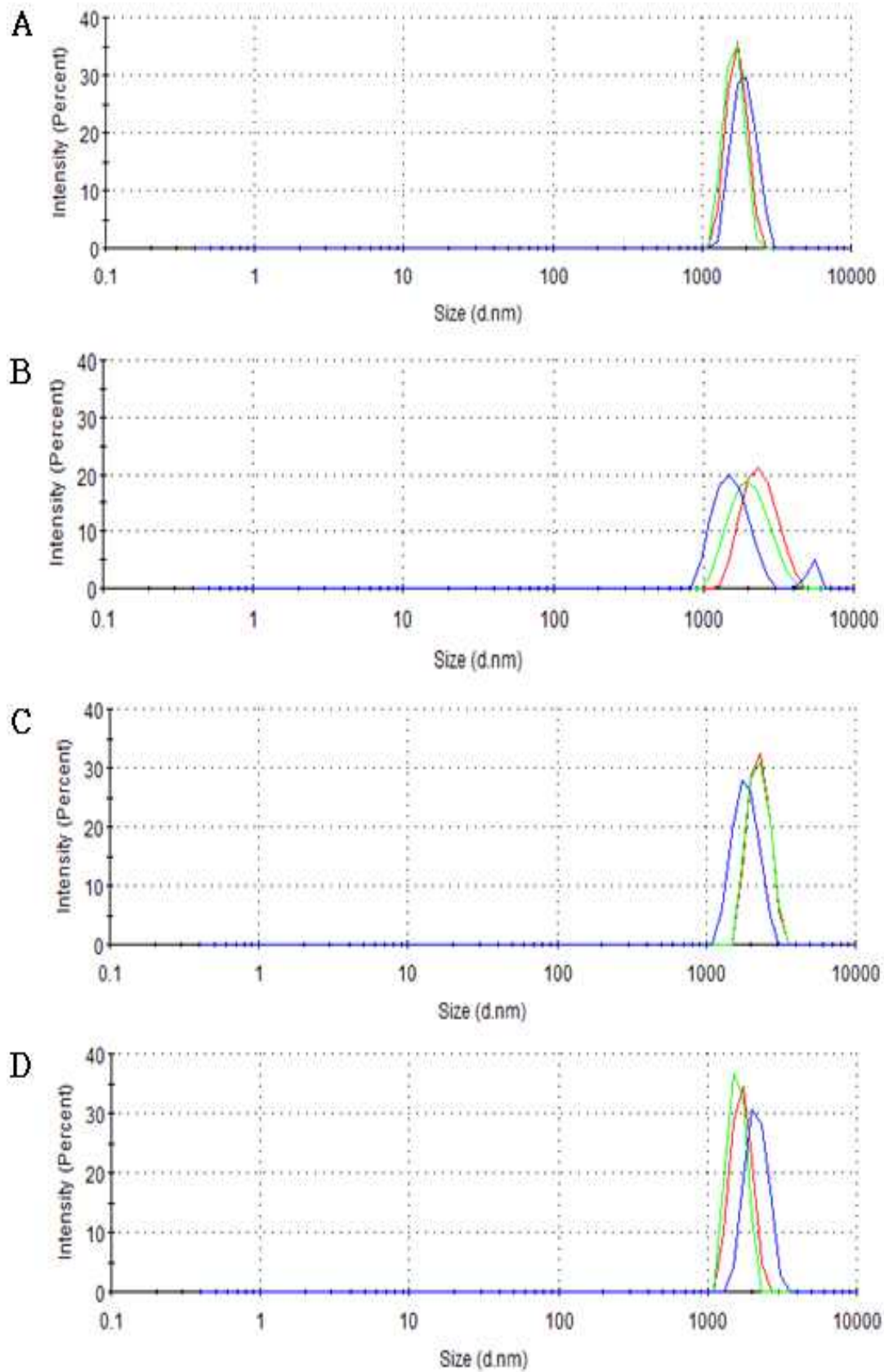


그림 3-1-37. 저장기간에 따른 코팅하지 않은 펙타이드가 첨가된 유자 음료의 입자분산도;
 A: 0주, B: 1주, C: 2주, D: 4주.

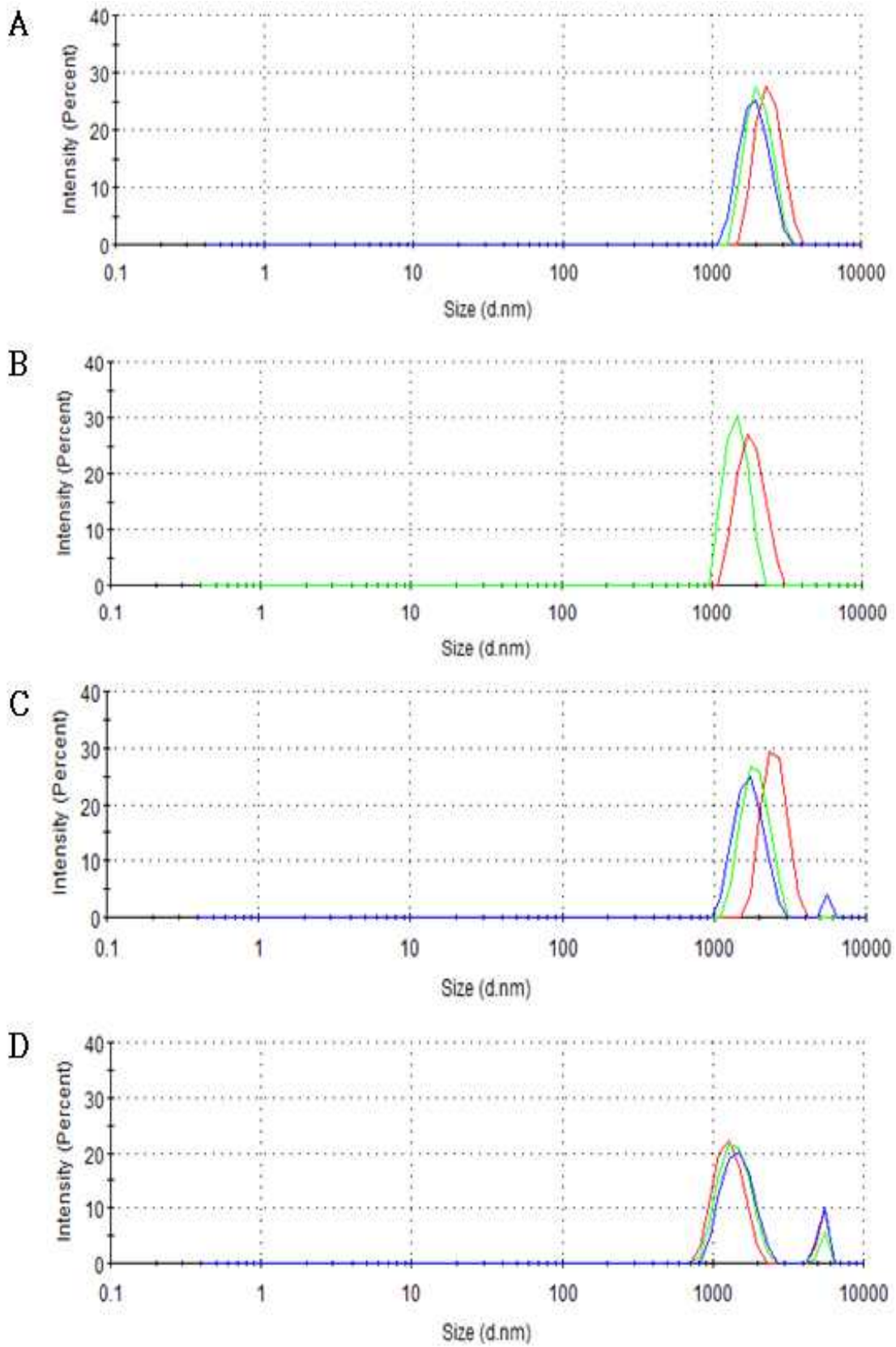


그림 3-1-38. 저장기간에 따른 펩타이드가 코팅된 리포솜이 첨가된 유자 음료의 입자분산도; A: 0주, B: 1주, C: 2주, D: 4주.

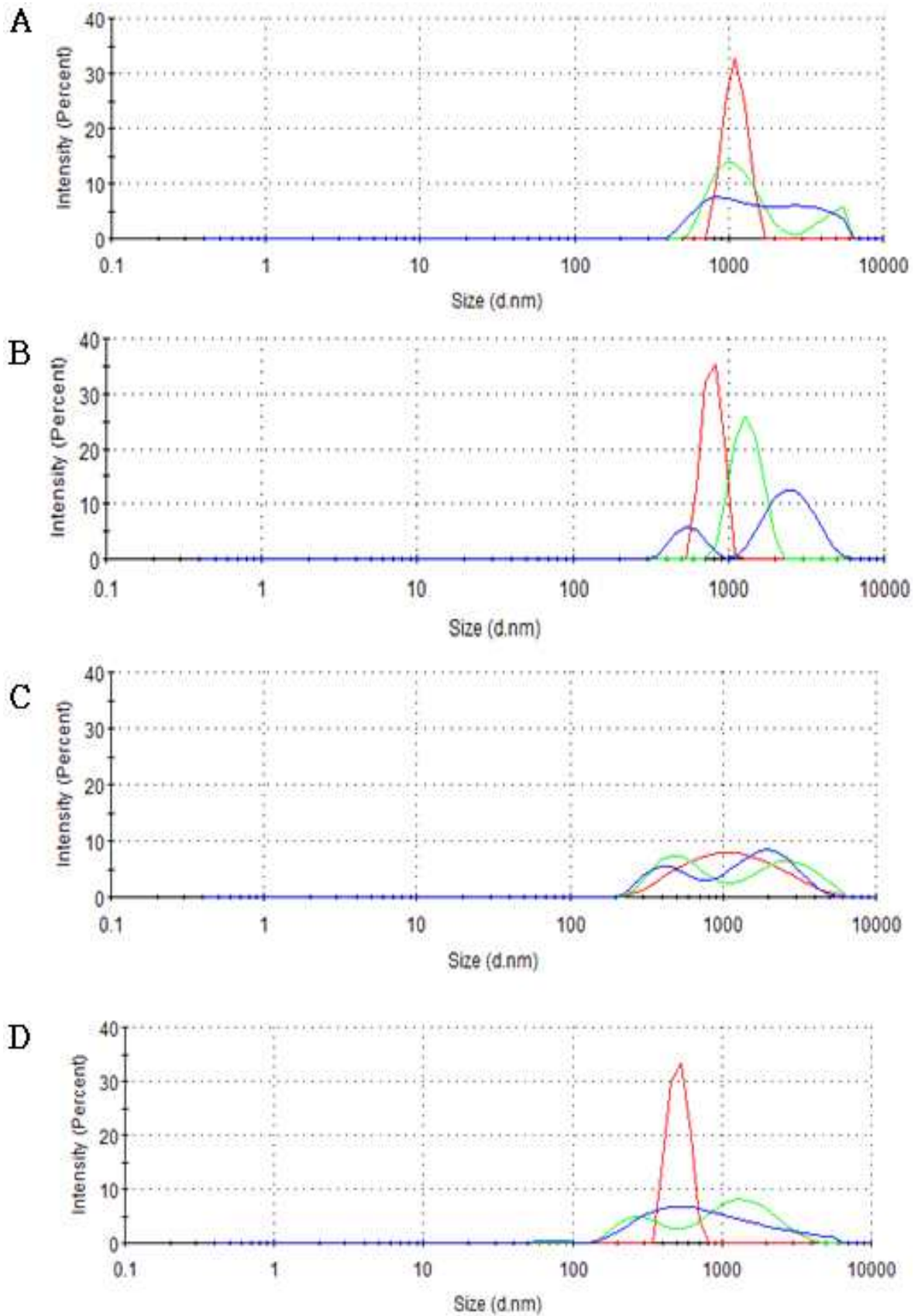


그림 3-1-39. 저장기간에 따른 펩타이드가 코팅된 리포솜의 입자분산도;
A: 0주, B: 1주, C: 2주, D: 4주.

7. 어피 펩타이드 리포솜의 scale-up 제조공정 확립 및 안정성 분석

가. 어피 펩타이드 리포솜 plant 용량 설정을 위한 생산라인 탐색

- 참여기업 에덴식품의 제품형태와 1일 생산량에 6%의 어피 펩타이드를 첨가하기 위한 어피 펩타이드 리포솜의 생산량을 계산이 필요하여, 상용화 되고 있는 유자 음료의 생산량을 조사 하였다. 그에 대한 정보는 아래 도표(표 3-1-16)에서 나타내었다.
- 일반적인 음료로 섭취하는 “유자즙”의 경우는 내열 PET로 포장되어 한 포장단위당 약 120 mL의 양이 들어가고 1일 생산량은 약 14,000개를 생산하여 최소 생산량은 약 0.5 톤이다.

표 3-1-16. 참여기업인 에덴식품에서 생산하는 1일 유자즙의 생산량 및 기타 제품 정보

시제품	제품형태	음료수	음료수
	포장형태	내열PET	유리병
	용량	120 mL	180 mL
제품1일 생산 대비	전체 최소 생산량	0.5 톤	0.5 톤
	1일 생산량	14,000개/120 mL/일	10,000개/220 mL/일
	최소생산량	7,000개/120 mL/일	5,000개/180 mL/일

- 또한 대량 생산된 시료의 어피 펩타이드 plant 현장 적용을 위한 공장 라인을 답사를 실시하여 주입 단계를 결정하였다. 생산라인 및 개별 생산라인은 아래의 그림 3-1-40와 같다. 대량생산된 어피 펩타이드 리포솜 주입단계는 개별 단위 포장 전으로 결정하였다.

- 대용량 제품 생산라인



- 파우치 및 PET 타입 제품 생산라인



그림 3-1-40. 에덴식품의 음료 생산 시설.

나. 어피 펩타이드 리포솜의 scale-up 제조 및 이를 첨가한 유자 음료 제조

- 12% w/v 어피 펩타이드 용액 5 L에 레시틴을 1% w/v 첨가하여 500 rpm에서 60분 이상 교반시킨 후 대형 균질기(WSB70, Waring, Torrington, CT, USA)를 이용하여 8,000 rpm으로 3분간 균질하였다.
- 어피 펩타이드 리포솜의 plant scale 적용을 위해 에덴식품의 음료 공정라인을 이용하였다. 로타리식 자동 포장기계(SPS-R380, S-Pack, Daegu, Korea, 그림 3-1-41)에 유자 액기스 5 kg과 물 5 L를 혼합한 후 절반인 5 L에 12% w/v 어피 펩타이드 용액 5 L를 첨가하였으며 나머지 5 L에 12% 어피 펩타이드 리포솜을 첨가하여 각각을 98℃에서 3분간 열처리 살균하였다. 로타리식 자동 포장기계를 이용하여 각 음료를 120 mL 용량의 파우치 형태로 포장하였다(20개/1분).



그림 3-1-41. 로타리식 자동 포장기계

- 그림 3-1-42,43,44에서 음료 공정 라인에 사용되는 장치가 제시되어있다. 상단부의 용기에 펌프를 통해 시료를 주입하여 연속적으로 처리가 가능하며 포장하기 직전 저장 탱크에 대량 생산된 리포솜을 혼합하여 펩타이드 혼합유자 추출액을 제조하였다.
- 유리병의 경우도 전체 생산량은 0.5톤가량 되어 실제 어피 펩타이드가 들어가는 양을 계산해보면 10%의 펩타이드 용액 50 kg과 0.5톤의 유자추출액을 혼합하면 1%의 펩타이드 함량 유자 추출액 제조가 가능하다. 최종 펩타이드 함량조건은 순차적으로 논의 후 결정될 예정이며 본 실험에서 나온 결과를 토대로 유자추출액과 혼합 후 6%의 펩타이드 코팅 리포솜이 4주 저장 시 입자가 안정되어 12%의 펩타이드 용액을 기준으로 제조하였다.
- 연속식 공정에서 실제 모든 0.5톤의 모든 시료를 시행하지 않고, 최종 용량이 10L를 기준으로 하여 아래 표1-5의 혼합비를 기준으로 plant line에 주입하여 펩타이드 유자 음료는 제조하였다.



그림 3-1-42. 혼합 후 가열 공정.



그림 3-1-43. 어피 펩타이드(A) 및 리포솜(B)을 첨가 공정(C,D).

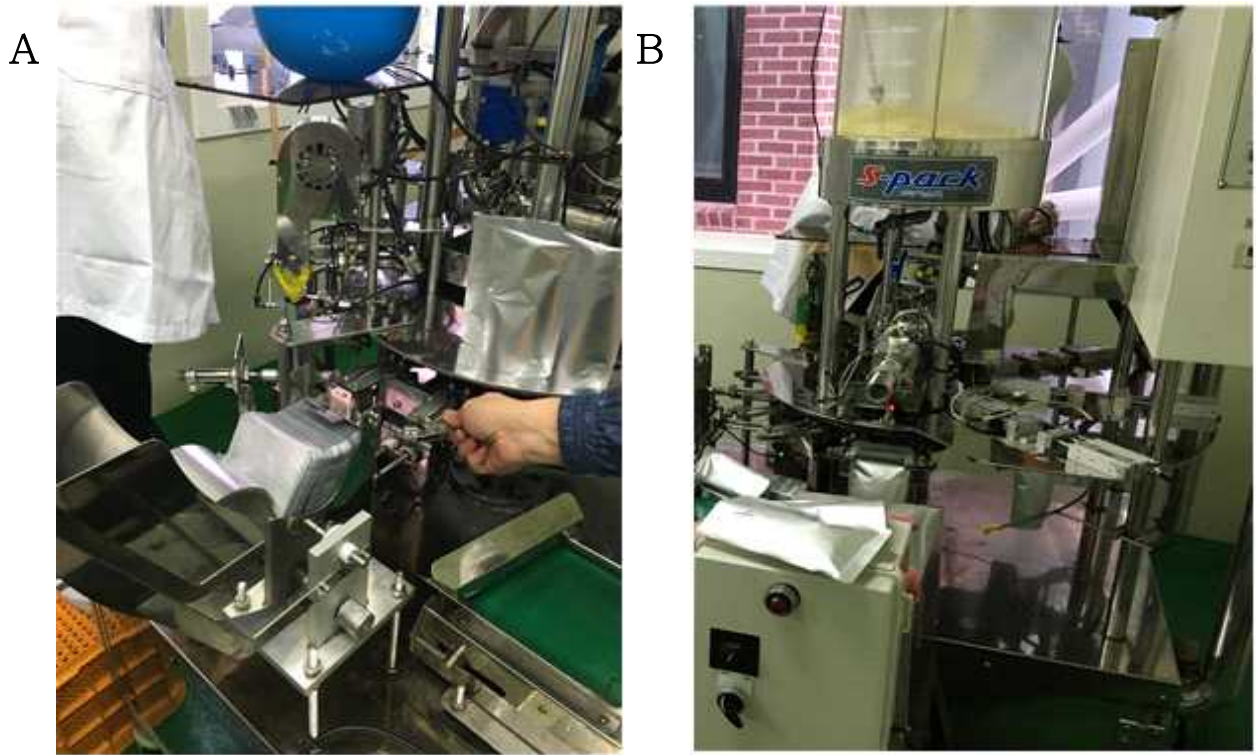


그림 3-1-44. 포장 공정 과정.

- 가열 공정(그림 3-1-42)은 98℃에서 3분간 진행되며, 이후 위의 그림(그림 3-1-44)과 같이 자동으로 파우치가 공급되며, 배출구를 통해 시료가 주입된 후 자동으로 진공포장이 진행된다. 다음은 진공포장을 마친 뒤 최종적으로 제조된 시제품이다(그림 3-1-45, 120 mL).

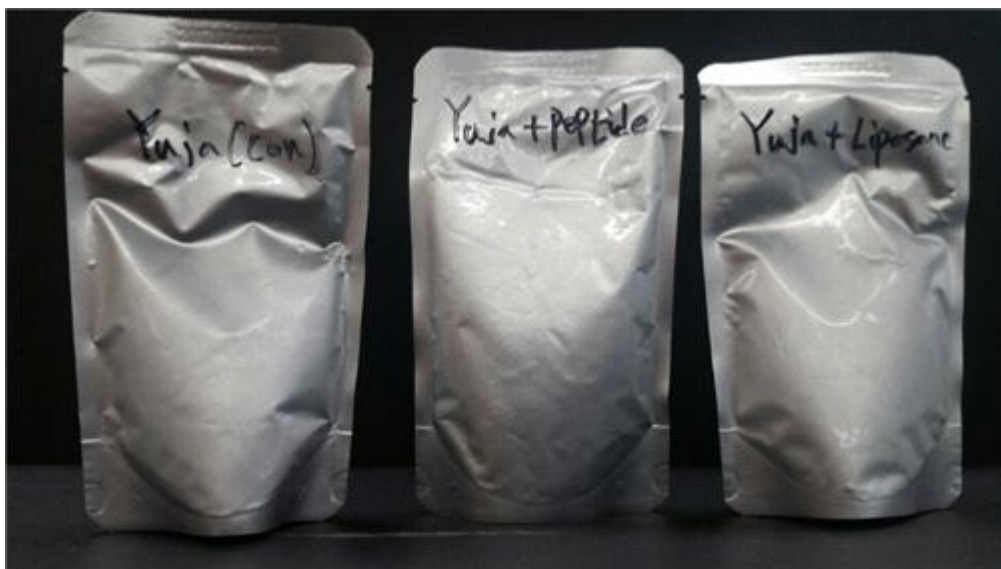


그림 3-1-45. 펩타이드 및 펩타이드 코팅 리포솜이 들어간 유자 음료 시제품.

나. 어피 펩타이드 및 리포솜을 농도별로 첨가한 유자 음료의 이화학적 특성

(1) 어피 펩타이드 및 리포솜을 농도별로 첨가한 유자 음료의 외관

- 4주 동안 냉장 보관한 유자 음료를 관찰한 결과를 그림 3-1-46에 나타내었다. 첨가물과 상관없이 유자 음료 A, B, C 모두 저장 1주 후 유자의 고형물이 가라앉은 것을 관찰하였다. 대용량으로 제조된 12% w/v 어피 펩타이드 리포솜 D는 시료 가운데 가장 천천히 sedimentation되는 것을 알 수 있었다. 이는 앞에서 pilot scale로 제조한 시료의 경우 동일 농도로 제조했을 때 4주간 냉장 저장 시에도 일정한 분산안정성을 나타낸 결과와 다소 차이가 나는 것으로 나타났다.
- 유자 주스(대조군)의 경우 시간에 따라 고형물이 아래로 가라앉는 것을 볼 수 있다. 4주 후에는 상등액 부분이 매우 투명하게 맑아지는 것을 알 수 있었고, 다른 시료에 비해 3개의 층으로 구분지어지기 시작하여 분리되기 시작하였다.

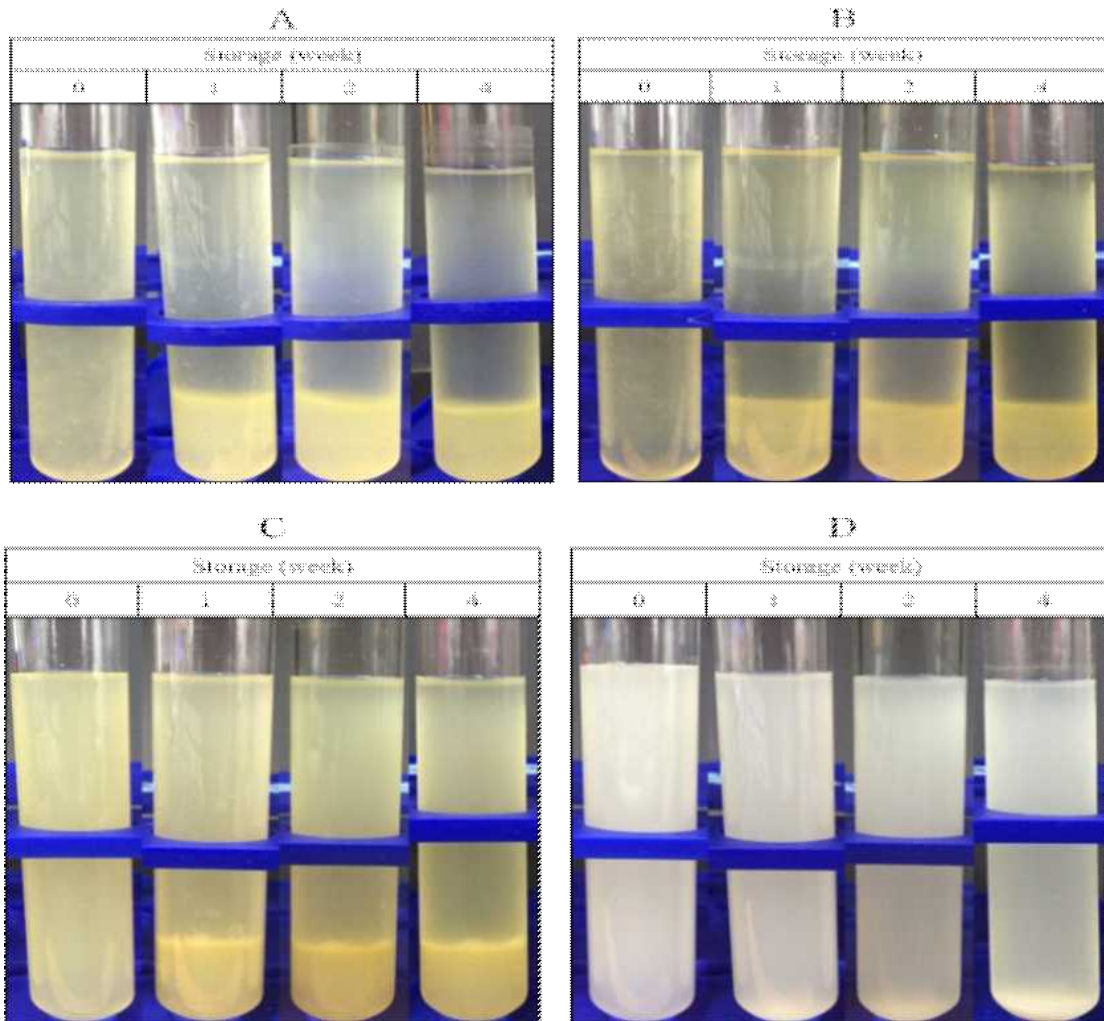


그림 3-1-46. Plant scale로 제조하여 4주간 4℃에서 보관한 어피 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자 음료의 외관;
 A: 유자 음료(대조군), B: 펩타이드 첨가 유자 음료
 C: 펩타이드 리포솜 첨가 유자 음료, D: 리포솜.

- 어피 펩타이드가 첨가된 용액의 경우 노란색이 대조구보다 훨씬 진하게 나타나는 것을 알 수 있었고, 하단에 침전되는 속도도 동일하게 나타나는 것을 알 수 있었다. 따라서 분산안정성에 대해서는 비슷한 현상을 나타내나 전체적인 색이 펩타이드 첨가군의 시료에서 진하게 나타나는 것을 알 수 있었다.
- 어피 펩타이드가 코팅된 리포솜 첨가군의 경우 다소 흰색이 반영되고 불투명한 색을 띠었다. 어피 펩타이드만 보관한 시료의 경우에는 4주후에도 매우 안정적으로 분산되어 있는 것을 알 수 있었다. 이는 ultra-sonicator를 이용한 2차 균질 여부에 따른 것으로 판단된다. 즉, 어피 펩타이드 용액은 연한 노란색을 나타내기 때문에 음료에 첨가되었을 때(B) 대조구(A)보다 음료의 노란색이 더 진하게 관찰되었으며, 어피 펩타이드 리포솜(D)의 흰색으로 인해 음료에 첨가된 음료 C의 색이 대조구보다 탁해진 것을 볼 수 있다.

(2) 저장 기간에 따른 안정성 분석

- 어피 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자음료의 입자 크기, 제타 전위를 저장 기간에 따라서 측정된 결과를 그림 3-1-47에 나타내었으며, 입자크기 분산도를 그림 3-1-48,49,50,51에 나타내었다.

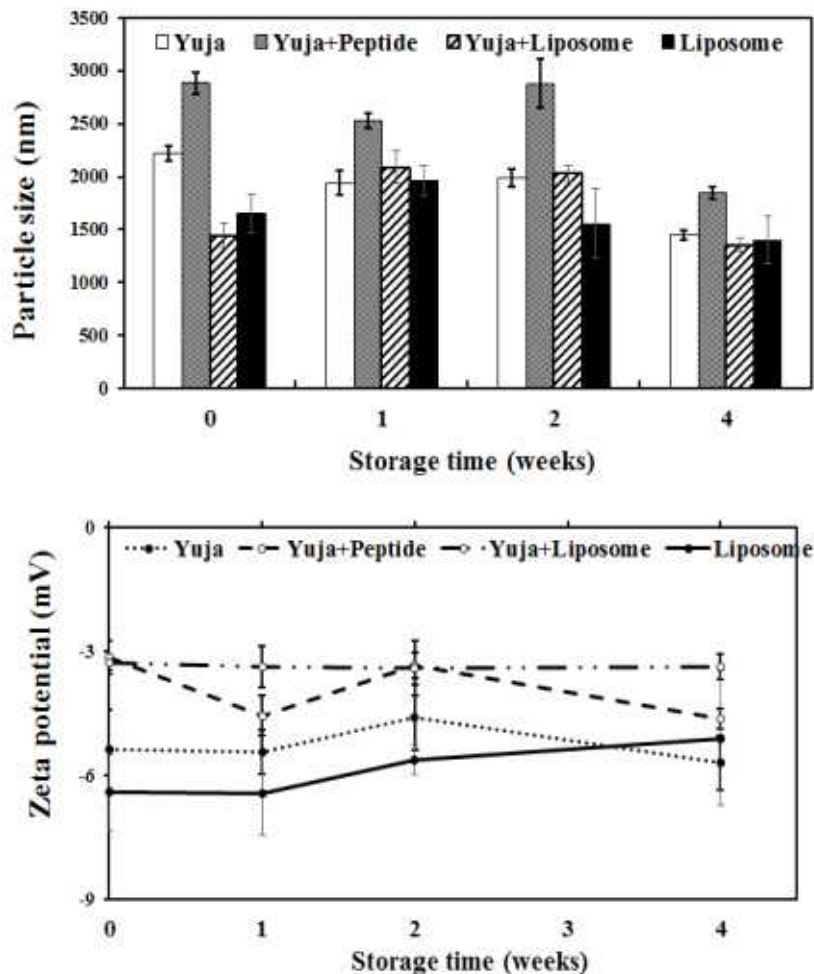


그림 3-1-47. 시간에 따른 입자 안정성.

- 저용량 실험과 마찬가지로 시간이 지날수록 입자 분산도에서 변화가 커지고 있으며, 어피 펩타이드를 첨가한 유자 음료는 2주 이후 다분산상의 형태가 나타났다. 유자의 경우 유자네 내부 고형물의 크기가 다소 감소하여 2 mm에서 1.5 mm까지 크기가 감소하였다.
- 리포솜의 경우 대량 생산 하였을 경우 입자의 크기가 lab 혹은 pilot에 비해 plant scale 용은 1 um 미만으로 제조되지 않았다. 입자의 크기는 저장 시간에 따라 다소 증감하였는데 이는 리포솜 자체의 안정성이 불안정하여 입자 크기가 일정하게 나타나지 않았다. 펩타이드 코팅 리포솜의 경우도 대조구 혹은 리포솜과 유사한 경향을 나타내었다.
- 반면 펩타이드만 포함된 유자의 경우 처음 혼합 시 입자가 가장 크게 나타났고 시간이 3주까지 3마이크로 입자를 유지하다 4주 후에 입자크기가 다소 감소하였다. 이는 lab 단위에서 나타낸 것과 유사한 경향을 나타내었다.
- 리포솜의 경우 제타 전위값은 가장 높은 절대 값을 나타내었는데 랩 단위에서 제조한 제타 값에 비해서 안정성이 떨어지는 수치의 값을 나타내었다. 처리구간 혹은 시간에 따른 제타전위의 변화는 나타나지 않았다.
- 본 실험을 통해서 대량생산 입자의 성공여부보다는 실 제품 적용 후 제품화를 위한 살균 공정과정이 입자의 크기 변화에 영향을 줄 수 있어 열처리에 따른 대량생산 나노입자의 안정성에 대해서 알아보았다.

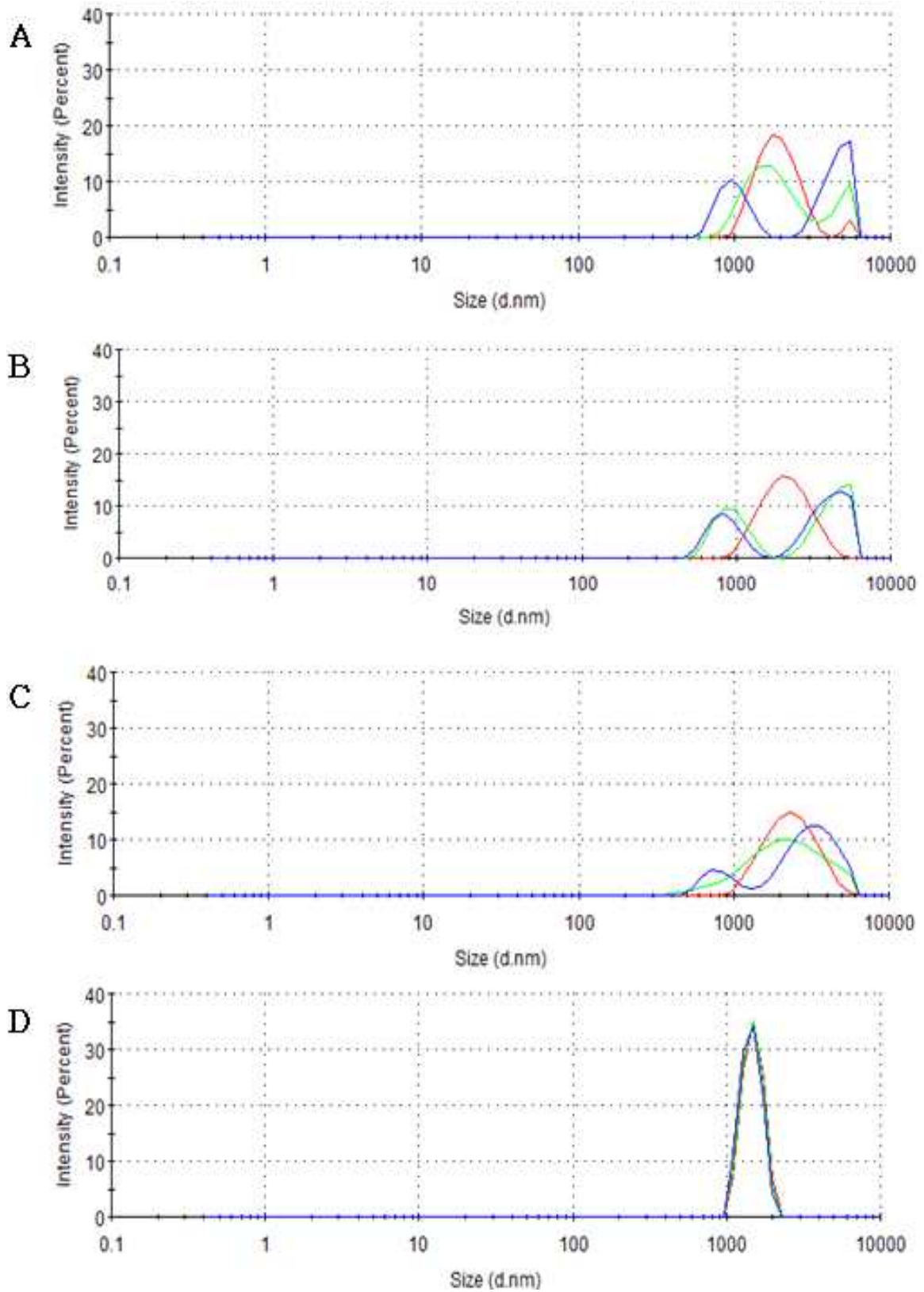


그림 3-1-48. 저장 기간에 따른 유자 음료(1 L)의 분산도;
A: 0주, B: 1주, C: 2주, D: 4주.

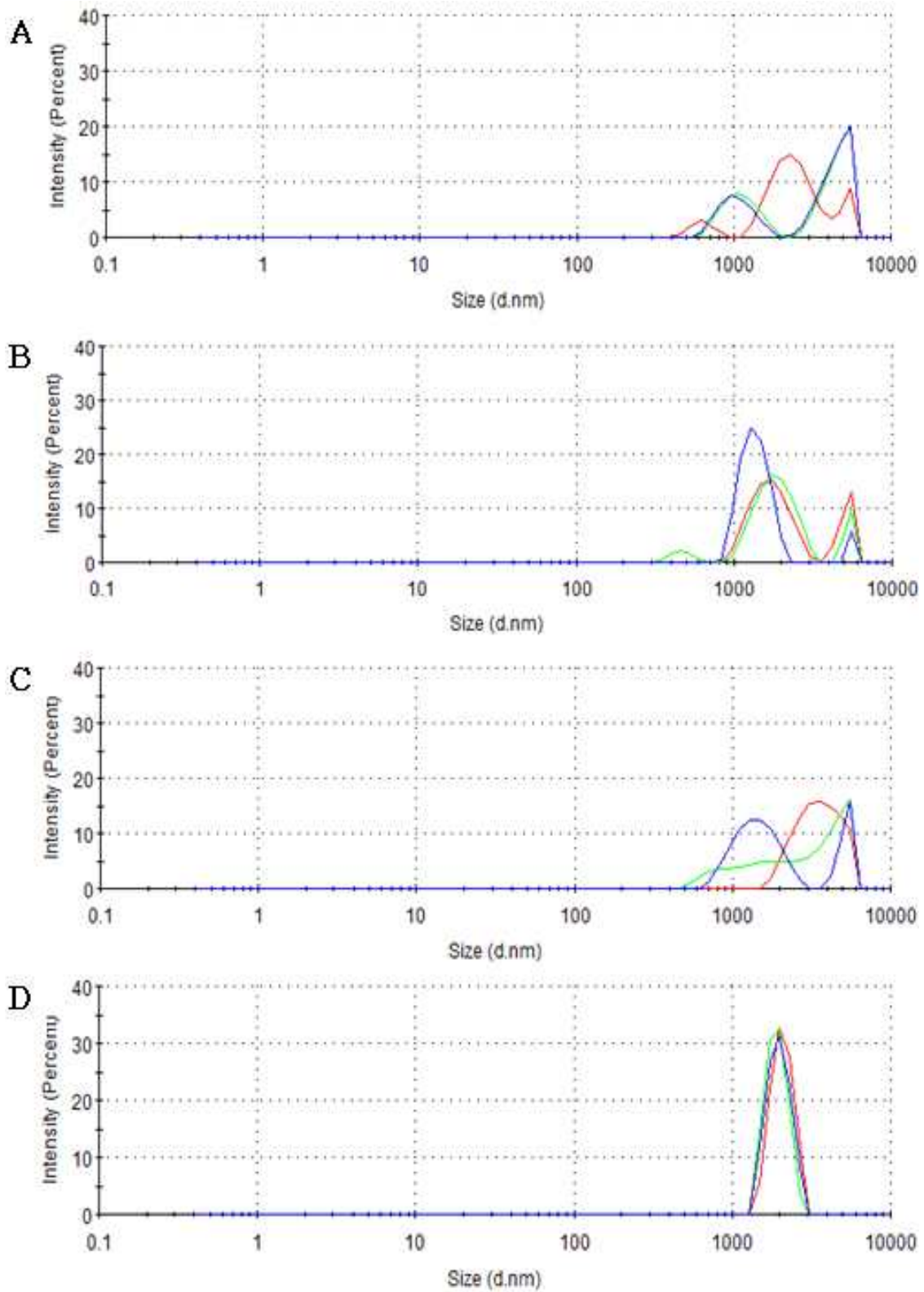


그림 3-1-49. 저장 기간에 따른 펩타이드 첨가 유자 음료(1 L)의 분산도;
 A: 0주, B: 1주, C: 2주, D: 4주.

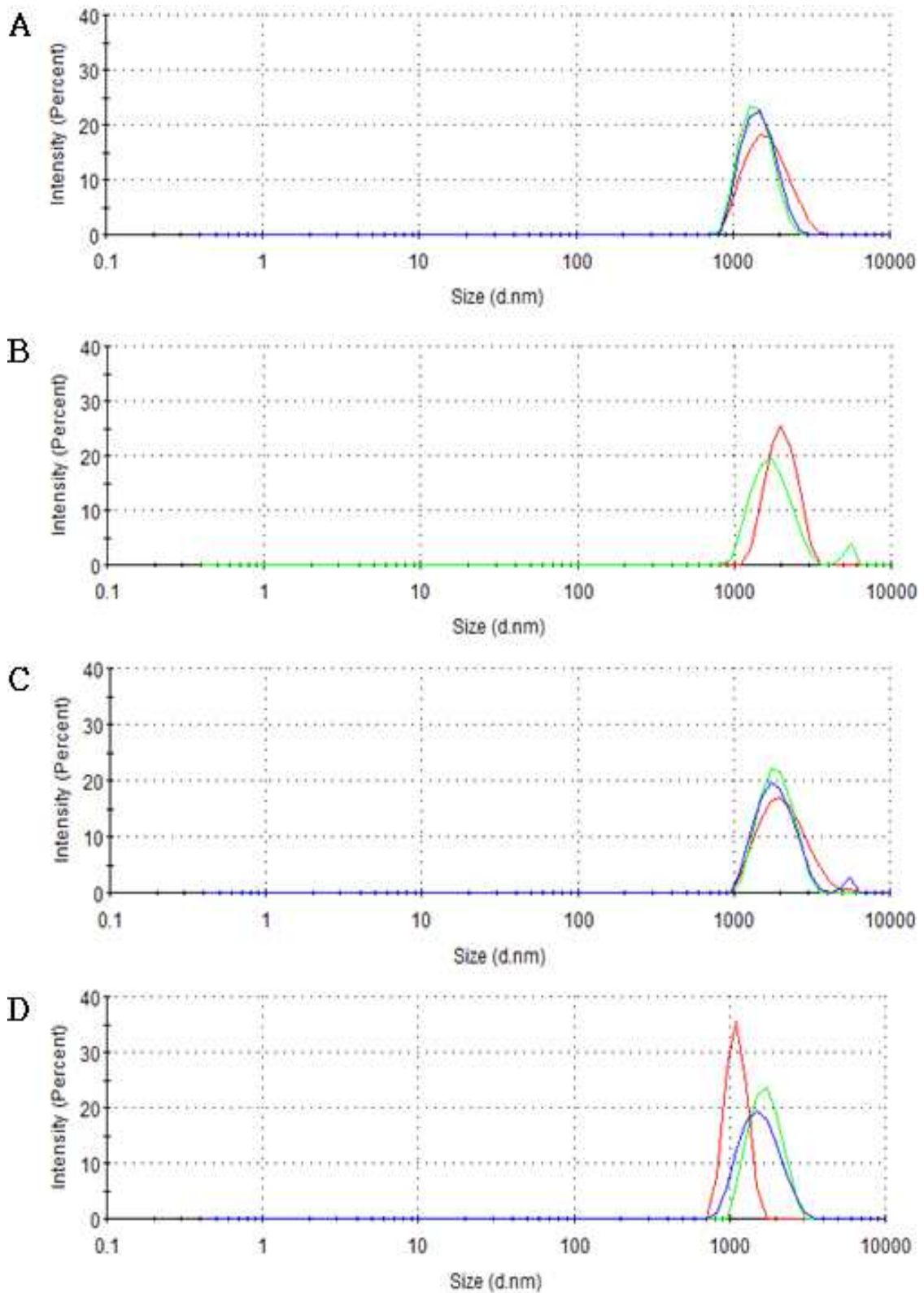


그림3-1-50. 저장 기간에 따른 펩타이드 리포솜 첨가 유자 음료(1 L)의 분산도;
A: 0주, B: 1주, C: 2주, D: 4주.

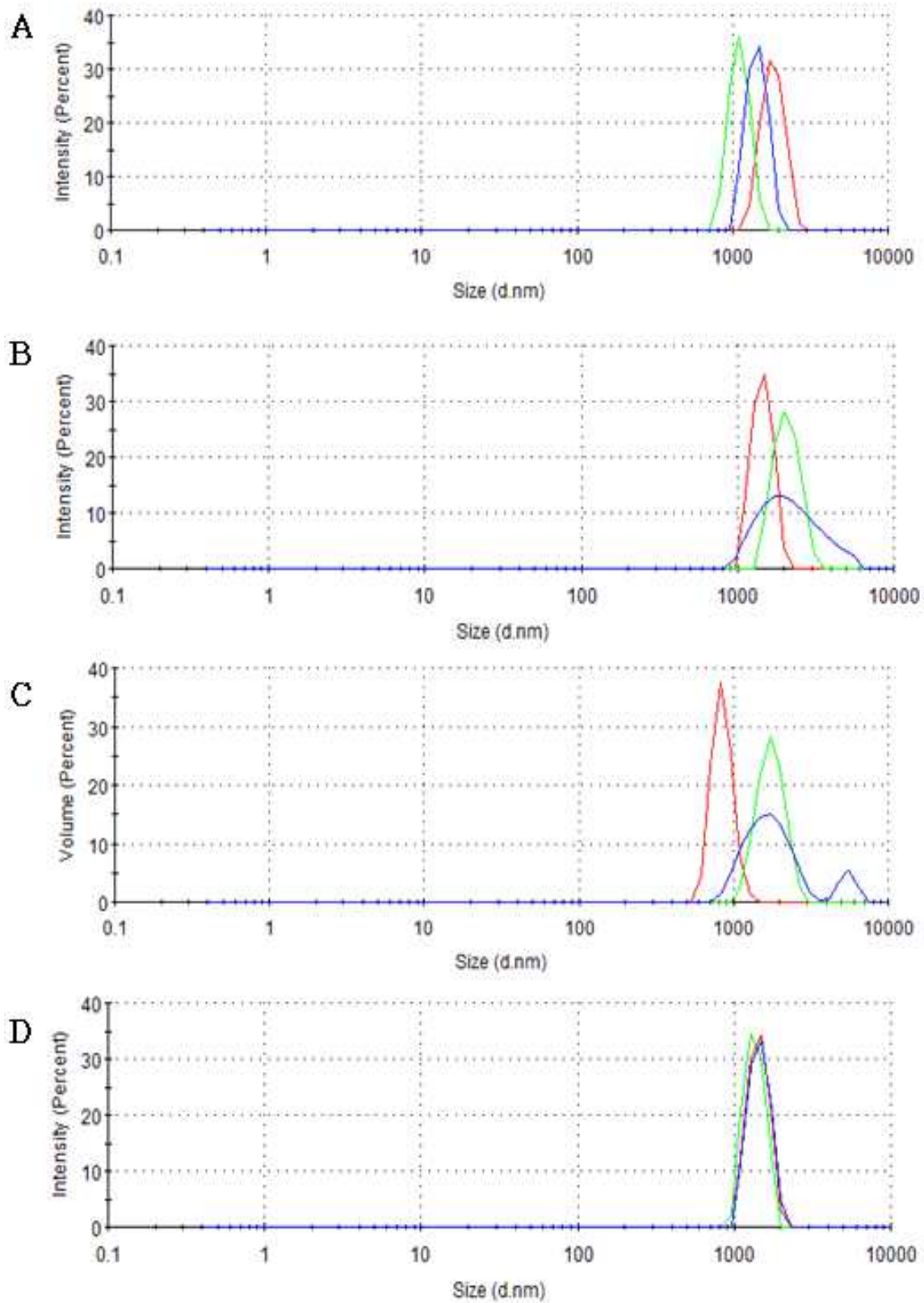


그림 3-1-51. 저장 기간에 따른 리포솜(1 L)의 분산도;
 A: 0주, B: 1주, C: 2주, D: 4주.

(3) 가열 조건에 따른 어피 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자 음료 제조 및 안정성 분석

- 어피 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자 음료의 입자 크기, PdI와 제타 전위를 저장 기간에 따라서 측정한 결과를 그림 3-1-52에 나타내었다.
- 입자크기 분산도는 대부분 가열 후 분자량 영역대가 분산되는 모습을 보였으나, 어피 펩타이드 리포솜 시료에서 98℃, 3 min 처리하였을 때 가열 전과 비교해서 가장 유지가 잘 되는 경향을 보였다.
- 가열 처리 후 모든 시료에서 제타 전위는 큰 차이가 없었으며 따라서 열처리에 따른 내부 단백질의 변성은 크게 일어나지 않은 것으로 생각되며, 가열 전과 비교하여 입자크기가 증가하였다.

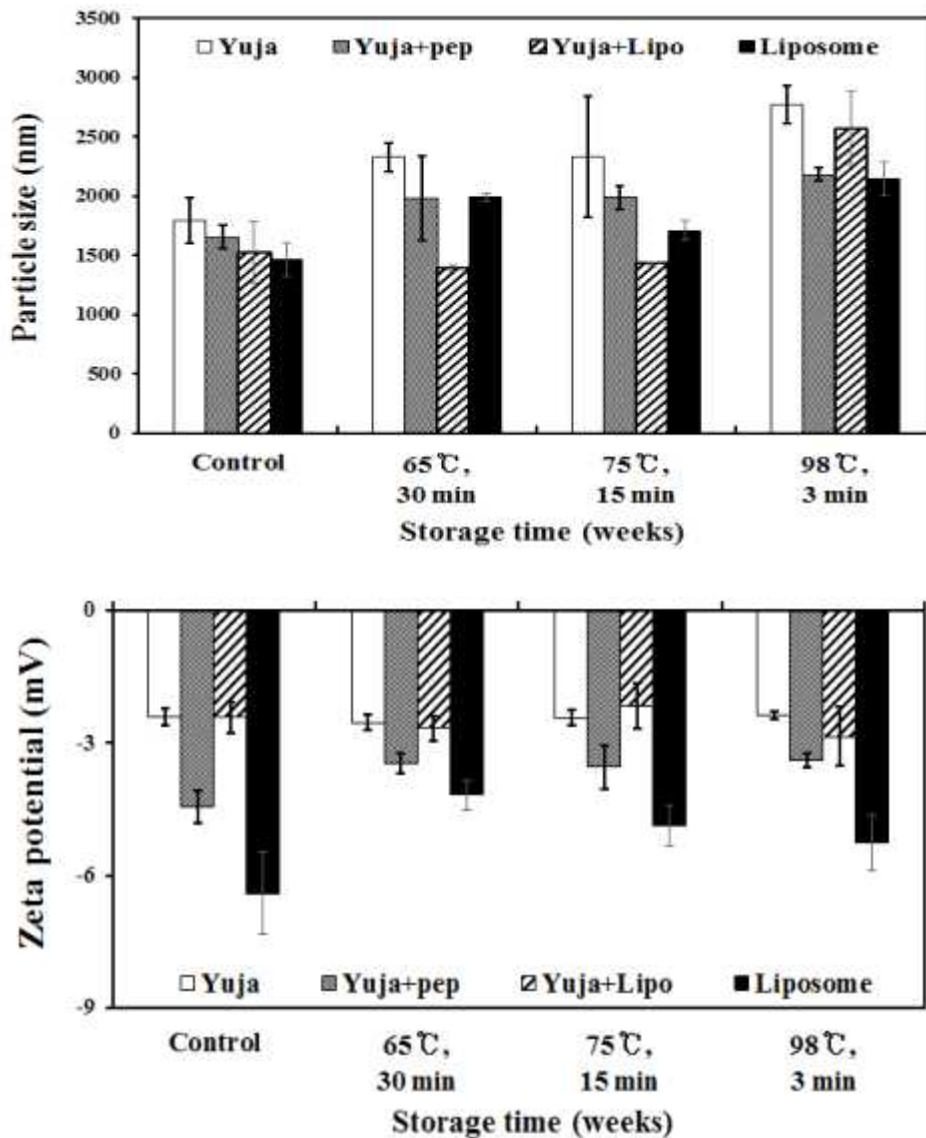


그림 3-1-52. 살균조건에 따른 유자시료들의 입자 크기 및 제타전위 변화.

(4) 제조 용량에 따른 어피 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자 음료 이화학적 특성 비교

- 이제까지의 용량별 혹은 기타 처리구별 입자크기를 비교분석한 내용을 표 3-1-17에 나타냈다. blank liposome과 비교하였을 때, plant scale로 제조된 입자의 크기가 약 5배로 증가한 것을 알 수 있다. 이는 펩타이드 코팅 유무에 따라 크기 변화에 영향을 주기도 하지만 대량생산으로 하였을 경우 ultrasonification의 처리 정도 혹은 제품 생산 열처리에 따라 입자 크기에 영향을 미쳐 1.2 마이크로로 다소 증가되었다.
- 하지만 펩타이드 코팅 리포솜이 첨가된 plant scale의 유자 주스의 경우 입자의 크기가 1.5마이크로로 유자입자 크기보다 다소 낮게 나타났다.

표 3-1-17. 제조 용량별 유자, 펩타이드 유자, 펩타이드 코팅 리포솜 유자의 이화학적 특성 비교

		총 제조 용량	나노 시료 용량	펩타이드	레시틴	1일 생산량	시제품 타입	입자크기 (nm)	PdI	제타 전위 (mV)
Pilot scale	Blank Liposome	1 L	-	-	10 g	-	-	286.00 ±8.86	0.3 ±0.03	-35.4 ±1.70
	Yuja		-	-				2878.33 ±136.96	0.19 ±0.06	-2.3 ±0.26
Lab scale	Yuja+		60 g	-				2273.33 ±64.05	0.32 ±0.04	-2.43 ±0.05
	Pep	1 L				-	-	2573.67 ±306.44	0.31 ±0.02	-3.43 ±0.41
	Yuja+		60 g	5 g				1248.00 ±200.00	0.24 ±0.08	-5.34 ±0.30
	Lipo		120 g	10 g				2223.00 ±69.07	0.39 ±0.14	-5.36 ±0.96
Plant scale	Yuja		-	-				2883.67 ±101.50	0.44 ±0.05	-3.15 ±0.40
	Yuja+		600 g	-			과우치	1444.33 ±115.42	0.18 ±0.05	-3.27 ±0.18
	Pep	10 L				0.5 ton	(120 mL)	1652.00 ±183.77	0.93 ±0.12	-6.41 ±0.93
	Yuja+		600 g	50 g			/병			
	Lipo		1200 g	100 g			(180 mL)			

8. 안정성 증진을 위한 이중층 올리고 펩타이드 리포솜 제조

- pH 3 acetate buffer를 사용하여 농도별로 제조한 키토산 용액과 기존의 방식으로 제조한 리포솜을 1:1(v/v)로 stirrer를 사용하여 1시간 동안 혼합하여 층을 형성한다.
- 3중 레이어 리포솜을 제조하기 위해 농도가 고정된 키토산-어피 펩타이드 리포솜(CHI Lipo)과 카라기난(Car, Sigma, St Louis, MO, USA), HMP(High methoxyl petin, Sigma, St Louis, MO, USA), SA(Sodium alginate, Sigma, St Louis, MO, USA)을 사용하여 다중층 펩타이드 리포솜을 제조하였다.

가. Pilot scale(1 L)의 다중층 어피 펩타이드 리포솜 제조

- pH 3 acetate buffer를 사용하여 농도별로 제조한 키토산 용액과 기존의 방식으로 제조한 리포솜을 1:1(v/v)으로 stirrer를 사용하여 1시간 동안 혼합하여 층을 형성한다.
- 3중 레이어 리포솜을 제조하기 위해 농도가 고정된 키토산-어피 펩타이드 리포솜(CHI Lipo)과 카라기난 용액을 2:1(v/v)로 혼합하여 층을 형성한다.
- 3중 레이어 리포솜을 제조하기 위해 농도가 고정된 키토산-어피 펩타이드 리포솜과 HMP (High methyl pectin) 용액을 2:1(v/v)로 혼합하여 층을 형성한다.
- 3중 레이어 리포솜을 제조하기 위해 농도가 고정된 키토산-어피 펩타이드 리포솜과 Sodium Alginate 용액을 2:1(v/v)로 혼합하여 층을 형성한다.
- 입도분석기(Zeta-sizer ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK)를 이용하여 어피 펩타이드 리포솜의 입자 크기 및 제타 전위 값을 4주 동안 측정하였다. 이 때 모든 분석은 3회 반복 시행하였다.

나. 외관 관찰

- 다음 그림 3-1-53에 키토산 코팅한 어피 펩타이드 리포솜의 외관을 제시하였다. 어피 펩타이드 리포솜에 키토산을 코팅하였을 때 기존에 노란 빛이던 색이 흰색으로 변하였으며, 육안으로 확인되는 입자들이 존재하였다.

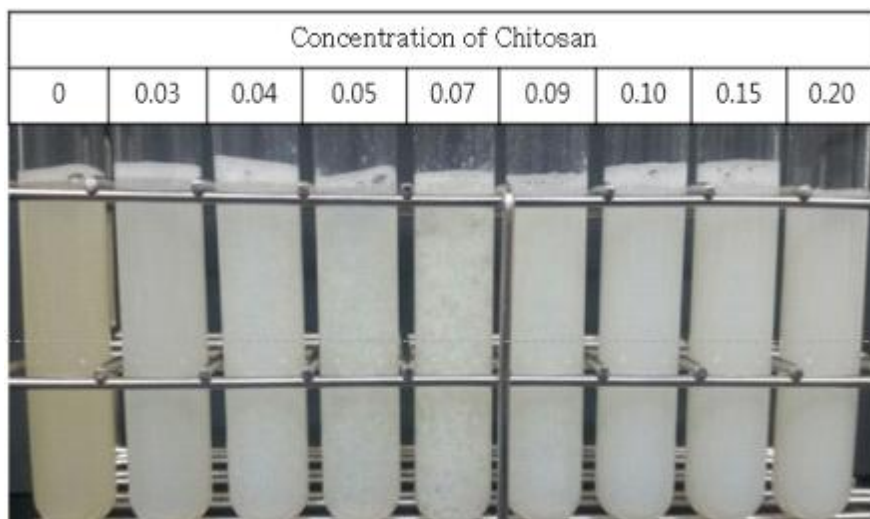


그림 3-1-53. 키토산 농도에 따른 키토산 어피 펩타이드 리포솜.

다. 대량생산 시 입자크기 및 제타전위

- 대량 생산하였을 때 어피 펩타이드 리포솜의 외관은 Lab 단위에서 나타나는 현상과 유사한 결과를 나타냈다. 또한 키토산의 최적농도를 알아보기 위해 입자크기와 제타전위를 측정하여 아래 그림 3-1-54에 나타내었다.
- 키토산 농도가 증가할수록 리포솜의 입자 크기가 증가하였으며, 제타 전위의 경우, 농도가 0.1% 이상으로 올라가도 더 이상 제타전위의 큰 변화가 나타나지 않았다. 이에 따라서 키토산의 농도를 0.1%로 설정하여 실험을 진행하였다.
- 대량생산에서 다중 막을 형성하기 위해서는 랩 단위에서와 마찬가지로 크기와 함께 제타전위 값이 매우 중요한 의미를 차지한다. 키토산의 양이온 차지를 증대 시키고 입자의 크기가 일정하게 나오기 위해서 최적 농도를 잡아주어야 하는데 일반적으로 제타 값이 변화가 없고 입자 크기가 일정한 지점의 농도를 기준으로 설정한다.

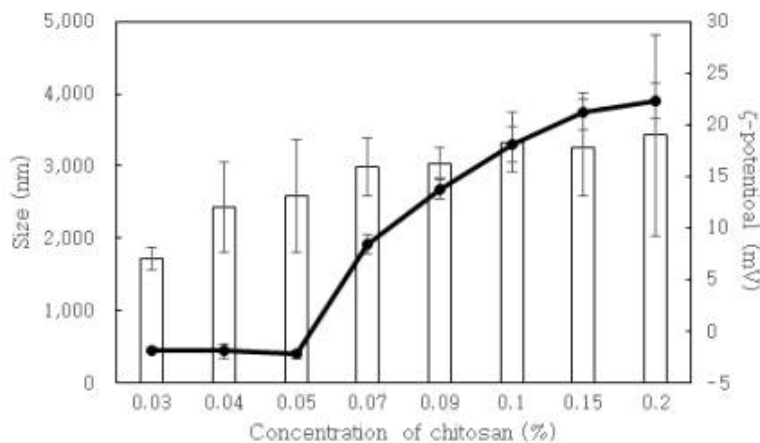


그림 3-1-54. 키토산 농도에 따른 입자크기 및 제타 전위.

- 다음 그림 3-1-55에 각각 Car, HMP, SA 1% 용액 및 리포솜과 혼합하여 3중 층을 형성한 리포솜의 외관을 제시하였으며, 다음 그림 3-1-56에 각 용액의 입자 크기 및 제타전위를 제시하였다. 외관으로 보았을 때 HMP가 가장 분산이 잘된 것으로 보이며, 다른 용액에 비해서 입자크기가 적은 것을 관찰할 수 있었다.

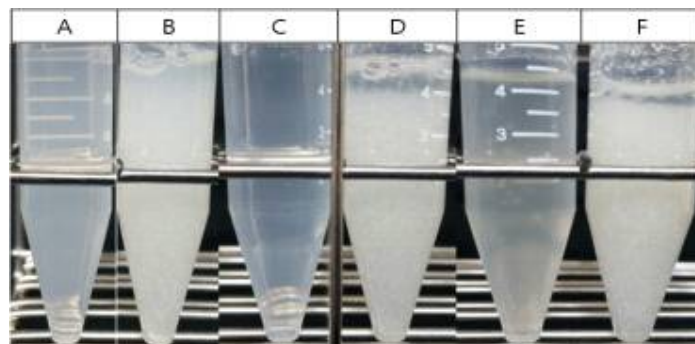


그림 3-1-55. A: 1% HMP 용액, B: 1% HMP 용액을 첨가한 키토산 코팅 리포솜, C: 1% SA 용액, D: 1% SA 용액을 첨가한 키토산 코팅 리포솜, E: 1% Car 용액, F: 1% Car 용액을 첨가한 키토산 코팅 리포솜의 외관.

- 다음 그래프(그림 3-1-56)에 1% Car, HMP, SA 용액의 입자 크기 및 제타 전위를 나타내었다. SA용액의 입자크기가 크기가 너무 커서 SA는 제외하고 이후 실험을 진행하였다.

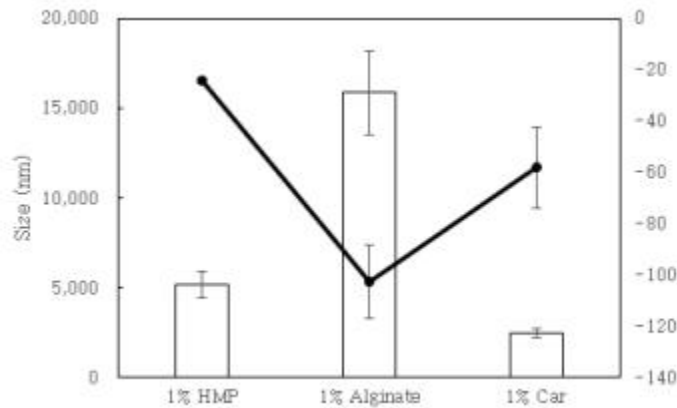


그림 3-1-56. 1% Car, HMP, SA 용액의 입자 크기 및 제타 전위.

- 다음 그래프(그림 3-1-57)에 카라기난과 HMP 용액을 농도별로 리포솜에 코팅하여 3중 레이어를 형성한 리포솜의 입자 크기, PdI 및 제타전위를 제시하였다. 카라기난의 경우, 0.25%에서 입자크기가 높게 나타났는데 이는 측정 중에 코팅된 입자가 침전되어 입자 크기가 높게 나타난 것으로 생각된다. 또한 입자의 분산도를 나타내는 PdI 값이 0.25 HMP로 가장 낮게 나타났다. 입자 전위는 카라기난 보다 HMP를 코팅한 리포솜에서 절대 값이 더 높게 나타났다. 이를 통해서 0.25 HMP 코팅 리포솜을 최적으로 설정하여 이후 실험을 진행하였다.

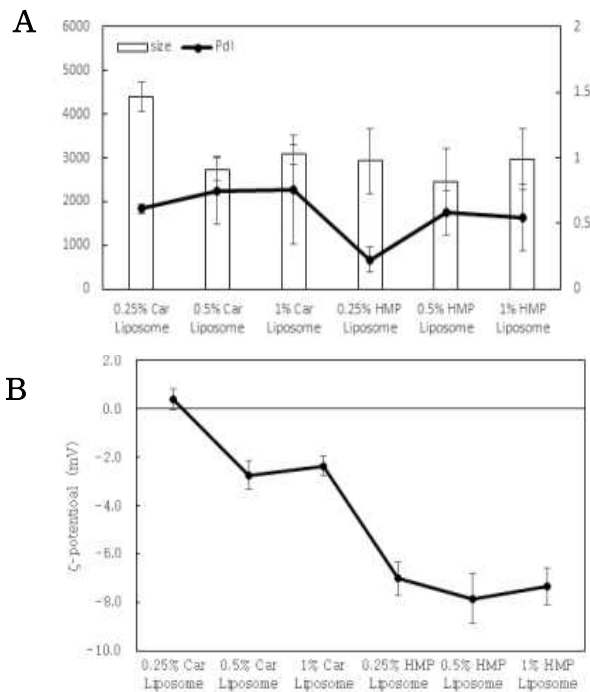


그림 3-1-57. Car, HMP, SA을 농도별로 혼합한 리포솜의 입자크기, PdI (A) 및 제타 전위 (B).

라. 제조량에 따른 입자크기 비교

○ 다음 표 3-1-18에서 레이어 코팅 횟수에 따른 리포솜을 비교하였다. 총 제조 볼륨을 10 L로 하여 제조하여 비교하였으며, 각 시료의 양과 입자 크기, PDI 및 제타 전위를 비교하였다.

표 3-1-18. 레이어 코팅 횟수에 따른 리포솜의 비교

	Lab scale			Liposome	Plant scale	
	2% FC Liposome	0.5% CHI Liposome	0.1% HMP Liposome		0.1% CHI Liposome	0.25% HMP Liposome
총 제조 용량	1 L				10 L	
나노 시료 양						
- 펩타이드	10 g	5 g	3.33 g	1200 g	600 g	400 g
레시틴	20 g	10 g	6.66 g	100 g	50 g	33.33 g
키토산	-	2.5 g	1.66 g	-	5 g	3.33 g
HMP	-	-	0.33 g	-	-	8.33 g
입자 크기	470.48 ±65.54	1208.15 ±523.32	1089.54 ±198.37	2774.33 ±163.10	3332.67 ±415.32	2935.50 ±743.17
PDI	0.37 ±0.02	0.74 ±0.09	0.93 ±0.35	0.33 ±0.02	0.42 ±0.14	0.22 ±0.10
입자 전위	-34.89 ±2.54	30.54 ±0.87	-39.54 ±3.43	-2.38 ±0.08	18.13 ±1.72	-7.03 ±0.70

9. 아임계 처리된 어류 추출물의 향미 성분 masking 실험

- 1차 년도에서 수행했던 나온 결과물인 아임계 추출물을 유자 추출액에 넣고 제조한 결과 이미 이취가 발생하지 않아 유자추출물 혼합하지 않고 추출물 자체의 코팅방법 적용을 통한 향미성분 masking 실험을 진행하였다.
- 아임계 처리된 어류 추출물의 이취 성분 masking을 위한 코팅 기술 적용을 위해 두 가지 방법의 코팅 기술을 적용 시켜 안전성을 확인하였다.
- Emulsion-diffusion 방법과 b-CD inclusion 방법을 통해 어류 추출물에 남아있는 이취 성분을 코팅기술을 통해 제조하여 유자 추출물에 적용하여 이화학적 특성을 분석하였다.

가. 어피 펩타이드 코팅 막 제조 및 분석

- Emulsion-Diffusion 방법: polycaprolactone(PCL)과 올리고펩타이드가 녹은 oil 성분을 ethyl acetate와 증류수로 상호 포화된 용액에 유화제를 섞어 제조하여 1차 emulsion 입자를 제조한 뒤, 다량의 증류수를 넣어 diffusion을 유도하여 코팅 막과 입자크기를 작게 하여 나노입자를 제조한다(그림 3-1-58).

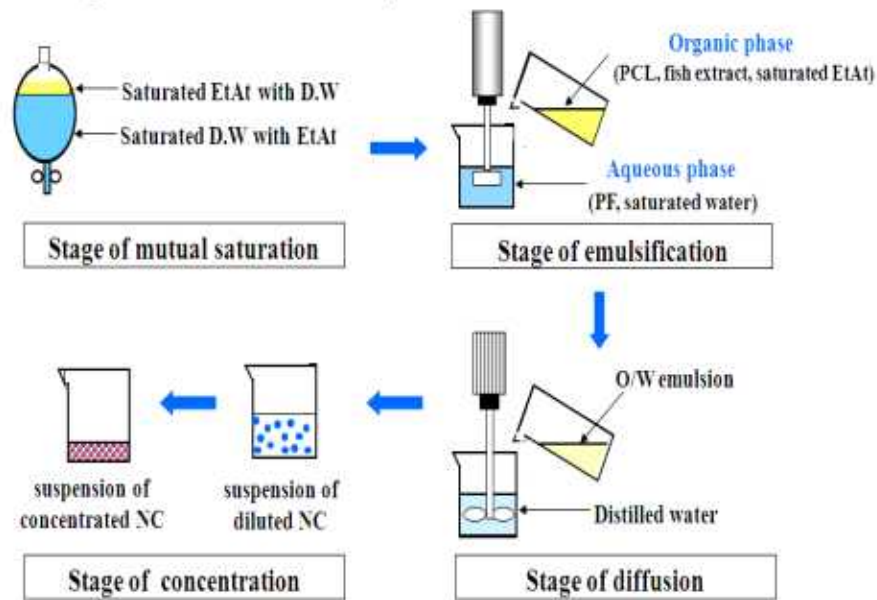


그림 3-1-58. Emulsion-Diffusion 코팅 방법.

- b-CD inclusion 방법은 적정량의 CD용액과 어피 올리고 펩타이드를 혼합하여 2시간 stirring 시키면 CD 링 안으로 이미 성분이 inclusion되어 이취 성분을 masking시킨다 (그림 3-1-59).

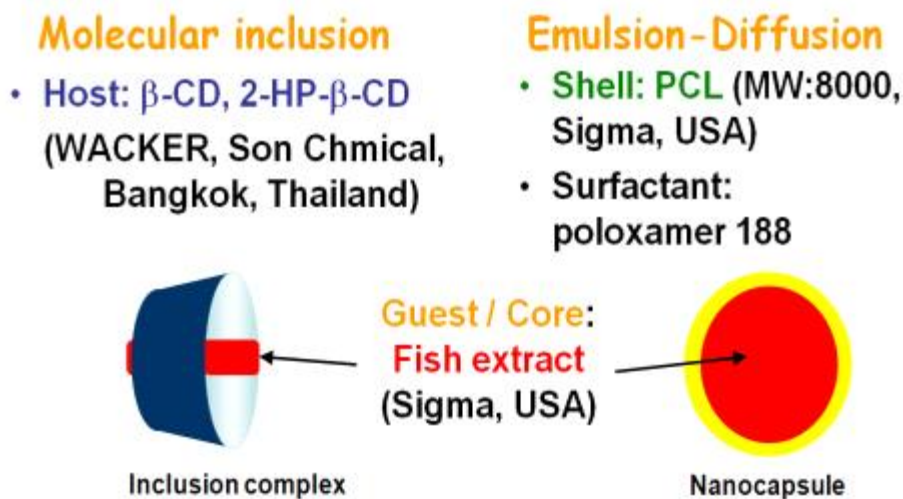


그림 3-1-59. CD inclusion 방법.

- 앞에 기술된 방법으로 크기를 측정한다. UV-spectrophotometer를 통해 어피 올리고 펩타이드의 코팅 효율을 측정한다. wavelength 358 nm에서 측정하여 추출물 코팅 효율을 측정한다.
- TEM을 통해 입자의 코팅막 유무 및 입자 모양에 대해 관찰하였다.
- 각각 코팅된 입자들을 저장 조건에 따라 안정성을 분석하여 향미 성분 용출 속도, 저장 후 입자크기를 측정하였다. 24시간 동안 서로 다른 소금물 농도 및 멸치액젓에 넣고 실험하여 저장 용액별 용출속도를 살펴보았다.

- 추출물의 산화안정성을 살펴보기 위하여 TPA를 통해 코팅 입자의 어류 추출물의 산화안정성을 분석하였다.

(1) 제조된 코팅 입자들의 크기, 제타전위

- 전체적으로 코팅 막과 어류 추출물간의 혼합비에 따른 제조 방법에 따른 입자크기에 다소 차이가 나타났다. 어류추출물의 농도가 증가할수록 입자의 크기는 CD inclusion 방법에서 약 300 nm에서 700 nm까지 증가하였고, 반면 Emulsion-Diffusion(이하 ED)에서는 입자의 크기는 200 nm크기로 균일하게 나타났다(표 3-1-19).
- 분산 분포도의 다분상 혹은 단분산상의 척도를 나타내는 PDI값은 입자의 크기가 클수록 PDI 값이 증가하여 다분상 경향을 나타냈었고, ED의 경우 농도와 상관없이 PDI 값이 0.1-0.2를 나타내어 고르고 균일한 입자크기를 나타내었다.
- 입자의 저장 안정성을 예측할 수 있는 제타전위 값은 절대 값이 매우 큰 의미를 부여하는데, CD를 이용한 방법에서는 농도에 따라 절대 값이 증가하여 ED 방법에 의한 코팅 기술 보다 안정성이 높게 나타났다.

표 3-1-19. 어류 추출물 코팅 방법에 따른 입자크기, PDI, 제타 전위값

	Mass ratio (w/w)	Z-Average (d.nm)	PdI	Zeta Potential (mV)
b-CD:FE	10:1	261.52±17.02	0.48±0.03	-28.82±0.05
	10:5	259.01±22.21	0.45±0.08	-27.72±0.52
	10:10	356.59±22.01	0.52±0.03	-27.57±1.11
	10:20	700.12±72.12	0.74±0.10	-32.31±1.29
PCL:FE	2:1	200.72±5.89	0.21±0.03	-0.45±0.11
	2:2	172.02±5.21	0.15±0.03	-3.81±1.20
	2:3	200.71±2.10	0.14±0.03	-5.60±0.55

(2) 코팅효율 측정

- 코팅 효율(encapsulation efficiency)은 첨가된 어류 추출물의 양 대비 코팅 적용된 양의 비율을 나타내는 것으로 CD 코팅의 경우 어류 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 코팅 효율은 낮아졌다. 코팅 막과 어류 추출물의 양 대비로 생각했을 때 1대1로 혼합 시 많은 양의 어류 추출물을 코팅할 수 있고, 양 대비 효율성이 좋은 것으로 사료 된다. 반면 loading content는 제조된 입자의 양 대비 코팅되어 있는 어류 추출물의 양을 계산한 내용으로 많은 농도의 어류 추출물이 포함된 시료에서 효율이 높은 것으로 나타났다(표 3-1-20).
- ED이 적용된 코팅 입자에서는 코팅 막과 어류 추출물의 양 대비 상관없이 99%의 높은 코팅 효율을 나타내었다. 이는 ED 방법이 지니고 있는 제조 방법 특성상 한번 형성된 emulsion에서 녹아 있던 코팅 막 PCL이 어류 추출물 표면에 추출되면서 입자를 코팅하게 되어 높은 코팅효율을 나타냈었다. loading content는 전체적으로 CD방법에 비해 높

은 값을 나타내었고, 농도가 증가함에 따라 이 값도 함께 증가하는 것을 알 수 있었다. ED의 경우가 코팅 효율 적인 면에서는 CD보다 우수한 것으로 사료된다.

표 3-1-20. 어류 추출물 코팅 방법에 따른 encapsulation efficiency와 loading content (LE) 계산 값

	Mass ratio (w/w)	Encapsulation efficiency (%)	Loading content (%)
b-CD:FE	10:1	87.26	8.03
	10:5	86.56	30.21
	10:10	85.32	46.04
	10:20	84.05	62.70
PCL:FE	2:1	99.52	33.30
	2:2	99.831	50.04
	2:3	99.86	60.05

(3) 입자 형태 관찰

- 입자의 코팅 막 유무 형성을 관찰하기 위해서 투과전자현미경을 통해 입자를 관찰하였다. 그림의 첫 번째 두 번째 사진은 CD와 어류추출물의 1:1 혼합비를 관찰한 것으로 내부 진하게 나타난 검은 부분은 어류 추출물이고, 외부에 옅은 부분은 CD의 코팅 막으로 관찰되어 진다(그림 3-1-60).
- 이에 반해 ED로 관찰한 입자의 경우 PCL로 코팅되어진 얇은 코팅 막을 관찰 할 수 있었다. 대체적으로 입자의 형상이나 크기는 본 연구자가 수행했던 선행연구 결과의 입자 형성과 동일한 결과를 나타내었다. 특히 CD의 경우 1차 inclusion 후 재 입자 형성 (aggregation) 과정을 통해 육각형의 입자를 형성하였다는 선행연구와 일치되었다.

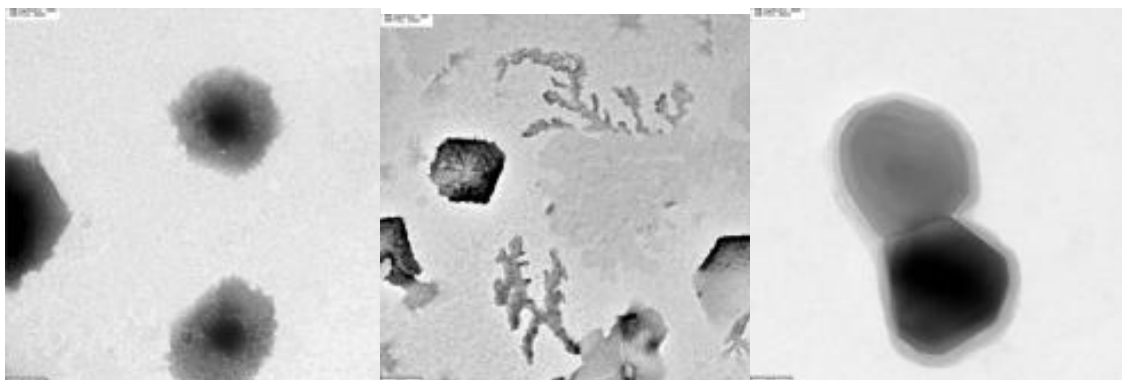


그림 3-1-60. TEM images, first picture & middle picture: CD:FE (1:1), last picture: PCL:FE (1:1)

(4) 용출속도를 통한 코팅 안정성 분석

- 각각 서로 다른 농도에서 제조된 시료를 증류수, 15%, 25% 소금물과 fish sauce에 넣어서 용출실험을 실시하였다.
- CD코팅의 경우 전체적으로 15%의 소금물에서 용출속도가 가장 느려 안정적인 특성을 보였다. 하지만 코팅 막과 어류 추출물간의 비율에서는 10:10으로 코팅한 경우 가장 많은 양이 코팅 막 안에 포함되어 있어 가장 안정적인 것을 알 수 있었다. 이는 masking이 효과적으로 이루어져 외부로 유출되는 양이 매우 작다는 것을 의미한다. 그리고 증류수에서 안정적이었고, 실제 제품인 fish sauce에서는 매우 불안정하여 코팅 막 안에 포함되어 있는 양이 가장 적은 것을 알 수 있었다. 특히 10:20의 혼합비에서는 2시간 후 절반 이상이 외부로 유출되어 나와 masking이 유지되지 않은 것을 알 수 있었다(그림 3-1-61).
- ED법으로 코팅 한 입자의 경우에는 fish sauce에서 가장 안정적으로 나타났다고, 15%, 25의 시료 순으로 나타났다. 전체적으로 24시간 후에도 약 95% 정도 코팅 막 안에 보존되어 있어서 CD코팅 법에 비해 효과가 좋은 것을 알 수 있었다.
- 이러한 결과를 통해서 후에 음료나 제품을 제조 시에 확대 적용할 수 있으리라 사료된다.

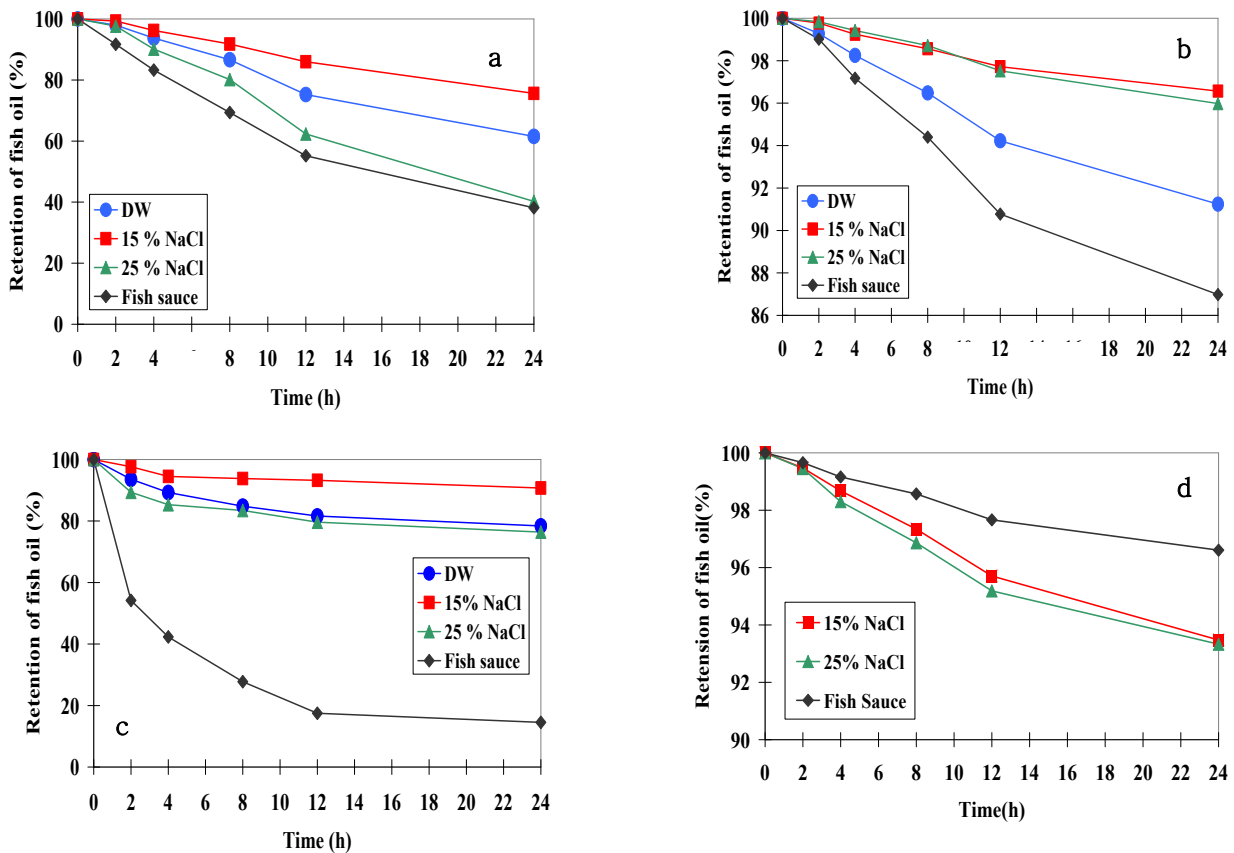


그림 3-1-61. Effect of external phase type on the release of fish oil, (a) b-CD:FO=10:1, (b) b-CD:FO=10:10, (c) b-CD:FO=10:20, and (d) PCL:FO=200:300.

10. 식약처에서 권고된 나노식품 규정에 부합될 수 있는 소재 개발

가. 식품 원료용 나노 제형화 된 펩타이드 리포솜 입자 개발

- 어피 펩타이드 리포솜 나노입자 개발 시 사용되는 모든 성분은 식품용으로 허가된 물질인 lecitin, 펩타이드, 물만을 사용한다.
- 이중층 입자 제조에서도, 카라기난, 펙틴, chitosan은 모두 식품용으로 사용되는 물질로 안전한 식품원료이다.

나. 1협동 연구 결과를 토대로 한 독성 결과

- 다만 이들을 이용하여 나노입자로 제조 되었을 시 나노 크기가 지닐 수 있는 독성에 대한 부분 1협동연구팀의 결과를 토대로 MTT assay를 실시한 후 아무것도 첨가하지 않은 세포와 비교하여 세포 생존율을 계산하였으며, 20% 유자+펩타이드 샘플을 제외하고 모든 조건에서 80% 이하의 세포 생존율을 나타내었다.
- 컨트롤로 사용된 아무것도 첨가하지 않은 유자 고형물에서도 80% 이하의 생존율을 보인 것을 통해, 펩타이드나 리포솜에 의한 세포독성으로 보기는 어렵다.

다. 소화 모방실험을 통한 효능 검증

(1) 소화 모방 용액 제조

- 아래의 표(표 3-1-21)대로 소화액을 제조하였고, 샘플에 Saliva를 첨가하여 37℃에서 1분간 반응시킨 후 gastric juice를 첨가하여 2시간 반응, duodenal juice와 bile juice를 첨가하여 다시 2시간 동안 반응을 시켰다. 각각의 단계에서 샘플을 채취하여 filter paper로 여과한 후에 particle size, zeta potential, release rate를 측정하였다.

표 3-1-21. 모방소화용액 제조

	Saliva	Gastric juice	Duodenal juice	Bile juice
Inorganic solution	10 ml KCl 89.6 g/l 10 ml KSCN 20 g/l 10 ml NaH ₂ PO ₄ 88.8 g/l 10 ml NaSO ₄ 57 g/l 1.7 ml NaCl 175.3 g/l 20 ml NaHCO ₃ 84.7 g/l	15.7 ml NaCl 175.3 g/l 3.0 ml NaH ₂ PO ₄ 88.8 g/l 9.2 ml KCl 89.6 g/l 18 ml CaCl ₂ · 2H ₂ O 22.2 g/l 10 ml NH ₄ Cl 30.6 g/l 6.5 ml HCl 37% g/g	40 ml NaCl 175.3 g/l 40 ml NaHCO ₃ 84.7 g/l 10 ml KH ₂ PO ₄ 8 g/l 6.3 ml KCl 89.6 g/l 10 ml MgCl ₂ 5 g/l 180 µl HCl 37% g/g	30 ml NaCl 175.3 g/l 68.3 ml NaHCO ₃ 84.7 g/l 4.2 ml KCl 89.6 g/l 150 µl HCl 37% g/g
Organic solution	8 ml Urea 25 g/l	10 ml Glucose 65 g/l 10 ml Glucuronic acid 2 g/l 3.4 ml Urea 25 g/l 10 ml Glucosamine Hydrochloride 33 g/l	4 ml Urea 25 g/l	10 ml Urea 25 g/l
Add to mixture organic + inorganic solution	290 mg α-Amylase 15 mg Uric acid 25 mg Mucin	1 g BSA 2.5 g Pepsin 3 g Mucin	9 ml CaCl ₂ · 2H ₂ O 22.2 g/l 1 g BSA 9 g Pancreatin 1.5 g Lipase	10 ml CaCl ₂ · 2H ₂ O 22.2 g/l 1.8 g BSA 30 g Bile
pH	6.8 ± 0.2	1.30 ± 0.02	8.1 ± 0.2	8.2 ± 0.2

(2) 펩타이드 코팅 리포솜의 모방 소화실험 결과

- 입속 환경은 1분, 위환경 2시간, 소장환경 2시간으로 하여 랩단위로 제조된 펩타이드가 코팅된 리포솜을 첨가하여 입자크기, 제타를 측정한 결과 입자의 크기는 침과 소장 조건에서는 입자 크기가 100 nm으로 작게 나왔고, 위 조건에서는 400 nm로 크기가 증가 하였다. 강산에 의해서 입자기리 aggregation되는 것으로 사료된다(그림 3-1-62).

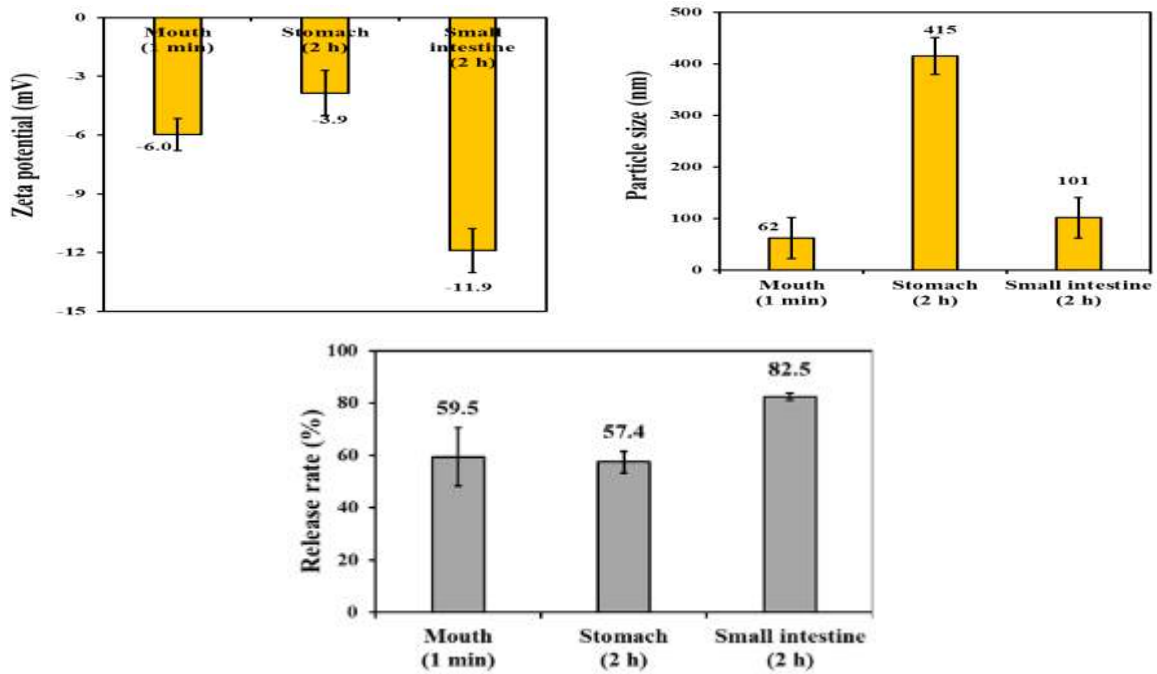


그림 3-1-62. 소화모방 조건에서의 시료 처리 후 입자 크기 및 제타 전위 및 펩타이드 방출속도 실험.

- 제타 전위의 경우 전체적으로 음이온을 띠었고, 소장에서 전위 값이 증가하는 경향을 나타내었다.
- Peptide의 경우 침과 위 조건에서 60%로 방출되고, 소장의 경우 80%정도 방출되는 것을 알 수 있다. 이는 침, 위, 소장을 단계적으로 거쳐 입자의 안정도가 떨어지는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 한편으로 소장에서 펩타이드가 80%가 방출된다는 것은 소장이 주로 흡수 기관임으로 긍정적으로 생각할 수 있으나 침과 위의 경우 50%가 방출되어 이에 대한 효율 증대에 대해서 보강할 필요가 있다.

라. 식약처의 나노 식품에 대한 관련 규정

(1) 소화 모방 용액 제조

- 현재 나노기술을 적용한 식품의 안전성에 대한 식약처의 규제는 2012년 발간된 '나노기술 응용식품 업체자율 안전성평가 가이드라인'에 제시된 '식품의 제조가공에 나노소재를 첨가한 식품의 안전성 평가' 기준을 따르고 있다. 여기에서는 1)나노소재의 함량 및 존재 형태, 2)나노소재의 물리, 화학적 특성 평가, 3)나노소재의 체내 독성동태 평가, 4)나노소재의 독성 평가, 5) 나노소재의 노출량 평가를 수행하도록 권장하고 있다.
- 식약처 가이드라인에 제시된 나노소재의 독성평가 방법 :
 - 나노기술응용식품은 일반적으로 경구 노출에 의한 것이므로 이에 대한 장기 반복투여독성시험 등 많은 연구가 요구된다. 나노소재를 섭취 시 인체에 미치게 될 잠재적인 위해성으로 인해 독성평가를 수행하여야 한다.
 - 독성시험은 나노소재를 시료로 하여 분석한 유전독성시험(복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험), 단위투여 독성시험, 90일 반복투여 독성시험에 관한 자료를 제출해야 한다.

- 상기 실험결과에 따라 필요한 경우에 한하여 생식독성시험, 항원성시험, 발암성시험에 관한 자료를 제출해야 한다. 독성시험은 우수실험실운영규정(Good Laboratory Practice, GLP)에 따라 운영되는 기관에서 실시하고, 식약청의 독성시험기준(의약품등 독성시험기준) 또는 OECD에서 정하고 있는 독성 시험방법(OECD Test Guideline) 또는 이에 준하여 시험하여야 한다.
- 하지만 이는 정부에서 관리하기보다는 **업계자율의 안전성평가에 대한 가이드라인을 제시**하고 있는 실정이다.
- 본 연구에서도 최종적으로 나노기술을 적용한 제품의 상용화를 위해서는 식약처의 새롭게 발표될 ‘나노기술응용식품의 안전성 평가지침’에 따라 안전성 평가 항목을 모두 수행하여 기준에 맞는 상품을 개발하려고 계획한다.

위대한 여정 새로운 도약



식품의약품안전평가원



수신 수신자 참조
(경유)

제목 전문가 자문회의 개최

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 우리 과에서 마련 중인 ‘나노기술응용식품 안전성 평가지침(안)’에 대한 자문회의를 아래와 같이 개최하오니 참석하셔서 귀중한 의견 주시기 바랍니다.

- 일 시 : 2016. 8. 17.(수), 15:30 ~ 17:30
- 장 소 : 공향철도 서울역 회의실 AREX-II(서울 중구 소재)
- 내 용 : ‘나노기술응용식품 안전성 평가지침(안)’ 검토 및 의견 수렴. 끝.

식품의약품안전평가원장

수신자 김영록 교수(경희대 식품공학과), 송남웅 박사(한국표준과학연구원), 임수진 교수(세종대 바이오융합공학 학과), 최미정 교수(건국대 생명자원식품공학과), 김종태 박사(한국식품연구원), 김준태 교수(계명대 식품가공학과), 이성준 교수(고려대 식품공학과)



주무관 **곽지연** 연구관 대결 2016. 8. 10. 신소재식품과 전결
이우영 과장

협조자

시행 신소재식품과-2390 (2016. 8. 10.) 접수

우 28159 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 / www.nifds.go.kr

전화번호 043-719-2356 팩스번호 043-719-2350 / kjdus5@korea.kr / 비공개(5)

소통하는 투명한 정부, 정부3.0으로 함께 만들어 가겠습니다.

11. 어피 펩타이드 및 리포솜의 염색 방법에 따른 TEM (Transmission electron microscopy) 결과

가. UA(uranyl acetate)염색

- 실제 식품내 나노 입자화 시킨 기능성 성분의 유무 여부와 안정성 평가를 위한 실험법이 마련되어 있지 않아 이에 대한 시도로 전자현미경을 활용하였다. 먼저 원물시료로 나노 입자 코팅하지 않은 fish peptide와 blank liposome, fish peptide가 실린 liposome의 경우 UA 염색법을 했을 시 확연히 구분되어 졌다. 이는 분산매가 증류수인 경우에 해당되는 시료로써 fish peptide가 리포솜 나노 입자에 코팅 되었을 시 liposome의 이중막이 염색되어 진하게 나타나 나노입자로 존재되어 있고, 형태나 크기가 명확하게 관찰되어 졌다.
- 이를 근간으로 유자음료에 적용하여 동일한 분석법으로 나노입자의 유무와 크기 및 형태 유지를 관찰하였다. 무첨가 처리군인 유자음료에 UA 염색 시 (그림 3-1-64) 바탕화면이 상대적으로 깨끗하고 달리 염색되어 나타나는 입자들이 없는 것으로 나타났다. fish peptide의 경우 나노 코팅을 하지 않았어도 약간의 검은 색을 띠는 부분이 많이 나타나 이것이 fish peptide가 염색되어 나타난 것으로 생각된다. Blank 리포솜 혹은 fish peptide가 코팅된 liposome 모두 UA로 염색되어 확연히 구분되어 졌다. 이를 통해 실제 식품에 추가된 음료에서 나노 입자 유무, 크기, 입자 형태를 TEM UA 염색법으로 확인할 수 있어 본 실험법을 채택하여 다른 실제 음료 식품에서 활용 가능할 것으로 판단된다.

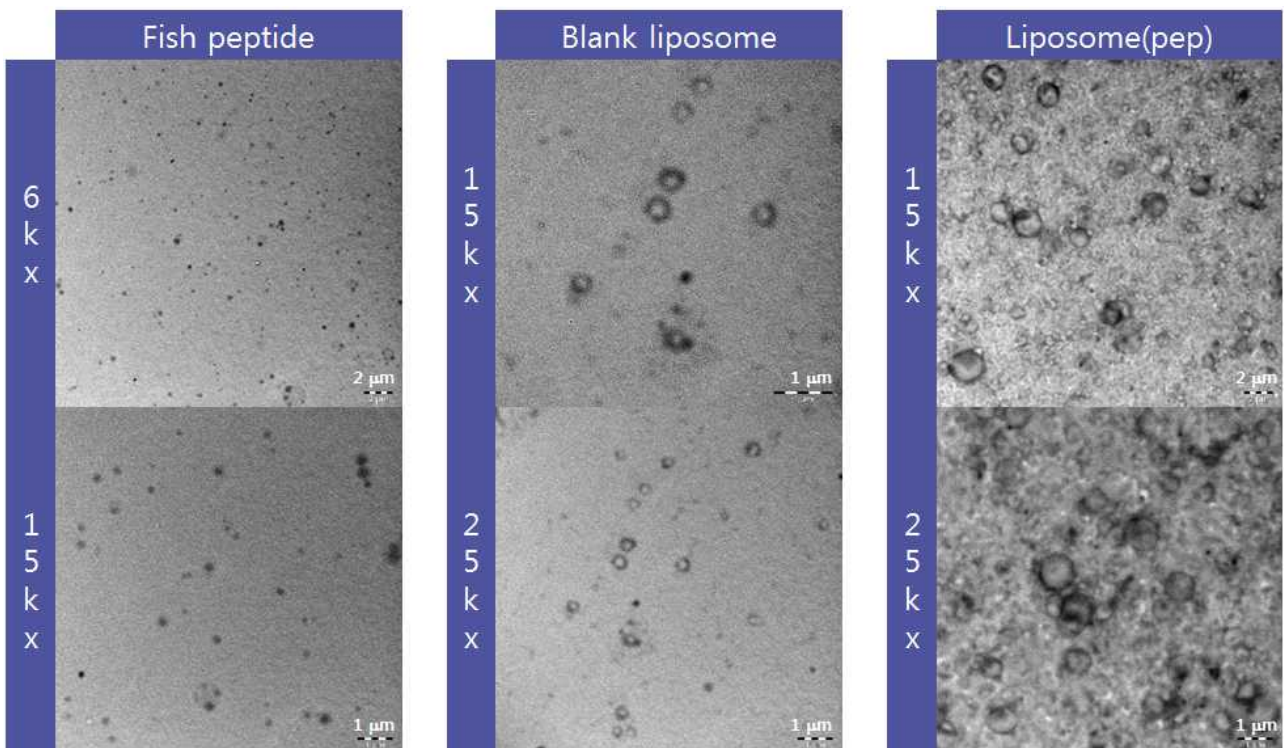


그림 3-1-63. 어피 펩타이드 및 리포솜의 TEM 사진(UA염색)

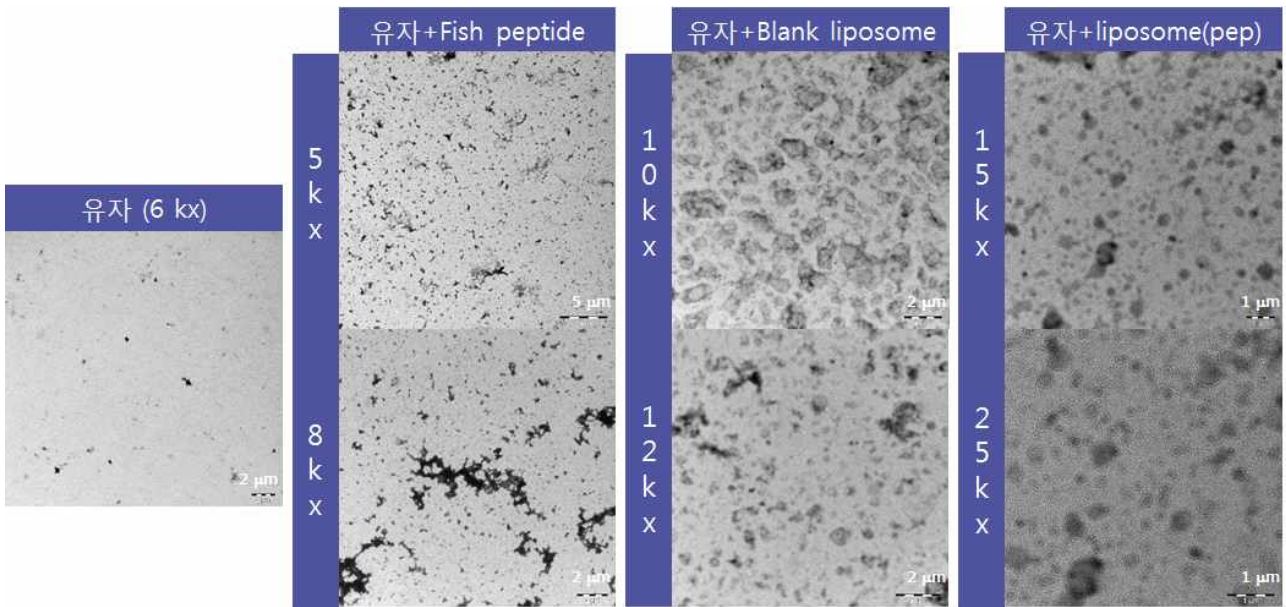


그림 3-1-64. 어피 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자음료의 TEM 사진(UA염색)

나. PTA(Phosphotungstic acid)염색

○ 그림 3-1-65는 PTA 염색법을 활용하여 입자 유무를 TEM으로 관찰하였다. 관찰 목적은 상기한 바와 동일하다. PTA의 염색의 경우 블랭크 리포솜을 첨가한 유자의 경우 육각형의 결정화를 관찰하였으나, 펩타이드가 들어가 있는 시료의 경우 육각형의 결정화는 관찰할 수 없었으나 검은색의 나노입자를 관찰할 수 있었다. 그 크기는 500 nm에서 700 nm로 입도분석기로 측정한 결과의 값과 유사하게 나타났다. PTA 염색법도 나노입자의 유무 및 크기 확인이 가능하지만, 유자내 다른 당의 결정화 형성 부분이 PTA염색법에 의한 것인지 다른 요인인지 추가적인 실험이 필요하다. 이에 따라 UA염색법이 PTA 염색법보다 안정적인 나노입자 검출과 크기 확인에 유효한 것으로 판단된다.

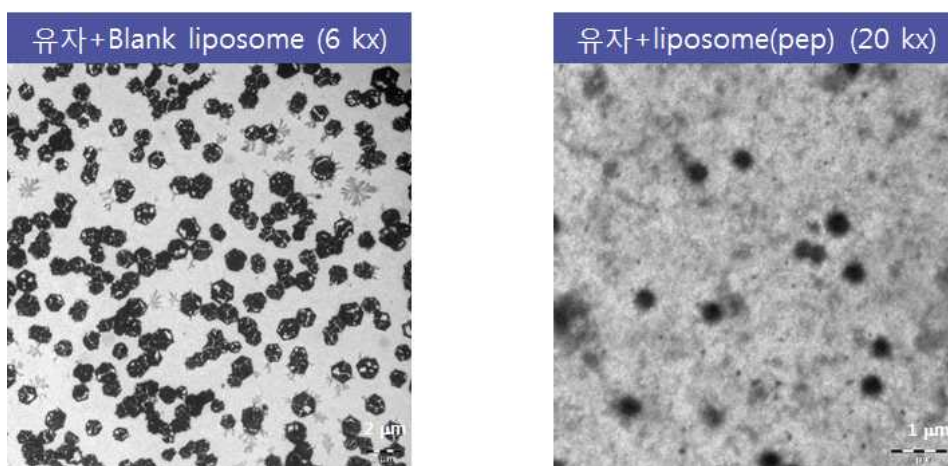


그림 3-1-65. 리포솜을 첨가한 유자음료의 TEM

12. 어피 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 돼지고기 패티의 냉동 저장 중 이화학적 특성 및 지방 산패도 결과.

- 본 연구에서는 돼지고기 패티에 어피 펩타이드 및 리포솜을 첨가하여 냉동 저장 중 패티의 지방 산패도를 분석하였다.
- 돼지고기의 비계없는 고기 및 등 지방을 PM-70 mincer (Mainca, Spain)를 사용하여 각각 분쇄하였다. 분쇄된 고기 및 지방을 8:2로 혼합하여 1.5%의 소금을 첨가하여 대조구로 사용했으며, 제조한 돼지고기 패티에 양성 대조구로 BHA(butylated hydroxyanisole) 0.02%를 첨가하였다. 처리구로는 FSP(Fish skin peptide) 및 FSPL(Fish skin peptide liposome)를 각각 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3% 농도로 첨가하여 색도, TBARS, VBN, 조리감량, 경도, pH를 측정하였으며, 각 실험은 3회씩 반복하여 측정하였다.
- 표 3-1-22, 23에 측정한 색도를 나타내었다. 어피 펩타이드를 첨가하였을 때 대조구 및 양성 대조구보다 CIE* L값이 낮았으며, 어피 펩타이드를 첨가한 패티의 CIE* a값은 어피 펩타이드 농도가 증가함에 따라 감소하였으며 저장기간이 증가함에 따라서 어피 펩타이드 농도에 따라서 CIE* a값이 증가하는 경향을 보였다. 첨가 된 FSP의 양이 많을수록 적색 유지 효과가 높은 것으로 생각된다.

표 3-1-22. 여러 농도의 어피 펩타이드 첨가 돼지고기 패티의 냉장 저장 중 CIE 색도 변화.

Treatments ¹⁾	Storage periods (d)					
	0	2	4	7	10	14
CIE L*						
Control	53.66±1.37 ^{ab}	54.06±2.31 ^{abB}	54.93±2.21 ^{aAB}	56.37±2.79 ^{aA}	56.9±2.82 ^{aA}	56.76±1.80 ^{aA}
BHA	53.70±0.82 ^{ab}	55.87±1.91 ^{aA}	55.71±1.46 ^{aA}	55.54±1.89 ^{abA}	56.62±1.59 ^{aA}	55.51±1.24 ^{aA}
FSP 0.1%	52.42±1.11 ^{aA}	51.83±3.41 ^{bA}	51.66±2.57 ^{bA}	52.77±2.74 ^{cdA}	51.72±2.72 ^{bA}	52.11±0.88 ^{bA}
FSP 0.5%	52.85±1.77 ^{aA}	51.7±2.73 ^{bA}	51.69±1.57 ^{bA}	53.49±2.08 ^{bcA}	52.8±1.88 ^{bA}	53.02±1.72 ^{bA}
FSP 1%	52.74±1.74 ^{aA}	52.04±3.34 ^{bA}	51.00±2.10 ^{bA}	51.33±1.68 ^{cdA}	51.68±2.06 ^{bA}	52.00±2.08 ^{bA}
FSP 2%	51.88±2.00 ^{aAB}	51.8±2.31 ^{bAB}	52.57±1.87 ^{abAB}	51.04±1.09 ^{dB}	53.63±1.77 ^{bA}	53.65±1.63 ^{bA}
FSP 3%	52.96±2.41 ^{aA}	51.63±1.57 ^{bA}	52.47±1.62 ^{bA}	51.68±2.73 ^{cdA}	52.49±2.44 ^{bA}	52.59±2.11 ^{bA}
CIE a*						
Control	9.57±0.75 ^{aA}	8.87±1.06 ^{aAB}	8.19±1.16 ^{ab}	5.51±0.46 ^{bC}	4.36±0.48 ^{bD}	3.55±0.33 ^{bcE}
BHA	9.43±0.58 ^{aA}	8.92±0.65 ^{aA}	7.59±0.83 ^{abB}	6.88±1.10 ^{ab}	5.07±0.92 ^{aC}	4.52±0.65 ^{aC}
FSP 0.1%	9.07±0.80 ^{aA}	7.28±1.19 ^{bB}	6.78±0.41 ^{bB}	3.96±0.55 ^{cdC}	3.55±0.19 ^{cCD}	3.14±0.56 ^{cd}
FSP 0.5%	8.94±0.72 ^{aA}	7.44±1.39 ^{bB}	6.90±0.50 ^{bB}	4.54±0.41 ^{cdC}	3.93±0.47 ^{bcC}	3.2±0.47 ^{bcD}
FSP 1%	8.87±1.02 ^{aA}	7.59±0.84 ^{bB}	7.08±1.16 ^{bB}	4.96±0.76 ^{bcC}	3.99±0.43 ^{bcCD}	3.5±0.72 ^{bcD}
FSP 2%	8.62±0.89 ^{abA}	7.78±0.76 ^{bB}	7.45±1.06 ^{abB}	5.12±0.36 ^{bcC}	4.24±0.93 ^{bcC}	3.61±0.71 ^{bcC}
FSP 3%	7.97±1.13 ^{bA}	7.80±0.98 ^{bA}	7.65±0.60 ^{abA}	5.48±0.63 ^{bB}	4.38±0.49 ^{bcC}	3.82±1.01 ^{bcC}
CIE b*						
Control	8.19±0.52 ^{aC}	8.36±0.62 ^{abBC}	8.28±0.73 ^{aC}	8.67±0.58 ^{aABC}	8.95±0.53 ^{aAB}	9.16±0.57 ^{aA}
BHA	8.13±0.60 ^{aA}	8.43±0.40 ^{aA}	8.1±0.75 ^{aA}	8.47±0.63 ^{aA}	8.72±0.77 ^{abA}	8.52±0.58 ^{abcA}
FSP 0.1%	7.41±0.92 ^{bA}	7.19±0.92 ^{cA}	7.13±0.85 ^{bA}	7.28±0.68 ^{cA}	7.49±0.50 ^{dA}	7.82±0.43 ^{cdA}
FSP 0.5%	7.37±0.69 ^{bB}	7.7±0.94 ^{bcB}	7.77±0.82 ^{abB}	7.99±0.44 ^{abB}	8.76±0.84 ^{abA}	8.88±0.73 ^{abA}
FSP 1%	7.33±0.79 ^{bA}	7.25±0.75 ^{cA}	7.53±0.67 ^{abA}	7.66±1.08 ^{bcA}	7.9±0.72 ^{cdA}	7.61±1.08 ^{dA}
FSP 2%	7.46±0.57 ^{bc}	7.71±0.72 ^{bcBC}	8.12±0.57 ^{aAB}	8.09±0.69 ^{abAB}	8.63±0.43 ^{abA}	8.44±0.84 ^{bcA}
FSP 3%	7.32±0.71 ^{bB}	7.48±0.95 ^{cB}	8.06±0.47 ^{aA}	8.17±0.54 ^{abA}	8.31±0.47 ^{bcA}	8.41±0.71 ^{bcA}
Total color difference (ΔE)						
Control		2.29±1.47 ^{bC}	2.59±1.81 ^{bC}	5.33±1.86 ^{ab}	6.55±1.76 ^{abAB}	7.01±0.98 ^{aA}
BHA	1.00±0.45 ^{bD}	2.55±1.72 ^{bC}	3.12±0.93 ^{abBC}	3.73±1.31 ^{bB}	5.67±0.89 ^{bA}	5.49±0.81 ^{bA}
FSP 0.1%	2.27±0.54 ^{aC}	4.42±1.44 ^{ab}	4.31±0.88 ^{ab}	6.46±0.26 ^{aA}	6.82±0.77 ^{aA}	6.66±0.36 ^{aA}
FSP 0.5%	2.35±0.67 ^{aD}	3.68±1.75 ^{abC}	3.71±0.88 ^{abC}	5.37±0.79 ^{ab}	6.05±0.47 ^{abAB}	6.67±0.59 ^{aA}
FSP 1%	2.73±0.85 ^{aD}	4.22±1.37 ^{abC}	4.16±1.16 ^{aC}	5.43±0.94 ^{ab}	6.23±0.77 ^{abAB}	6.75±0.91 ^{aA}
FSP 2%	2.73±0.68 ^{aC}	3.47±0.68 ^{abC}	3.11±0.97 ^{abC}	5.36±0.44 ^{ab}	5.58±1.05 ^{bAB}	6.18±0.71 ^{abA}
FSP 3%	3.04±1.20 ^{aC}	3.37±1.19 ^{abC}	2.73±0.78 ^{bC}	5.32±1.21 ^{ab}	5.82±0.58 ^{bAB}	6.42±0.99 ^{aA}

¹⁾Control(무첨가군); BHA(양성 대조군); FSP(L)(처리군).

^{a-d}Means with different letters within the samples at the same storage time

^{A-E}Means with different letters within the same sample group for the entire experiment days are significantly different by Duncan's range test (p<0.05).

표 3-1-23. 여러 농도의 어피 펩타이드 리포솜 첨가 돼지고기 패티의 냉장 저장 중 CIE 색도 변화.

Treatments ¹⁾	Storage periods (d)					
	0	2	4	7	10	14
CIE L*						
Control	53.66±1.37 ^{aB}	54.06±2.31 ^{abB}	54.93±2.21 ^{abAB}	56.37±2.79 ^{aA}	56.90±2.82 ^{aA}	56.76±1.80 ^{aA}
BHA	53.70±0.82 ^{aB}	55.87±1.91 ^{aA}	55.71±1.46 ^{abA}	55.54±1.89 ^{aA}	56.62±1.59 ^{abA}	55.51±1.24 ^{abA}
FSPL 0.1%	52.87±1.80 ^{aA}	53.61±2.48 ^{abA}	53.82±2.28 ^{abA}	54.15±2.46 ^{aA}	54.67±1.68 ^{bA}	54.47±2.64 ^{bA}
FSPL 0.5%	52.1±2.63 ^{aB}	54.30±3.40 ^{abAB}	54.90±1.97 ^{abA}	54.76±2.36 ^{aA}	55.27±2.47 ^{abA}	56.29±2.27 ^{abA}
FSPL 1%	53.2±2.29 ^{aB}	55.33±1.18 ^{abAB}	55.8±2.80 ^{aAB}	56.29±2.15 ^{aAB}	55.12±0.97 ^{abA}	56.67±1.78 ^{aA}
FSPL 2%	53.4±2.65 ^{aB}	54.49±2.94 ^{abAB}	54.79±2.57 ^{abAB}	56.50±2.12 ^{aA}	55.94±2.13 ^{abA}	55.17±0.93 ^{abA}
FSPL 3%	52.1±2.88 ^{aD}	52.78±2.66 ^{bCD}	53.36±2.04 ^{bBCD}	56.33±1.35 ^{aA}	55.08±1.62 ^{abABC}	55.35±2.61 ^{abAB}
CIE a*						
Control	9.57±0.75 ^{aA}	8.87±1.06 ^{aAB}	8.19±1.16 ^{aB}	5.51±0.46 ^{bC}	4.36±0.48 ^{bD}	3.55±0.33 ^{bE}
BHA	9.43±0.58 ^{aA}	8.92±0.65 ^{aA}	7.59±0.83 ^{abB}	6.88±1.10 ^{aB}	5.07±0.92 ^{aC}	4.52±0.65 ^{aC}
FSPL 0.1%	8.54±0.81 ^{bA}	8.31±0.85 ^{abA}	7.31±0.83 ^{abcA}	5.69±0.52 ^{bB}	4.30±0.75 ^{bC}	3.85±0.99 ^{abC}
FSPL 0.5%	9.01±0.98 ^{abA}	7.68±1.03 ^{bcB}	7.15±1.03 ^{bcB}	5.53±0.80 ^{bC}	3.89±0.62 ^{bcD}	3.70±1.02 ^{bD}
FSPL 1%	8.98±0.58 ^{abA}	7.14±0.95 ^{cdB}	6.92±0.93 ^{bcB}	4.57±1.37 ^{bC}	3.55±0.25 ^{cdD}	3.26±0.52 ^{bD}
FSPL 2%	8.21±0.78 ^{bA}	6.58±0.81 ^{dB}	6.47±0.97 ^{cB}	4.87±0.82 ^{bB}	3.14±0.56 ^{dC}	3.08±0.92 ^{bC}
FSPL 3%	8.24±0.95 ^{bA}	6.52±1.23 ^{dB}	6.35±1.17 ^{cB}	4.74±1.49 ^{bC}	3.07±0.76 ^{dD}	3.46±0.81 ^{bD}
CIE b*						
Control	8.19±0.52 ^{aC}	8.36±0.62 ^{abBC}	8.28±0.73 ^{aC}	8.67±0.58 ^{abABC}	8.95±0.52 ^{aAB}	9.16±0.57 ^{aA}
BHA	8.13±0.60 ^{aA}	8.43±0.40 ^{abA}	8.10±0.75 ^{aA}	8.47±0.63 ^{abA}	8.72±0.77 ^{aA}	8.52±0.58 ^{abA}
FSPL 0.1%	7.39±0.86 ^{bB}	8.28±0.57 ^{abA}	7.98±0.73 ^{aAB}	8.48±0.39 ^{abA}	8.62±0.69 ^{aA}	8.28±0.65 ^{bA}
FSPL 0.5%	7.66±0.64 ^{abB}	8.17±0.76 ^{abAB}	8.24±0.61 ^{aAB}	8.47±0.61 ^{abA}	8.44±0.57 ^{aA}	8.70±0.81 ^{abA}
FSPL 1%	7.77±0.75 ^{abB}	8.68±0.83 ^{aA}	8.68±0.65 ^{aA}	8.66±0.13 ^{abA}	8.73±0.58 ^{aA}	8.85±0.50 ^{abA}
FSPL 2%	7.30±0.90 ^{bC}	7.99±0.62 ^{bB}	8.20±0.80 ^{aB}	8.23±0.48 ^{bB}	8.61±0.40 ^{aAB}	8.92±0.28 ^{abA}
FSPL 3%	7.09±0.68 ^{bD}	8.12±0.84 ^{abC}	8.21±0.61 ^{aBC}	8.88±0.06 ^{aAB}	8.86±0.72 ^{aAB}	9.03±0.69 ^{aA}
Total color difference (ΔE)						
Control	-	2.29±1.47 ^{abC}	2.59±1.81 ^{cC}	5.33±1.86 ^{abcB}	6.55±1.76 ^{abAB}	7.01±0.98 ^{aA}
BHA	1.00±0.45 ^{bD}	2.55±1.72 ^{abC}	3.12±0.93 ^{bcBC}	3.73±1.31 ^{cB}	5.67±0.89 ^{bA}	5.49±0.81 ^{bA}
FSPL 0.1%	2.32±1.02 ^{abCD}	2.09±0.82 ^{bD}	3.14±1.00 ^{bcC}	4.32±1.34 ^{bcB}	5.65±0.79 ^{bA}	6.48±1.29 ^{abA}
FSPL 0.5%	2.86±1.58 ^{aC}	3.60±1.87 ^{abBC}	3.29±1.23 ^{abcBC}	4.59±0.88 ^{abcB}	6.30±1.21 ^{abA}	6.91±1.35 ^{aA}
FSPL 1%	2.12±1.45 ^{abC}	3.15±0.82 ^{abBC}	4.42±1.23 ^{abB}	5.96±1.42 ^{abA}	6.31±0.31 ^{abA}	6.85±0.63 ^{aA}
FSPL 2%	2.86±1.49 ^{aC}	3.94±1.70 ^{abBC}	4.50±0.41 ^{aB}	6.26±1.12 ^{aA}	7.01±0.96 ^{aA}	6.91±0.76 ^{aA}
FSPL 3%	3.46±1.54 ^{ab}	4.06±1.89 ^{ab}	3.83±1.06 ^{abcB}	5.80±0.90 ^{abA}	6.90±0.66 ^{aA}	7.00±1.10 ^{aA}

¹⁾Control(무첨가군); BHA(양성 대조군); FSP(L)(처리군).

^{a-d}Means with different letters within the samples at the same storage time

^{A-E}Means with different letters within the same sample group for the entire experiment days are significantly different by Duncan's range test (p<0.05).

○ TBARS 측정 결과를 그림 3-1-66에 나타내었다. 산화 스트레스 지표인 TBARS 값은 저장 시간이 증가함에 따라서 증가하는 결과를 보였으며, 어피 펩타이드를 첨가한 돼지고기 패티의 TBARS값은 대조구에 비해 낮게 나타났으며, 첨가 농도가 높을수록 낮은 값을 나타냈다. 어피 펩타이드 리포솜을 첨가한 패티의 경우 TBARS값이 증가하는 결과를 나타냈으며, 저장 시간이나 농도의 증가에 따라서 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 이는 코팅층을 구성하는 레시틴이 산화되어 이러한 결과가 나타난 것으로 생각된다.

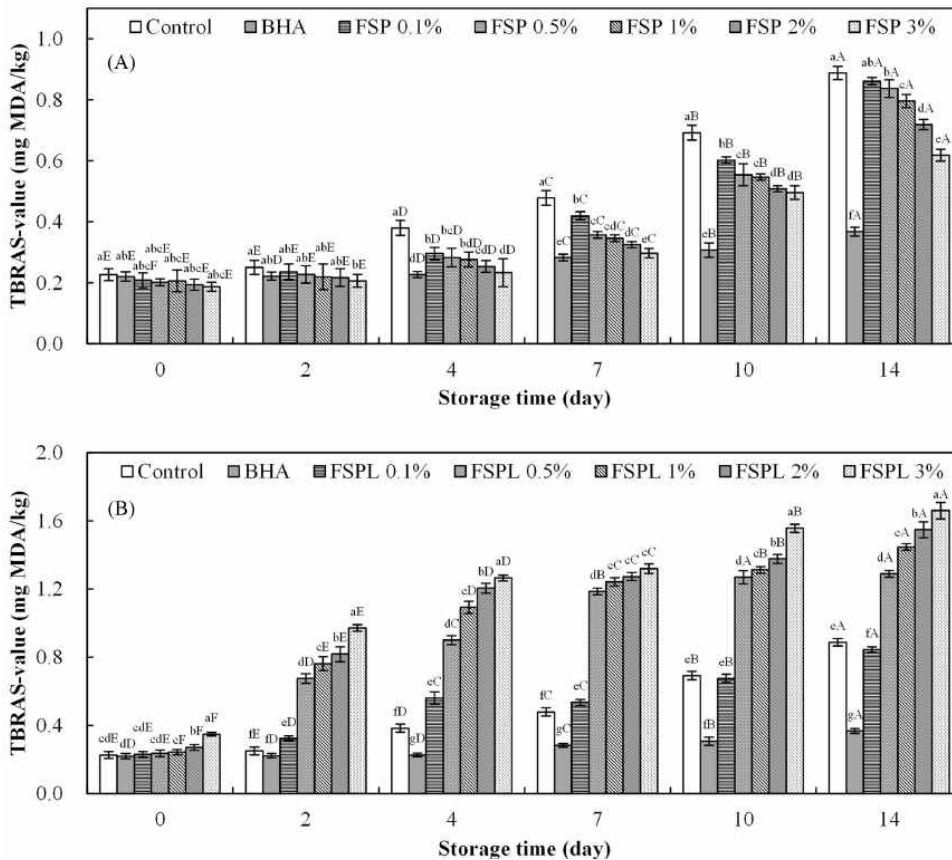


그림 3-1-66. 여러 농도의 어피 펩타이드(A) 및 리포솜(B)을 첨가한 돼지고기 패티의 냉동저장 중 TBARS 값 변화. Control(무첨가군); BHA(양성 대조군); FSP(L)(처리군).

^{a-g}Means with different letters within the samples at the same storage time

^{A-F}means with different letters within the same sample group for the entire experiment days are significantly different by Duncan's range test ($p < 0.05$).

○ TBARS 측정 결과를 그림 3-1-67에 나타내었다. 산화 스트레스 지표인 TBARS 값은 저장 시간이 증가함에 따라서 증가하는 결과를 보였으며, 어피 펩타이드를 첨가한 돼지고기 패티의 TBARS값은 대조구에 비해 낮게 나타났으며, 첨가 농도가 높을수록 낮은 값을 나타냈다. 어피 펩타이드 리포좀을 첨가한 패티의 경우 TBARS값이 증가하는 결과를 나타냈으며, 저장 시간이나 농도의 증가에 따라서 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 이는 코팅층을 구성하는 레시틴이 산화되어 이러한 결과가 나타난 것으로 생각된다.

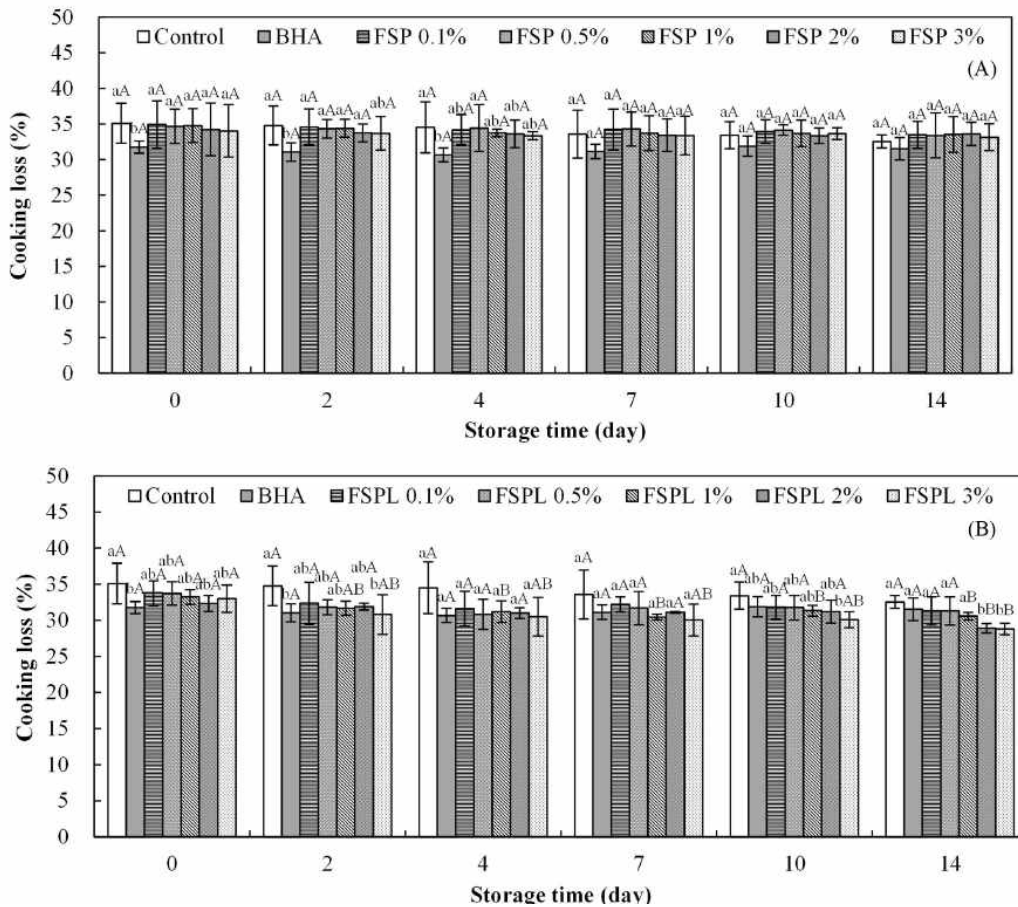


그림 3-1-67. 여러 농도의 어피 펩타이드(A) 및 리포좀(B)을 첨가한 돼지고기 패티의 냉동저장 중 조리 감량 변화. Control(무첨가군); BHA(양성 대조군); FSP(L)(처리군).

^{a-g}Means with different letters within the samples at the same storage time

^{A-F}Means with different letters within the same sample group for the entire experiment days are significantly different by Duncan's range test ($p < 0.05$).

○ 어피 펩타이드를 첨가한 돼지고기 패티의 경도 측정 결과를 그림 3-1-68에 나타내었다. 산화 스트레스 지표인 TBARS 값은 저장 시간이 증가함에 따라서 증가하는 결과를 보였으며, 어피 펩타이드를 첨가한 돼지고기 패티의 TBARS값은 대조군에 비해 낮게 나타났으며, 첨가 농도가 높을수록 낮은 값을 나타냈다. 어피 펩타이드 리포솜을 첨가한 패티의 경우 TBARS값이 증가하는 결과를 나타냈으며, 저장 시간이나 농도의 증가에 따라서 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 이는 코팅층을 구성하는 레시틴이 산화되어 이러한 결과가 나타난 것으로 생각된다.

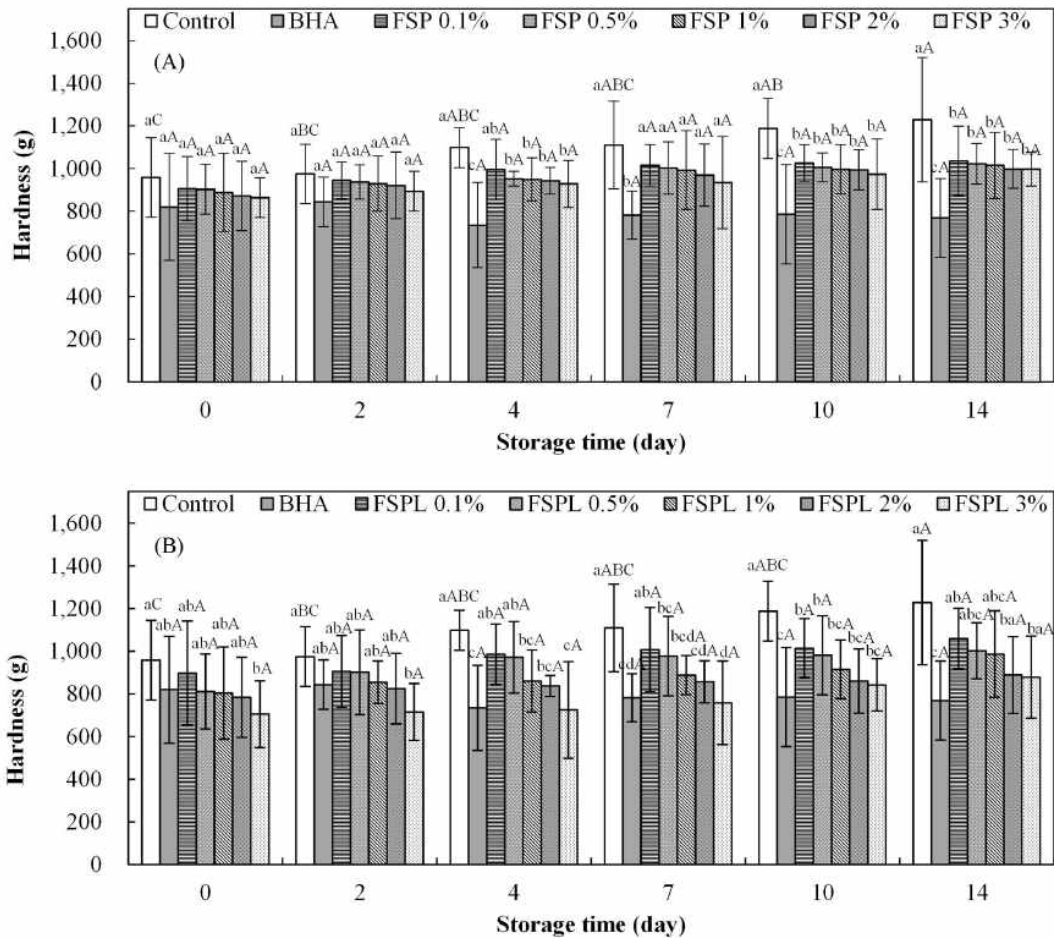


그림 3-1-68. 여러 농도의 어피 펩타이드(A) 및 리포솜(B)을 첨가한 돼지고기 패티의 냉동저장 중 경도 변화. Control(무첨가군); BHA(양성 대조군); FSP(L)(처리군).

^{a-f}Means with different letters within the samples at the same storage time

^{A-F}Means with different letters within the same sample group for the entire experiment days are significantly different by Duncan's range test ($p < 0.05$).

○ VBN 및 pH 측정 결과를 그림 3-1-69, 70에 나타내었다. 어피 펩타이드 처리한 패티의 VBN값은 저장기간이 지남에 따라서 증가하는 경향을 보였으며, 어피 펩타이드 농도가 증가함에 따라서 패티의 pH는 증가하였으며, 어피 펩타이드 리포솜의 첨가 농도가 증가함에 따라서는 감소하는 경향을 나타냈다.

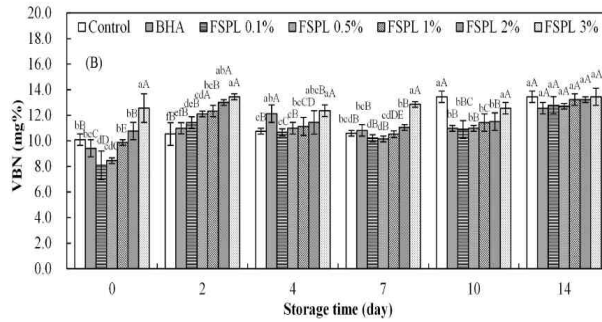
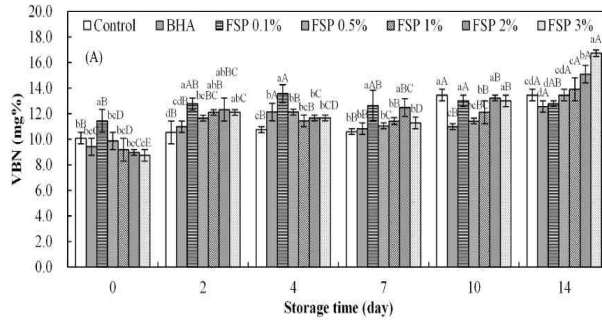


그림 3-1-69. 여러 농도의 어피 펩타이드(A) 및 리포좀(B)을 첨가한 돼지고기 패티의 냉동저장 중 VBN값 변화. Control(무첨가군); BHA(양성 대조군); FSP(L)(처리구).

^{a-g}Means with different letters within the samples at the same storage time ^{A-F}Means with different letters within the same sample group for the entire experiment days are significantly different by Duncan's range test ($p < 0.05$).

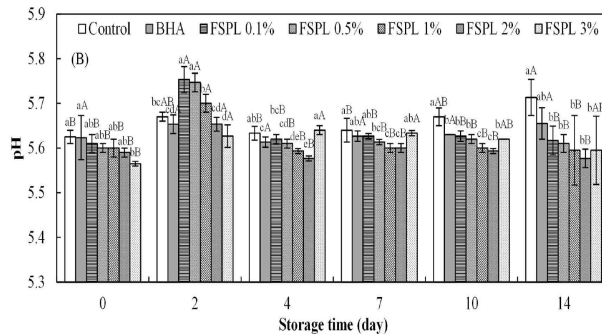
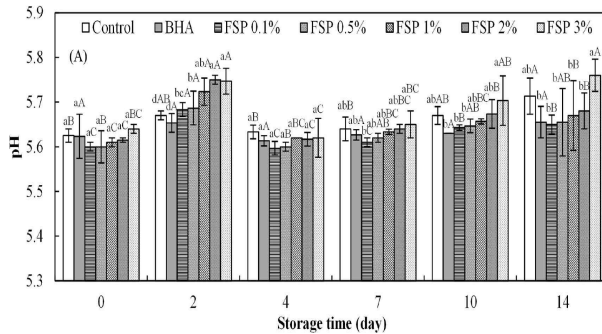


그림 3-1-70. 여러 농도의 어피 펩타이드(A) 및 리포좀(B)을 첨가한 돼지고기 패티의 냉동저장 중 pH값 변화. Control(무첨가군); BHA(양성 대조군); FSP(L)(처리구).

^{a-g}Means with different letters within the samples at the same storage time ^{A-F}Means with different letters within the same sample group for the entire experiment days are significantly different by Duncan's range test ($p < 0.05$).

13. 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자 음료의 대용량 동결건조

○ 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자 음료의 대용량 동결건조 과정을 다음 그림 3-1-71에 나타내었다.



그림 3-1-71. 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자 음료의 동결건조 과정

○ 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자 음료의 동결건조 후 분쇄한 사진을 다음 그림 3-1-72에 나타내었다.



그림 3-1-72. 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자 음료의 대용량 동결건조 분말; 유자 음료(A), 펩타이드 첨가 유자 음료(B), 펩타이드 리포솜 첨가 유자음료(C), 리포솜(D)

- 다음 표 3-1-24에 리포솜 코팅된 유자 펩타이드의 대용량 동결건조 후 수율을 나타내었다. 유자펩타이드의 수율은 60.61%인 반면 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자 음료의 동결건조 결과는 각각 67.95와 72.43%로 증가하는 경향을 나타내었다.

표 3-1-24. 대용량 동결건조한 펩타이드 및 리포솜을 첨가한 유자 음료의 수율

	유자	유자+펩타이드	유자+리포솜	리포솜	단위
용액 고형분 함량	0.33	0.28	0.28	0.06	
건조 용액량	7.5	7.5	7.5	30	L
고형분 함량	2.475	2.100	2.100	1.800	kg
건조 후 무게	1.500	1.427	1.521	1.775	kg
수율	60.61	67.95	72.43	98.64	%

커큐민 나노에멀전의 대량 생산화를 위한 최적 공정기술 확립 및 제품 개발

협동기관 : 계명대학교

1협동 책임자 김준태

2절 커큐민 나노에멀전의 대량 생산화를 위한 최적 공정기술 확립 및 제품 개발

1. 국내의 나노기술응용식품 시장 분석 및 scale-up 관련 동향 분석

가. 나노기술응용식품의 시장 분석 및 기술 경향 분석

(1). 나노기술응용식품의 정의 및 규정

- 2017년 7월 국내에서 개정된 ‘나노기술개발촉진법시행령’에 의하면 나노기술이란 물질을 나노미터 크기의 범주에서 조각, 분석하고, 이를 제어함으로써 새롭거나 개선된 물리적, 화학적, 생물학적 특성을 나타내는 소재, 소자(素子), 또는 시스템을 만들어내는 과학기술 또는 소재를 나노미터 크기의 범주에서 미세하게 가공하는 과학기술이라고 정의하고 있다.
- 2012년 식품의약품안전처에서는 ‘나노기술응용식품’이란 식품의 제조, 가공에 나노기술이 이용되거나, 나노소재가 첨가된 식품이라고 정의하면서, 나노기술이란 ‘나노미터(10^{-9} m) 범주로 제조, 가공하여 기존의 식품이나 물질의 특성과는 다른 새롭거나 개선된 물리적, 화학적, 또는 생물학적 특성을 나타내도록 하는 기술’이라고 정의 하였다.
- 또한 나노물질이란 ‘물질 외부 한쪽 면(1차원)의 크기가 전자현미경으로 1~100 nm 인 물질’이고, 나노소재란 i) 구성입자의 평균(산술) 크기가 나노물질 크기로 제조된 물질이나 소재, 또는 ii) 구성입자의 50%(개수기준) 이상이 제조된 나노물질로 구성된 물질이나 소재, 또는 iii) 구성입자 평균(산술) 크기가 나노물질보다 크지만, 나노물질과 동일한 새롭거나 개선된 특징을 갖도록 제조된 크기가 1,000 nm 미만인 물질이나 소재, 또는 iv) 위의 소재가 각각 또는 상호 화학적 또는 물리적으로 결합되거나 뭉쳐진 응집체라고 정의하고 있다(그림 3-2-1).

나노기술이란?	“나노미터(10^{-9}) 범주로 제조,가공하여 기존의 식품이나 물질의 특성과는 다른 새롭거나 개선된 물리, 화학, 생물학적 특성을 나타내도록 하는 기술’
나노물질이란?	“물질 외부 한쪽 면(1차원)의 크기가 100 nm 이내인 물질”
나노소재란?	①구성입자의 평균(산술) 크기가 나노물질 크기로 제조된 물질이나 소재, 또는 ②구성입자의 50 % (개수 기준) 이상이 제조된 나노물질로 구성된 물질이나 소재, 또는 ③구성입자 평균(산술) 크기가 나노물질보다 크지만, 나노물질과 동일한 새롭거나 개선된 특징을 갖도록 제조된 크기가 1 μ m (1,000 nm) 미만인 물질이나 소재 또는 ④위의 소재가 각각 또는 상호 화학적 또는 물리적으로 결합되거나 뭉쳐진 응집체
나노기술응용식품이란?	“식품의 제조, 가공에 나노기술이 이용되거나 나노소재가 첨가된 식품” - 나노기술이 제조, 가공 단계에서 직접 식품에 사용되는 경우 - 나노기술을 이용하여 제조한 나노소재를 제조,가공 단계에서 식품에 첨가한 경우

그림 3-2-1. 나노관련 용어의 정의(식품의약품안전처, 2012).

- EU에서는 결합되지 않은 상태 또는 응집체로서 크기분포 상 50% 이상의 입자들의 하나 이상의 표면 크기가 1-1,000 nm 범위에 있는 자연적, 우연적 또는 제조에 의한 것으로 정의하고 있다 (European commission, 2011). 그 밖의 별도 규정으로써 제조나노물질(engineered nanomaterial,

ENM)은 하나 이상의 외부 치수를 가지고 구조체, 집합체 또는 응집체를 포함하는 의도적으로 제조된 물질을 말하며, 크기가 100 nm를 초과할 수도 있으나, 나노스케일의 특성을 보유한 물질로 그 특성을 (i) 관련 물질의 큰 비표면적과 관련되는 특성, (ii) 동일 물질의 비-나노형태의 특성과 다른 특정 물리 화학적 특성으로 규정하고 있다(신규식품 EU, 2015.2283).

- EU는 현재 나노물질과 관련된 다양한 규정을 제품 및 나노물질의 분류에 따라 제정하고 있으며, 나노물질 중 신규식품, 식품첨가물, 식품포장재에 대하여 승인절차, 안전성평가, 표시에 대한 규정을 시행하고 있다.
- 특히, 2015년에 발효된 신규식품 규정(EU)2015/2238에 따라 제조나노물질(ENM)로 구성된 식품은 신규식품에 해당되고, ENM의 물리화학적 특성을 바탕으로 위해요소 확인 및 위해요소 결정, 노출평가, 위해도 결정의 과정으로 평가된다.
- 영국왕립학회에서는 나노물질은 100 nm 미만의 1차원 이상의 물질로 정의되고, 영국식약처(FSA)에서는 나노기술은 나노미터 규모로 형태와 크기를 제한하여, 구조, 장치, 시스템을 설계, 특장화, 생산, 실행하는 것으로 정의하였다.
- 미국에서는 나노물질을 법적으로 정의하지 않지만, 관련 정부기관을 자체 규제범위 내에서 나노물질을 권고의 형태로 정의하고 있다. 미국 환경보건청(EPA)에서는 나노크기의 신고대상 화학성분은 25°C, 표준대기압에서 고체형태이며, 응집체를 포함한 화학물질의 최소 1차원이 나노크기(1~100 nm)로 가공된 물질 및 나노화에 의하여 새로운 특성을 가지는 물질로 정의 하고 있고, 미국 식품의약안전청(US FDA)에서는 나노기술에 대한 고려사항에 대하여 해당물질 또는 최종재가 1차원의 나노크기이거나 외부 표면적이 나노크기로의 제조 여부 그리고 최대 1,000 nm의 나노크기를 벗어난도 그 면적에 물리적 또는 화학적 특성이나 생물학적 효과의 특성이나 현상을 보이는지 여부에 대하여 언급하고 있다. 아래의 표는 국외 나노기술 및 나노물질의 정의 현황이다 (표 3-2-1 & 표 3-2-2).

표 3-2-1. 국내·외 ‘나노기술(nanotechnology)’의 정의 현황

국가	내용	발표기관 및 출처
미국	근본적으로 새로운 분자 조직, 물성 및 기능을 갖는 재료, 소자 및 시스템을 창출할 목적으로 원자, 분자 및 초분자 수준에서 이해, 측정, 조작 및 제어할 수 있도록 해주는 과학과 기술임	21 st Century Nanotechnology Research and Development Act, '03 - 법적 정의
	a) 1~100 nm 크기에서 물질을 제어하고 이해하는 것으로 독특한 현상을 이용해 새로운 응용 가능 b) 1~100 nm 크기로 수행되는 과학, 공학, 기술	National Nanotechnology Initiative
	1~100nm 크기의 물질을 제어하는 것으로, 그 독특한 특성을 이용해 새로운 적용 가능	American National Standards Institute-Nanotechnology Standards Panel
호주	10 ⁻⁹ m 크기에서 물질을 정확히 가공하는 기술로 새로운 기능을 획득할 수 있음	Australian Office of Nanotechnology, Australian

		Government-Department of Industry, Tourism and Resources, '06
캐나다	적어도 한 면이 100 nm이하인 구조나 system을 직접 조작, 연구, 개발할 수 있는 기술	Statistics Canada, '07
덴마크	나노미터 크기의 모양과 크기를 제어할 수 있는 구조, 장치 및 시스템을 디자인, 생산, 적용하는 것	덴마크 과학기술부, '06
프랑스	나노과학은 나노미터의 크기를 가진 구조, 시스템에서 관찰되는 현상을 연구하는 것으로 나노크기에 의해 물리/화학/생물학적 특성이 유래됨	Ministry of Economy, Finance and Labour, '04
일본	나노미터 수준에서 원자와 분자들을 조작/제어하여 나노크기의 특이적 특성들을 사용한 새로운 기능을 개발하는 것임	National Institute of Science and Technology Policy, '06
네덜란드	새로운 분자구조를 가진 복합기능의 물질을 생산하기 위해 1~100 nm의 구조체를 다루는 것	Nanotechnology network in the Netherlands
영국	0.1~100 nm 수준의 극미의 물질을 조작하는데 이용되는 기술과 공정 나노과학을 제품 및 공정개발에 응용하는 것	하원 과학기술위원회
EU	나노기술은 100nm이하의 물질을 조작, 정확한 배치, 측정, 모델링 및 제조하는 것임	EU, '03
	한 면 이상이 100nm 이하인 기능성분을 최소한 한 개 이상 포함하며 이로 인해 물리, 화학, 생물학적 영향의 차이를 일으키는 물질을 다루는 것	유럽특허청
한국	a) 물질을 나노미터 크기의 범주에 조작·분석하고 이를 제어함으로써 새롭거나 개선된 물리적·화학적 생물학적 특성을 나타내는 소재·소자 또는 시스템(이하 “소재 등”이라 한다)을 만들어 내는 과학기술 b) 소재 등을 나노미터 크기의 범주에서 미세하게 가공하는 과학기술	교과부, '03 나노기술개발 촉진법 - 법적 정의
국제기구		
OECD	일반적으로 100nm이하의 작은 구조/시스템을 조작/연구/개발하는 일련의 기술. 이로 인해 전혀 다른 특성을 가진 새로운 물질, 기구, 제품 생산 가능	WPN, '07
ISO	나노크기로 물질을 조작하고 제어하여 원자나 분자 혹은 벌크(bulk)물질과는 뚜렷이 구별되는 크기와 구조에 따른 특성과 현상을 이용하는 과학지식의 응용	ISO/TC 229, '10

표 3-2-2. 국내·외 ‘나노물질(nanomaterial)’의 정의 현황

국가	내용	발표기관/ 출처
미국	a) 제조물질로 적어도 한 면이 나노크기(약 1~100 nm)인 물질 b) 1 μm미만 제조물질로 크기에 의해 물리, 화학, 생물학적 특성이나 영향이 달라진 물질	FDA, '11 (산업체 가이던스)
	제조물질로 적어도 한 면이 약 1~100 nm 크기를 가진 물질	EPA, FIFRA
	제조물질로 적어도 한 면이 나노크기 (일반적으로 1~100 nm)인 입자, 물체 및 물질	EPA, TSCA (Stewardship program)
	a) 제조물질로 한 면 이상이 약 1~100 nm인 물질 b) ‘버키볼’은 1 nm이하여도 나노물질에 포함 c) 100 nm 이상의 aggregate와 agglomerate 중 쪼개져서 1~100 nm 입자를 생성하는 물질 ※ 제외 대상 - 비나노크기 형태의 물질과 비교 시 새로운/독특한 특성을 가지지 않는 경우 - 물 또는 생물학적 용매에 용해되는 경우 - 1~100 nm의 물질이 10%이하로 포함된 경우 - micelle, single polymer	American Chemistry Council
캐나다	a) 제조물질로 적어도 한 면이 나노크기(1~100 nm)인 물질 b) 모든 면이 나노크기보다 작거나 크고, 한 개 이상의 나노크기 현상(크기에 의해 물리, 화학, 생물학적 특성이 변한 경우)을 보이는 것	Health Canada, '09
호주	a) 약 1~100 nm 크기를 가지거나 독특한 특성(나노크기에 따른 물리, 화학적 특성)을 갖도록 의도적으로 제조·생산·가공한 물질로 나노물체(한 면 이상이 나노크기) 또는 나노구조(내부 또는 표면구조가 나노크기)인 물질 b) aggregate, agglomerate도 나노구조임 c) 정의를 충족시키는 입자가 물질 중 10% 이상을 차지하는 것	National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, '09
뉴질랜드	외부 한 면 이상 또는 내부구조가 1~100 nm이며, 불용성 또는 생체지속성을 가진 의도적으로 제조된 물질	Environmental Risk Management Authority, '11
영국	두 면 이상이 200 nm 이하인 물질	DEFRA, '08
덴마크	가장 작은 면이나 구조의 길이가 100 nm보다 작은 물질	환경부
EU	외부 한 면 이상 또는 내부구조가 1~100 nm이며, 불용성 또는 생체지속성을 가진 의도적으로 제조된 물질	Cosmetic Products Regulation, '09 - <u>법적정의</u>
	a) 제조된 물질로 한 면 이상이 100nm 이하이거나, 내부 또는 표면의 특정기능부분이 100nm 이하인 물질 b) 100nm이상의 구조, agglomerate, aggregate이지만 나노크기의 특징을 갖는 물질	Novel food regulation 개정안, '08
	a) 외부 한 면 이상이 1-100nm 입자 1% 이상으로 구성된 물질	Environment, '10

	b) 내부 또는 표면구조 한 면 이상이 1-100nm c) 비표면적이 60m ² /cm ³ 이상(1nm이하 물질제외)	
	a) 평균크기가 1~100 nm인 물질(비표면적으로 100nm 이하 증명 가능) b) 평균크기가 100~500 nm인 물질로 100 nm 이하가 0.15%이상인 경우	SCENIHR, '11
	천연 또는 제조한 물질로 외부 한 개 이상 면의 크기가 1~100nm인 입자가 개수분포에서 50%이상 차지하는 물질 및 그 응집체	Commission recommendation, '11
덴마크	가장 작은 면이나 구조의 길이가 100 nm보다 작은 물질	환경부
국제 기구		
OECD	나노물체(한 면 이상이 나노크기) 또는 나노구조(내부 또는 표면구조가 나노크기)로 된 물질로서 나노크기는 약 1~100nm임 - aggregate, agglomerate는 나노구조에 포함	WPMN, '07
ISO/CEN	나노크기 물질이 한 면 이상 차지하고 있으며, 크기는 약 1~100 nm 범위인 물질	'08
ISO/TS	외부 한 면 이상, 내부 또는 표면구조가 나노크기(약1~100 nm)인 물질	'08
기 타		
International Council of Chemical Association	a) 고체 입자물질 b) 의도적으로 나노크기 제조 c) 한 면 이상이 1~100 nm d) c)로 구성된 aggregate, agglomerate e) 나노물질이 총 중량의 10% 이상이거나, 나노물질 aggregate/agglomerate 50% 이상	'10

(1) 국내외 나노기술 연구현황 및 시장조사

(가) 국내 나노기술 연구 현황

- 2015년 국내 나노관련 SCI급 연구논문은 5,787편으로 세계 4위(1위 중국, 2위 미국, 3위 인도)이고, 2000년부터 2015년 까지 발표된 나노관련 우리나라 SCI 논문은 총 45,845편으로 국내에서 나노에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.
- 2001년 제1기 나노기술종합발전계획 수립 이후 15년 동안 약 4조 5,288억 원을 투자하였고, 특히 연구개발에 3조 6,582억 원을 투자하였다. 그 중 나노식품 관련 정부 연구개발 사업으로는 미래창조과학부에서는 바이오 기술 개발 사업 및 나노소재 기술개발 사업, 나노융합 2020사업 등을 추진 하였다.
- Newtree 연구소에서는 지용성분인 coenzyme Q10을 초고압균질기를 이용하여 나노에멀전으로 개발하였고, 초고압균질기를 사용함으로 나노에멀전의 안정성 향상과 함께 생산 효율이 증대되어 나노에멀전의 대량생산이 가능하도록 하였다.
- 파일약품에서는 나노에멀전 제조에 대한 자체개발 기술을 기반으로 건강기능식품과 화장품 시장에 진입하기 위한 다양한 지용성 기능성분들을 가지고 수용성의 나노입자(30~100 nm)를 생산하였다.
- 한국 Kolmar사 에서는 나노다중에멀전 개발에 대한 특허를 획득하였고, 사람의 피부 각질을 구성하고 있는 세라마이드, 콜레스테롤 및 인지질을 이용하여 피부 생체지질과 유

사한 조성물을 가지면서 30-100 nm의 입자들이 고밀도, 고농축된 제품을 개발하였다. 다중캡슐화 기술을 통해 불안정한 활성성분을 안정화시키고 피부 흡수율과 보습력을 극대화시켜 피부에 주는 활성성분의 유효농도를 10배 이상으로 안정하게 만들어 효과를 향상시켰다.

- ㈜비타코스가 독자적으로 개발한 나노에멀전은 기존 기술에 의한 유화제품(입자크기 1,000-2,000 nm) 또는 나노에멀션크림제품(입자크기 400-500 nm)은 그 입자가 커서 피부흡수가 어려워서 충분한 제품효과를 내지 못했으나 최근에 개발된 신기술은 유화입자의 크기를 나노에멀션(20-200 nm)의 범위 내인 약 50 nm 또는 그 이하 크기로 상압에서 만들 수 있으므로 제품 유효성분의 피부흡수를 획기적으로 향상시킬 수 있게 되었다.
- 나노큐어텍에서는 나노에멀전이 잇몸염증의 예방 및 치료에 미치는 효과에 대한 연구 목적은 부작용이 없으면서도, 생체친화적인 성분을 이용하여 잇몸 질환에 나노에멀전이 신속하게 흡수되어 효과를 발휘할 수 있는 나노 비타민C, E 프로폴리스 복합 성분의 효능에 관한 연구를 수행하였다.
- 연세대학교에서는 대두 lecithin을 이용하여 효소를 포집하는 리포솜을 개발하여 특정 조건에서 효소의 방출속도를 조절할 수 있는 기술을 개발하였다. 리포솜 내 효소의 방출속도를 조절하기 위하여 lecithin vesicle 내의 lysozyme의 유출에 미치는 외부 환경 인자의 변화 및 유출 촉진제 첨가의 영향을 조사하였다.
- 2006년 한국화학연구원에서는 초임계이산화탄소 매질과 분리막을 이용하는 나노리포솜의 대량 제조 하이브리드 공정을 통하여 암 조직 신생혈관계를 통하여 항암제를 암 조직에 targeting하는 나노 규모의 리포솜을 개발하였다.
- 전주대학교에서 철분강화 식품첨가제용 리포솜을 제조함으로써 ferrous sulfate와 hemin을 혼합한 철분 함유 리포솜의 생체이용률을 증진하고자 하였다. 이러한 철분 함유 리포솜을 제조하는데 가장 큰 문제점은 ferrous sulfate의 자체 산화와 ferrous sulfate와 hemin으로 인한 리포솜의 지질산화로 지적되었고, 최종적으로 리포솜에 ascorbic acid와 토코페롤의 항산화제를 복합하여 사용함으로써 제품 내에서 철분으로 인한 반응성을 최소화하였다.
- 경남대학교에서는 비타민 C(ascorbic acid)의 불안정성을 극복하기 위하여 탈수화/재수화의 방법을 이용하여 soybean phosphatidyl choline으로 제조한 리포솜에 ascorbic acid를 미세캡슐화 하였다. 리포솜 내에서의 ascorbic acid는 수용액에서보다 안정성이 매우 증대되었다.
- 호서대학교에서는 나노리포솜을 이용한 astaxanthin의 안정화 연구에서 이중결합을 가진 불포화화합물로 제조나 저장 시 열과 산화 (빛)에 의해 쉽게 파괴되어 활성이 감소하여 응용범위에 한계가 있는 아스타잔틴의 안정성 향상을 위하여 나노리포솜 제형기술을 이용하였다.
- 2010년 (주)세라젬헬스앤뷰티는 생약 추출물을 안정화한 나노리포솜을 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물에 관한 특허를 출원하고, 나노리포솜을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품을 개발하였다.
- 경북대학교에서는 공액리놀레산을 함유하는 키토산 코팅 나노리포솜을 개발하여 공액리놀레산이 물 또는 수성용매에 대한 용해성과 분산성을 현저히 개선 시켜 체중조절 효과 등 다양한 생리활성 기능을 극대화 할 수 있다고 하였다.

- 2008년 식품의약품안전청에서 시행한 ‘나노물질의 인체위해평가연구’ 보고서에서는 나노식품 소재의 소화흡수 특성을 파악하기 위해서 Caco-2 세포에 대한 나노입자의 안정성, 흡수율, 소화율 등을 연구하였다. 또한 소화성 소재인 BSA를 이용하여 나노입자를 제조하고 pH와 염농도를 조절하여 제조 조건의 최적화를 이루었다. 비소화성 소재인 키토산을 이용하여 BSA와 같은 연구를 수행하였다.
- 2010년 식품의약품안전청에서 시행한 나노안전성 평가기반 연구사업단의 ‘나노물질의 표적장기별 독성평가기반 연구’ 보고서에서 나노물질의 표적장기별 독성평가 기반 연구를 위해 무기 나노물질의 경구, 경피, 정맥을 통한 장기간 투여에 의한 독성 평가를 시행하여 독성 가능성 예측 및 평가 기술을 개발하였다.
- 2010년 식품의약품안전청에서 시행한 나노안전성 평가기반 연구사업단의 ‘나노물질의 독성동태 연구’ 보고서에서 나노물질의 독성동태 연구를 위해 무기 나노물질의 물리화학적 특성 평가를 크기, 분산성, 표면전하, 결정 구조, 표면물질, 응집 등을 측정하여 분석하였고 나노물질의 체내·외 분석법을 확립하고 생체 내 거동 특성을 무기 나노물질의 정량 및 전자현미경 이미지를 통해 분석하는 연구가 실행되었다.
- 본 연구진의 선행연구를 통하여 나노물질의 분석법이 다양하지만 각각의 신뢰도와 재현성이 부족하다는 것을 인식하였으며 분석을 위한 표준화된 전처리 방법이 필요하다고 생각되었다. 또한 같은 분석법이라 하더라도 나노물질의 제조법과 형태에 따라 상이한 결과를 보였다. 특히 식품용 나노소재의 경우 그 분류가 다양하므로 체계적인 분류법과 분류된 나노소재별 분석법의 비교평가가 반드시 이뤄져야 하는데 현재 국내에서는 그 연구가 많이 미흡하다.

(나) 국외 나노기술 연구 현황

- 2009년 미시간대학의 과학자들은 나노에멀전 로션으로 2도 화상을 처리하면 박테리아 성장을 빠르게 감소시키며, 회복이 힘든 염증이 회복될 수 있다는 연구결과를 발표하였다. 나노에멀전은 화상을 입은 사람들에게 일반적으로 사용되는 국소 항생제와 비교했을 때 비슷한 감소를 보였다.
- 영국 리즈대학교(University of Leeds)의 식품 콜로이드학 교수 브렌트 머레이(Brent Murray)가 이끄는 연구진은 유니레버의 R&D와 함께 연구한 결과, “액티브 바이오폴리머(active biopolymers)”의 혼합물은 현재 식품 제조에 사용되는 계면활성제의 필요량을 감소시킬 수 있다고 하였다.
- 영국 생명공학 생물학연구협의회(BBSRC) 연구소에서는 사탕무 펙틴의 유화 특성의 분자적 기초를 조사하였고, 동시에 유적 표면에 사탕무 펙틴이 형성한 구조를 확인하기 위해 원자현미경으로 분석하여 최초로 이러한 표면 구조가 물속에 있는 두 개의 유적간 힘에 미치는 효과를 직접적으로 측정했다.
- 미국의 퍼듀 대학교에서는 사탕옥수수(sweet corn)의 약 30%를 구성하는 전분과 같은 재료인 피토글리코겐(phytoglycogen)으로 나노입자를 개발하는데 성공하였고, 이러한 나노입자가 오일층에 접착하여 유화됨으로써 식품의 악취를 유발하는 산화(oxidation) 과정을 막는 역할을 하는 기능으로 사용화 하였다.
- 1989년 미국에서는 치즈 숙성의 촉진을 위해 이용되어지는 proteinase 효소를 리포솜속에 함유시켜 각각 공장규모의 치즈 생산 공정에 첨가시켰다. 효소를 포집한 리포솜을 치

즈 제조 시 첨가하면 curd가 형성될 때에 거의 손상되지 않고 압착한 후에야 리포솜으로부터 방출되기 때문에 효소를 그냥 우유에 첨가하면 3~9%의 curd가 존재하는데 반하여 리포솜에 포집한 효소를 첨가하면 35~65%가 남는다는 결과를 보여주었다.

- 나노 리포솜은 약물을 내장한 나노 캡슐에 질병 인식 항체를 결합시킨 스마트 의약으로 체내에서 질병 부위에서만 약물을 방출, 치료하는 나노 로봇 개념의 의약 치료제로 불린다. 특히 항암 요법제, 항생제, 백신 등에 적용했을 때 기존 제형보다 약효가 월등하고 부작용도 매우 낮아서 나노 리포솜을 의약으로 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다.
- 미국 존스 홉킨스대학의 연구진은 약물을 실은 나노입자를 통증 없이 코를 통해 폐에 넣어 암세포로 전달하는 기술을 개발했고, 국내에서도 지난 2003년 종근당이 개발해 미국 FDA에 신약 승인된 항암제 ‘캄토벨’이 나노 리포솜형태로 개발 중이다.
- 특허청 자료에 따르면, 1997년부터 2006년까지 나노 리포솜 제제의 특허출원은 총 131건이었고, 이는 내국인 출원 보다 외국인 출원이 4배나 더 많았다. 연도별 출원 건수로는 지난 90년대 중반부터 출원이 증가하기 시작해 2000년 이후에는 매년 10건 이상의 출원이 꾸준히 어이지고 있는 것으로 나타났다.
- 유제품, 시리얼, 빵, 음료수는 현재 비타민, 미네랄(철, 마그네슘, 아연 등), 생균제(probiotics), 생물활성 펩타이드, 항산화제, 식물성 스테롤(plant sterol), 콩 등으로 강화되고 있으며, 이 활성성분의 일부는 현재 나노입자로서 식품에 첨가되고 있다.
- 비타민, 지방산을 포함한 나노캡슐화 활성 성분들이 음료, 고기, 치즈 등의 가공과 보존에 사용할 목적으로 현재 상업적 판매가 되고 있으며, 식품첨가제로의 나노입자(TiO₂, SiO₂ 등)는 영양분의 전달 기능 외에도 식품 가공 시 유동성, 색깔, 안정성을 향상 시키거나 유통기간의 연장을 위해서 나노입자들이 가공보조제로 많은 식품에 의도적으로 첨가되고 있다.
- 예를 들어, 알루미늄 실리케이트(alumino-silicate)는 과립 또는 분말 가공 식품에서 고결방지제(anticaking agent)로서 흔히 사용되고 있으며, 아나타제 이산화티타늄은 통상의 식품의 미백제 및 증백제로서 과자, 치즈 및 소스에 사용되고 있다.
- 활성성분, 영양강화 첨가제를 함유한 나노캡슐이 식품에서의 사용이 증가하고 있는데, 이들은 최근까지 마이크로 캡슐화된 식품에 첨가되어 왔지만, 현재는 효능을 높이기 위해 수천 배나 작은 나노캡슐로 생산되고 있다.
- 많은 국외 연구진들이 식품 및 의약품을 위한 나노물질에 대한 연구를 활발하게 수행하여 왔으나 아직까지 식품에 함유된 나노입자들을 분리, 분석하는 기술은 발달되지 않은 상황이다.

(다) 국내외 나노기술응용 식품의 시장 현황

- 스위스의 네슬레(Nestle)와 네덜란드의 유니레버(Unilever)는 지방감축과 향미를 유지하면서 지방 함량이 적은 나노에멀전 아이스크림을 개발하였고, 일부 가공식품들에 비타민과 미네랄 함량을 강화하기 위하여 나노기술을 사용하고 있다.
- 독일의 BASF는 식품첨가물로서 리코펜(lycopene)을 나노 크기로 제조하여 과일주스와 마가린 에 사용한 제품을 생산하였다.
- 과일약품(주)에서는 2014년 나노에멀전을 통한 수용화 기술을 개발하여 난용성 및 불용

성 식품소재를 수용화하였고, 나노 수용화를 위한 전용 GMP 공장에서 상용화 하고 있으며, 현재까지 나노 수용화제품은 CoQ10-NEWS, CLA-NEWS, Omega 3-NEWS, PS-NEWS, Vitamin E 등이 있다.

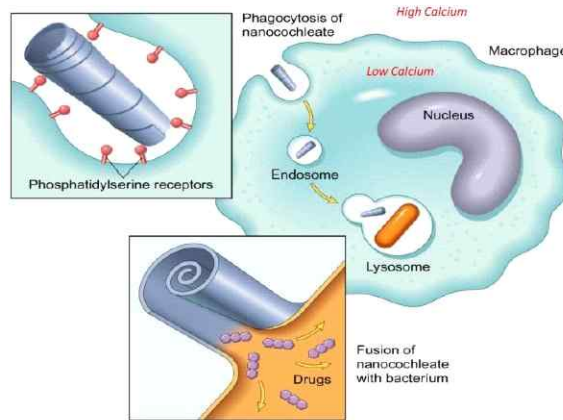
- Aquznova(독일)사는 비타민 C, 비타민 E, 코엔자임 Q10, 이소플라본(isoflavone), 플라보노이드(flavonoids), 카로티노이드(carotenoids), 정유(essential oil), 방부제, 색소, 기타 생리활성성분들을 캡슐화하기 위하여 30 nm 미셀(micelle)을 사용하여 나노기술 기반의 캐리어 시스템을 개발하였고, CoQ 10을 NovaSol 이란 상표로 2006년부터 판매하고 있다(그림 3-2-2). 이러한 나노 캡슐화 기술을 통하여 생리활성 성분의 생체이용률을 증가시켰다.
- 호주의 George Weston Foods사는 ‘Tim-Top Up’이라는 빵을 판매하고 있는데, 이 빵은 오메가-3가 풍부한 참치 어유의 마이크로 캡슐(140~180 μm, Nu-MegaDriphorm®)을 함유하고 있으며, 이로 인해 참치유의 이취를 제거하고, 기능성을 빵에 첨가하는 기술을 개발하고 있다.



그림 3-2-2. Aquznova 사의 Novasol CoQ 10과 George Weston Foods사 Nu-Mega 제품.

- 미국의 Salvona technology사에서는 ‘Multisal’이라는 다성분 전달시스템을 개발하였다. 이 시스템은 통상 잘 혼합되지 않는 여러 개의 활성성분(수용성 및 지용성 성분)을 생체내로 전달하고 생체 내에서 성공적으로 흡수될 수 있도록 고안되었다.
- 미국의 Biodelivery Science International사에서는 nanocochleate를 개발하여 특허를 출원하였으며, 이것을 콩과 칼슘으로부터 유도된 직경 50 nm의 코일형 나노입자로 영양분을 직접 세포내로 운반할 수 있는 기술로 nanocochleate를 통하여 오메가-3 지방산을 첨가하여도 맛과 풍미에 영향을 주지 않는 케익, 파스타, 쿠키 등에 적용 하였다(그림 3-2-3).

Cochleates: Cell-targeted Delivery



Source: Mannino RJ, et al. / Aquarius BioTechnologies, Inc

그림 3-2-3. Biodelivery Science International사의 nanocochleate.

나. 대량생산을 위한 scale-up 관련 동향 분석

- 일반적으로 lab scale에서 개발한 나노입자를 산업체에서 pilot scale 또는 plant scale로 생산하기 위해서는 제조공정에 있어서 큰 차이가 있어 이를 극복하기 위해서는 scale-up에 따른 장비구축과 제조 공정조건의 확립이 필요하다.
- 2015년 미국의 Alexey S. Peshkovsky는 초음파 균질방법을 통해 lab scale에서의 나노에멀전을 개발하고, Sono Mechanics사에서 개발한 Barbell Horn Ultrasonication Technology (BHUT)를 이용하여 나노에멀전의 대량 생산 기술을 개발하였다.
- BHUT는 음파방출 장치의 증폭 및 출력을 높게 방출 시킬 수 있게 하는 장치로 대규모 산업에서 적용이 가능한데(그림 3-2-4), Alexey는 BHUT를 이용하여 백신 물질인 MF 59를 함유한 나노에멀전의 대량 생산에 성공하였다.

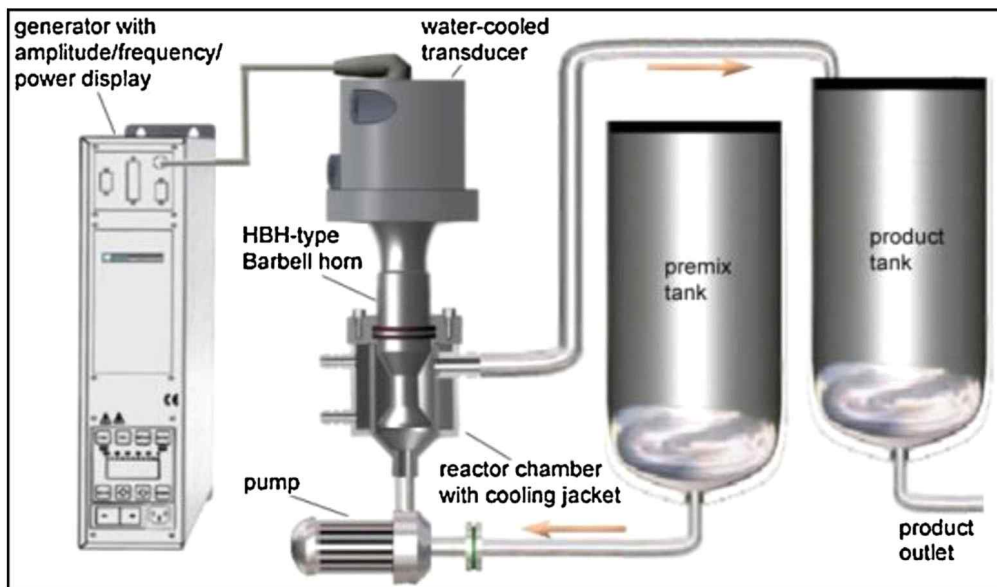


그림 3-2-4. Barbell Horn Ultrasonication Technology.

- 본 연구에서는 세 가지 초음파 출력장치인 LSP-500, BSP-1200, 및 ISP-3000을 각각 lab-scale, bench-scale, 및 pilot-scale (industrial-scale)의 생산을 위해 적용하였다.
- LSP-500은 실험실 규모에 사용되는 ultrasonication 시스템으로 500 W의 음파 생성기, 12.7 mm 크기의 CH-type의 초음파 probe가 이용되며, 40 mL 정도의 시료를 비이커에 담아 온도 설정을 조절하고, 균질화 하는데 사용하였다(그림 3-2-5).
- BSP-1200은 1200 W의 음파생성기, 냉각기, 32 mm의 HBH-type의 초음파 probe가 사용되며, 80 L의 시료를 반응기에 넣고, 균질화 하였다(그림 3-2-6).
- ISP-3000은 3000 W의 초음파 출력장치와 47 mm 크기의 HBH-type의 초음파 probe를 사용하며, 최대 300 L의 샘플을 반응기에 넣고 균질화 할 수 있는 장치이며(그림 3-2-7), CH (conventional horn) 및 HBH (half wave Barbell horn)-type의 probe를 사용하였다(그림 3-2-8).



그림 3-2-5. Lab-scale ultrasonic processor (LSP-500).



그림 3-2-6. Bench-scale processor (BSP-1200).



그림 3-2-7. Industrial-scale processor (ISP-3000).

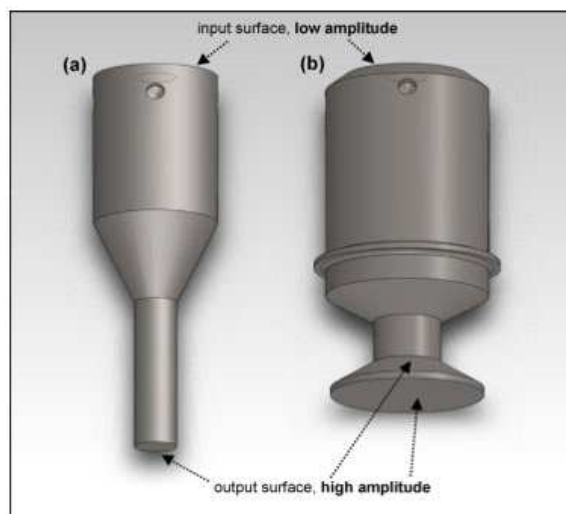


그림 3-2-8. Ultrasonication probe of (a) CH-type and HBH-type.

○ 그림 3-2-9는 lab scale, bench scale, 및 industrial scale 장치를 이용한 MF-59 나노에멀전의 생성속도와 입자크기와의 상관관계를 나타낸 것이다. 모든 처리군에서 MSD 250 nm의 나노에멀전을 제조할 수 있었으며, 특히 ISP-2000을 사용하면 2.5 mL/min의 속도로 MSD 220 nm의 나노에멀전을 생산할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 200 nm 정도의 나노에멀전을 대량생산하는데 효율적이었다.

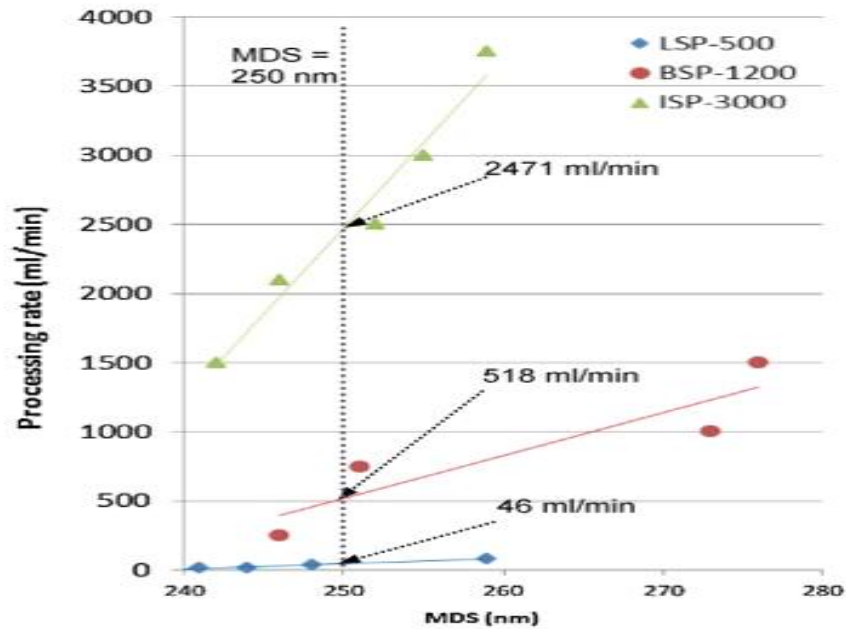


그림 3-2-9. LSP-500, BSP-1200, 및 ISP-3000으로 제조한 나노에멀전의 생성속도 및 입자크기.

1. 커큐민 나노에멀전의 대량 생산화를 위한 최적 공정기술 확립

가. Lab-scale 강황추출물 나노에멀전 제조 최적공정 확립

(1) 고농도 커큐민 추출을 위한 용매 및 추출방법 최적화

(가) 추출 용매의 최적화

- 일반적으로 강황에서 커큐민을 추출하는 방법은 에탄올이나 헥산, DMSO(dimethyl sulfoxide) 등과 같은 유기용매를 사용하고 있는데, 식품으로 허가되기 위해서는 유기용매가 아닌 물 또는 에탄올만을 사용하여 추출하여야 한다.
- 하지만 커큐민의 물에 대한 용해도가 매우 낮기 때문에 에탄올의 농도별(30%, 50%, 70%, 및 95%)로 추출되는 효율을 비교하기 위해 물과 에탄올에 강황 분말을 1 mg/mL와 10 mg/mL의 농도로 침지하여 상온에서 24시간 동안 정치한 후 추출된 커큐민의 함량을 분석하여 최적의 용매를 선정하였다.
- 그림 3-2-10은 1 mg/mL의 농도와 10 mg/mL의 농도의 강황 분말을 증류수, 30%, 50%, 70%, 및 95%의 에탄올에서 추출한 시료의 사진으로 저농도와 고농도 모두의 조건에서 50% 에탄올과 70% 에탄올에서 커큐민의 함량이 높게 추출되는 결과를 얻었다.
- 하지만, 그림 3-2-4에서 보듯이 1 mg/mL의 저농도 보다는 10 mg/mL의 고농도로 추출한 경우 50% 에탄올에서 더욱 뚜렷한 색깔의 변화를 보이고 있어 더 많은 양의 커큐민이 추출되었을 것으로 예측되었다.

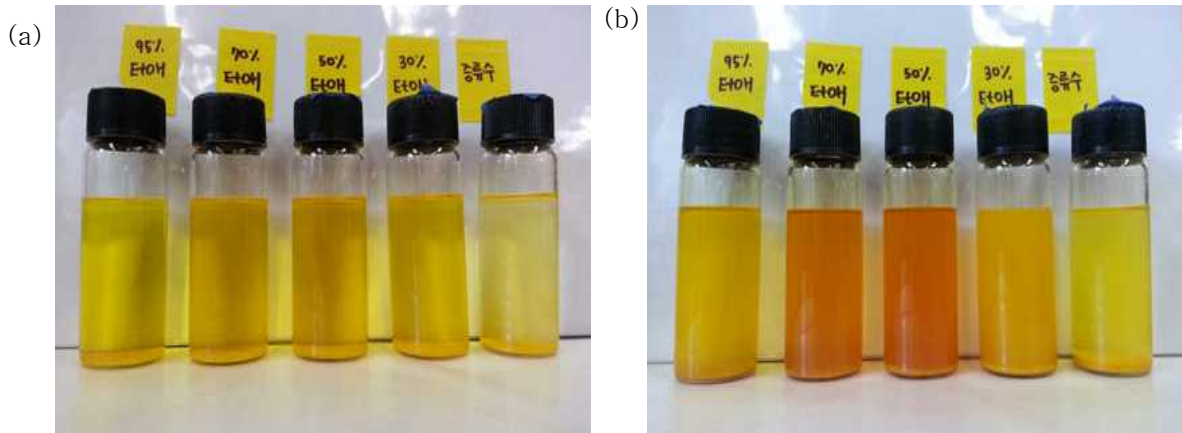


그림 3-2-10. (a) 1 mg/mL과 (b) 10 mg/mL의 강황 분말을 사용한 추출 용매에 따른 시료 사진.

- 추출용매에 따른 커큐민의 함량을 분석하기 위해 커큐민 표준물질을 DMSO 용매에 5가지 농도 조건의 표준용액으로 제조하고, 제조된 표준용액을 UV 분광광도계를 이용하여 425 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다(그림 3-2-11a).
- 각 용매에서 추출한 강황 추출물을 UV 분광광도계로 흡광도를 측정한 후 표준곡선에 대입하여 커큐민 농도를 계산한 결과 그림 3-2-11b에 나타내었다. 예상했던 것과 같이 물(DW)에서는 9.16 $\mu\text{g/mL}$ 의 커큐민이 추출되어 용해도가 낮은 물로 추출하는 것은 효율적이지 않았다.
- 에탄올을 이용한 추출방법에서는 물 추출에 비해 크게 증가하는 경향을 보였는데, 30%에서 95%의 에탄올에서는 85.68~115.34 $\mu\text{g/mL}$ 사이의 커큐민이 추출됨을 알 수 있으며, 특히, 커큐민의 함량이 최대치를 보인 조건은 50%의 에탄올로 추출한 조건이었다. 50% 이상의 에탄올에서는 오히려 커큐민의 추출이 감소하였는데, 70%와 95% 에탄올을 사용한 경우 각각 110.21 $\mu\text{g/mL}$ 과 97.00 $\mu\text{g/mL}$ 로 감소되는 경향을 보였다.

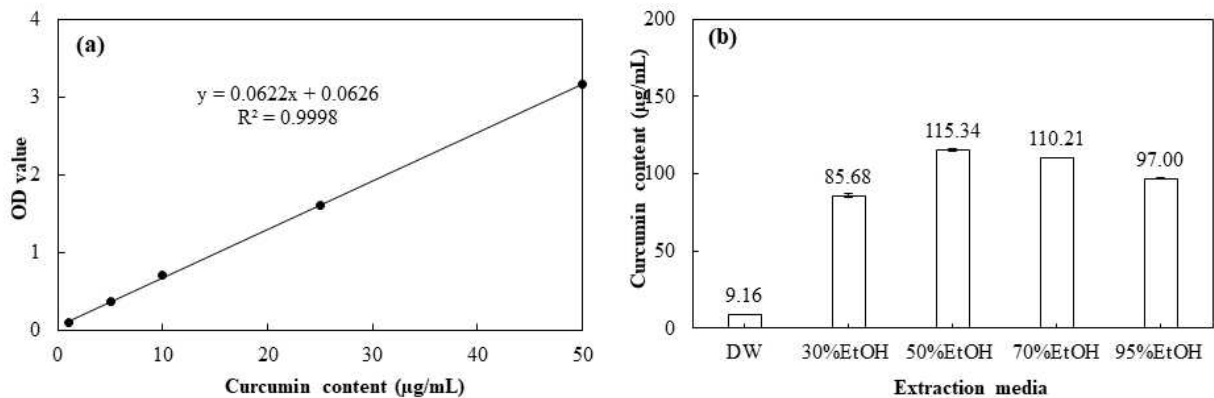


그림 3-2-11. (a) 커큐민의 표준곡선과 (b)추출용매에 따른 커큐민의 함량.

- 위의 결과를 토대로 50%와 70% 에탄올과 비교를 위한 대조군으로 물을 선정하였고, 추출시간은 12시간 단위로 최대 48시간까지 추출하면서 커큐민의 함량을 분석한 결과 그림 3-2-6에서 보는 것과 같이 50% 에탄올에서 가장 높은 흡광도를 보였고, 추출시간에서는 36시간에서 최대 함량을 보였다(그림 3-2-12).

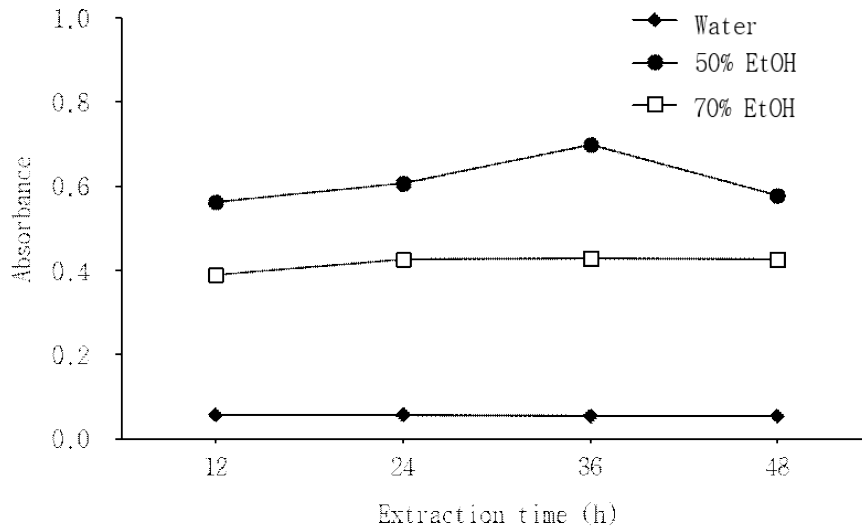


그림 3-2-12. 추출시간에 따른 물, 50% 에탄올, 및 70% 에탄올에서의 커큐민의 함량.

(나) 추출 횟수에 따른 커큐민 추출 함량

- 최적의 추출용매로 선별된 50% 에탄올을 이용하고, 추출 횟수에 따른 강황에서의 커큐민 추출조건을 최적화하기 위해 50% 에탄올로 24시간 씩 추출하는 공정을 총 3회 반복하여 추출하였다. 정확한 커큐민의 함량을 분석하기 위해 HPLC (Shimadzu D-20A HPLC, Kyoto, Japan)를 사용하였고, 분석조건으로 detector는 UV detector를 사용하였고, 검출 파장은 425 nm를 사용하였다. 칼럼은 ACE5 C18 column (4.6 × 250 mm, 5 mm; advanced chromatography Technologies, Aberdeen, UK), mobile phase는 acetonitrile과 2% acetic acid를 65:35의 비율로 혼합하여 사용하였고, flow rate는 1.0 mL/min, injection volume 은 20 µL로 설정하였다.
- HPLC를 이용한 표준 커큐민을 가지고 표준곡선을 구하고, 추출물에 함유된 커큐민의 함량을 계산하는데 사용하였다. 그림 3-2-13은 전형적인 HPLC spectrum과 커큐민 표준용액에 의한 표준곡선이다.

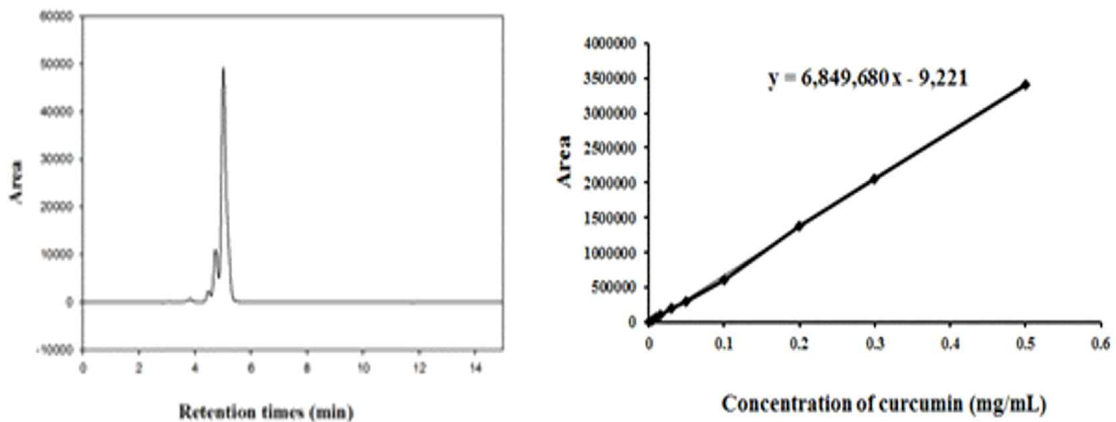


그림 3-2-13. HPLC spectrum과 커큐민의 표준곡선.

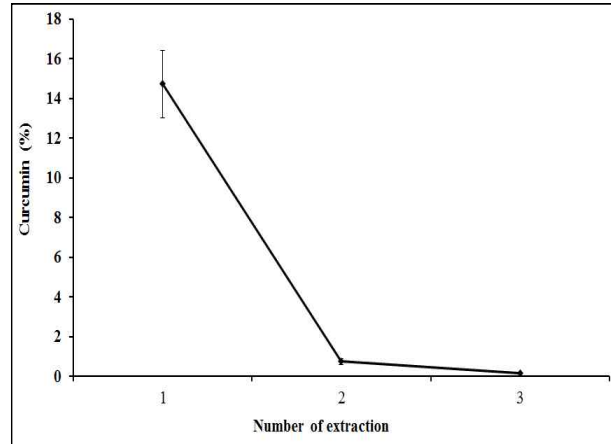
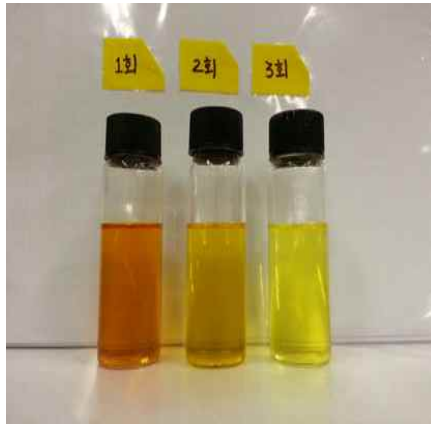


그림 3-2-14. 추출 횟수에 따른 강황추출물 사진과 커큐민의 함량.

- 10 mg/mL의 강황을 50% 에탄올에 추출하면서 추출횟수에 따른 추출되는 커큐민의 함량을 분석한 결과 그림 3-2-14에서 보는 것과 같이 1회에서는 진한 갈색을 보이며, 2회, 3회 반복하여 추출하였을 경우 색이 옅어지는 경향을 보였다. 또한 HPLC를 이용한 정량분석 결과에서도 1회 추출에서는 커큐민의 함량이 15%를 나타내지만 2회 추출에서는 1% 이하를 보이며 유의적인 차이를 보였다.

(다) 유화제의 첨가와 초음파 처리의 병행에 따른 커큐민 추출 함량

- 강황분말을 물에 1%(w/v)의 농도로 넣고, 친유성 유화제인 레시틴(lecithin)을 강황분말의 2%(w/w 강황분말)로 첨가하여 상온에서 24시간 정치 추출하였고, US 처리시간에 따른 효과를 보기위해 레시틴을 혼합한 후 0, 1, 3, 5, 10 및 20분 동안 US 처리하면서 각 조건에서의 커큐민 함량을 측정하였다.
- 그림 3-2-15는 2% 레시틴을 첨가한 물을 용매로 하여 US 처리시간에 따른 커큐민 추출함량을 나타낸 것으로 US 처리를 하지 않은 경우에는 48.8 $\mu\text{g/mL}$ 의 커큐민이 추출되었으나 US 처리 시간이 증가함에 따라 크게 증가하면서 10분 동안 처리한 경우 최대값이 388.2 $\mu\text{g/mL}$ 의 커큐민이 추출되었다. 이는 50% 에탄올을 이용한 추출과 비슷한 수준의 커큐민이 추출되는 결과를 보였다. 하지만 20분 동안 처리하였을 경우 다시 감소하는 결과를 보여 US 10분 처리가 가장 고농도의 커큐민을 추출할 수 있는 최적의 조건임을 확립하였다.

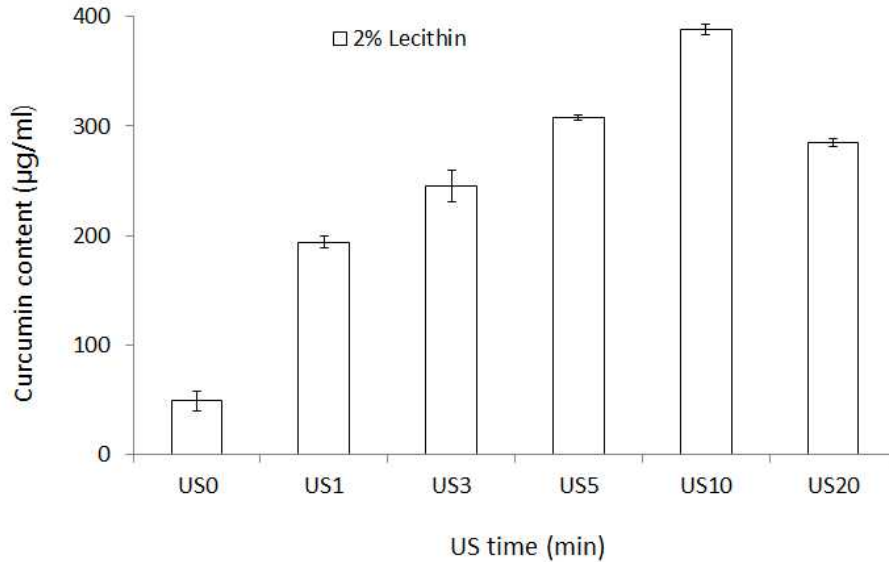


그림 3-2-15. US 처리 시간에 따른 커큐민의 추출 함량(2% 레시틴).

- 레시틴의 함량에 따른 효과를 비교하기 위해 레시틴을 강황분말의 0%, 1%, 2%로 하면서 US 처리시간을 10분간 처리하여 추출된 커큐민의 함량을 비교한 결과를 그림 3-2-16에 나타내었다. 그림에서 보듯이 레시틴을 첨가하지 않은 물(No-surfactant)에서는 4.29 µg/mL로 매우 적은 양의 커큐민이 추출되었고, US 시간을 10분까지 처리하였을 경우에도 32.12 µg/mL로 8배 가까이 증가하였지만, 유기용매로 추출한 커큐민의 함량과 비교 시 매우 낮은 함량이 추출되었다.
- 하지만, 레시틴의 함량을 1%와 2%(w/w 강황)로 첨가한 경우에는 US를 처리하지 않았을 때, 각각 29.4 µg/mL와 48.8 µg/mL로 물에서 추출한 것에 비해서는 10배 이상 높은 함량을 보였다. 또한 여기에 US 처리를 하는 경우 커큐민의 추출량이 크게 증가하면서 10분간 처리를 하였을 때, 1% 레시틴에서는 242.4 µg/mL, 2% 레시틴에서는 388.2 µg/mL로 물에서 추출된 커큐민에 비해 최대 90.5배가 증가하였다.

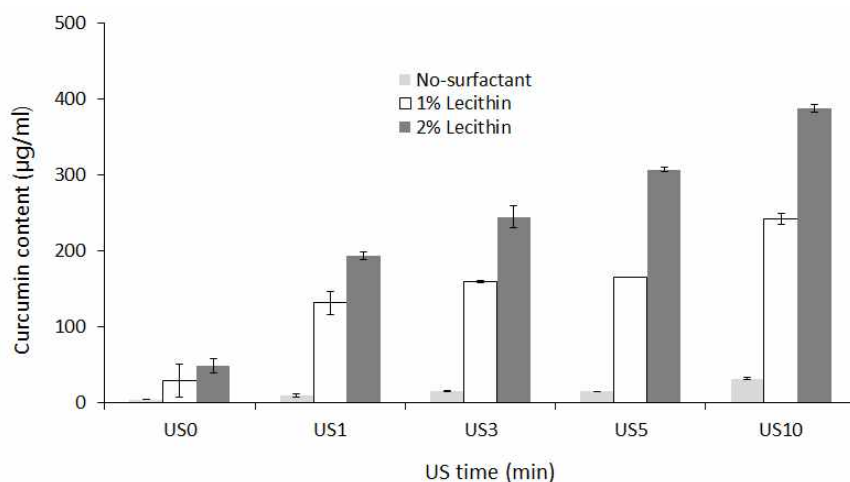


그림 3-2-16. 레시틴 함량과 US 시간에 따른 커큐민 추출 함량.

- 에멀전을 제조하는데 친유성 유화제인 레시틴만을 사용하면 O/W 에멀전의 형성이 불안정하며, 친수성 유화제인 tween 80(HLB: 15)과 tween 20(HLB: 16.7)을 적당량 혼합하여야 한다. 강황추출물에서 커큐민을 더 많이 추출하기 위해 레시틴 대신 친수성 유화제인 tween 80과 tween 20을 사용하여 추출효율에 미치는 영향을 살펴보았다.

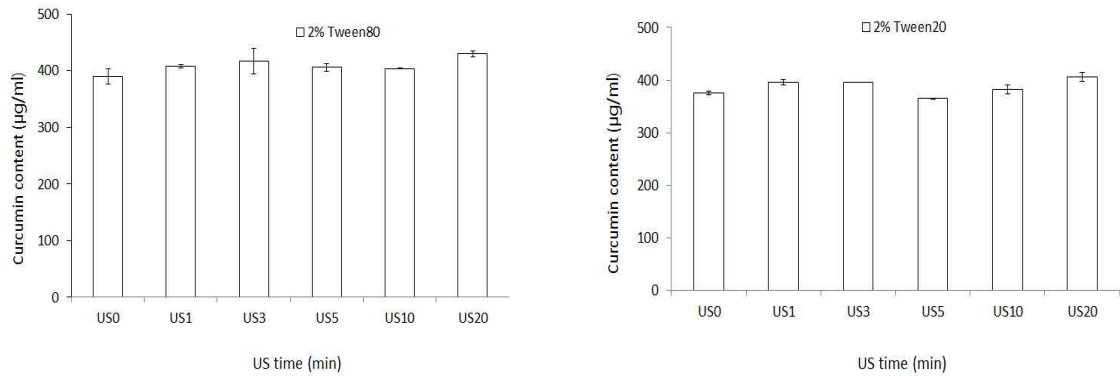


그림 3-2-17. 2%의 친수성 유화제 첨가 후 US 처리 시간에 따른 커큐민 추출 함량.

- 그림 3-2-17은 2%의 tween 80과 2%의 tween 20을 첨가하고, US 처리시간을 0에서 20분까지 증가하면서 추출된 커큐민의 함량을 비교한 것으로 두 가지 유화제에서 모두 US를 처리하지 않고, 친수성 유화제 2%만을 첨가하여도 이미 높은 함량의 커큐민이 추출되어 추가적인 US 처리 시간에 따른 효과는 유의적인 차이가 없었다.
- 또한 tween 80을 사용한 조건에서 tween 20을 사용한 조건에 비해 다소 높은 커큐민이 추출되는 경향을 보였다(그림 3-2-17).
- Tween 80의 함량에 따른 커큐민 추출함량을 비교하기 위해 tween 80의 첨가량을 최대 4%(w/w 강황)까지 증가하였고, US 처리 없이 24시간 정치추출을 하여 50% 에탄올 추출결과를 대조군으로 사용하여 비교하였다.
- Tween 80의 함량이 1%에서 3%까지 증가하면서 커큐민의 추출 함량은 조금씩 증가하는 경향을 보였지만 4%이상의 tween 80을 첨가하는 경우에는 더 이상 커큐민 추출함량은 증가하지 않았다. 또한 3% 이상의 tween 80을 첨가하는 경우에는 50% 에탄올 추출 조건과 비슷한 함량의 커큐민이 추출되었다(그림 3-2-18).

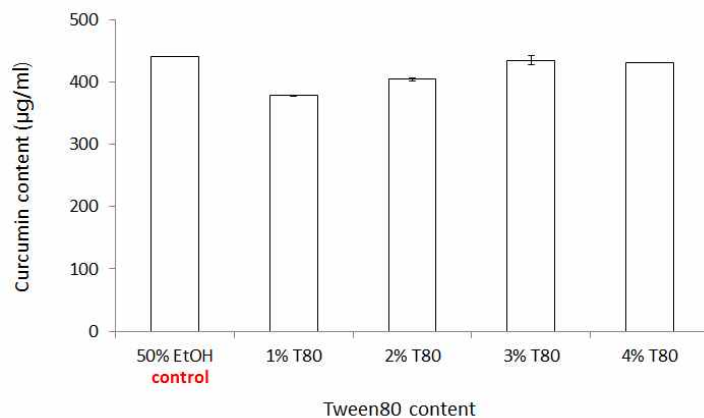


그림 3-2-18. Tween 80의 함량에 따른 커큐민 추출 함량.

- 앞에서 보여준 결과를 서로 비교하기 위해 유화제로 레시틴, tween 80, 및 tween 20을 1%와 2%(w/w 강황) 사용하고, US 처리 시간을 0분과 10분으로 처리하여 추출된 커큐민 함량 결과를 그림 3-2-19에서 비교하였다.

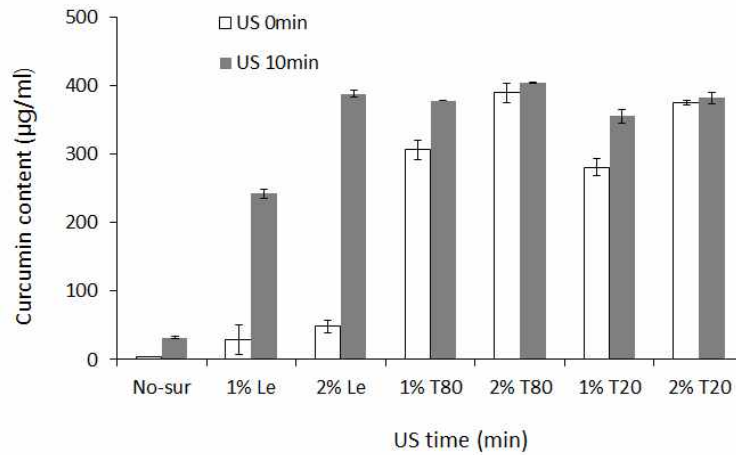


그림 3-2-19. 유화제 종류와 함량 및 US 처리 시간에 따른 커큐민 추출함량.

- 유화제가 첨가되지 않은 조건에서는 US 처리 후 크게 증가는 하지만 US 처리하지 않은 조건이 매우 낮았기 때문에 아직 고함량의 커큐민이 추출되지 못한다. 또한 친유성 유화제인 레시틴의 경우에는 첨가량이 증가함에 따라 커큐민의 추출 함량도 증가하는 경향을 보이나 US 처리를 하지 않은 경우에는 50 µg/mL 정도의 커큐민이 추출되었고, US 처리를 한 경우 약 380 µg/mL 까지 커큐민의 추출 함량이 증가하였다.
- 친수성 유화제인 tween 80과 tween 20의 경우에는 유화제의 농도가 1%만 첨가하여도 300 µg/mL 이내의 높은 커큐민 추출 함량을 보였고, 유화제의 농도가 증가함에 따라 커큐민의 추출 함량은 더욱 크게 증가하였다. 또한 US를 처리하였을 경우 1%의 조건에서는 크게 증가하였고, 2% 조건에서는 유의적인 증가는 보이지 않고 약 400 µg/mL의 커큐민 추출되는 결과를 보였다(그림 3-2-19).

(2) 강황추출물 함유 나노에멀전 제조공정 확립

(가) 오일 스크리닝

- 강황추출물 함유 나노에멀전을 제조하기 위해 강황추출물에 함유된 기능성분인 커큐민을 가장 많이 용해시키는 오일을 선별하였다. 에멀전에서 oil phase의 역할은 기능성분의 캡슐화 효율(encapsulation efficiency)와 직접적인 영향이 있으며, 기능성 커큐민을 가장 많이 용해시키는 오일을 선정하는 것은 매우 중요하다.
- 우선, 식용 가능한 5가지의 오일(MCT oil, Canola oil, Corn oil, Sesame oil, Soybean oil)에 강황추출물 1mg/mL의 농도로 첨가하여 잘 혼합한 후 10,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상등액과 침전액을 분리하면, 상등액에는 오일 층에 용해된 커큐민이 함유되어 있으며, 침전액에는 용해되지 않은 성분들로 구성된다. 상등액의 흡광도를 측정하여 커큐민을 정량 하였다.

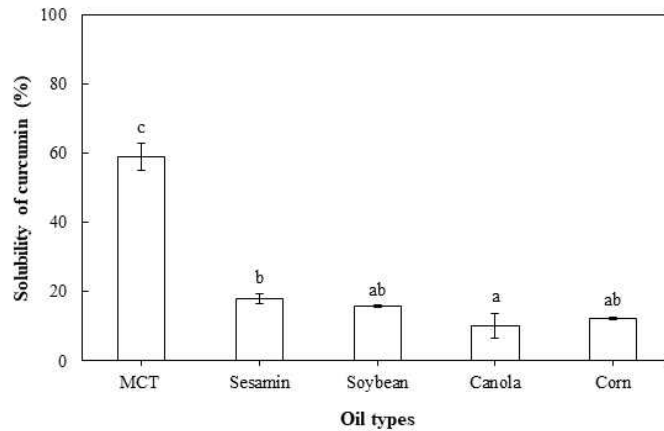


그림 3-2-20. 오일의 종류에 따른 커큐민의 용해도.

- 오일의 종류에 따른 커큐민의 추출 함량 결과는 그림 3-2-20에서 보이는 것처럼 MCT 오일에서 약 59.0%로 가장 높은 수치를 보였고, sesame 오일, soybean 오일, 및 corn 오일에서는 각각 17.9%, 15.7%, 및 12.3%의 커큐민이 용해되는 것을 알 수 있었다. 하지만 canola 오일의 경우 10.2%로 다른 오일들에 비해 현저하게 낮은 값을 보이고 있었다.
- 강황추출물에 있는 커큐민이 가장 많이 용해되는 MCT (medium chain triglyceride) 오일은 중쇄 지방산인 C8~C12인 지방산들로 구성되어 있으며, 무색, 무취의 특성을 가지고 있어 다양한 식품에 적용되고 있다.

(나) 강황추출물 나노에멀전 제조를 위한 물리적 처리 조건 확립

- 강황추출물 나노에멀전을 개발하기 위해 본 연구에서는 물에 잘 녹지 않는 강황추출물을 오일스 크리닝을 통해 선정된 MCT 오일에 용해시키고, 물과 유화제의 함량을 조절하여 최적의 함량 비율을 확립하고자 하였다.
- 하지만, 에멀전의 입자크기가 나노입자 수준에서 안정한 상태를 지속하기 위해서는 물리적인 힘이 더해져야 하며, 일반적으로 혼합 및 균질화를 위해 magnetic stirring, high speed homogenization (HSH), ultrasonication (US), 및 high pressure homogenization (HPH) 등의 물리적인 방법이 사용되고 있다.
- 강황추출물 나노에멀전의 제조는 7.5% (w/w)의 강황추출물과 대두 레시틴을 MCT 오일에 넣어 oil phase를 제조하고, 증류수와 tween 80을 혼합하여 aqueous phase를 제조한 후 oil phase와 aqueous phase를 혼합하여 상온에서 magnetic stirring을 2시간 동안 처리하면서 균일하게 혼합시켰다.
- 혼합된 에멀전의 입자 크기를 줄이고, 안정성을 향상시키기 위해 high speed homogenization (HSH), ultrasonication (US), 및 high pressure homogenization (HPH) 처리를 수행하면서 각각의 입자크기 변화를 비교하였다.
- 그림 3-2-21은 강황추출물 에멀전의 제조에서 처리한 대조군과 HSH, US, 및 HPH 처리에 따른 시료의 사진으로 사진에서 보는 것처럼 HSH 처리 한 시료의 경우 색이 옅은 갈색을 보이고, 상층에 크리밍(creaming)이 형성되는 것을 볼 수 있다. 이는 균질과정에서 형성된 크림층이 남아 있기 때문이다.
- 하지만 US와 HPH 처리된 시료의 경우 색이 더 진한 갈색을 보이고 있으며, 크림층이 형성도 관

찰되지 않고 균일한 용액을 얻을 수 있어 HSH 처리에 비해 더 균일한 에멀전을 형성한 것으로 보인다.

- 또한, 입자의 크기는 HSH 처리된 시료의 경우 약 500 nm 수준의 입자가 형성되지만 US 처리와 HPH 처리를 한 시료의 경우에는 100 nm 이하의 평균 입자크기를 보이고 있고, PDI 값도 HSH 처리에 비해 낮은 값을 보이고 있어. US 처리와 HPH 처리 시 균일하고, 안정한 나노에멀전이 형성 되었다고 판단된다(그림 3-2-22A).
- 제타전위의 경우 HSH 처리된 시료는 층 분리와 함께 에멀전의 상태가 불안정해 정확한 제타전위의 측정이 어려웠으며, US 처리와 HPH 처리한 시료의 제타전위는 그림 3-2-22B 에서 보는 것과 같이 각각 -24.93 mV와 -32.29 mV를 나타내었다.

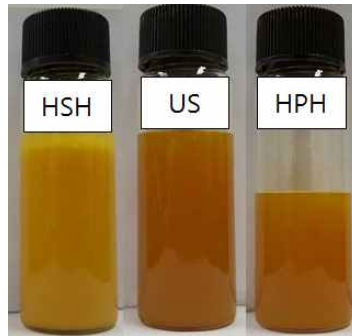


그림 3-2-21. HSP, US, 및 HPH 처리된 강황추출물 나노에멀전 사진.

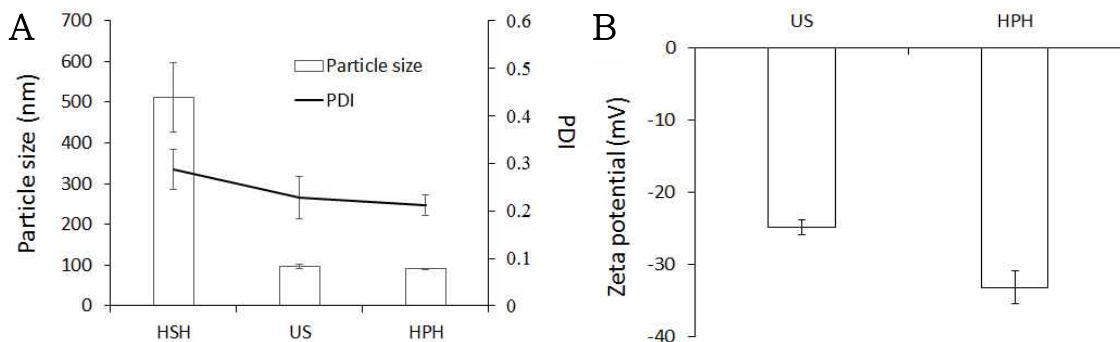


그림 3-2-22. 물리적인 처리에 의한 강황추출물 나노에멀전의 입자크기, PDI 및 제타전위.

(다) 오일, 유화제 혼합 조성에 따른 나노에멀전의 안정성

- 나노에멀전의 제조는 oil, 유화제, water의 적절한 조성으로 구성하게 되는데, 이들의 구성비율을 확립하기 위해 우선 표 3-2-3에 나타난 것과 같이 오일(MCT oil), 유화제(Tween 80), 증류수(DW)의 제조 비율을 설정하였다.
- MCT 오일과 물의 비율을 1: 50으로 고정하고, 유화제인 tween 80의 비율을 0.3, 0.7, 1.0, 1.5, 및 2.0으로 조정하면서 나노에멀전을 제조하였고, 제조된 강황추출물 나노에멀전의 mean droplet size, PDI, 및 제타전위(zeta potential)를 측정하였다.

표 3-2-3. 물의 비율 50에서 tween 80의 함량 변화 따른 제조 조건

Sample	비율			함량 (%)		
	MCT oil	Tween 80	DW	MCT oil	Tween 80	DW
A7	1	0.3	50	1.95	0.58	97.47
A9	1	0.7	50	1.93	1.35	96.71
A10	1	1.0	50	1.92	1.92	96.15
A11	1	1.5	50	1.90	2.86	95.24
A12	1	2.0	50	1.89	3.77	94.34

- 그림 3-2-23에서 보듯이 유화제(tween 80)의 함량이 증가함에 따라 입자의 크기는 감소하여 112.6 nm까지 줄어들다가 유화제의 비율이 1.0 이상에서는 다시 증가하여 2.0의 비율에서는 290.9 nm로 크게 증가하는 경향을 보였다. 이는 유화제의 비율이 1.0에서 가장 작은 입자를 만들 수 있는 최적의 조성이라고 보인다.
- PDI 값은 값이 작을수록 입자의 분포가 균일하다는 것을 의미하며, 일반적으로 0.3 이하의 값을 갖는 경우 균일하다고 판단하고 있다. 본 결과에서는 모든 조건에서 PDI의 값이 0.3 이하로 나타났으며, 특히 유화제의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다.

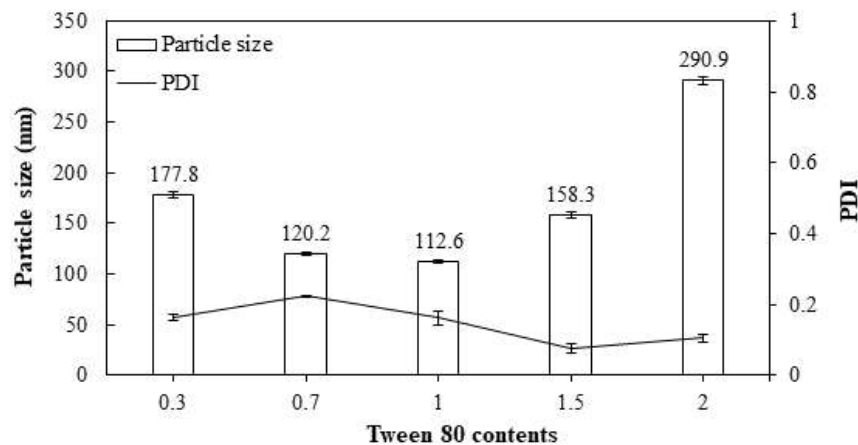


그림 3-2-23. 물의 비율 50에서 tween 80의 함량 비율에 따른 나노에멀전의 입자크기와 PDI

- 제타전위란 콜로이드상에서 입자가 가진 최외각 전자의 전위차를 의미하는 것으로 일반적으로 절대값으로 30 이상인 경우 콜로이드가 안정하다고 판단하고 있다. Tween 80의 비율에 따른 강황추출물 나노에멀전의 제타전위는 -14 mV 에서 -22 mV 사이의 값을 보였는데, 이는 Non-ionic 유화제인 tween 80만을 사용하였기 때문이며, 낮은 제타전위 값을 통해 tween 80만을 사용한 나노에멀전은 저장 시간에 따라 침전(precipitation), 층분리(phase separation), 응집(aggregation/flocculation) 등의 불안정성을 보일 것으로 예측된다(그림 3-2-24).

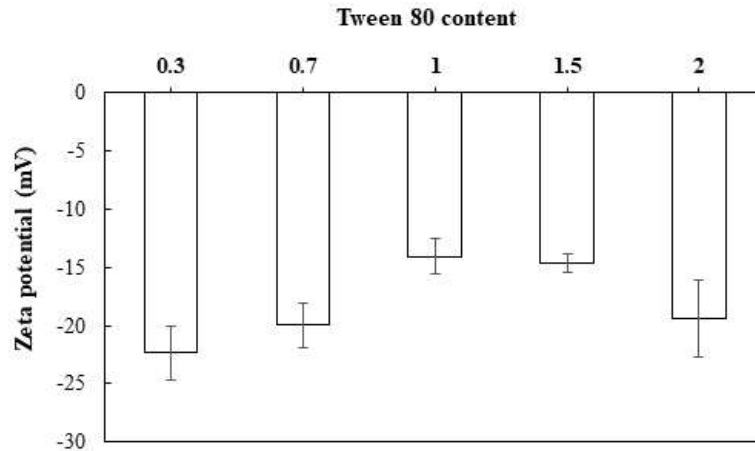


그림 3-2-24. 물의 비율 50에서 tween 80의 함량 비율에 따른 나노에멀전의 제타전위.

- 그림 3-2-25는 tween 80의 함량 비율에 따른 강황추출물 나노에멀전의 저장 안정성을 평가한 결과를 나타낸 것으로 제조 후 30일 동안 저온(4도)에서 저장 하면서 입자의 크기와 PDI의 변화를 측정한 결과 입자의 크기와 PDI 모두 저장 30일 에서도 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

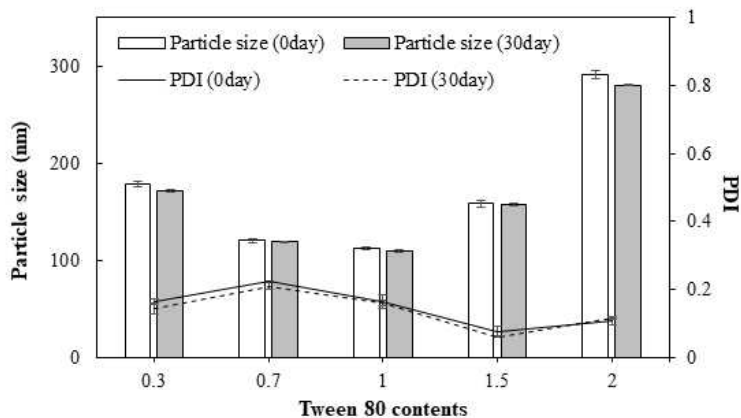


그림 3-2-25. 물의 비율 50에서 tween 80의 함량 비율에 따른 나노에멀전의 저장 안정성 평가.

- 나노에멀전에 함유되는 강황추출물의 양을 높이기 위해 증류수의 비율을 10으로 줄이고, 오일의 비율을 1로 하면서 tween 80의 비율을 0.3, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0%로 변화하면서 나노에멀전을 제조하였다(표 3-2-4).

표 3-2-4. 물의 비율 10에서 tween 80의 함량 변화 따른 제조 조건

Sample	비율			함량 (%)		
	MCT oil	Tween 80	DW	MCT oil	Tween 80	DW
A7	1	0.3	10	8.85	2.65	88.50
A9	1	0.7	10	8.55	5.98	85.47
A10	1	1.0	10	8.33	8.33	83.33
A11	1	1.5	10	8.00	12.00	80.00
A12	1	2.0	10	7.69	15.38	76.92

- 제조 공정에서 나노에멀전은 high speed homogenization 15분, ultrasonication 15분 및 high pressure homogenization 3 cycle을 처리하였다.
- 그림 3-2-26은 물의 비율이 10으로 고정된 상태에서 tween 80의 함량 변화에 따른 입자의 크기와 PDI 변화를 나타낸 결과로 물의 함량이 낮은 조건에서는 tween 80의 함량이 증가함에 따라 입자의 크기도 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며, tween 80의 함량이 2.0인 조건에서는 약 433.5 nm로 물의 비율이 50이었던 조건에 비해 약 49%가 증가하는 결과를 보여주었다. 하지만 PDI의 값은 0.3 이하를 나타내면서 모든 조건에서 균일한 상태를 나타내었다.

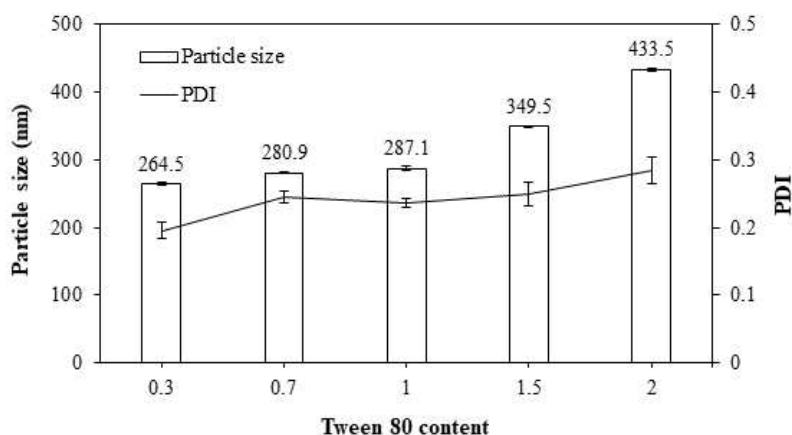


그림 3-2-26. 물의 비율 10에서 tween 80의 함량 비율에 따른 나노에멀전의 입자크기와 PDI

- 제타전위의 결과는 물의 비율 50인 조건과 비슷한 경향을 보였고, 역시 절대값이 30 이하의 낮은 제타전위를 보여, 안정성이 낮을 것으로 예상된다(그림 3-2-27).

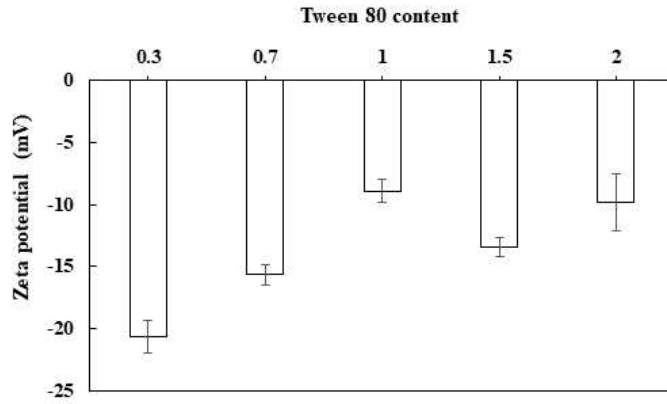


그림 3-2-27. 물의 비율 10에서 tween 80의 함량 비율에 따른 나노에멀전의 제타전위.

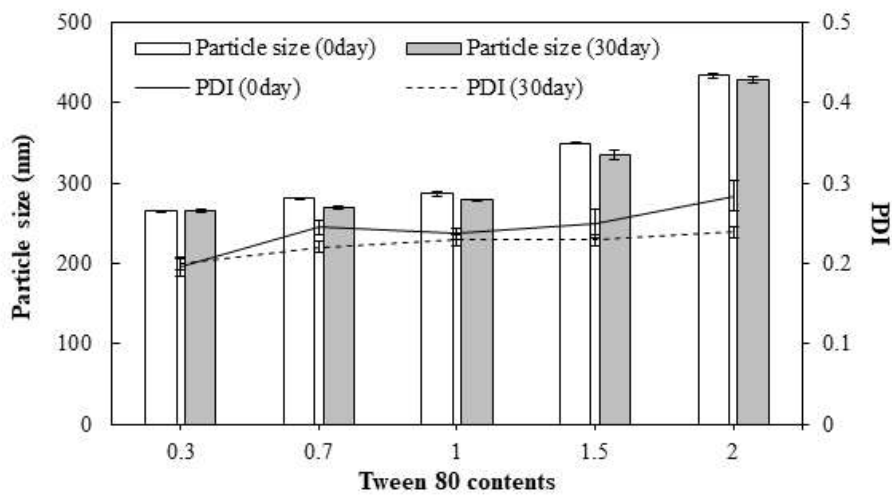


그림 3-2-28. 물의 비율 10에서 tween 80의 함량 비율에 따른 나노에멀전의 저장 안정성 평가.

- 저장 안정성 실험에서는 물의 함량이 50%인 조건에 물의 함량이 10%로 줄인 조건에서는 저장 30일 이후 입자의 크기가 다소 감소되는 경향을 보였다(그림 3-2-28).
- 오일과 물의 비율을 1:5로 고정하여 물의 함량을 더욱 감소시킨 후 tween 80의 비율을 0.3, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0 비율로 조정 하면서 강황추출물 나노에멀전을 제조하였다(표 3-2-5).
- 물의 비율이 크게 줄어들어 따라 에멀전의 입자 크기가 급격하게 상승하였고, PDI 값도 증가하는 경향을 보였다. 그림 3-2-29에서 보는 것처럼 tween 80의 비율이 0.3일 때 359.9 nm 이고, tween 80의 비율이 1.5와 2.0으로 증가함에 따라 입자의 크기는 각각 1,010.7 nm와 2,382.6 nm로 나노에멀전이 아닌 마이크로 수준의 coarse 에멀전이 되었다. 또한 tween 80의 비율이 1.0 이상에서는 PDI 값이 0.3 이상을 나타내고 있었다.

표 3-2-5. 물의 비율 5에서 tween 80의 함량 변화 따른 제조 조건

Sample	비율			함량 (%)		
	MCT oil	Tween 80	DW	MCT oil	Tween 80	DW
A7	1	0.3	5	15.87	4.76	79.37
A9	1	0.7	5	14.93	10.45	74.63
A10	1	1.0	5	14.29	14.29	71.43
A11	1	1.5	5	13.33	20.00	66.67
A12	1	2.0	5	12.50	25.00	62.50

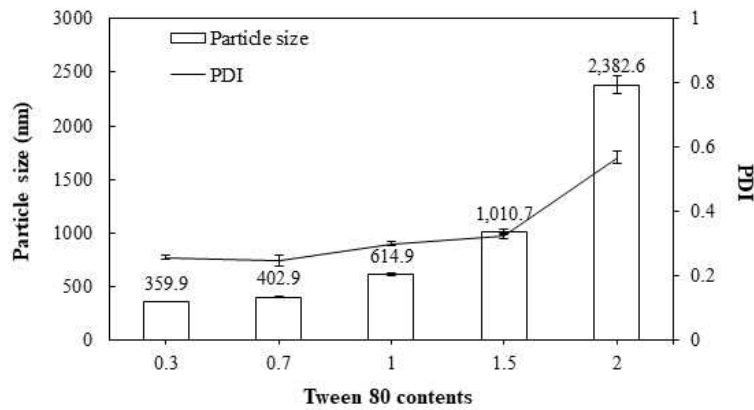


그림 3-2-29. 물의 비율 5에서 tween 80의 함량 비율에 따른 에멀전의 입자크기와 PDI.

- 제타전위의 경우에는 $-8.85 \text{ mV} \sim -21.77 \text{ mV}$ 사이의 값을 보이고 있으며, tween 80의 함량에 따라 일관성 없는 변화를 보이고 있어 제조된 에멀전의 상태가 매우 불안정한 상태라고 판단된다(그림 3-2-30).
- 오일: tween 80: 물의 비율을 1: 2: 50의 비율로 고정시키고, 강황추출물을 오일에 대해서 0, 5, 10, 15, 및 20%의 비율로 혼합하여 나노에멀전을 제조하였다. 나노에멀전 제조 공정은 앞의 방법과 같이 magnetic stirring, HSH 15분, 및 US 15분 처리를 하여 균질화 하였다(표 3-2-6).

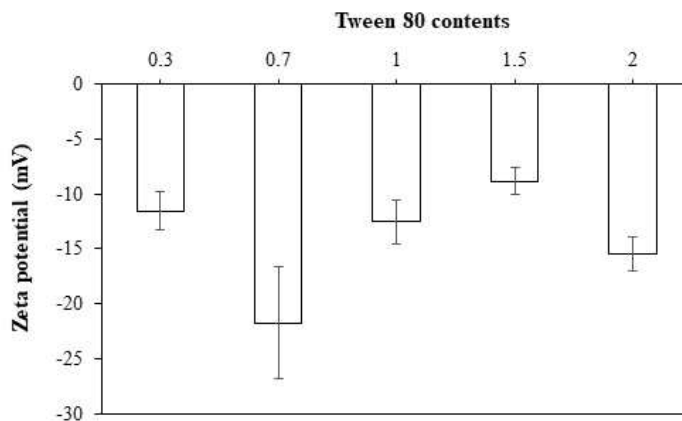


그림 3-2-30. 물의 비율 5에서 tween 80의 함량 비율에 따른 에멀전의 제타전위.

표 3-2-6. 강황추출물의 함량에 따른 나노에멀전의 제조 조건(오일:tween 80;물=1:2:50).

Sample	비율			강황추출물 (% w/w oil)
	MCT oil	Tween 80	DW	
강0%	1	2	50	0
강5%				0.05
강10%				0.10
강15%				0.15
강20%				0.20

- 강황추출물의 함량에 따른 나노에멀전의 입자크기는 100~150 nm 사이의 크기를 보이며, 강황추출물이 10%에서 입자의 크기가 가장 작은 결과를 보이다가 강황추출물의 함량이 15%와 20%로 증가함에 따라 입자의 크기가 다시 증가하여 20% 강황추출물을 첨가한 조건에서는 157 nm까지 증가하였다. 하지만 PDI 값은 강황추출물의 함량에 따라 큰 변화가 없이 0.3 이하의 값을 나타내었다(그림 3-2-31).

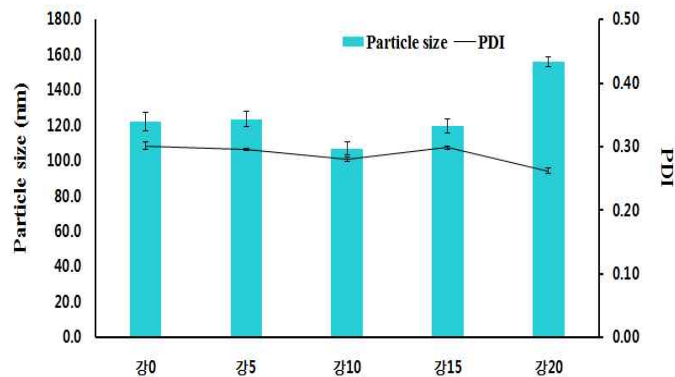


그림 3-2-31. 강황추출물의 함량에 따른 입자 크기 및 PDI (오일:tween 80;물=1:2:50).

- 앞의 결과에서 tween 80의 비율을 0.5로 줄이고, 물의 비율을 10으로 조정한 후 강황추출물의 함량을 0.2%~3.0% (w/w oil)까지 달리하면서 에멀전을 제조하였다(표 3-2-7).
- Tween80과 물의 비율이 0.5와 10으로 감소된 조건에서 강황추출물의 함량을 달리하였을 때 입자의 크기는 약 200 nm 이하의 크기를 보이며, 물의 비율이 50이었던 조건에 비해서는 다소 큰 입자크기를 보였다. 하지만 PDI는 0.2 이하를 보였다(그림 3-2-32).
- 제타전위의 경우 매우 불안정한 상태를 보였는데, 강황추출물의 함량이 증가함에 따라 제타전위가 감소하였으며, 일부 조건에서는 다시 증가하면서 큰 편차를 보이고 있었다(그림 3-2-32)

표 3-2-7. 강황추출물의 함량에 따른 나노에멀전의 제조 조건 2(오일:tween 80;물=1:0.5:10).

Sample	비율			
	MCT oil	Tween 80	DW	강황추출물 (% w/w oil)
강20%	1	0.5	10	0.2
강50%				0.5
강70%				0.7
강100%				1.0
강150%				1.5
강170%				1.7
강200%				2.0
강250%				2.5
강270%				2.7
강300%				3.0

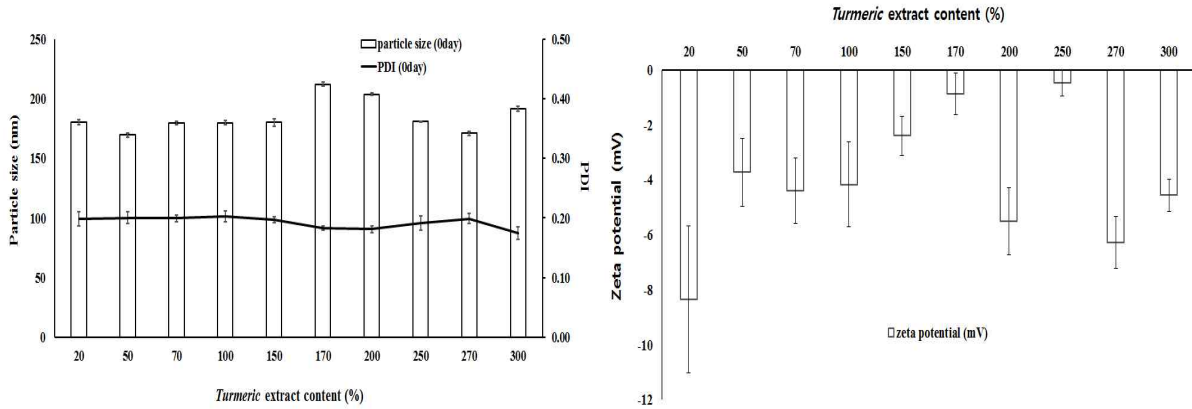


그림 3-2-32. 강황추출물의 함량에 따른 입자크기, PDI, 및 제타전위(오일:tween 80;물=1:0.5:10).

- 강황추출물의 함량 변화에 따라 제조된 나노에멀전의 저장 안정성을 평가하기 위해 상온에서 20일과 30일 동안 저장하면서 입자크기와 PDI의 변화를 측정한 결과 그림 3-2-33에서 보는 것과 같이 입자크기와 PDI 모두에서 조건별 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

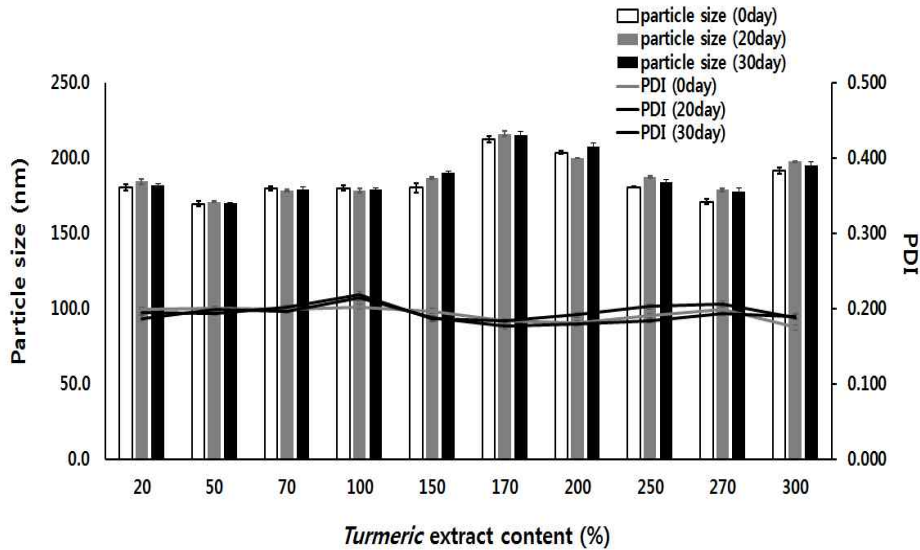


그림 3-2-33. 강황추출물 나노에멀전의 입자크기와 PDI를 통한 저장 안정성 평가 (오일:tween 80;물=1:0.5:10).

- 앞의 선행연구들을 종합해 볼 때, 나노에멀전을 제조하기 위해서는 물의 함량이 80% 이상이 필요하고, 오일과 유화제의 비율을 1: 0.5, 1: 1.0, 1: 1.5, 및 1: 2.0으로 달리하면서 에멀전의 입자크기 및 제타전위의 변화를 측정하였다(표 3-2-8).

표 3-2-8. 오일 : 유화제의 비율에 따른 강황추출물 나노에멀전 제조 비율

오일: 유화제	오일(%)	유화제(%)	물 (%)
1: 0.5	13.34	6.66	80
1: 1.0	10.00	10.00	80
1: 1.5	8.00	12.00	80
1: 2.0	6.66	13.34	80

- 그림 3-2-34는 oil과 surfactant 비율에 따라 제조한 강황추출물 나노에멀전의 사진을 나타낸 것으로 육안으로 관찰 시 오일과 유화제의 비율이 1 : 0.5인 경우에는 노랑색을 띄고 있지만 유화제의 비율이 점차 증가할수록 나노에멀전의 색이 짙은 갈색으로 변화하는 것을 알 수 있었다. 이는 앞의 유화제를 첨가할수록 커큐민이 많이 추출된다는 결과에서와 같이 나노에멀전 제조 시에도 고농도의 커큐민이 용해되기 때문일 것으로 사료된다.
- 유화제의 비율이 증가함에 따라 입자크기, PDI 및 제타전위는 그림 3-2-35에 나타내었다. 강황추출물 나노에멀전의 입자크기는 오일: 유화제의 비율이 1: 0.5에서는 약 250 nm였고, 제타전위는 약 -30 mV를 나타내었다.
- 오일: 유화제의 비율이 1:1인 조건에서는 강황추출물 나노에멀전의 입자크기는 156.4 nm로 가장 작은 입자를 나타냈고, 제타전위는 -32 mV로 다소 증가하는 경향을 보였다. 하지만 유화제의 비율이 증가함에 따라서는 나노에멀전의 입자크기가 400 nm까지 유의적인 증가를 보였고, 제타전위는 약 -40 mV까지 증가하였다(그림 3-2-35).

- 강황추출물 나노에멀전의 입자크기가 가장 적고, 제타전위도 안정한 상태를 보이는 조건인 오일: 유화제의 비율이 1: 1인 조건을 선택하여 오일과 유화제의 비율을 고정한 후 다음 실험을 진행하였다.

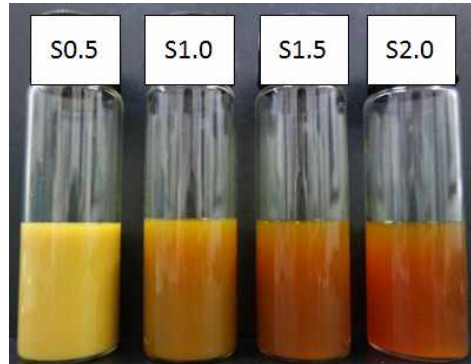


그림 3-2-34. 유화제의 비율에 따른 강황추출물 나노에멀전 시료 사진.

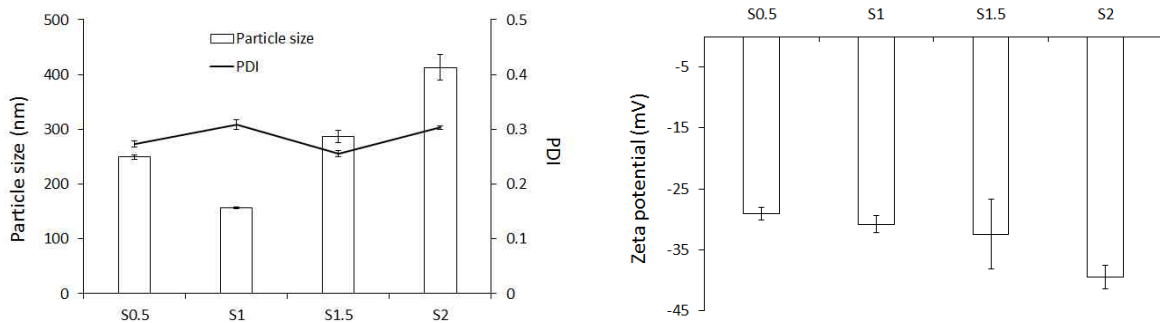


그림 3-2-35. 유화제의 비율에 따른 강황추출물 나노에멀전의 입자크기, PDI 및 제타전위.

- 오일: 유화제의 비율을 1: 1로 고정시킨 후 유화제로는 레시틴과 tween 80을 혼합하여 사용하였고, 물의 함량을 낮추기 위해 85%에서 60%까지 낮추어 가며 나노에멀전을 제조하였다(표 3-2-9).
- 물의 비율 변화에 따른 강황추출물 나노에멀전의 입자크기는 그림 3-2-36에서 보는 것과 같이 유의적인 차이를 보이며, 물의 함량이 줄어들수록 입자의 크기는 증가하는 경향을 보였다. 물의 비율이 85%인 경우(Sample W1) 입자크기는 약 89.6 nm를 나타내며, 제타전위는 -33.59 mV로 가장 안정한 값을 보였다. 하지만 물의 비율이 60%인 Sample W5의 경우에는 입자의 크기가 1049.8 nm로 마이크로 크기의 입자크기를 보였고, 제타전위도 크게 감소하면서 약 -23 mV를 나타내었다.

표 3-2-9. 오일 : 유화제의 비율에 따른 강황추출물 나노에멀전 제조 비율

Sample	오일	레시틴	Tween 80	물 (%)
W1	7.5	4.13	3.38	85
W2	10.0	5.55	4.50	80
W3	12.5	6.88	5.63	75
W4	15.0	8.25	6.75	70
W5	20.0	11.00	9.00	60

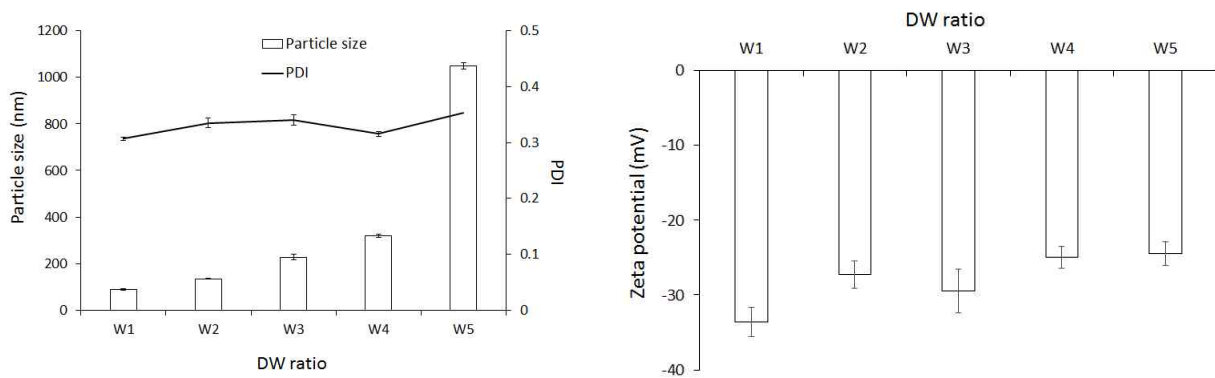


그림 3-2-36. 물의 함량 변화에 따른 강황추출물 나노에멀전의 입자크기, PDI 및 제타전위.

- HLB (hydrophilic-lipophilic balance)란 친수성과 소수성의 비율을 나타내는 것으로 전체의 중량에서 친수성이 차지하는 중량에 20을 곱하여 계산된다(eq. 1).

$$HLB = \frac{M_h \times 20}{M} \quad (\text{eq. 1})$$

- 강황추출물 나노에멀전의 안정성을 향상시키기 위해 non-ionic 유화제인 tween 80 (HLB 4.0) 이외에 anionic 유화제인 레시틴(HLB 15.0)을 혼합하였다. 유화제의 비율에 따라 HLB 값이 달라지며, 이렇게 HLB 값에 따른 나노에멀전의 특성을 조사하였다.
- 일반적으로 O/W emulsion의 HLB value 범위는 약 8~18으로 알려져 있어 중간 값인 10~14 범위 내에서 에멀전을 제조하였고, 식품회사에서는 상용화된 제품으로 개발하기 위해서는 실제 식품회사에서 더 많이 사용되고 있는 레시틴의 함량을 높이려고 하였으나 일정량 이상에서는 심각한 층 분리와 함께 불안정한 에멀전이 형성되어 최적의 함량을 구하였다.
- 표 3-2-10은 HLB value에 따른 강황추출물 나노에멀전을 제조 조건으로 이전의 실험 결과를 바탕으로 오일과 유화제를 1: 1의 비율로 고정하고, 레시틴과 tween 80의 조성을 변경하여 HLB 값이 10.2, 10.6, 11.0, 11.8, 12.6, 및 13.8로 맞추었다. 물의 함량은 실험의 경향성을 보기 위해서 85%(W1)와 80%(W2) 두 가지 조성을 각각 살펴보았다.

표 3-2-10. HLB 값에 따른 강황추출물 나노에멀전 제조 조성 비율

HLB	Sample NO	오일 (%)	레시틴 (%)	Tween 80 (%)	물 (%)
H10.2	W1	7.5	4.50	3.00	85
H10.6			4.13	3.38	
H11.0			3.75	3.75	
H11.8			3.00	4.50	
H12.6			2.25	5.25	
H13.8			1.13	6.38	
H10.2	W2	10.0	4.50	3.00	80
H10.6			4.13	3.38	
H11.0			3.75	3.75	
H11.8			3.00	4.50	
H12.6			2.25	5.25	
H13.8			1.13	6.38	

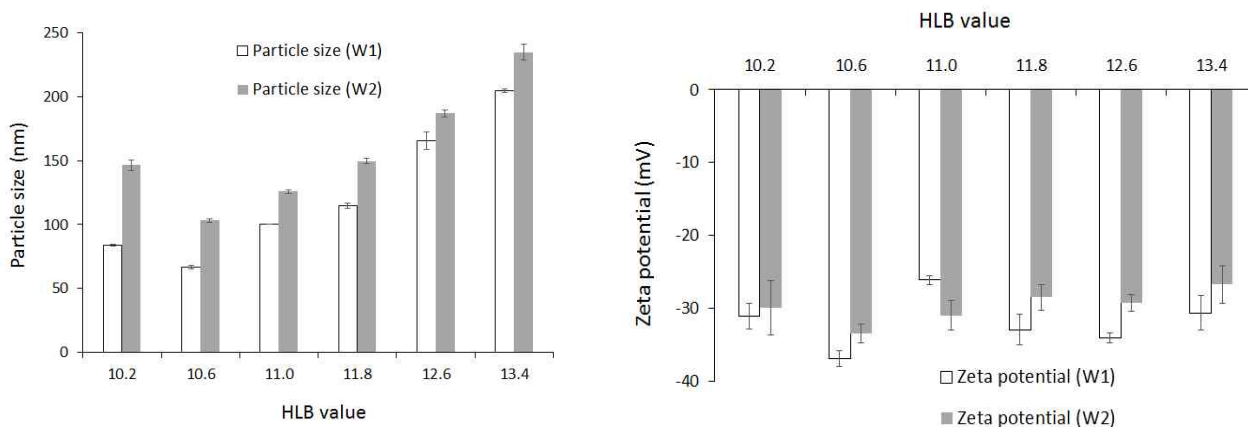


그림 3-2-37. HLB 값에 따른 강황추출물 나노에멀전의 입자크기, PDI 및 제타전위.

- 나노에멀전 제조에서 안정한 에멀전을 제조하기 위해서는 하나의 유화제를 사용하기 보다는 두 가지 이상의 서로 다른 특성의 유화제를 혼합함으로써 효율성과 안정성을 증가시키는 연구들이 많이 진행되고 있었다.
- 그림 3-2-37에서 보는 것과 같이 HLB 값에 따른 강황추출물 나노에멀전의 입자크기는 약 66.6 nm~234.6 nm 사이를 나타내며, W1과 W2 조건 모두에서 HLB 값에 따른 입자크기의 변화는 똑같은 경향성을 보이고 있다. 즉, HLB 값이 10.6에서 가장 작은 입자크기가 만들어졌고, HLB 값이 증가함에 따라 입자크기도 점점 증가하는 경향을 보였다.
- 제타전위의 경우, HLB 값에 따른 경향성은 확인할 수 없었지만 HLB 값이 10.6인 조건에서 약 -36 mV로 매우 안정한 강황추출물 나노에멀전을 형성함을 알 수 있었다.

(3) Lab-scale 강황추출물 나노에멀전 최적공정 확립

- Lab-scale에서 강황추출물 나노에멀전을 제조하기 위한 최적공정은 다음과 같다. 우선 커큐민의 용해도가 가장 높았던 MCT 오일 7.5g에 강황추출물을 오일과 같은 양으로 혼합하고, 친유성 유화제인 레시틴을 4.13g 넣고, 잘 혼합하여 오일상(oil phase)을 제조한다. 물 85 mL에 친수성 유화제인 tween 80을 3.38g 넣고, 혼합하여 수상(aqueous phase)을 제조한 후 오일상과 수상을 서로 혼합한다.
- 오일상과 수상의 혼합용액을 magnetic stirring으로 30분간 처리하여 1차적으로 혼합시키고, 다음으로 high speed homogenization (HSH)를 5,000 rpm에서 10분간 처리하며, 이어서 probe type의 ultrasonication을 40%의 진폭(amplitude)으로 15분간 균질화 한다.
- Lab-scale의 강황추출물 나노에멀전 제조 단계별 공정은 그림 3-2-38과 그림 3-2-39에 사진으로 나타내었다.

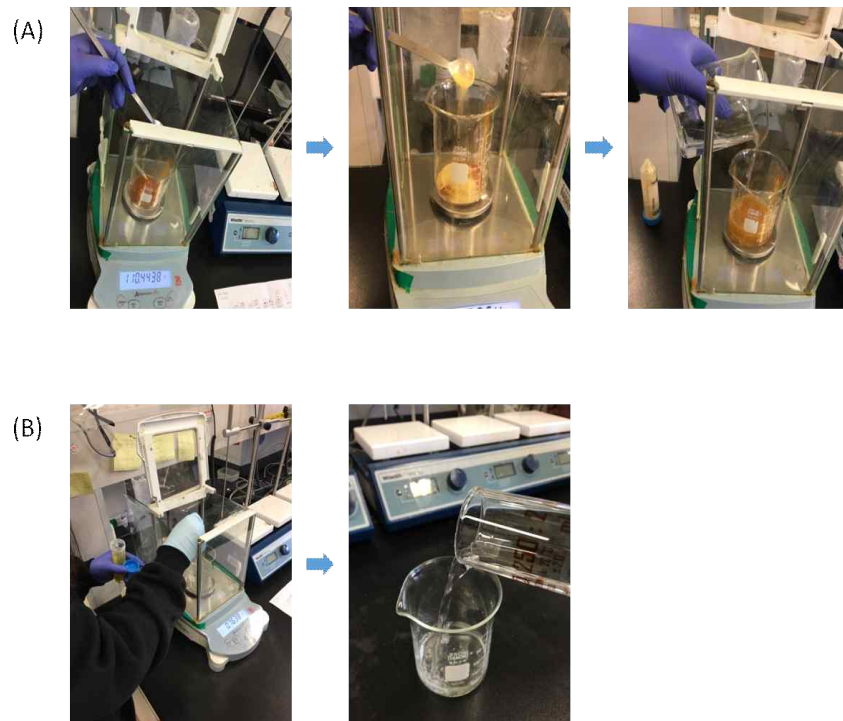


그림 3-2-38. (A)오일상(oil phase)과 (B)수상(aqueous phase)의 제조 공정.

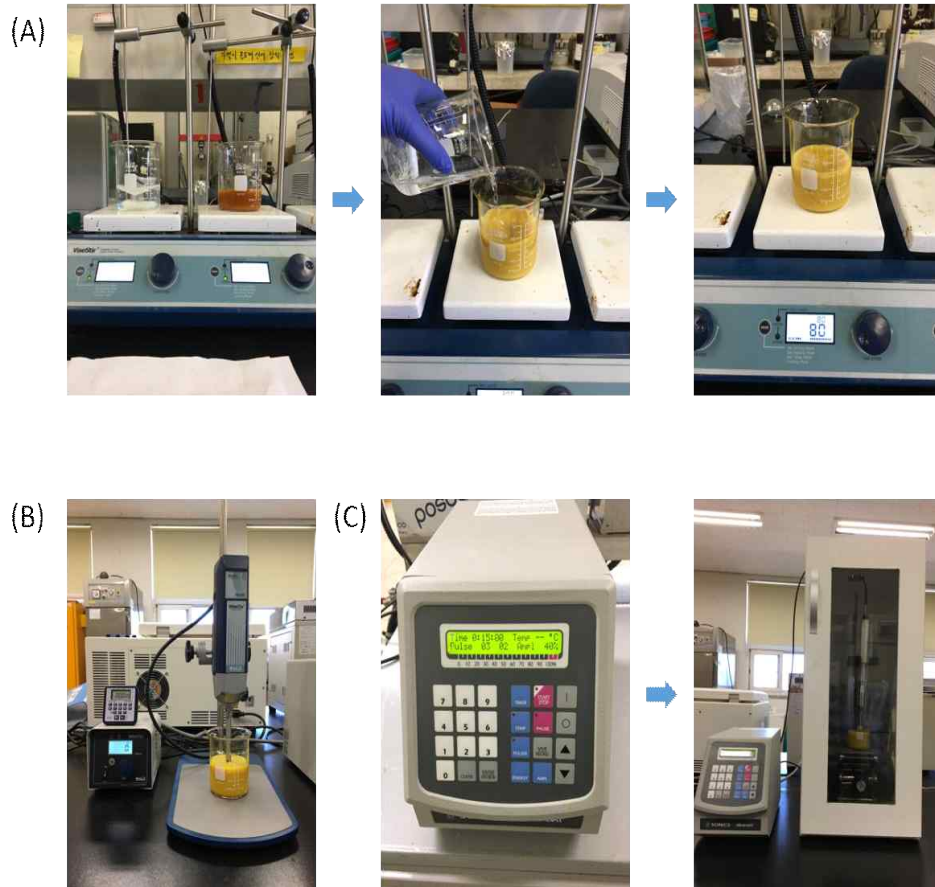


그림 3-2-39. Lab-scale 나노에멀전 제조를 위한 (A)magnetic stirring, (B)HSH, 및 (C) US 처리.

(4) 강황추출물 나노에멀전의 특성 및 커큐민 함량 분석

- 강황추출물 나노에멀전의 형태적인 특성을 분석하기 위해 샘플 1 μL 를 carbon coating mesh grid에 loading 하고, 약 2분간 고정한 후 남은 수분을 왓트만페이퍼를 이용하여 흡수하고, 샘플 로딩과 수분흡수 공정을 3회 반복한다. 다음은 2% phosphotungstic acid로 염색하여 상온에서 12시간 건조시켜서 TEM grid에 샘플 코팅을 완료한 후 TEM 분석장비를 이용하여 강황추출물 나노에멀전의 입자 크기와 형태를 분석하였다.
- 그림 3-2-40에서 보듯이 강황추출물 나노에멀전의 one droplet의 TEM image 구형 또는 타원형으로 되어 있고, 입자의 크기는 나노입도분석기로 측정한 입자크기의 결과 값과 비슷한 범위의 크기인 100 nm 정도의 크기를 보여주고 있다.

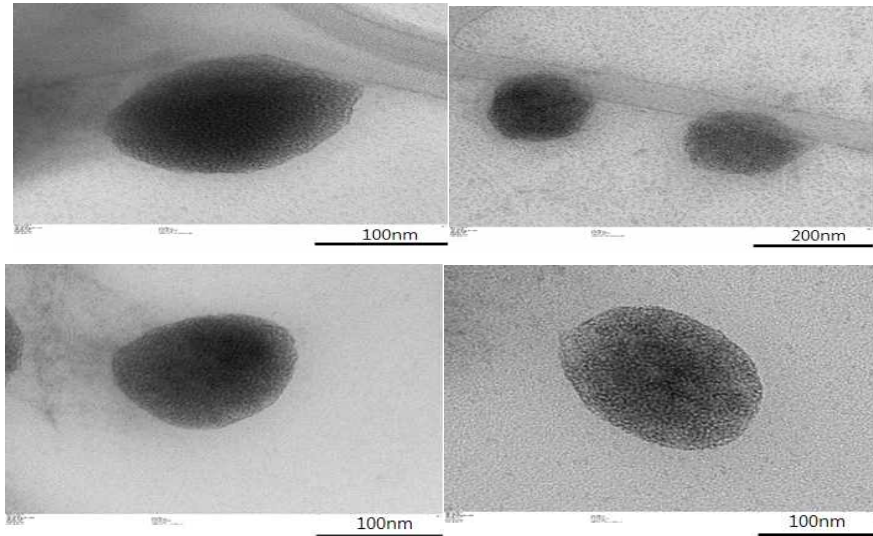


그림 3-2-40. 강황추출물 나노에멀전의 TEM images.

- 강황추출물 나노에멀전 제조 시 강황추출물의 함량을 100~500% (w/w 오일)로 하여 제조한 나노에멀전에 함유된 커큐민의 함량을 분석하기 위해 순도 99%의 커큐민 표준용액을 US spectrophotometer를 이용하여 425 nm에서 농도별로 측정하여 표준곡선을 작성하고, 표준식에 시료의 흡광도를 측정하여 커큐민의 함량을 계산하였다.
- 측정방법은 시료 1 mL을 9 mL의 methanol에 희석한 후 흡광도를 측정하였다. 강황추출물의 함량이 증가함에 따라 커큐민의 함량도 증가하는데, 100% 강황추출물을 첨가한 시료에서는 32.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 커큐민이 분석되었고, 500%의 강황추출물을 첨가한 시료에서는 765.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 커큐민이 함유되어 있었다. 이는 강황추출물의 함량이 증가함에 따라 커큐민의 함량도 증가하는 경향을 보였으나 정확하게 비례하지는 않았다.

표 3-2-11. 강황추출물 함량에 따른 나노에멀전에 함유된 커큐민의 함량

강황추출물 함량 (%, w/w 오일)	커큐민 함량 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
100	32.55
200	144.55
300	347.64
400	560.85
500	765.25

나. 강황추출물 나노에멀전의 대량 생산을 위한 scale-up 공정 확립

(1) Pilot-scale에서의 제조공정 확립

- 기업에서 강황추출물 나노에멀전을 상용화하기 위해서는 대량생산 시설이 필요한데, lab-scale에서 제조한 50 mL 수준에서 1단계 pilot-scale에서는 1.5 L를 생산하고, 2단계 plant-scale에서는 10 L 이상을 생산할 수 있는 장비를 구축하였다.

- Scale-up을 위해서는 ultrasonication의 capacity가 10 L 이상을 처리할 수 있어야 하며, 현재 ultrasonication probe는 종류에 따라 20 L까지도 처리가 가능하다.
- 그림 3-2-41은 lab-scale에서 pilot-scale로 scale-up을 위해 사용한 HSH와 US 장비들이다. HSH는 최대 2.5 L까지 처리가 가능한 Dispersing Tool “HT1025” probe를 사용하였고, US 처리는 최대 20 L까지 처리가 가능한 probe를 사용하였다.

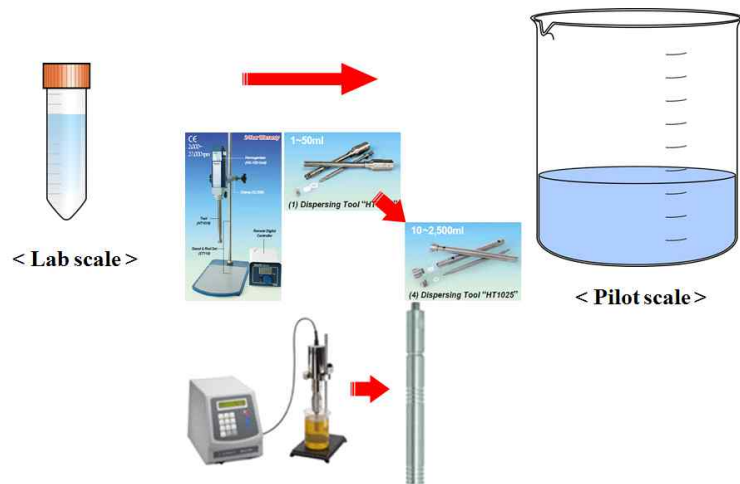


그림 3-2-41. Pilot-scale (1.5 L) 생산을 위한 HSH와 US 장비들.

- Pilot-scale에서의 강황추출물 나노에멀전을 제조하기 위한 조성은 lab-scale에서 최적의 조건과 같은 비율로 설정하였고(표 3-2-12), magnetic stirring은 300 rpm에서 2시간, HSH 처리는 5,000 rpm에서 20분간 처리하였고, US 처리시간을 30분 단위로 하여 총 6시간(360분)까지 처리하였다.

표 3-2-12. Pilot-scale (1.5 L) 생산을 위한 성분 비율

MCT oil (g)	레시틴 (g)	Tween 80 (g)	DW (mL)	강황추출물 (g)
112.5	61.875	50.625	1,275	22.5

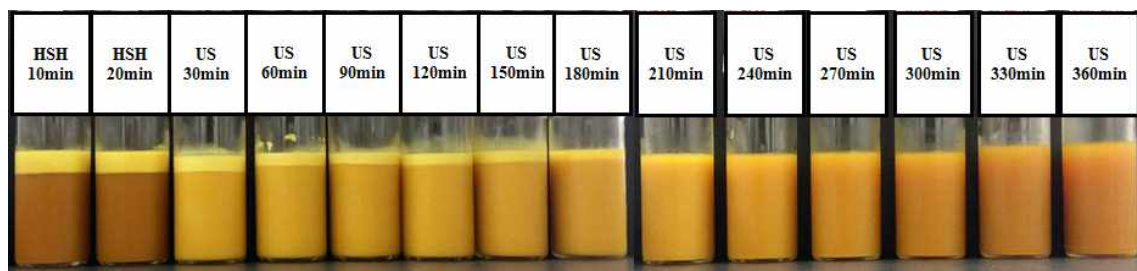


그림 3-2-42. US 처리 시간에 따른 pilot-scale의 강황추출물 나노에멀전.

- 그림 3-2-42는 HSH 처리 후 US 처리시간에 따른 pilot-scale의 강황추출물 나노에멀전을 나타낸 사진이다. 그림에서 보듯이 HSH를 10분과 20분 처리한 경우 상층부에 심각한 층 분리가 발생한 것을 볼 수 있으며, 추가적으로 US 처리 시간이 증가함에 따라 분리된 층의 정도가 감소하는 경향을 보였다.

- 하지만, US 처리 시간이 210분(3시간30분)까지는 아직까지 육안으로도 관찰되는 층 분리가 있었고, US 처리 240분(4시간) 이상부터는 이러한 층 분리가 관찰되지 않아 최소 4시간 이상의 US 처리 시간이 필요하다고 판단된다.
- US 처리시간을 30분에서 최대 360분(6시간)으로 증가하면서 US 처리 시간에 따른 입자 크기의 변화를 그림 3-2-43에 나타내었다. Pilot-scale로 제조된 강황추출물 나노에멀전의 입자크기는 US 처리시간이 30분인 경우 평균 입자의 크기가 약 623.3 nm로 lab-scale에서 제조하였을 때와 비교하여 매우 큰 입자가 형성되었음을 알 수 있었다.
- 특히, 층분리가 관찰되었던 최대 210분 처리에서도 입자의 크기는 약 334.1 nm 였으며, 240분 이상 처리하였을 경우에 300 nm이하의 입자가 제조되는 것을 알 수 있었다.
- US 6시간(360분) 처리한 시료는 178.8 nm로 200 nm 이하의 입자를 제조할 수 있었으며, 산업체에서 생산을 위한 조건에서도 6시간 이상의 US 처리는 이용하는데 어려움이 있어 최대 6시간까지 처리하였다.

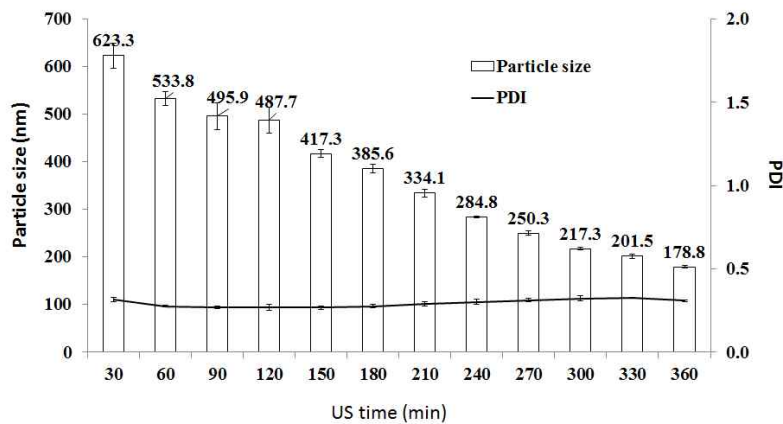


그림 3-2-43. US 처리시간에 따른 pilot-scale 강황추출물 나노에멀전의 입자크기 및 PDI.

(2) Plant-scale의 대용량 나노에멀전 제조를 위한 반응기 제작

- Plant-scale (10L 이상)의 대용량 나노에멀전을 제조하기 위한 반응기는 나노에멀전을 제조하기 위해 필요한 조건(heating, cooling, 시간 등)들을 적용하여 직접 도안, 설계하여 자체적으로 제작하였다(그림 3-2-44).
- 강황추출물 나노에멀전을 제조하는 공정에서는 오일상과 수상을 혼합해 줄 수 있는 mixing 장치와 강황추출물을 oil phase에 녹일 때 약 75도 온도에서 수행하기 때문에 heating system, ultrasonication 처리 장치, 그리고 US 처리 시 발생하는 열을 낮추기 위한 cooling system이 필요하였다.
- 그림 3-2-44B의 도면에서 ①은 혼합조로 오일상과 수상을 함께 섞고 혼합(mixing)할 수 있도록 해주는 1차 혼합기이며, ②은 US 처리를 위한 2차 반응기로 US 처리 시 발생하는 온도상승을 억제하기 위한 cooling system이 장착되어 있다. 또한 ③은 칠러 유닛, ④는 전기조작 판넬, ⑤는 이송펌프로 혼합조에서 반응조로 이송해주는 역할을 하고, 마지막으로 ⑥은 이송형 좌대를 나타낸다.

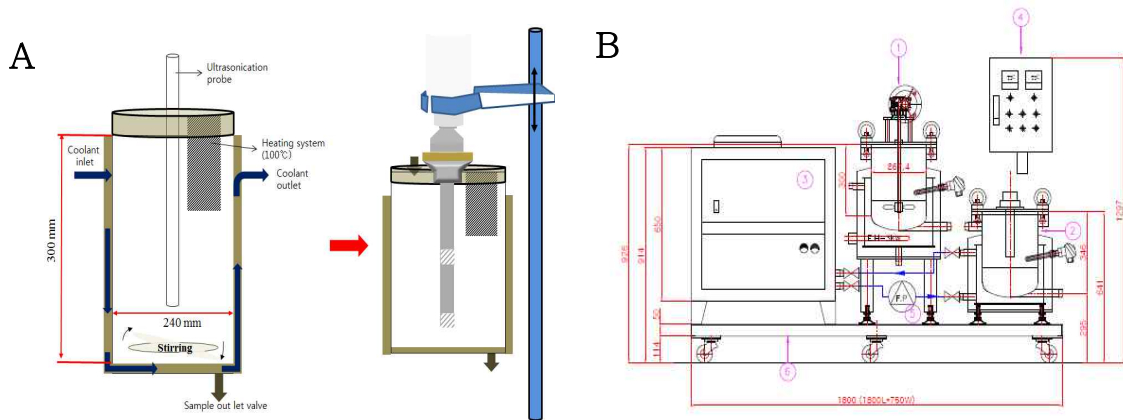


그림 3-2-44. Plant-scale의 대용량 반응기 초기도안(A) 및 도면(B).

- 표 3-2-13은 10 L 규모의 대용량 나노에멀전을 생산하기 위한 제조조건이며, 각 구성성분의 비율은 lab-scale에서 선정된 최적의 조건을 따랐다.
- 그림 3-2-45는 plant-scale의 생산을 위해 오일상과 수상의 제조 공정을 보여주고 있으며, 그림 3-2-46은 대용량 반응기를 이용하여 혼합과 균질화 하는 공정을 보여주고 있다.

표 3-2-13. Plant-scale (10 L) 생산을 위한 성분 비율

MCT oil (g)	레시틴 (g)	Tween 80 (g)	DW (mL)	강황추출물 (g)
750	412.5	337.5	8,500	150

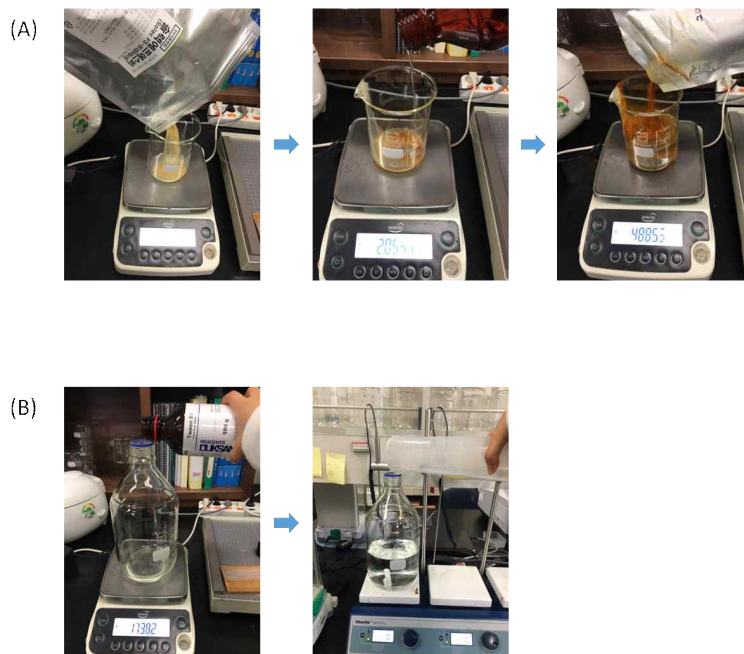


그림 3-2-45. Plant-scale로 제조하기 위해 오일상(A)과 수상(B)의 제조과정.

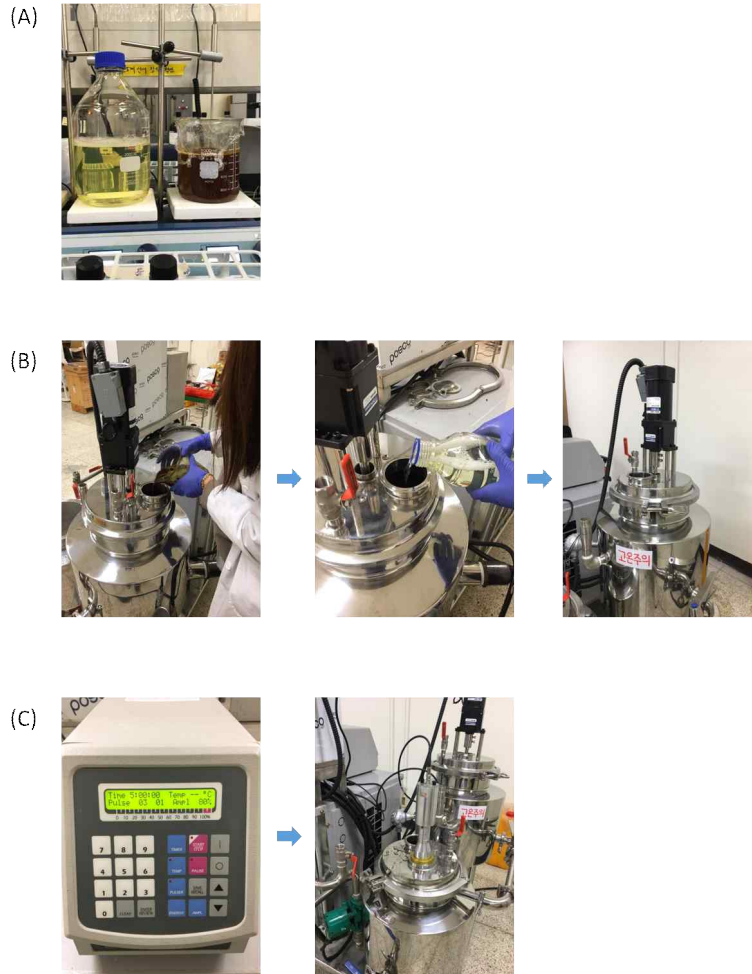


그림 3-2-46. Plant-scale의 강황추출물 나노에멀전 제조를 위한 (A) 혼합 및 (B, C) 균질화 공정.

○ 그림 3-2-47은 철저한 검토와 신중한 설계에 따라 제작된 plant-scale (최대 20 L)의 대용량 반응기이다. 대용량 반응기는 1차 혼합기와 2차 반응기가 연결되어 있고, heating과 cooling system을 조절할 수 있어 대량생산이 가능한 반응기이며, 실제 대용량의 강황추출물 나노에멀전을 제조하는 공정을 보여주고 있다.



그림 3-2-47. Plant-scale의 대용량 반응기 및 강황추출물 나노에멀전 제조 공정.

(3) Plant-scale의 대용량 나노에멀전 제조 공정 확립

- 표 3-2-13에 나타난 성분비율로 오일상과 수상을 제조하여 1차 혼합기에 제조된 오일상과 수상을 넣고, 75도의 온도에서 섞어주면서 균일하게 혼합해 준다. 균일하게 혼합된 혼합용액을 2차 반응기로 옮겨 US 처리 시간에 따른 강황추출분말 나노에멀전을 제조하며, 시간에 따른 입자의 크기와 제타전위를 측정하였다.
- 그림 3-2-48은 plant-scale의 대용량 반응기를 이용하여 강황추출물 나노에멀전을 생산하면서 1차 혼합기에서 혼합된 에멀전과 US 처리 3시간, 4시간, 5시간 동안 균질화 한 시료의 사진을 나타내었다. 그림에서 보듯이 1차 혼합기로만 혼합된 에멀전의 경우 상층부에 층분리가 뚜렷하게 관찰되었고, US 처리시간이 증가함에 따라 층분리가 없는 안정한 강황추출물 나노에멀전으로 만들어짐을 관찰할 수 있었다.

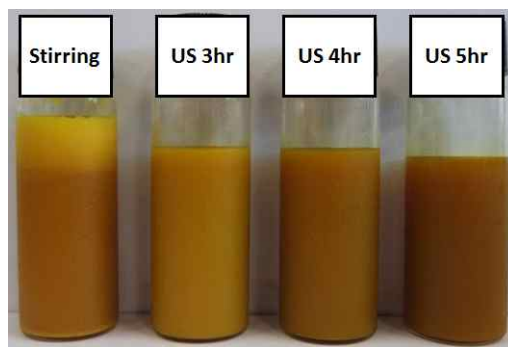


그림 3-2-48. Plant-scale의 대용량 반응기를 이용한 강황추출물 나노에멀전.

- 그림 3-2-49는 plant-scale의 대용량 반응기로 제조하면서 US 처리시간에 따른 강황추출물 나노에멀전의 입자크기, PDI 및 제타전위를 나타낸 것으로 1차 혼합기에서 제조된 시료의 경우 입자크기가 약 738.8 nm이며 앞의 사진에서 보듯이 층분리가 있으며, 제타전위는 측정이 안 되었다. 하지만 US 처리시간이 3시간부터는 입자의 크기가 크게 감소하면서 약 230 nm가 되었고, 4시간, 5시간으로 US 처리시간이 증가함에 따라 입자크기는 더욱 감소하여 137.6 nm의 입자를 얻을 수 있었다.
- 제타전위의 경우에는 약 -33 mV를 나타내었으며, US 처리시간이 3시간 이후에는 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.
- 대용량의 경우 총 10 L의 원료를 US 5시간으로 처리하여 얻은 강황추출물 나노에멀전의 수율은 9.8 L로 98%의 수율을 나타내었다.

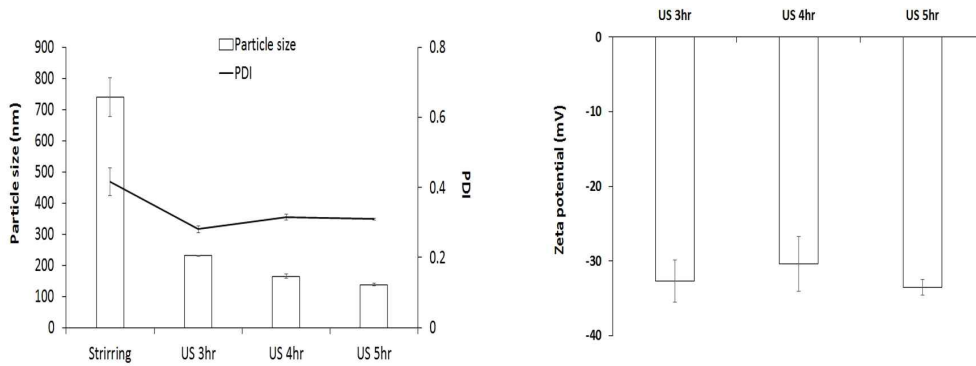


그림 3-2-49. Plant-scale의 대용량 반응기에서 US 처리시간에 따른 강황추출물 나노에멀전의 입자크기, PDI, 및 제타전위.

(4) 제조용량에 따른 강황추출물 나노에멀전 최적 조건 비교

○ 그림 3-2-50은 강황추출물 나노에멀전의 lab-scale에서 pilot-scale과 plant-scale로의 scale-up에 따른 최적의 제조 공정을 비교한 것이다.

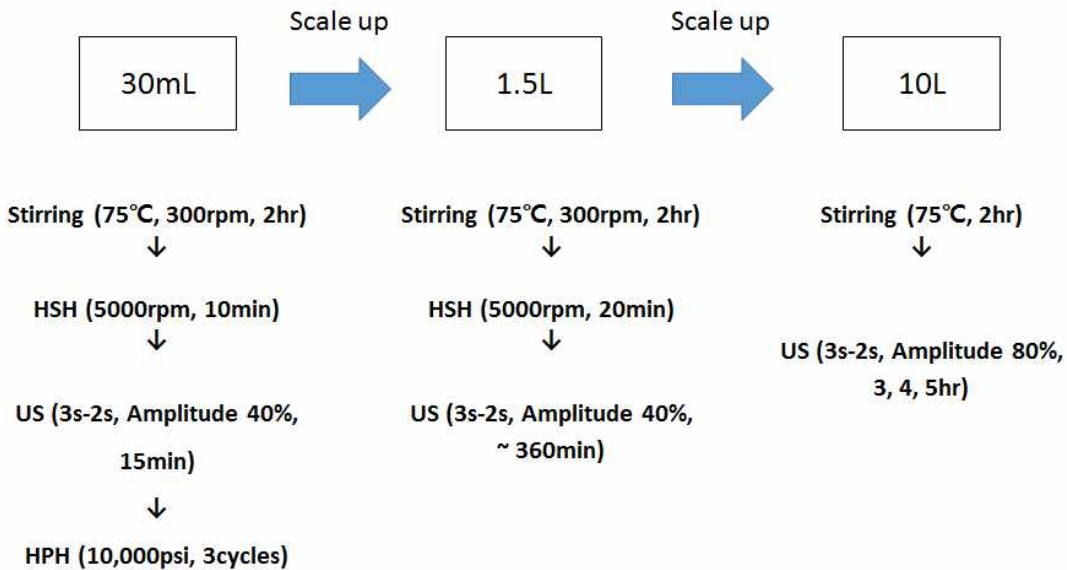


그림 3-2-50. 제조용량에 따른 강황추출물 나노에멀전 제조 조건.

○ Plant-scale (10 L)의 대용량 반응기를 이용하여 제조한 강황추출물 나노에멀전의 입자 크기가 pilot-scale (1.5L)로 제조한 나노에멀전에 비해 같은 시간의 US 처리별로 비교할 때 전체적으로 작은 경향을 나타내고 있는데, 이는 반응기를 통해 장치의 효율이 증가하였기 때문으로 보인다(그림 3-2-51).

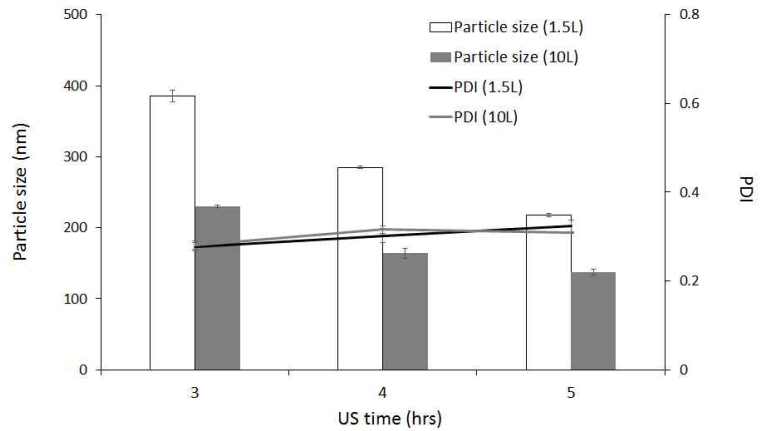


그림 3-2-51. 제조용량별 US 시간에 따른 입자크기 및 PDI

- 그림 3-2-52는 각 용량별 최적의 제조조건으로 제조 하였을 때의 강황추출물 나노에멀전의 입자크기 및 제타전위를 비교한 것으로 lab-scale (30 mL)에서는 US 처리시간도 짧고, 제조된 입자의 크기도 감소되는 경향을 보였으나 scale-up에 따른 제조 용량이 증가함에 따라 제조 시간도 크게 증가하였고, 제조된 나노에멀전 입자의 크기도 증가 하는 경향을 보였다.
- 하지만, pilot-scale (1.5 L)과 plant-scale (10 L)에서는 제작된 대용량 반응기를 이용한 강황추출물 나노에멀전은 입자 크기가 137.6 nm이며, 제타전위는 -33.52 mV로 균일하고 안정적인 나노에멀전을 제조할 수 있었다.

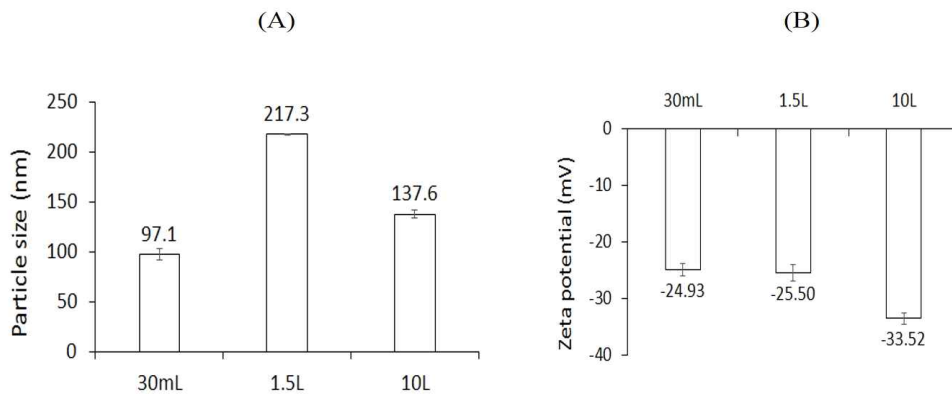


그림 3-2-52. 용량별 최적조건에서의 입자크기(A) 및 제타전위(B).

3. 향기성분 masking을 위한 고분자 코팅 기술 개발

가. 키토산을 이용한 강황추출물 나노에멀전 코팅

- 강황추출물 나노에멀전의 대량생산을 위한 최적의 제조 조건은 오일: 유화제: 물의 비율이 7.5: 7.5: 85이고, 레시틴과 tween 80의 비율은 HLB 값이 10.6이 되는 비율로 하였다.
- 최적의 제조공정에서 제조된 강황추출물 나노에멀전을 키토산으로 코팅하기 위해 저분자(low molecular weight, MW: 50~190 KDa, Sigma Aldrich) 키토산을 1% 초산이 첨가된 물에 0.1~0.5% (w/v)의 농도로 제조하여 사용하였다.
- 강황추출물 나노에멀전을 키토산으로 코팅하기 위해 제조된 농도별 저분자 키토산 용액을 peristaltic pump를 이용하여 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 flow rate으로 강황추출물 나노에멀전 용액에 drop-wise 방법으로 첨가하였다.
- 그림 3-2-53은 0.1~0.5% (w/v) 사이의 키토산 용액으로 코팅된 강황추출물 나노에멀전 시료의 사진으로 육안으로 관찰하였을 모든 농도 조건에서 어떠한 층 분리 없이 균일한 상태를 보여주고 있다.

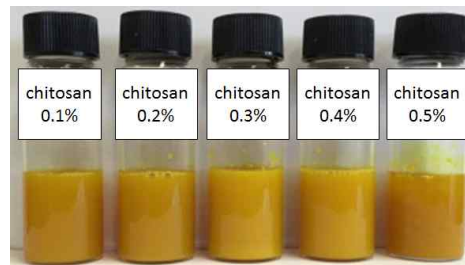


그림 3-2-53. 저분자 키토산 농도별로 코팅된 강황추출물 나노에멀전.

- 저분자 키토산으로 캡슐화한 강황추출물 나노에멀전 입자의 크기는 대조군(약 87 nm)에 비해 증가하는 경향을 보였고, 저분자 키토산의 농도가 증가함에 따라 입자의 크기는 더 크게 증가하였다.
- 그림 3-2-54A에서 보는 것과 같이 저분자 키토산의 농도가 0.1%인 경우 입자의 크기는 89.8 nm이며, 0.3%의 키토산으로 캡슐화한 시료까지는 200 nm 이하의 작은 입자가 형성됨을 알 수 있었다. 하지만 저분자 키토산의 농도가 0.4%와 0.5%를 사용한 시료는 각각 357.4 nm와 946.2 nm의 입자크기를 보이면서 유의적인 증가를 보였다. PDI 값은 저분자 키토산의 농도가 0.4% 이하까지는 0.3이하의 값을 보이며, 균일한 입자가 형성되었다고 보이는데, 0.5% 저분자 키토산 용액으로 캡슐화 한 경우에 0.55의 PDI 값을 보여 불균일한 상태를 보였다.
- 제타전위는 대조군이 -28.7 mV에서 저분자 키토산의 농도가 증가함에 따라 감소하다가 0.5%로 캡슐화한 조건에서 +8.4 mV를 나타내었다. 이는 저분자 키토산이 가지고 있는 (+)전하인 아민기의 영향으로 키토산의 함량이 증가함에 따라 강황추출물 나노에멀전의 표면의 (+)전하 값이 증가할 것으로 예상된다(그림 3-2-54B).

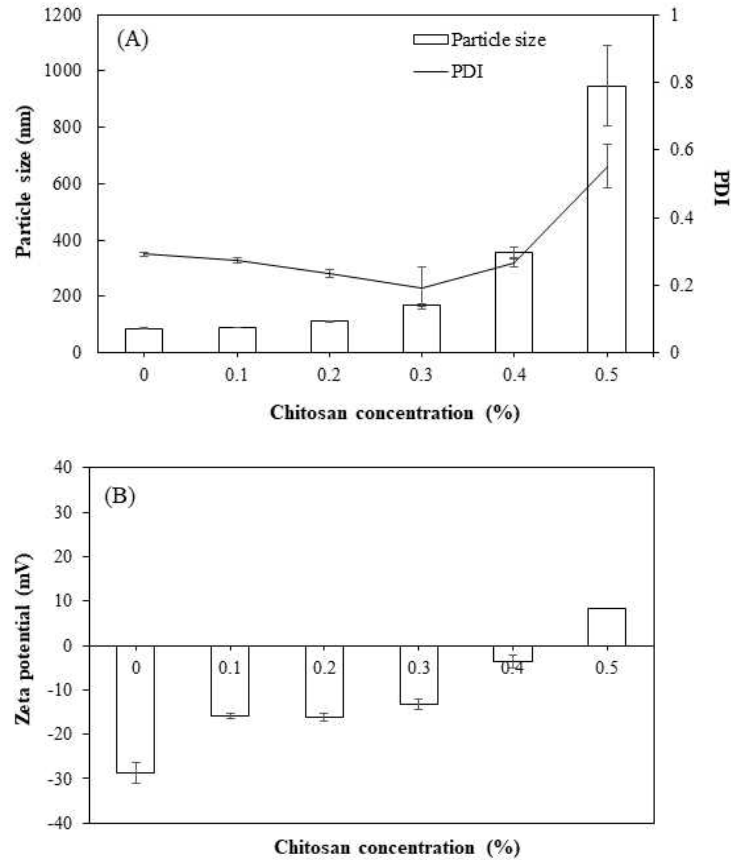


그림 3-2-54. 저분자 키토산 농도에 따른 나노에멀전의 (A)입자크기, PDI 및 (B)제타전위.

- 저분자 키토산으로 캡슐화 한 경우 0.5%의 키토산 용액으로 처리한 경우에 입자의 크기가 900 nm 이상을 보이고 있으며, 시간이 지남에 따라 층 분리가 관찰되어 저장 안정성이 낮다는 결과를 얻었다. 또한 1%의 초산 첨가로 인해 초산의 강한 향이 시료에 남아 있는 문제가 발생하였다. 이를 개선하기 위해 물에 쉽게 녹는 수용성 키토산(분자량?? 양양키토산)을 사용하여 고농도의 용액으로 캡슐화를 하였다.
- 수용성 키토산 용액을 0.5~3% (w/v)의 농도로 제조하였고, 앞의 방법과 같게 농도별로 제조된 수용성 키토산 용액을 동일한 양의 강황추출물 나노에멀전에 peristaltic pump를 이용하여 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 flow rate으로 drop-wise 방식으로 혼합하였다.
- 대조군인 강황추출물 나노에멀전의 입자 크기는 102.5 nm이었고, 수용성 키토산 0.5%에서 3% 농도의 용액으로 캡슐화 하였을 때 수용성 키토산의 농도가 증가함에 따라 입자의 크기가 증가하면서 최대 209.3 nm를 나타내었다. 특히 수용성 키토산의 농도가 2%에서 3%로 증가하는 구간에서 입자 크기의 변화가 가장 두드러졌다. PDI 값은 모든 구간에서 약 0.3 내외를 보이고 있어 입자들이 균일하게 존재하는 것을 알 수 있었다(그림 3-2-55A).
- 제타전위는 대조군의 경우 -31.87 mV를 나타내고 있으며, 수용성 키토산의 농도가 증가함에 따라 감소하다가 1.5% 수용성 키토산으로 캡슐화한 시료에서 부터는 (-) charge였던 제타전위가 (+) charge로 바뀌는 것을 확인할 수 있었다. 또한 2.5% 이상의 농도에서는 +30 mV 이상을 보이면서 안정한 상태를 보였다.

- 수용성 키토산의 캡슐화로 인한 입자표면의 변화는 키토산이 가지고 있는 (+) charge를 가진 아민(amine) 그룹에 의한 영향으로 보인다. 입자의 크기가 200 nm이하 이면서 제타전위가 +30 mV로 안정한 나노에멀전을 보여준 수용성 키토산의 농도가 2.5%인 조건을 최적의 조건으로 선정하여 다음 실험을 진행하였다(그림 3-2-55B).

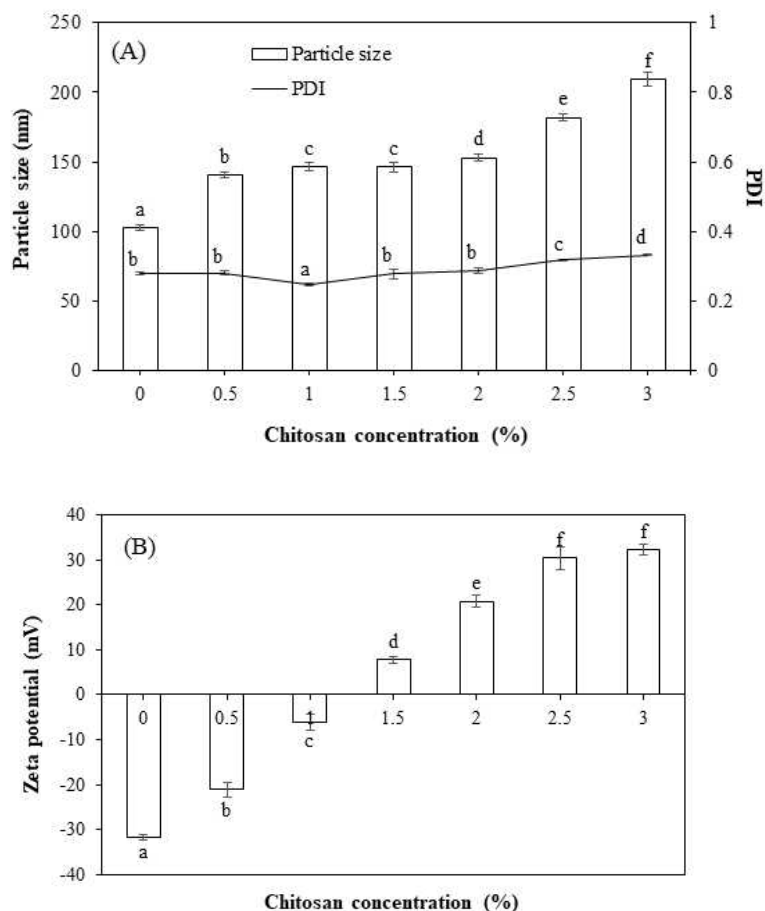


그림 3-2-55. 수용성 키토산 농도에 따른 나노에멀전의 (A)입자크기, PDI 및 (B)제타전위.

- 강황추출물 나노에멀전과 2.5%의 수용성 키토산의 혼합비율을 1: 1에서 1: 10까지 변경하여 코팅 물질의 양을 증가함에 따른 강황추출물 나노에멀전의 입자 크기 PDI 및 제타전위의 변화를 측정하였다.
- 그림 3-2-56는 나노에멀전과 수용성 키토산의 혼합비율에 따라 제조된 시료의 사진으로 육안으로 관찰하였을 때 수용성 키토산의 혼합비율이 증가함에 따라 진한 노란색이었던 시료의 색상이 옅은 색으로 변하였다. 하지만 수용성 키토산의 함량 증가에 따른 침전이나 층 분리 등의 현상은 관찰되지 않아 안정한 상태라고 보인다.



그림 3-2-56. 나노에멀전과 수용성 키토산의 비율에 따라 제조된 시료.

- 강황추출물 나노에멀전과 수용성 키토산의 혼합비율에 따른 입자크기와 제타전위의 변화는 그림 3-2-57에서 나타내었다.
- 그림 3-2-57A에서 보듯이 입자의 크기는 수용성 키토산의 혼합비율이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 특히, 1: 1의 비율에서 182.0 nm인 입자크기가 1: 2의 비율에서 292.8 nm로 유의적인 증가를 보였고, 1: 10의 비율에서는 434.3 nm로 지속적인 증가를 보였다. 하지만 PDI 값은 0.317에서 0.366 사이의 값을 나타내었다.
- 제타전위 또한 수용성 키토산의 혼합비율이 증가함에 따라 크게 증가하는 경향을 보였는데, 1: 1의 비율에서 +30.4 mV였던 제타전위가 1: 2의 비율에서 +41.0 mV로 크게 증가하였고, 1: 3의 비율에서는 +50.3 mV까지 증가하였다. 또한 1: 6의 비율 이상에서는 +56.0 mV를 나타내면서 더 이상의 유의적인 차이는 없었다(그림 3-2-56B).

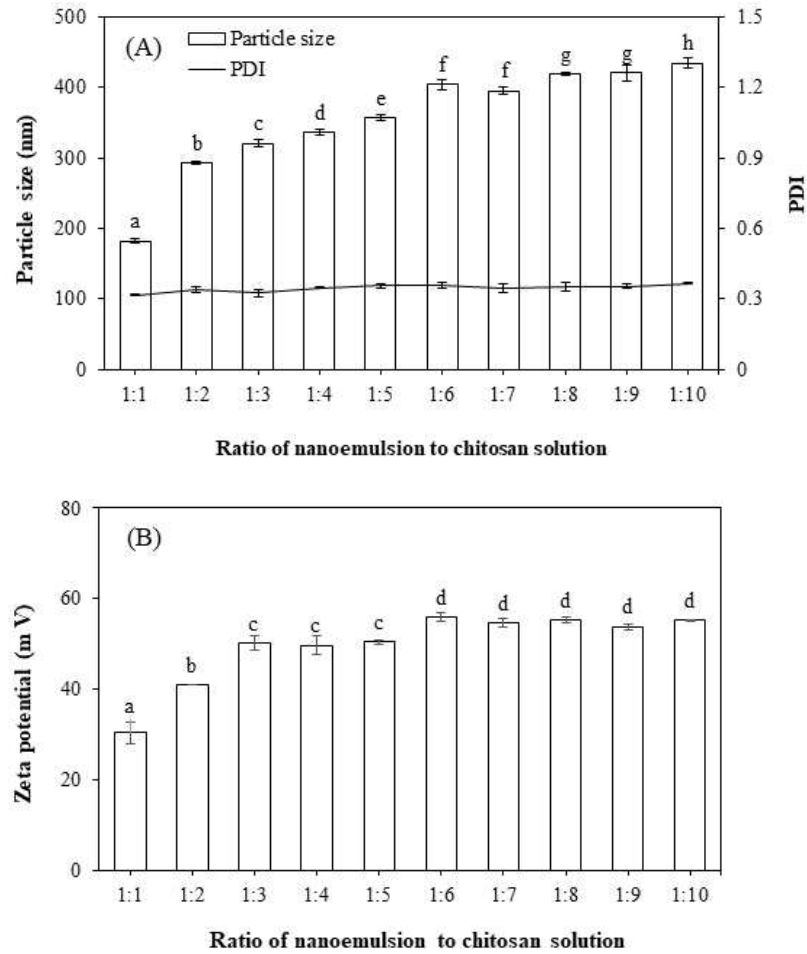


그림 3-2-57. 나노에멀전과 수용성 키토산 비율에 따른 (A)입자크기, PDI 및 (B)제타전위.

- 강황추출물 나노에멀전과 수용성 키토산 용액의 혼합 비율을 1: 1에서 1: 10으로 달리하면서 캡슐효율(encapsulation efficiency)을 구하였다. 그림 3-2-58에서 보는 것과 같이 encapsulation efficiency는 수용성 키토산 용액의 비율이 증가함에 따라 다소 증가하는 경향을 보였는데, 1: 1의 조건에서는 약 74.2%에서 1: 10의 비율에서는 최대 값인 87.6%를 보였다. 하지만 1: 8의 비율 이상에서는 유의적인 차이는 없었다.

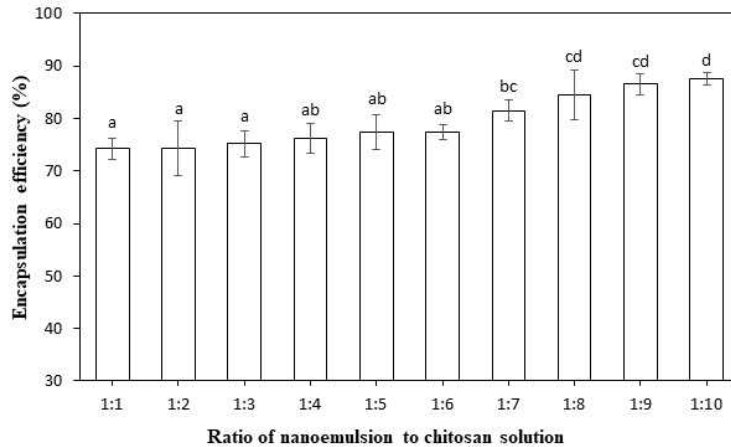


그림 3-2-58. 나노에멀전과 수용성 키토산의 비율에 따른 encapsulation efficiency.

나. 저장 온도와 시간에 따른 수용성 키토산 코팅 나노에멀전의 안정성 평가

- 4°C, 25°C, 및 60°C의 저장 온도에서 수용성 키토산 코팅 강황추출물 나노에멀전의 저장 기간에 따른 안정성을 평가하기 위해 2일 간격으로 입자의 크기, PDI 및 제타전위를 측정하였다.
- 2.5%의 수용성 키토산과 나노에멀전의 비율을 1: 1로 하여 코팅한 강황추출물 나노에멀전을 4°C, 25°C, 및 60°C의 저장 온도에서 저장하였다. 총 14일 동안의 저장 기간 중 입자크기는 저장 기간이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보이는데, 4°C와 25°C에서는 저장 초기의 182 nm에서 14일 후에 약 203 nm로 약 11.6%가 증가하였다. 또한 4°C와 25°C 사이에는 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.
- 하지만, 고온인 60°C에서 저장하였을 경우에는 저장 시간에 따라 입자 크기의 증가가 더욱 크게 작용하였는데, 저장 4일째 205.9 nm로 약 13.1%가 증가하였고, 저장 14일째에는 225.8 nm로 저장 전과 비교하였을 때 약 24%가 증가 하였다. 이는 고온의 조건에서 수용성 키토산으로 코팅한 강황추출물 나노에멀전 입자들의 swelling에 의한 것으로 보여진다.
- PDI의 경우에는 4°C에서는 유의적인 차이가 없었지만, 25°C에서는 초기 0.317에서 14일째에 0.232로 크게 저하되었다. 또한 60°C에서는 0.128까지 줄어드는 경향을 나타내었다.
- 제타전위는 저장 초기 +30.4 mV에서 저장 2일째에 +37.7~39.7 mV로 약 25%가 증가하는 경향을 보였고, 그 이후 4°C에서는 저장 시간에 따라 점차적으로 증가하여 저장 14일째에는 +43.5 mV까지 증가하였다. 이는 초기 제타전위보다 약 43%가 상승한 결과이다.
- 25°C에서도 비슷한 경향이 보였는데, 다만 저장 14일째 제타전위의 값이 41.5 mV로 4°C 보다는 다소 증가폭이 줄어들었다. 하지만 60°C에서는 저장 2일째에 증가한 이후로 저장 14일까지 유의적인 차이는 없었다.

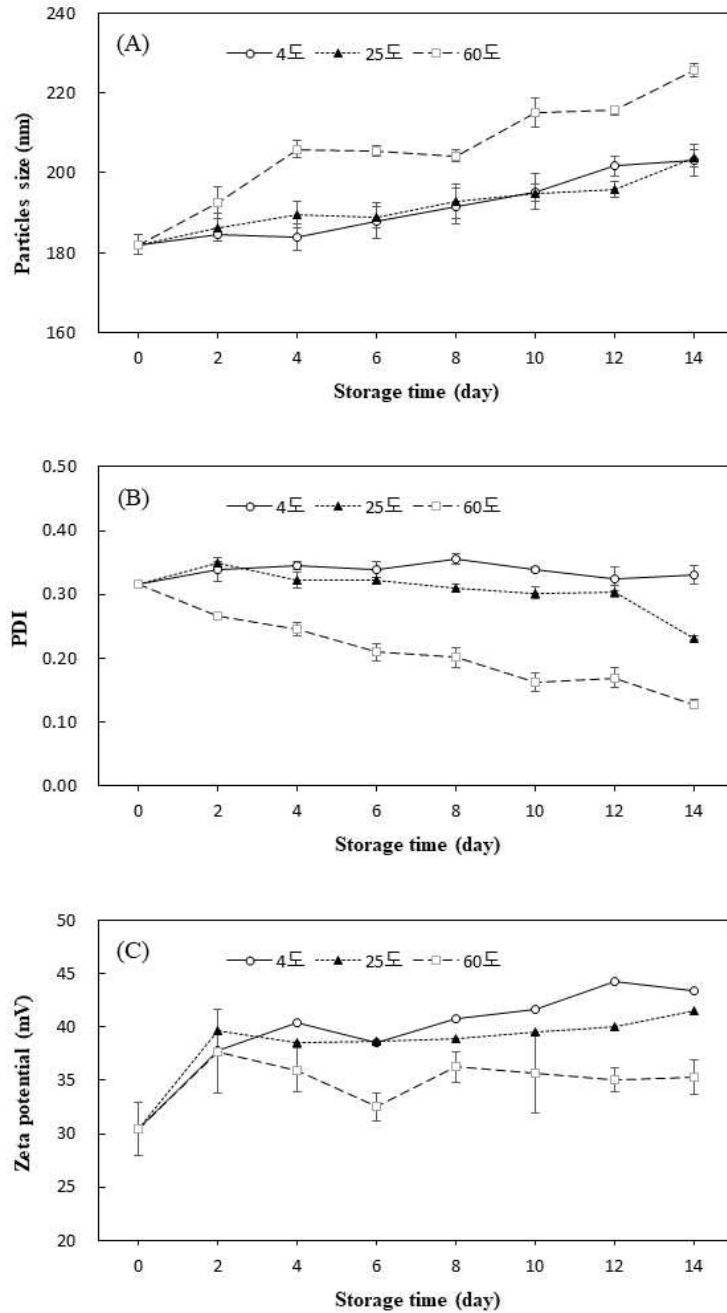


그림 3-2-59. 저장 온도와 시간에 따른 수용성 키토산 코팅 나노에멀전의 (A)입자크기, (B)PDI 및 (C)제타전위.

다. NaCl 농도 및 pH 변화에 따른 수용성 키토산 코팅 나노에멀전의 커큐민 함량

- 강황추출물 나노에멀전이 다양한 가공식품에 응용되기 위해서는 염의 농도와 pH 등의 변화에서 기능성 코어 물질인 커큐민을 지속시키는 기술이 필요하다.
- 2.5%의 수용성 키토산을 강황추출물 나노에멀전과 1: 1의 비율 혼합하여 제조한 키토산 코팅 강황추출물 나노에멀전(CS-TE-NEs)을 다양한 염(NaCl)의 농도에서 유지되는 커큐민의 함량을 측정하여, 초기의 강황추출물(TE)과 강황추출물 나노에멀전(TE-NEs)의 커큐민 함량과 비교하였다.

- NaCl의 농도가 증가함에 따라 원료물질인 강황추출물에 있는 커큐민의 잔류량은 크게 감소하는 경향을 보였다. 대조군(100%)에 비해 100 mM의 NaCl의 경우 88.4%로 약 11.6%의 커큐민이 감소하였고, 200 mM의 NaCl에서는 80.8%으로 감소하였다가 500 mM에서는 69.4%까지 감소하여 강황추출물 원료를 고농도의 염이 들어있는 식품에 혼합하였을 경우에는 커큐민의 손실이 크다는 결과를 얻었다.
- 반면에, 강황추출물 나노에멀전과 수용성 키토산으로 코팅한 나노에멀전의 경우에는 염의 농도가 증가함에 따라 감소하는 폭이 상대적으로 많이 적었다. 강황추출물 나노에멀전의 경우 500 mM의 NaCl에서 87.2%가 잔존하였고, 수용성 키토산으로 코팅한 경우에는 91.1%까지 남아 있는 결과를 보였다. 하지만 나노에멀전에 비해 수용성 키토산 코팅의 효과는 유의적이지 않았다(그림 3-2-60).

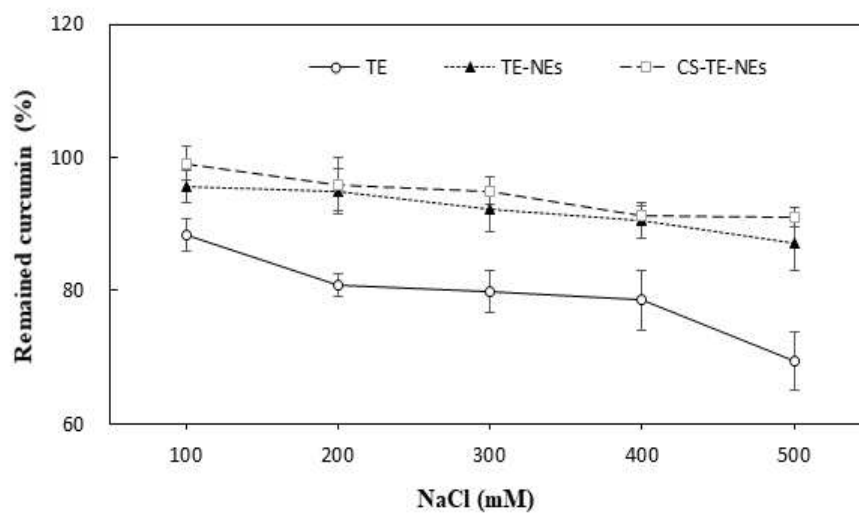


그림 3-2-60. NaCl농도에 따른 TEP, TE-NEs와 CS-TE-NEs의 잔류 커큐민 함량.

- 그림 3-2-61은 pH에 따른 커큐민의 잔류량을 비교한 결과이다. pH 변화에 따른 커큐민의 잔류량은 원료물질인 강황추출물에서 가장 크게 감소하는 경향을 보였다. 특히 산성 조건인 pH 2와 알칼리조건인 pH 10에서 잔류량이 매우 적었는데, pH 2에서는 19.6%만 남아있었고, pH 10에서는 6.9%만 남아있었다. pH 5와 pH 7의 약산성 및 중성 조건에서는 각각 22.4%와 24.7%의 커큐민이 잔류하는 결과를 나타내었다.
- 반면에, 강황추출물 나노에멀전과 수용성 키토산 코팅은 산성, 약산성, 중성의 pH에서 커큐민이 잔류하는데 매우 효과적이었다. 강황추출물 나노에멀전의 경우 91.0%~95.2% 사이의 커큐민 잔류량을 보였고, 수용성 키토산 코팅한 시료의 경우 95.2%~97.7% 사이의 커큐민 잔류량을 보였다.
- pH 10의 알칼리조건에서는 강황추출물 나노에멀전과 수용성 키토산 코팅한 시료 모두 유의적인 감소를 보였는데, 각각 21.1%와 28.6%의 커큐민의 잔류량을 보였다. 비록 알칼리 조건에서 커큐민이 많이 분해 또는 손실 되었지만 원료물질인 강황추출물에 비해서는 여전히 4배 정도 높은 안정성을 보였다.

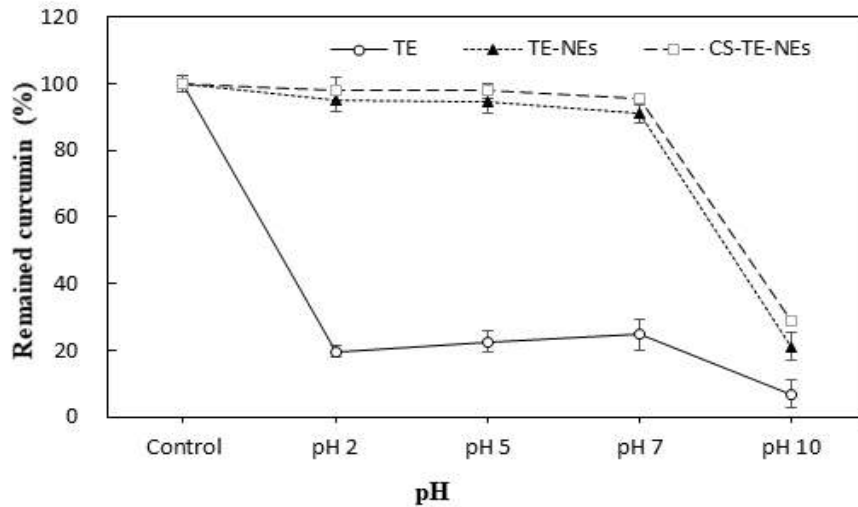


그림 3-2-61. pH에 따른 TEP, TE-NEs와 CS-TE-NEs의 잔류 커큐민 함량.

라. 수용성 키토산 코팅 강황추출물 나노에멀전의 FT-IR, GC-MS, 및 TEM 분석

- 강황추출물 나노에멀전에 대한 수용성 키토산의 코팅이 잘 되었는지를 확인하기 위해 FT-IR을 이용하여 적외선 영역의 빛 흡수에 의한 분자의 진동수를 통해 결합구조를 분석하였다. 그림 3-2-61에서 보듯이 강황추출물 나노에멀전(TE-NEs)의 특징적인 피크들이 2930 cm^{-1} 과 2857 cm^{-1} 에서 관찰되었으며, 이는 C-H에 의한 영향이다. 또한 1744 cm^{-1} 에서는 C=O 결합에 의한 피크가 관찰되었다.
- 수용성 키토산의 경우에는 1650 cm^{-1} 와 1519 cm^{-1} 에서 키토산의 아민기(-NH₃)에 의한 피크들이 관찰되었다.
- 수용성 키토산이 코팅된 강황추출물 나노에멀전(CS-TE-NEs)의 경우에는 강황추출물 나노에멀전의 특징적인 피크들과 키토산에서 보이는 특징적인 피크들이 모두 관찰 되면서 수용성 키토산이 강황추출물 나노에멀전을 잘 캡슐화 하였다는 것을 확인할 수 있었다.

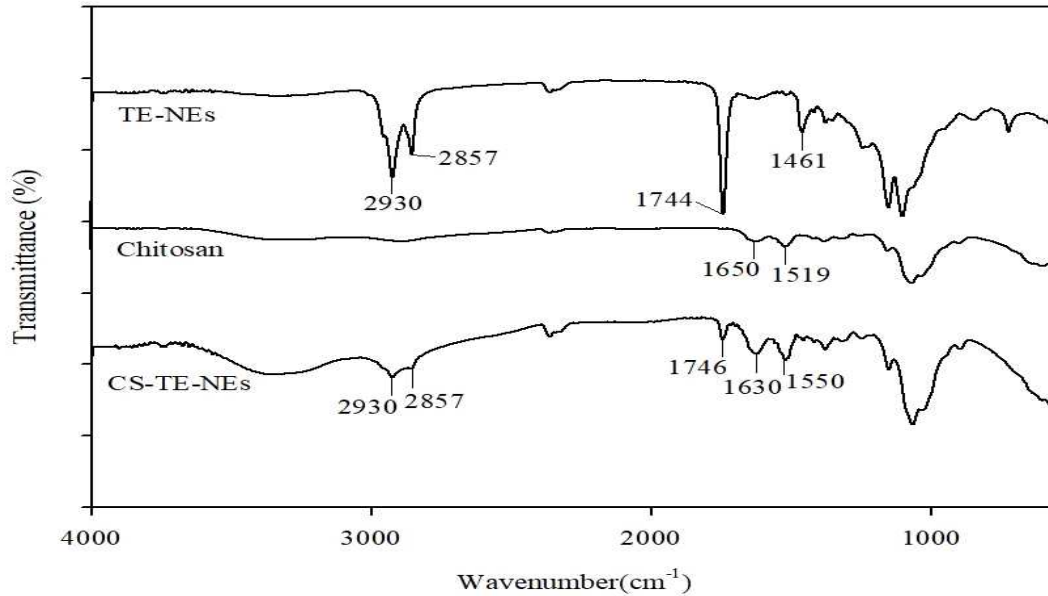


그림 3-2-62. TE-NEs, chitosan, 및 CS-TE-NEs의 FT-IR spectra.

- 원료물질인 강황추출물의 경우 매우 강한 향기 성분을 가지고 있어 다양한 가공식품으로 적용하는데 제한되고 있기도 하다. 이러한 향기성분을 나노에멀전과 수용성 키토산의 코팅을 통해 masking 하려고 하였고, Gas chromatography (GC) 분석을 통해 향기성분의 masking 효과를 비교하였다.
- 강황 또는 강황추출물에는 aromatic turmerone (*ar*-turmerone)이 대표적인 향기성분으로 관련된 수많은 문헌들에서도 강황에 들어있는 향기성분의 지표물질(biomarker)로 사용되고 있다.
- 그림 3-2-63은 gas chromatography 분석 결과로 표준물질인 *ar*-turmerone을 이용한 standard curve를 작성하고, 강황추출물(TE), 강황추출물 나노에멀전(TE-NEs) 및 수용성 키토산 코팅한 강황추출물 나노에멀전(CS-TE-NEs) 시료를 측정된 결과이다. 그림에서 보듯이 *ar*-turmerone은 retention time이 22.7분일 때 강한 피크를 나타내는데, 강황추출물의 경우 매우 강한 피크를 보이고 있고, 강황추출물 나노에멀전의 경우 매우 감소된 피크를 보이고 있다. 하지만 수용성 키토산의 코팅에 따른 추가적인 masking 효과는 매우 미미한 결과를 보여주었다.
- 강황추출물 시료의 피크 면적에 대한 강황추출물 나노에멀전과 수용성 키토산 코팅한 나노에멀전의 피크 면적의 비율로 향기성분의 masking 효과를 계산하였다. 강황추출물 나노에멀전과 수용성 키토산 코팅한 나노에멀전의 경우 강황추출물 원료물질의 향기성분의 약 2.18%와 2.31%의 향기성분이 검출됨으로 약 97.82%와 97.69%가 masking 되었음을 알 수 있었다.
- 하지만 나노에멀전에 비해 수용성 키토산의 코팅 효과는 더 이상 없었다. 이는 에멀전을 구성하는 오일층에 의해 이미 대부분의 향기성분이 masking 되었기 때문으로 사료된다.

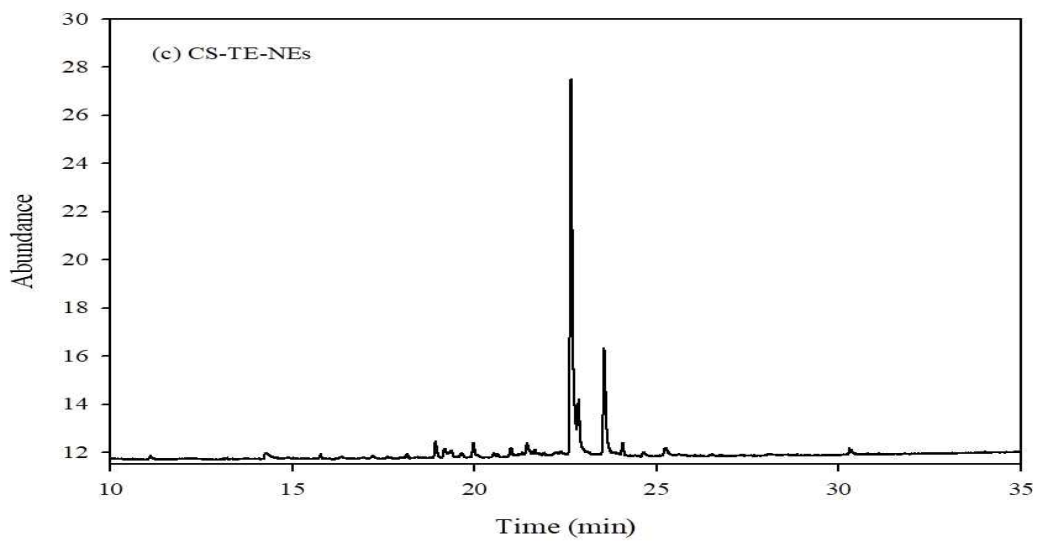
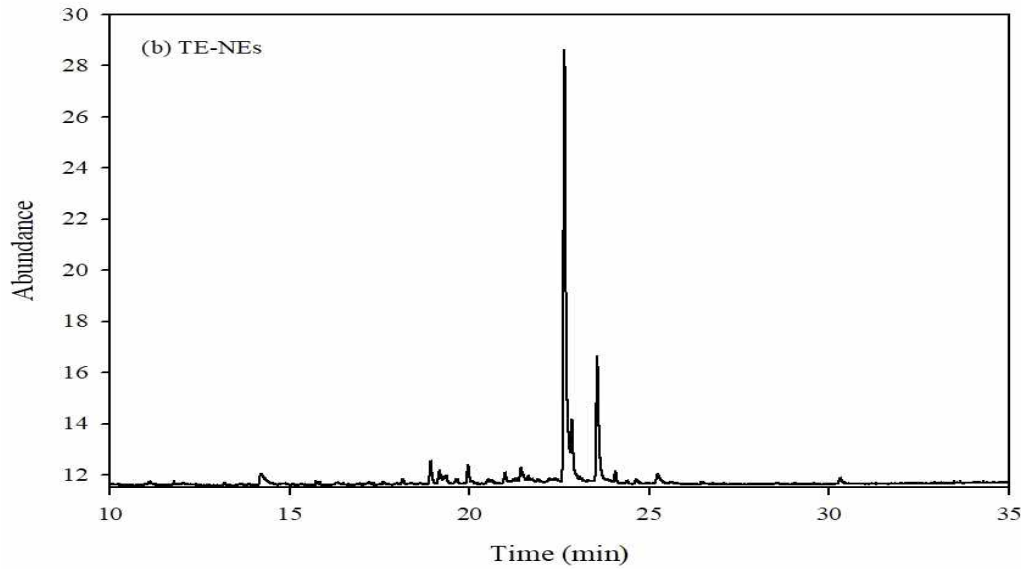
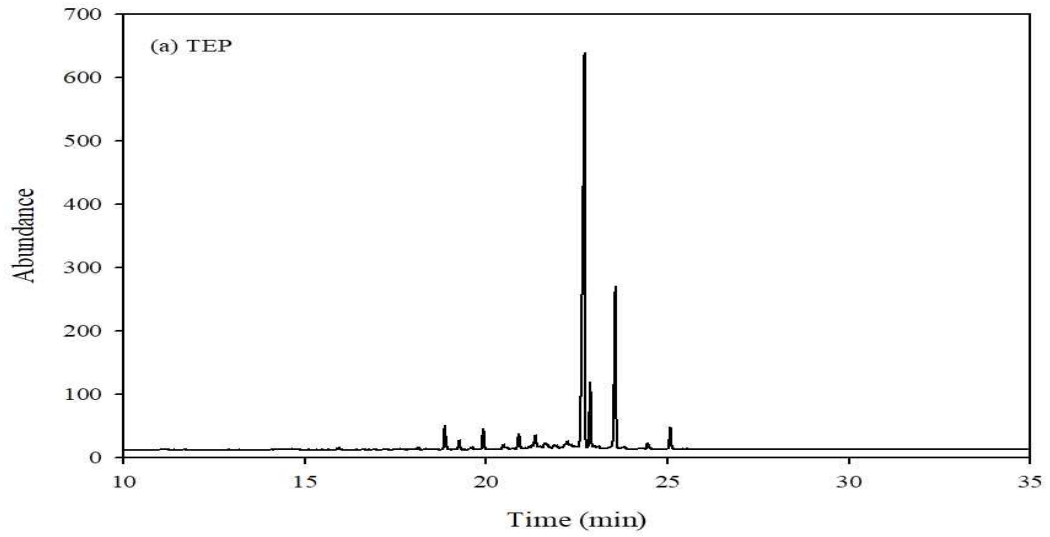


그림 3-2-63. TE, TE-NEs, 및 CS-TE-NEs의 GC spectra.

- 강황추출물 나노에멀전과 수용성 키토산으로 코팅한 나노에멀전의 형태를 관찰하기 위해 바이오 전자투과현미경(Bio-TEM)을 이용하였다. 시료의 전처리 과정으로 강황추출물 나노에멀전을 TEM grid에 몇 방울 떨어뜨리고, 과도한 시료는 whatman filter paper를 이용하여 제거하였고, Grid에 로딩되는 나노에멀전 droplet의 양을 높이기 위해 이 과정을 3회 반복하였다. TEM grid는 phosphotungstic acid 시약을 이용하여 염색 후 12시간 상온건조를 시킨 후 TEM 장비를 이용하여 나노에멀전의 형태를 분석하였다.
- 그림 3-2-64는 강황추출물 나노에멀전(A,B)과 수용성 키토산 코팅된 나노에멀전(C,D)의 TEM 사진이다. 그림에서 보듯이 두 가지 나노에멀전의 형태는 모두 구형으로 이루어져 있으며, 입자의 크기도 입도분석기로 측정한 입자크기와 비슷한 100 nm~200 nm사이의 크기를 보이고 있었다.
- 수용성 키토산으로 코팅된 나노에멀전의 경우에는 입자 주변에 키토산에 의한 층으로 예상되는 띠로 둘러싸인 입자들이 관찰되었다.

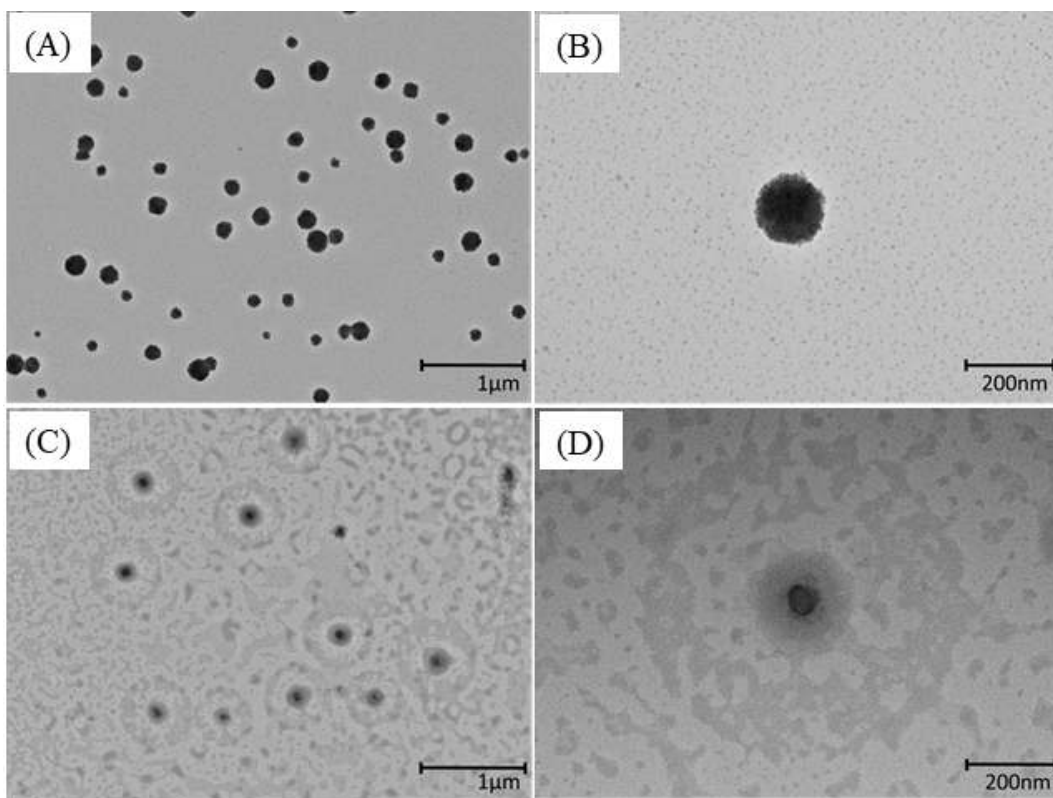


그림 3-2-64. (A,B)강황추출물 나노에멀전과 (C,D)수용성 키토산 코팅된 나노에멀전의 TEM 사진.

마. β -cyclodextrin을 이용한 강황추출물 나노에멀전 캡슐화

- 사이클로덱스트린은 고리형 올리고당의 일종으로 분자를 형성하는 포도당의 수에 따라 α -, β -, γ - 사이클로덱스트린으로 나뉘며, 하이드록실기가 위치하는 분자 외부에 비해 내부가 비교적 소수성 성질을 가지는 특징을 가지고 있어 소수성 특성을 갖는 기능성 성분의 캡슐화에 적합한 생물고분자로 많은 연구에 사용되어 왔다.
- 본 연구에서는 강황추출물 나노에멀전의 향기성분을 masking 하기 위해 β -사이클로덱스트린의 농도에 따른 강황추출물 나노에멀전의 코팅 효과를 비교하였다.

- β -싸이클로덱스트린(β -CD)의 농도는 0.5%~3% (w/v)로 제조하였고, 제조된 β -CD 용액을 강황추출물 나노에멀전과 1: 1의 비율로 하여 peristaltic pump를 이용하여 500 μ l/min의 flow rate으로 하여 drop-wise 방식에 따라 혼합하였다.
- 그림 3-2-65는 β -CD로 코팅한 강황추출물 나노에멀전의 β -CD의 농도에 따른 입자크기, PDI 및 제타전위를 나타낸 것이다. β -CD를 처리를 하지 않은 대조군의 입자크기는 87.2 nm에서 β -CD의 농도가 0.5%에서 3%까지 증가함에 따라 입자크기는 98.6 nm까지 증가하였다. 하지만 β -CD의 농도에 따른 입자크기의 변화는 유의적인 차이는 없었다. 또한 PDI 값은 0.26-0.28 사이의 값을 보이며 균일한 값을 보였고, β -CD의 농도별 처리에도 유의적인 차이는 없었다(그림 3-2-65A).
- 제타전위의 경우 β -CD 농도가 0.5%~3%까지 증가함에 따라 큰 차이는 없었으나 -32.0~-36.1 mV 사이를 나타내면서 절대값이 30이상을 보이며, 안정한 상태의 에멀전으로 보인다.

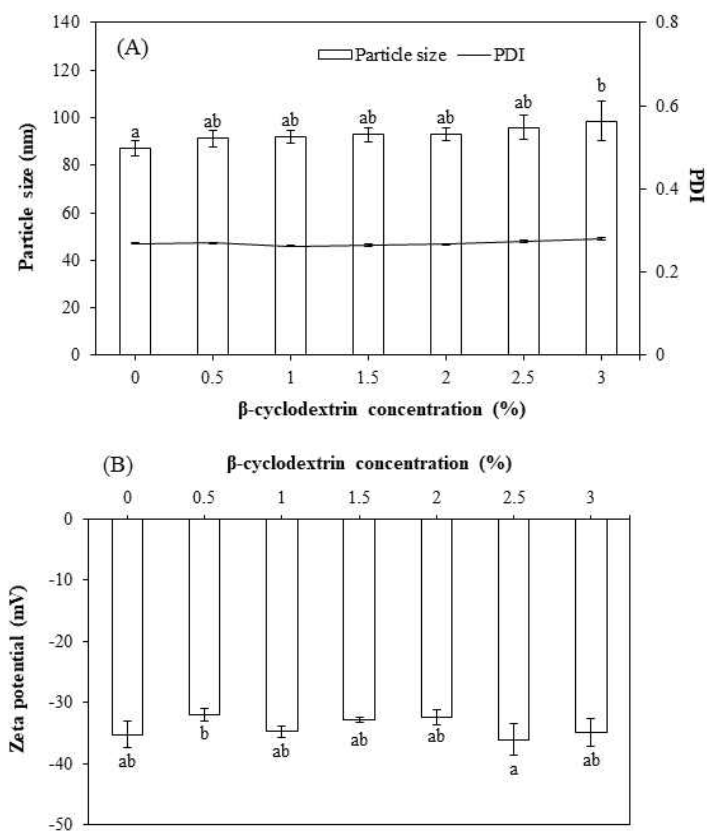


그림 3-2-65. β -CD의 농도에 따른 나노에멀전의 (A)입자크기, PDI 및 (B)제타전위.

- 그림 3-2-66은 1% (w/v)의 β -CD로 코팅한 강황추출물 나노에멀전을 다양한 pH 용액에 적용한 후 4 $^{\circ}$ C 저온에서 최대 30일 동안 저장하면서 입자크기, PDI 및 제타전위를 측정하여 저장 안정성을 평가한 결과이다.
- 처음 pH용액에 적용하지 않은 대조군의 입자크기는 87.6 nm였으나 pH 2에 적용하였을 때 입자크기가 100.4 nm로 유의적으로 증가하였고, 4 $^{\circ}$ C에서 30일간 저장하면서 저장 기간에 따른 유의적인 차이는 없었다(그림 3-2-66A).

- pH 4에서는 입자크기가 95.0 nm로 증가하였고, 저장 14일 까지는 유의적인 차이가 없었으나 저장 30일째에는 103.8 nm로 유의적인 증가를 보였다. pH 6과 pH 8에서도 pH 4에서와 유사한 결과를 보였고, pH 8에서 30일 동안 저장하였을 때가 108.6 nm로 입자크기가 가장 크게 증가하였다. 하지만 PDI 값은 모든 조건에서 0.3 이하를 보였으며, pH와 저장 기간의 차이에 따른 유의적인 차이는 없었다(그림 3-2-66A).
- 제타전위의 경우에는 pH의 변화에 따라 큰 차이를 보였다. 1% (w/v)의 β -CD로 코팅한 강황추출물 나노에멀전(대조군)의 제타전위는 -34.7 mV였으며, 그림 3-2-66B에서 보는 것과 같이 pH 2에 적용하였을 경우 -15.3 mV로 크게 저하되는 경향을 보였고, 저장 기간에 따라 최대 -19.7 mV까지 변화하였으나 이는 실험적인 오차로 보이며, 대체로 저장 기간에 따라서는 큰 변화는 없었다.
- pH가 4에 적용하였을 경우에는 제타전하가 -29.7 mV로 유의적인 감소가 있었고, 저장 기간에 따라 -24.1 mV까지 감소하는 결과를 보였다. 또한 pH 8에서는 pH 4에서와 비슷한 수준의 제타전위를 보였고, 저장 기간에 따른 변화도 비슷한 경향을 보였다.
- 대조군의 pH와 같은 pH 6에 적용하였을 경우에는 -37.3 mV를 나타내 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 저장 기간이 증가함에 따라 -29.8 mV~-32.3 mV 사이의 값을 보이며 유의적인 감소를 보이고 있으며, 저장 7일 이후에는 유의적인 변화는 없었다.

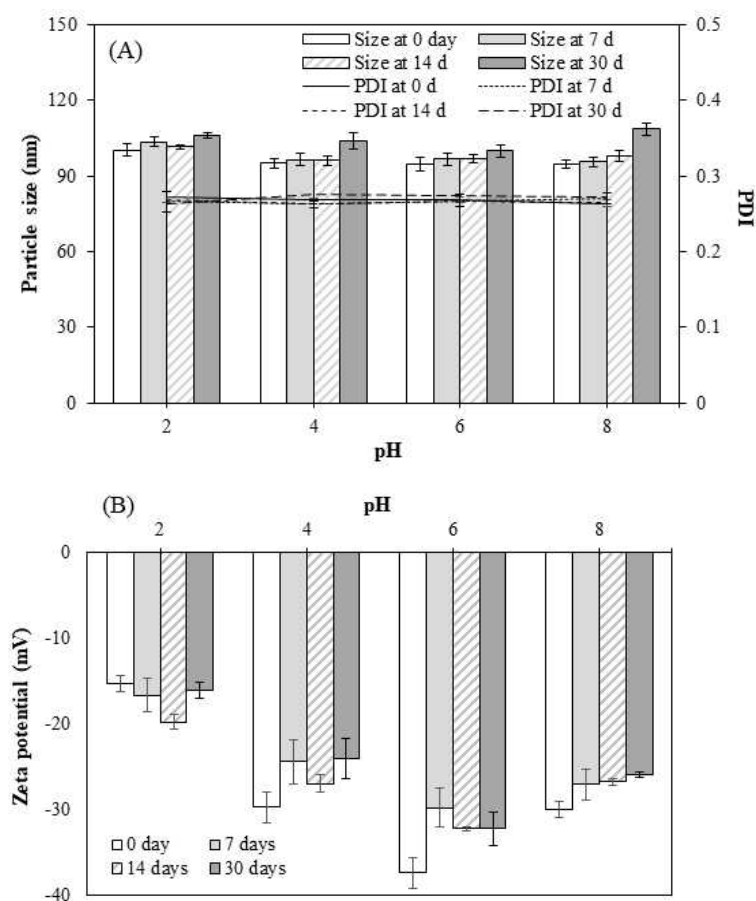


그림 3-2-66. β -CD적용 강황추출물 나노에멀전의 pH별 저장기간에 따른 (A)입자크기, PDI 및 (B)제타전위.

- β -CD의 농도별 캡슐화 실험에서 β -CD 용액을 강황추출물 나노에멀전과 혼합 후 저장 안정성을 향상시키기 위해 ultrasonication (US)을 10분간 처리한 후 4°C 저온에서 저장하면서 입자크기, PDI 및 제타전위를 측정하여 저장안정성을 비교하였다.
- 그림 3-2-67(A)에서 보는 것과 같이 US 10분간 처리한 시료의 경우 US 처리하지 않은 시료와 비교할 때 모든 농도의 β -CD의 캡슐화 조건에서 입자크기가 약 40%씩 감소하는 결과를 보였다.
- β -CD의 농도에 따른 입자크기는 다소 증가하는 경향은 있으나 유의적인 차이는 없었다. 하지만 농도별 저장 기간에 따른 입자크기는 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 1%의 β -CD에서 샘플 제조 후 입자크기는 50.13 nm였으며, 저장 7일째에는 54.5 nm로 유의적인 증가를 보였으며, 저장 30일 후에는 최대 58.7 nm까지 증가하였다.
- 제타전위는 β -CD의 농도에 따라 -26.9 mV~-32.3 mV사이의 값을 보였고, 저장 기간이 14일까지는 유의적인 변화가 없었으나 30일째에는 -33.4 mV~-36.4 mV까지 증가하면서 약 30%씩 증가하는 결과를 보였다.

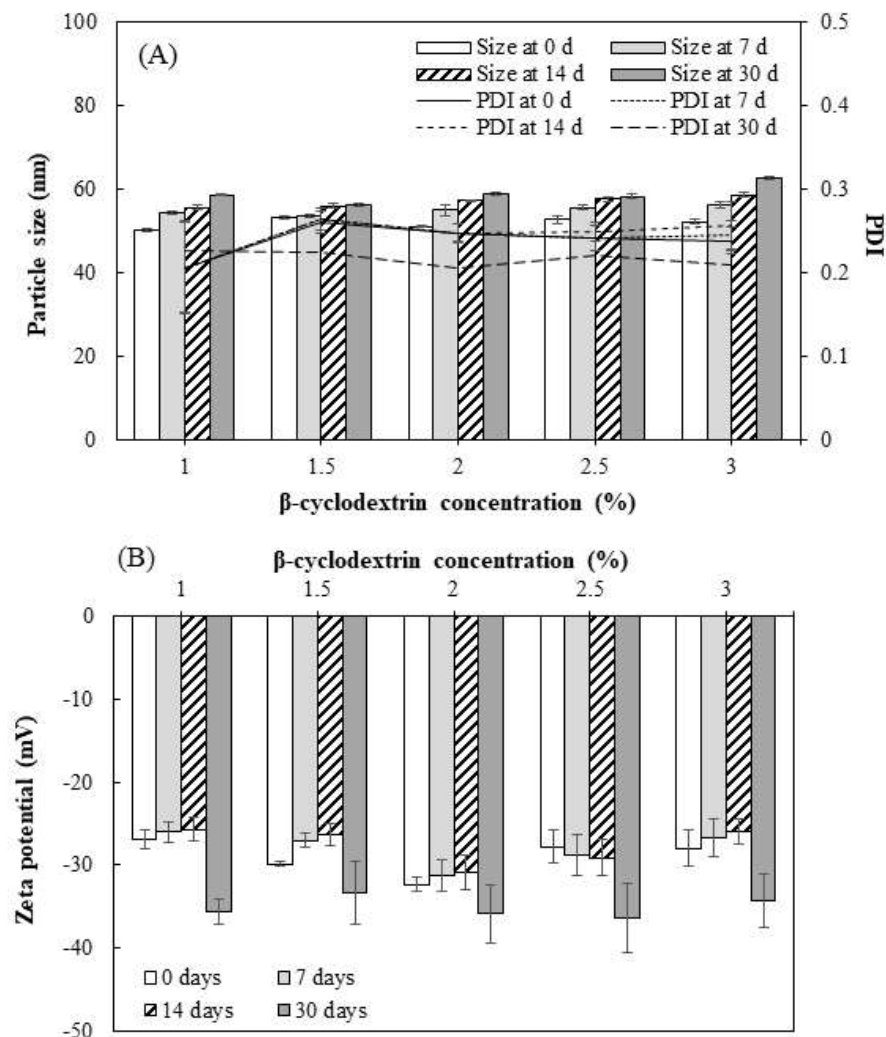


그림 3-2-67. β -CD적용 강황추출물 나노에멀전의 β -CD의 함량별 저장기간에 따른 (A)입자크기, PDI 및 (B)제타전위.

- β -CD로 캡슐화한 강황추출물 나노에멀전의 형태적인 분석을 위해 바이오 전자투과현미경(Bio-TEM)을 이용하였고, 시료의 전처리 과정은 앞에서 제시한 방법과 동일하게 하였다.
- 그림 3-2-68의 결과에서 보듯이 β -CD로 캡슐화된 강황추출물 나노에멀전의 형태는 구형의 입자들로 구성되어있으며, 표면이 β -CD 층으로 둘러싸여 있는 모습을 보여주고 있다. TEM 사진에서 보이는 입자들의 평균 크기는 입도분석기를 이용한 결과와 비슷한 수치인 약 50 nm~60 nm 사이의 입자들이 관찰되었다.

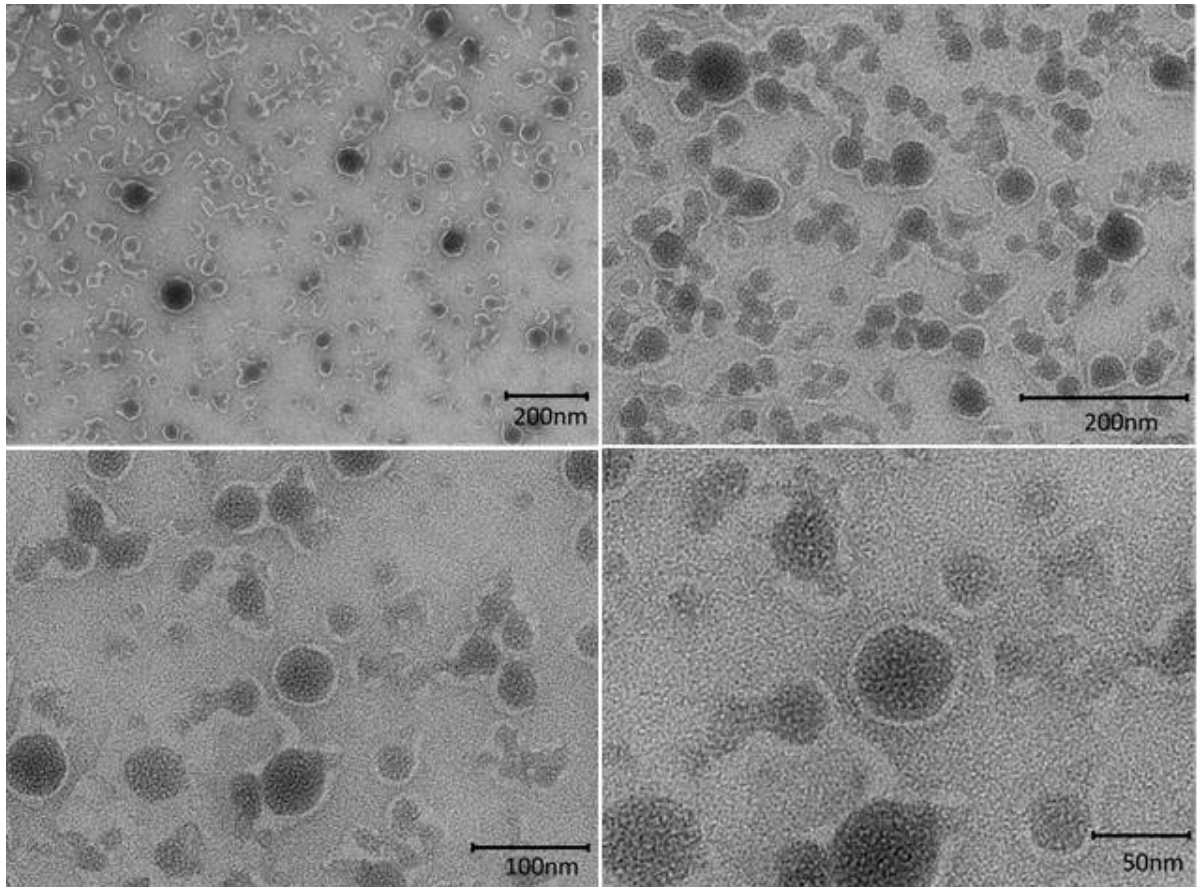


그림 3-2-68. β -CD로 캡슐화한 강황추출물 나노에멀전의 TEM images.

4. 강황추출물 나노에멀전을 적용한 시제품 개발

가. 강황추출물 나노에멀전을 적용한 햄 시제품 개발

- 햄 제조 과정은 그림 3-2-69에서 보여 지는 것과 같이 6단계의 공정에서 제조하였다. 1) 원료준비 공정에서는 원료의 검수 및 분말 원료를 계량한다. 2) 분쇄 공정에서는 민스기를 이용하여 돼지고기를 4~5 mm 크기로 분쇄한다. 3) 혼합 공정에서는 pilot vacuum mixer 기기를 이용하여 진공상태와 저온(-20℃)을 유지하면서 분쇄된 고기를 분말원료와 혼합한다. 4)숙성 공정에서는 4℃이하에서 18~28시간 정도로 장시간 숙성을 통해 혼합된 원료를 안정화시킨다. 5) 충전 공정에서는 캔에 충전한 후 진공상태에서 용기속의 잔존 산소를 모두 제거한 뒤 시밍(seaming) 작업한다. 6)살균 공정(121℃ for 22분)에서는 스팀온도와 압력을 가해 캔 내용물을 살균한다.

- 강황추출물 나노에멀전을 적용한 햄 배합비는 표 3-2-14에 보는 것과 같이 주된 성분인 정제염, 시즈닝, 향신료분말, 백설탕, 비타민 C, 카라기난은 동일한 비율로 첨가하고, 대조군으로 커큐미노이드를 첨가하고, 강황, 강황추출물 분말, 강황추출물 나노에멀전 분말을 각각 실험군 1, 실험군 2, 및 실험군 3으로 하여 제조하였다.



그림 3-2-69. 햄 제조 공정과 제조된 햄.

표 3-2-14. 강황추출물 나노에멀전 적용 햄 배합비

	원재료명	Blank	대조군	실험군 1	실험군 2	실험군 3
1	정제염	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5
	시즈닝	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
2	향신료분말	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
	커큐미노이드		3.0			
	강황분말			3.0		
	강황추출물 분말				3.0	
	강황추출물 나노에멀전 분말					3.0
3	백설탕	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0
	비타민 C	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
4	카라기난	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	정제수	41.5	38.5	38.5	38.5	38.5
	총합	80	80	80	80	80

- 표 3-2-14의 배합비에 따라 제조된 햄의 사진을 그림 3-2-70에 나타내었다. 그림에서 보듯이 blank는 기존의 제품이고, 대조군은 커큐미노이드, 실험군 1은 강황분말, 실험군 2는 강황추출물 분말, 및 실험군 3은 강황추출물 나노에멀전 분말을 같은 비율로 첨가한 것이다. 그림에서 보듯이 blank에 비해 커큐미노이드를 첨가한 대조군의 경우 매우 진한

노란색을 보이고 있으며, 커큐미노이드와 같은 비율의 강황분말과 강황추출물 분말의 경우에도 색상이 다소 옅어졌지만 노란색을 나타내고 있다. 하지만 강황추출물 나노에멀전 분말을 첨가한 실험군 3의 경우 blank와 비슷한 색상을 보였다.

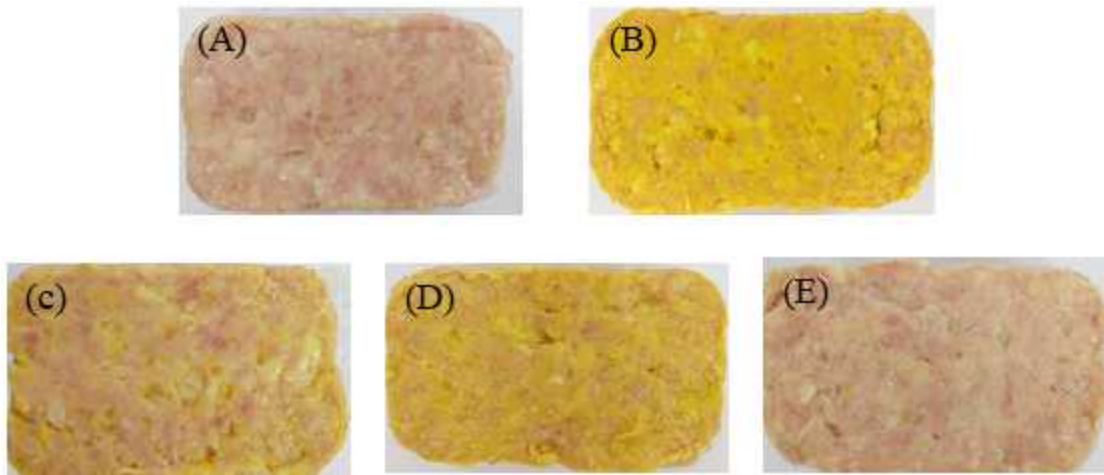


그림 3-2-70. 배합비에 따라 제조된 헴의 사진.
(A)Blank, (B)대조군, (C)실험군 1, (D)실험군 2, 및 (E)실험군 3.

- 참여기업인 ㈜오뚜기의 중앙연구소 연구소원 15명을 대상으로 하여 관능검사를 수행하였다. 관능검사 방법은 10점 평정법을 사용하여 점수가 높을수록 특성이 강해지고, 기호도가 좋아지는 결과를 나타내는 것이며, ANOVA를 이용한 통계처리에 의해 유의차 검증을 수행하였다.
- Blank, 대조군, 실험군 1, 실험군 2 및 실험군 3 시료에 대한 조리하지 않은 경우와 조리한 후로 나누어 관능평가를 수행하였고. 관능평가 결과 조리하지 않은 경우 노란색이 강할수록 기호도가 낮았으며, 이미, 이취의 강도는 강황분말 보다 강황추출물 분말이 유된 실험군 2에서 더 낮은 점수를 받았다.
- 전체적인 맛에 대한 결과에서는 강황추출물 나노에멀전 분말을 첨가한 실험군 3의 경우 blank와 유사한 점수를 받았으나 실험군 2과 실험군 2의 경우 특유의 흠냄새와 같은 향미가 느껴지면서 관능평가에서 낮은 점수를 받은 것으로 분석된다.
- 조리한 제품의 경우에는 관능적인 차이는 다소 줄어들었는데, 이는 굽는 과정에서 색상의 변화가 생겼기 때문이며, 이미, 이취의 경우에도 굽는 과정에서 많이 줄어들었기 때문으로 분석된다.
- 표 3-2-16은 헴의 색도를 나타낸 것으로 blank와 비교하여 실험군 1과 실험군 2에서는 a 값(redness)은 크게 감소하였고, b 값(yellowness)은 크게 증가하였으나 강황추출물 나노에멀전 분말을 첨가한 실험군 3의 경우 blank와 가장 유사한 결과를 보인다.

표 3-2-15. 햅의 관능평가 결과

Sample	조리 전			조리 후		
	색상의 기호도	이미/이취 강도	복합미	색상의 기호도	이미/이취 강도	복합미
Blank	7.93	0.00	7.64	7.86	0.00	7.21
실험군 1	7.20	0.47	6.86	7.00	0.21	7.00
실험군 2	6.87	0.00	7.29	7.71	0.00	7.07
실험군 3	7.80	0.00	7.43	7.43	0.00	7.43

표 3-2-16. 햅의 색도 분석

Sample	L	a	b	ΔE
Blank	58.62±0.01	9.42±0.01	9.63±0.02	
실험군 1	58.76±0.01	4.87±0.02	24.13±0.05	15.20
실험군 2	57.18±0.01	5.10±0.03	29.17±0.03	20.06
실험군 3	60.33±0.01	8.13±0.01	11.88±0.02	3.11

나. 백세강황환 시제품 개발

- 강황분말을 미분쇄하여 이를 이용하여 백세강황환을 생산하여 기존의 강황분말로 제조한 것과 비교하고자 하였다. 백세강황환의 제조공정도는 그림 3-2-71에 나타내었다. 1) 원료준비 공정에서는 원료 검수 및 계량한다. 2)원료분쇄 공정에서는 발아현미분말, 순카레, 카레분을 분쇄한 후 체로 거른다. 3)참쌀풀 준비 공정에서는 참쌀분을 배합수 1에 잘 풀고, 배합수 2를 끓여준 후 잘 풀어준 참쌀분을 넣고, 호화가 되어 점성이 생길때까지 저어준다. 4)원료혼합 공정에서는 분말원료부터 혼합한 후 참쌀풀과 아카시아꽃을 투입하여 최종 혼합한다. 5)제환 공정에서는 혼합한 반죽을 제환기 투입구에 넣은 후 이를 회전하는 롤러 사이에 통가시켜 원하는 크기의 구형으로 환을 만든다. 6)정환 및 건조 공정에서는 당의기에 환을 넣고 회전시키면서 원형에 가까운 모양으로 다듬고, 환을 열풍건조기에 넣고 온도와 시간을 설정한 후 건조한다. 7)선별 공정에서는 원하는 크기와 모양의 환만을 선별한다. 8)건조 공정에서는 60℃에서 15시간동안 열풍 건조 한다. 9)충진 공정에서는 규격에 맞게 병에 포장한다. 10)검사 공정에서는 수분과 커큐민 함량을 분석하고, 봉해도는 제1액에서 60분 내에 녹지 않고, 잔류물이 남아있을 경우, 제2액에서 60분 동안 봉해 실험을 실시한다.
- 일반 강황분말과 미분쇄한 강황분말을 이용하여 제조된 백세강황환의 차이를 비교하기 위해 색도 및 관능평가를 수행하였다. 미분쇄한 강황분말은 일반 강황분말과 비교하여 a 값은 다소 낮았고, b 값이 유의적으로 증가하며 더욱 진한 노란색을 띠었다. 하지만 강황환으로 제조한 이후에는 색도의 차이는 거의 없었다.

- 관능평가에서는 일반 강황분말을 첨가한 제품과 비교하여 색상 및 강황 향에 대한 기호도가 다소 높은 평가가 되었으나 그 외에는 유의적인 차이는 없었다.

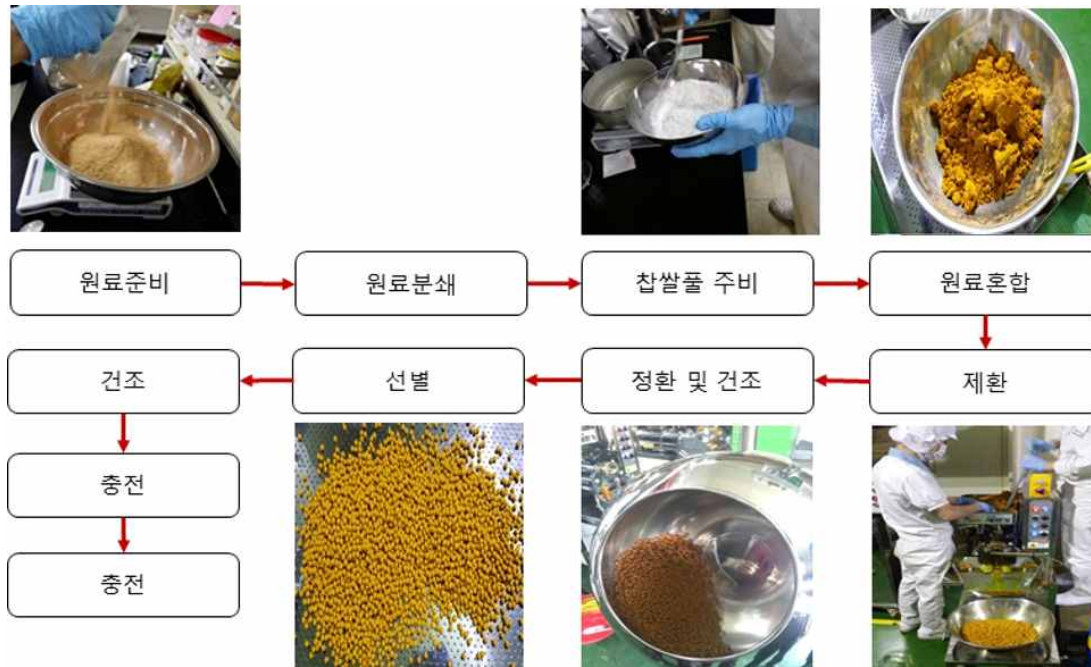


그림 3-2-71. 백세강황환 제조 공정.

5. 제품 내 나노물질 검증 및 분석법 개발

가. 나노물질의 이화학적 특성 분석법

- 나노물질의 이화학적 특성으로는 입자크기, 분포도, 제타전위, 형태 등이 있는데, 입자크기는 dynamic light scattering (DLS)을 이용하여 콜로이드 상에서 분산된 나노입자들의 brown 운동을 Stoke-Einstein식에 대입하여 입자의 크기를 측정하게 된다. DLS법은 photon correlation spectroscopy 또는 quasi-elastic light scattering이라고도 하며, 용액 속의 미세한 입자들의 분포를 빠르게 분석할 수 있다.
- DLS법에 의한 입도분석 원리는 아주 묽게 희석된 상태의 시료를 레이저 빔에 노출시켜 입자가 빛을 산란시킴으로 발생하는 파장 신호 변화를 통해 입자의 크기를 분석하며, 측정 시간이 5~6분 정도로 짧고 별도의 보정이 필요 없지만 입자 크기 분산도가 큰 물질의 경우 정확한 값을 얻기 어렵다는 단점도 있다.
- DLS는 입자의 브라운 운동에 의해 결정되고, 고정된 탐지각(detection angle)을 가지고 일정한 시간별로 변화하는 산란 빛의 파장 강도를 읽으며, 크기가 작은 입자일수록 좀 더 빠른 브라운 운동을 하기 때문에 확산계수에 관한 Stoke-Einstein 관계식에 의해 입도가 결정된다.

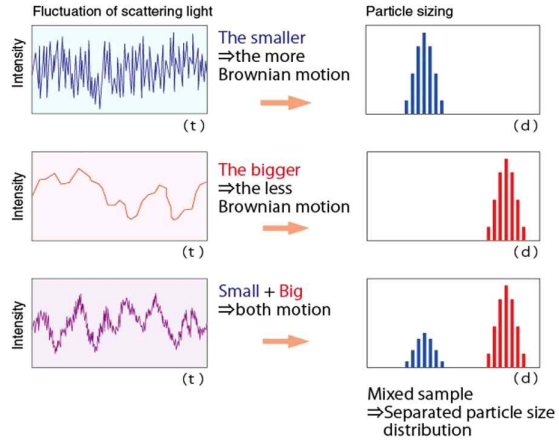
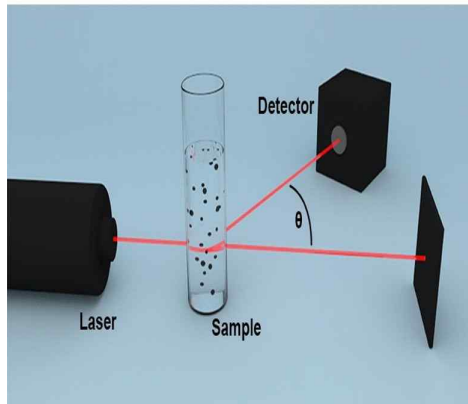


그림 3-2-72. DLS법을 이용한 입자의 크기 및 분포도 분석.

○ 제타전위는 액상에 분산되어 있는 입자들이 가지는 전기적인 charge를 말하며, 여기에 전류를 흘리게 되면 대전된 전하에 의하여 입자의 전하가 이동하며, 계명활성제와 같은 표면개질물의 첨가에 의하여 영향을 받을 수 있다. 입자와 입자의 제타전위가 같으면 서로간의 반발력에 의하여 전위값이 커지고, 입자간의 제타전위가 다르면 이력이 작용하여 응집된다(그림 3-2-73). 일반적으로 높은 제타전위를 가지는 입자는 안정하여 응집되지 않는다고 알려져 있다.

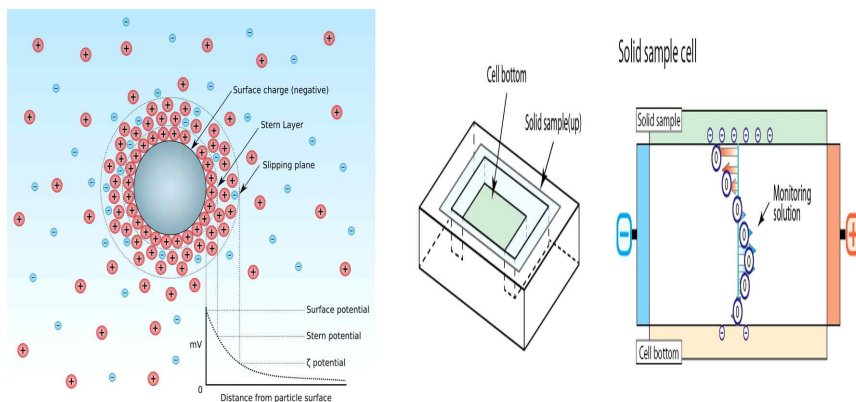


그림 3-2-73. 콜로이드 용액에서의 제타전위 측정.

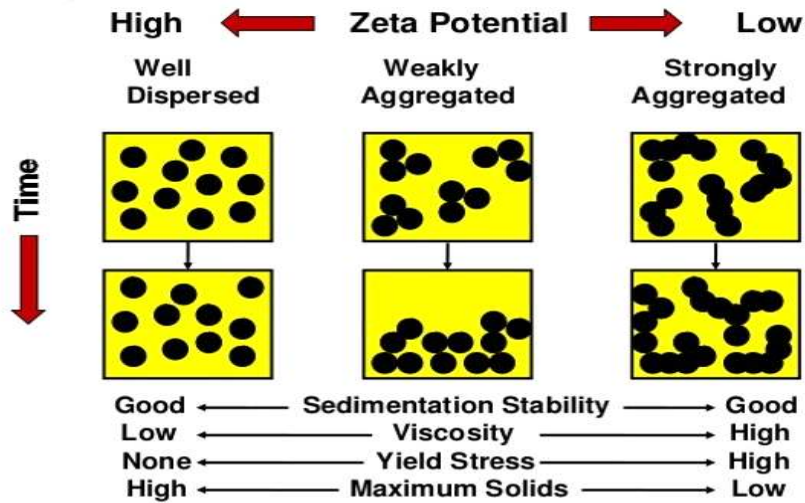


그림 3-2-74. 제타전위에 따른 입자 안정성.

- Transmission Electron Microscopy (TEM)은 나노에멀전의 크기와 형태의 관찰이 가능한 전자현미경으로서 100~1,000 nm 사이의 나노에멀전 droplets의 형태를 관찰하기 위해 사용된다.
- Differential Scanning Calorimetry (DSC)는 엔탈피 변화와 전이에 의해 발생하는 열적 특성에 따라 다양한 정보를 제공하며, 유리전이, 화학반응, 녹는점, 산화안정성, 결합여부 등의 물리적 변화를 알 수 있다.

나. 식품에 함유된 나노에멀전의 분리 및 검증법

(1) 식품에 함유된 나노에멀전 분리 검증을 위한 단계별 분석

- 현재까지 나노에멀전에 대한 연구는 많이 있지만, 이를 식품에 적용하였을 때 물리화학적 특성변화와 식품에 함유된 나노에멀전을 분리하고, 검증하는 연구는 거의 없는 상황이다. 하지만 나노기술을 적용한 식품에 개발되며, 이를 검증하기 위한 분석기술이 필요하며, 본 연구에서는 강황추출물 나노에멀전을 식품의 모사용매에 적용한 후 나노에멀전의 특성을 분석하고, 실제 식품에도 적용하여 분석하였다.
- 문헌조사를 통해 식품에 적용된 나노에멀전의 검증법은 표 3-2-17과 같았다.

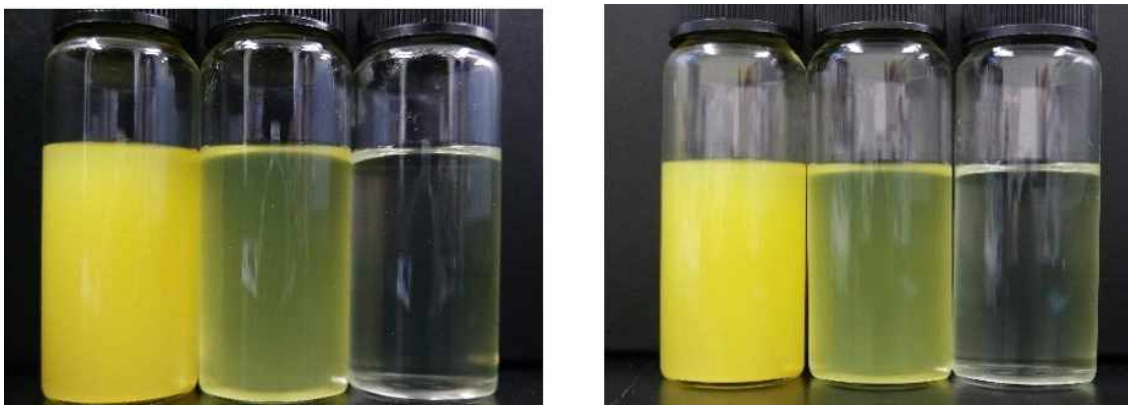
표 3-2-17. 식품 내 나노에멀전 분리 및 검증을 위한 단계 및 항목

검증순서	시험내용	분석항목
1단계	식품 적용 전 나노에멀전의 특성확립	입자크기, 제타전위, TEM, HPLC 등
2단계	식품 적용 전 나노에멀전의 외부환경으로 부터의 안정성 평가(pH, 염농도, 저장시간 등)	입자크기, 제타전위, HPLC 등
3단계	식품 적용 후 평가	입자크기, 제타전위, TEM, HPLC, DSC 등
4단계	식품 적용 후 안정성 평가	입자크기, 제타전위, HPLC 등
5단계	식품과 나노에멀전 분리	원심분리, 입자크기, 제타전위, HPLC 등

(2) 모사용매에서의 강황추출물 나노에멀전의 안정성 평가

(가) 증류수에서의 안정성 평가

○ 강황추출물 나노에멀전 분말의 안정성을 육안으로 확인하기 위해 10 mg/mL, 20 mg/mL, 및 50 mg/mL의 농도로 증류수에 재분산 시키고, 7일간 저장 후 관찰하였다. 그림 3-2-75에서 보는 것과 같이 농도가 증가함에 따라 색은 진한 노란색으로 변하였고, 불투명하게 바뀌는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 입자의 침전이나 층 분리와 같은 현상은 관찰되지 않았다.



0 day

7 day

그림 3-2-75. 농도별로 재분산된 강황추출물 나노에멀전의 저장 7일 후 안정성.

- 식품에 직접 적용하기 전에 강황추출물 나노에멀전 분말을 증류수에 재분산하여 저장 기간에 따른 안정성을 측정하였다. 그림 3-2-76에서 보는 것과 같이 증류수에 분산된 강황추출물 나노에멀전 분말의 입자크기는 초기 198.7 nm에서 저장 7일 후 201.7 nm로 다소 증가하는 결과를 보였으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. PDI 값은 0.3 이하의 값을 나타냈으며 역시 저장 기간에 따른 유의적인 차이는 없었다.
- 증류수에 재분산된 강황추출물 나노에멀전의 제타전위는 약 -60 mV를 보이며, 저장 기간에 따른 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

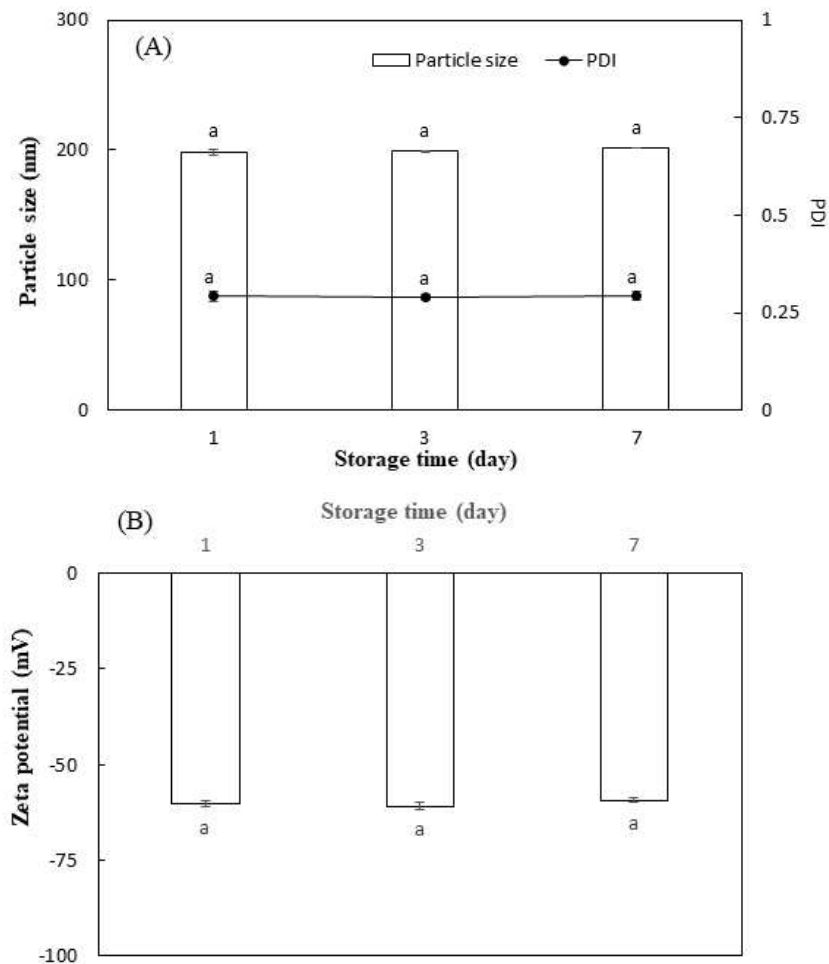


그림 3-2-76. 저장시간에 따른 TE-NEP 입자 및 제타전위 변화

- 강황추출물 나노에멀전 분말을 증류수에 재분산 시킨 후 커큐민의 함량 변화를 7일 동안 분석하여 비교하였다. 그림 3-2-77에서 보는 것과 같이 대조군의 경우 커큐민의 함량이 18.71%이며, 저장 기간이 3일과 7일 후 각각 17.87%와 17.99%로 3.8~4.5%가 감소하였고, 통계적으로도 유의적인 감소를 보였다. 하지만 3일과 7일 사이의 변화는 유의적인 차이는 없었다.

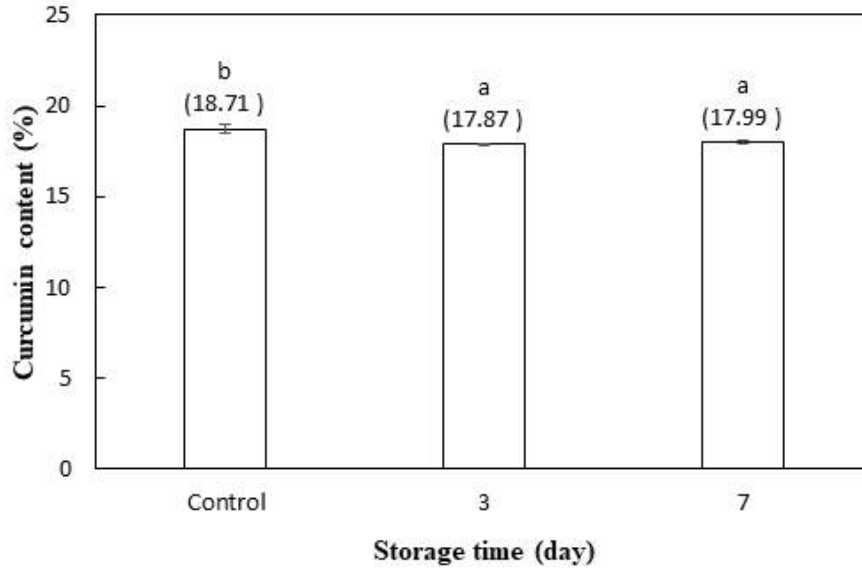


그림 3-2-77. 증류수에 재분산된 강황추출물 나노에멀전 분말의 저장기간에 따른 커큐민 함량.

(나) NaCl 용액에서의 안정성 평가

- 가공식품에 적용 시 가장 많이 노출되는 성분이 바로 염이다 따라서 제품 적용 실험 전 강황추출물 나노에멀전 분말을 NaCl 용액에 적용하고 저장 기간에 따른 안정성을 확인하였다. 염화나트륨은 식품에 함유된 소금을 재현한 것으로 일반적으로 모든 식품가공품에 사용되고 함유되어 있는 물질이다.
- 대부분의 식품에 사용되는 NaCl은 단순히 짠맛의 기능이 아니라 농도와 적용식품에 따라 살균, 방부, 탈수, 단백질의 열 응고, 갈변방지, 탄력성증진, 단백질 용해, 발효조정, 효소 활성 억제 등 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있고 이러한 사용은 단백질, 지방, 다당류와 같은 성분과 결합하여 나타나는 작용으로서 NaCl 용액에서 강황추출물 나노에멀전 분말의 안정성을 관찰하였다.
- 그림 3-2-78은 10 mM, 50 mM, 100 mM의 NaCl 용액에 첨가한 강황추출물 나노에멀전 분말의 대조군과 저장 7일 후의 사진으로 육안으로 관찰하였을 때 대조군에서는 균일한 혼합으로 층 분리와 침전 등은 보이지 않았지만, 저장 7일 후에는 creaming 현상이 보이며 층 분리가 관찰되었다. NaCl의 농도에 따른 외관상의 차이는 없었다.



0 day



7 day

그림 3-2-78. NaCl 용액(10, 50, 및 100 mM)에 첨가한 강황추출물 나노에멀전 분말.

- 다음은 10 mM NaCl 용액에 강황추출물 나노에멀전 분말을 첨가하고, 0, 1, 3, 및 7일째에 입자크기, PDI 및 제타전위를 비교하여 안정성을 확인하였다. 그림 3-2-79에서 보는 것과 같이 입자의 크기는 198.7 nm에서 저장 시간이 지남에 따라 조금씩 증가하는 경향을 보이거나 저장 3일까지는 유의적인 차이는 없었다. 하지만 저장 7일째에는 217.1 nm로 약 9.3%가 증가하면서 유의적인 차이를 보였다. PDI는 0.26~0.29사이의 값을 보이며 유의적인 차이는 없었다.
- 제타전위는 대조군이 -60.2 mV로 매우 큰 제타전위를 나타내었으나 10 mM NaCl용액에 첨가하여 저장 시간에 따라 -32.6 mV로 크게 감소하는 경향을 보였다. 이는 NaCl이 해리되어 생기는 Na⁺이온들이 나노입자들 표면에 결합하면서 제타전위의 값을 감소시켰을 것으로 보인다.

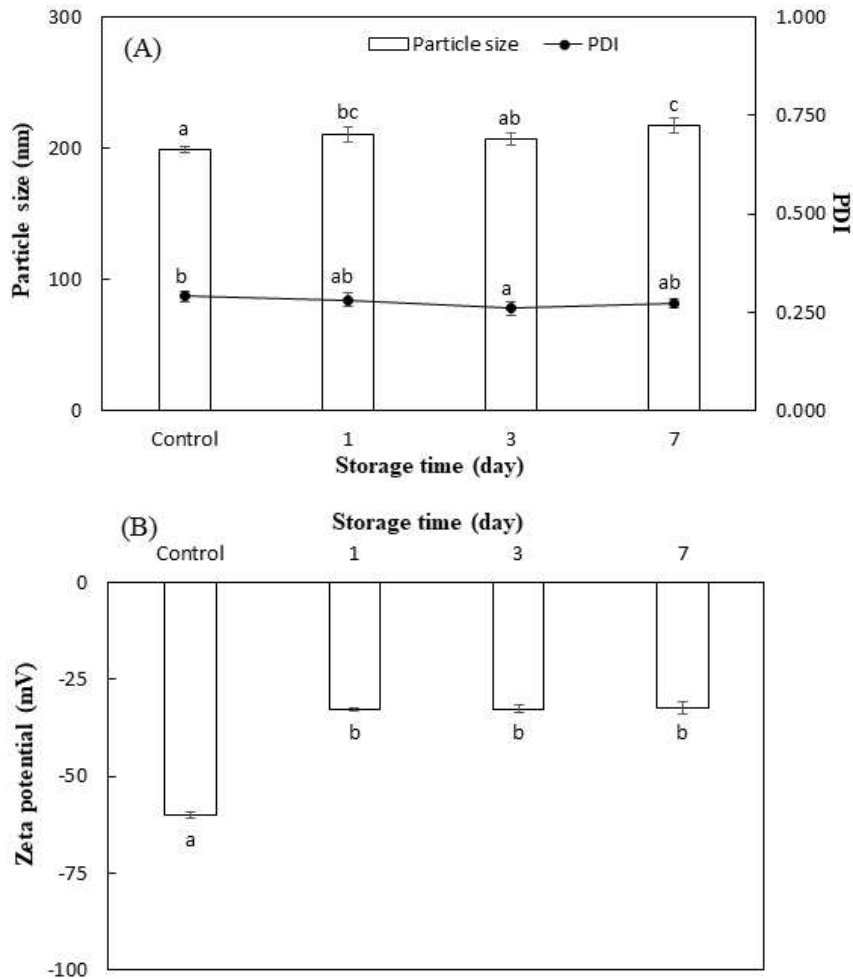


그림 3-2-79. 10 mM NaCl 용액에 첨가한 강황추출물 나노에멀전 분말의 저장안정성.

- 문헌에 따르면 색소성분인 커큐민은 NaCl에 민감하여 쉽게 파괴된다고 되어 있다. 본 연구에서도 강황추출물 나노에멀전 분말을 10 mM NaCl 용액에서의 7일 동안 저장 하면서 커큐민의 함량 변화를 측정하였다. 대조군으로 99% 커큐민을 사용하여 NaCl 용액에서의 안정성을 비교하였다.
- 그림 3-2-80에서 보는 것과 같이 대조군인 커큐민은 10 mM의 NaCl 용액에 첨가하여 저장 기간이 증가함에 따라 크게 감소하는 경향을 보이는데, 저장 1일째에 81.3%, 저장 3일째에 58.7%, 저장 7일째에는 50.9%만이 남아있어 일주일 만에 약 50%가 분해되는 결과를 보였다.
- 반면에 강황추출물 나노에멀전에 함유된 커큐민은 저장 시간에 따른 감소폭이 대조군인 커큐민에 비해 크게 줄어드는 것을 알 수 있었다. 저장 기간이 증가함에 따라 지속적으로 감소하는 경향은 보였으나 저장 7일째에도 93.6%가 남아있어 대조군에 비해 약 84%가 유지되는 것을 알 수 있었다. 이는 에멀전 표면을 둘러싸고 있는 오일층과 분말화를 위해 사용된 텍스트린의 코팅에 의한 효과로 보인다.

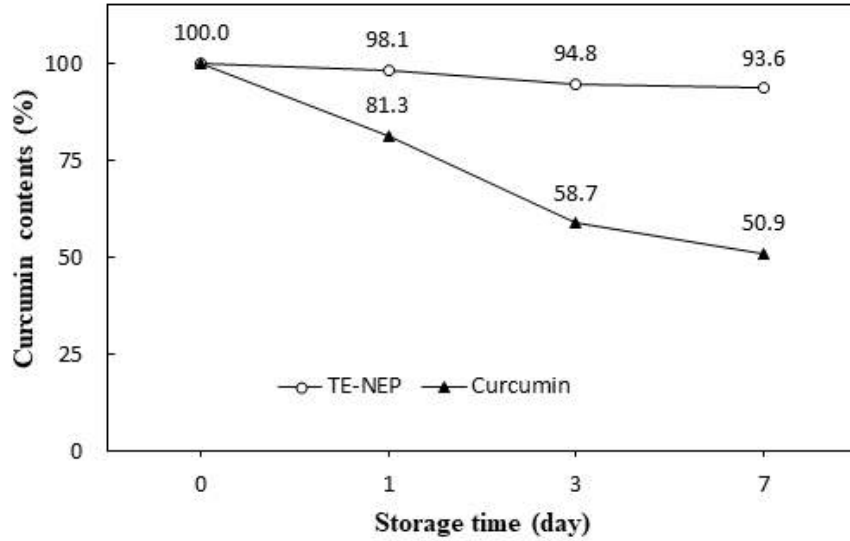


그림 3-2-80. 10 mM NaCl에 첨가한 99%커큐민과 강황추출물 나노에멀전 분말의 저장 시간에 따른 커큐민의 함량 비교.

(다) pH에 따른 안정성 평가

- 강황추출물 나노에멀전 분말의 pH 안정성을 평가하기 위해 pH 2, 5, 7, 및 10 용액에 재분산 시킨 후 저장 기간을 7일까지 하여 저장 기간에 따른 입자크기, PDI 및 제타전위의 변화를 비교하였다.
- 그림 3-2-81은 pH별 저장 기간에 따른 강황추출물 나노에멀전 분말의 입자크기와 PDI를 나타낸 것으로 pH 2와 pH 10에서는 입자크기에 있어 유의적인 변화는 없었다. 하지만 pH 5와 pH 7에서는 저장 1일 이후 유의적인 증가를 보였으며, 특히 pH 7에서는 저장 7일째 275.9 nm로 대조군에 비해 약 39%가 증가하였다. PDI 값은 pH 2에서는 유의적인 차이가 없었고, 그 외의 pH에서는 저장 1일 이후에 유의적인 감소를 나타내었다.

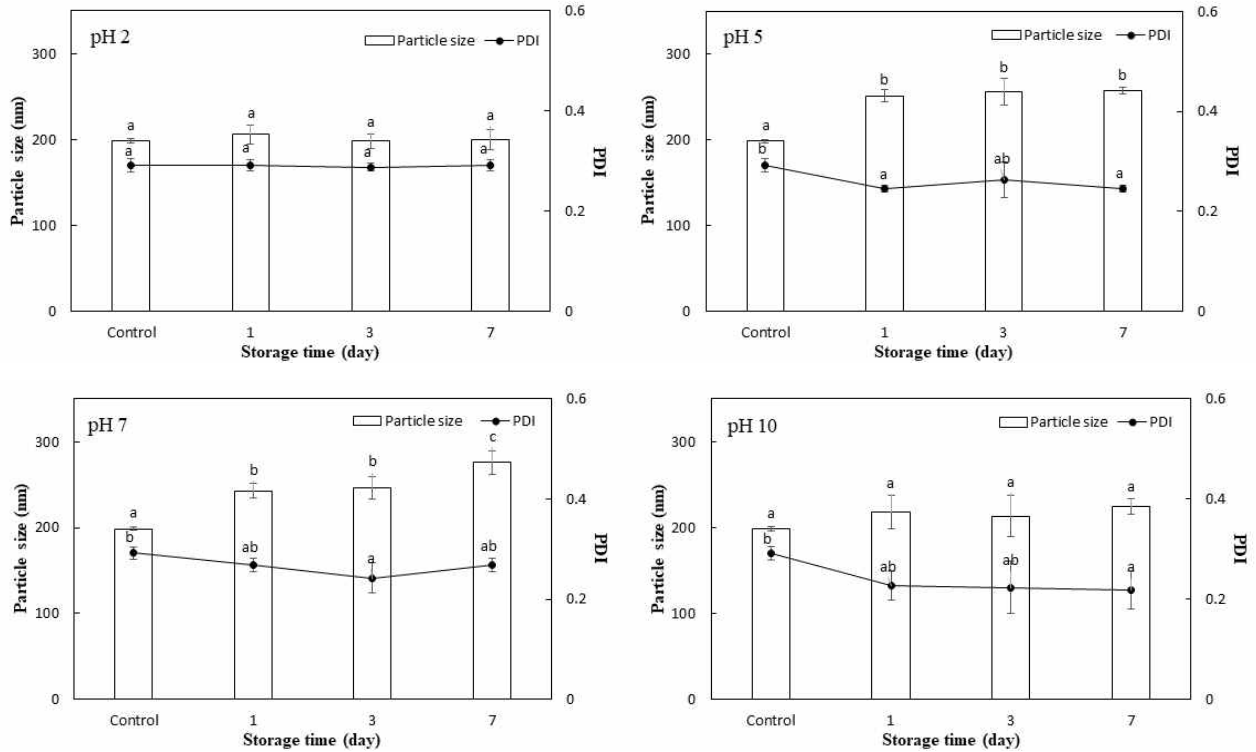


그림 3-2-81. pH별 강황추출물 나노에멀전 분말의 재분산 후 저장 기간에 따른 입자크기와 PDI.

- 제타전위의 변화는 산성인 pH 2에 첨가하게 되면 급격하게 감소하면서 대조군의 -60.2 mV에 비해 약 73%가 감소하였다. 산성 조건에서 제타전위의 감소는 산성에서 해리되어 있는 수소이온의 결합에 의한 것으로 많은 문헌들의 결과와 유사한 결과를 보였다.
- pH 5와 pH 7에서는 유의적인 차이를 보이며 감소하는 경향은 보였으나 감소되는 비율이 약 16% 이내로 산성 조건에 비해서는 감소폭이 작았고, 또한 감소한 이후에도 -50 mV 이상을 보이고 있어 매우 안정한 상태의 에멀전을 나타내고 있다. pH 10인 알칼리 조건에서는 최대 -66.7 mV까지 증가하는 경향은 보였으나 유의적인 차이는 없었다.

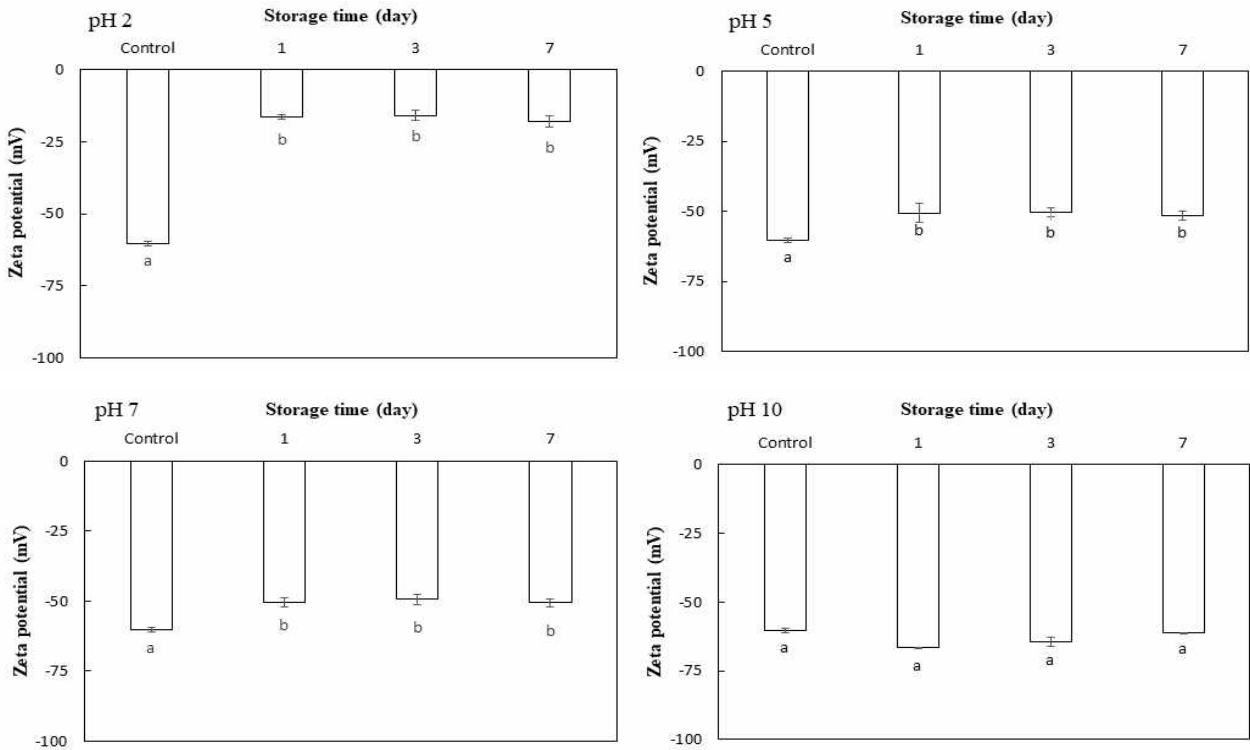


그림 3-2-82. pH별 강황추출물 나노에멀전 분말의 재분산 후 저장 기간에 따른 제타전위.

- pH에 따른 커큐민의 파괴되는 정도를 비교하기 위해 pH 2, 5, 7 및 10 용액에 강황추출물 나노에멀전 분말과 99% 커큐민을 첨가하고, 7일간의 저장 기간에 따른 커큐민의 함량을 분석하였다.
- pH별 저장 기간에 따른 저장 안정성을 평가한 결과 99%의 커큐민의 경우 모든 pH에서 저장 시간이 증가함에 따라 빠르게 감소하는 경향을 보였다. 하지만 산성 또는 약산성의 조건에서는 중성과 알칼리 조건에 비해 감소되는 양이 상대적으로 적었다. 예를 들어, pH 2에서는 저장 기간이 1일, 3일, 7일로 증가함에 따라 커큐민 함량이 82.6%, 58.6%, 및 47.5%가 남아 있었다. 또한 pH 5에서는 87.4%, 66.9%, 및 62.7%로 상대적으로 pH 2 조건보다도 많은 양의 커큐민이 남아있었다.
- 또한 pH 7에서는 저장 7일 후에 28.1%만 남아 있어 약72%가 파괴되었으며, pH 10에서는 저장 3일 후에 6.7%만 남아있었고, 저장 7일 후에는 1.7%만이 남아있어 대부분의 순수한 커큐민은 알칼리 조건에서 쉽게 파괴됨을 알 수 있었다.
- 하지만, 강황추출물 나노에멀전 분말의 경우 pH 2, 5, 7에서는 7일동안의 저장 후에도 최소 91.7% 이상의 커큐민이 잔류하는 결과를 얻었다. 그러나 pH 10에서는 저장 3일과 7일 이후 각각 25.2%와 10.4%가 잔류하여 알칼리 조건에서는 나노에멀전 분말도 대부분이 파괴된다는 결론을 얻었다.

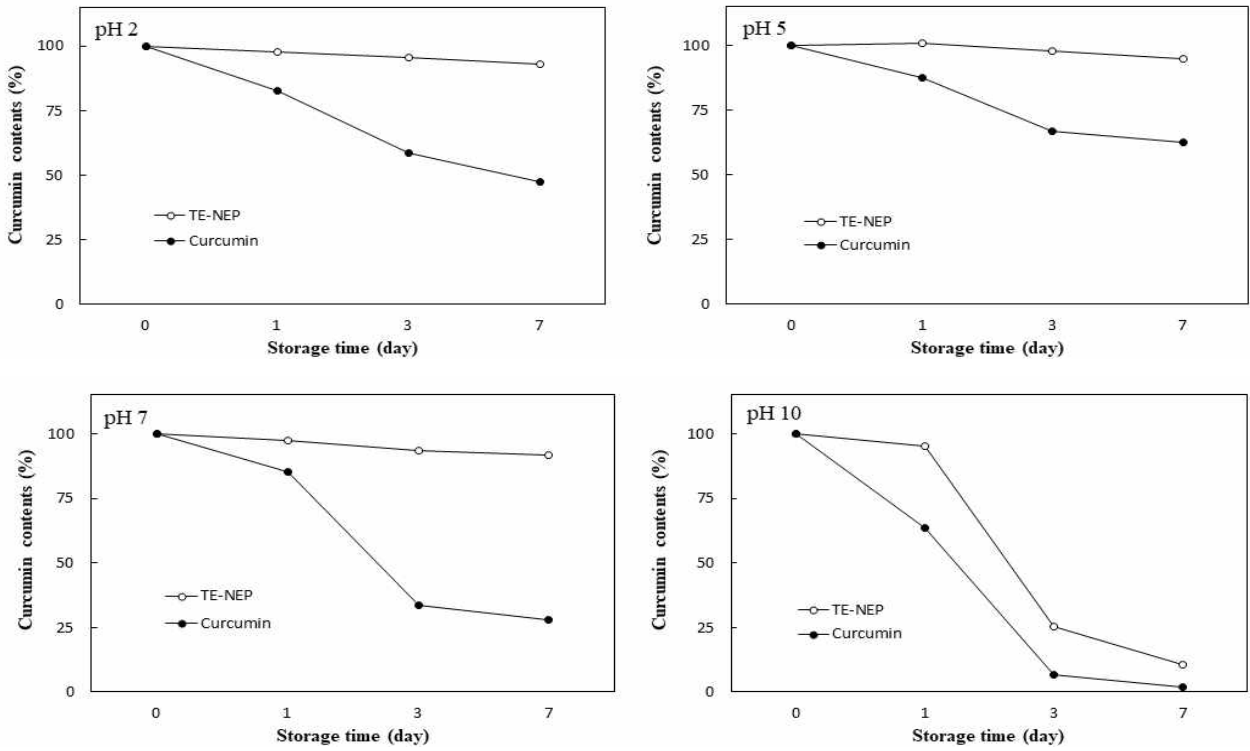


그림 3-2-82. 다양한 pH에서 99%커큐민과 강황추출물 나노에멀전 분말의 저장 시간에 따른 커큐민의 함량 비교.

(라) 에탄올에서의 안정성 평가

- 강황추출물 나노에멀전 분말을 10% 에탄올에 재분산 시킨 후 저장 기간에 따른 입자크기, PDI, 및 제타전위를 측정하였다. 대조군의 입자크기가 198.7 nm에서 10% 에탄올에 재분산 시킨 강황추출물 나노에멀전 분말의 경우 약 350.1 nm~380.6 nm 사이로 유의적인 증가를 보였다. 하지만 저장 기간에 따른 유의성은 나타나지 않았다. PDI 값은 대조군에 비해 다소 감소하는 경향은 보였으나 유의적인 차이는 없었다(그림 3-2-83).
- 제타전위의 경우 대조군에 비해 10% 에탄올에 재분산 시킨 강황추출물 나노에멀전 분말이 다소 증가하는 경향은 보였으나 유의적인 차이는 없었다.

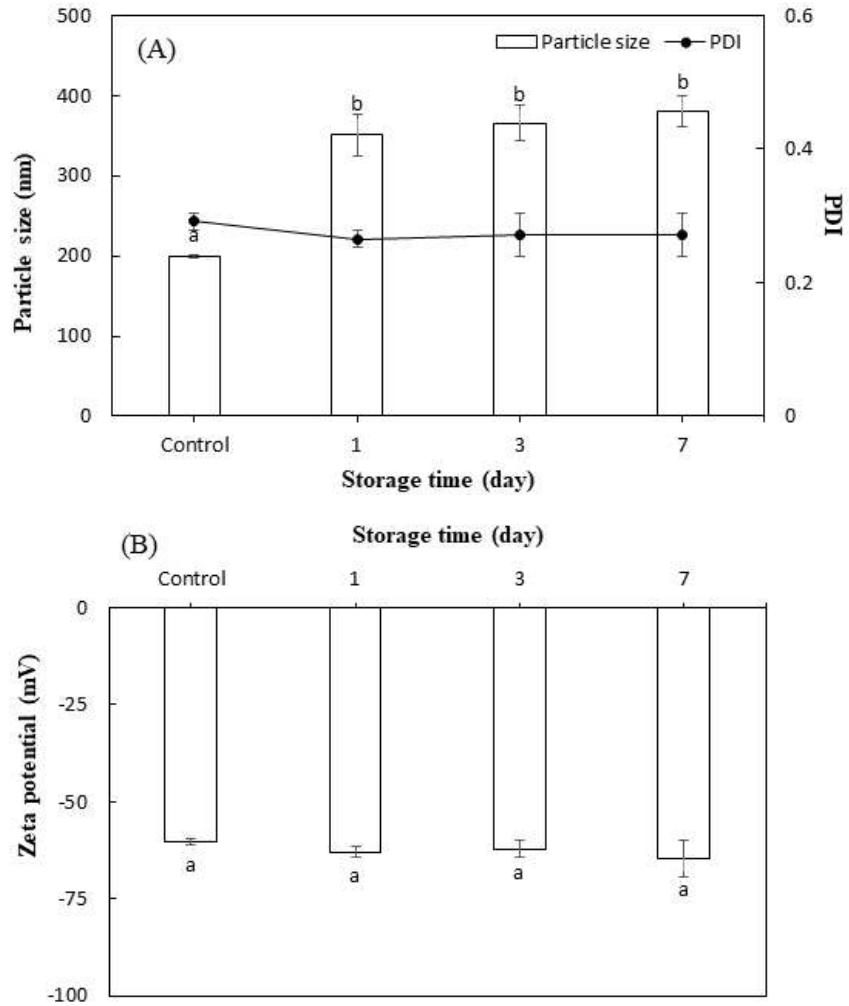


그림 3-2-83. 10% EtOH에 의한 TE-NEP 입자 및 제타 전위 변화

- 10% 에탄올에 첨가된 99% 커큐민과 강황추출물 나노에멀전 분말에 함유된 커큐민의 저장 기간에 따른 커큐민의 함량을 분석한 결과 그림 3-2-84와 같이 순수한 커큐민의 경우 저장 1일 후 79.7%, 3일 후 47.0%, 그리고 7일 후에는 36.2%만이 남아있었다. 하지만 강황추출물 나노에멀전 분말의 경우 저장 7일 후에도 93.6%가 남아 있어 나노에멀전 분말의 경우 에탄올에서도 매우 안정하다는 결론을 얻었다.

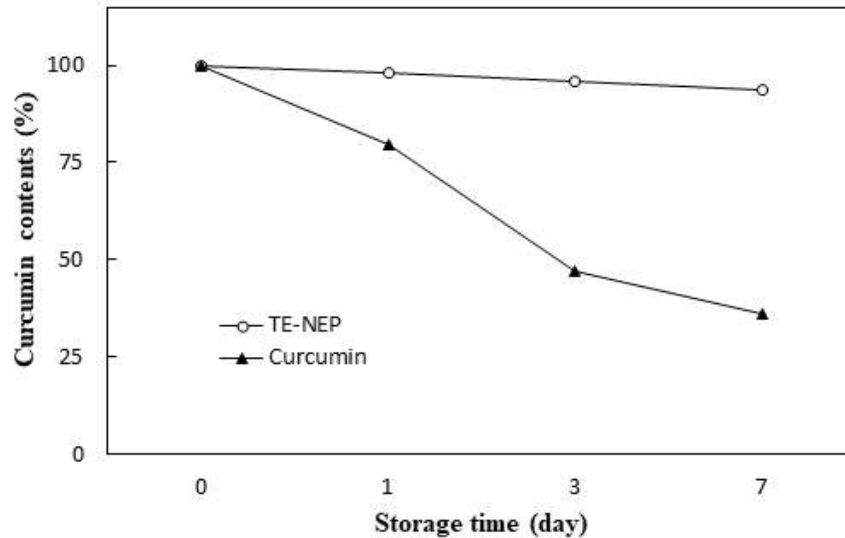


그림 3-2-84. 10% 에탄올에서 99%커큐민과 강황추출물 나노에멀전 분말의 저장 시간에 따른 커큐민의 함량 비교.

(3) 식품에 적용된 강황추출물 나노에멀전의 특성 및 검출

(가) 우유에 함유된 강황추출물 나노에멀전 분말 (건국유업 협업)

- 강황추출물 나노에멀전 분말을 시중에 유통되는 우유에 재분산 시킨 후 저장 기간에 따른 입자크기, PDI, 제타전위를 측정하였고, 커큐민의 함량과 DSC를 이용한 열적 특성 변화를 비교하였다.
- 강황추출물 나노에멀전 분말을 20 mg/mL의 농도로 우유에 혼합하고, 냉장 온도에서 저장 하면서 저장 시간에 따른 입자크기의 변화는 그림 3-2-85A에 나타내었다. 그림에서 보는 것과 같이 대조군(우유)의 입자크기는 277.4 nm였으며, 강황추출물 나노에멀전의 입자크기는 198.7 nm 강황추출물 나노에멀전을 우유에 첨가한 후 1일에서 7일 동안의 저장 후에 입자의 크기는 약 278.2 nm~279.4 nm 사이로 나타나며 우유의 입자크기와 유의적인 차이가 없었다. 이는 첨가한 강황추출물 나노에멀전의 함량에 비해 우유의 함량이 크기 때문으로 판단된다.
- PDI 값은 대조군에서 보다 다소 감소하는 경향은 있었으나 대조군에서도 0.3 이하의 값을 보이고 있어 대체로 균일한 상태를 보이고 있었다.
- 대조군인 우유의 제타전위 값은 -16.3 mV이며, 강황추출물 나노에멀전의 제타전위는 -60.25 mV이었다. 강황추출물 나노에멀전을 우유에 분산시킨 이후 혼합액의 제타전위는 우유의 제타전위와 유사한 -16.3 mV~-19.4 mV사이의 값을 보였다.

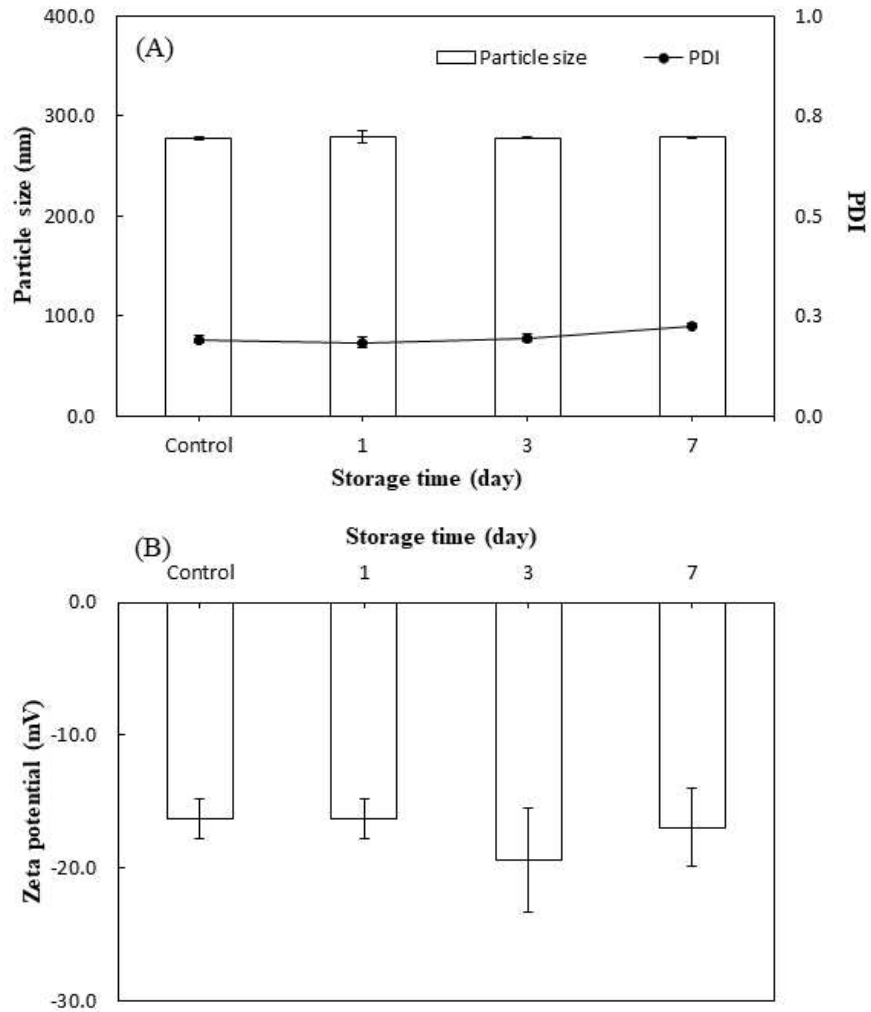


그림 3-2-85. 우유에 분산된 강황추출물 나노에멀전 분말의 저장 기간에 따른 (A)입자크기, PDI 및 (B)제타전위.

- 우유(milk), 강황추출물 나노에멀전(TE-NEP) 및 우유에 재분산시킨 강황추출물 나노에멀전 분말(TE-TEP-M) 시료의 입자 분포도를 그림 3-2-86에 나타내었다. 그림에서 보듯이 우유의 경우 상대적으로 narrow한 피크를 보이나 입자의 평균 크기는 강황추출물 나노에멀전에 비해 다소 큰 경향을 보였다. 하지만 강황추출물 나노에멀전의 경우 broad한 피크를 보이고 있으며, 이를 우유에 재분산 시킨 시료의 경우 중간값의 그래프를 보여 강황추출물 나노에멀전 분말이 우유에 잘 혼합되어 있는 것을 확인 하였다.

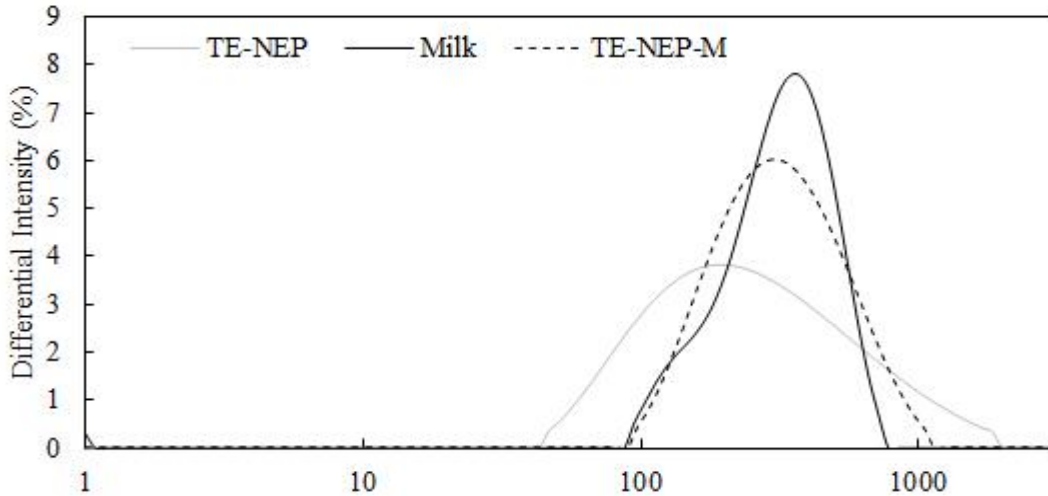


그림 3-2-87. TE-NEP 와 milk 혼합에 따른 입자 분포도 변화

○ DSC 분석을 통해 우유, 강황추출물 나노에멀전 분말 및 혼합한 TE-NEP-M의 열에 대한 안정성을 측정하였다. 그림 3-2-88에서 보는 것과 같이 강황추출물 나노에멀전 분말의 경우 녹는 온도가 162.5°C였고, 우유의 경우 녹는점이 187.5°C를 보였다. 우유에 20 mg/mL의 강황추출물 나노에멀전 분말을 혼합한 혼합액의 경우에는 175°C의 녹는점을 보이면 우유와 강황추출물 나노에멀전 분말이 균일하게 결합되어 있다는 것을 확인할 수 있었다.

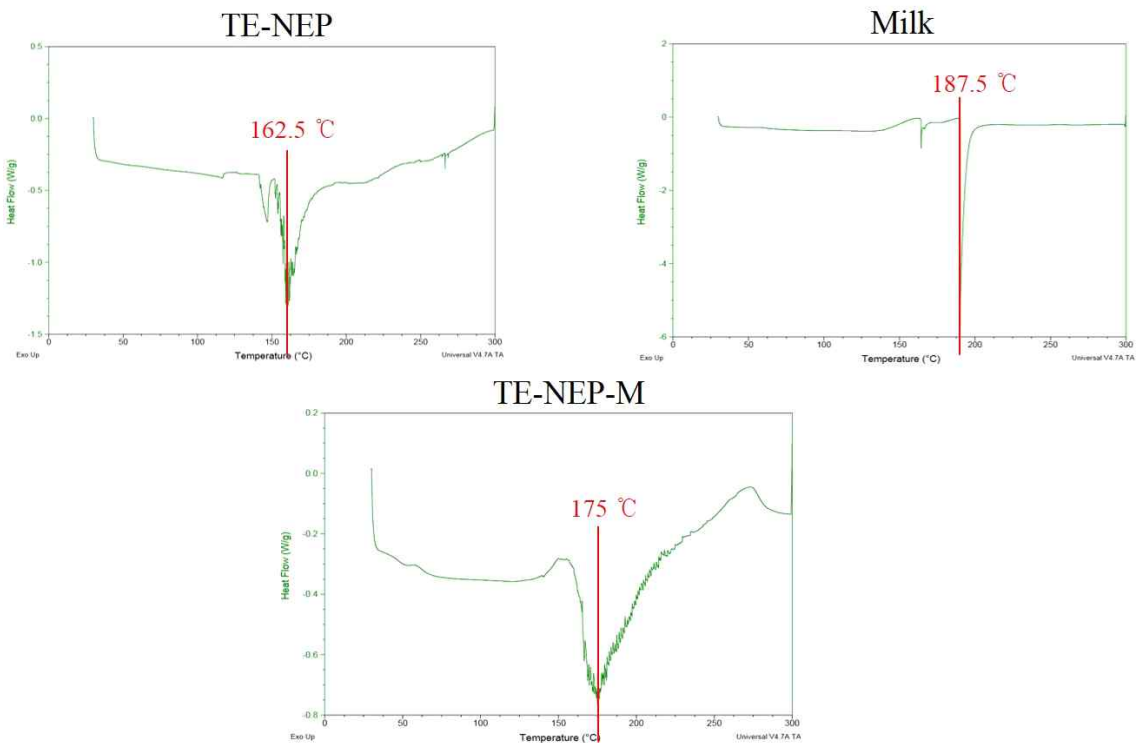


그림 3-2-88. DSC 분석에 의한 TE-NEP와 milk 결합 확인

- 강황추출물 나노에멀전 분말을 우유에 혼합한 후 저장 기간에 따른 커큐민의 함량을 분석하였다. 그림 3-2-89에서 보는 것과 같이 저장 후 5%이내에서 감소하는 경향은 있으나 저장 기간에 따른 유의적이 차이는 없었다.

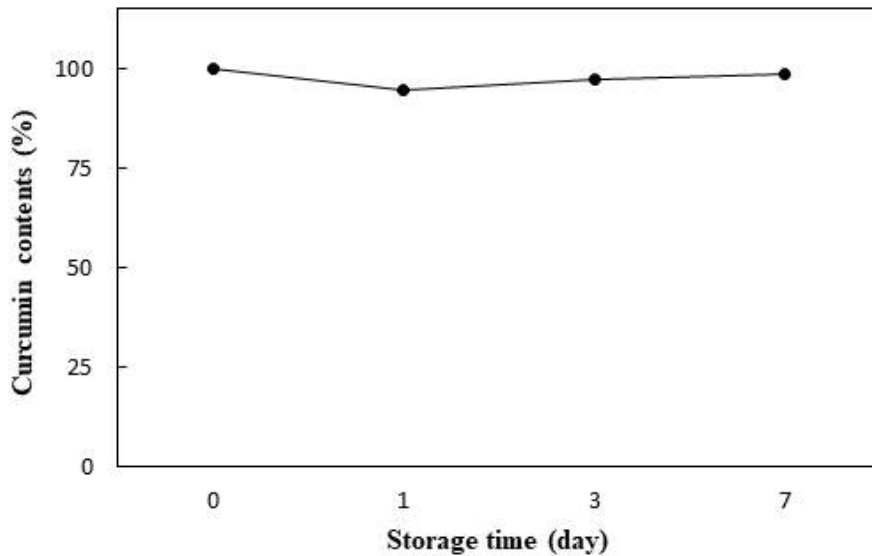


그림 3-2-89. 우유에 혼합한 강황추출물 나노에멀전의 저장 기간에 따른 커큐민의 함량.

- 강황추출물 나노에멀전을 우유에 재분산 시킨 후 각각의 시료와 혼합된 시료의 형태학적인 특징을 관찰하기 위해 Confocal laser scanning microscopy (CLSM)로 분석하였다. CLSM 분석을 위해 시료는 Nile-Red 지시약으로 염색하였다.
- 그림 3-2-90에서 보는 것과 같이 강황추출물 나노에멀전은 미세한 구형의 입자들이 균일하게 분포되어 있으며, 어떠한 aggregation 및 agglomeration 등의 모습은 관찰되지 않았다. 하지만 우유의 경우 우유에 함유된 지방구들이 분포되어 있지만 일부에서는 커다란 마이셀(micelle)형태로 분산되어 있는 것을 확인할 수 있었다.
- 우유에 강황추출물 나노에멀전을 혼합한 혼합액의 경우에도 우유의 지방구와 강황추출물 나노에멀전 입자들이 서로 결합되어 더욱 조밀한 형태를 이루고 있는 모습이 확인되었다.
- 하지만 사용된 confocal 현미경은 배율이 낮기 때문에 미세한 나노입자들을 확대해서 관찰 하는데 한계가 있었다.

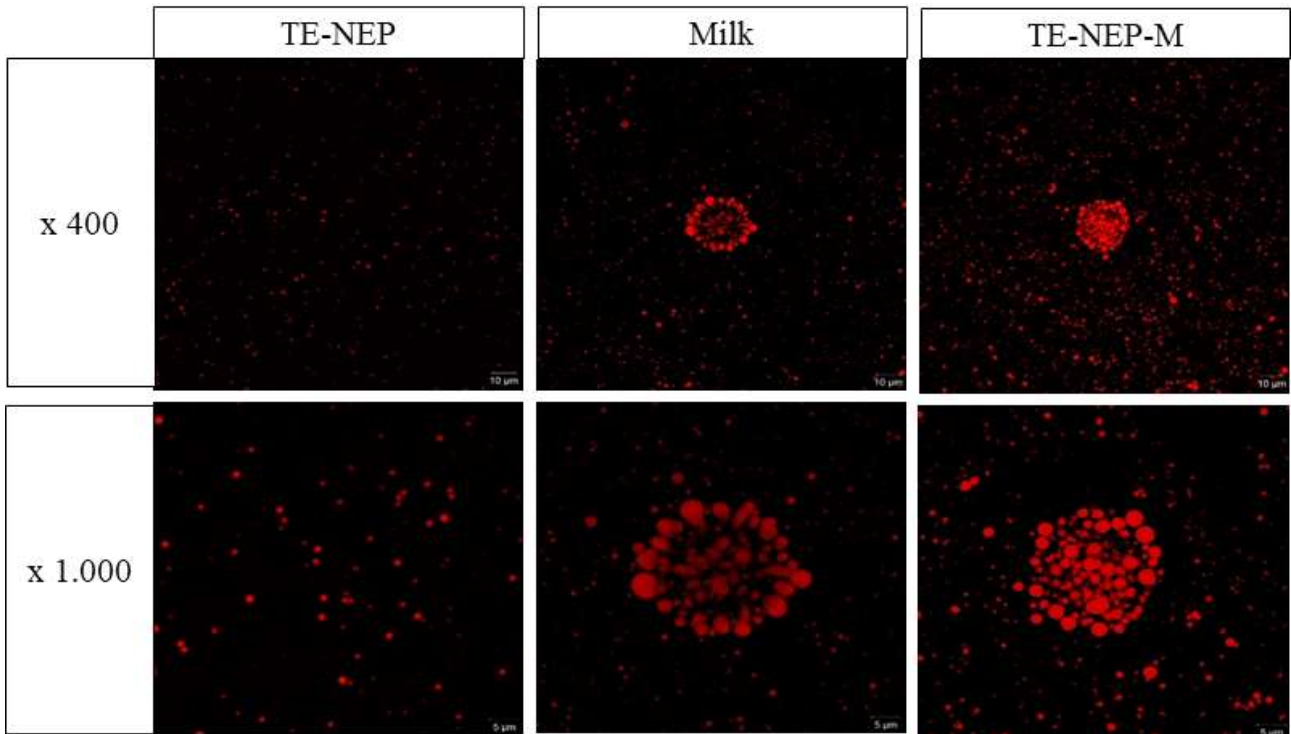


그림 3-2-90. TE-NEP, milk, 및 TE-NEP-M의 confocal images.

(나) 우유에 적용한 강황추출물 나노에멀전의 검출을 위한 분리 및 정제

- 우유에 적용한 TE-NEP의 검출을 위해 원심분리기를 이용하여 10,000 rpm에서 2시간동안 원심분리 한 후 입자크기, PDI 및 제타전위를 측정하였다. 원심분리 후 시료를 크게 3등분으로 나누었다. 상위층을 Top, 중간층을 Middle, 그리고 침전된 부분을 Bottom으로 구분하였다.
- 원심분리 후 상등액, 중간액, 하등액의 입자크기를 측정하였을 때 그림 3-2-91에서 보는 것과 같이 중간액의 입자크기가 122.8 nm로 가장 작았으며 상등액의 입자크기는 471.5 nm로 중간액의 입자크기에 비해 약 4배 큰 입자들이 있었다. 이는 물보다 비중이 낮은 지방구들이 분리되어 떠올라서 나타나는 현상으로 보인다.
- 하등액의 입자크기는 207.9 nm로 강황추출물 나노에멀전의 초기 입자크기인 198.7 nm와 가장 유사한 입자크기를 보여주었다. 또한 제타전위의 결과에서도 상등액의 경우 -58.3 mV의 값을 보이고, 중등액은 -29.9 mV를 보였으며, 하등액의 경우 -65.6 mV로 강황추출물 나노에멀전의 초기 제타전위와 유사한 결과를 보였다.
- PDI 값은 각 층에 따라 약간의 차이는 보이지만 모든 조건에서 0.3 이하의 낮은 수치를 보이고 있어 각 층에 있는 입자들이 균일하게 존재할 것으로 보인다.

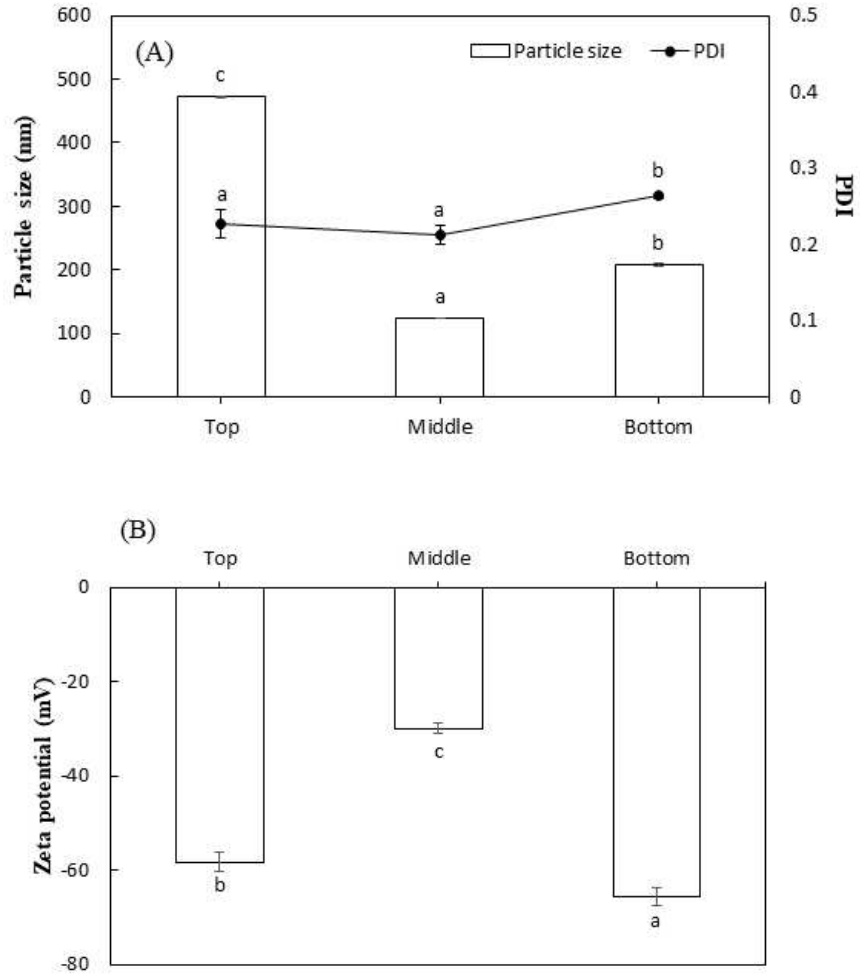


그림 3-2-91. TE-NEP-M의 원심분리 후 상등액, 중등액, 하등액의 (A)입자크기, PDI 및 (B)제타전위.

- 원심분리된 상등액, 중등액, 하등액에 함유된 커큐민의 함량을 분석한 결과를 그림 3-2-92에 나타내었다. 각 층에 함유된 커큐민의 함량은 각각 72.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 52.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 및 160.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 보였으며, 하등액의 경우 전체 커큐민의 약 56%를 차지하고 있어 강황추출물 나노에멀전의 경우 많은 함량이 10,000 rpm으로 2시간 동안 원심분리를 할 경우 침전되어 분리할 수 있음을 알 수 있었다.

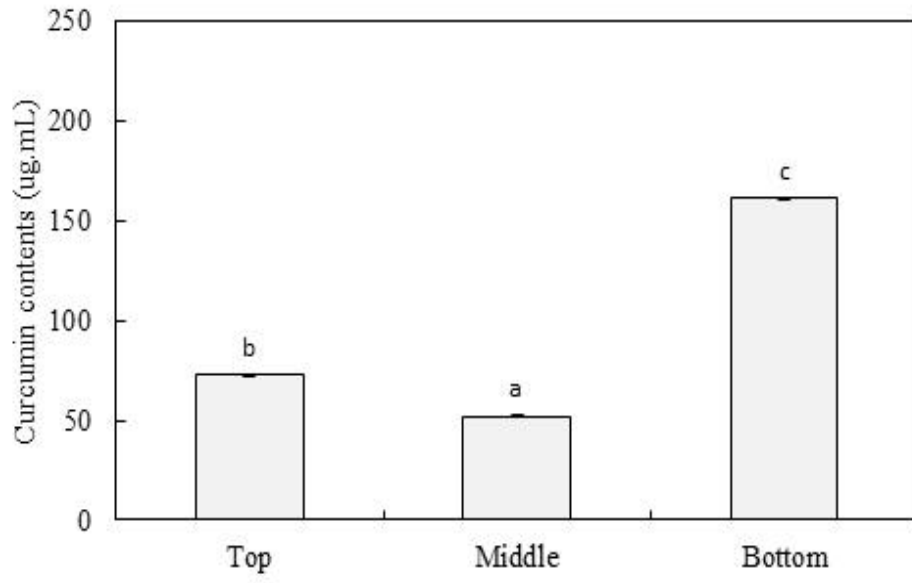


그림 3-2-92. TE-NEP-M을 원심분리 후 상등액, 중등액, 하등액에 함유된 커큐민 함량.

개발된 나노소재 및 제품의 세포독성·체내안정성 평가 및 생리활성 효능 규명

주관기관 : 건국대학교

2세부 책임자 배호재

3절 개발된 나노소재 및 제품의 세포독성·체내안정성 평가 및 생리활성 효능

1. 개발된 나노소재와 제품의 세포 독성 및 체내 안정성 평가

가. 콜라겐 펩타이드 및 커큐민 소재의 독성 평가

(1) 콜라겐 펩타이드(추출물)

(가) 세포주 대상으로 콜라겐 펩타이드 (추출물)의 독성 평가

○ 다양한 조직유래 세포주 HepG2 Hepatocyte, NIH3T3 Fibroblast, H9C2 Cardiomyoblast 를 대상으로 콜라겐 펩타이드 추출물의 세포독성을 검증하기 위해, 콜라겐 추출물을 농도별로 처리하여 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) assay, Lactate dehydrogenase (LDH) assay 및 Live/Dead assay 를 수행한 결과, 모든 처리농도 조건(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 콜라겐 펩타이드 추출물(Collagen extract)와 상용화된 콜라겐 펩타이드(Naticol)를 처리한 세포주의 생존률 (survival rate)이 대조군 (control)과 유사하게 관찰되어 세포 독성을 나타내지 않았다. (그림 3-3-1, 3-3-2)

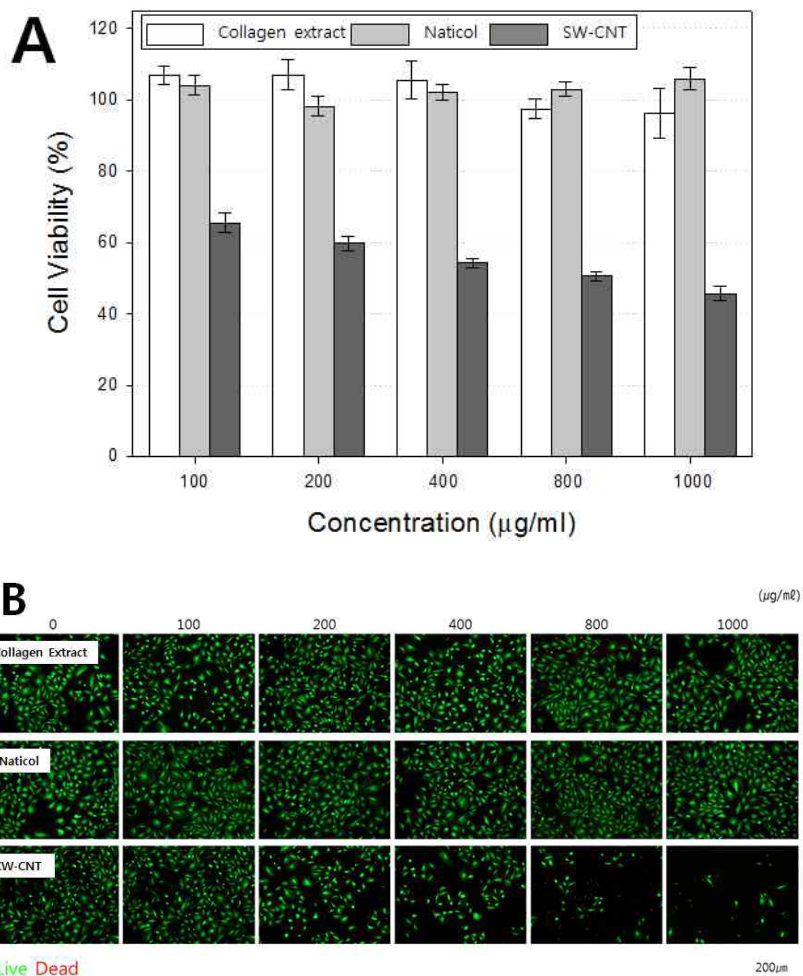


그림 3-3-1. H9C2 Cardiomyoblast에서 콜라겐 펩타이드 추출물의 세포독성 검증 (A: MTT Assay결과 B: Live/Dead결과)

○ 반면 잠재적 독성의심 나노물질 (SW-CNT)를 처리한 세포주의 생존률은 급격히 감소하여 HepG2 Hepatocyte, NIH3T3 Fibroblast, H9C2 Cardiomyoblast 에 세포독성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한, H9C2 Cardiomyoblast 세포주에 대한 Live/Dead 독성 평가 결과 콜라겐 펩타이드 추출물 (Collagen extract)과 상용화된 콜라겐 펩타이드 (Naticol)를 농도 별로 처리하였을 때 모든 처리농도에서 세포독성을 보이지 않았으며 잠재적 독성의심 나노물질 (SW-CNT)만이 세포 독성을 보였으므로 앞서 MTT assay에서 평가된 H9C2 Cardiomyoblast 세포주의 세포 생존률 결과와 일치하였다. (그림 3-3-1 B).

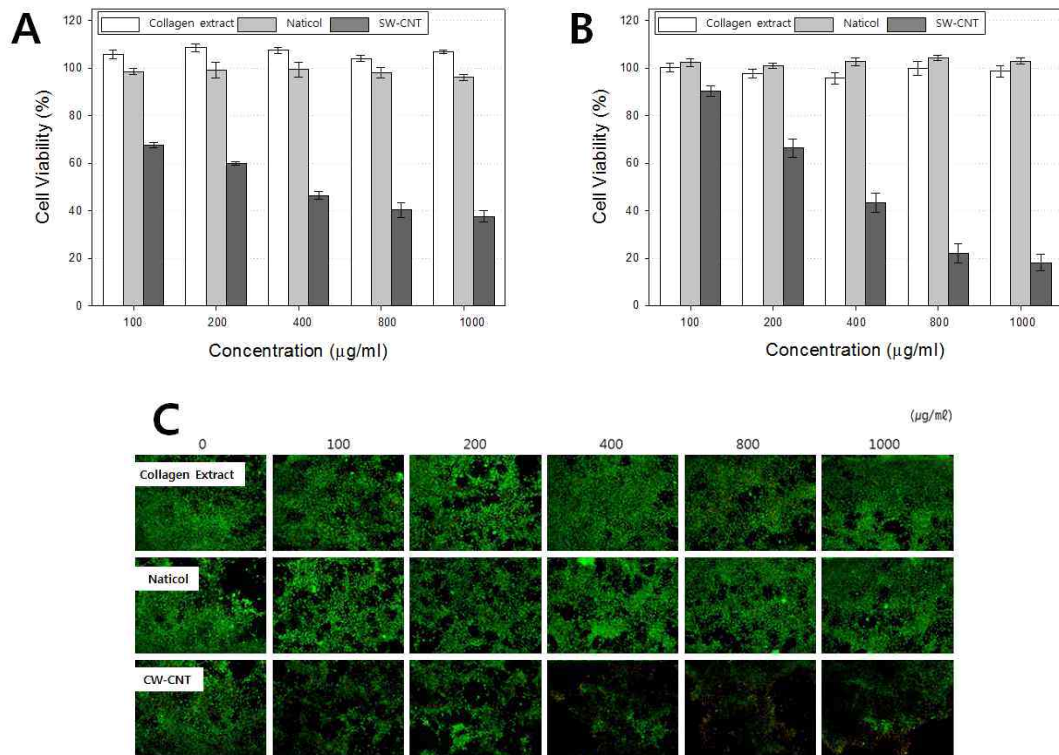


그림 3-3-2. NIH3T3 Fibroblast에서 콜라겐 펩타이드 추출물의 세포독성 검증 (A: MTT Assay결과 B: LDH Assay결과 C: Live/Dead결과)

○ 세포주 HepG2 Hepatocyte를 대상으로 한 콜라겐 펩타이드 추출물의 세포독성 시험에서 같은 방법으로 세포 독성을 평가하였다. 세포주 HepG2 Hepatocyte 대상으로 독성 시험 결과, 콜라겐 펩타이드 추출물의 경우 H9C2 Cardiomyoblast, NIT3T3 Fibroblast와 유사한 cell viability 결과를 보였다. 즉, 모든 처리농도 조건(100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL, 1000 µg/mL)에서 콜라겐 펩타이드 추출물(Collagen extract)와 상용화된 콜라겐 펩타이드 (Naticol)는 세포독성을 나타내지 않았으며 반면에 잠재적 독성의심 나노물질 (SW-CNT)를 처리한 세포주의 생존률은 MTT assay 결과 세포독성을 나타내는 것을 확인하였으나 LDH assay 분석 결과에서는 모든 처리 농도(100 µg/mL - 1000 µg/mL)에서 80% 이상의 cell viability를 보였다. (그림 3-3-3).

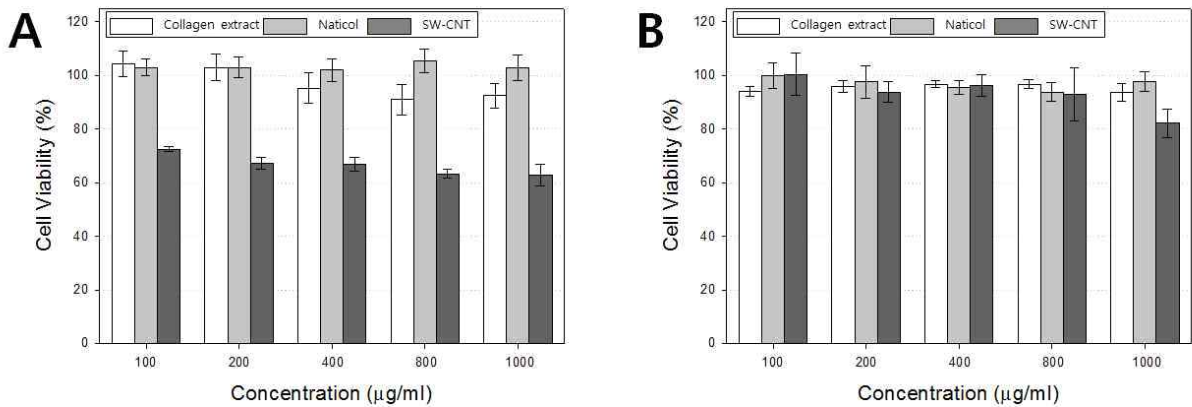


그림 3-3-3. HepG2 Hepatocyte에서 콜라겐 펩타이드 추출물의 세포독성 검증 (A: MTT Assay결과 B: LDH Assay결과)

(나) 일차 배양 세포를 대상으로 콜라겐 펩타이드 (추출물)의 독성 평가

○ 일차 배양 세포 (Primary Cardiac Stem Cell) 대상으로 콜라겐 펩타이드 추출물의 세포독성을 검증하기 위하여 콜라겐 추출물을 농도별로 처리하여 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) assay를 수행한 결과, 콜라겐 펩타이드 추출물 처리 농도 조건(100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL, 1000 µg/mL)에서 콜라겐 펩타이드 추출물(Collagen extract)을 처리한 세포주의 생존률 (survival rate)은 대조군(control)의 80% 이상 수준으로, 콜라겐 추출물을 처리하지 않은 cell의 생존률과 유사하게 관찰되어 세포독성을 보이지 않았지만 처리 농도 1000 µg/mL 이상에서 Primary Cardiac Stem Cell의 viability가 감소 하는 것으로 확인되었다. 한편, 상용화된 콜라겐 펩타이드(Naticol)와 잠재적 독성의심 나노물질(SW-CNT)를 처리한 세포주의 생존률은 모든 처리 농도 조건(100 µg/mL - 1000 µg/mL)에서 낮은 cell viability 수치를 보여 Naticol과 SW-CNT는 모든 처리 농도 조건(100 µg/mL . 1000 µg/mL)에서 콜라겐 추출물과 비교하여 더 낮은 viability을 보였다. (그림 3-3-4).

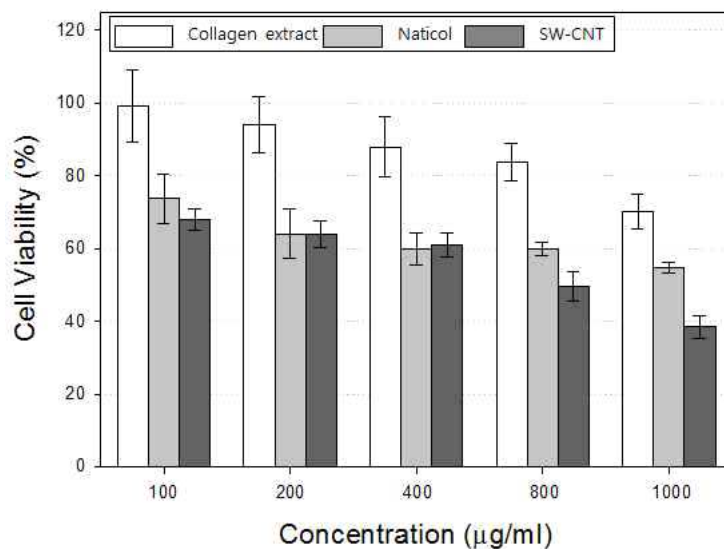


그림 3-3-4. Primary Cardiac Stem Cell에서 콜라겐 펩타이드 추출물의 세포독성 검증

(2) 커큐민 에멀전

(가) 세포주 대상으로 커큐민 에멀전의 독성 평가

- 다양한 조직유래 세포주 (HepG2 Hepatocyte, NIH3T3 Fibroblast, H9C2 Cardiomyoblast) 대상으로 커큐민 에멀전의 세포독성을 검증하기 위해 커큐민 에멀전 (Curcumin), 강황추출물 (Turmeric) 및 잠재적 독성의심 나노물질 (SW-CNT)을 농도별로 처리하여 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) assay, Lactate dehydrogenase (LDH) Assay 및 Live/Dead Assay 를 수행하였다.

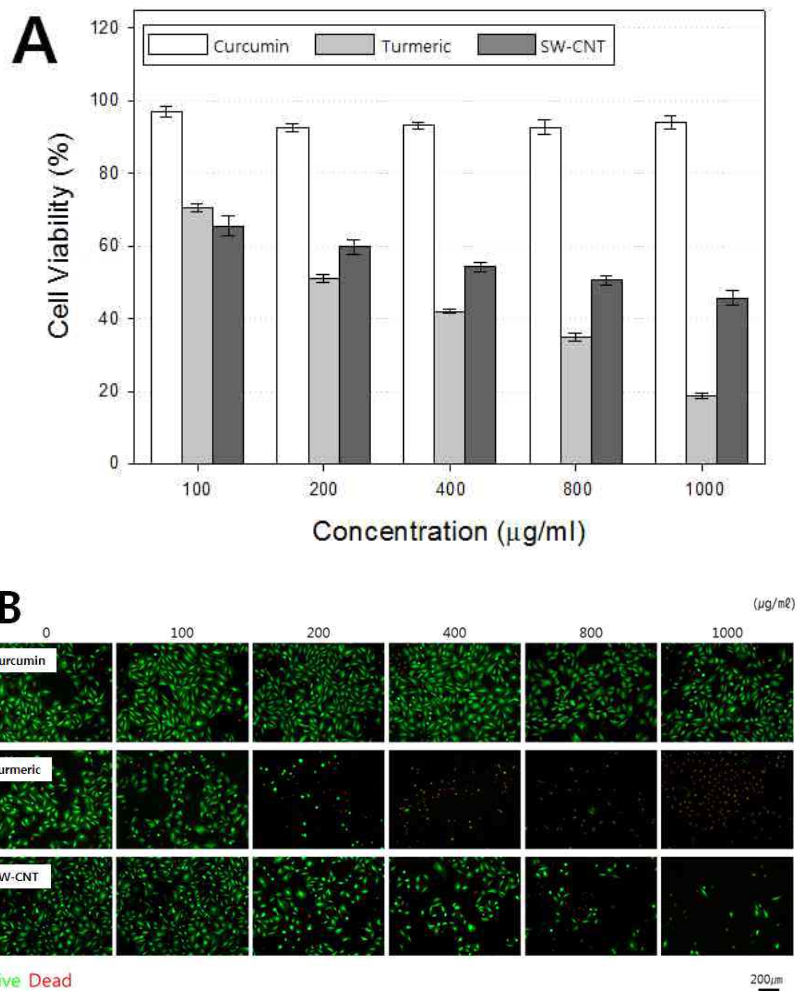


그림 3-3-5. H9C2 Cardiomyoblast에서 커큐민 에멀전의 세포독성 검증 (A: MTT Assay결과 B: Live/Dead결과)

- 세포주에 대한 커큐민 에멀전의 독성평가 검증 결과 모든 처리농도 조건(100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL, 1000 µg/mL)에서 커큐민 에멀전(Curcumin) 을 처리한 세포주의 생존률 (survival rate)이 대조군 (control)의 생존률의 95% 이상 수준으로 관찰되어 커큐민 에멀전은 조직유래 세포주인 HepG2 Hepatocyte, NIH3T3 Fibroblast, H9C2 Cardiomyoblast 에 세포독성을 나타내지 않았다. (그림 3-3-5, 6, 7).

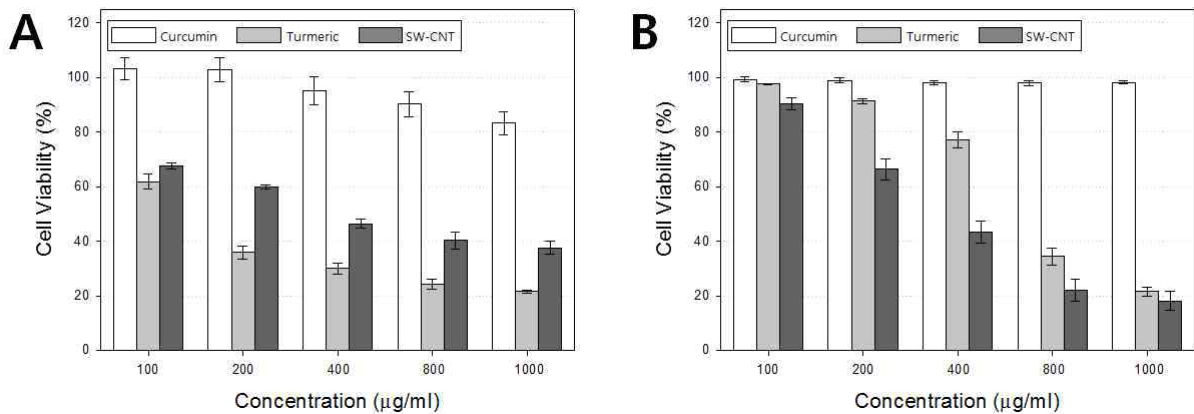


그림 3-3-6. NIH3T3 Fibroblast에서 커큐민 에멀전의 세포독성 검증 (A: MTT Assay결과 B: LDH Assay결과)

- 세포주 HepG2 Hepatocyte, NIH3T3 Fibroblast, H9C2 Cardiomyoblast를 대상으로 한 독성 평가에서 강황 추출물 (Turmeric) 처리 세포의 생존률(%)이 잠재적 독성의심 나노물질 (SW-CNT) 처리 세포의 생존률 보다 낮아 강황 추출물이 더 높은 in vitro 세포독성을 보임을 알 수 있었다. 대조군인 강황 추출물의 커큐민 함량은 42.11mg/g 수준으로, 커큐민 에멀전의 커큐민 함량 (4.33 mg/g) 대비 약 9.7배 높은 수준의 curcumin을 포함하고 있고, 이에 따른 낮은 viability 결과는 커큐민에 의한 세포의 항 성장효과 혹은 사멸현상과 관련하여 설명할 수 있다. 즉, 강황 추출물의 높은 curcumin 함량이 세포 성장을 억제하여 SW-CNT보다 낮은 수준의 cell viability를 보인 것으로 나타났다. 강황 추출물 및 SW-CNT를 처리한 세포주의 생존률은 모두 농도 의존적으로 감소하는 결과를 보였다.
- 따라서, 강황 추출물 및 잠재적 독성의심 나노물질(SW-CNT)는 모든 처리 농도 수준(100 µg/mL, 1000 µg/mL)에서 조직유래 세포주 HepG2 Hepatocyte, NIH3T3 Fibroblast, H9C2 Cardiomyoblast에 세포독성을 나타내는 것을 확인하였다.

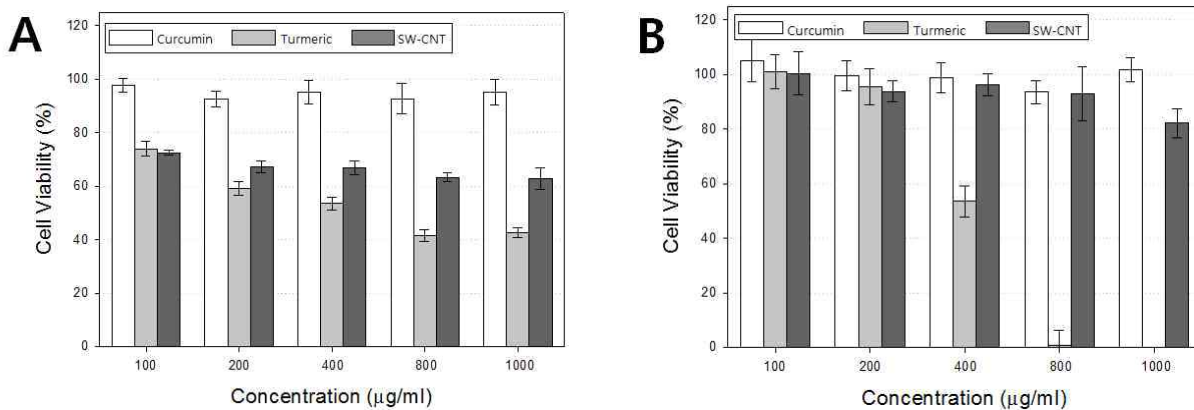


그림 3-3-7. HepG2 Hepatocyte에서 커큐민 에멀전의 세포독성 검증 (A: MTT Assay결과 B: LDH Assay결과)

나. 콜라겐 펩타이드 및 커큐민 소재의 유전독성 평가

(1) 콜라겐 펩타이드(추출물)

(가) 세포주 HepG2 Hepatocyte를 대상으로 콜라겐 펩타이드 (추출물)의 유전독성 평가

- 나노소재에 의한 세포의 DNA손상 영향 정도를 분석하여 개발된 콜라겐 펩타이드 (추출물)의 잠재적 유전독성 여부를 평가하기 위한 방법으로 세포주 HepG2 Hepatocyte를 대상으로 한 유전독성 평가를 진행하였다. Alkaline condition single cell gel electrophoresis (comet assay)를 이용하여 콜라겐 펩타이드 (추출물)이 HepG2 Hepatocyte 세포에 미치는 DNA손상 여부를 측정된 결과, 모든 처리 농도 조건(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 Nuclei comet tail이 관찰되지 않았으므로 콜라겐 펩타이드 추출물은 세포주 HepG2 Hepatocyte에 유전독성을 나타내지 않음을 확인하였다(그림 3-3-8).

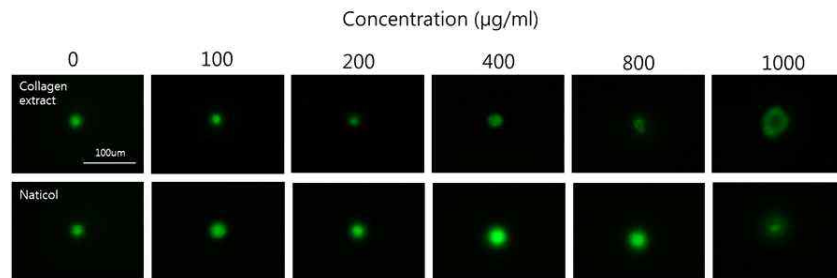


그림 3-3-8. HepG2 Hepatocyte에서 콜라겐 펩타이드 추출물의 유전독성 검증

- 콜라겐 펩타이드 추출물과 동일한 조건으로 상용화된 콜라겐 펩타이드 (Naticol)에 의한 HepG2 Hepatocyte의 DNA 손상 여부도 함께 분석하였다. Single cell gel electrophoresis (comet assay)를 이용, 세포 DNA에 미치는 유전독성 평가를 위해 vista green DNA dye에 의해 염색된 Nuclei의 형상을 관찰한 결과 세포의 DNA 손상으로 인한 Nuclei의 comet tail이 관찰되지 않았다. 따라서, 콜라겐 펩타이드 (추출물), 상용화된 콜라겐 펩타이드(Naticol)가 모든 처리 농도 수준(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 조직유래 세포주 HepG2 Hepatocyte의 DNA손상에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

(2) 커큐민 에멀전

(가) 세포주 HepG2 Hepatocyte를 대상으로 커큐민 에멀전의 유전독성 평가

- 커큐민 에멀전 (Curcumin)의 잠재적 유전독성 여부를 평가하기 위한 방법으로 세포주 HepG2 Hepatocyte를 대상으로 한 유전독성 평가를 진행하였다. 나노소재에 의한 세포의 DNA손상 영향을 분석하는 방법으로 alkaline condition single cell gel electrophoresis (comet assay)을 이용하였다. 다양한 처리 농도 조건을 설정하고 커큐민 에멀전 (Curcumin)이 HepG2 Hepatocyte 세포에 미치는 DNA손상 정도를 분석한 결과, 모든 처리 농도 조건(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 세포주 HepG2 Hepatocyte에 유전독성을 나타내지 않음을 확인하였다(그림 3-8-9).

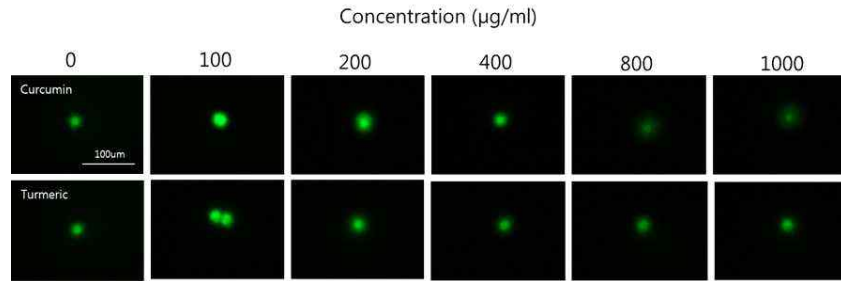


그림 3-3-9. HepG2 Hepatocyte에서 커큐민 에멀전의 유전독성 검증

다. 커큐민 소재 및 유자 추출물의 세포 독성 평가

(1) 커큐민 에멀전

(가) 세포주 대상으로 커큐민 에멀전의 세포 독성 및 유전 독성 평가

○ 조직유래 세포주 NIH3T3 Fibroblast를 대상으로 커큐민 에멀전의 세포독성을 검증하기 위해, 커큐민 에멀전을 농도별 (w/v)로 처리하여 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) assay, Water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) assay를 수행한 결과, MTT assay에서는 0.25 mg/mL 농도 이하의 커큐민 에멀전을 처리한 세포주는 90% 이상의 생존율 (survival rate)을 보였으며 0.5 mg/ml과 1 mg/mL 농도의 커큐민 에멀전을 처리한 세포주의 생존율은 모두 85% 이하로 세포의 독성을 나타내었다. WST-1 assay에서는 모든 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다. 반면에 강황 추출분말 경우, 모든 assay에서 강황추출분말의 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 감소하여, 농도에 따른 세포독성을 나타내었다(그림 3-3-10).

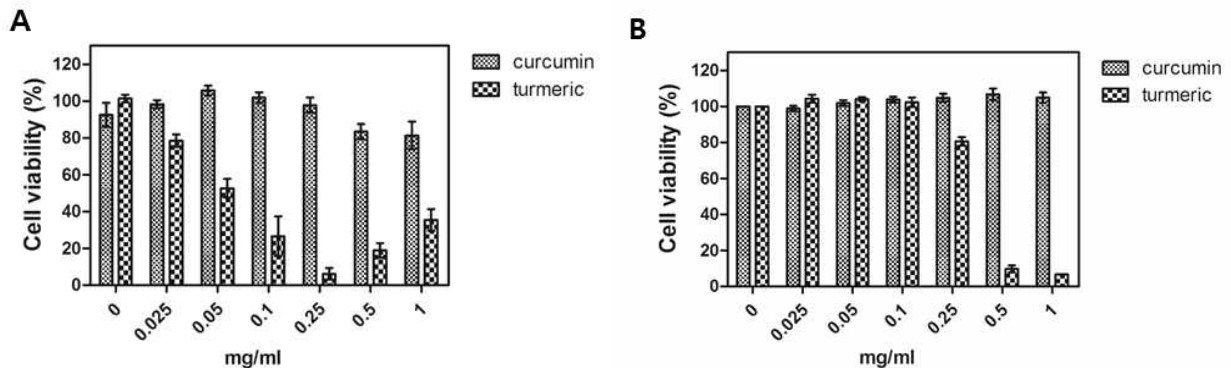


그림 3-3-10. NIH3T3 Fibroblast에서 커큐민 추출물의 세포독성 검증 (A: MTT Assay, B: WST-1 Assay)

○ 또한, NIH3T3 Fibroblast 세포주에 대한 Live/Dead assay를 통해 세포의 독성을 평가한 결과, 커큐민 에멀전을 농도별 (0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL)로 처리하였을 때 5 mg/mL 농도를 제외한 모든 처리농도에서 세포독성을 보이지 않았다. 그러나 강황추출분말을 농도 별로 처리한 경우, 농도가 증가함에 따라 세포의 사멸 정도가 증가하여 부착세포인 NIH3T3의 수가 현저히 줄어드는 것을 보였으며 (그림 3-3-11), 이 같은 결과는 위 그림 3-3-1과 동일한 양상을 나타내고 있다.

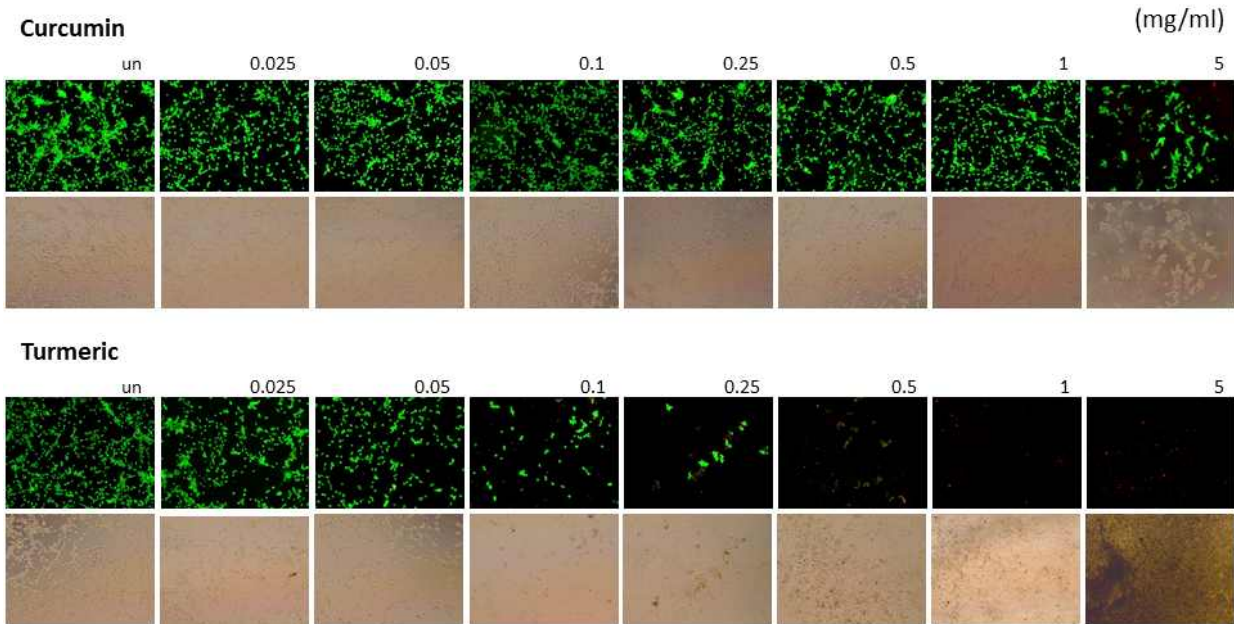


그림 3-3-11. NIH3T3 Fibroblast에서 커큐민 추출물의 세포독성 검증 (Live/Dead Assay)

- 대조군인 강황 추출물의 커큐민 함량은 50.04 ug/mg 수준으로, 커큐민 에멀전의 커큐민 함량 (3.3 ug/mg) 대비 약 15배 높은 수준의 curcumin을 포함하고 있고, 이에 따른 낮은 viability 결과는 커큐민에 의한 세포의 항 성장효과 혹은 사멸현상과 관련하여 설명할 수 있다.

(나) 일차 배양 세포를 대상으로 커큐민 에멀전의 세포 독성 평가

- 사람 유래 일차 배양 세포 (Primary ardiac Stem Cell, Endothelial progenitor Cell)를 대상으로 진행된 커큐민 에멀전의 세포 독성을 검증하기 위하여 커큐민 에멀전을 농도별 (0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL)로 처리하여 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) assay 및 Water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) assay를 수행하였다.
- Human cardiac stem cell을 대상으로 MTT assay를 실시한 결과, 커큐민 에멀전을 처리한 모든 조건에서 세포의 생존율이 85% 이상으로 세포 독성을 나타내지 않았으며, 비교군으로 사용된 강황추출분말을 처리한 세포에서는 처리 농도에 따라 세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였다 (그림 9-3A). WST-1 assay (Ez-cytox kit)를 실시한 cardiac stem cell의 경우에는 커큐민 에멀전의 0.1 mg/ml 농도까지 세포 독성을 나타내지 않았으나, 0.25 mg/ml 이상의 농도에서는 일차 배양세포 human cardiac stem cell의 생존율이 85% 이하로 세포 독성을 보였다 (그림 3-3-12B).

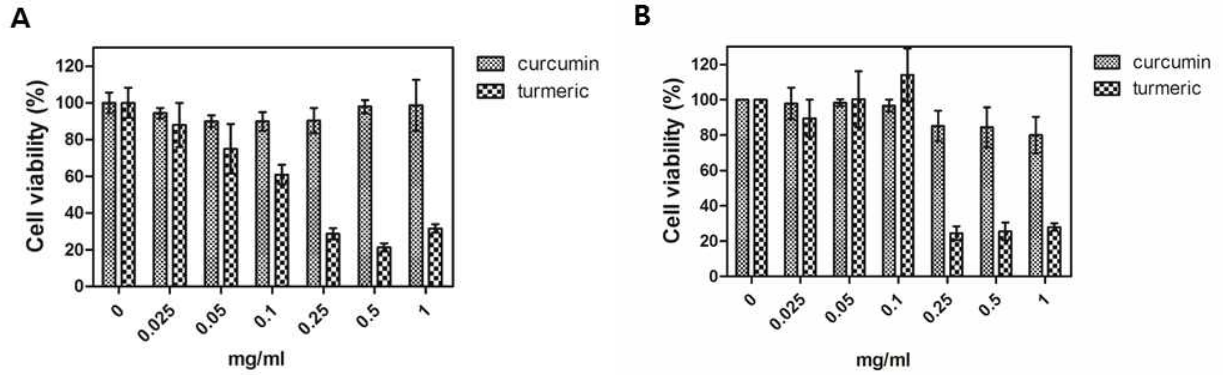


그림 3-3-12. 일차 배양세포, Human cardiac stem cell에서 커큐민 에멀전의 세포독성 검증 (A: MTT assay, B: WST-1 assay)

○ Human endothelial progenitor cells을 대상으로 MTT assay를 실시한 결과, 커큐민 에멀전을 처리한 모든 조건에서 세포의 생존율이 85% 이상으로 세포 독성을 나타내지 않았으며, 비교군으로 사용된 강황추출분말을 처리한 세포에서는 0.25 mg/ml 농도에서부터 세포의 생존율이 감소하여 세포 독성을 나타내었다 (그림 3-3-13A). WST-1 assay를 실시한 결과, MTT assay와 동일하게 커큐민 에멀전을 처리한 모든 조건에서 세포의 생존율이 85% 이상으로 세포 독성을 보이지 않았으며, 강황추출분말의 경우에도 0.25 mg/ml 이상의 농도에서 세포의 생존율이 85% 이하로 세포 독성을 나타내었다 (그림 3-3-13B).

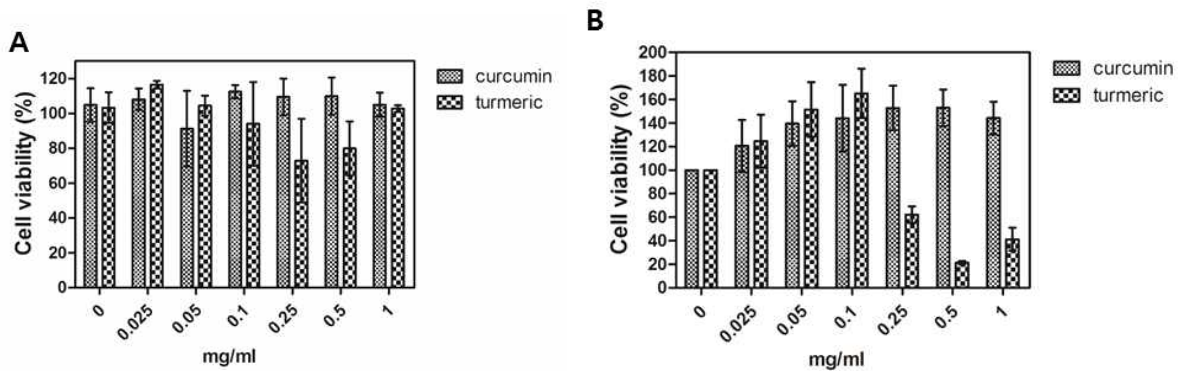


그림 3-3-13. 일차 배양세포, Human endothelial progenitor cells에서 커큐민 에멀전의 세포독성 검증 (A: MTT assay, B: WST-1 assay)

○ 대조군인 강황 추출물의 커큐민 함량은 50.04 ug/mg 수준으로, 커큐민 에멀전의 커큐민 함량 (3.3 ug/mg) 대비 약 15배 높은 수준의 커큐민을 포함하고 있고, 이에 따른 낮은 viability 결과는 커큐민에 의한 세포의 항 성장효과 혹은 사멸현상과 관련하여 설명할 수 있다. 즉, 강황 추출물의 높은 커큐민 함량이 세포 성장을 억제하여 낮은 수준의 cell viability를 보인 것으로 나타났다. 강황 추출물을 처리한 세포주의 생존율은 모두 농도 의존적으로 감소하는 결과를 보였다. 0.5 mg/ml과 1 mg/ml 농도에서 세포의 생존율이 다시 증가하는 것은 강황 추출분말의 노란색 잔여물이 충분히 제거되지 못하고 well에 남아있어 측정에 영향을 미친 것으로, 실제 세포를 육안으로 확인한 결과, 세포의 수가 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다.

(2) 유자 샘플: 유자 고형물, 펩타이드+유자, 리포솜+유자

(가) 세포주 대상으로 유자 샘플의 독성 평가

- 조직유래 세포주 NIH3T3 Fibroblast 대상으로 유자 샘플 (유자 고형물, 펩타이드+유자, 리포솜+유자)의 세포독성을 검증하기 위해 유자 샘플을 원액과 20, 40, 60, 80% (v/v)로 희석하여 NIH3T3 세포에 처리하였으며, MTT assay를 수행하였다. MTT assay를 실시한 후 아무것도 첨가하지 않은 세포와 비교하여 세포 생존율을 계산하였으며, 20% 유자+펩타이드 샘플을 제외하고 모든 조건에서 80% 이하의 세포 생존율을 나타내었다(그림 3-3-14).

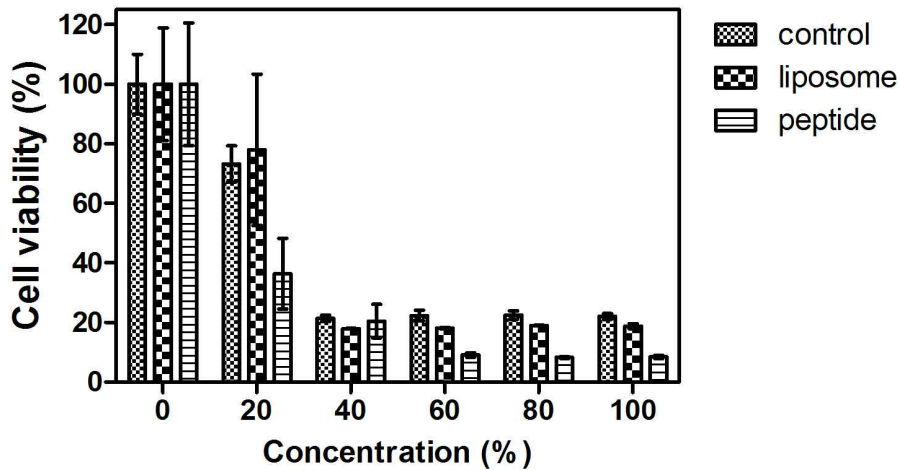


그림 3-3-14. 세포주 NIH3T3 fibroblast에서 유자 샘플의 세포독성 검증 (MTT assay)

(나) 일차 배양 세포 대상으로 유자 샘플의 독성 평가

- 일차 배양 세포 Endothelial progenitor cells (EPC) 대상으로 유자 샘플 (유자 고형물, 펩타이드+유자, 리포솜+유자)의 세포독성을 검증하기 위해 유자 샘플을 원액과 20, 40, 60, 80 % (v/v)로 희석하여 EPC 세포에 처리하였으며, MTT assay, WST-1 assay, Live/Dead assay를 수행하였다. MTT assay, WST-1 결과는 아무것도 첨가하지 않은 세포와 비교하여 세포 생존율을 계산하였으며, 20% 유자+펩타이드 샘플을 제외하고 모든 조건에서 80% 이하의 세포 생존율을 보였다. 유자+펩타이드의 경우에, 20% 농도에서 약 90%의 생존율을 나타내었다.

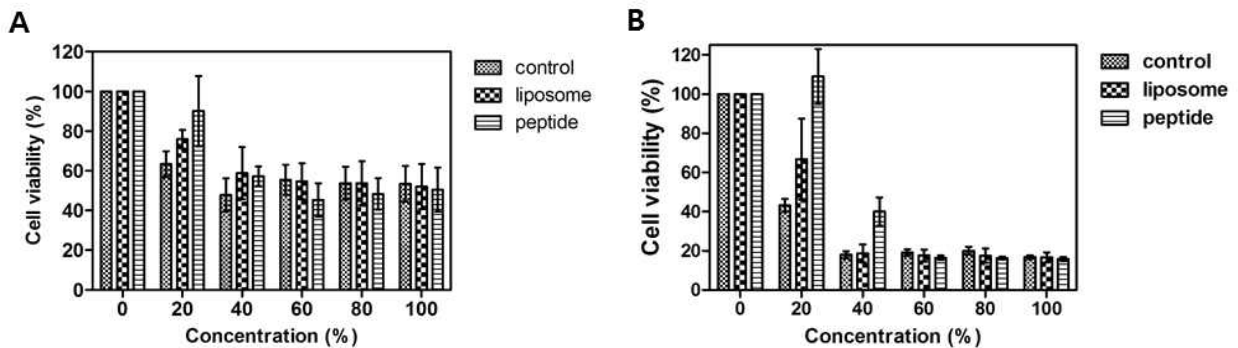


그림 3-3-15. 일차 배양세포, Human endothelial progenitor cells에서 커큐민 에틸렌의 세포독성 검증 (A: MTT assay, B: WST-1 assay)

- 또한, EPC 일차 배양 세포에 대한 Live/Dead assay를 통해 세포의 독성을 평가하였다. 초록색은 Calsein AM 염색 시약을 통해 살아있는 세포를 형광 염색한 결과이며 붉은 색은 Ethidium homodimer-1 in the presence of DNA-1 (EthD-1) 염색 시약을 통해 사멸된 세포를 형광 염색한 결과이다. 유자 고형물, 유자+펩타이드, 유자+리포좀의 3가지 유자 샘플을 농도별(20, 40, 60, 80%)로 처리하였을 때, 유자 고형물 20% 농도를 제외한 모든 처리농도에서 세포독성을 보였다 (그림 3-3-16).

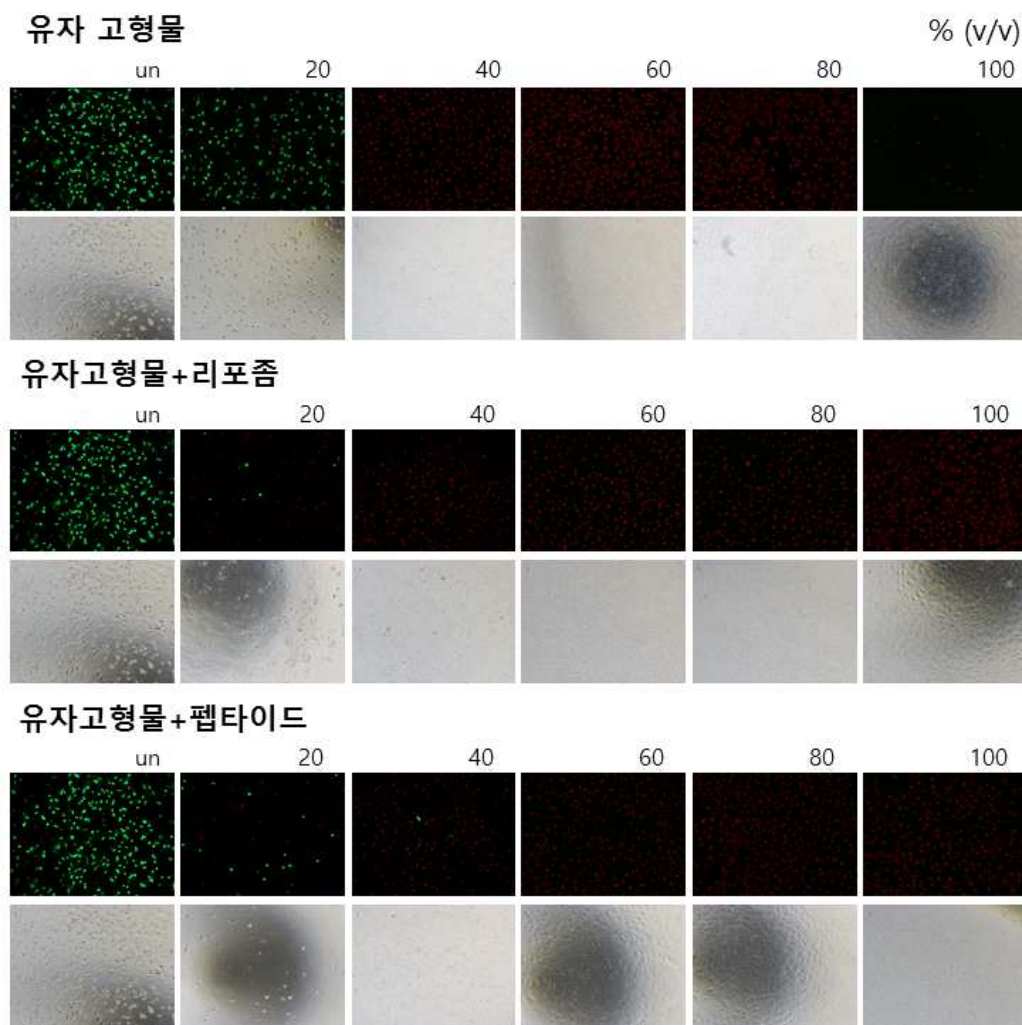


그림 3-3-16. 일차 배양세포, Human endothelial progenitor cells에서 커큐민 추출물의 세포독성 검증 (Live/Dead Assay; 초록색: live cell, 붉은색: dead cell)

- 컨트롤로 사용된 아무것도 첨가하지 않은 유자 고형물에서도 80% 이하의 생존율을 보인 것을 통해, 펩타이드나 리포좀에 의한 세포독성으로 보기는 어렵다. 유자의 경우에는 다양한 세포에 독성을 가진다는 연구 논문이 많이 보고되어 있다. 특히 유자 내 hesperidin 성분은 세포의 apoptosis를 유도하며 naringin 성분 또한 특정 농도 이상에서 세포 독성을 강하게 나타낸다고 한다. 이 같은 특징으로 세 가지 (MTT assay, WST-1 assay, Live/Dead assay) 독성 평가에서 나타난 유자의 세포 독성 효과를 설명할 수 있다.

라. 커큐민 소재 및 유자 추출물의 세포 독성 평가

(1) 커큐민 에멀전

(가) 세포주 대상으로 커큐민 에멀전의 세포 독성 및 유전 독성 평가

○ 조직유래 세포주 NIH3T3 fibroblast, H9C2 cardiomyoblast, HepG2 세포를 대상으로 커큐민 에멀전의 세포독성을 정량적으로 검증하기 위해, 커큐민 에멀전을 농도별 (w/v)로 처리하여 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) assay 및 Lactate dehydrogenase (LDH) assay를 수행하였다. 그 결과, MTT assay에서는 0.1 mg/mL 농도 이하의 커큐민 에멀전을 처리한 세포주는 90% 이상의 생존율 (Cell viability)을 보였으며, 1 mg/ml 농도 이하의 커큐민 에멀전을 처리한 세포주의 생존율 또한 80% 이상의 세포의 생존율을 나타내었다. LDH assay에서는 0.1 mg/mL 농도 이하의 커큐민 에멀전을 처리한 세포주는 10% 이하의 세포독성 (Cytotoxicity)을 보였으며 1 mg/ml 농도 이하의 커큐민 에멀전을 처리한 세포주의 세포독성 또한 20% 이하로 MTT와 LDH 에서 동일한 세포 독성 양상을 입증하였다. 반면에 강황추출분말 경우, MTT assay 및 LDH assay에서 강황추출분말의 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율은 급격히 감소하고, 세포 독성은 급격히 증가함에 따라 농도에 따른 세포독성을 나타내었다(그림 3-3-17, 18).

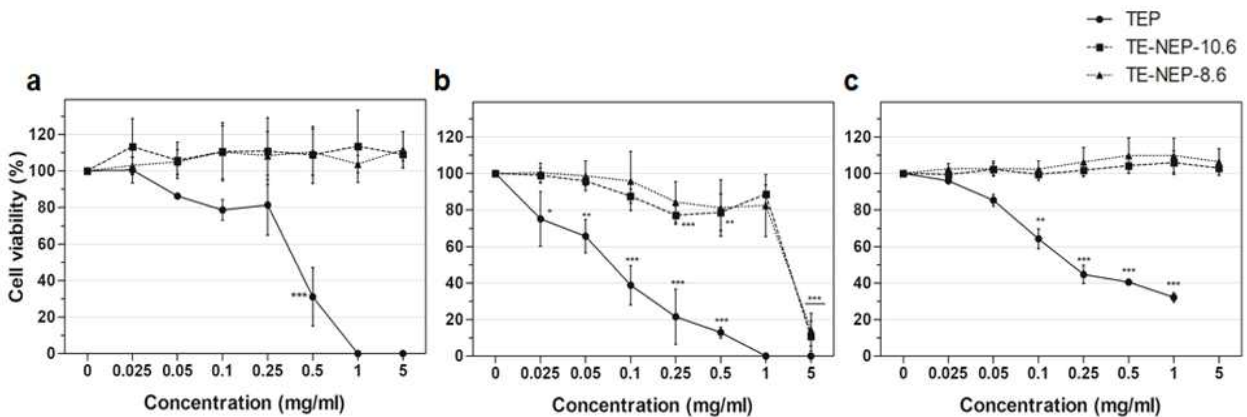


그림 3-3-17. a. NIH3T3 MTT assay, b. H9C2 MTT assay, c. HepG2 MTT assay

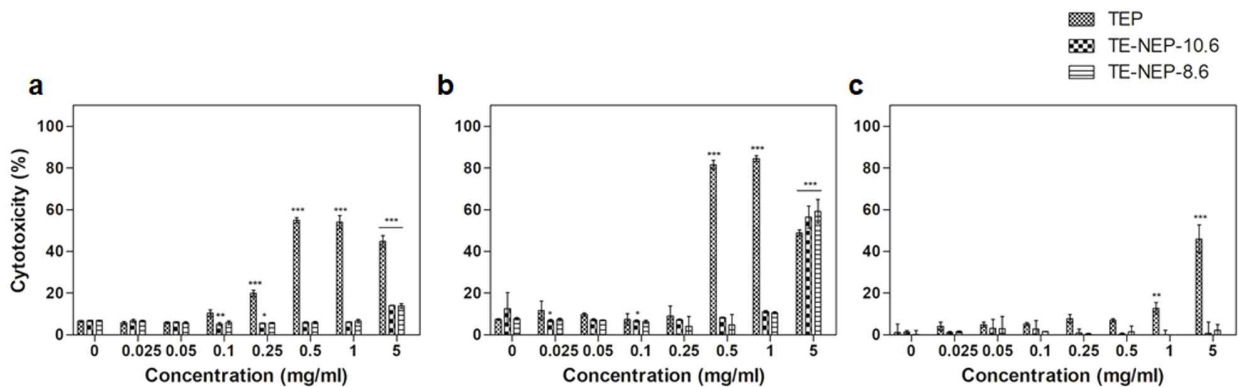


그림 3-3-18. a. NIH3T3 LDH assay, b. H9C2 LDH assay, c. HepG2 LDH assay

○ 또한, 조직유래 세포주 NIH3T3 fibroblast, H9C2 cardiomyoblast, HepG2 세포에 대한 Live/Dead assay를 통해 세포의 독성을 정성적으로 평가한 결과, 각각 커큐민 에멀전을 농도별 (0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL)로 처리하였을 때

5 mg/mL 농도를 제외한 모든 처리농도에서 급격한 세포사멸이 관찰되지 않았다. 그러나 강황추출분말을 농도 별로 처리한 경우, 농도가 증가함에 따라 세포사멸이 증가하고 세포의 부착 정도가 현저히 줄어드는 것을 보였으며 (그림 3-3-19), 이 같은 결과는 MTT assay, LDH assay (그림 3-3-17, 18) 와 동일한 양상을 나타내고 있다.

- 대조군인 강황 추출물의 커큐민 함량은 50.04 ug/mg 수준으로, 커큐민 에멀전의 커큐민 함량 (3.3 ug/mg) 대비 약 15배 높은 수준의 curcumin을 포함하고 있고, 이에 따른 낮은 viability 결과는 커큐민에 의한 세포의 항 성장효과 혹은 사멸현상과 관련하여 설명할 수 있다.

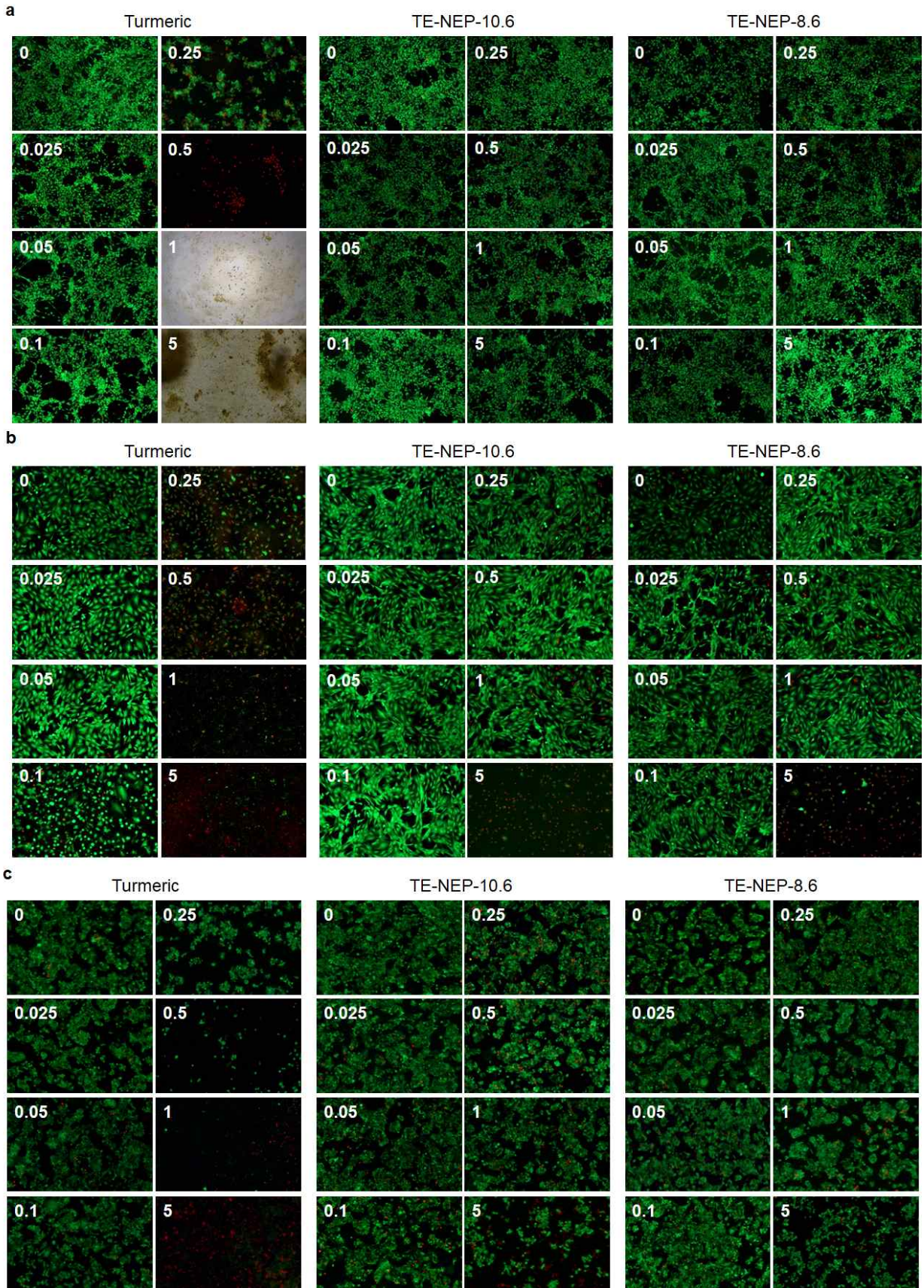


그림 3-3-19. a. NIH3T3 Live/Dead assay, b. H9C2 Live/Dead assay, c. HepG2 Live/Dead assay

(나) 일차 배양 세포를 대상으로 커큐민 에멀전의 세포 독성 및 유전 독성 평가

- 인간 유래 일차 배양 세포 (primary cell line) 를 대상으로 진행된 커큐민 에멀전의 세포 독성을 정량적으로 검증하기 위하여 human Endothelial Progenitor Cell (hEPC) 및 human Cardiac Progenitor Cell (hCPC)에 커큐민 에멀전을 농도별 (0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL)로 처리하여 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) assay 및 Lactate dehydrogenase (LDH) assay를 수행하였다.
- MTT assay를 실시한 결과, 0.1 mg/ml 이하의 커큐민 에멀전을 처리한 세포의 생존율이 90% 이상으로 세포 독성을 나타내지 않았으며, 비교군으로 사용된 강황추출분말을 처리한 세포에서는 0.025 mg/ml 농도에서부터 세포의 생존율이 감소하여 세포 독성을 나타내었다 (그림 3-3-20). LDH assay를 실시한 결과, MTT assay와 유사하게 0.5 mg/ml 이하의 커큐민 에멀전을 처리한 모든 조건에서 세포의 사멸이 10% 이하로 세포 독성을 보이지 않았으며, 강황추출분말의 경우, 0.025 mg/ml 농도에서부터 세포의 사멸이 급격하게 증가하면서 세포 독성을 나타내었다 (그림 3-3-21).
- 대조군인 강황 추출물의 커큐민 함량은 50.04 ug/mg 수준으로, 커큐민 에멀전의 커큐민 함량 (3.3 ug/mg) 대비 약 15배 높은 수준의 커큐민을 포함하고 있고, 이에 따른 낮은 viability 결과는 커큐민에 의한 세포의 항 성장효과 혹은 사멸현상과 관련하여 설명할 수 있다. 즉, 강황 추출물의 높은 커큐민 함량이 세포 성장을 억제하여 낮은 수준의 cell viability를 MTT assay 및 LDH assay 를 통해 정량적으로 확인할 수 있었다.

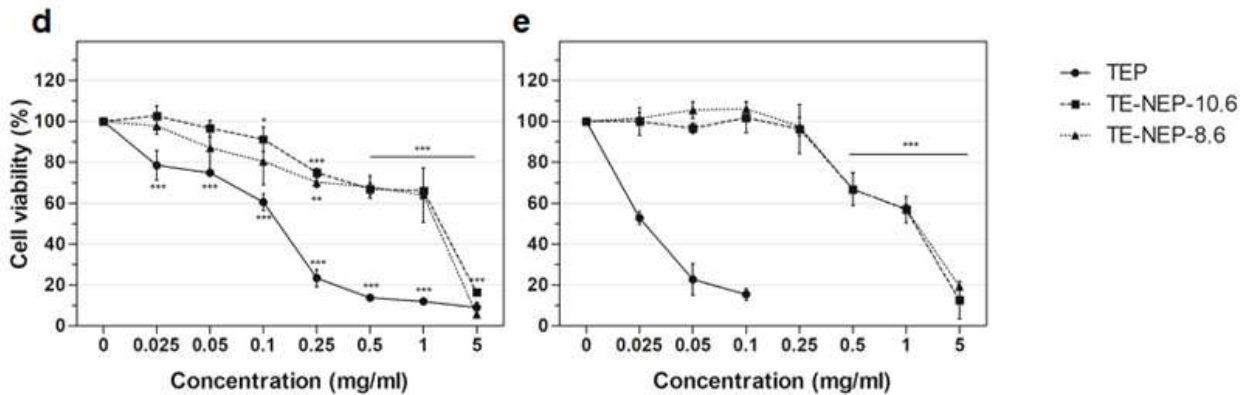


그림 3-3-20. d. hCPC MTT assay, e. hEPC MTT assay

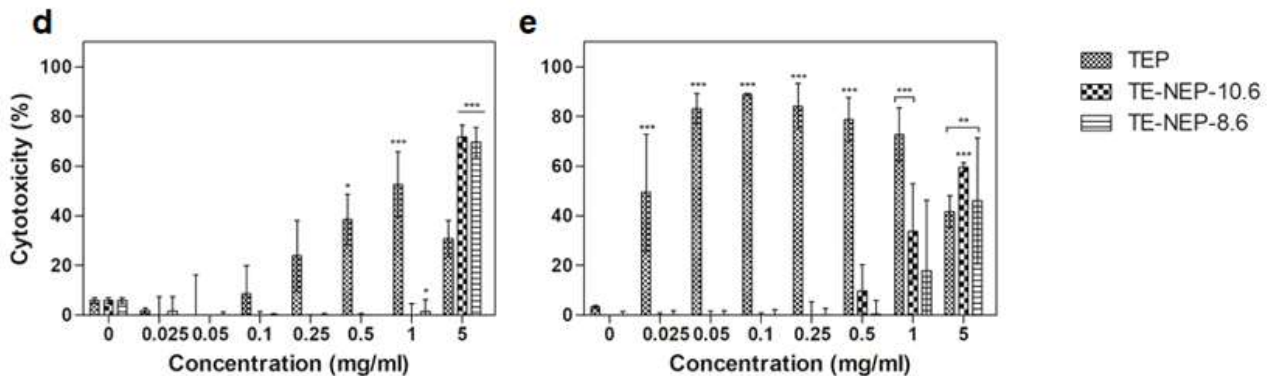


그림 3-3-21. d. hCPC LDH assay, e. hEPC LDH assay

○ 또한, 인간 유래 일차 배양 세포 (primary cell line)의 경우, Live/Dead assay를 통해 세포의 독성을 정성적으로 평가한 결과, 각각 커큐민 에멀전을 농도별 (0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml)로 처리하였을 때, 0.25 mg/ml 농도이하에서는 세포사멸이 관찰되지 않았다. 커큐민 에멀전 0.5 mg/ml 이상의 농도에서는 세포의 부착능력이 다소 감소하는 것을 확인할 수 있다. 그러나 강황추출분말을 농도 별로 처리한 경우, 농도가 증가함에 따라 세포사멸이 증가하고 세포의 부착 정도가 현저히 줄어드는 것을 보였으며 (그림 3-3-22), 이 같은 결과는 MTT assay, LDH assay (그림 3-3-20, 21)와 동일한 양상을 나타내고 있다.

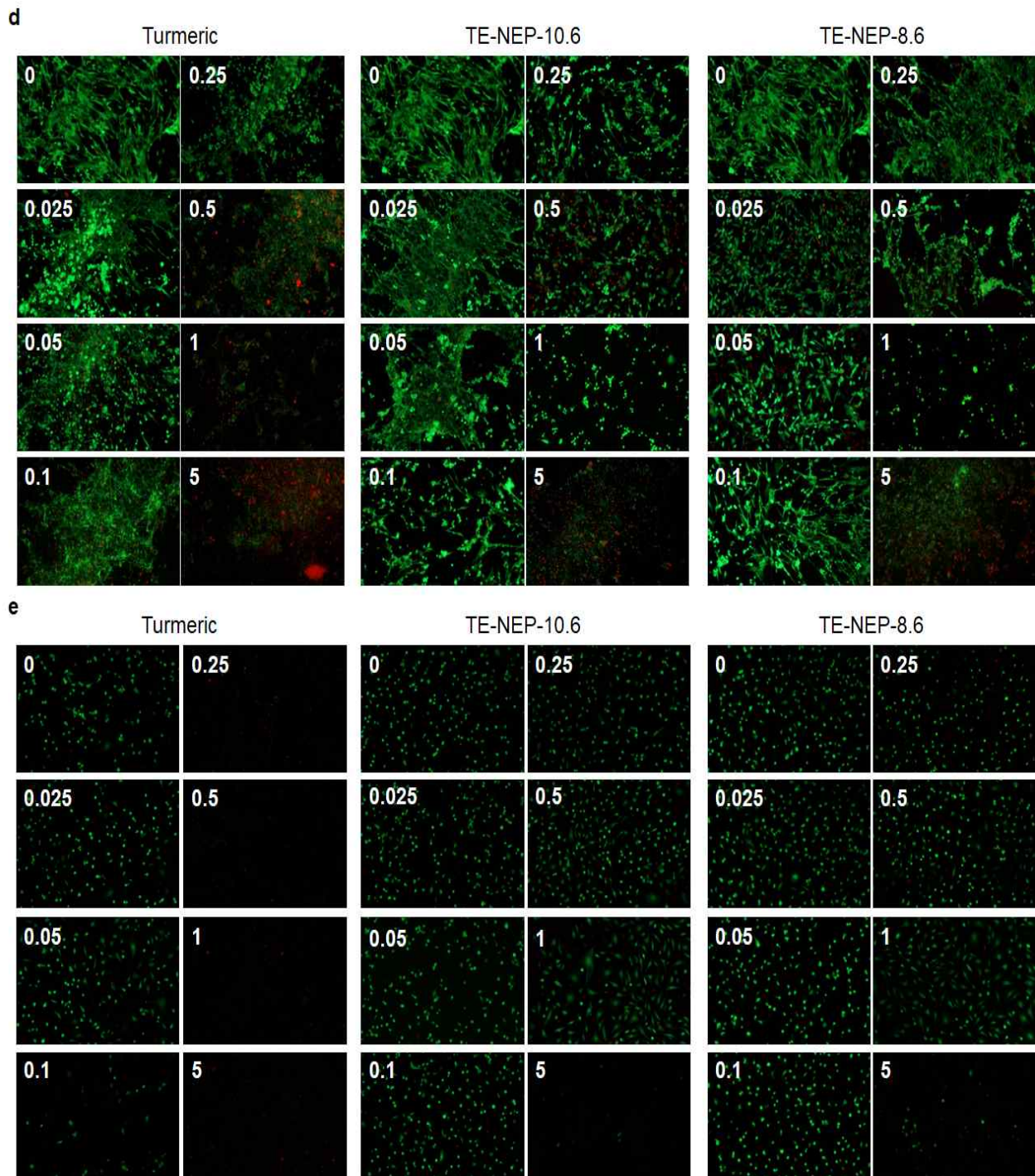


그림 3-3-22. d. hCPC Live/Dead assay, e. hEPC Live/Dead assay

(2) 유자 샘플: 유자 고형물, 펩타이드+유자, 리포솜+유자

(가) 세포주 대상으로 유자 샘플의 독성 평가

○ 조직유래 세포주 NIH3T3 fibroblast, H9C2 cardiomyoblast, HepG2 세포를 대상으로 유자, 유자+펩타이드, 유자+리포솜 샘플의 세포독성을 정량적으로 검증하기 위해, 농도별 (w/v)로 처리하여 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) assay 및 Lactate dehydrogenase (LDH) assay를 수행하였다. 그 결과, MTT assay에서는 0.1 mg/mL 농도 이하의 유자 샘플을 처리한 세포주는 90% 이상의 생존율 (Cell viability)을 보였으며, 1 mg/ml 농도 이하의 유자 샘플을 처리한 세포주의 생존율 또한 80% 이상의 세포의 생존율을 나타내었다. LDH assay에서는 0.1 mg/mL 농도 이하의 유자, 유자+펩타이드, 유자+리포솜 샘플을 처리한 세포주는 10% 이하의 세포독성 (Cytotoxicity)을 보였으며 0.5 mg/ml 농도 이하의 샘플을 처리한 세포주의 세포독성 또한 25% 이하로 MTT와 LDH에서 동일한 세포 독성 양상을 입증하였다. 특히 HepG2 cell 의 경우에는 유자, MTT assay 및 LDH assay의 유자+펩타이드, 유자+리포솜 샘플을 처리한 전농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 확인하였다.

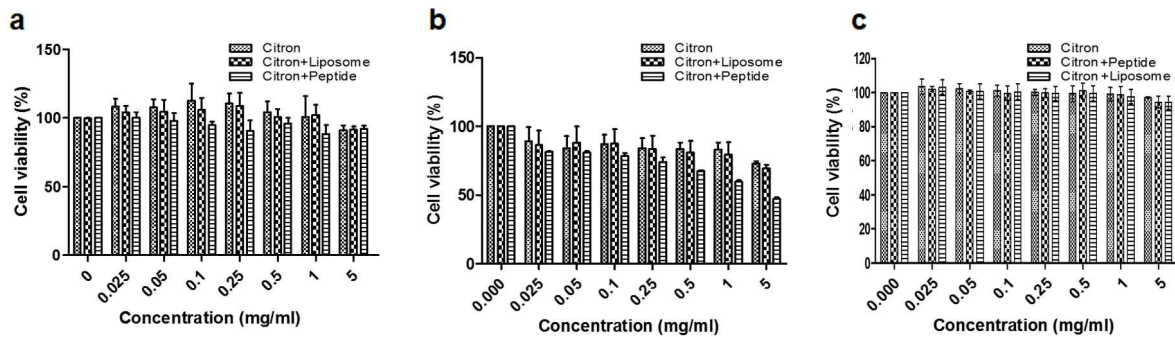


그림 3-3-23 a. NIH3T3 MTT assay, b. H9C2 MTT assay, c. HepG2 MTT assay

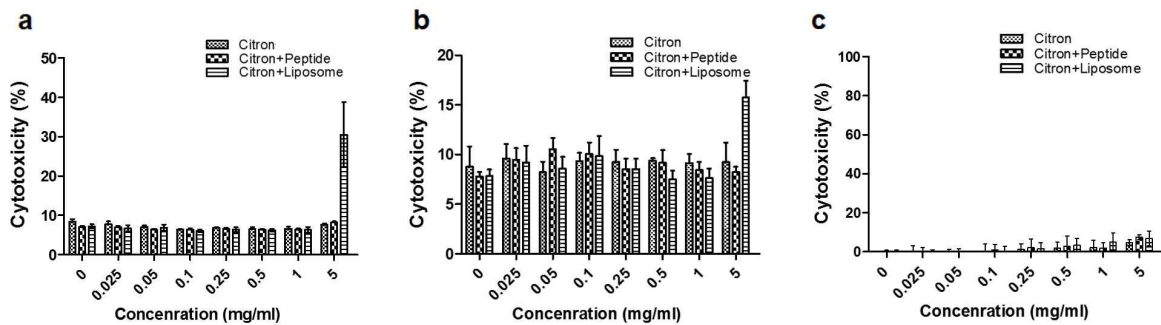


그림 3-3-24. a. NIH3T3 LDH assay, b. H9C2 LDH assay, c. HepG2 LDH assay

○ 또한, 조직유래 세포주 NIH3T3 fibroblast, H9C2 cardiomyoblast, HepG2 세포에 대한 Live/Dead assay를 통해 세포의 독성을 정성적으로 평가한 결과, 각각 유자, 유자+펩타이드, 유자+리포솜 샘플을 농도별 (0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL)로 처리하였을 때, 모든 처리농도에서 급격한 세포사멸이 관찰되지 않았다 (그림 3-3-25). MTT assay, LDH assay (그림 3-3-23, 24)의 전 농도에서 세포 생존율이 90% 이상을 나타냈던 결과와 동일한 양상을 나타내고 있다.

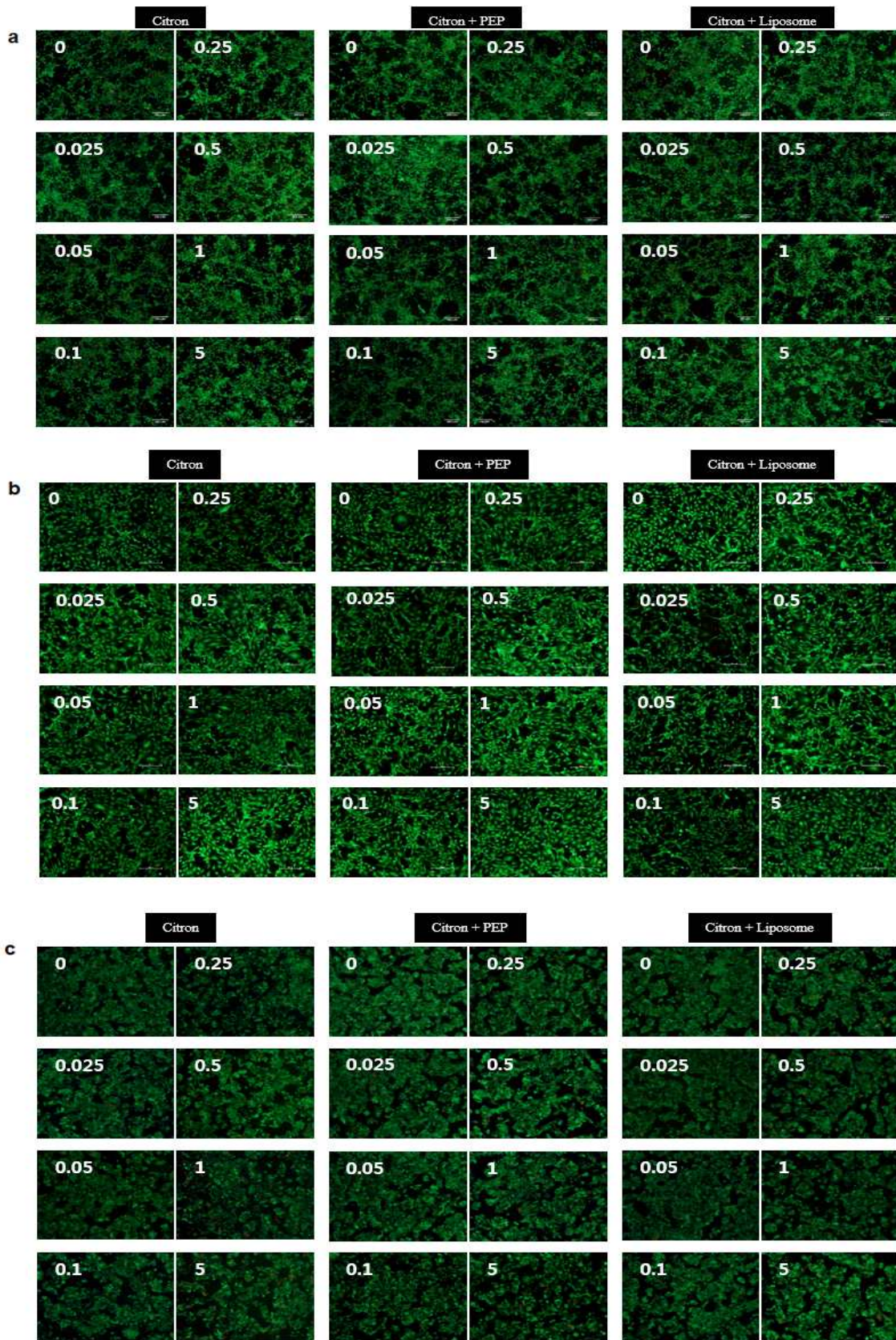


그림 3-3-25. a. NIH3T3 Live/Dead assay, b. H9C2 Live/Dead assay, C. HepG2 Live/Dead assay

(나) 일차 배양 세포를 대상으로 유자 샘플의 세포 독성 및 유전 독성 평가

- 인간 유래 일차 배양 세포 (primary cell line) 를 대상으로 진행된 유자, 유자+펩타이드, 유자+리포솜 샘플의 세포 독성을 정량적으로 검증하기 위하여 human Endothelial Progenitor Cell (hEPC) 및 human Cardiac Progenitor Cell (hCPC)에 커큐민 에멀전을 농도별 (0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL)로 처리하여 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) assay 및 Lactate dehydrogenase (LDH) assay를 수행하였다.
- MTT assay를 실시한 결과, 0.1 mg/ml 이하의 유자, 유자+펩타이드를 처리한 세포의 생존율이 90% 이상으로 세포 독성을 나타내지 않았으며, 유자+리포솜 샘플의 세포 생존율은 80% 이상으로 확인하였다 (그림 3-3-26). 일차 배양 세포의 경우, 모든 샘플군에서 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 점진적으로 감소하는 경향을 나타내었다. LDH assay 결과, MTT assay와 유사하게 0.25 mg/ml 이하의 유자, 유자+펩타이드, 유자+리포솜 샘플을 처리한 모든 조건에서 세포의 사멸이 10% 이하로 세포 독성을 보이지 않았으며, 샘플의 농도가 증가함에 따라 세포 사멸이 증가함으로써 세포 독성을 나타내었다 (그림 3-3-27).

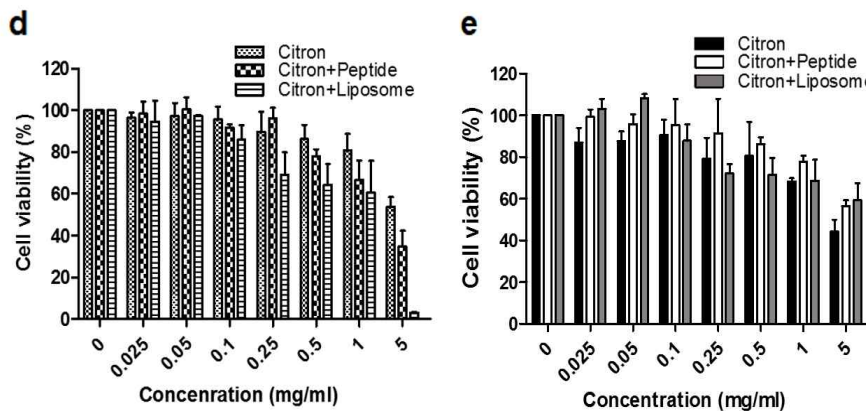


그림 3-3-26. d. hCPC MTT assay, e. hEPC MTT assay

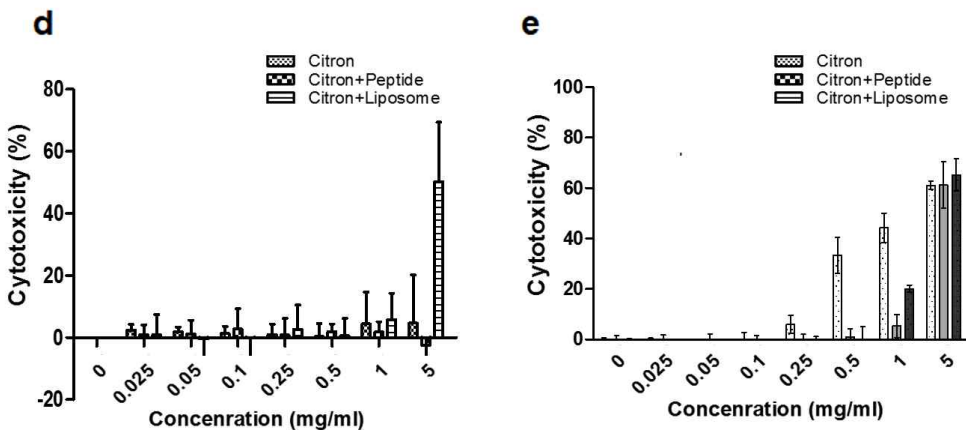


그림 3-3-27. d. hCPC LDH assay, e. hEPC LDH assay

- 또한, 인간 유래 일차 배양 세포 (primary cell line)의 경우, Live/Dead assay를 통해 세포의 독성을 정성적으로 평가한 결과, 각각 유자, 유자+펩타이드, 유자+리포솜 샘플을 각각의 농도 (0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml)로 처리하였을 때,

0.25 mg/ml 농도이하에서는 세포사멸이 관찰되지 않았다. 0.5 mg/ml 이상의 농도에서는 세포의 부착능력이 다소 감소하고 사멸한 세포가 관찰되는 것을 확인할 수 있다. 특히, 유자+리포솜 샘플을 농도 별로 처리한 경우, 농도가 증가함에 따라 세포사멸이 증가하고 세포의 부착 정도가 현저히 줄어드는 것을 보였다(그림 3-3-28).

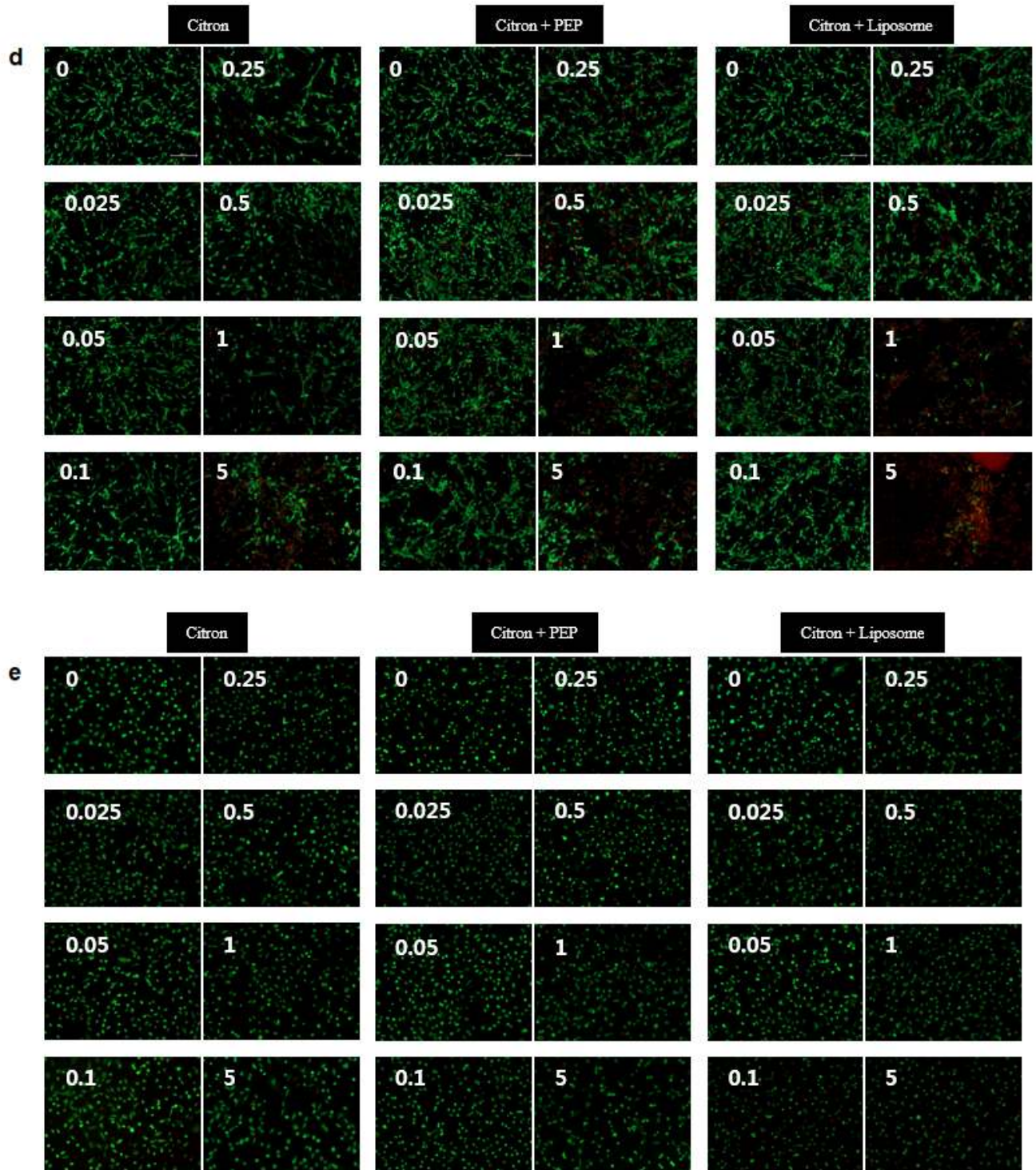


그림 3-3-28. d. hCPC Live/Dead assay, e. hEPC Live/Dead assay

마. 커큐민 소재의 마우스를 이용한 독성평가

○ In-vivo 독성평가를 위해 C57BL/6 마우스를 이용한 단회독성평가를 수행하였다. 비교군으로 용매인 Oil을 사용하였고, 실험군으로 turmeric extract powder (TEP), turmeric extract-nanoemulsion-10.6 (TE-NEP-10.6, 106은 HLB 값을 의미함)을 각각 저용량군 (500 mg/kg), 중용량군 (1,000 mg/kg), 고용량군 (2,000 mg/kg)으로 지정하여 실험을 수행하였다. 또한, 강황추출물을 로딩하지 않은 TE-NEP-10.6-carrier를 동일하게 실험하여 나노에멀전 자체의 독성을 확인하였다.

(1) 임상증상 및 사망률

○ 실험기간 (14일) 동안 모든 실험군의 동물에서 시험 물질의 투여에 기인한 특이할 만한 임상 증상은 관찰되지 않았으며, 폐사 및 반사 동물 또한 관찰되지 않았다. 따라서 마우스에서 본 TE-NEP의 최소 치사량 (minimal lethal dose)은 암/수 모두 2,000 mg/kg을 훨씬 상회하는 것으로 나타났다 (표 3-3-1).

표 3-3-1. Mortality of mice orally treated with turmeric extract-nanoemulsion on single dose toxicity.

Sex	Sample	Dosage (mg/kg)	Days after oral administration								Final mortality	
			0	1	3	5	7	9	11	13		
M*	Oil	0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	TEP	500	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		1000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		2000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		10.6	500	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	10.6	1000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		2000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		10.6 Carrier	2000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		Oil	0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
F**	TEP	500	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		1000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		2000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		10.6	500	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	10.6	1000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		2000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		10.6 Carrier	2000	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
		Oil	0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

*Male **Female

(2) 체중 변화

○ 경구 투여 후 TE-NEP 고용량군 (2,000 mg/kg), 중용량군 (1,000 mg/kg), 저용량군 (500 mg/kg) 과 비교군 (Oil) 모두 시작 체중에 비하여 체중이 점차 증가하는 경향을 보였으며, 모든 투여군 사이의 유의적인 체중변화는 관찰할 수 없었다. 이를 통해, TE-NEP에 의한 마우스의 체중 변화는 나타나지 않는다고 판단된다 [그림 3-3-29,30].

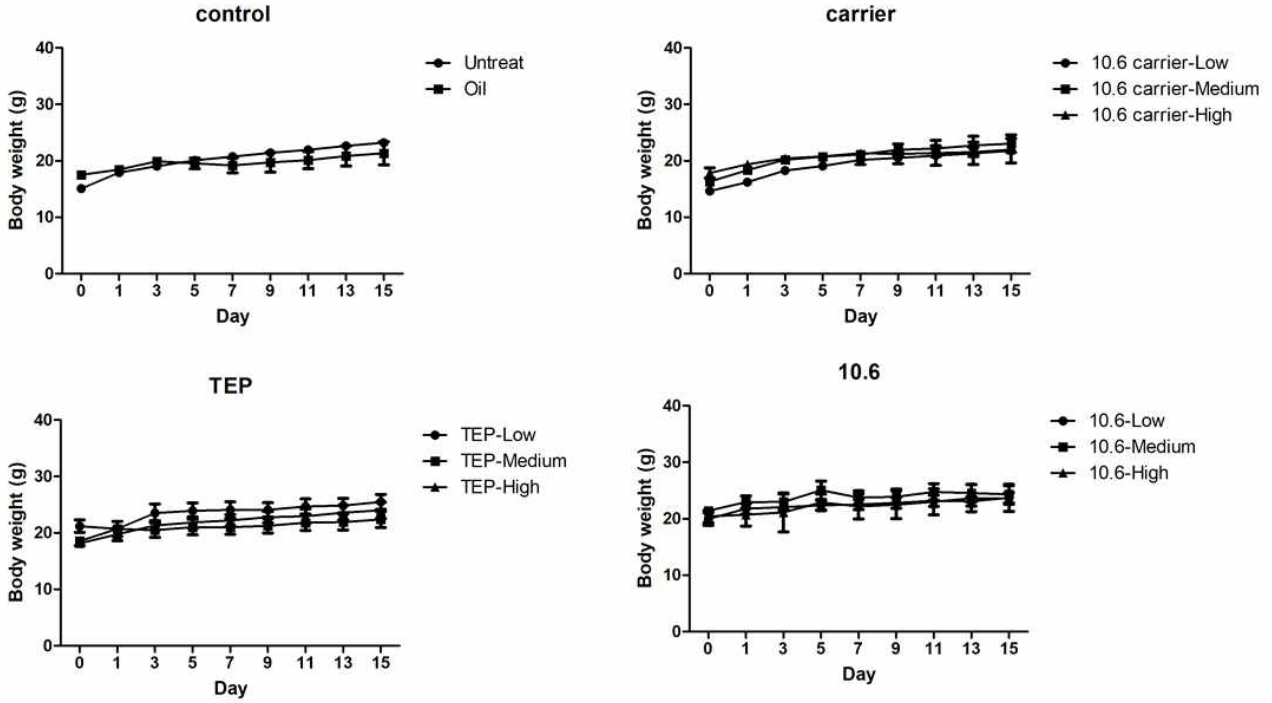


그림 3-3-29. Change in body weight of male mice treated turmeric extract-nanoemulsion.

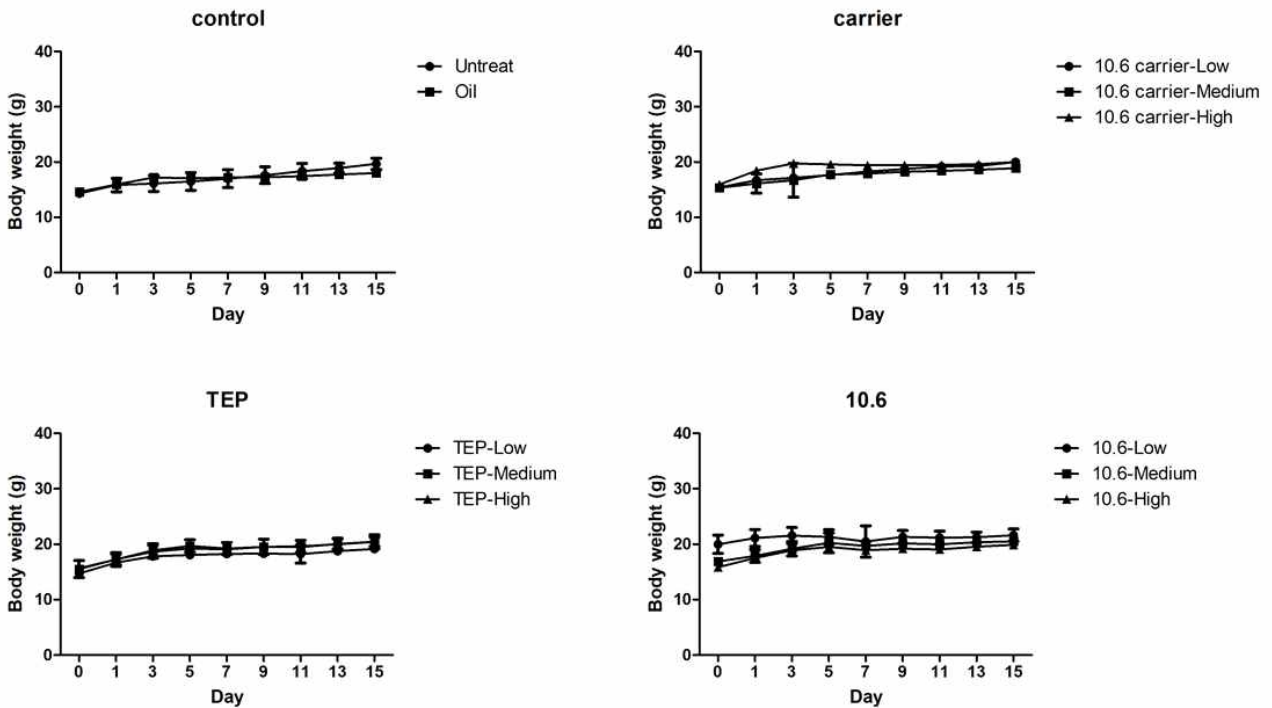


그림 3-3-30. Change in body weight of female mice treated with turmeric extract-nanoemulsion.

(3) 식이 변화

○ 수컷의 일일 사료 섭취량에 있어서 대조군과 샘플 투여군 사이에 의미있는 차이가 보이지 않았다. 암컷의 경우, 10.6 carrier의 중용량군 (1,000 mg/kg)에서 대조군과 비교하면 낮은 섭취량을 보이거나 보다 높은 고용량군에서 비교군과 유사한 섭취량을 보이고, 동일한 샘플에 대한 수컷의 섭취량은 비교군과 유의적 차이를 보이지 않았기 때문에, 이는 투여된 샘플에 의한 효과라고 여겨지지 않는다. 종합적으로 TE-NEP에 의한 식이량 변화가 나타나지 않는다고 판단된다 [그림 3-3-31, 32].

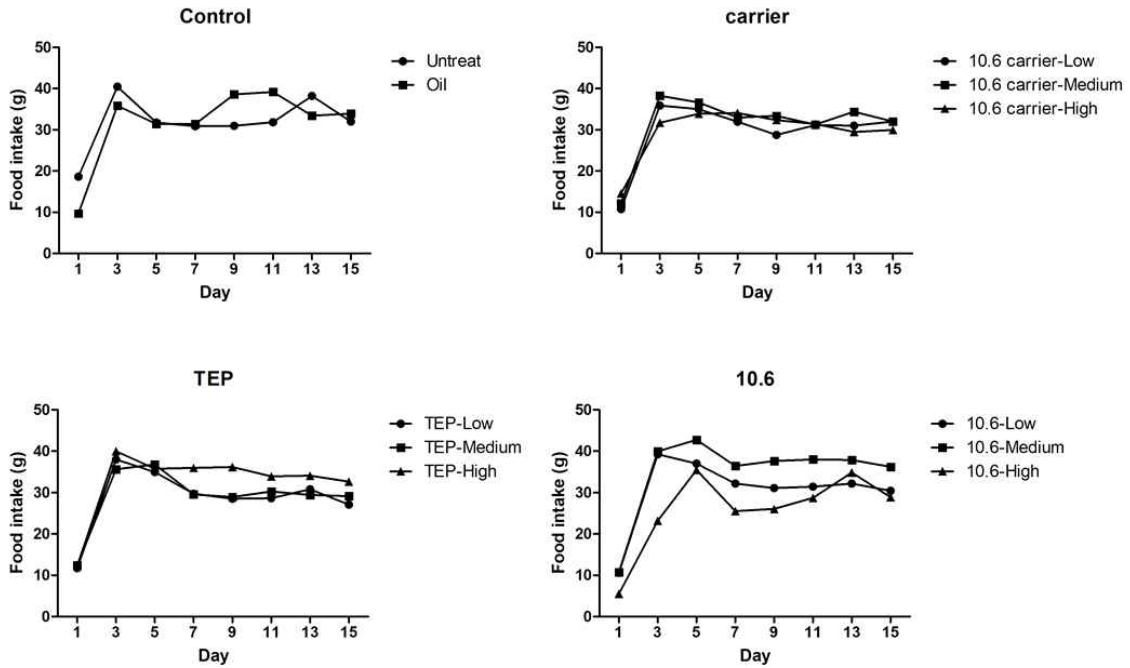


그림 3-3-31. Daily feed intake (g per 5 mouse) by male mouse treated with turmeric extract-nanoemulsion.

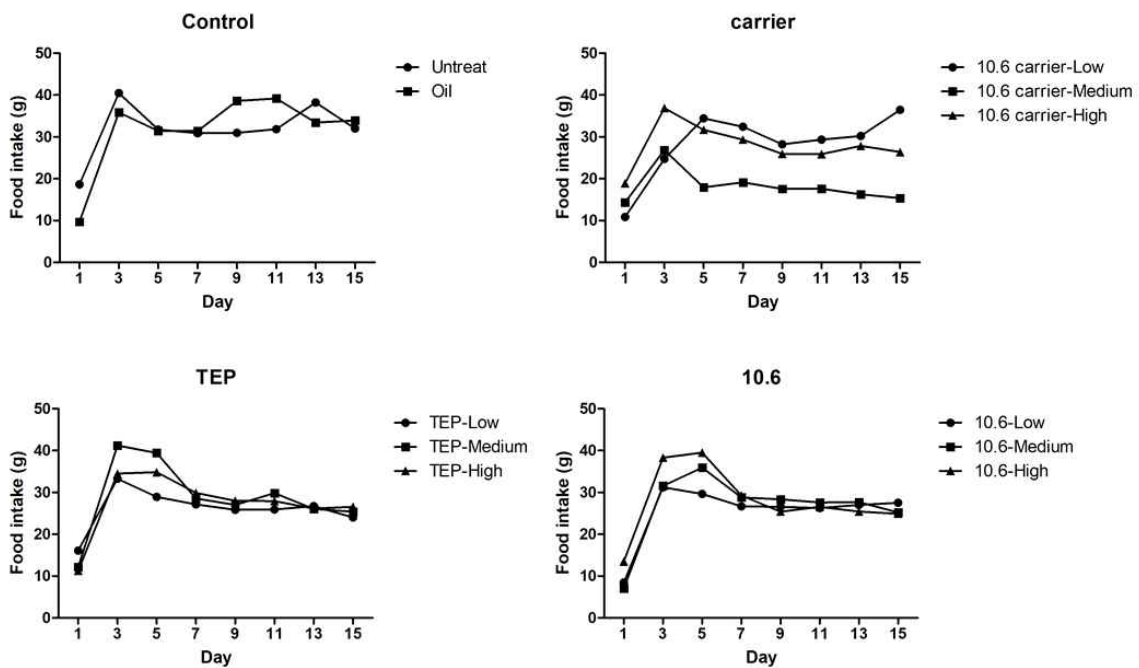


그림 3-3-31. Daily feed intake (g per 5 mouse) by female mouse treated with turmeric extract-nanoemulsion.

(4) 음수 변화

○ 음수 섭취량에 있어서도 대조군과 샘플 투여군 사이에 유의미한 차이가 나타나지 않았다. 수컷의 TE-NEP-10.6에서 중용량군 (1,000 mg/kg)과 고용량군 (2,000 mg/kg)에서 약간 높은 음수량을 보였으나 동일한 샘플의 암컷의 경우 용량에 관계없이 비슷한 수치를 나타내는 것을 보면, 샘플에 의해 유발되는 현상으로만 생각하기 어렵다. 종합적으로 TE-NEP는 단회투여를 통해 마우스의 음수량에 영향을 미치지 않는 것으로 고려된다 [그림 3-3-32, 33].

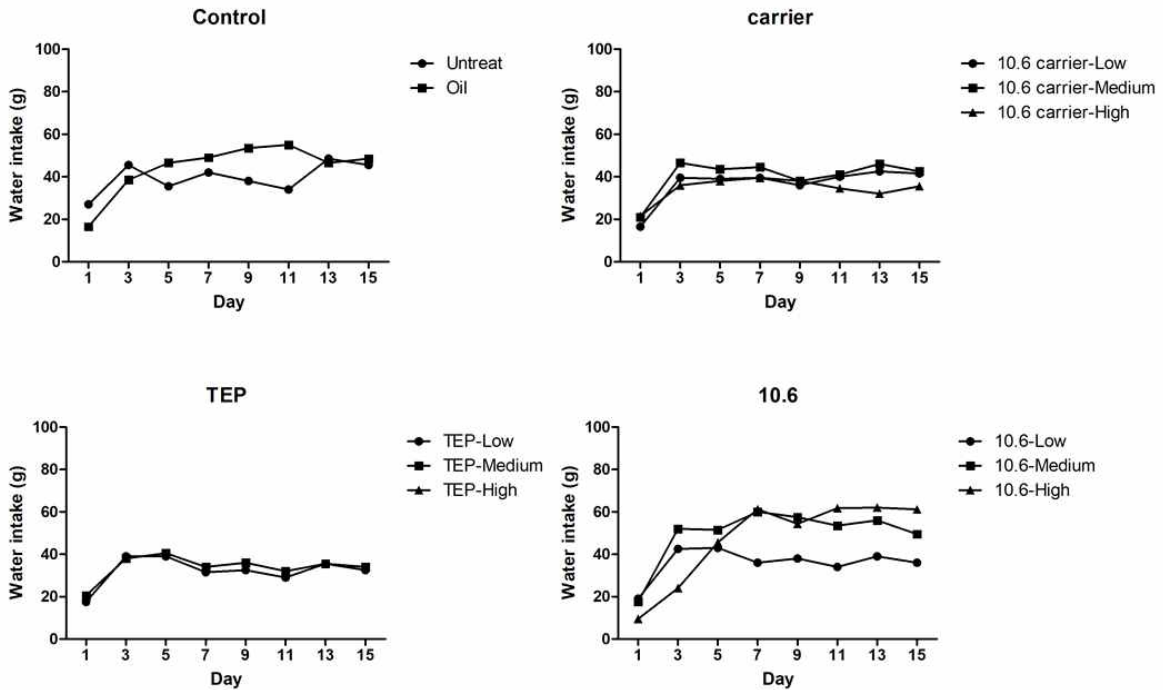


그림 3-3-32. Daily water intake (g per 5 mouse) by male mouse treated with turmeric extract-nanoemulsion

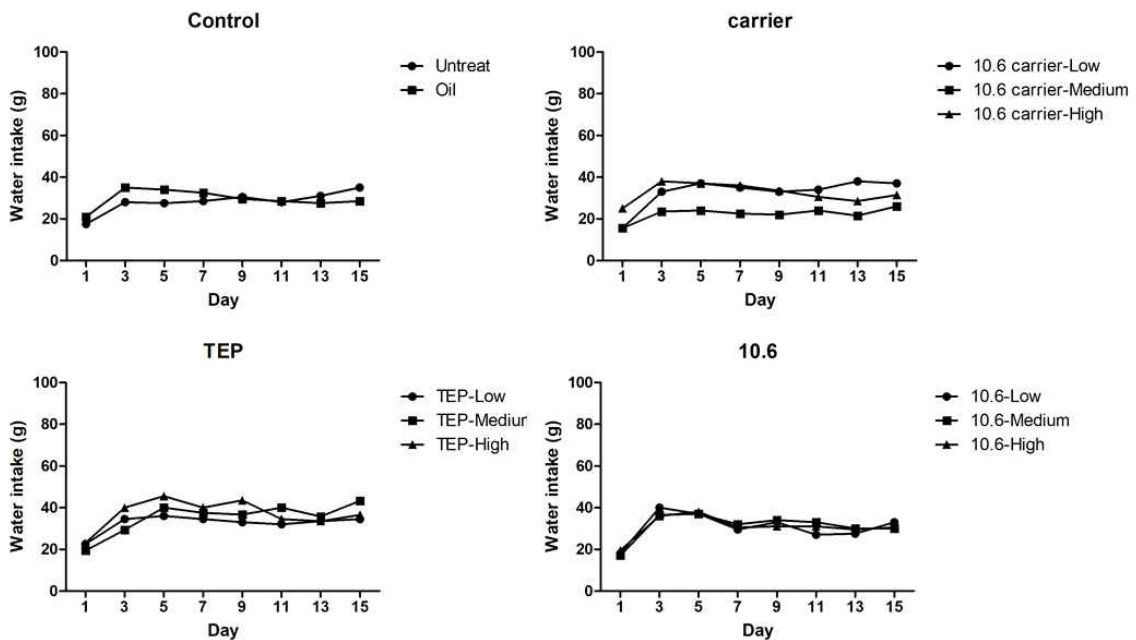


그림 3-3-33. Daily water intake (g per 5 mouse) by female mouse treated with turmeric extract-nanoemulsion

(5) 장기 중량 변화

○ 샘플 투여 14일 후, 실험 종료 시 모든 실험 동물을 부검하여 주요 내부 장기의 육안적 소견을 관찰하였다. 모든 동물에서, 심장, 폐, 간, 위, 비장, 신장, 생식기 등 주요 내부 장기에 대한 외관상의 어떠한 이상병변도 발견되지 않았다. 따라서 필요시 조직 병리학적 검사는 생략되었다. 또한, 독성으로 인한 무게의 변화를 확인하기 위해 부검시 각 장기의 무게를 측정하였으며, 장기 무게 값에 대한 유의적 차이는 수컷에서 TEP 저용량군 (500 mg/kg)의 Seminal vesicle에서 높게 관찰되었으며, 암컷에서는 TE-NEP-10.6 저용량군의 심장, 오른쪽 신장, 난소와 TE-NEP-10.6 중용량군 (1,000 mg/kg)의 심장, TE-NEP-10.6 고용량군 (2,000 mg/kg)의 심장에서 유의적으로 높은 값이 관찰되었다. 마우스 개체별 크기를 고려한 상대적 장기 중량 결과에서는 수컷의 경우, 고용량으로 NEP-10.6 (carrier)를 처리한 군의 폐, 간, 신장에서 비교군보다 유의적으로 낮은 값을 보였으며, 암컷의 경우, 고용량으로 NEP-10.6 (carrier)를 처리한 군의 심장과 TE-NEP-10.6의 저용량군을 처리한 군의 난소, 고용량군을 처리한 난소에서 통계적으로 유의하게 높은 값이 관찰되었다. 몇몇 군에서 유의적 차이가 발생하였으나 용량 의존성이 없으며, 암수 상관성이 없어 turmeric extract-nanoemulsion의 독성으로 인한 영향이 아닌 것으로 여겨진다 [표 3-3-2, 3, 4, 5].

표 3-3-2. Absolute organ weights (g) of male mice treated with turmeric extract-nanoemulsion.

Group (mg/kg)	Heart	Lung	liver	stomach	spleen	kidney		Semi nal Vesi cle	testis		epididymi		
						R	L		R	L	R	L	
Oil	0.118± 0.0125	0.165± 0.0169	1.186± 0.1226	0.307± 0.0661	0.072± 0.0159	0.151± 0.0233	0.146± 0.0231	0.136± 0.0190	0.079± 0.0089	0.078± 0.0062	0.039± 0.0156	0.036± 0.0157	
	500	0.116± 0.0148	0.170± 0.0169	1.065± 0.0745	0.295± 0.0766	0.056± 0.0083	0.143± 0.0133	0.130± 0.0166	0.224± 0.0493 *	0.080± 0.0022	0.077± 0.0050	0.036± 0.0062	0.039± 0.0055
TEP		1000	0.114± 0.0211	0.143± 0.0119	1.047± 0.2538	0.389± 0.1625	0.058± 0.0087	0.148± 0.0280	0.144± 0.0317	0.183± 0.0627	0.078± 0.0069	0.074± 0.0063	0.035± 0.0053
	2000		0.121± 0.0116	0.166± 0.0066	1.132± 0.1159	0.241± 0.0431	0.079± 0.0380	0.136± 0.0150	0.133± 0.0060	0.127± 0.0227	0.084± 0.0099	0.081± 0.0083	0.034± 0.0071
10.6		500	0.121± 0.0161	0.159± 0.0331	1.092± 0.1218	0.256± 0.0325	0.056± 0.0059	0.151± 0.0259	0.141± 0.0202	0.200± 0.0573	0.076± 0.0152	0.073± 0.0144	0.039± 0.0150
	1000		0.128± 0.0201	0.174± 0.0150	1.226± 0.0814	0.318± 0.0574	0.135± 0.0945	0.152± 0.0088	0.137± 0.0034	0.185± 0.0428	0.081± 0.0065	0.080± 0.0078	0.038± 0.0087
10.6 carri er		2000	0.126± 0.0175	0.150± 0.0162	1.163± 0.1512	0.267± 0.0903	0.115± 0.0597	0.159± 0.0153	0.146± 0.0221	0.152± 0.0077	0.077± 0.0030	0.072± 0.0055	0.039± 0.0126
	0.123± 0.0088		0.154± 0.0236	1.049± 0.0677	0.260± 0.0758	0.058± 0.0083	0.129± 0.0105	0.119± 0.0059	0.142± 0.0251	0.077± 0.0086	0.076± 0.0093	0.031± 0.0082	0.032± 0.0094

Note: Values are expressed as mean±SD, n=5, * p > 0.05

☒ 3-3-3. Relative organ weights (%) of male mice treated with turmeric extract-nanoemulsion.

Group (mg/kg)	Heart	Lung	liver	stomach	spleen	kidney		Seminal Vesicle	testis		epididymi		
						R	L		R	L	R	L	
Oil	0.558±0.0546	0.780±0.0822	5.584±0.6731	1.450±0.3374	0.346±0.1018	0.717±0.1341	0.693±0.1398	0.639±0.0638	0.371±0.0271	0.370±0.0257	0.188±0.0743	0.172±0.0765	
	500	0.457±0.0367	0.671±0.0800	4.182±0.2724	1.159±0.2905	0.221±0.0303	0.562±0.0480	0.511±0.0601	0.887±0.2252	0.317±0.0196	0.303±0.0236	0.144±0.0266	0.153±0.0250
TEP	1000	0.511±0.0810	0.641±0.0686	4.653±0.8500	1.737±0.7035	0.258±0.0271	0.661±0.0901	0.643±0.1168	0.812±0.2261	0.353±0.0293	0.335±0.0242	0.160±0.0241	0.175±0.0543
	2000	0.507±0.0574	0.696±0.0433	4.710±0.2747	1.002±0.1478	0.327±0.1381	0.572±0.0764	0.559±0.0503	0.529±0.0857	0.350±0.0408	0.341±0.0343	0.143±0.0226	0.186±0.0569
10.6	500	0.512±0.0550	0.669±0.1171	4.603±0.4407	1.079±0.1222	0.238±0.0227	0.639±0.1099	0.596±0.0818	0.845±0.2435	0.321±0.0587	0.309±0.0564	0.164±0.0564	0.162±0.0480
	1000	0.525±0.0468	0.720±0.0715	5.055±0.3751	1.321±0.2896	0.551±0.3743	0.628±0.0319	0.565±0.0369	0.775±0.2208	0.337±0.0299	0.332±0.0475	0.160±0.0449	0.180±0.0440
10.6	2000	0.533±0.0338	0.608±0.0436	4.937±0.4462	1.115±0.3026	0.489±0.2381	0.678±0.0117	0.619±0.0583	0.649±0.0543	0.331±0.0240	0.309±0.0300	0.166±0.0455	0.165±0.0440
	10.6 carrier	0.470±0.2379	0.553±0.2760	3.946±1.9621	0.963±0.5683	0.222±0.1168	0.480±0.2361	0.455±0.2286	0.551±0.2983	0.283±0.1427	0.280±0.1442	0.121±0.0690	0.122±0.0737

Note: Values are expressed as mean±SD, n=5, * p > 0.05

☒ 3-3-4. Absolute organ weights (g) of female mice treated with turmeric extract-nanoemulsion.

Group (mg/kg)	heart	lung	liver	stomach	spleen	kidney		Uterus	ovary		
						R	L		R	L	
Oil	0.082±0.0120	0.136±0.0117	0.853±0.1177	0.202±0.020	0.058±0.0059	0.092±0.0143	0.095±0.0154	0.039±0.0270	0.001±0.0010	0.001±0.0011	
	500	0.099±0.0101	0.135±0.0203	0.835±0.1316	0.217±0.053	0.065±0.0080	0.099±0.0070	0.093±0.0097	0.057±0.0227	0.002±0.0012	0.002±0.0008
TEP	1000	0.091±0.0030	0.144±0.0150	0.868±0.1229	0.173±0.00	0.063±0.0152	0.095±0.0070	0.094±0.0056	0.064±0.0352	0.003±0.0032	0.003±0.0022
	2000	0.095±0.0058	0.154±0.0152	0.867±0.0664	0.207±0.099	0.064±0.0087	0.102±0.0075	0.101±0.0102	0.076±0.0242	0.004±0.0019	0.003±0.0018
10.6	500	0.110±0.0121***	0.165±0.0137	2.423±0.2728	0.254±0.016	0.070±0.0069	0.128±0.0268***	0.116±0.0216	0.090±0.0208	0.007±0.0027**	0.008±0.0043***
	1000	0.103±0.0050*	0.154±0.0169	0.823±0.0283	0.224±0.078	0.059±0.0061	0.100±0.0067	0.096±0.0087	0.060±0.0114	0.002±0.0011	0.002±0.0008
10.6	2000	0.102±0.0114*	0.153±0.0385	0.861±0.1917	0.186±0.085	0.062±0.0156	0.104±0.0109	0.100±0.0217	0.072±0.0292	0.004±0.0016	0.004±0.0018
	10.6 carrier	0.114±0.0146***	0.147±0.0182	0.942±0.1443	0.272±0.078	0.069±0.0083	0.115±0.0111	0.116±0.0199	0.064±0.0132	0.002±0.0003	0.002±0.0008

Note: Values are expressed as mean±SD, n=5, * p > 0.05

표 3-3-5. Relative organ weights (%) of female mice treated with turmeric extract-nanoemulsion.

Group (mg/kg)	heart	lung	liver	stomach	spleen	kidney		Uterus	ovary		
						R	L		R	L	
Oil	0.459±0	0.756±0	4.742±0	1.127±	0.324±0	0.514±0	0.530±0	0.275±0.	0.011±0	0.010±0	
	.0790	.0644	.6449	0.1202	.0352	.0819	.0871	1052	.0029	.0046	
	500	0.517±0	0.708±0	4.356±0	1.134±	0.340±0	0.520±0	0.487±0	0.300±0.	0.012±0	0.012±0
TEP	.0623	.1020	.6681	0.1221	.0385	.0363	.0465	1171	.0061	.0042	
	1000	0.450±0	0.706±0	4.248±0	1.054±	0.308±0	0.470±0	0.463±0	0.310±0.	0.017±0	0.015±0
	.0152	.0481	.4660	0.2376	.0643	.0364	.0156	1563	.0144	.0098	
2000	0.468±0	0.756±0	4.238±0	1.016±	0.317±0	0.501±0	0.495±0	0.372±0.	0.022±0	0.017±0	
	.0378	.0877	.2048	0.1395	.0445	.0209	.0445	1183	.0092	.0084	
	500	0.511±0	0.769±0	11.64±1	1.171±	0.326±0	0.594±0	0.539±0	0.416±0.	0.036±0	0.040±0
10.6	.0355	.0726	6.280	0.3444	.0196	.1033	.0831	0910	.0120**	.0185**	
	1000	0.503±0	0.751±0	4.012±0	1.088±	0.290±0	0.489±0	0.470±0	0.296±0.	0.012±0	0.012±0
	.0320	.0674	.1536	0.2112	.0267	.0498	.0298	0520	.0056	.0041	
2000	0.514±0	0.770±0	4.314±0	0.938±	0.314±0	0.523±0	0.503±0	0.360±0.	0.020±0	0.021±0	
	.0458	.1734	.8275	0.0759	.0686	.0394	.0940	1333	.0079*	.0091**	
	10.6	0.570±0	0.733±0	4.707±0	1.357±	0.349±0	0.575±0	0.581±0	0.321±0.	0.011±0	0.014±0
carrier	.0745*	.0827	.7263	0.2743	.0419	.0551	.0943	0615	.0016	.0045	

Note: Values are expressed as mean±SD, n=5, * p > 0.05

(6) 혈액학적 검사

○ 혈액학적 검사 결과는 turmeric extract-nanoemulsion 고용량군 (2,000 mg/kg), 중용량군 (1,000 mg/kg) 저용량군 (500 mg/kg)과 비교군의 혈액을 CBC 검사를 통해 수행하였다. 검사 결과 수컷의 경우, 헤모글로빈 수치가 비교군인 oil 군과 TEP 저용량군 및 중용량군, TE-NEP-10.6 저용량군, 중용량군, 고용량군에서 정상 수치보다 낮게 관찰되었고, HCT 수치는 TE-NEP-10.6 저용량군에서 낮게 관찰되었다. MCV 값은 TEP 저용량군과, TE-NEP-10.6 저용량군 및 중용량군에서 정상 수치보다 더 높게 측정되었다. 혈소판 수치의 경우에는 oil 군과 TE-NEP-10.6 중용량군에서 높게, TEP 중용량군에서 낮게 관찰되었다. 정상수치를 크게 벗어나거나 용량 의존적인 변화를 나타내지 않고 표준편차 역시 높게 관찰되므로 개체간의 차이가 클것으로 예상되며 본 연구과제에서 개발된 turmeric extract-nanoemulsion에 의한 혈액학적 독성을 보인다고는 여겨지지 않는다 [표 3-3-6, 7].

☒ 3-3-6. Hematological parameters on mice of male after treatment with turmeric extract-nanoemulsion.

Group (mg/kg)	Hb (g/dL)	HCT (%)	MCH (pg)	MCHC (g/Dl)	MCV (fL)	Platelet (10 ³ /uL)	RBC (10 ⁶ /uL)	WBC (10 ³ /uL)	
Oil	13.1±2.13	38.8±6.46	16.2±0.26	33.4±0.88	48.6±2.02	1191.6±273.95	7.95±1.31	5.12±5.22	
TEP	500	12.4±1.44	39.4±4.97	16±0.83	31.6±0.73	50.5±1.94	743.8±117.12	7.81±1.07	2.6±1.80
	1000	11.0±1.81	34.8±5.69	15.6±0.17	31.5±0.46	49.6±0.95	364±123.70	7.03±1.21	3.8±1.27
	2000	14.6±0.56	40.5±10.2	15.3±0.60	31.6±1.24	48.3±0.53	814±247.65	9.22±0.55	1.58±0.66
10.6	500	11.5±1.48	32.4±6.05	17.7±2.67	36.1±6.16	52.0±3.36	914.4±202.95	6.55±1.13	6.42±3.25
	1000	13.5±1.48	45.7±2.58	15.3±0.40	29.5±1.92	55.3±3.04	1045.2±445.39	8.84±0.97	5.54±2.08
	2000	11.6±1.80	36.6±3.34	17.5±2.49	31.9±6.40	48.6±1.46	794.33±134.96	6.63±0.55	3.33±0.73
10.6 carrier	2000	15.6±0.57	47.9±2.13	15.9±0.34	32.7±0.76	48.6±1.46	952±210.39	9.84±0.37	4.98±1.93

Abbreviations: Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; Platelet, ; RBC, red blood cell; WBC, white blood cell.

☒ 3-3-7. Hematological parameters on mice of female after treatment with turmeric extract-nanoemulsion.

Group (mg/kg)	Hb (g/dL)	HCT (%)	MCH (pg)	MCHC (g/Dl)	MCV (fL)	Platelet (10 ³ /uL)	RBC (10 ⁶ /uL)	WBC (10 ³ /uL)	
Oil	13.5±0.98	40.0±2.25	16.3±0.86	33.8±2.42	48.3±1.06	834.6±196.80	8.28±0.49	4.6±1.04	
TEP	500	13.4±1.69	41.3±5.21	15.6±0.15	32.4±0.31	48.2±0.74	1069±175.35	8.56±0.98	3.66±1.51
	1000	12.8±2.95	38.4±9.09	15.9±0.40	33.7±0.45	47.3±1.59	934.6±468.99	8.16±1.87	1.53±0.75
	2000	14.8±0.58	44.5±2.47	16.1±0.18	33.4±0.77	48.2±0.87	672±296.83	9.23±0.38	4.14±2.24
10.6	500	13.9±1.19	44.4±2.95	15.4±0.61	31.4±1.28	49.3±1.51	716.2±201.14	9.04±0.80	5.26±2.01
	1000	13.8±1.37	41.9±4.91	15.7±0.45	32.9±0.87	47.7±0.40	989.2±127.32	8.8±1.03	5.42±1.81
	2000	14.8±0.98	46.6±2.96	18.7±7.17	39.4±15.0	47.7±1.14	1125.2±267.98	8.91±2.34	1.5±0.55
10.6 carrier	2000	10.8±1.37	32.9±4.53	15.6±0.32	32.8±0.66	47.7±1.11	610.8±126.08	6.91±0.97	2.5±0.78

Abbreviations: Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; Platelet, ; RBC, red blood cell; WBC, white blood cell.

2. 개발된 나노소재 및 제품의 생리활성 효능

가. Plant scale로 저분자화한 콜라겐 펩타이드의 효능검증

(1) 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 항염 효과

(가) 염증 세포 모델에서의 콜라겐 펩타이드의 항염 효과

○ 대식세포인 RAW264.7 세포에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 세포독성을 검증하기 위해, 콜라겐 펩타이드를 시간, 농도별로 처리하여 Trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 1 mg/mL 농도의 콜라겐 펩타이드가 (그림 3-3-34A) 1시간부터 168시간까지 세포독성을 가지지 않는 것을 확인하였다 (그림 3-3-34B). 이러한 세포독성실험을 바탕으로 콜라겐 펩타이드를 0.5 mg/ml부터 10 mg/ml까지 처리 하였을 때, LPS에 의해 유도된 Nitrite 생성이 콜라겐 추출물 1 mg/ml부터 억제되기 시작하여 10 mg/ml에서는 상당히 억제되는 것을 확인할 수 있다 (그림 3-3-35).

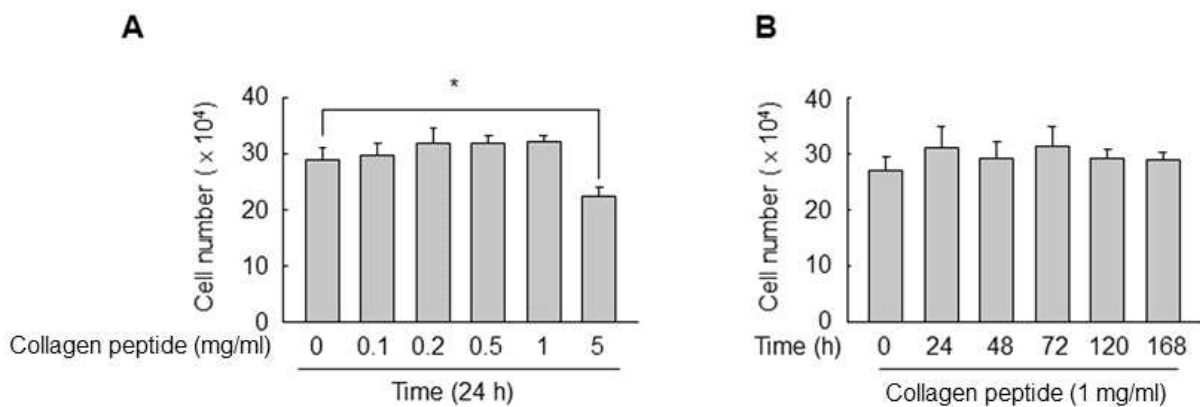


그림 3-3-34. RAW264.7세포에서 저분자화 된 콜라겐 펩타이드의 세포독성 분석

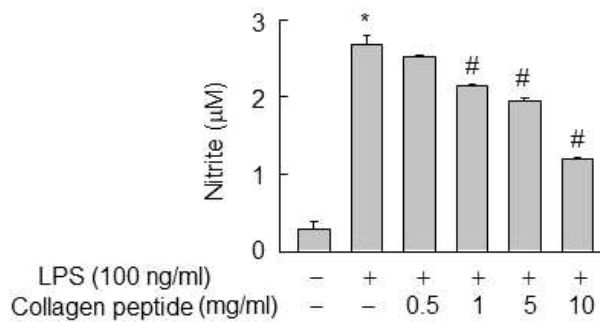


그림 3-3-35. 콜라겐 펩타이드의 NO 생성에 대한 효과 검증

○ 대식세포인 RAW264.7 세포에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 항염증 효과를 검증하기 위해, 염증 유도제인 LPS에 의해 유도된 염증인자인 HMGB1의 분비를 조사한 결과, LPS에 의해 유도된 HMGB1의 분비가 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 전처리에 의해 억제되는 것을 확인하였으며 (그림 3-3-36A), HMGB1의 핵에서 세포질로의 이동 또한 억제되는 것을 확인하였다 (그림 3-3-36B).

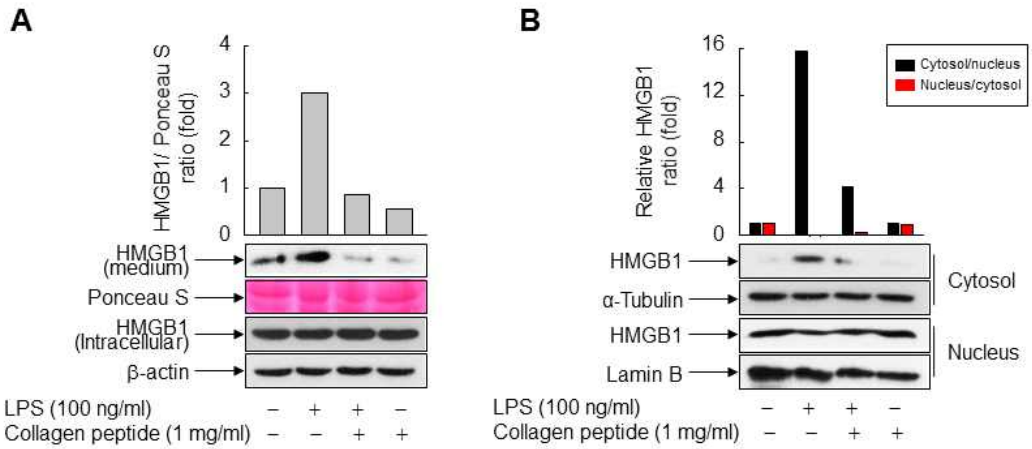


그림 3-3-36. LPS에 의해 유도된 HMGB1 분비에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 효과 분석

○ 염증 억제분자인 HO-1이 HMGB1의 분비를 억제한다는 보고가 있으므로, 콜라겐 펩타이드의 HMGB1 분비 억제효과가 HO-1을 경유하는 것인지 검증하기 위해, 대식세포인 RAW264.7 세포에서 HO-1 siRNA를 구축하였다 (그림 3-3-37A). 그 후, 염증 유도제인 LPS에 의해 유도된 HMGB1의 분비를 조사한 결과, LPS에 의해 유도된 HMGB1의 분비가 콜라겐 펩타이드 전처리에 의해 상당히 감소하였지만, HO-1을 억제시키는 HO-1 siRNA 및 ZnPPIX (HO-1 억제제)의 첨가에 의해서는 콜라겐 펩타이드의 HMGB1억제효과가 제거되는 것을 확인하였다. 따라서, 이러한 LPS에 의해 유도되는 HMGB1의 분비를 콜라겐 펩타이드가 억제하는 것은 HO-1을 경유하는 결과라는 것을 알 수 있다 (그림 3-3-37B, C).

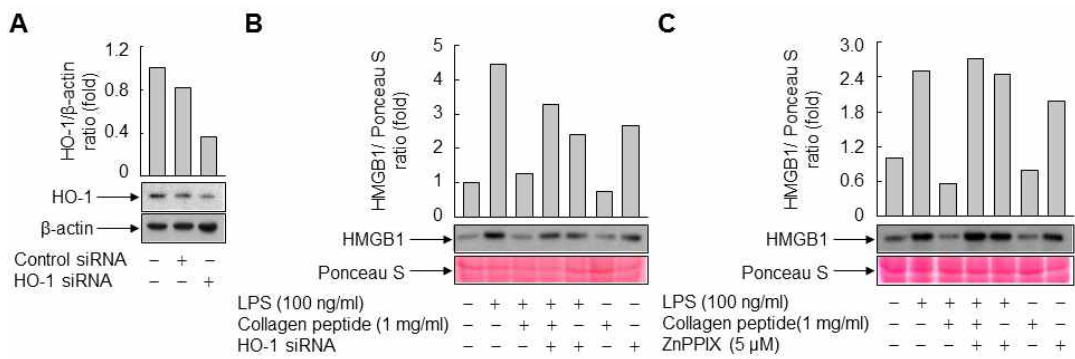


그림 3-3-37. 콜라겐 펩타이드에 의한 HMGB1의 억제에 있어서 HO-1의 관련성 검증

○ 앞서 콜라겐 펩타이드에 의한 HMGB1의 억제에 있어서 HO-1의 관련성이 제기되었으므로, 콜라겐 펩타이드가 HO-1의 발현에 영향을 미치는지 조사하였다. 그 결과, 콜라겐 펩타이드는 HO-1의 발현을 농도 및 시간 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였고 이러한 증가가 전사적 단계를 조절함으로써 발생하는 것을 알 수 있었다 (그림 3-3-38A-C). 또한, HO-1의 발현증가에 관여하는 Nrf-2의 translocation을 확인하였을 때, 콜라겐 펩타이드의 첨가에 의해서 세포질에 존재하는 Nrf-2가 핵으로 이동하는 것을 확인할 수 있었으며, 이로 인해 콜라겐 펩타이드가 Nrf-2를 조절함으로써 HO-1의 발현을 증가시킬 것이라는 결과를 얻을 수 있었다 (그림 3-3-38D, E).

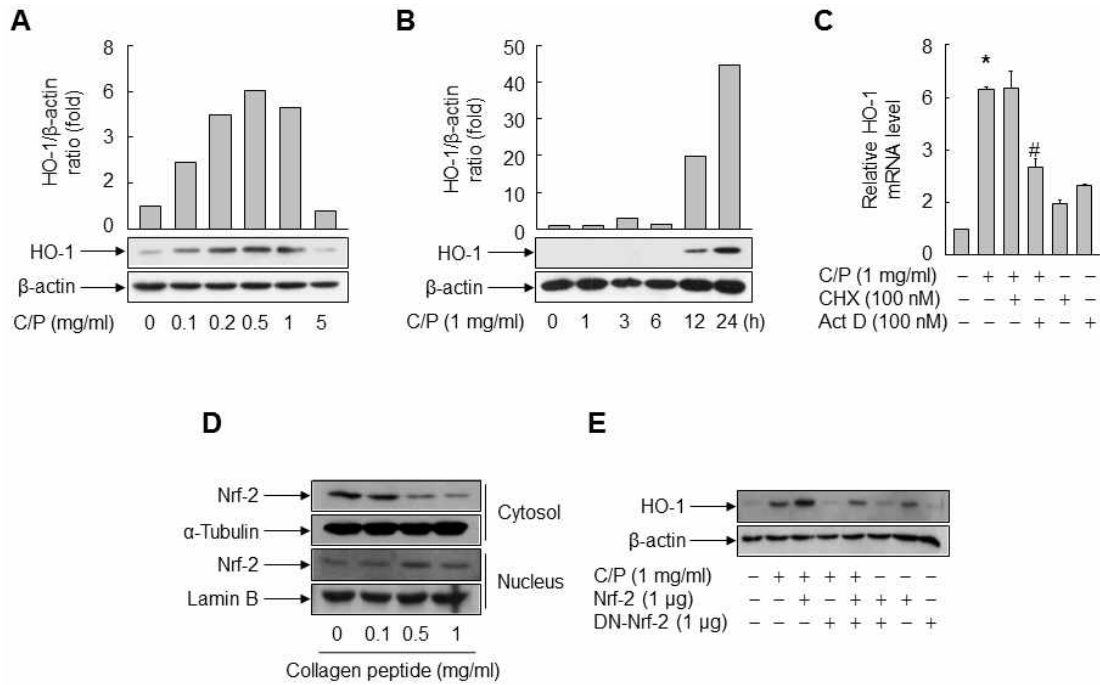


그림 3-3-38. 콜라겐 펩타이드의 HO-1 발현 유도 검증

(나) 염증 동물 모델에서의 콜라겐 펩타이드의 항염 효과

○ 위와 같은 콜라겐 펩타이드의 항염 효과가 동물 모델에서도 유사하게 나타나는지를 확인하기 위하여 BALB/c 쥐의 복강에 LPS를 주사한 후 15일간 쥐의 생존율을 조사하였다. LPS를 주사한 생쥐는 2일 만에 모든 개체가 죽었으나 LPS와 콜라겐 펩타이드를 같이 주사한 생쥐는 3일 이후부터는 생존율이 50%로 지속되는 것을 관찰하였다. 그러나 이러한 생존 효과는 HO-1을 억제시키는 ZnPPIX를 같이 주사하면 사라지는 것을 확인하였다 (그림 3-3-39A). BALB/c 쥐의 복강에 LPS를 주사한 후 18시간 후 혈액 내 염증인자인 HMGB1의 분비를 조사한 결과 세포 실험에서와 마찬가지로 LPS를 주사한 쥐의 혈액에서 HMGB1 분비가 콜라겐 펩타이드를 같이 주사한 쥐에서는 억제되는 것을 확인하였다. 이러한 억제 효과는 ZnPPIX를 같이 주사한 실험군에서는 사라지는 것을 확인하였다 (그림 3-3-39B). 따라서 세포 모델뿐만 아니라 동물을 이용한 염증 모델에서도 콜라겐 펩타이드가 항염 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

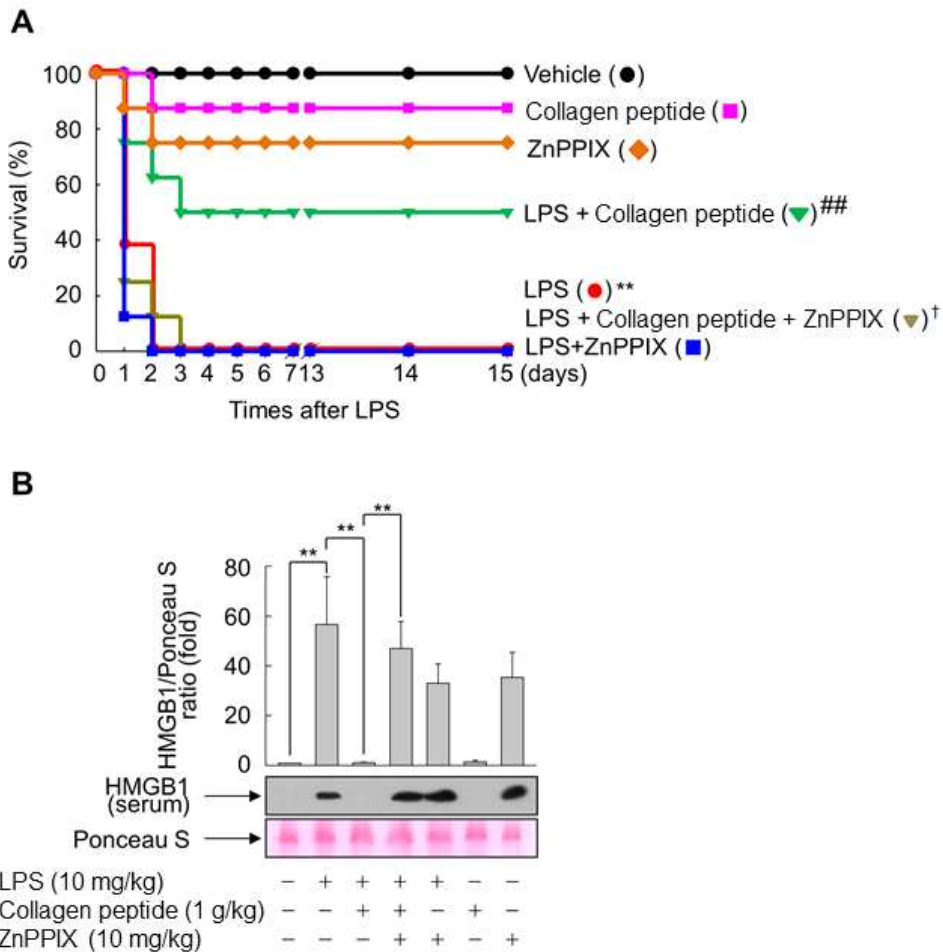


그림 3-3-39. 염증성 모델 쥐에서의 콜라겐 펩타이드의 효과 검증

○ 이상의 결과들로 대식세포인 RAW264.7 세포에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 처리는 LPS에 의한 염증성 세포 모델에서 염증성 인자인 HMGB1의 발현을 억제하고 항산화 마커 단백질인 HO-1의 발현을 증가시켜 세포를 보호하는 작용을 한다는 것을 확인하였다. 마찬가지로 염증성 동물 모델 실험에서도 콜라겐 펩타이드의 처리는 LPS 처리에 의해 사망하는 쥐의 생존율을 높이고 혈액 내 HMGB1의 분비를 억제하는 것을 확인함으로써 항염 효과가 있다는 것을 실험으로 검증하였다.

(2) 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 항비만 효과

(가) 비만 세포 모델에서의 콜라겐 펩타이드의 항비만 효과

○ 지방전구세포인 3T3-L1세포에서 콜라겐 펩타이드의 세포독성을 검증하기 위해, 콜라겐 펩타이드를 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mg/ml의 농도별로 처리하여 Trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 최고농도인 5 mg/ml까지도 세포독성이 나타나지 않은 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-3-40).

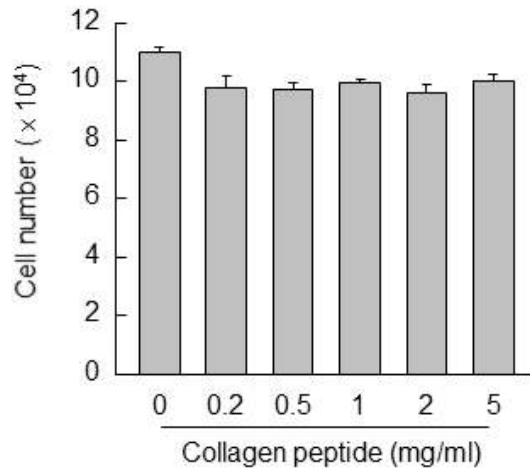


그림 3-3-40. 지방전구세포에서 콜라겐 펩타이드의 세포 독성 검증

○ 앞서 수행한 세포독성 실험을 바탕으로 콜라겐 펩타이드 0.5 및 1 mg/ml과 MDI (IBMX, Dexamrthasone, Insulin)를 동시에 처리하여 지방세포의 분화에 미치는 영향을 확인한 결과, MDI에 의한 지방세포로의 분화가 0.5 mg/ml의 콜라겐 펩타이드에 의해 유의하게 억제되기 시작하여 1 mg/ml의 농도까지 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-3-41).

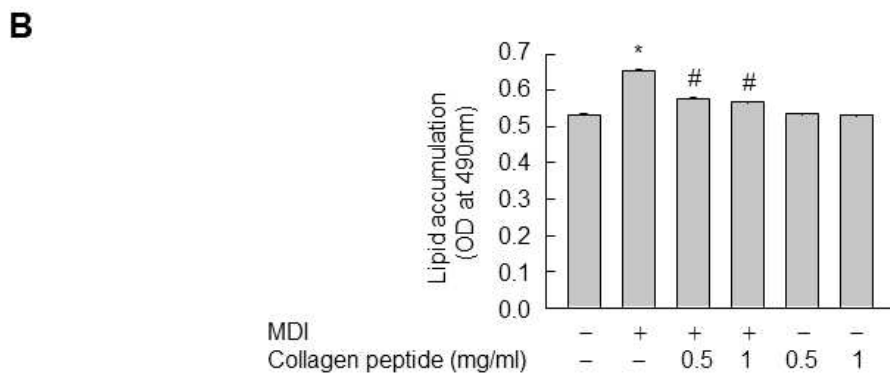
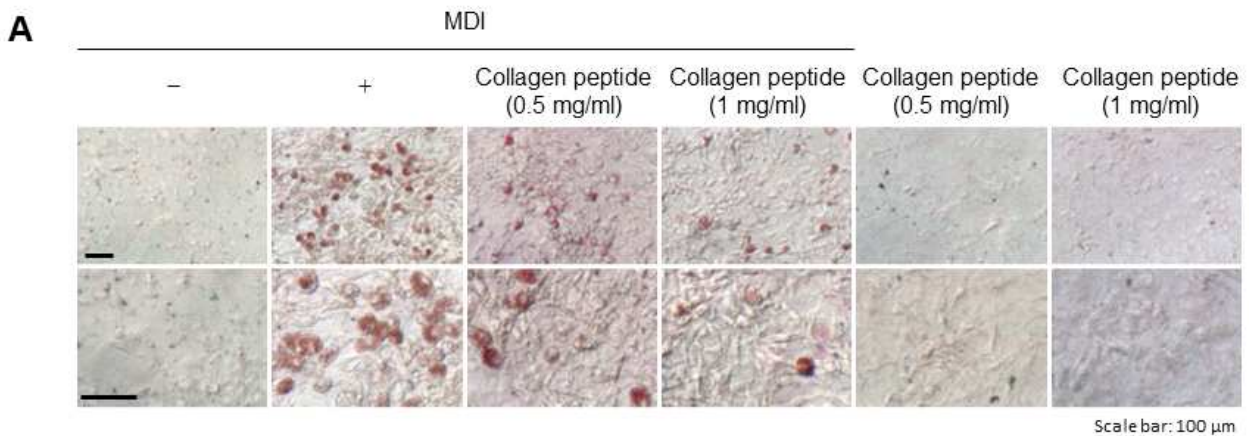
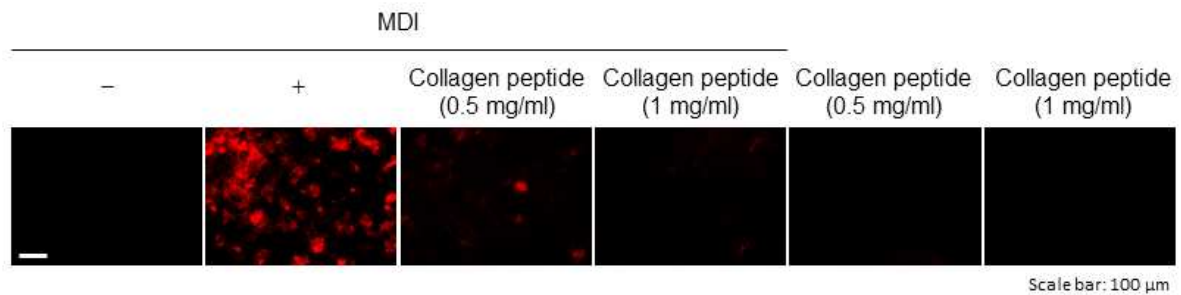


그림 3-3-41. 지방 세포에서 콜라겐 펩타이드의 지방축적 억제효과 검증

○ 1년차에 수행한 세포독성 실험을 바탕으로 콜라겐 펩타이드 0.5 및 1 mg/ml과 MDI (IBMX, Dexamrthasone, Insulin)를 동시에 처리하여 지방세포의 분화에 미치는 영향을 확인한 결과, MDI에 의한 지방세포로의 분화가 0.5 mg/ml의 콜라겐 펩타이드에 의해 유의하게 억제되기 시작하여 1 mg/ml의 농도까지 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-3-42). 또한, 저분자화된 콜라겐 펩타이드는 MDI 처리로 유도된 지방분화에 의해 축적된 지방 세포 분화 관련 유전자인 PPAR γ , aP2, C/EBP α 의 발현을 상당히 억제시켰다 (그림 3-3-43).

A



B

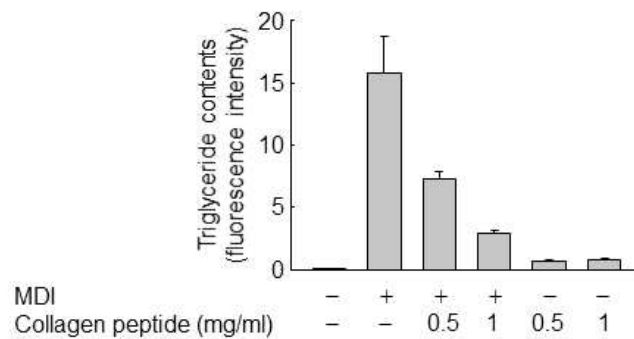


그림 3-3-42. 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 중성지방 축적 억제 효과 검증

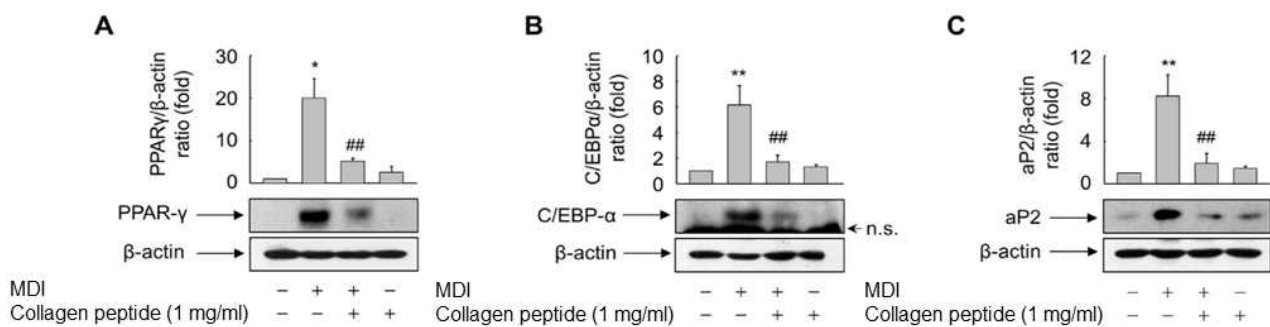
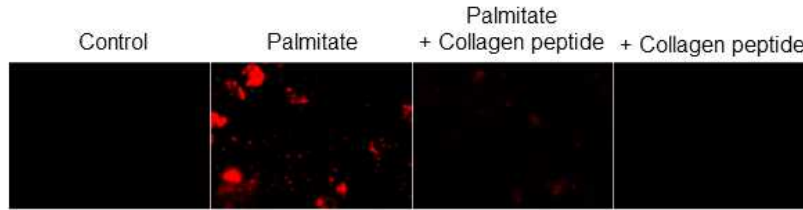


그림 3-3-43. 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 지방 분화 관련 유전자 억제 효과 검증

○ 한편, 간세포인 HapG2세포에 유리지방산인 palmitate를 처리하여 작성한 비알콜성 지방증 모델세포에서도 저분자화된 콜라겐 펩타이드를 처리한 그룹에서 중성지방산의 축적이 유의하게 감소하는 연구결과로부터 저분자화된 콜라겐 펩타이드가 지방세포로의 분화억제 뿐만이 아니라, 만성적인 비알콜성 지방간염의 억제에 효과를 나타낼 가능성이 시사되어졌다 (그림 3-3-44).

A



B

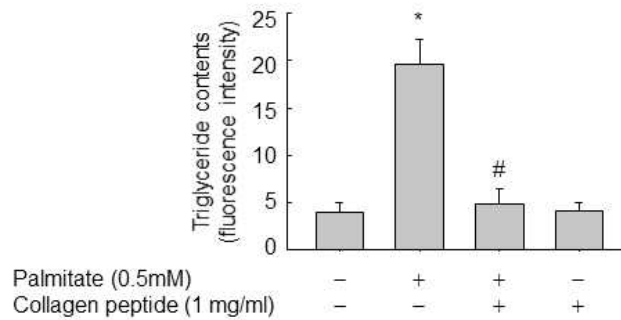


그림 3-3-44. 간세포에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 중성지방 축적 억제효과 검증

(나) 비만 동물 모델에서의 콜라겐 펩타이드의 항비만 효과

○ 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 항비만 효과가 세포 실험과 마찬가지로 동물 실험에서도 효능이 있는지를 확인하기 위하여 6주령 ICR 수컷 생쥐에게 8주간 정상 식이 (4.3% 지방, 19.2% 단백질 함유) 혹은 고지방 식이 (24% 지방, 24% 단백질 함유)를 실시하여 비만 동물 모델을 작성하였다. 콜라겐 펩타이드는 1주일에 3번 300 mg/kg/day로 경구투여하였다. 8주 후 쥐의 체중 및 식이 섭취 효율을 분석한 결과, 정상 식이군에 비해 고지방 식이에 의한 체중의 증가가 콜라겐 펩타이드를 함께 투여한 실험군에서는 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 그러나 각 실험군 간의 식이 섭취 효율에는 큰 차이가 없었다 (표 3-3-8). 이상의 결과들로 저분자화된 콜라겐 펩타이드가 동물 모델에서 지방세포의 분화를 조절하여 체중 감소를 하는 것이 시사되었다.

표 3-3-8. 정상 식이 혹은 고지방 식이를 급여한 쥐에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 체중 및 식이 섭취 효율 효과 분석

Group	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g/mouse/8 wks)	Food intake (g/mouse/8 wks)
ND	29.51 ± 0.86	40.03 ± 1.06	10.49	2109.5
HDF	28.55 ± 0.64	48.99 ± 1.79*	20.44	1861.5
HDF + Collagen peptide	29.54 ± 0.46	41.05 ± 0.47#	11.51	2220.3
Collagen peptide	29.54 ± 0.30	41.65 ± 1.71	12.11	1977.0

개체수 각각 n = 8

*정상 식이 (ND) 군과의 비교

#고지방 식이 (HFD) 군과의 비교

○ 비만 동물 모델을 사용한 실험에서 콜라겐 펩타이드에 의한 체중 감소 효과를 8주간 관찰한 결과 고지방 식이를 급여한 쥐에서 2주부터 유의하게 나타난 체중증가는 콜라겐 펩타이드를 함께 투여한 실험군에서 실험 4주째부터 체중이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다 (그림 3-45A). 세포 모델 실험에서와 마찬가지로 지방 분화 관련 단백질들의 발현을 살펴 본 결과 고지방 식이에 의해서 증가된 PPAR γ , aP2, C/EBP α 의 발현을 의미 있게 감소시키는 것을 확인하였다 (그림 3-B, C). 또한, 실제 지방 세포의 크기를 Hematoxylin과 eosin 염색을 통해 관찰한 결과 고지방 식이에 의해 커진 지방세포가 콜라겐 펩타이드를 투여한 실험군에서 현저하게 그 크기가 감소하는 것이 관찰되었다 (그림 3-3-45 D, E).

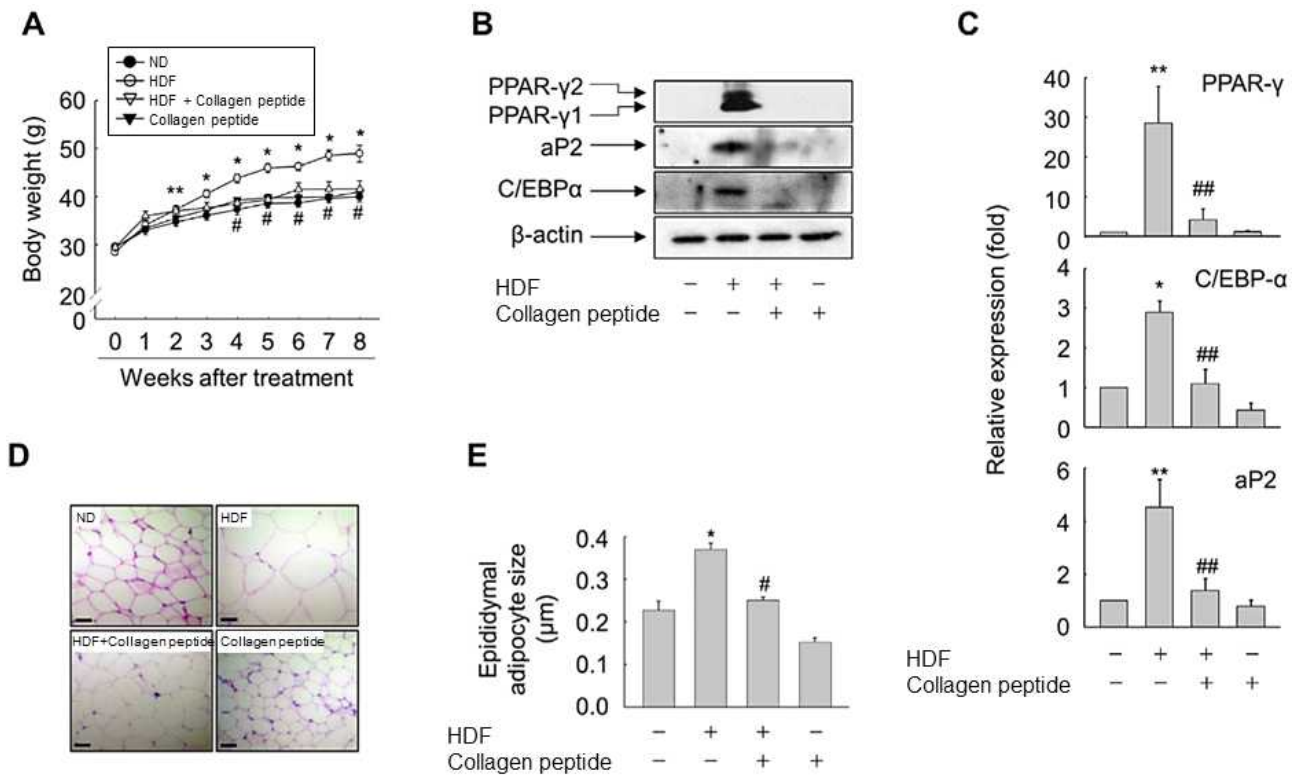


그림 3-3-45. 정상 식이 혹은 고지방 식이를 급여한 쥐에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 체중 감소, 비만 관련 유전자의 발현 억제, 지방 세포 크기 감소 효과 분석

○ 비만 동물 모델에서의 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 항비만 효과를 확인하기 위하여 정상 식이 및 고지방 식이를 8주간 진행한 쥐의 혈중 지질을 분석하였다. 고지방 식이를 투여한 실험군에서 증가된 혈중 총콜레스테롤과 동맥경화를 유발할 수 있는 중성지방 (tryglyceride)이 콜라겐 펩타이드를 같이 투여한 실험군에서 각각 10.8%, 5.8%가 감소한 것을 확인하였다. 혈중 저밀도지단백 콜레스테롤 (Low density lipoprotein cholesterol)과 고밀도지단백 콜레스테롤 (High density lipoprotein cholesterol)을 분석한 결과 고지방 식이군에 비해, 혈관벽에 침착되는 콜레스테롤과 결합하고 있는 저밀도지단백 콜레스테롤의 경우는 14.5% 감소한 반면 혈액 내 콜레스테롤을 간으로 운반시켜 동맥경화 발병을 낮추는 고밀도지단백 콜레스테롤의 경우 18.6% 상승하였다 (표 3-3-9).

표 3-3-9. 정상 식이 혹은 고지방 식이를 급여한 쥐에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 혈중 지질 감소 효과 분석

Group	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
ND	184.33 ± 4.52	155.17 ± 4.06	104.00 ± 8.14	16.32 ± 0.35
HDF	200.17 ± 5.02*	224.50 ± 3.30*	82.83 ± 4.67*	24.82 ± 1.59**
HDF + Collagen peptide	188.50 ± 4.29 [#]	200.33 ± 4.03 [#]	98.33 ± 4.23 [#]	21.23 ± 1.38
Collagen peptide	171.17 ± 5.34	167.00 ± 2.68	100.17 ± 5.50	18.80 ± 1.61

개체수 각각 n = 6

*,**정상 식이 (ND) 군과의 비교

[#],[#]고지방 식이 (HFD) 군과의 비교

○ 이상의 결과들로 3T3-L1 세포를 이용한 비만 세포 모델에서 콜라겐 펩타이드는 지방 축적 및 중성지방을 억제하고 지방 분화에 관련된 유전자들을 억제하는 것을 확인하였다. 고지방 식이를 급여하여 제작한 비만 동물 모델에서도 콜라겐 펩타이드는 체중과 지방 관련 유전자들의 발현을 억제하였고 이 결과 지방조직의 크기 또한 작아졌으며 혈중 지질 성분들이 개선되는 결과로부터 콜라겐 펩타이드가 항비만 효과가 있다는 것을 확인하였다.

(3) 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 항산화 및 항노화 효과

○ 쥐의 대동맥에서 초대 배양한 혈관평활근세포에서 콜라겐 펩타이드에 의한 세포독성 영향을 확인하기 위해, 콜라겐 펩타이드를 농도별 (0, 0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg/ml)로 24시간 처리하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 콜라겐 펩타이드 10 mg/ml까지 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다. 따라서, 콜라겐 펩타이드 10 mg/ml 농도에서 항산화 효능을 확인하였다 (그림 3-3-46).

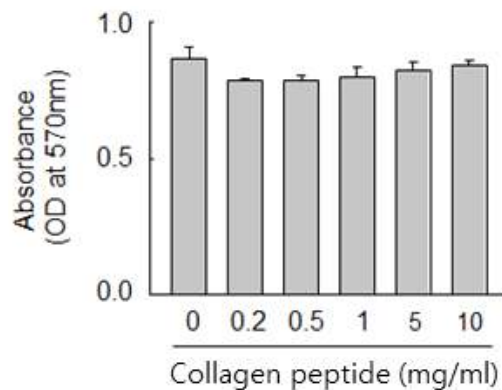


그림 3-3-46. 혈관평활근 세포에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 세포 독성 확인

○ 콜라겐 펩타이드가 H₂O₂에 의한 혈관평활근세포 내의 ROS 생성에 미치는 효과를 DCF-DA assay를 통하여 확인 하였다. 혈관평활근세포에 콜라겐 펩타이드 10 mg/ml을 24시간 전 처리하고, ROS 유발인자인 H₂O₂로 세포내의 ROS 생성을 유도하여 DCF 형광강도를 관찰하였다. 그 결과, 대조군과 비교하여, H₂O₂를 단독 처리한 실험군에서는 유의하게 형광강도의 증가를 보였고, 콜라겐 펩타이드를 전 처리한 군에서는 H₂O₂를 단독 처리한 실험군보다 효과적인 세포 내 ROS 생성 억제되었다 (그림 3-3-47).

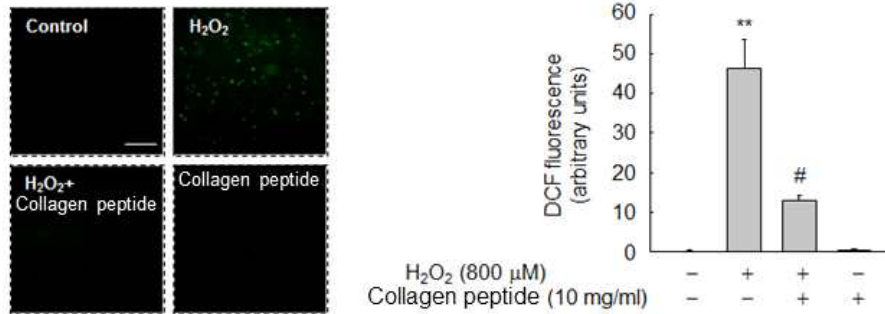


그림 3-3-47. 혈관평활근 세포에서 콜라겐 펩타이드의 H₂O₂에 의해 생성된 ROS 억제 효과 확인

- 사람의 섬유아세포에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 세포독성을 검증하기 위해, 저분자화된 콜라겐 펩타이드를 농도별로 처리하여 MTT assay를 수행한 결과, 1 mg/ml 농도의 저분자화된 콜라겐 펩타이드에서 24시간까지 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다 (그림 3-3-48A). 또한, 항노화 관련 유전자인 elastin의 발현을 살펴본 결과, 저분자화된 콜라겐 펩타이드가 elastin의 발현을 시간 및 농도 의존적으로 증가 시킨다는 것을 알 수 있었다 (그림 3-3-49B, C).

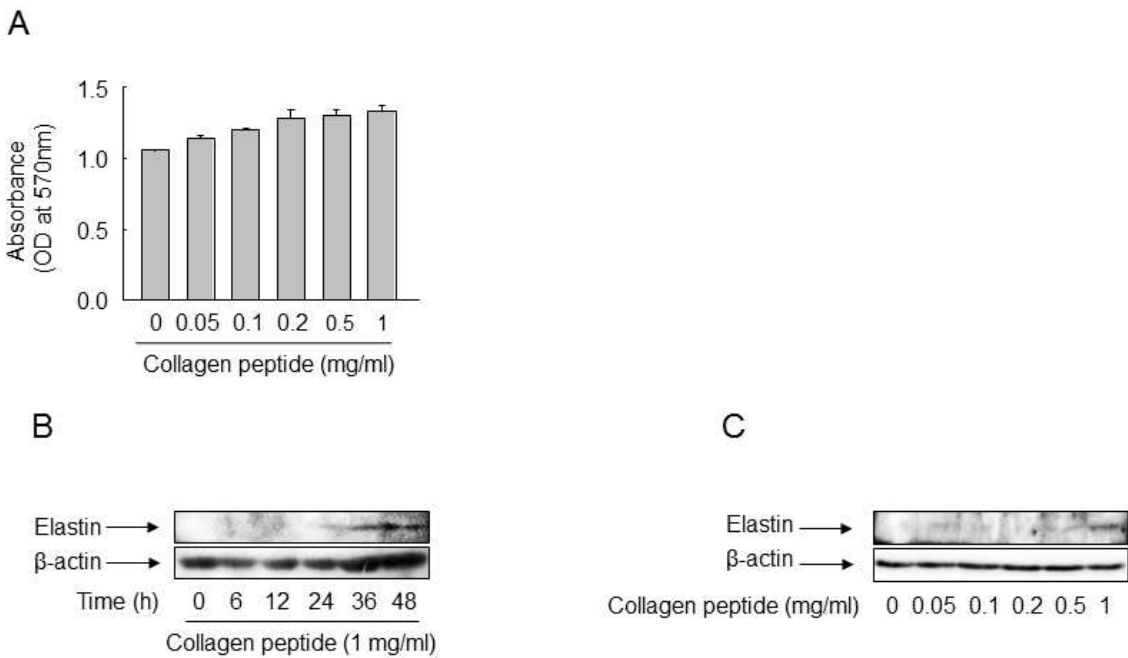


그림 3-3-49. Elastin 발현에 있어서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 효과 분석

- 다음으로, 섬유아세포에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드가 UVB에 의해 유도되는 세포노화에 미치는 효과를 확인하고자 하였다. 섬유아세포에 저분자화된 콜라겐 펩타이드 1 mg/ml을 24시간 전 처리하고, 40 mJ/cm²의 UVB를 조사한 후, 24시간 배양하였다. 그 결과, 대조군과 비교하여, UVB를 단독 처리한 실험군에서는 유의하게 세포노화 마커인 β-galactosidase의 활성이 증가하는 것을 확인하였고, 저분자화된 콜라겐 펩타이드가 전 처리된 실험군에서는 β-galactosidase의 활성이 UVB 단독군에 비해 감소하는 것을 확인하였다 (그림 3-3-50).

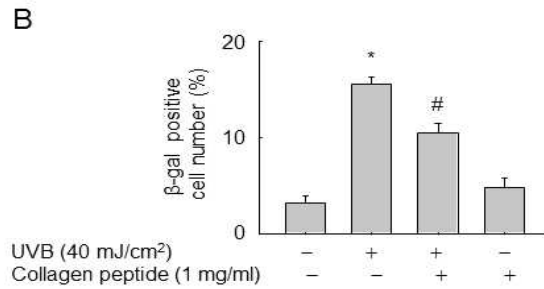
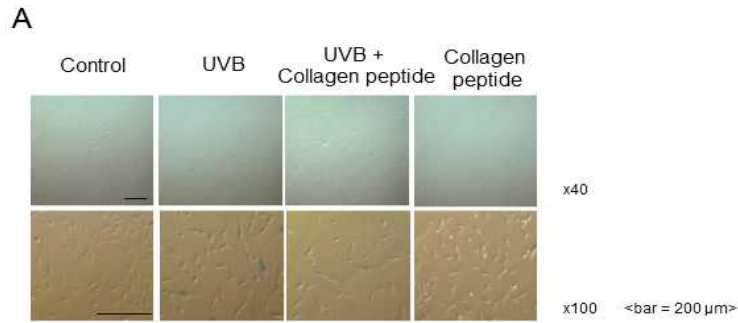


그림 3-3-50. UVB에 의해 유도된 노화마커의 활성에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 효과 검증

- 또한, 섬유아세포에서 콜라겐 펩타이드가 UVB에 의해 유도되는 elastin 파괴에 미치는 효과를 확인하고자 하였다. 섬유아세포에 콜라겐 펩타이드 1 mg/ml을 24시간 전 처리하고, 40 mJ/cm²의 UVB를 조사한 후, 24시간 배양하였다. Western blot을 수행한 결과, 대조군과 비교하여, UVB를 단독 처리한 실험군에서는 elastin의 발현이 현저히 억제하는 것을 확인하였고, 콜라겐 펩타이드가 전 처리된 군에서는 elastin의 발현이 UVB 단독군에 비해 다시 대조군 수준으로 회복되는 것을 확인하였다 (그림 3-3-51).

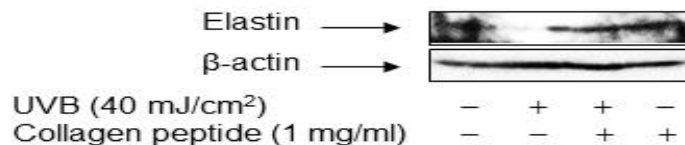


그림 3-3-51. UVB에 의해 억제된 elastin 발현에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 효과 분석

- 마지막으로, 섬유아세포에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드가 UVB에 의해 유도되는 활성산소종 (ROS) 생성에 미치는 효과를 확인하고자 하였다. 섬유아세포에 저분자화된 콜라겐 펩타이드 20 μg/ml을 24시간 전 처리하고, 40 mJ/cm²의 UVB를 조사한 후, 24시간 배양하였다. ROS 생성을 측정된 결과, 대조군과 비교하여, UVB를 단독 처리한 실험군에서는 유의하게 ROS가 증가하는 것을 확인하였고, 저분자화된 콜라겐 펩타이드가 전 처리된 군에서는 ROS가 UVB 단독군에 비해 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 억제는 ROS억제제인 NAC와 동시처리에 의해 더욱 억제되었다 (그림 3-3-52).

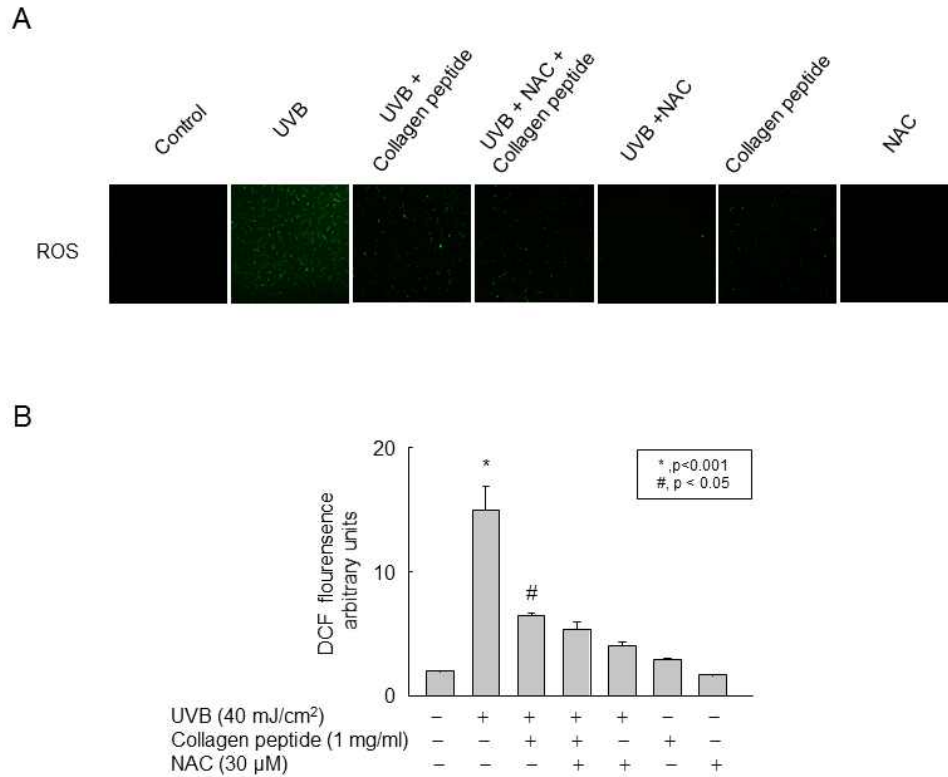


그림 3-3-52. UVB에 의해 유도된 ROS 생성에서 저분자화된 콜라겐 펩타이드의 효과 검증

- 이상의 결과들로 콜라겐 펩타이드는 혈관평활근 세포에 H₂O₂를 처리하여 발생한 ROS를 억제함으로써 산화 스트레스로부터 세포를 보호할 작용이 있음을 시사하였고, 사람의 섬유아세포에 자외선을 조사하여 제작한 노화 모델에서 콜라겐 펩타이드는 elastin의 발현을 증가시켜 자외선에 의한 ROS 생성 및 세포 노화를 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

나. Plant scale 커큐민 소재의 효능검증

(1) 커큐민 에멀전의 항염증 효과

(가) 강황 추출물의 항염 효과

- 면역세포인 RAW264.7 세포에서 강황 추출물의 세포독성을 검증하기 위해, 강황 추출물을 농도별로 처리하여 MTT assay를 수행한 결과, 0.1 mg/ml에서 1 mg/ml까지는 세포독성이 나타나지 않았으나, 5 mg/ml 농도부터는 세포가 사멸하기 시작하였다 (그림 3-3-53A). 따라서, 세포독성실험을 바탕으로 강황 추출물을 0.1 mg/ml부터 5 mg/ml까지 농도별로 처리하였을 때, LPS에 의해 유도된 Nitrite 생성이 강황 추출물 0.5 mg/ml부터 억제되기 시작하여 5 mg/ml에서는 상당히 억제되는 것을 확인할 수 있다 (그림 3-3-53B).

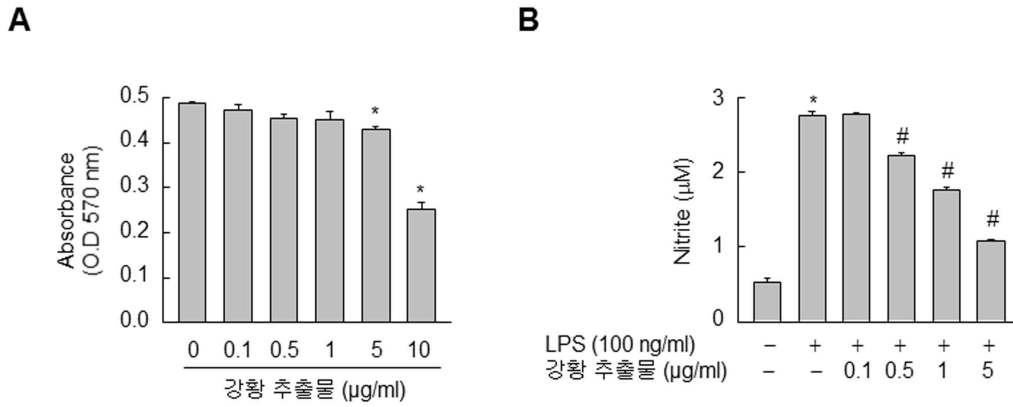


그림 3-3-53. RAW264.7 세포에서 강황 추출물의 세포독성 및 NO생성에 대한 효과 분석

○ RAW264.7 세포에서 염증억제인자인 HO-1의 발현을 측정하기 위해, 강황 추출물을 농도별로 처리하여 HO-1의 단백질 발현을 측정한 결과, 강황 추출물이 농도 의존적으로 HO-1의 발현이 증가하였으며 5 mg/ml의 농도에서 HO-1의 발현이 가장 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-3-54A). 또한, LPS에 의해 유도된 염증유발인자들의 발현 및 분비에 강황 추출물의 효과를 살펴본 결과, LPS에 의해 유도된 HMGB1의 분비 및 iNOS의 발현은 5 mg/ml의 강황 추출물에 의해 억제되었으나, 이것이 COX-2의 발현에는 큰 영향이 없는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-3-54B).

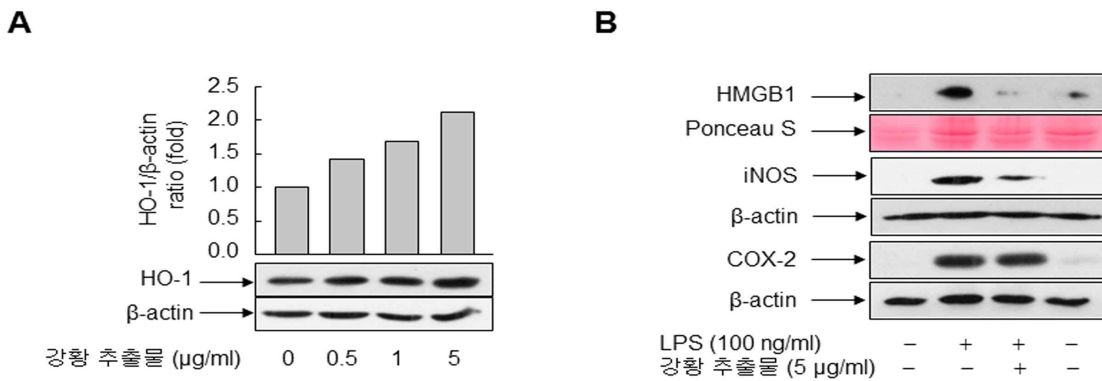


그림 3-3-54. RAW264.7세포에서 염증억제 및 유발 인자의 발현 및 분비에 대한 강황 추출물의 효과 분석

(나) 강황 추출물 나노 에멀전 (커큐민 에멀전)의 항염 효과

○ 면역세포인 RAW264.7 세포에서 강황 추출물 나노 에멀전 (커큐민 에멀전)의 세포독성을 검증하기 위해, 커큐민 에멀전을 농도별로 처리하여 MTT assay를 수행한 결과, 0.1 mg/ml에서 20 mg/ml까지 농도 의존적으로 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-3-55A). 따라서, 세포독성실험을 바탕으로 커큐민 에멀전을 1 mg/ml부터 20 mg/ml까지 처리 하였을 때, LPS에 의해 유도된 Nitrite 생성이 커큐민 에멀전 1 mg/ml부터 억제되기 시작하여 20 mg/ml에서는 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있다 (그림 3-3-55B).

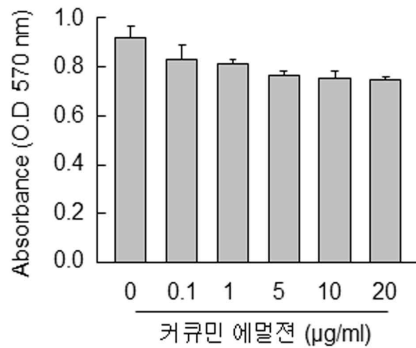
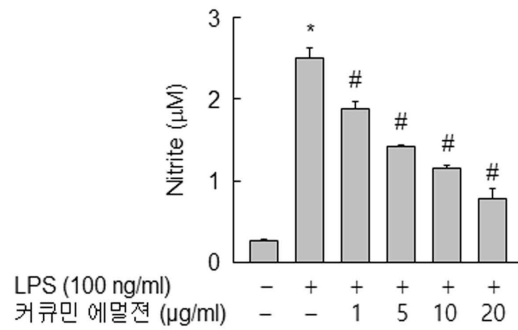
A**B**

그림 3-3-55. RAW264.7세포에서 커큐민 에멀전의 세포독성 및 NO생성에 대한 효과 확인

- RAW264.7 세포에서 염증억제인자인 HO-1의 발현에 있어서 커큐민 에멀전의 효과를 검증하기 위해, 커큐민 에멀전을 농도별로 처리하여 HO-1의 단백질 발현을 측정된 결과, 5 µg/ml의 커큐민 에멀전 농도에서 HO-1의 발현이 가장 증가하였다 (그림 3-3-56).

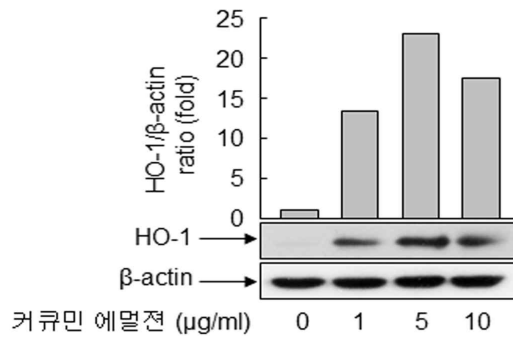


그림 3-3-56. Raw264.7세포에서 염증 억제인자의 발현에 대한 커큐민 에멀전의 효과 분석

- RAW264.7 세포에서 커큐민 에멀전의 항염 효과를 검증하기 위해, LPS에 의해 유도된 염증인자인 HMGB1의 분비에 커큐민 에멀전을 전처리하여 살펴본 결과, LPS에 의해 유도된 HMGB1의 분비가 커큐민 에멀전의 전처리에 의해 억제되는 것을 확인하였으며 (그림 3-3-57A), 이러한 억제가 nitric oxide synthase (NOS) 억제제인 L-NMMA와 동시에 처리하였을 시 더욱 억제되는 것을 확인하였다 (그림 3-3-57B).

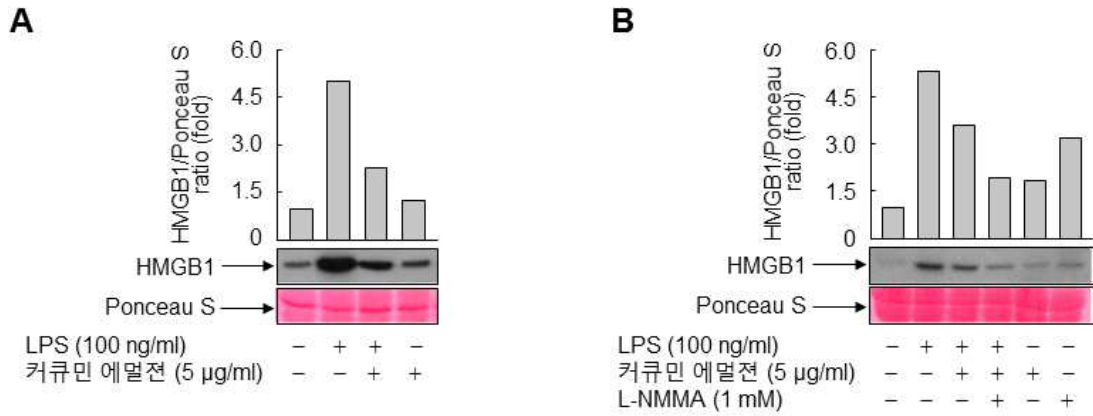


그림 3-3-57. LPS에 의해 유도된 HMGB1분비에 대한 커큐민 에멀전의 억제 효과 분석

- 면역세포인 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 염증관련 신호전달체계인 MAPK 관련 유전자의 인산화에 대한 커큐민 에멀전의 효과를 확인한 결과, 특히적으로 JNK의 인산화를 억제하는 것을 확인 하였다 (그림 3-3-58).

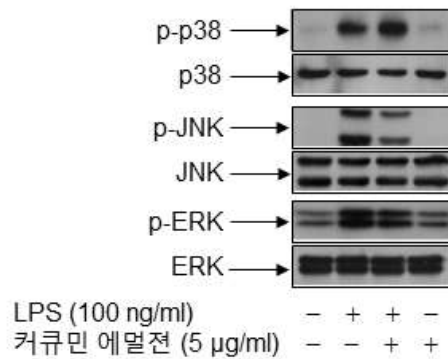


그림 3-3-58. LPS에 의해 유도된 MAPK 인산화에 대한 커큐민 에멀전의 억제 효과 분석

- 이상의 결과들로 강황 추출물 및 커큐민 에멀전 각각 RAW264.7 세포에서 HO-1의 발현을 증가시키고 LPS에 의한 HMGB1의 분비를 억제함으로써 염증성 세포 모델에서 항염 작용이 있다는 것을 확인하였다.

(2) 커큐민 에멀전의 항비만 효과

(가) 비만 세포 모델에서의 강황 추출물의 항비만 효과

- 지방전구세포인 3T3-L1 세포에서 강황 추출물의 세포독성을 측정하기 위해, 강황 추출물을 농도 별로 처리하여 trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 5 mg/ml에서 50 mg/ml까지는 세포 독성이 나타나지 않았으나, 100 mg/ml 농도부터는 세포가 사멸하기 시작하였다 (그림 3-3-59).

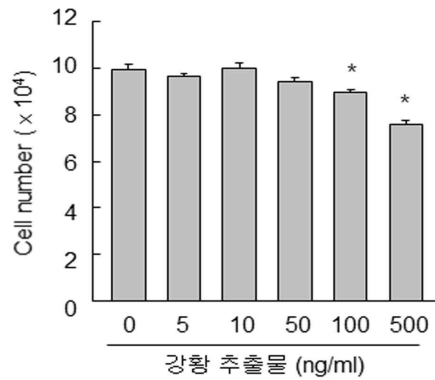


그림 3-3-59. 지방전구세포에서 강황 추출물의 세포독성 측정

(나) 비만 세포 모델에서의 강황 추출물 나노 에멀전 (커큐민 에멀전)의 항비만 효과

○ 지방전구세포에서 강황 추출물 나노 에멀전 (커큐민 에멀전)의 세포독성을 검증하기 위해, 커큐민 에멀전을 농도별로 처리하여 Trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 1~10 µg/ml 농도까지 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인하였으나, 30 µg/ml 농도에서는 세포독성이 나타나고 있음을 확인하여, 본 실험에서는 10 µg/ml의 커큐민 에멀전을 사용하여 지방세포분화에 미치는 효과를 검토하였다 (그림 3-3-60).

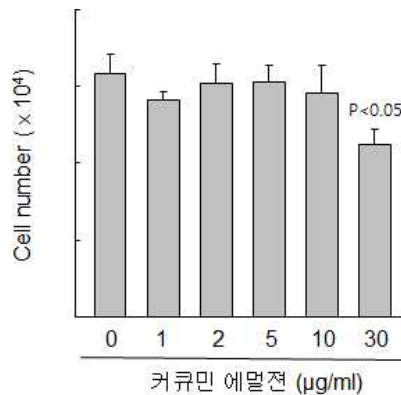


그림 3-3-60. 3T3-L1 지방전구세포에서 커큐민 에멀전의 독성 검증

○ MDI의 처리에 따라 지방세포로 분화된 3T3-L1 세포내의 지방축적 또한, 커큐민 에멀전 10 µg/ml 을 처리한 그룹에서 control 수준으로 유의하게 감소되어 있음을 Oil Red O staining으로 확인할 수 있었고 (그림 3-3-60), Nile Red로 분석한 중성지방의 축적 또한 3배 이상 억제되어 있는 것을 확인하였다 (그림 3-3-61).

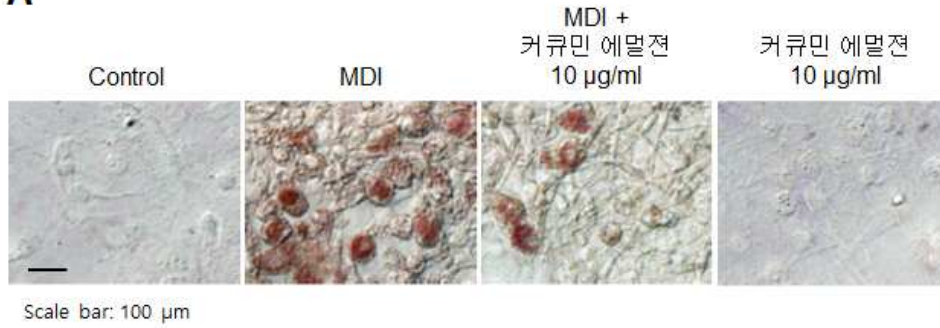
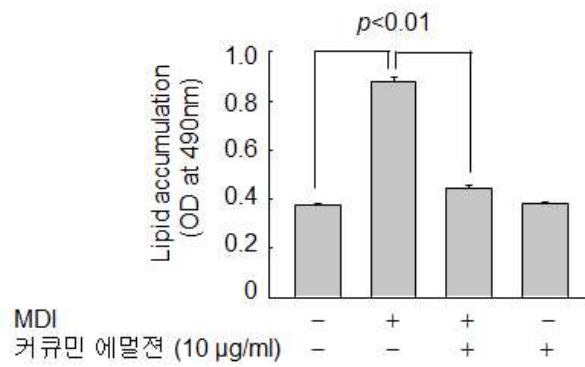
A**B**

그림 3-60. 지방세포 분화에 있어서
커큐민 에멀전의 억제 효과 검증

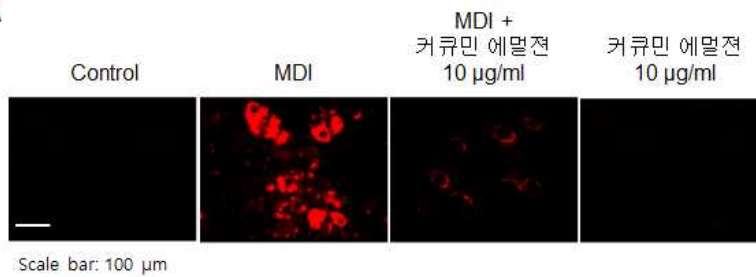
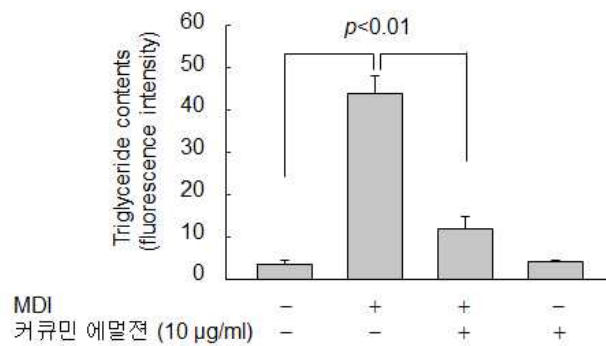
A**B**

그림 3-3-61. 중성지방 축적에 대한
커큐민 에멀전의 억제 효과 검증

- 지방세포분화에 있어서의 커큐민 에멀전의 효과를 3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 분화시키는 시약인 MDI (IBMX, Dexamrthasone, Insulin)와 커큐민 에멀전 10 ug/ml을 동시에 처리하여 8 일 동안 분화시킨 후, 잘 알려진 지방세포분화인자인 PPAR γ , aP2, C/EBP α 의 발현을 Western blot으로 분석한 결과, MDI에 의해 증가된 PPAR γ , aP2, C/EBP α 의 발현이 커큐민 에멀전을 처리한 그룹에서 억제되고 있음을 확인하였다 (그림 3-3-62).

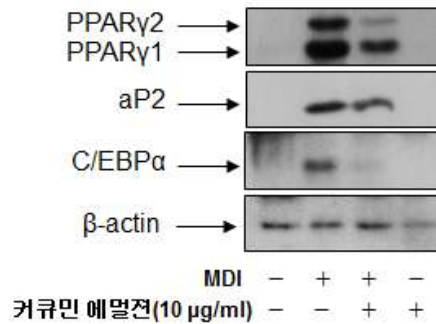


그림 3-3-63. 지방분화 관련 유전자의 발현에 대한 커큐민 에멀전의 억제 효과 분석

(다) 비만 동물 모델에서의 강황 추출물 나노 에멀전 (커큐민 에멀전)의 항비만 효과

- 커큐민 에멀전의 항비만 효과가 세포 실험과 마찬가지로 동물 실험에서도 효능이 있는지를 확인하기 위하여 6주령 ICR 수컷 생쥐에게 8주간 정상 식이 혹은 고지방 식이를 실시하여 비만 동물 모델을 작성하였다. 커큐민 에멀전은 1주일에 3번 300 mg/kg/day로 경구투여하였다. 8주 후 쥐의 체중 및 식이 섭취 효율을 분석한 결과, 정상 식이군에 비해 고지방 식이에 의한 체중의 증가가 뚜렷하게 나타나는 것을 확인하였다. 그러나 커큐민 에멀전을 함께 투여한 실험군에서 고지방 식이에 의한 체중 증가의 감소가 나타나지 않았으며 고지방 식이 단독 실험군에 비해 체중이 더 많이 증가하였다. 이는 고지방 식이와 커큐민 에멀전을 같이 처리한 실험군에서 식이 섭취량이 2배 이상 차이나는 특징 때문으로 사료된다 (표 3-3-10).

표 3-3-10. 고지방 식이를 급여한 쥐에서 커큐민 에멀전의 체중 및 식이 섭취 효율 분석

Groups	Weight (g)			Food intake (g)	Food efficiency ratio (%)
	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g)		
ND	29.54 ± 0.86	39.98 ± 0.92	10.44	2109.5	0.45
HFD	28.55 ± 0.64	48.03 ± 2.30*	19.48*	1861.5	1.04
HFD + 커큐민 에멀전	28.76 ± 0.50	51.82 ± 2.77	23.06	4120.3	0.56
커큐민 에멀전	29.85 ± 0.69	41.00 ± 1.22	11.15	1992.4	0.56

개체수 각각 n = 6

*정상 식이 (ND) 군과의 비교

- 고지방 식이를 처리 후 8주 후 실험 개체들의 지방 조직을 적출하여 지방 세포의 크기를 확인하였다. 그 결과 앞서 고지방 식이 단독 실험군에 비해 고지방 식이와 커큐민 에멀전을 같이 투여한 군의 체중 증가가 더 상승하였음에도 불구하고 지방 세포의 크기는 고지방 식이 실험군이 가장 컸으며 커큐민 에멀전을 함께 투여한 실험군은 지방 세포의 크기가 감소하는 것을 확인하였다 (그림 3-3-64).

림 3-3-64). 간과 지방 조직에서 지방 분화 관련 단백질들의 발현을 조사한 결과, 고지방 식이에 의해 증가한 PPAR γ , aP2, C/EBP α 의 발현이 커큐민 에멀전을 투여한 군에서 모두 감소되는 것을 확인하였다 (그림 3-3-65).

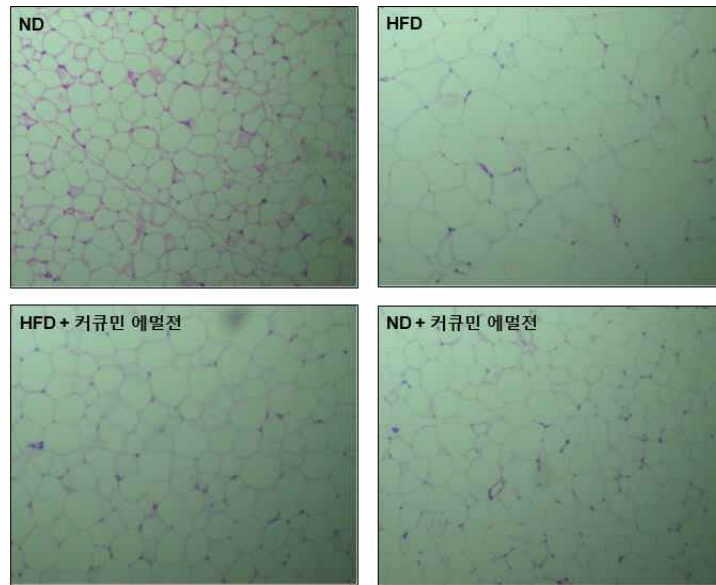


그림 3-3-64. 정상 식이 및 고지방 식이군에서 커큐민 에멀전의 지방 세포 억제 효과 분석

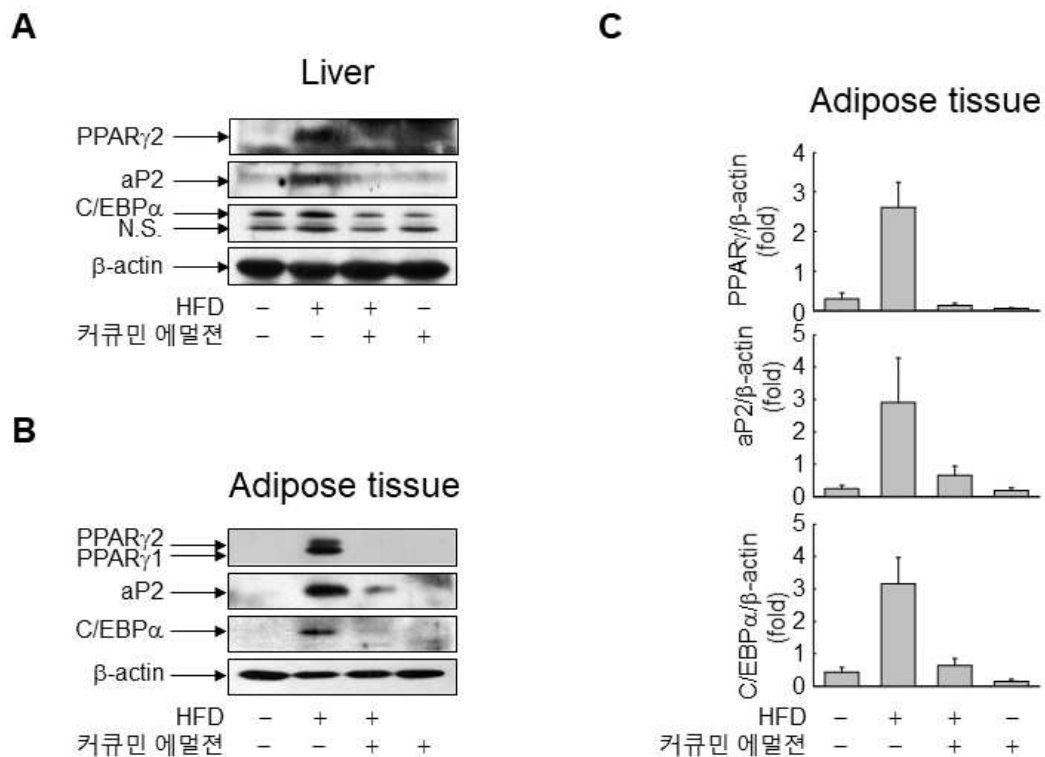


그림 3-3-65. 커큐민 에멀전을 투여한 고지방 식이군의 간과 지방 조직에서의 지방 분화 단백질들의 발현 조사

- 비만 동물 모델에서의 커큐민 에멀전의 항독성 효과를 확인하기 위하여 정상 식이 및 고지방 식이를 8주간 진행한 쥐의 혈중 지질을 분석하였다. 고지방 식이를 투여한 실험군에서 혈중 중성지방 (TG), 총 콜레스테롤 (TC), 저밀도 지단백 콜레스테롤 (LDL cholesterol)은 증가하였고, 고밀도 지단백 콜레스테롤 (HDL cholesterol)은 감소하였다. 그러나 커큐민 에멀전을 같이 투여한 실험군에서는 이러한 고지방 식이에 의한 혈중 지질 성분의 변화가 크게 차이하지 않았다 (표 3-3-11).

**표 3-3-11. 고지방 식이를 급여한 쥐에서
강황 추출물과 커큐민 에멀전의 혈중 지질 성분 분석**

Group	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
ND	185.75 ± 7.95	155.13 ± 4.23	104.00 ± 7.83	16.58 ± 2.64
HDF	201.50 ± 5.68*	224.00 ± 3.95*	86.00 ± 6.39*	24.97 ± 3.58*
HDF + 커큐민 에멀전	192.50 ± 6.49	203.00 ± 4.08	91.33 ± 6.11	22.5 ± 4.06
커큐민 에멀전	168.33 ± 7.74	179.50 ± 5.01	105.67 ± 5.92	17.53 ± 6.19

개체수 각각 n = 6

*정상 식이 (ND) 군과의 비교

- 이상의 결과들로 커큐민 에멀전이 세포 모델 및 동물 모델에서도 일부 효과가 있었으나 30 µg/ml 에서 세포 독성이 나타나거나 동물 실험에서 식이 섭취가 비정상적으로 과도하게 일어나는 등의 문제가 있음을 확인하였다.

(3) 커큐민 에멀전의 항산화 및 항노화 효과

(가) 강황 추출물의 항산화 및 항노화 효과

- 쥐의 대동맥 혈관평활근세포에서 강황 추출물이 미치는 세포독성 영향을 확인하기 위해, 강황 추출물을 농도별 (0, 0.1, 1, 5, 10, 20 µg/ml)로 24시간 처리하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 강황 추출물 20 µg/ml까지 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다. 따라서, 강황 추출물 20 µg/ml 농도에서 항산화 효능을 확인하였다 (그림 3-3-66).

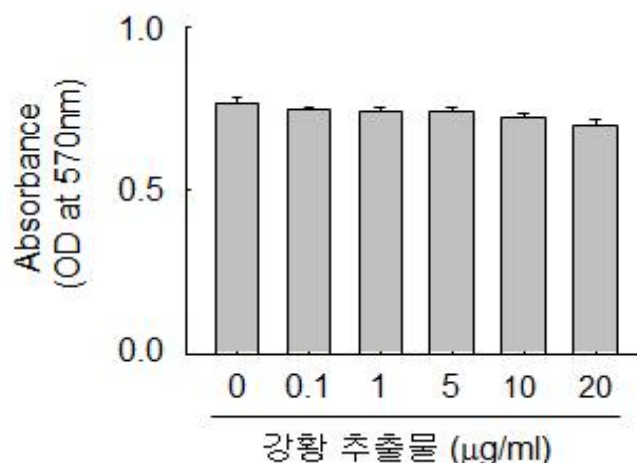


그림 3-3-66. 강황 추출물이 세포 독성에 미치는 영향.

- 강황 추출물이 H₂O₂에 의한 혈관평활근세포 내의 ROS 생성에 미치는 효과를 DCF-DA assay를 통하여 확인 하였다. 혈관평활근세포에 강황 추출물 20 µg/ml을 24시간 전 처리하고, ROS 유발인자인 H₂O₂로 세포내의 ROS 생성을 유도하여 DCF 형광강도를 관찰하였다. 그 결과, 대조군과 비교하여, H₂O₂를 단독 처리한 실험군에서는 유의하게 형광강도의 증가를 보았지만, 강황 추출물을 전 처리한 군은 유의성 있는 세포 내 ROS 생성 억제능을 보이지 못하였다 (그림 3-3-67).

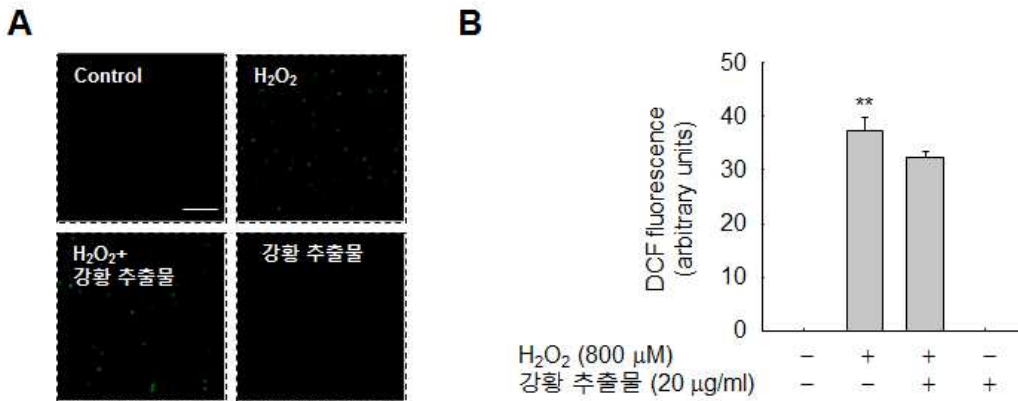


그림 3-3-67. H₂O₂ 처리에 의한 혈관평활근 세포에서 강황 추출물의 ROS 억제 효과 실험

- 강황 추출물이 섬유아세포에 대한 세포독성 영향을 확인하기 위해, 강황 추출물을 농도별 (0, 0.1, 1, 5, 10, 20 µg/ml)로 24시간 처리하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 강황 추출물 20 µg/ml 까지 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다. 따라서, 강황 추출물 10 µg/ml 농도에서 항노화 효능을 확인하였다 (그림 3-3-68).

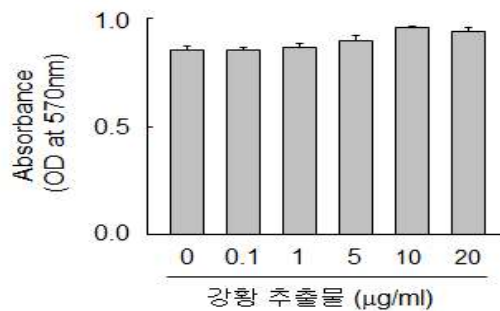


그림 3-3-68. 강황 추출물이 섬유아세포의 세포 독성에 미치는 영향 분석

- 섬유아세포에서 강황 추출물이 UVB에 의해 유도되는 세포노화에 미치는 효과를 확인하고자 하였다. 섬유아세포에 강황 추출물 20 µg/ml을 24시간 전 처리하고, 40 mJ/cm²의 UVB를 조사한 후, 24시간 배양하였다. 그 결과, 대조군과 비교하여, UVB를 단독 처리한 실험군에서는 유의하게 세포노화 마커인 β-galactosidase의 활성이 증가하는 것을 확인하였고, 강황 추출물이 전 처리된 군에서는 β-galactosidase의 활성이 UVB 단독군에 비해 약간 감소되었지만 유의차를 나타내지 않았다. 따라서, 강황 추출물의 항노화 효과를 확인 할 수 없었다 (그림 3-3-69).

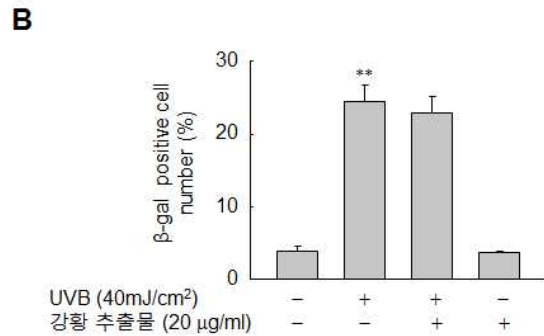
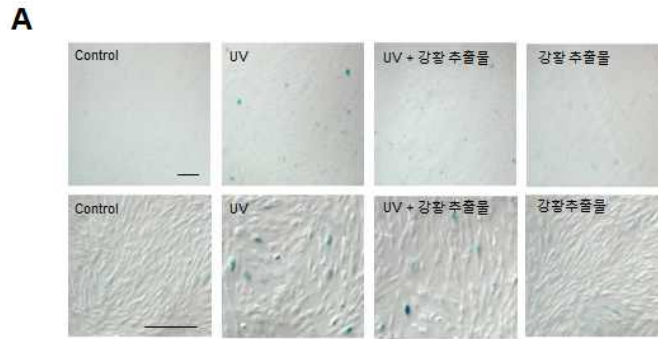


그림 3-3-69. 강황 추출물의 항노화 효과 검증

○ 이상의 결과들로부터 혈관평활근 세포에서 강황 추출물은 단독으로는 독성을 나타내지 않으며, H₂O₂에 의한 ROS 생성을 억제하지 못하는 것으로 보아 산화 스트레스로부터 세포 보호작용은 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 섬유아세포에서는 강황 추출물이 단독으로는 독성을 지니지 않는 것을 확인하였으나 자외선에 의한 세포 노화 실험에서는 노화를 억제하는 효과는 나타내지 않는 것을 확인하였다.

(나) 강황 추출물 나노 에멀전 (커큐민 에멀전)의 항산화 및 항노화 효과

○ 쥐의 대동맥 혈관평활근세포에서 커큐민 에멀전이 미치는 세포독성 영향을 확인하기 위해, 커큐민 에멀전을 농도별 (0, 0.1, 1, 5, 10, 20 μg/ml)로 24시간 처리하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 커큐민 에멀전 20 μg/ml까지 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다. 따라서, 커큐민 에멀전 20 μg/ml 농도에서 항산화 효능을 확인하였다 (그림 3-3-70).

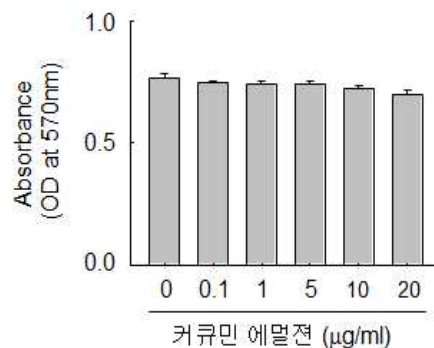


그림 3-3-70. 혈관평활근 세포에서 커큐민 에멀전이 세포 독성에 미치는 영향 확인

- 커큐민 에멀전이 H_2O_2 에 의한 혈관평활근세포 내의 ROS 생성에 미치는 효과를 DCF-DA assay를 통하여 확인 하였다. 혈관평활근세포에 커큐민 에멀전 20 $\mu\text{g/ml}$ 을 24시간 전 처리하고, ROS 유발인자인 H_2O_2 로 세포 내의 ROS 생성을 유도하여 DCF 형광강도를 관찰하였다. 그 결과, 대조군과 비교하여, H_2O_2 를 단독 처리한 실험군에서는 유의하게 형광강도의 증가를 보였고, 커큐민 에멀전을 전 처리한 군에서는 H_2O_2 를 단독 처리한 실험군보다 효과적인 세포 내 ROS 생성 억제능을 보였다 (그림 3-3-71).

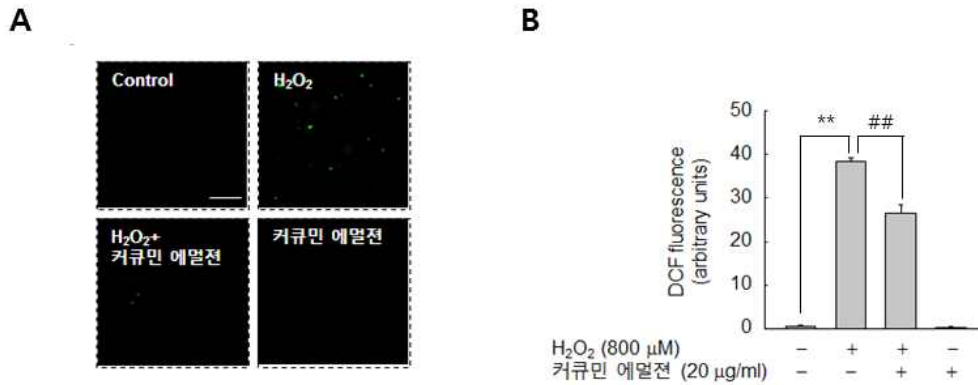


그림 3-3-71. H_2O_2 에 의한 혈관평활근세포 내의 ROS 생성에 커큐민 에멀전의 항산화 효과 검증

- 강황 추출물 나노 에멀전 (커큐민 에멀전)이 섬유아세포에 대한 세포독성 영향을 확인하기 위해, 커큐민 에멀전을 농도별 (0, 0.1, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$)로 24시간 처리하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 커큐민 에멀전 20 $\mu\text{g/ml}$ 까지 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다. 따라서, 커큐민 에멀전 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 항노화 효능을 확인하고자 한다 (그림 3-3-72).

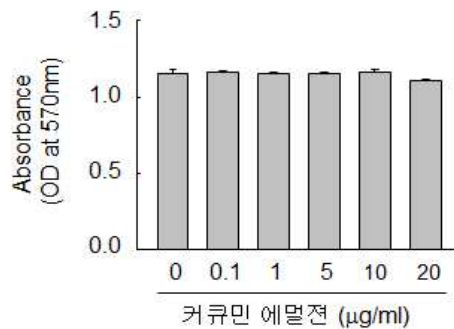


그림 3-3-72. 섬유아세포에서 커큐민 에멀전이 세포 독성에 미치는 영향 확인

- 섬유아세포에서 강황 추출물 나노 에멀전 (커큐민 에멀전)이 UVB에 의해 유도되는 세포노화에 미치는 효과를 확인하고자 하였다. 섬유아세포에 커큐민 에멀전 20 $\mu\text{g/ml}$ 을 24시간 전 처리하고, 40 mJ/cm^2 의 UVB를 조사한 후, 24시간 배양하였다. 그 결과, 대조군과 비교하여, UVB를 단독 처리한 실험군에서는 유의하게 세포노화 마커인 β -galactosidase의 활성이 증가하는 것을 확인하였으나, 커큐민 에멀전이 전 처리된 군에서는 β -galactosidase의 활성이 억제되는 것으로부터 커큐민 에멀전의 항노화 효과를 확인 할 수 있었다 (그림 3-3-73).

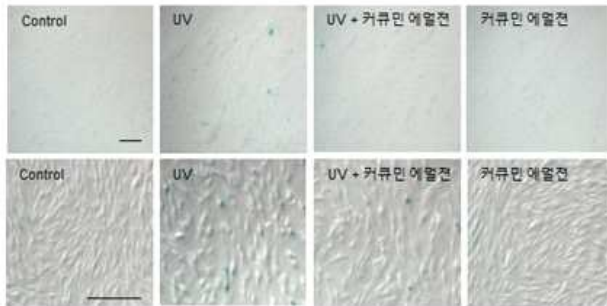
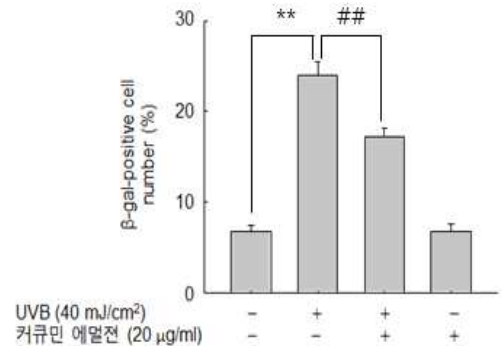
A**B**

그림 3-3-73. UVB 조사에 의한 섬유아세포에서의 커큐민 에멀전의 항노화 효과 검증

- 이상의 결과들로 커큐민 에멀전이 혈관 평활근 세포에서 H₂O₂에 의한 ROS 생성을 줄이는 효과가 있음을 확인하였고, 섬유 아세포에서는 자외선에 의해 증가된 세포 노화를 억제하는 것으로 보아 항산화 및 항노화 효과가 있는 것을 시사하였다.

다. 개발된 커큐민 나노 소재의 효능검증

(1) 지방 독성 세포 모델에서의 강황 추출물과 개발된 커큐민 나노 소재의 지방독성 억제 효과

- 간세포인 HapG2 세포에 강황 추출물과 개발된 커큐민 나노 소재 (커큐민 에멀전)를 1 µg/ml부터 30 µg/ml까지 농도 의존적으로 처리하여 MTT assay로 분석한 결과 세포 독성이 나타나지 않았다 (그림 3-3-74A, B). 유리지방산인 palmitate를 처리하여 작성한 세포 독성 모델에서도 강황 추출물은 5 µg/ml부터 10 µg/ml까지 세포를 palmitate에 의한 독성으로부터 세포를 보호하는 효과를 보였으며 커큐민 에멀전의 경우 2 µg/ml부터 유의하게 효과를 보이며 10 µg/ml에서 최대의 독성 억제 효과를 나타내었다(그림 3-3-74C, D). 한편, 세포 밖으로 분비되는 LDH를 검출하여 세포독성을 확인하는 실험 palmitate에 의해 증가된 LDH의 분비가 강황 추출물을 처리한 실험군에서는 2 µg/ml부터 유의하게 감소되어 10 µg/ml에서 최대 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였고 커큐민 에멀전을 처리한 실험군에서도 2 µg/ml부터 유의하게 감소되어 10 µg/ml에 최대 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다 (그림 3-3-75).

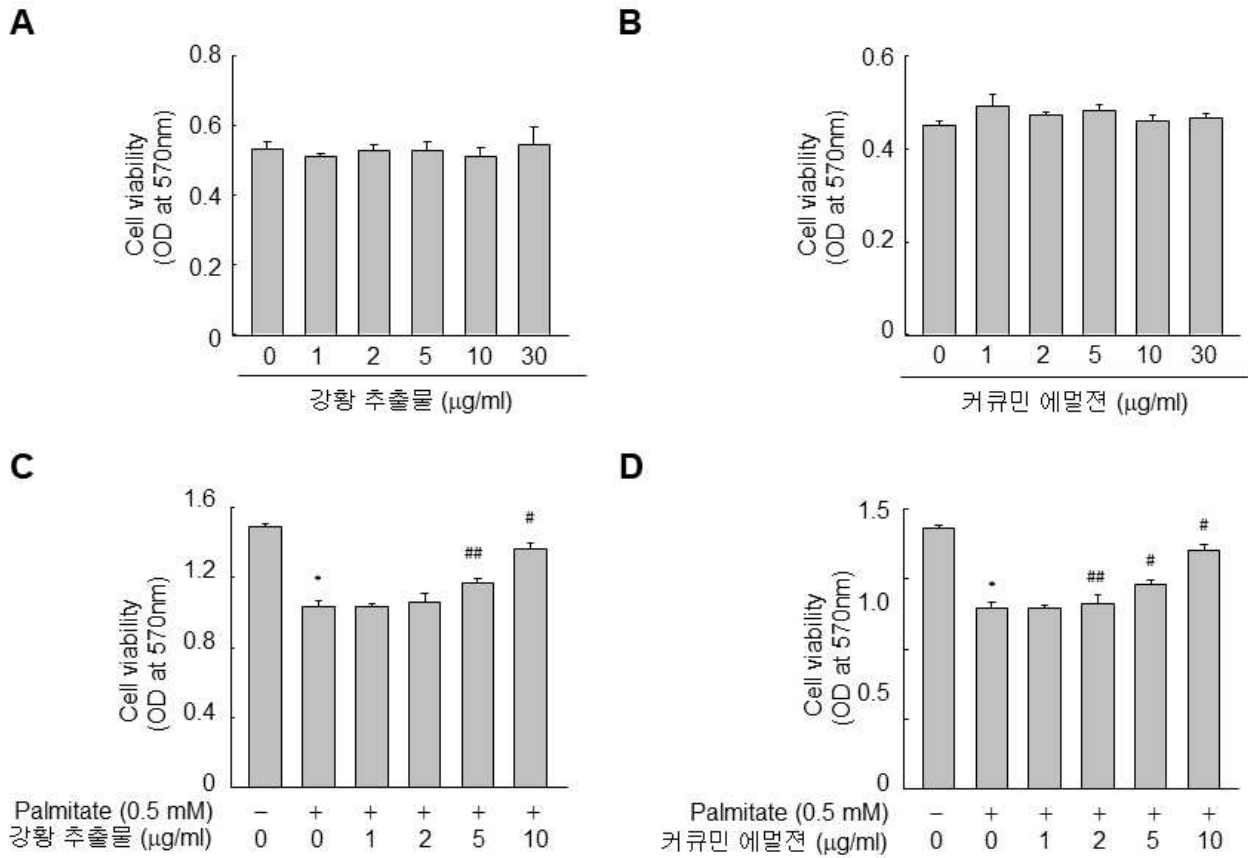


그림 3-3-74. Palmitate를 처리한 HepG2 세포에서의 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 세포 독성 억제 효과 확인

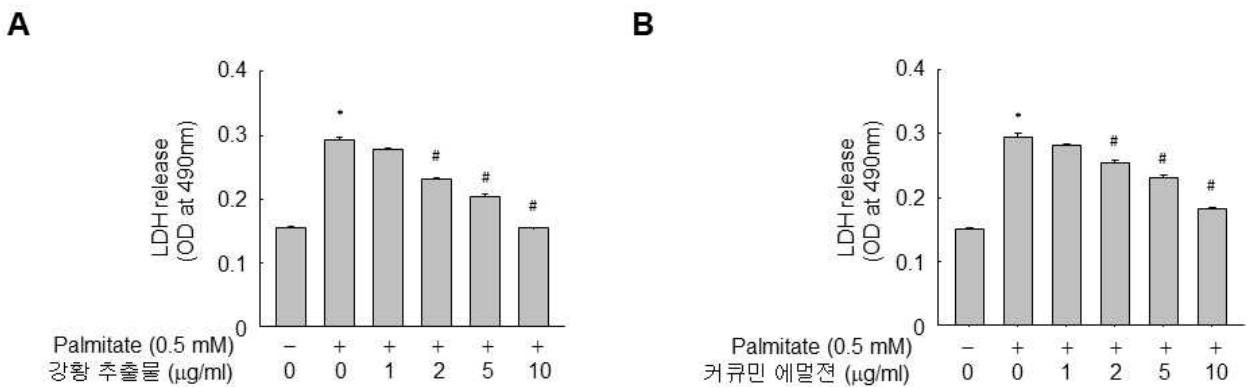


그림 3-3-75. 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 palmitate에 의한 LDH 분비 억제 효과 확인

○ 간세포인 HepG2 세포에 palmitate를 처리하면 지방 축적 및 중성지방의 축적이 일어나 간세포에 독성을 초래한다. Palmitate와 강황 추출물과 커큐민 에멀전을 각각 10 µg/ml 동시 처리하고 Oil red o 염색으로 지방의 축적을 분석하였다. 그 결과, palmitate에 의해 증가된 지방의 축적은 강황 추출물과 커큐민 에멀전 모두에서 억제 효과를 나타내었다 (그림 3-3-76A, B). Nie red 염색으로 본 중성지방 축적을 확인하는 실험에서도 앞서와 마찬가지로 palmitate에 의해 증가된 중성 지방 축적이 강황 추출물과 커큐민 에멀전에서 모두 억제됨을 확인하였다 (그림 3-3-76C, D).

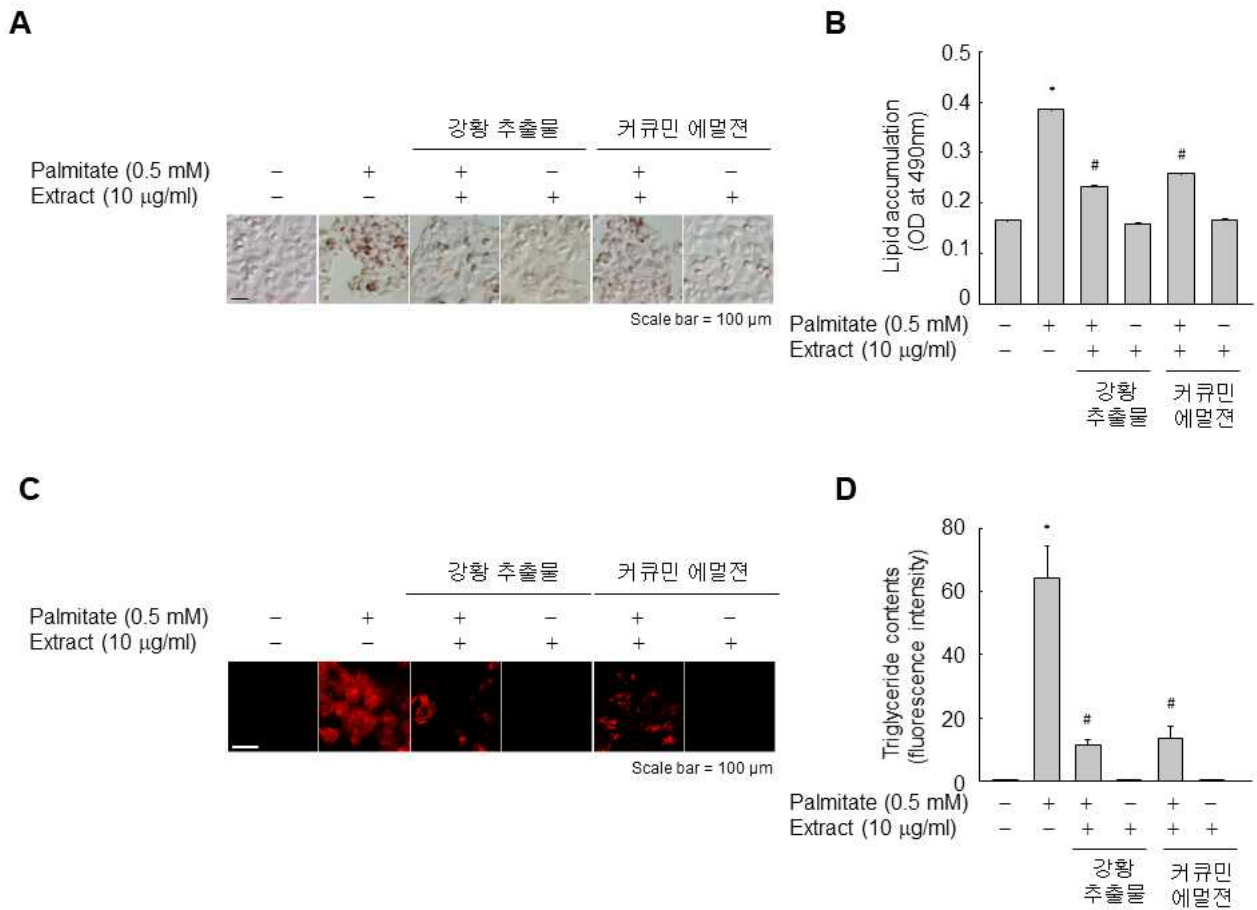


그림 3-3-76. 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 palmitate에 의한 지방 축적 및 중성지방 축적 억제 효과 검증

- 앞선 실험에서 HapG2 세포에 palmitate를 처리하면 지방 축적 및 중성지방의 축적이 일어나는 것을 확인하였다. 이때 지방분화에 관련한 유전자들의 mRNA 및 단백질 발현을 조사하였다. 그 결과, RT-PCR 분석으로 palmitate에 의해 PPAR γ 2와 SREBP-1의 mRNA 발현이 증가되었고 강황 추출물과 커큐민 에멀전을 각각 동시 처리한 실험군에서 모두 PPAR γ 2와 SREBP-1의 mRNA 발현의 유의하게 억제되는 것을 확인하였다 (그림 3-3-77 A, B). 지방분화 관련 유전자들의 단백질 발현을 western blot으로 조사한 결과 palmitate에 의해 증가한 PPAR γ 2와 SREBP-1의 단백질 발현이 강황 추출물과 나노 에멀전 모두에서 억제되는 것을 확인하였다 (그림 3-3-78C-E).

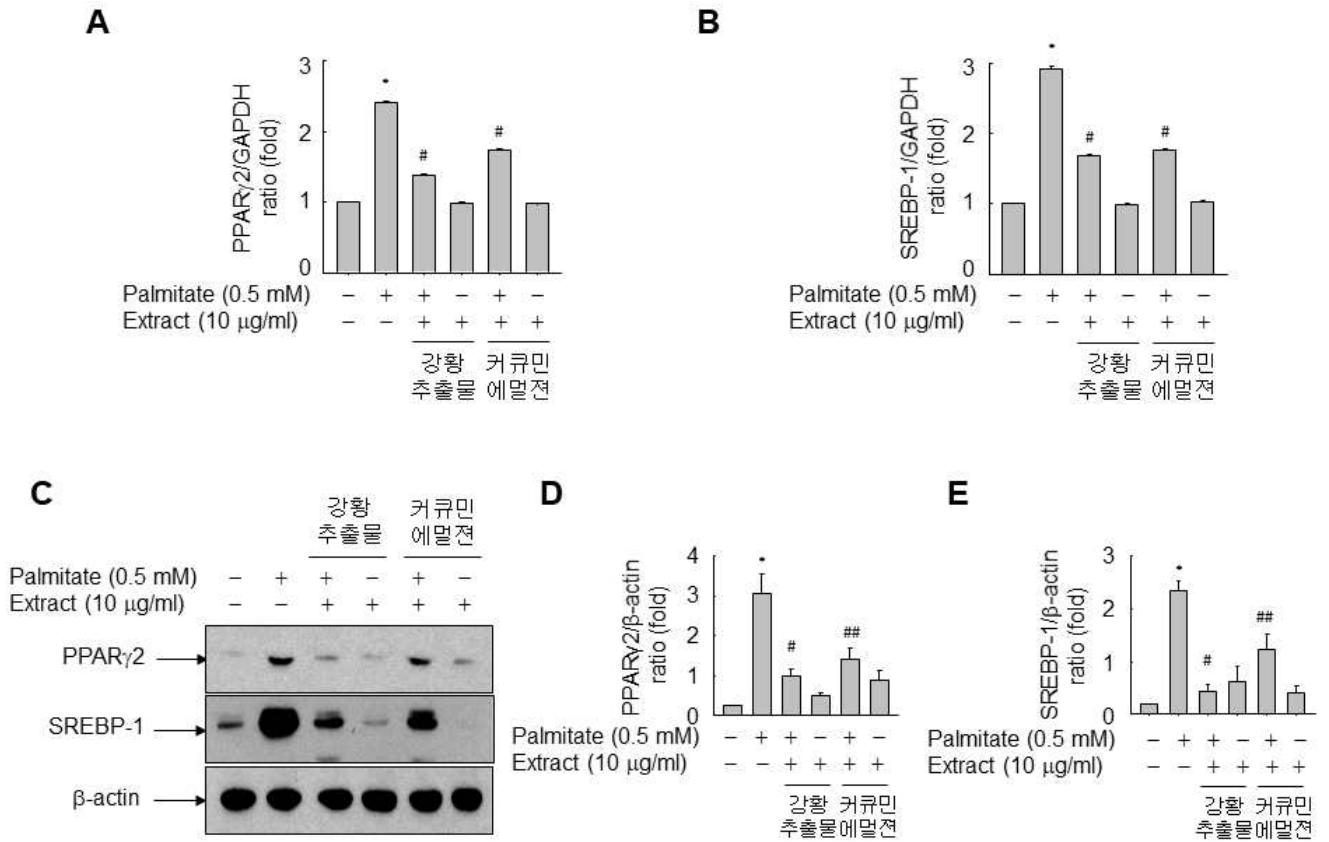


그림 3-3-78. 강황 추출물과 커큐민 에멀전에 의한 palmitate에 유도된 지방분화 관련 유전자의 발현 억제 효과 확인

○ 한편, 세포 독성이 일어날 때 지표로 주요하게 작용하는 ROS를 확인하기 위하여, 간세포인 HapG2 세포에 DCF-DA assay를 수행하여 ROS 생성을 분석한 결과 palmitate에 의해 증가된 ROS를 강황 추출물과 커큐민 에멀전 모두 억제하는 것을 확인하였다 (그림 3-3-79).

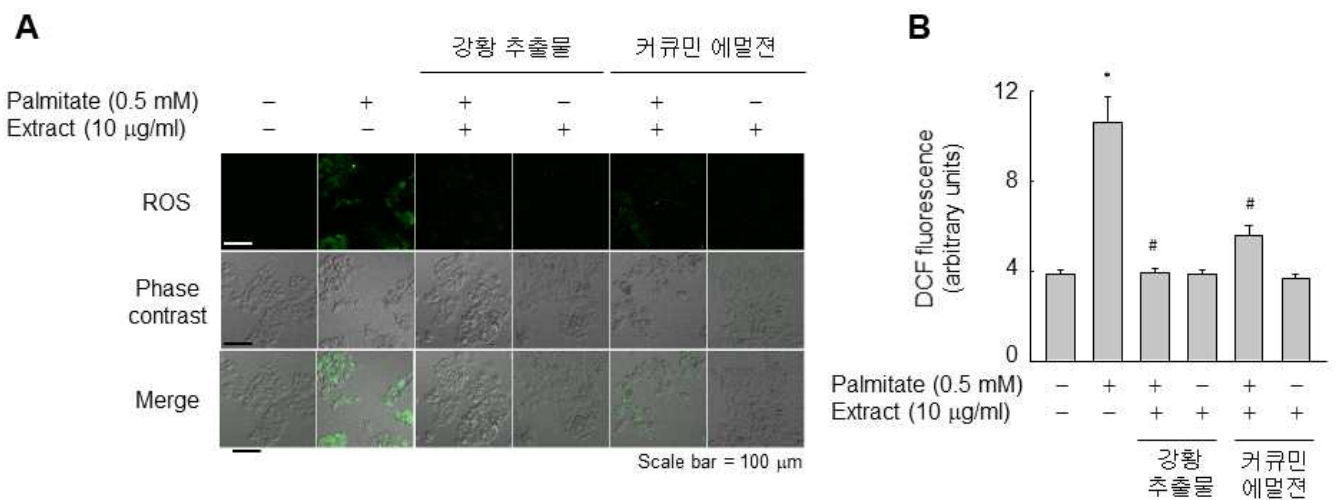


그림 3-3-79. 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 palmitate에 의한 ROS 생성과 LDH 분비 억제 효과 확인

○ 세포 독성에 관련된 아포토시스 (apoptosis) 단백질들과의 관련성을 western blot으로 확인한 결과, HepG2 세포에서 palmitate에 의해 cleaved caspase-3, cleaved PARP의 발현이 증가하였다. 강황 추출물과 커큐민 에멀전을 각각 처리한 실험군에서는 palmitate에 의한 발현 증가가 억제되는 것을 확인하였다 (그림 3-3-80A, B C). 반대로 palmitate에 의해 total PARP의 발현과 HO-1의 발현 감소는 강황 추출물과 커큐민 에멀전 모두에서 발현이 증가하는 것을 관찰하였다 (그림 3-3-80A, D, E). Palmitate에 의한 HepG2 세포에서의 세포독성에 관련된 신호전달 단백질들과의 관련성을 조사한 결과 palmitate 처리에 의해 MAPK kinase인 JNK 1, 2, ERK, p38의 인산화가 일어나는 것을 Western blot으로 확인하였다. 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 처리군에서는 JNK 1, 2의 인산화에는 아무런 영향을 미치지 못하였지만 ERK와 p38 모두에서 각각의 처리군에 의해 인산화가 억제되는 것을 확인하였다 (그림 3-3-81).

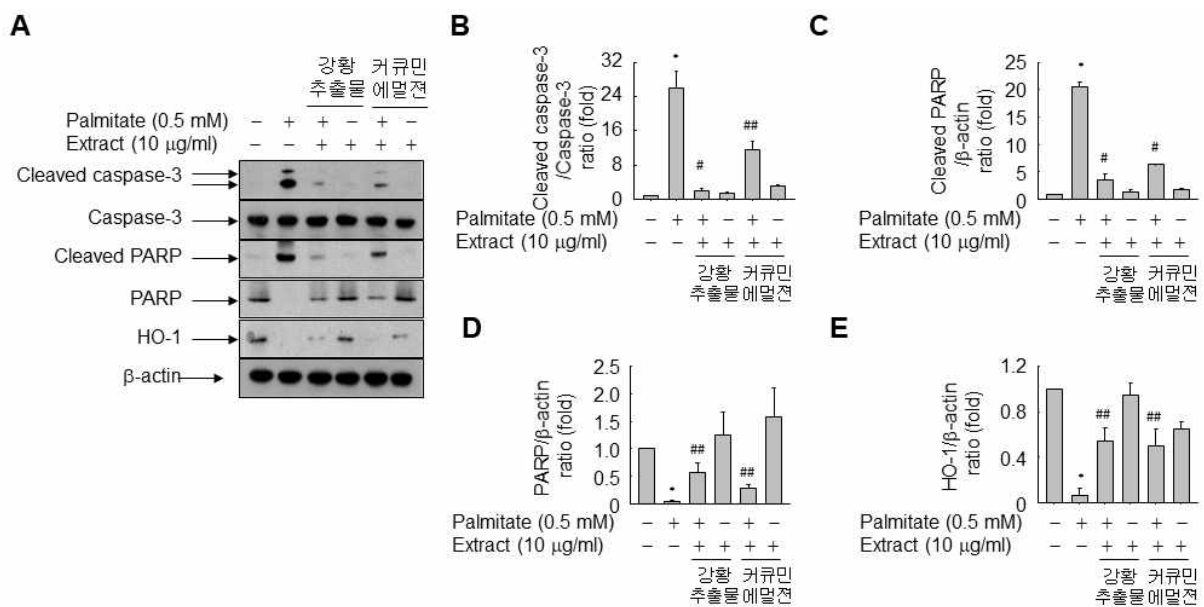


그림 3-3-80. 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 세포 독성 관련 단백질들의 발현 조절 효과 분석

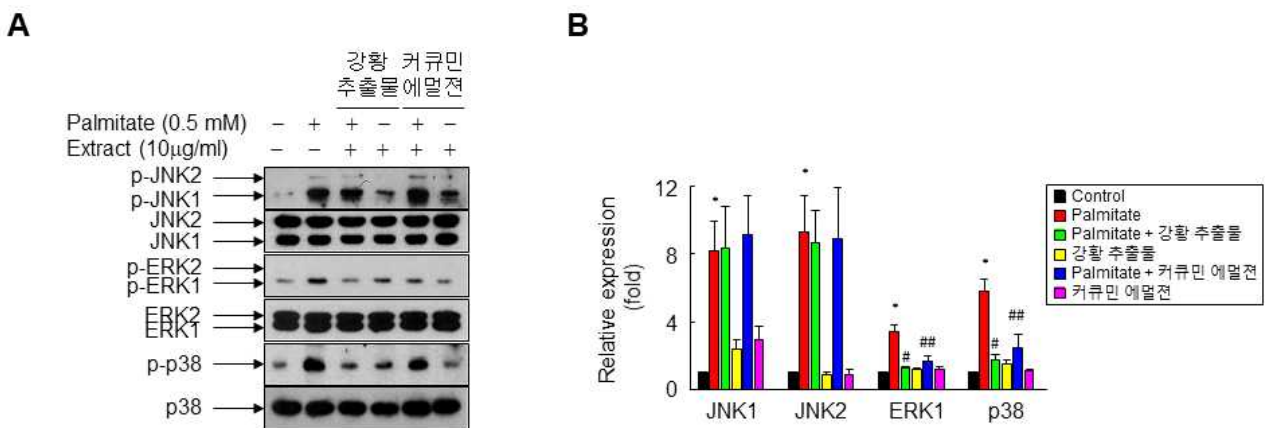


그림 3-3-81. 강황 추출물과 커큐민 에멀전에 의한 palmitate에 의해 유도된 신호전달 단백질들의 인산화 조절 분석.

- 이상의 결과들로 palmitate에 의한 HepG2 세포 독성 모델에서 강황 추출물과 커큐민 에멀전은 ROS 생성과 그에 관련된 유전자들의 발현을 조절하고, 지방 축적을 억제하고 나아가서 지방분화 유전자들의 발현 또한 조절함으로써 지방 독성에 의한 세포사로부터 HepG2를 보호하는 작용이 있다는 것을 세포 모델에서 확인하였다.

(2) 지방 독성 동물 모델에서의 강황 추출물과 개발된 커큐민 나노 소재의 지방독성 억제 효과

- 강황 추출물과 강황 추출물 나노 에멀전 (커큐민 에멀전)의 지방 독성 억제 효과가 세포 실험과 마찬가지로 동물 실험에서도 효능이 있는지를 확인하기 위하여 6주령 ICR 수컷 생쥐에게 8주간 정상 식이 혹은 고지방 식이를 실시하여 8주간 실시하여 지방 독성 동물 모델을 작성하였다. 강황 추출물과 커큐민 에멀전은 1주일에 3번 50 mg/kg/day로 경구투여하였다. 8주 후 쥐의 체중 및 식이 섭취 효율을 분석한 결과, 정상 식이군에 비해 고지방 식이에 의한 체중의 증가가 강황 추출물과 콜라겐 에멀전을 함께 투여한 실험군에서는 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 그러나 각 실험군 간의 식이 섭취 효율에는 큰 차이가 없었다 (표 3-3-12). 쥐의 체중 증가율을 분석한 결과 고지방 식이를 급여한 쥐에서의 체중 증가는 강황 추출물과 커큐민 에멀전을 각각 투여한 실험군에서 3주째부터 유의한 체중 증가 억제 효과가 나타났다 (그림 3-3-82A). 실험 종료 후 각각의 쥐에서 부고환 지방 조직을 적출하여 그 무게를 확인한 결과 고지방 식이에 의해 증가한 지방 조직의 무게는 강황 추출물과 커큐민 에멀전 투여군 각각에서 유의하게 감소하였다 (그림 3-3-82B). 간의 무게를 확인한 결과, 모든 실험군에서 무게의 차이는 나타나지 않는 것을 확인하였다 (그림 3-3-82C).

표 3-3-12. 고지방 식이를 급여한 쥐에서 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 체중 및 식이 섭취 효율 분석

Groups	Weight (g)			Food intake (g)	Food efficiency ratio (%)
	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g)		
ND	18.69 ± 0.39	26.14 ± 0.77	7.45	1711.17	0.44
HFD	19.10 ± 0.37	30.70 ± 0.61*	11.60	1340.80	0.87
HFD + 강황 추출물	19.54 ± 0.27	26.86 ± 0.89#	7.33	1324.33	0.55
강황 추출물	18.90 ± 0.37	26.28 ± 0.36	7.38	1686.64	0.44
HFD + 커큐민 에멀전	18.35 ± 0.42	27.91 ± 0.59#	9.56	1431.27	0.67
커큐민 에멀전	19.29 ± 0.36	26.41 ± 0.35	7.13	1666.82	0.43

개체수 각각 n = 6

*정상 식이 (ND) 군과의 비교

#고지방 식이 (HFD) 군과의 비교

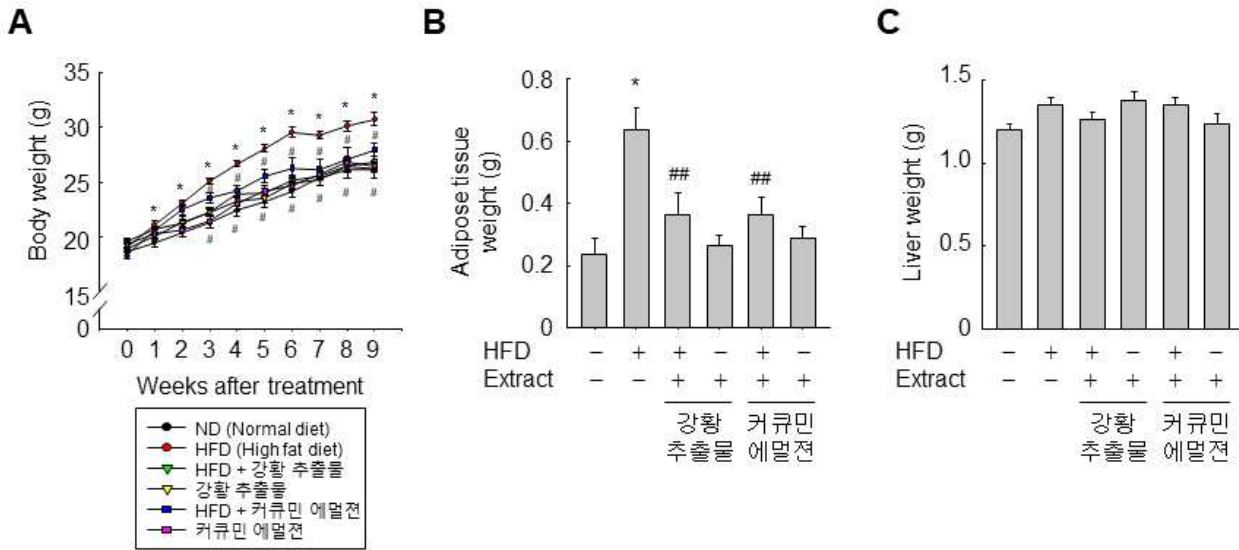


그림 3-3-82. 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 고지방 식이에 의한 체중 증가 및 지방과 간 조직 무게 분석

○ 지방 독성 동물 모델에서의 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 항독성 효과를 확인하기 위하여 정상 식이 및 고지방 식이를 8주간 진행한 쥐의 혈중 지질을 분석하였다. 고지방 식이를 투여한 실험군에서 증가된 혈중 중성지방 (TG)은 강황 추출물을 투여한 실험군에서는 유의하게 감소하였으나 커큐민 에멀전 투여 실험군에서는 유의차를 볼 수 없었다. 혈중 총콜레스테롤 (TC)의 경우 고지방 식이 투여군에서의 증가가 강황 추출물과 커큐민 에멀전 투여군 각각에서 의미있는 감소를 보였다. 혈중 저밀도지단백 콜레스테롤 (LDL cholesterol)과 고밀도지단백 콜레스테롤 (HDL cholesterol)을 분석한 결과 고지방 식이군에 비해, 저밀도지단백 콜레스테롤의 경우는 강황 추출물과 커큐민 에멀전 투여군에서 모두 유의하게 감소한 반면, 고밀도지단백 콜레스테롤의 경우는 두 투여군에서 모두 유의하게 상승하였다 (표 3-3-13, 그림 3-3-83).

표 3-3-13. 고지방 식이를 급여한 쥐에서 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 혈중 지질 성분 분석

Group	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
ND	79.25 ± 4.00	113.13 ± 4.83	100.88 ± 2.27	6.88 ± 0.48
HDF	101.88 ± 4.49*	160.75 ± 4.10*	62.13 ± 3.37*	10.25 ± 0.41*
HDF + 강황 추출물	88.00 ± 2.09 ^{##}	121.25 ± 4.70 [#]	93.38 ± 2.36 [#]	7.50 ± 0.82 [#]
강황 추출물	85.13 ± 5.17	111.00 ± 5.10	92.13 ± 2.82	7.50 ± 0.42
HDF + 커큐민 에멀전	91.63 ± 3.46	137.25 ± 4.70 [#]	86.50 ± 2.78 [#]	9.00 ± 0.53 [#]
커큐민 에멀전	81.00 ± 4.87	111.75 ± 12.11	95.00 ± 6.18	7.00 ± 0.98

개체수 각각 n = 6

*정상 식이 (ND) 군과의 비교

^{##}고지방 식이 (HFD) 군과의 비교

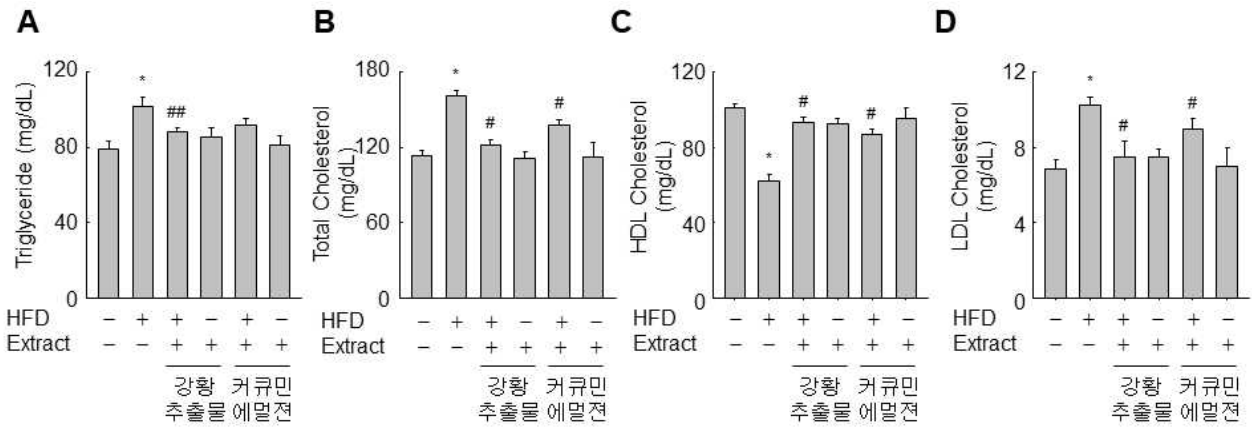


그림 3-3-83. 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 고지방 식이에 의한 혈중 지질 성분 분석

○ 동물 모델에서 지방 독성에 의한 간조직 손상의 정도를 H&E staining으로 확인하였다. 그 결과 고지방 식이를 투여한 군에서 간 조직의 손상이 심하게 나타난 것을 확인하였고 이러한 손상은 강황 추출물과 커큐민 에멀전을 각각 투여한 실험군에서는 손상이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 3-3-84).

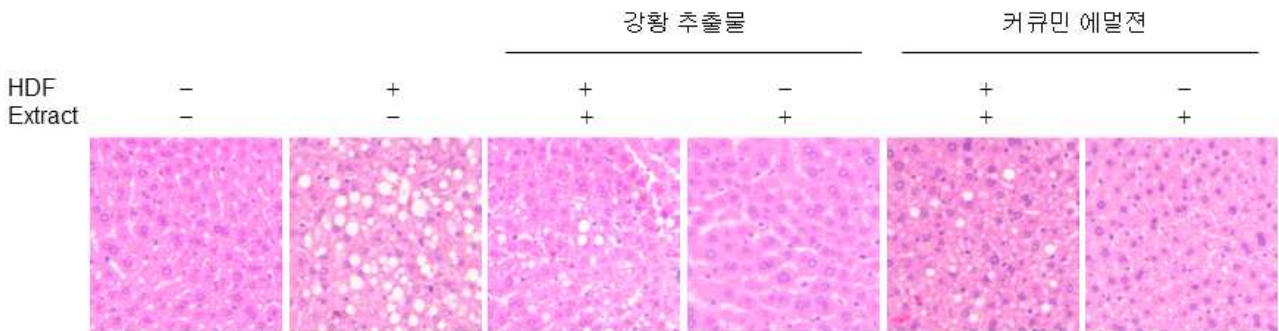


그림 3-3-84. 쥐의 간조직에서 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 고지방 식이에 의한 지방 독성 억제 검증

○ 동물 모델에서 지방 분화 관련 단백질들의 발현을 western blot으로 조사하였다. 고지방 식이군에 의해 증가된 지방 분화 마커 단백질인 PPAR γ 2와 SREBP-1의 발현이 고지방 식이에 의해 증가된 것을 확인하였다. 강황 추출물과 커큐민 에멀전을 각각 투여한 실험군에서는 지방 분화 관련 단백질들의 발현이 유의하게 억제되는 것을 확인하였다 (그림 3-3-85).

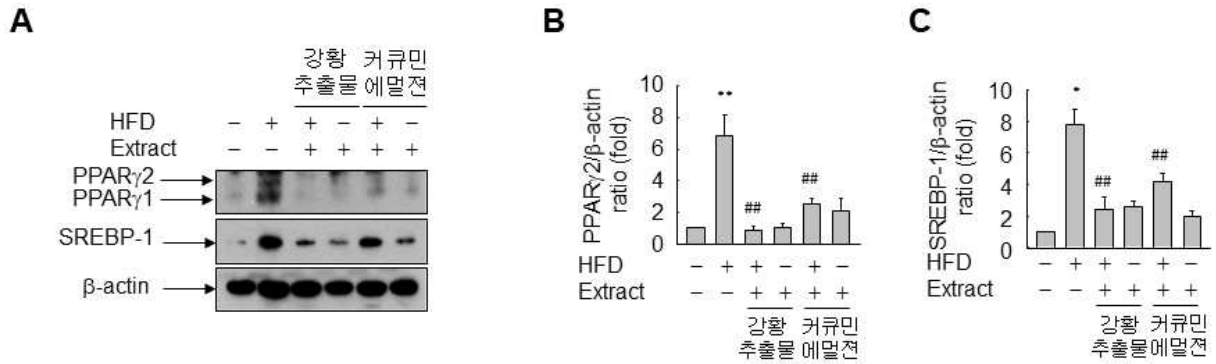


그림 3-3-85. 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 고지방 식이에 의한 지방 분화 관련 단백질들의 발현 조절 효과 분석

○ 세포 독성에 관련된 아포토시스 단백질들과의 관련성을 동물 조직에서 western blot으로 확인한 결과, 고지방 식이에 의해 cleaved caspase-3, cleaved PARP의 발현이 증가하였다. 강황 추출물과 커큐민 에멀전을 각각 처리한 실험군에서는 고지방 식이에 의한 발현 증가가 억제되는 것을 확인하였다 (그림 3-3-86A, B C). 반대로 고지방 식이에 의해 total PARP의 발현과 HO-1의 발현 감소는 강황 추출물과 커큐민 에멀전 모두에서 발현이 증가하는 것을 관찰하였다 (그림 3-3-86A, D, E).

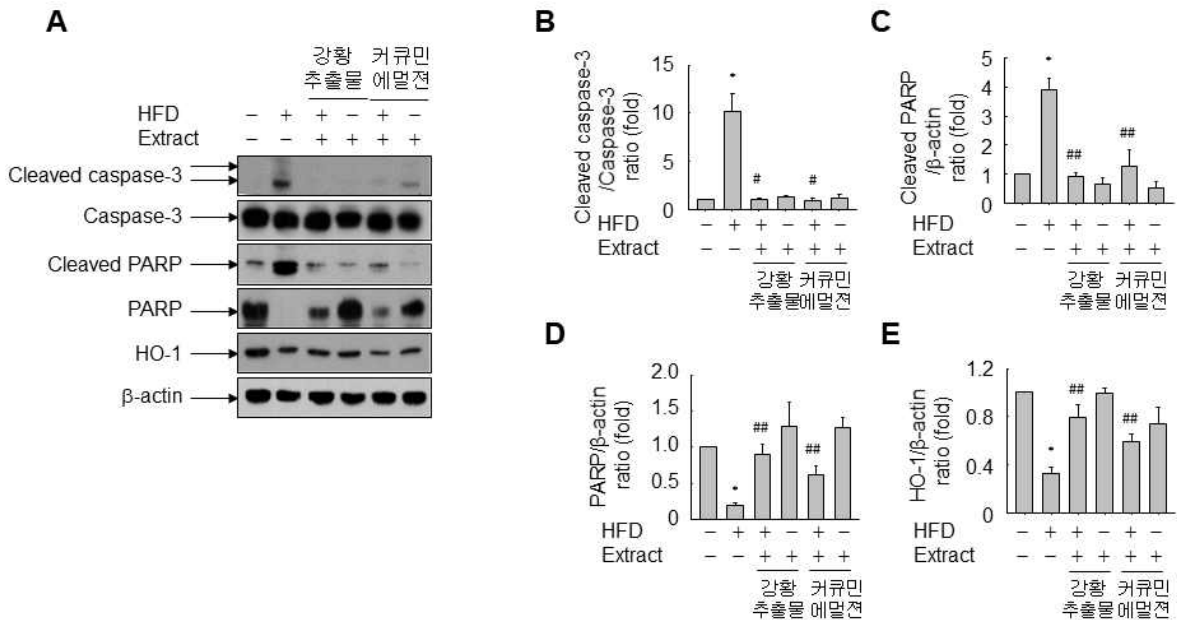


그림 3-3-86. 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 고지방 식이에 의한 세포 독성 관련 단백질들의 발현 조절 효과 분석

○ 이상의 결과들로 고지방 식이에 의한 지방 독성 동물 모델에서 강황 추출물과 개발된 커큐민 나노 소재 (커큐민 에멀전)은 지방 축적을 억제하고 나아가서 지방분화 유전자들의 발현을 조절하며 최종적으로 혈중 지질 성분들을 조절하는 것을 확인하였다. 그리고 지방 축적에 의한 비알콜성 지방증으로 인한 간 손상으로 부터 세포 보호 작용이 있는 것을 세포 독성에 관여하는 단백질들의 발현과 조직 염색으로 확인하였다.

- 위의 실험들은 강황 추출물과 커큐민 에멀전에서 실험한 것으로 강황 추출물이 들어있지 않은 나노 에멀전이 세포 독성이 있는지를 확인하기 위하여 HepG2 세포에 커큐민 에멀전과 같은 농도로 세포에 처리하고 세포 독성을 MTT assay로 확인한 결과, 강황 추출물이 들어 있지 않은 에멀전 단독처리에서는 세포 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다. Palmitate 0.5 mM을 함께 처리한 실험군에서는 커큐민 에멀전과는 달리 세포 보호작용을 나타내지 못하는 것으로 보아 강황 추출물이 들어 있지 않은 나노 에멀전 자체의 세포 독성은 없으나 강황 추출물이 함유된 커큐민 에멀전과는 달리 지방독성으로부터 세포 보호 작용은 없는 것을 확인하였다 (그림 3-3-87).

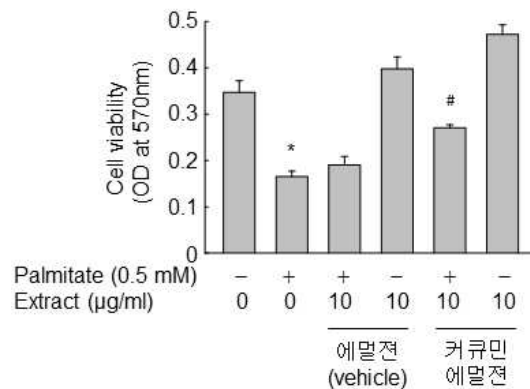


그림 3-3-87. 강황 추출물이 들어있지 않은 나노 에멀전 (vehicle)의 세포 독성 확인

- 앞선 지방독성 억제 효과를 검증하기 위한 실험에서 사용한 강황 추출물과 커큐민 에멀전의 농도는 각각 10 µg/ml이었다. 그러나 실제 강황 추출물의 커큐민 함량은 32.48 µg/ml 인데 반해 커큐민 에멀전의 커큐민 함량은 1.64 µg/ml으로 약 19.8배 농도가 낮다. 그럼에도 불구하고 앞선 실험에서는 커큐민 에멀전을 10 µg/ml 사용하여도 지방 독성 억제 효과가 나타나는 것을 확인하였지만 실제 커큐민 함량을 동일하게 하여 실험해야 하므로 커큐민 에멀전의 농도를 최대 125 µg/ml 까지 해서 HepG2에서 독성을 확인한 결과 세포에 아무런 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다 (그림 3-3-88A). 커큐민 에멀전의 최대농도인 125 µg/ml으로 palmitate 처리에 의한 지방 독성으로부터 세포 보호 효과가 있는지를 MTT assay로 확인한 결과, palmitate에 의한 세포사로부터 세포 보호 작용이 있는 것을 확인하였다 (그림 3-3-88B).

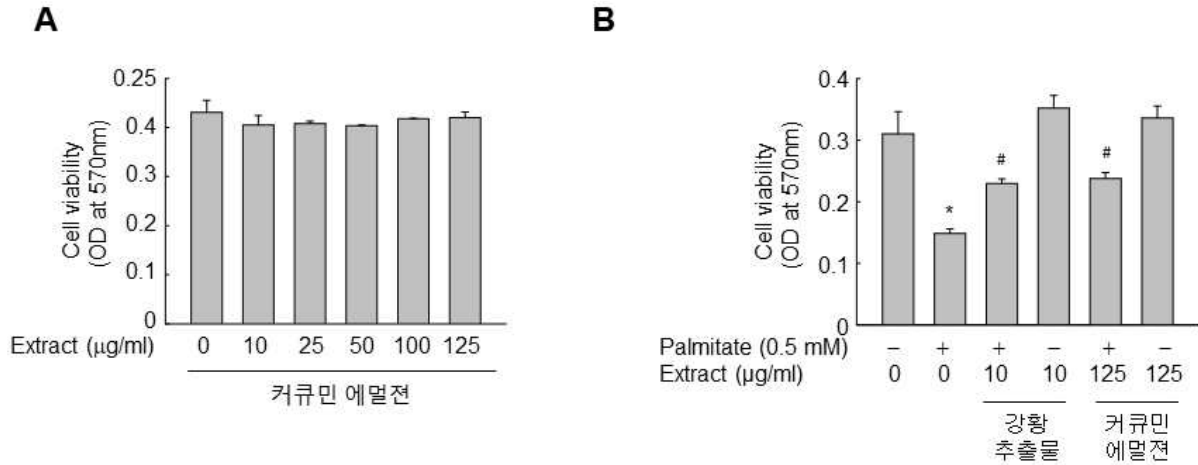


그림 3-3-88. 강황 추출물과 커큐민 함량을 유사하게 맞춘 커큐민 에멀전의 세포 독성 분석

- 이상의 결과들로 커큐민 추출물을 함유하지 않은 나노 에멀전은 그 자체로 세포에 독성을 나타내지 않으나 palmitate에 의한 지방 독성에서는 아무런 역할을 하지 않는 것을 확인하였으며 커큐민 에멀전의 커큐민 함량을 강황 추출물에 유사하게 맞춘 실험에서는 커큐민 에멀전 자체 독성은 없으며 강황 추출물 및 커큐민 에멀전 10 µg/ml 사용 때와 유사한 작용을 하는 것을 알 수 있었다. 다만, 커큐민 에멀전의 농도를 125 µg/ml가 아닌, 200 µg/ml으로 사용하여야 기존의 강황 추출물과 커큐민 함유량이 비슷해지기 때문에 향후 개발된 커큐민 나노 소재 (커큐민 에멀전)의 농도를 200 µg/ml으로 하였을 때 단독에서 독성이 있는지 여부와 palmitate에 의한 지방 독성 모델에서 세포 보호 작용이 있는지를 추가적으로 검증할 예정이다.

4절 정량적 연구 목표 성과 및 실적

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술 료	제품 화	매출 액 (억)	수출 액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI						
최종 목표	3	3		1		4	3					8	1	11		13		1	6*
1차 년도	목표													3		6			
	실적													5					
2차 년도	목표	2										2		4		4			2
	실적	2										1.5		10		6		1**	2***
3차 년도	목표	1	2		1	2						5	1	4		3		1	4
	실적	2	1		1	2						4	1	10		8			4
소 계	목표	3	2		1	2						7	1	11		13		1	6
	실적	4	1		1	2						6.5	1	25		14		1	6
종료 1차년도			1			2						1							
종료 2차년도							1												
종료 3차년도							2												
종료 4차년도																			
종료 5차년도																			
소 계			1			2	3					1							
합 계		3	3		1	4	3					8	1	11		13		1	6

* 보고서 4건, 시제품 2건

** 시제품 음료 홍보를 위한 박람회 참석 1건

*** 기타성과: 기존 연구 성과 목표에서 설정한 시제품 제작 2건에 대한 내용

1. 특허 출원 (3개 목표, 4개 달성)

가. 2차년도 정량적 성과 달성 내용

1. 민상기, 박성희. 2016. 고압열수처리용 고압고온 반응기(출원번호 : 10-2016-0122166)
2. 김준태, 이수비, 이봄내. 유화제 및 초음파를 이용한 강황으로부터 고함량의 커큐민 추출방법 (출원번호 : 10-2016-0123075)

나. 3차년도 정량적 성과 달성 내용

1. 김준태, 박성진, 코랄리아 가르시아. 강황을 포함하는 나노지질전달체 및 이의 제조방법(출원번호 : 10-2017-0092714)
2. 최미정, 조영재, 이중규, 백정정. 어피펩타이드 함유 나노리포솜을 포함하는 돈육의 저장성을 증가시키기 위한 첨가제 조성물(출원번호 : 10-2017-0153198)

2. 특허 등록 (2개 목표, 1개 달성)

가. 3차년도 정량적 성과 달성 내용

1. 민상기, 박성희. 2016. 고압열수처리용 고압고온 반응기(등록번호 : 10-1814169)

3. 기술이전 (1개 목표, 1개 달성)

가. 3차년도 정량적 성과 달성 내용

1. “어피 펩타이드 리포솜의 제조공정과 대량생산 공정조건에 관한 기술 이전 사업화”에 관한 기술이전

4. 제품화 (2개 목표, 2개 달성)

가. 3차년도 정량적 성과 달성 내용

1. 강황추출물 나노에멀전 함유 썸(2017.10.31)
2. 미분쇄 강황 분말 적용 강황환(2017.11.10)

5. SCI 논문 (7개 목표, 6.5개 달성)

가. 2차년도 정량적 성과 달성 내용

1. Sung Jin Park, Coralia V. Garcia, Gye, Hwa Shin, Jun Tae Kim. 2016. Fabrication and optimization of EGCG-loaded nanoparticles by high pressure homogenization. J. APPL. POLYM. SCI. 43269.
2. Jeehye Kim, Robert Gauvin, Hee Jeong Yoon, Jin-Hoi Kim, Sang-Mo Kwon, Hyun Jin Park, Sang Hong Baek, Jae Min Cha, and Hojae Bae. 2016. Skin Penetration-Inducing Gelatin Methacryloyl Nanogels for Transdermal Macromolecule Delivery. Macromol. Res. 24(12):1115-1125. 중북사사.

나. 3차년도 정량적 성과 달성 내용

1. Eun Ji Lee, Jinwoo Hur, Sun Ah Ham, Yeonji Jo, SangYoon Lee, Mi-Jung Choi, Han Geuk Seo. 2017. Fish collagen peptide inhibits the adipogenic differentiation of preadipocytes and ameliorates obesity in high fat diet-fed mice. Int J Biol Macromol. 104: 281-286.

2. Min Young Ahn, Jung Seok Hwang, Sun Ah Ham, Jinwoo Hur, Yeonji Jo, SangYoon Lee, Mi-Jung Choi, Sung Gu Han, Han Geuk Seo. 2017. Subcritical water-hydrolyzed fish collagen ameliorates survival of endotoxemic mice by inhibiting HMGB1 release in a HO-1- dependent manner. *Biomed. Pharmacother* 93:923-930.
3. Ji Sun Lee, Soo Hee Cho, Chae Mi Lim, Moon Ik Chang, Hojae Bae. 2017. Development of an Improved HPLC-PDA Method for the Determination of Tolfenamic Acid in Meat and Milk. *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 8:5. 중북사사.
4. Jing-Jing Bai, Jung-Gyu Lee, Sang-Yoon Lee, Soojin Kim, Mi-Jung Choi. Youngjae Cho. 2017. Changes in quality characteristics of pork patties containing antioxidative fish skin peptide or fish skin peptide-loaded nanoliposomes during refrigerated storage. *Korean J, Food Sci. An.* 37(5) 767-778.
5. Seung Wook Kim, Coralia V. Garcia, Bom Nae Lee, Ho Jeong Kwon, and Jun Tae Kim. Development of turmeric extract nanoemulsions and their incorporation into canned ham. *Korean J. Food Sci. An.* 37(6). 중북사사.
6. Hee Jeong Yoon, Xiaowei Zhang, Min Gyeong Kang, Gyeong Jin Kim, Sun Young Shin, Sang Hong Baek, Bom Nae Lee, Su Jung Hong, Jun Tae Kim, Kwonho Hong and Hojae Bae. 2018. Cytotoxicity evaluation of turmeric extract incorporated oil-in-water nanoemulsion. *Int. J. Mol. Sci.* 19(1): 280.
7. Xiaowei Zhang, Hee Jeong Yoon, Min Gyeong Kang, Gyeong Jin Kim, Sun Young Shin, Sang Hong Baek, Jung Gyu Lee, Jing Jing Bai, Sang Yoon Lee, Mi Jung Choi, Kwonho Hong, Hojae Bae. 2018. Identification and evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of peptide liposome system from citron extracts. *International Journal of Molecular Sciences.* 심사 중.

6. 비SCI 논문 (1개 목표, 1개 달성)

가. 3차년도 정량적 성과 달성 내용

1. JungGyu Lee, YunJung Lee, JingJing Bai, Soojin Kim, Youngjae Cho, and Mi-Jung Choi. 2017. Optimization and Scale-up of Fish Skin Peptide Loaded Liposome Preparation and Its Storage Stability. *산업식품공학회.* 21(4) 360-366.

7. 학술발표 (11개 목표, 25개 달성)

가. 1차년도 정량적 성과 달성 내용

1. Sung Hee Park, Jun Bo Shim, Pangyenchao, Yeon Ji Jo, Ji Yeon Chun , Sang-Gi Min. Potential Application of High Temperature and Moderate Pressure Processing for Protein Hydrolysis of Fish Collagen/ICoFF 2015 (15. 11. 22-25.)
2. 이수비, 김준태. Process optimization of curcumin-loaded nanoemulsions/한국포장학회 (15.04.22)
3. 이수비, 홍수정, 김준태. Preparation of nanoemulsion (NE) and their potential as a Tumeric extract (TE) delivery carrier/한국식품과학회 (15.06.23)
4. 이수비, Whang Key, 김준태. Fabrication and characterization of Turmeric extract-loaded nanoemulsions/한국식품영양과학회 (15.08.24)

5. 이수비, Whang Key, 김준태. Preparation and characterization of Turmeric extract-loaded nanoemulsions (TE-NEs)/한국포장학회 (15.10.31)

나. 2차년도 정량적 성과 달성 내용

1. Junggyu Lee, SangYoon Lee, Jiseon Lee, Jae-Hee Seo, Soojin Kim, Dong Hyeon Park, JingJing Bai, HeeJeong Choi, Geun-Pyo Hong, Eun Yeong Ko, Sang-Gi Min, Mi-Jung Choi. Comparison of Collagen-Fortified Yuja Beverage Manufactured by Lab-Scale or Pilot-Scale/한국식품과학회 (16.08.18)
2. Dong-Hyeon Park, Jung Gyu Lee, SangYoon Lee, Jiseon Lee, Soojin Kim, Jae-Hee Seo, Hee-Jeong Choi, JingJing Bai, EunYoung Ko, Mi-Jung Choi. The Stability of Triple Layer Liposome Depending on Various Coating Concentration/한국식품영양과학회(16.11.02)
3. 이수비, 홍수정, Whang key, 김준태. Process optimization of turmeric extract-loaded nanoemulsions/식품과학회 (16.08.18)
4. 이수비, 조유미, 박성진, 김준태. Fabrication and characterization of Turmeric extract-loaded nanoemulsions/Iufost (16.08.22)
5. 이봄내, 김준태. Encapsulation of Turmeric extract-nanoemulsions using chitosan or β -cyclodextrin/식품과학회 (16.08.18)
6. 이수비, 김병수, 김준태, 신계화. High content curcumin extraction from Turmeric using emulsifiers and ultrasonication/한국식품영양과학회 (16.10.31)
7. 이봄내, 홍수정, 김규현, 김병수, 김준태. Encapsulation of Turmeric Extract-Nanoemulsions(TE-NEs) Using β -Cyclodextrinand HPMC/한국식품영양과학회 (16.10.31)
8. 윤희정 Tunable Hydrogel using Cold Water Fish Gelatin Methacryloyl/한국생체재료학회 (16.09.30))
9. 유태식, 함선아, 황정석, 이원진, 서한극. PPAR δ -mediated downregulation of Nox4 involved in the inhibition of MMP-2 activated by porophyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts/KSBMB International Conference 2016(16.05.18)
10. 황정석, 함선아, 유태식, 이원진, 서한극. PPAR δ -dependent SIRT1 inhibits VSMC proliferation and migration induced by oxLDL/KSBMB International Conference 2016(16.05.18)

다. 3차년도 정량적 성과 달성 내용

1. 백정정, 이상윤, 이중규, 박동현, 최희정, 배준환, 조영재, 최미정. Antioxidation effect of fish skin peptide and its inhibitory effect on lipid oxidation of pork patties/ISFAN 2017(17.06.18), 우수포스터상
2. 백정정, 이상윤, 이중규, 박동현, 김홍균, 배준환, 곽은지, 이윤정, 조영재, 최미정. Application of fish skin peptide/fish skin peptide-loaded liposome on pork patties as a preservative/INSFF (17.10.23)
3. 이윤정, 곽은지, 김홍균, 백정정, 이상윤, 이중규, 박동현, 최희정, 배준환, 조영재, 최미정. Optimal Condition of Fish Collagen Peptide-loaded Liposome Depending on Manufacture Scales/식품영양과학회 (17.11.08)
4. 박성진, Coralía V. Garcia, 김준태, 신계화. Formation and evaluation of vitamin D-NLCs on the

various storage conditions/2017 ISFANS (17.06.19)

5. 박성진, 이수비, 홍수정, 김준태, 신계화. Evaluation of stability of multilayer turmeric extract-loaded nanoemulsion powders (MTE-NEs) in various environmental conditions/식품과학회 (17.05.31)
6. 이봄내, 김준태, 신계화. Multilayered turmeric extract-loaded nanoemulsions using β -cyclodextrin/2017 ISFANS (17.06.19), 우수포스터상
7. 이봄내, 김준태, 신계화. Characterization and masking effect of turmeric extract-loaded nanoemulsions (TE-NEs) by chitosan coating/포장학회 (17.10.19), 우수포스터상
8. 이봄내, 김준태, 신계화. Stability of beta-cyclodextrin encapsulated turmeric extract-loaded nanoemulsions/식품영양과학회 (17.11.08)
9. 이은지, 허진우, 함선아, 조연지, 이상윤, 최미정, 서한극. Fish collagen peptide inhibits the adipogenic differentiation of preadipocytes and ameliorates obesity in high fat diet-fed mice/KSMCS(17.09.12)
10. 안민영, 황정석, 함선아, 허진우, 서한극, Subcritical water-hydrolyzed fish collagen ameliorates survival of endotoxemic mice by inhibiting HMGB1 release in a HO-1-dependent manner/KSMCS(17.09.12)

8. 인력양성 (13명 목표, 14명 달성)

가. 2차년도 정량적 성과 달성 내용 (6인)

- 조연지(박사), 김재형(석사), 심준보(석사), 정유경(석사), 윤희정(석사), 최혁수(석사)

나. 3차년도 정량적 성과 달성 내용 (8인)

- 김광일(박사), 이지선(석사), 김수진(석사), 서재희(석사), 박성진(박사), 이수비(석사), 이은지(석사), 안민영(석사)

9. 홍보전시 (1개 목표, 1개 달성)

가. 2차년도 정량적 성과 달성 내용

- 다푸드 수출 상담회 및 박람회(2016.09.06.-09.12)

10. 기타 (6개 목표, 6개 달성)

가. 2차년도 정량적 성과 달성 내용

- 시제품 (2건) - 펩타이드 리포솜 제조기술을 이용한 유아음료, 미세입자 함유 액상카레

나. 3차년도 정량적 성과 달성 내용 (보고서 4개)

- 국내 나노 식품 시장 분석 보고서(증빙 1)
- 나노 개발 기술의 현장 보급·확산을 위한 관련 연구 보고서(증빙 2)
- 대량생산 체제에서 최적 공정 확립 보고서(증빙 3)
- 나노소재 고도화 및 시제품(식품)을 활용한 단계별 현장 실증(적용)시험 결과(증빙 4)

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

코드번호 D-06

1절. 목표달성도

1. 연구개발 최종 목표 대비 달성도

최종 목표	달성도
<ul style="list-style-type: none"> ○ 나노식품 제조기술의 산업체 상용화 연구 및 제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 개발된 나노식품 기술에 대한 공장 시스템 현장 적용 및 상용화 - 산업화된 식품소재 및 제품에 대한 나노식품 안정 및 안전성, 효능 검증 - 실현 가능한 나노식품 기술 기업체 상용화 및 현장보급 - 국가, 산업의 기술 혁신을 도모할 수 있는 신소재 개발 기술 육성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 나노식품 제조기술의 산업체 상용화 연구 완료 및 시제품 제작 완료 <ul style="list-style-type: none"> - 개발된 나노 공정화 과정 공장 시스템 현장 적용 완료 - 실제 공장에서 제조한 제품의 효능 검증 평가 완료 및 입증 - 실현 가능한 나노식품 기술 기업체 상용화 및 현장보급 완료 - 종료 후 제품 생산을 통한 매출 창출에 대한 논의 중

2. 세부 및 연차별 연구개발 목표 및 수행내용

가. 제1세부: 아·초임계수 처리된 기능성 올리고 펩타이드 나노 제형 공정의 산업체 상용화 기술 개발

구분 (연도)	세부연구목표	연구수행방법	연구개발 수행내용
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 아·초임계수를 이용한 어류 올리고 펩타이드의 pilot scale에서의 제조 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 어피 유래 기능성 올리고 펩타이드 나노 제형 공정을 개발하기 위해서는 고분자 어피 콜라겐을 가수분해를 통해 저분자화 해야 함 ○ 기존 단백질 가수분해 방법인 산 또는 효소를 이용하는 화학적 방법이 아닌 자연적이고 친환경적인 아·초임계수를 이용한 어피 콜라겐 가수 분해 공정 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ pilot-scale로 주문 제작된 아·초임계수 처리 장치를 이용하여 다양한 압력 (350-3900 kPa) 및 온도 (150-230°C) 조건으로 어피 콜라겐을 처리 후, 단백질 함량 (뷰렛 반응), 유리아미노산, 전기영동, pH 및 색도 분석을 통해 최적 가수분해 조건을 확립
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pilot scale의 올리고 펩타이드 나노리포좀 최적 제조 공 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 올리고 펩타이드 나노 제형 공정의 효율성 증대를 위해서는 고농축된 어피 콜라겐으로 가수분해물을 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 실험을 통하여 확립된 어피 콜라겐 가수분해를 위한 최적 아·초임계 압력 및 온도 조건인 190°C-1100 kPa에서 어피 초기 농도를 7, 13,

	정 확립	<p>획득해야 함</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 초기 어피 농도가 가수 분해 효율에 미치는 영향을 규명할 필요가 있음 	<p>26, 66%로 조절하여 단백질 가수분해 효율을 규명</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pilot scale에 의한 올리고 펩타이드 리포솜 안정성 분석(수정 목표: 안정성 향상을 위한 키토산 및 펙틴을 이용한 2중층 FC리포솜 제조) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적화된 Lab scale 공정을 pilot scale로 확대하기 위한 검증 테스트 ○ 대형 균질기를 통한 pilot scale의 FC리포솜 제조 ○ 제조된 각 리포솜의 입자크기 및 입자전하의 측정 ○ FC리포솜의 안정성을 향상시키기 위해 FC리포솜에 정전기적 침착성 원리를 이용하여 레이어를 형성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pure materials 및 Blank 리포솜 제조 및 특성 분석 ○ 2% lecithin과 다양한 농도의 FC를 이용한 리포솜 제조 ○ 2% FC와 2% lecithin을 이용한 pilot scale의 1% FC 리포솜 제조 ○ 생산비용을 고려한 저가 lecithin 및 Tween20, low-energy emulsification을 이용한 FC리포솜 제조 ○ 대형균질기를 이용한 pilot scale 10 L의 1%, 2%, 3% blank 리포솜 및 1%, 2% FC 리포솜 제조 ○ 키토산 및 펙틴-FC리포솜 제조
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pilot scale에 의한 올리고 펩타이드 리포솜 안정성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 안정성 향상을 위한 키토산 및 펙틴을 이용한 2중층 FC 리포솜 제조 ○ 제조된 각 리포솜의 입자크기 및 입자전하의 측정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 키토산-FC리포솜 제조: FC리포솜의 안정성을 향상시키기 위해 양전하를 띠는 키토산을 이용하여 FC리포솜에 정전기적 침착성 원리를 이용하여 레이어를 형성 ○ 펙틴-FC리포솜 제조
2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ Plant scale로의 scale-up 제조공정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pilot scale에서 확립된 최적 공정 과정의 plant scale 적용 ○ Plant 규모의 나노 리포솜 최적 공정 과정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 초고속 균질기 8000 rpm, ultrasonification 60 W, 펩타이드 농도 6%, 조건에서 1 mm의 입자 제조 가능 ○ 10 L의 최대 용량 ○ 식약처 나노식품 정의 충족
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Plant scale에 의한 올리고 펩타이드 리포솜 안정성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 입자크기, 제타전위, 입자형태 등의 이화학적 특성 분석 ○ 30일 저장 후 입자크기, 제타전위 변화 ○ 1일 생산량, 나노화된 입자들의 유효 기간 등 정성·정량적인 유효성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 30일 저장 후 입자크기 및 제타전위 유지 ○ 시제품 유자 주스 1일 최소 생산량 0.5톤 대비 20 L 펩타이드 제조 성공 ○ 입자크기는 약 2 mm로 한 달 유통기간 성공

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 안정성 증진을 위한 이중층 올리고 펩타이드 리포솜 제조 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 이중층 콜라겐 올리고 리포솜 제조를 위한 바이오폴리머 선정 ○ 이중층 콜라겐 올리고 리포솜 제조 조건 확립 ○ 단층 및 이중층 올리고 펩타이드 리포솜의 비교 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 이중층 pilot scale up 제조 시 입자크기는 1 mm내외로 유지 ○ HMP, 카라기난을 통해 3중층 리포솜 형성 성공 ○ 올리고 펩타이드 리포솜이 보다 안정적
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식약처에서 권고한 나노식품 규정에 부합될 수 있는 소재 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식품원료용 나노 제형화 검증 ○ 1협동 결과를 통한 독성 및 효능 검증 ○ 식약처 부합 여부 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선택된 소재들은 이미 식품소재로 허가된 성분 ○ 독성에 안전, 항비만, 항염증, 항노화 효과적 ○ 식약처 나노식품에 대한 별도 규정이 없어 추후 제품화 가능 확인
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pilot scale의 향미성분 코팅 기술 적용 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 입자 크기, 제타 전위, 입자 형태 등의 이화학적 특성 분석: 목표 입자 크기: 평균 약 300 nm± 50 nm ○ 저장 조건(온도 및 시간)에 따른 향미 성분의 안정성 (stability) 측정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기존 펩타이드 리포솜과 유자 제품 혼합 시 이취가 사라짐 ○ 별도 어류 추출물을 CD와 PCL로 코팅 성공. ○ 이취 성분은 조건에 따라 서로 다른 방출 속도를 나타냄 ○ PCL에서 효과적
3차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 올리고 펩타이드 리포솜 함유 기능성 음료 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 올리고 펩타이드 리포솜 함유 기능성 음료 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 콜라겐 펩타이드를 유자음료에 첨가한 후 ○ 추가로 돼지고기패티에 적용하여 이화학적 특성 및 항산화 효과 측정
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품내 나노물질 검증 실험 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 올리고 펩타이드 리포솜의 지표물질 선정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전자주사현미경 관찰을 통한 리포솜 입자 관찰
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품 시장 진입 전략 수립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발된 제품의 나노 식품 시장 진입 전략 수립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 펩타이드 및 리포솜이 첨가된 유자음료의 대용량 동결건조 분말
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발 소재의 식품 적용 및 적용된 제품의 나노 분석법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지표물질의 분리 정제 ○ 지표 성분 분석법 개발 및 적용 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전자주사현미경 관찰을 통한 리포솜 및 유자 입자 관찰

나. 제2세부: 개발된 나노소재 및 제품의 세포독성·체내안정성 평가 및 생리활성 효능

구분 (연도)	세부연구목표	연구수행방법	연구개발 수행내용
1차 년도	○ 세포주 대상 세포독성 시험	○ 콜라겐 펩타이드 및 커큐민 소재 세포독성 여부에 대해 세포주를 대상으로 잠재적 독성의심 나노물질과의 비교·분석	○ 세포독성 측정법으로는 LDH assay, MTT assay를 각각 적용하여 결과를 비교·분석
	○ 일차 배양 세포 대상으로 세포독성 시험	○ 콜라겐 펩타이드 및 커큐민 소재 세포독성 여부에 대해 일차배양 세포를 대상으로 잠재적 독성의심 나노물질과의 비교·분석	○ 세포독성 측정법으로는 LDH assay, MTT assay를 각각 적용하여 결과를 비교·분석
	○ 세포주 대상 유전독성 시험	○ 콜라겐 펩타이드 및 커큐민 소재의 유전독성 여부에 대해 잠재적 독성의심 나노물질과의 비교·분석을 시행, 개발된 나노소재의 유전독성 가능성을 평가	○ 유전독성 측정법으로 Comet assay를 적용하여 결과를 비교·분석
2차 년도	○ Plant scale로 개발된 샘플의 세포주 대상 세포 독성 평가	○ 커큐민 소재 및 유자 샘플의 세포 독성 여부에 대해 세포주를 대상으로 세포 독성 평가 실시	○ 모든 assay를 통한 NIH3T3 세포 독성 평가에서 0.25 mg/ml 이상의 농도에서 커큐민 에멀전의 독성을 확인. ○ 모든 assay에서 유자샘플을 세포에 처리한 경우, 모든 조건에서 독성을 나타남
		○ Plant scale로 개발된 샘플의 일차 배양 세포 대상 세포 독성 평가	○ 커큐민 소재 및 유자 샘플의 세포 독성 여부에 대해 일차 배양 세포를 대상으로 세포 독성 평가 ○ 세포 독성 측정법으로는 MTT assay, WST-1 assay, Live/dead assay를 이용하였으며, 결과를 비교/분석.
		○ Plant scale로 개발된 샘플의 세포주 대상 유전 독성 평가	○ 세포종류별 독성 및 유전독성 평가 (세포 viability 95% 이상) ○ 커큐민 소재 및 유자 샘플의 세포 독성 여부에 대해 세포주를 대상으

			<p>로 유전 독성 가능성을 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 유전독성 측정법으로는 comet assay를 적용하여 결과를 비교/분석
3차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ Plant scale로 개발된 샘플의 세포주 대상 세포 독성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소동물 (마우스)를 이용한 단회 독성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 커큐민 나노에멀전 분말을 경구투여하여 독성 평가를 진행함 ○ 투여 용량 (mg/kg·bw)은 저용량(500), 중용량(1000), 고용량(2000)으로 수행하였으며 암수의 독성 차이의 확인을 위해 성별 5마리씩 지정함. ○ 15일간의 급성 독성 평가 중 식이, 음수량에 큰 변화가 없었으며 나노소재의 투여로 인한 체중의 변화도 관찰되지 않음. ○ 육안으로 관찰되는 장기 형태나 크기에 이상이 발견되지 않았으며 나노소재의 독성으로 장기의 무게에 영향을 미치지 않았음 ○ 혈액학적 검사 (CBC) 결과 또한 정상 수치에 크게 벗어나거나 나노소재의 농도에 따른 수치 변화가 없었음.

다. 제1협동: 커큐민 나노에멀전의 대량 생산화를 위한 최적 공정기술 확립 및 제품 개발

구분 (연도)	세부연구목표	연구수행방법	연구개발 수행내용
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 및 해외 나노식품 시장 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 논문, 특허, 매거진의 검색을 통한 나노식품 조사 ○ 인터넷 검색을 통한 시장 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 나노 식품시장 분석 및 기술 경향 분석 ○ 상용화 되지 않은 나노기술 취합 및 기업현장 적용 가능성 분석 ○ 분석된 나노식품 기술의 식품산업 현장 적용 가능한 우수기술 발굴 (공장화 시스템 수정, 공장화를 위한 새로운 formulation 개발 등 ○ 식약처에서 권고된 나노식품 규정에 부합될 수 있는 제품 연구 및

			적용 기술 개발
	○ 커큐민 나노에멀전의 pilot scale에서의 제조 조건 확립	○ 강황추출물의 추출 효율을 비교하기 위해 다양한 용매를 사용 ○ HPLC를 이용한 커큐민 함량 측정 및 표준 커큐민을 이용한 표준곡선 작성 ○ 강황추출물 나노에멀전 제조공정 확립 및 pilot scale에서의 나노에멀전 제조 공정 확립 ○ 나노에멀전의 이화학적 특성 분석	○ 증류수, 90% ethanol, 70% ethanol, 50% ethanol을 이용한 강황추출물의 추출조건 확립 ○ 강황추출물에 함유된 커큐민의 함량 분석 ○ 강황추출물을 이용한 나노에멀전 제조 조건 확립, 고농도의 강황추출물 함유 나노에멀전 제조 ○ oil, surfactant, 강황추출물의 함량 비율에 따른 나노에멀전의 특성 변화 분석 ○ 나노에멀전의 이화학적 특성으로 입자크기, 분포도, 제타전위 측정 ○ 강황추출물 나노에멀전의 pilot scale로의 제조공정 확립(speed, 시간, 압력, cycle 수 등) ○ Pilot scale로 제조된 강황추출물 나노에멀전의 저장기간에 따른 안정성 비교
	○ 다층구조의 나노에멀전 제조 및 향기성분 masking을 위한 캡슐화	○ 다층구조의 강황추출물 나노에멀전을 제조하기 위해 생물고분자 물질인 dextrin 또는 chitosan 등을 이용 ○ 커큐민 특유의 향기 성분을 masking하기 위한 cyclodextrin 또는 HPMC로의 캡슐화	○ 나노에멀전 코팅을 위한 코팅물질로 dextrin과 chitosan 선정 ○ 다층구조의 강황추출물 나노에멀전 제조 조건 확립 ○ 다층구조의 강황추출물 나노에멀전 입자크기, 제타전위, 입자형태 측정 ○ 분무건조를 통한 강황추출물 나노에멀전의 분말화 ○ 저장 조건(온도 및 시간)에 따른 안정성(stability) 측정
2차 년도	○ Plant scale로의 scale-up 제조공정 확립	○ Pilot scale에서의 나노에멀전 제조공정 조건 확립 ○ 입자크기, 제타전위, 입자형태 등의 이화학적 특성 측정 ○ 저장 조건에 따른 나노에멀전의 안정성 측정 ○ 1일 생산량, 수율(yield)계산	○ Plant scale의 나노에멀전 생산을 위한 대용량(최대 20L) 반응기를 제작하기 위해 생산할 용량 계산과 제조 공정에서 필요한 조건들을 고려하여 제작 ○ 대용량 반응기를 이용한 강황추출물 나노에멀전 제조 조건(반응시간,

			<p>온도 등)확립하여, 10L 용량의 강황 추출물 나노에멀전을 제조하여, 시간에 따른 입자의 크기 및 제타전위의 변화를 분석함</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 대용량 반응기에서는 US 처리시간이 3시간 이후 입자의 크기가 약 200 nm 수준으로 감소하였고, 5시간 처리 조건에서는 약 137 nm의 안정한 나노에멀전이 제조됨 ○ 대용량 반응기에서의 수율(yield)은 input 재료의 총 함량에서 생산된 나노에멀전의 양을 계산해보니 약 98%의 수율을 얻음 ○ 대량 생산된 강황추출물 나노에멀전을 냉장 및 실온에서 각각 30day 동안 보관하여 저장성 평가를 실시하였고, 실온에서 보관한 샘플에서는 약 일주일 후 미생물이 검출됨 ○ 저장 기간동안 입자크기의 변화는 약 6.9%
<ul style="list-style-type: none"> ○ 향기성분 masking을 위한 캡슐화 		<ul style="list-style-type: none"> ○ 강황/커큐민 특유의 향기성분을 masking을 위해 cyclodextrin, chitosan 등으로 코팅 ○ 캡슐화에 다른 강황추출물 나노에멀전의 이화학적 특성분석 ○ 저장조건에 따른 안정성 측정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 강황추출물 나노에멀전의 캡슐화를 위한 chitosan 및 β-cyclodextrin의 농도 조건 확립 ○ Chitosan의 농도가 높아짐에 따라 입자의 크기는 102.5 nm에서 209.3 nm까지 증가함 ○ 강황추출물 나노에멀전과 chitosan solution의 최적 비율 및 encapsulation efficiency 계산 결과 chitosan의 비율이 높아짐에 따라 74.2%에서 87.6%까지 증가함 ○ US 처리 시간에 따른 입자크기의 감소 및 안정성 증진 ○ 저장조건(온도,시간)에 따른 안정성 평가(입자크기, PDI, 제타전위) ○ pH, NaCl 농도에 따른 안정성 평가 (입자크기, PDI, 제타전위) ○ GC분석을 통한 강황추출물의 주요

			<p>향기성분인 ar-turmerone의 intensity가 낮아짐을 확인함</p> <p>○ TEM을 이용한 입자의 형태 및 크기 분석</p>
3차 년도	○ 제품 내 나노물질 검증 및 분석법 개발	<p>○ 강황추출물 나노에멀전을 분무건조기 (spray dryer)를 통해 분말화</p> <p>○ 실제식품(우유, 이온음료 등)에 대한 강황추출물 나노에멀전 분말의 안정성 평가</p> <p>○ 분말화된 강황추출물 나노에멀전을 모사식품에 재분산시켜 입자크기, PDI, 제타전위 및 커큐민의 함량을 측정하여 안정성 평가</p>	<p>○ HPLC를 통해 강황추출물 나노에멀전 분말의 커큐민함량은 $1.83 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{mg}$으로 분석됨</p> <p>○ 분말화된 강황추출물 나노에멀전을 모사식품에 재분산시켜 입자크기, PDI, 제타전위 및 커큐민의 함량을 측정하여 안정성 평가</p> <p>○ 20% EtOH에 분산시킨 강황추출물 나노에멀전 분말의 커큐민함량은 90%이상 유지되었고, 순수 커큐민은 23% 유지함</p> <p>○ 재분산시킨 강황추출물 나노에멀전 분말이 모사식품 내에 잘 분산되어 있는지 확인하기 위해 Confocal 현미경과 TEM을 통해 형태학적인 특성을 관찰</p>
	○ 제품시장 진입 전략 수립 (주요투기)	<p>○ 개발된 제품의 나노식품 시장 진입 전략 수립</p> <p>○ 나노기술을 적용한 시제품 개발</p>	<p>○ 강황추출물 나노에멀전을 적용한 시제품 개발</p> <p>○ 미분쇄 강황분말을 적용한 백세강황한 시제품 개발</p>

2절 관련분야 기여도

- 본 과제를 통한 연구 목표의 궁극적인 목적인 공장 라인에 실제 제품 적용 후 이에 대한 과학적 입증을 통한 그동안 제시된 나노식품 구현에 대한 상용화 가능성을 제시
- 기술적인 우월성은 실제 공장라인을 활용하여 제조된 음용제품에 대한 시제품, 환제품에 대한 시제품 제조를 통해 나노기술의 연구실에 국한된 주제에서 산업화 적용을 이룬 기여도가 있음.
- 실제 제품에 적용된 나노입자들의 안정성 여부를 과학적인 방법을 통해 나노입자의 유효성, 안전성을 검증하여 이에 대한 기술적인 방법 제안
- 나노 입자가 응용되어 제조된 각각의 공장시제품의 세포 및 동물실험을 통해 효능 및 안정성 평가 완료를 통해 다수의 SCI논문 게재
- 시제품 제조에서 그쳤지만, 실제 제품의 실용화를 통해 사업화 가능성이 크게 기대되어짐.

제5장 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<p>○ (사업화 방향) 본 연구주제를 통해서 (주)오뚜기와 에덴에서는 실제 제품 판매에 대해 긍정적으로 생각 중에 있고 건국유업은 강황추출물을 첨가한 기능성 우유에 관심이 있으나 색간섭 부분에 대한 문제가 선결되면 시제품 제작을 검토 중에 있음.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 오뚜기: 나노입자의 체내 안전성 평가에 대한 명확한 추가 결과와 식약처 허가 사항에서 문제가 없을 시 강황 미세 분말을 응용한 다양한 제품에 적용 판매할 예정임. - 영농법인에덴식품: 펩타이드 나노제형화의 경우 분무 건조 혹은 동결 건조시 우수한 제형이 만들어져 기타 가루 응용 음용제품 및 기타 타블렛 형태의 유자 제품 제조에 대한 시판에 대해 긍정적으로 검토 중. - 건국유업: 나노 강황 추출물을 활용한 우유 제조시 색감에 대한 간섭 부분이 해결될 시 시제품 제작에 긍정적 검토 <p>○ (타 연구에의 응용) 실제 제품에 적용된 나노입자의 입증 방법에 대한 실험법이 어느 정도 설계되어 타 제품 응용 시 적용 가능</p> <ul style="list-style-type: none"> - 음료제품 외에 건물 제품 적용 가능 <p>○ (추가 연구 필요성)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 나노식품 안전성에 대한 별도의 과제를 통한 충분한 과학적 결과가 필요 - 다양한 제품에 적용시 제품별 나노 입자의 안전화/안정성에 대한 부수적인 입증은 항상 필요 - 이에 대한 적극적인 홍보로 사업화에 기여할 수 있다 판단되어짐. <p>○ (제품화 계획)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 식품의약품안전처에 문의한 결과 신소재로 분류된 식품소재를 제품에 적용시 허가를 득해야 하나 펩타이드 및 강황 추출물 혹은 나노 코팅 재료들이 신소재는 아니며 일반 제품 품목 보고 형식으로 제품을 출시할 예정임. 	

제6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○ 해당사항 없음		

제7장. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항 없음(일반과제)		

제8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

○ 해당사항 없음

제9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>1절 안전조치 이행실적</p> <p>1. 본교 연구활동종사자 법정 정기 안전교육 이수 가. 2015년 1학기, 2015년 2학기, 2016년 1학기, 2016년 2학기, 2017년 1학기, 2017년 2학기</p> <p>2. 연구실 안전관리 담당자 집체교육 이수</p> <p>3. 연구실 법정안전점검 이수</p> <p>4. 매월 연구실 안전점검 관리대장 제출</p>		

제10장. 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	Fish collagen peptide inhibits the adipogenic differentiation of preadipocytes and ameliorates obesity in high fat diet-fed mice.	건국대학교	교신저자	International Journal of Biological Macromolecules	3.671	2017.11.01	단독	SCIE
2	논문	Subcritical water-hydrolyzed fish collagen ameliorates survival of endotoxemic mice by inhibiting HMGB1 release in a HO-1-dependent manner.	건국대학교	교신저자	Biomedicine & Pharmacotherapy	2.759	2017.09.01	단독	SCIE
3	논문	Fabrication and optimization of EGCG-loaded nanoparticles by high pressure homogenization	계명대학교	교신저자	Journal of Applied Polymer Science	1.86	2016.04.10	단독	SCIE
4	특허	어피펩타이드 함유 나노리포솜을 포함하는 돈육의 저장성을 증가시키기 위한 첨가제 조성물	건국대학교		대한민국		2017.11.16	단독	
5	특허	강황을 포함하는 나노지질전달체 및 그의 제조방법	계명대학교		대한민국		2017.07.21	단독	

제11장. 기타사항

○ 2차년도에 제1세부/주관 과제 책임자가 민상기에서 최미정으로 변경됨.

절부3.0, 국민과의 약속



농림수산식품기술기획평가원



수신자 건국대학교 산학협력단
(경유)

제목 고부가가치식품기술개발사업 협약변경 승인 통보

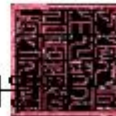
1. 농림축산식품연구개발사업 운영규정 제19조(협약의 변경), 건국대학교 산학협력팀-161486 (2016.09.26.)호와 관련됩니다.

2. 귀 기관에서 요청한 고부가가치식품기술개발사업 연구개발과제의 협약변경 승인요청 건에 대하여 아래와 같이 승인을 통보하오니, 주관연구기관장께서는 과제 관리에 만전을 기해주시기 바랍니다.

과제번호	과제명	주관연구기관 (연구책임자)	당해연도출연 금	총 연구기간	승인 사항	
314058-03	저분자 펩타이드와 쿼터민을 이용한 나노식품 제조기술의 산업체 상용화 연구 및 제품 개발	건국대학교 산학협력단 (민상기)	900,000천원 (300,000천원)	2014.11.28- 2017.11.27 (2년차)	주관연구책임자 변경 (건국대학교 산학협력단)	
					변경후	변경후
					민상기	최미정

붙임.

농림수산식품기술기획평가원



★@연구실★ 김혜리 연구실 박종락 실장 10/05 10/06 이장기

10/05 이장기

발주자

시행 사업관리실-4978 (2016.10.05.) 접수 산학관리팀-161562 (2016.10.06.)

우 14055 경기도 안양시 동안구 별곡로 168(관왕동 우암타 /http://www.ipet.re.kr

전화 031-420-8727 /전송 031-425-8443 / traum@ipet.re.kr / 공개

- 김종태, 김철진, 조용진, 김양하, 김인환, 최애진. 고기능성 식품나노체 제조기술. 식품과산업 제 41권: 33-45 (2008)
- 조용진. 2007. 식품나노기술의 현황과 전망. 산업식품공학 11: 145-152.
- 한국과학기술정보연구원. 2007. 나노기술연감 2007.
- 미래창조과학부. 2014. 제2기 국가나노기술지도 총괄보고서.
- 식품의약품안전처. 2012. 제48회 식품의약품안전열린포럼.
- (주)젤텍. 콜라겐의 아미노산 조성.
http://www.geltech.co.kr/kor/02_collagen/index.jsp?menu=2&page=6
- 식품의약품안전처. 2016. 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황.
- Byun Hee-Guk and Kim Se-Kwon. 2001. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. Process Biochemistry 36(12): 1155-1162.
- Alemán A, Giménez B, Pérez-Santin E, Gómez-Guillén MC and Montero P. 2011. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. Food Chemistry, 125(2), 334-341.
- 김세권, 김영태, 변희국, 남경수, 주동식, F. Shahidi. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(4): 1984-1989.
- Mendis E, Rajapakse N, Byun Hee-Guk, Kim Se-Kwon. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. Life sciences, 77(17), 2166-2178.
- 교육과학기술부. 2008. 국가나노기술지도.
- 미래창조과학부. 2015. 나노기술 산업화 전략.
- 산업통상자원부. 2013. 2012 나노융합산업조사보고서.
- Siddhartha s mukhop dhyay. 2014. Nanotechnology in agriculture: prospects and constrains. 국가과학기술위원회. 2012. 2012년도 국가나노기술발전시행계획.
- Kui-Jie Gong, Ai-Min Shi, Hong-Zhi Liu, Li Liu, Hui Hu, Ying Yang, Benu Adhikari and Qiang Wang. 2016. Preparation of nanoliposome loaded with peanut peptide fraction: stability and bioavailability. Food & Function, 7, 2034-2042.
- Fei Hao, Yanxi He, Yating Sun, Bin Zheng, Yan Liu, Xinmei Wang, Yongkai Zhang, Robert J. Lee, Lirong Teng and Jing Xie. 2016. Improvement of oral availability of ginseng fruit saponins by a proliposome delivery system containing sodium deoxycholate. Saudi Journal of Biological Science. 23, S113-125.
- Haisheng He, Yi Lu, Jianping Qi, Weili Zhao, Xiaochun Dong, Wei Wu, 2018. Biomimetic thiamine- and niacin-decorated liposomes for enhanced oral delivery of insulin. Acta Pharmaceutica Sinica B. 8(1), 97-105.
- Yasuaki Wada, Bo Lonnerdal. 2014. Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action. Journal of Nutritional Biochemistry. 25, 503-514.
- Ana Beloqui, Anne des Rieux, Veronique Preat. 2016. Mechanisms of transport of polymeric and lipidic nanoparticles across the intestinal barrier. Advanced Drug Delivery Reviews. 106, 242-255.
- Cientifica. 2008. The nanotechnology opportunity report. 3rd Ed.
- 한국과학기술정보원. 2008. 주요 나노기술의 현황과 산업화 동향.
- 김석필 외. 2014. 나노기술 상용화 현황 진단과 혁신과제. KISTEP. 연구보고 2014-016.

- 나노인. 2014. 나노융합제품DB. <https://www.nanoin.org/nanoEquip>
- 농촌진흥청. 2014. 나노기술 : 농업의 신 개척지 “농식품분야의 나노기술 적용 사례와 전망”.
- 천지연, 최미정, 민상기, Weiss Jochen. 2013. Formation and stability of multilayered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers. *Food Hydrocolloids* 30(1), 249-257.
- 조연지, 천지연, 권윤정, 민상기, 최미정. 2015. Formulation development of multilayered fish oil emulsion by using electrostatic deposition of charged Biopolymers. *International Journal of Food Engineering* 11(1), 31-40.
- Stefania Galdiero, Annarita Falanga, Marco Cantisani, Mariateresa Vitiello, Giancarlo Morelli and Massimiliano Galdiero. 2013. Peptide-lipid interactions: experiments and applications. *International journal of molecular sciences* 14, 18758-18789.
- Petkau-Milroy Katja and Brunsveld Luv. 2013. Supramolecular chemical biology; bioactive synthetic self-assemblies. *Organic & Biomolecular Chemistry* 11(2), 219-232.

[별첨]

[별첨 1] 국내 나노 식품 시장 분석 보고서

**[별첨 2] 나노 개발 기술의 현장 보급·확산을 위한 관련 연구
보고서**

[별첨 3] 대량생산 체제에서 최적 공정 확립 보고서

**[별첨 4] 나노소재 고도화 및 시제품(식품)을 활용한 단계별
현장 실증(적용)시험 결과**

[별첨 1]

나노식품 시장조사 보고서

< 목 차 >

제1장. 나노식품의 개요	3
제1절. 나노식품의 정의 및 범위	3
제2장. 식품에 적용된 나노물질 및 기술의 분류	9
제1절. 식품첨가물을 표방한 나노물질	9
제2절. 생리활성 기능성을 표방한 나노물질	13
제3절. 일반 식품에 적용된 나노 기술	24
제4절. 식품 포장에서 나노 기술	26
제3장. 국내 · 외 주요 정책 및 투자동향	28
제1절. 국내 정책 및 투자동향	28
제2절. 국외 정책 및 투자동향	32
제4장. 나노 기술 국내 · 외 시장(산업)동향	45
제1절. 국내외 시장(산업) 동향	45
제2절. 기술, 경제, 사회적 미래 전망	46
참고문헌	48

제 1장 나노식품 개요

제 1절 나노식품의 정의 및 범위

1) 식품 분야와 연관된 나노용어에 대한 다양한 정의

- “나노”라는 용어를 사용하여 정의나 관련 기술을 이야기할 때 그 정밀성에 대해서는 명확히 구분되어 사용되어지고 있지 않고 있다. 산업위생 측면에서 안정성 분야를 중심으로 연구하는 분야나 화학 및 재료 공학에서 사용하는 나노의 크기는 대체로 “직경 100 nm”을 미만으로 하여 그 크기의 기준 선을 명확히 구분하고 있다.
- 하지만 제약공학 및 화장품 분야 등 다른 소재분야에서는 “직경 200 nm”를 기준으로 정의를 하였다. 하지만 이러한 기준도 모든 입자가 그러한지 아니면 구형이 아닌 튜브의 형태의 경우는 어떠한지 등 다소 모호하다.
- 따라서 식품 분야에서 “나노”와 “식품”분야와 접목된 용어 정의를 새로이 세울 필요는 없으나 크기에 관해 적용시켜야 하는 범위를 한정 짓는 가이드라인은 자체적으로 분석하여 정립시킬 필요가 있다.

2) 식품의약품안전처 가이드라인에서 명기하는 용어 및 정의

- 식품 분야에서 가장 근접하여 활용할 수 있는 “나노” 용어에 대한 정의 마련 안은 식품의약품안전처(이하 식약처) 신소재 식품과에서 마련한 가이드라인을 주목할 필요가 있다.
- 본 가이드라인에서 특이할 만한 내용은 “나노소재”의 정의에서 ③내용 부분으로 “구성입자 평균(산술) 크기가 나노물질보다 크지만, 나노물질과 동일한 새롭거나 개선된 특징을 갖도록 제조된 크기가 1 mm (1000 nm) 미만인 물질이나 소재”로써 크기 범위에 대해 100 nm 혹은 200 nm미만으로 한정 짓지 않고 넓은 범위로 포함 시킨 부분이다. 이는 식품과학 분야의 특성과 지금까지 연구동향 내용을 감안하여 제시하고 있는 부분으로 크기의 초미세화 및 정밀화보단 미시적인 크기의 변화로 가시적인 현상의 변화를 야기하는 측면의 내용을 중점으로 접근한 것으로 볼 수 있다.

<출처: 식품의약품안전처, 신소재식품과,
나노기술응용식품 업계자율 안전성 평가 지침(안)(2016)>

- 1) “나노기술응용식품”이란 식품의 제조·가공에 나노기술이 이용된 새로운 형태의 식품 또는 식품원료(식품첨가물 제외)를 말한다.
- 2) “나노기술”이란 나노미터 크기(10^{-9} m) 범주로 의도적으로 제조·가공하여 기존의 식품이나 벌크 물질의 특성과는 다른 새롭거나 개선된 물리적, 화학적, 또는 생물학적 특성을 나타내도록 하는 기술을 말한다.
- 3) “나노소재”란 ① 구성입자 평균(산술) 크기가 나노물질 크기로 제조된 물질이나 소재, 또는 ② 구성입자의 50 %(개수 기준) 이상이 제조된 나노물질로 구성된 물질이나 소재, 또는 ③ 구성입자 평균(산술) 크기가 나노물질보다 크더라도 나노기술에 의해 제조되어 크기가 $1\ \mu\text{m}$ (1000 nm) 미만이면서 벌크물질과 비교 시 새롭거나 개선된 특징을 갖는 물질이나 소재, 또는 ④ 위의 소재가 각각 또는 상호 화학적 또는 물리적으로 결합되거나 뭉쳐진 응집체 또는 집괴체를 말한다.
- 4) “나노물질”이란 물질 외부 한쪽 면(1차원)의 크기가 전자현미경으로 1-100 nm 인 물질을 말한다.
- 5) “비나노(non-nanoform)물질”이란 이온이나 분자 또는 벌크형태의 물질을 말한다.
- 6) “응집체(aggregate)”란 나노기술에서 입자들의 분리된 집합체로, 강하게 결합되어 있는 1차 입자(예를 들면, fused sintered, 또는 metallically bonded particles)의 경우와 같이 이를 이루고 있는 다양한 개별 요소들이 쉽게 분리되지 않은 형태를 말한다.
- 7) “집괴체(agglomerate)”란 나노기술에서 상대적으로 약한 힘(Van der Waals 또는 capillary)에 의해 함께 모여 있는 입자의 집합체로 가공 과정에서 더 작은 입자로 쪼개어질 수 있는 형태를 말한다.

3) 국내외 “나노기술(nanotechnology)”의 정의 현황

표 1. 국내·외 ‘나노기술(nanotechnology)’의 정의 현황: 출처: 식약처(2012)

국가	내용	발표기관 및 출처
	근본적으로 새로운 분자 조직, 물성 및 기능을 갖는 재료, 소자 및 시스템을 창출할 목적으로 원자, 분자 및 초분자 수준에서 이해, 측정, 조작 및 제어할 수 있도록 해주는 과학과 기술이다.	21st Century Nanotechnology Research and Development Act, '03 - 법적 정의
미국	a) 약 1-100 nm 크기에서 물질을 제어하고 이해하는 것으로 독특한 현상을 이용해 새로운 응용이 가능하다. b) 약 1-100 nm 크기로 수행되는 과학, 공학, 기술이다.	National Nanotechnology Initiative
	1-100 nm 크기의 물질을 제어하는 것으로, 그 독특한 특성을 이용해 새로운 적용이 가능하다.	American National Standards Institute-Nanotechnology Standards Panel
호주	10^{-9} m 크기에서 물질을 정확히 가공하는 기술로 새로운 기능을 획득할 수 있다.	Australian Office of Nanotechnology, Australian Government-Department of Industry, Tourism and Resources, '06
캐나다	적어도 한 면이 100 nm이하인 구조나 system을 직접 조작, 연구, 개발할 수 있는 기술이다.	Statistics Canada, '07
덴마크	나노미터 크기의 모야오가 크기를 제어할 수 있는 구조, 장치 및 시스템을 디자인, 생산, 적용하는 것이다.	덴마크 과학기술부, '06
프랑스	나노과학은 나노미터의 크기를 가진 구조, 시스템에서 관찰되는 현상을 연구하는 것으로 나노크기에 의해 물리/화학/생물학적 특성이 유래된다.	Ministry of Economy, Finance and Labour, '04

국가	내용	발표기관/출처
일본	나노미터 수준에서 원자와 분자들을 조작/제어하여 나노크기의 특이적 특성들을 사용한 새로운 기능을 개발하는 것이다.	National Institute of Science and Technology Policy, '06
네덜란드	새로운 분자구조를 가진 복합기능의 물질을 생산하기 위해 1-100 nm의 구조체를 다루는 것이다.	Nanotechnology network in the Netherlands
영국	0.1-100 nm 수준의 극미의 물질을 조작 하는데 이용되는 기술과 공정 - 나노과학을 제품 및 공정개발에 응용하는 것이다.	하원 과학기술위원회
EU	나노기술은 100 nm 이하의 물질을 조작, 정확한 배치, 측정, 모델링 및 제조하는 것이다.	EU, '03
	한 면 이상이 100 nm 이하인 기능성분을 최소한 한 개 이상 포함하며 이로 인해 물리, 화학, 생물학적 영향의 차이를 일으키는 물질을 다루는 것이다.	유럽특허청
한국	a) 나노미터 크기 범주로 의도적으로 제조, 가공하여 기존의 식품이나 벌크 물질의 특성과는 다른 새롭거나 개선된 물리적, 화학적, 또는 생물학적 특성을 나타내도록 하는 기술이다. b) 소재 등을 나노미터 크기의 범주에서 미세하게 가공하는 과학기술이다.	식약처 2016 신소재식품과 <u>나노기술응용식품 안전성 평가지침</u>
국제 기구		
OECD	일반적으로 100 nm 이하의 작은 구조/시스템을 조작/연구/개발하는 일련의 기술이다. 이로 인해 전혀 다른 특성을 가진 새로운 물질, 기구, 제품 생산이 가능하다.	WPN, '07
ISO	나노크기로 물질을 조작하고 제어하여 원자나 분자 혹은 벌크(bulk)물질과는 뚜렷이 구별되는 크기와 구조에 따른 특성과 현상을 이용하는 과학지식의 응용이다.	ISO/TC 299, '10

표 2. 국내·외 ‘나노물질(nanomaterial)’의 정의 현황출처: 식약처(2012)

국가	내용	발표기관/ 출처
EU	외부 한면 이상 또는 내부구조가 1-100 nm이며, 불용성 또는 생체지속성을 가진 의도적으로 제조된 물질.	Cosmetic Products Regulation, '09 <u>-법적정의</u>
	a) 제조된 물질로 한 면 이상이 100 nm 이하인 물질이다. b) 100nm 이상의 구조, agglomerate, aggregate이지만 나노크기의 특징을 갖는 물질이다.	Novel food regulation 개정안, '08
	a) 외부 한 면 이상이 1-100 nm 1% 이상으로 구성된 물질이다. b) 내부 또는 표면구조 한 면 이상이 1-100 nm인 경우이다. c) 비표면적 60m ² /cm ³ 이상(1 nm 이하 물질제외)인 경우이다.	Environment, '10
	천연 또는 제조한 물질로 외부 한 개 이상 면의 크기가 1-100 nm 이하가 0.15% 이상인 경우이다.	Commission recommendation, '11
덴마크	가장 작은 면이나 구조의 길이가 100nm보다 작은 물질이다.	환경부
한국	<u>나노물체</u> 란 3차원의 외형지수 중 하나, 둘, 또는 셋이 나노크기(약 1-100 nm)인 물질이다.	지식경제부, '09
	<u>나노소재</u> 란 구성입자 평균(산술) 크기가 나노물질 크기로 제조된 물질이나 소재, 또는 구성입자의 50%(개수 기준)이상이 제조된 나노물질로 구성된 물질이나 소재, 또는 구성 입자 평균(산술)크기가 나노물질보다 크더라도 나노기술에 의해 제조되어 크기가 1μm (1000nm) 미만인면서 벌크물질과 비교 시 새롭거나 개선된 특징을 갖는 물질이나 소재, 또는 위의 소재가 각각 또는 상호 화학적 또는 물리적으로 결합되거나 뭉쳐진 응집체 또는 집괴체를 말한다.	식약처 2016 신소재식품과 <u>나노기술응용식품 안전성 평가지침</u>
미국	a) 제조물질로 적어도 한 면이 나노크기(약 1-100 nm)인 물질이다. b) 1 mm 미만 제조물질로 크기에 의해 물리, 화학, 생물학적 특성이나 영향이 달라진 물질이다.	FDA, '11 (산업체 가이드스)
	제조물질로 적어도 한 면이 약 1-100 nm 크기를 가진 물질이다.	EPA, FIFRA (Office of pesticide program)
	제조물질로 적어도 한 면이 나노크기(일반적으로 1-100nm)인 입자, 물체 및 물질이다.	EPA, TSCA (Stewardship program)
	a) 제조물질로 한 면 이상이 약 1-100 nm인 물질이다. b) ‘버키볼’은 1 nm 이하여도 나노물질에 포함된다. c) 100 nm 이상의 aggregate와 agglomerate 중 쪼개져 1-100 nm 입자를 생성하는 물질이다.	American Chemistry Council

	<p>※ 제외 대상</p> <ul style="list-style-type: none"> - 비나노크기 형태의 물성을 비교 시 새로운/독특한 특성을 가지지 않는 경우 - 물 또는 생물학적 용매에 용해되는 경우 - 1-100 nm의 물질이 10%이하로 포함된 경우 - micelle, single polymer 	
캐나다	<p>a) 제조물질로 적어도 한 면이 나노크기(1-100 nm)인 물질이다.</p> <p>b) 모든 면이 나노크기보다 작거나 크고, 한 개 이상의 나노크기 현상(크기에 의해 물리, 화학, 생물학적 특성이 변한 경우)을 보이는 것이다.</p>	Health Canada, '09
호주	<p>a) 약 1-100 nm 크기를 가지거나 독특한 특성(나노크기에 따른 물리, 화학적 특성)을 갖도록 의도적으로 제조·생산·가공한 물질로 나노물체(한 면 이상이 나노크기) 또는 나노구조(내부 또는 표면구조가 나노크기)인 물질이다.</p> <p>b) aggregate, agglomerate도 나노구조이다.</p> <p>c) 정의를 충족시키는 입자가 물질 중 10% 이상을 차지하는 것이다.</p>	National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, '09
뉴질랜드	외부 한면 이상 또는 내부구조가 1-100nm이며, 불용성 또는 생체지속성을 가진 의도적으로 제조된 물질이다.	Environmental Risk Management Authority, '11
영국	두면 이상이 200nm 이하인 물질이다.	DEFRA, '08
국제기구		
OECD	<p>나노물체(한 면 이상이 나노크기) 또는 나노구조(내부 또는 표면구조가 나노크기)로 된 물질로서 나노크기는 약 1-100 nm이다.</p> <p>- aggregate, agglomerate는 나노구조에 포함된다.</p>	WPMN, '07
ISO/CEN	나노크기 물질이 한 면 이상 차지하고 있으며, 크기는 약 1-100 nm 범위인 물질이다.	'08
ISO/TS	외부 한 면 이상, 내부 또는 표면구조가 나노크기(약 1-100 nm)인 물질이다.	'08
기타		
International Council of Chemical Association	<p>a) 고체입자물질</p> <p>b) 의도적으로 나노크기 제조</p> <p>c) 한 면 이상이 1-100 nm</p> <p>d) c)로 구성된 aggregate, agglomerate</p> <p>e) 나노물질이 총 중량의 10% 이상이거나, 나노 물질 aggregate/agglomerate 50% 이상</p>	'10

제 2장 식품에 적용된 나노물질 및 기술의 분류

제 1절 식품첨가물을 표방한 나노물질

○ 식품첨가물로 규정된 소재 가운데, 주로 무기물에 해당하는 이산화규소, 이산화티탄, 셀레늄, 은, 금, 백금, 칼슘, Fe 등이 식품분야에 사용되어지고 있고, 주로 제조기술 방법에 대한 내용보다는 첨가물의 기능적 측면과 안전성 관련한 기술 내용이 대부분을 이루고 있다.

○ 무기물 중심으로 첨가물 소재를 나노로 미세화 하여 목적별로 사용하여 실제 식품에 산업화 하여 사용되고 있다.

○ 세부적인 내용은 식약처에 고시된 식품첨가물에 해당되는 소재에 한하여 관련 내용을 요약정리 하였다(표 3).

1) 이산화규소 (SiO_2)

○ 연구 동향을 살펴보면 이산화규소의 경우 이화학적 특성과 안전성, 특히 세포 독성을 분석한 연구가 대부분으로 제조 방법에 대한 연구는 다소 미흡한 상황이다. 일부 키토산과 이산화규소로 코팅한 과일의 이화학적 특성을 분석한 연구, 이산화규소 자체가 나노화 되었을 때 지니고 있는 구조와 기능성 단백질의 활성화에 주는 효과 등이 있다. 식품에 사용되는 이산화규소의 입자의 크기는 대략 20-600 nm 범위로 검색되어지며, 안전성에 대한 논란이 있다.

○ 특히 부분에서는 이산화규소의 나노화를 통해 액체내 용해도를 높이는 방법, 혹은 식품의 색을 유지하기 위한 나노이산화규소 제조법에 대한 특허 등록이 검색된다.

○ 제품으로는 나노이산화규소의 경우 식품의 맛이나 색에 영향을 주지 않아, 응고, 침전 등을 방지하는 효과가 있어 주로 식품의 코팅제로 이용되며 sugar powder로 이용되어 지기도 한다.

2) 이산화티탄 (TiO_2)

○ 연구 동향을 살펴보면 주로 세포를 이용한 독성실험을 통한 안전성 검증 연구가 대부분이다.

○ 제조기술 관련한 연구 동향은 나타나지 않으며 판매되는 제품에서는 유통기간 연장 및 부패방지 효과를 목적, 기타 상품성(색상, 신선도) 유지를 위해 식품에 첨가한 제품들이 검색되어진다. 이러한 제품으로는 “그릭요거트(미국)”, 초콜릿 “M&M(미국)”, “Pop-Tarts(미국)” 기타 sugar powder 등이 있다.

3) 셀레늄 (Selenium)

○ 셀레늄 나노입자에 관한 연구는 주로 세포 독성 분석과 항산화 효과에 대해 진행되고 있다. 중국 Qinhuangdao Taiji Ring Nano-Products Co.,Ltd에서 평균 입자 크기가 160 nm 인 셀레늄을 첨가한 녹차제품 “Nano-Selenium Rich Green Tea”을 선보이고 있다.

4) 은 (Silver)

○ 은나노에 대한 연구도 제조 방법에 대한 기술적인 부분에 대한 연구는 없고 주로 안전성에 대한 연구가 대부분이다. 은나노에서 방출되는 은이온이 독성이 있다는 연구와 은이 나노 입자화 되었을 때 은나노입자 자체의 독성이 있다는 보고 등 유해 메커니즘에 대한 연구 내용이 대부분을 차지한다.

○ 식품분야에서 응용되는 제품 등은 없으며 미국의 “Nano Silver Technology”라는 회사에서 항균효과 및 항산화 효과, 다른 기능성 물질의 체내 흡수율을 도와주는 목적으로 판매되어진다. 국내에서는 은은 식품첨가물로 분류하고 있지 않으나 미국 FDA에서는 “silver nitrate”의 형태로 안전물질로 등록하고 있다.

5) 칼슘

○ 칼슘의 alginate나 phosphate 등과 연합하여 나노입자를 형성하기 위한 소재로 활용하거나 굴 껍질, 달걀 껍데기를 활용하여 grinding한 탄산칼슘의 형태로 제조하여 동물실험을 통해 골다공증에 도움을 주는 것을 확인한 연구 논문이 있다. Islan (2015) 등의 연구에서 나노탄산칼슘과 마이크로탄산칼슘의 이화학적 특성을 분석하였고, Vergaro (2015) 등의 연구에서는 나노탄산칼슘을 nano carrier에 적용했을 경우 이화학적 특성 효과에 대한 연구를 하였다.

○ 기타 소재로써의 활용범위를 다변화하기 위해서 탄산칼슘의 분산력(침전 억제) 강화를 위해 다른 고분자 물질과 혼합한 혼합비에 대한 특허도 발견되었다.

○ 이렇듯 나노 크기의 탄산칼슘을 이용하여 주로 생체 흡수율, 생체 내 활성에 대한 동물실험이 주류를 이루고 있고, 기타 알긴산 칼슘 혹은 인산칼슘으로 제조되어 이화학적 특성을 연구한 내용이 주류를 이룬다.

○ 제조방법으로는 장비를 활용하여 여러 단계를 걸쳐서 제조하는 방식을 이용하였는데, 일반적으로 hammer milling기를 통해 1차 파쇄 기술(건식 상태)을 걸쳐서, 콜로이드 밀 균질기(colloid mill homogenizer)나 high pressure 균질기 (high pressure homogenizer)(습식상태)를 이용하여 제조하는 공정을 거친다.

○ 1차 파쇄 기술은 기존에 식품분야의 농산가공 분야에서 활용되는 기술이고, 2차 파쇄 기술로 사용되는 high pressure homogenizer가 emulsion 파괴에 사용되는 고도화 작업에 사용되어지는데 이를 이용하여 덩어리(bulk)의 고형물을 나노단위까지 미세화 공정을 적용한다. 생산 수율적인 면에서 검증이 필요하다.

표 3. 식품첨가물을 표방한 나노 물질

번호	연구 내용	물질	입자 크기	나노제조 용도	분류	출처
1	Nano bio-sim	Silicon dioxide	-	항균작용, 체내 생체 이용률 증진	제품	http://www.nanotechproject.org/cpi/products/bio-sim/
2	TiO ₂ 을 첨가한 육제품에서의 미생물 분석. TiO ₂ 을 등각류에 주입해서 in vivo 실험.	TiO ₂	*	항균 및 gas 보존 포장 기능, 체내생체 이용률 증진, 난용성/불용성 성분 가용화	논문	Long et al., 2014; Drobne et al., 2009
3	Nanotea	Selenium	160 nm	항균 작용, 항염증 작용, 체내 생체 이용률 증진	제품	http://www.nanotechproject.org/cpi/products/nanotea/
4	칼슘, 철, 셀레늄 등 물질은 일단 나노 파티클으로 만들면 생물 이용도 및 인체에 흡수도가 크게 증가하고 식품에서의 용해도와 안정성도 상승함.	칼슘, 철, 셀레늄 등	-	체내생체 이용률 증진, 난용성/불용성 성분 가용화	논문	GUAN et al., 2006
5	나노 은은 좋은 내열성이 가지고 고온살균 후에도 좋은 항균효과가 있음.	은	-	항균 및 gas 보존 포장 기능, 기타(입자의 안정성 향상)	논문	Liu et al., 2006
6	Nano bio silver	은	-	항균 작용	제품	http://www.nano-bio-silver.com/index.html
7	Maternal water	은	-	항균작용	제품	http://www.nanotechproject.org/cpi/products/maternal-water/
8	Silver - 22TM	은	-	체내 생체 이용률 증진	제품	http://www.nanotechproject.org/cpi/products/silver-22tm/
9	Organa Colloidal Silver	은	40-100 nm	체내 생체 이용률 증진	제품	https://organa.net/shop/organa-colloidal-silver/
10	돌산 갖 고유의 특성을 유지하면서 골다공증 예방, 성장발육 촉진, 신선도 유지, 가스(CO ₂)발생으로 인한 부패현상 제어, 유통기간 연장 등과 같은 기능성	칼슘	-	기타	특허	10-2009-0065014
11	식품과 친화되고 고 분산성으로 식품고유의 품질에 영향이나 손상이 없고 장기간 안정됨	칼슘	-	체내생체 이용률 증진 난용성/불용성 성분 가용화	특허	10-2011-0065687
12	식품첨가물용으로 이용할 수 있는 나노 칼슘 개발. 칼슘의 흡수율 및 칼슘 이용률을 증가시킴.	칼슘	-	체내생체 이용률 증진	논문	Gang et al., 2008

제 2절 생리활성 기능성을 표방한 나노물질

기존의 기능성 식품에서 표방했던 생리활성 성분의 효능 등을 앞세워 광범위한 나노 물질 제조 기술에 관한 연구가 수행되어지고 있고, 제품들이 판매되어지고 있다.

특히 연구 분야는 나노크기로 제조 했을 때 체내 흡수율과 생체 이용률에 효과적임을 나타내는 논문이 오랜 기간 동안 꾸준히 발표되어지고 있고, 실제 식품분야에서 사용되는 소재의 동물실험을 통해 입자 크기가 미세화 됨에 따라 흡수율이 증가되는 것을 보여주는 논문이 다수 보인다.

판매되고 있는 제품에서도 나노라는 용어를 붙여 광고에 다수 이용하고 있는데 실질적인 관리 감독 기관이 없어 그 크기와 효능에 대한 부분은 확인할 수 없는 문제점이 있다. 기능성 식품에서 나노기술을 접목한 연구는 지속적으로 증가할 것으로 보이며 이에 대한 연구지원은 필요하다.

- 건강 기능성을 표방한 나노물질에 대한 제조에 대한 연구 동향을 살펴보면 식품 공정 분야 중 나노화 공정을 중심으로 매우 다양한 연구들이 진행된다.
- 나노기술을 접목시킨 기능성 식품 분야는 하나의 내용으로 국한하기 어려울 만큼 다양한 제조 기술과 소재, 그에 따른 형태별 제조 법 등이 매우 광범위 하다.

1) 제조방법별 분류

- 식약처 용역연구개발과제 “식품용 나노소재의 분류 체계화 및 이화학적 특성 연구” 보고서(2012)에 따르면 식품용 나노 소재를 제조기술별, 형태별, 용도(사용목적별)로 구분지어 설명하고 있다. (표4).
- 제조기술별 분류 종류로는 top-down 방식으로 high pressure homogenization, high speed homogenization, emulsification-diffusion, spraying drying 등이 있으며, bottom-up 방식으로는 coacervation ionic gelation, ionic interaction, thermal gelation, nanoprecipitation, polymerization 등이 있고 각각의 기술의 특징은 아래의 도표에서 명기하고 있다.
- 이러한 제조 방식들은 주로 약학공학에서 사용되는 방법을 차용하여 식품 분야에 맞게 변형시켜 제조 하는 경우가 대부분이고 제조 방법의 새로운 개발 보다는 기존의 방법을 변형하여 제조 하는 경우가 대부분이다.
- 주로 연구 분야와 특히 분야에서 중요하게 생각하는 분류로 제조 방법에 따라 크기의 고도화가 결정된다.

표 4. 식품용 나노 소재의 제조 기술별 분류

제조기술 이름	제조기술의 설명	참조문헌
Coacervation (or Desolvation)	친수콜로이드(특히 고분자 용액, 단백질이나 탄수화물)에 다른 물질(침전체 등)을 첨가하거나 온도를 변화시킬 때 콜로이드가 풍부한 액상과 콜로이드가 부족한 액상으로 분리되는 기술이다.	Coestera et al., 2000; Mao et al., 2001; Kima et al., 2006; Kreuter et al., 2007; Motwani et al., 2008; Ofokansia et al., 2010; Zhao et al., 2010; Jun et al., 2011; Xiao et al., 2011; Yang et al., 2014
Ionic gelation	불용성 고분자 수용액과 트리폴리인산나트륨(sodium tripolyphosphate) 용액 등을 섞어 양이온성의 키토산 또는 젤라틴이 음이온성의 트리폴리인산염과 결합하여 나노입자를 형성한다.	Pan et al., 2002; Bajpai et al., 2004; Lin et al., 2005; Sarmento et al., 2007; Jang et al., 2008; Avadi et al., 2010; Dube et al., 2010; Ibarguren et al., 2012; Benavides et al., 2016; Otalora et al., 2016
Emulsification-Diffusion	고분자를 함유한, 물에 부분적으로 녹는 용매상과 안정화제를 함유한 수상은 상호 포화 후 열역학적으로 안정한 상태 이르고, 서로 섞이지 않은 용매의 균질을 통해 1차 유화 형태를 얻고, 2차 확산 공정과정을 얻기 위해 다량의 물을 첨가하는 기술이다.	Kwon et al., 2001; Choi et al., 2002; Wang et al., 2006; Poletto et al., 2008; Wang et al., 2006; Lertsutthiwonga et al., 2009; Rao et al., 2011; Semo et al., 2011; Lesmes et al., 2012; Li et al., 2012; Rao et al., 2012; Amir et al., 2013; Navideh et al., 2013; Safa et al., 2014; Jennifer et al., 2015; Matos et al., 2015; Nanik et al., 2016
Emulsification-Evaporation	Emulsification-diffusion과 유사하나 다량의 물을 첨가하는 대신 증발을 시켜 폴리머를 오일 표면에 침전시켜 코팅막을 제조하는 방법이다.	Tan et al., 2005; Anarjan et al., 2010; Kanakubo et al., 2010; Cheow et al., 2011; Leong et al., 2011; Silvaa et al., 2011
High speed homogenization/ high pressure homogenization	기계적인 장치의 도움으로 균질을 시키는 방법으로 주로 emulsion 제조에 많이 사용되나 고체형태의 입자 미세화에도 많이 사용된다.	Mühlen et al., 1998; Jennings et al., 2000; Einhorn-Stoll et al., 2002; O'Reilly et al., 2005; Liu et al., 2007; SeidMahdi et al., 2007; Ye, 2008; Zanetti-Ramos et al., 2008; Relkin et al., 2009; Belhaj et al., 2010; Qian et al., 2011; Yin et al., 2012; Hebishy et al., 2015; Fernandez-Avila et al., 2016
Nanoprecipitation	물질의 self-assembly를 유도하여 나노입자를 만드는 방법으로 비교적 간단하고 계면활성제 없이 제조가능하다.	Dalençon et al., 1997; Govender et al., 1999; Zhang et al., 2006; Sahu et al., 2008; Sahu et al., 2008; Hu et al., 2009; Yadav et al., 2010; Almouazen et al., 2012; Cho et al., 2012; Cho et al., 2012; Ferreira et al., 2012; Khayata et al., 2012; Tang et al., 2013; Miladi et al., 2015; Yang et al., 2016

Spray drying	보통의 분무건조(spray drying)는 회전 분무기와 압력 노즐에 의해 분무된 용액이 순간적으로 건조되는 방식으로 입자를 제조. 진동 메쉬(mesh)기술이 사용되어 더 작고 고운 입자 제조 가능하다.	Gomez et al., 1998; Rattes et al., 2007; Jafaria et al., 2008; Lee et al., 2011; Abreu et al., 2012; Mohajel et al., 2012; Moisiu et al., 2014; Berendsen et al., 2015; Rikkert et al., 2015; Edris et al., 2016
Polymerization	출발 물이 단위화합물을 단량체(monomer), 생성물을 중합체(polymer)라 하고 2종류 이상의 단량체가 중합하는 것을 공중합(co-polymerization)이라 한다.	Losa et al., 1993; Mesiha et al., 2005; Moura et al., 2008
Ultrafiltration	보통 여과로는 거르지 못하는 미소한 콜로이드입자를 여과 분별하는 방법이다. 콜로이드의 정제, 농축, 입자의 균일화 등에 이용한다. 각종 공경을 갖는 다공성 고분자막의 개발로 널리 이용한다. 1-100 nm의 경우 한외 여과라 한다.	Holt, 1998; Lee et al., 2004; Tsou et al., 2010; Kishida et al., 2011; Nikiforidis et al., 2011; He et al., 2016
Molecular inclusion	주로 베타 사이크로덱스트린이나 아밀로즈를 이용하여 구조적으로 소수성 내부에 코팅하고자 하는 소수성 성분을 포함시켜 코팅하는 방법이다. 향미성분 포집이나 지방산에서 주로 사용된다.	Abarac et al., 2016; Gong et al., 2016; Wen et al., 2016; Zhang et al., 2016
Colloid mill homogenization	마쇄장치를 이용한 전형적인 top-down 방식의 제조 방법으로 식물성 성분, 약초 성분 등에 주로 사용된다.	Maindarkar et al., 2005; Perrier-Cornet et al., 2014
Self-assembly (liposomes)	친수성과 소수성기를 지니고 있는 유화제 등을 수분에 분산 시키면 스스로 열역학적 에너지를 낮추게 위해 자발적으로 배열되는 방법이다. 저렴하고 수용성분 코팅에 많이 이용된다.	Amnuakit, 2016; Jin et al., 2016; Kaminski et al., 2016; Liu et al., 2016; Zhang et al., 2016

○ 특별히 식품 분야와 약학공학 전반적인 제조 방법과의 근본적인 차이점은 나타나지 않으나, 약학공학 제조 공정 특성상 유기용매의 주로 사용하여 다양한 방식의 제조 공정 과정을 응용할 수 있으나 식품 분야는 실질적으로 적용시켜 섭취해야하기에 다소 제한이 있다.

제조기술별 분류

Top-Down	Emulsification, Homogenization, Sonification, Spray-Drying, Electrospinning, Ultrafiltration
Bottom-Up	Coacervation, Ionic interaction, Gelation, Nanoprecipitation, Salting out, Solvent evaporation, Molecular inclusion, Polymerization, Solvent displacement, Self-assembly
Physical preparation	Emulsification, Homogenization, Sonification, Spray-Drying, Electrospinning, Ultrafiltration, Solvent evaporation
Chemical preparation	Electrospinning, Coacervation, Ionic interaction, Gelation, nanoprecipitation, Salting out, Solvent evaporation, Molecular inclusion, Polymerization, Solvent displacement

그림 1. 기타 나노 소재의 제조 기술별 분류.

2) 형태별 분류

- 형태별 분류는 주로 약학공학에서 주로 사용하는 개념으로 입자 디자인의 컨셉이 반영되어 명명되어진다.
- 주로 코팅 관련 기술에서 많이 활용되고, 코팅하고자 하는 물질과 감싸는 물질로 구분하여 이 둘 간의 상호 작용에 따른 제조법이 결정지어진다.
- 식품 분야에서 형태별 분류에 따른 나노 소재 개발이 의미하는 바는 약리성분 전달 체재처럼 체내에서 시간에 따른 방출 속도를 조절의 의미보다는 유통과정에 있어 온도, 압력, 습도 등의 조건에 견딜 수 있는 코팅 막의 형태 혹은 모양의 형태가 중요한 의미를 차지한다.
- 식품 분야에서는 나노에멀전이나 나노 파우더의 경우 상용화하여 적용하기 쉬운 형태이고 실질적으로 제품 개발에 많이 본 형태가 사용되어지고 있다.

표 5. 식품용 나노 소재의 제조 기술별 분류

형태 이름	특징	크기	참조
Nano-emulsion	제조 과정상 적절한 유화제가 첨가되고 고속 균질기로 1차 에멀전을 얻고 고압 균질기로 2차 에멀전 제조. 식품 분야에서 가장 많이 사용하고 주로 지질 성분의 나노화에 사용된다.	주로 200 nm 미만의 크기 emulsion. 연구 논문에 따라 다소 차이가 있으나 1 mm도 나노라 하는 경우도 있다.	Mao et al., 2001; Jafaria et al., 2008; Nikiforidis et al., 2011; Lesmes et al., 2012; Li et al., 2012; Rao et al., 2012; Troncoso et al., 2012; Jiménez-Colmenero, 2013; Alfaro et al., 2015; Esfanjani et al., 2015; Li et al., 2016; Mohammadi et al., 2016; Prasert et al., 2016
Liposomes	인지질의 이중막으로 구성된 입자로 친수성 성분을 주로 코팅할 때 사용된다. 친수성과 소수성 성분 코팅 가능하다. 세포의 원형질막과 동일한 성분으로 화장품 분야에서도 사용되어진다. 다만 저장안정성이 떨어진다.	다중막 리포솜은 1 mm/ diffusion 제조법을 사용 시 100 nm 미만이다.	Lamprecht et al., 2004; Wang et al., 2006; Minnes et al., 2008; Sánchez-López et al., 2009; Liu et al., 2010; Marsanasco et al., 2011; Rao et al., 2011; Frenzel et al., 2015; Frenzel et al., 2015; Amnuakit et al., 2016; Jin et al., 2016; Kaminski et al., 2016; Liu et al., 2016; Zhang et al., 2016
Micelles	리포솜과 유사하게 인지질을 주로 사용하지만, 셀 내부는 친유성기이며 외부는 친수성기로 구성된 점이 차이점이다. 매우 미세한 입자로 self assembly 방법에 의해 제조된다.	100 nm 미만으로 주로 소수성 성분을 코팅할 때 사용된다.	Holt, 1998; O'Reilly et al., 2005; Xia et al., 2006; Aliabadi et al., 2007; Sahu et al., 2008; Semo et al., 2011; Balde et al., 2016; Ma et al., 2016; Zhao et al., 2016
Nanotubes	직경이 나노크기인 원통모양의 튜브로 제조 방법 다양하다.	한 단면이 100 nm이고 길이는 정해진 것이 없다.	Lee et al., 2004; Graveland-Bikker et al., 2006; Graveland-Bikker et al., 2006; Yang et al., 2008; Sweileh et al., 2014; Bueno et al., 2016; Gouda et al., 2016
Nanostructured Lipid Complex	나노 구조의 네트가 형성된 체계이다..	복합적인 형태로 소수성 친수성 성분 코팅 가능하다.	Tamjidi et al., 2013; Aditya et al., 2014; Manea et al., 2014; Livney et al., 2015; Wan et al., 2016

Solid lipid nanoparticles	지질성분을 다소 고온의 oil에 녹인 뒤 나노화 한 후 온도를 낮추어 제조한다.	100 nm 미만으로 매우 고른 입자 분포이다.	Mühlen et al., 1998; Jenning et al., 2000; Zhang et al., 2006; Ipsen et al., 2007; Liu et al., 2007; Cheow et al., 2011; Aditya et al., 2014; Ramalingam et al., 2016
Nano-powder	일반 분말의 물질을 나노크기로 분쇄하여 체에 거르거나 나노 스프레이 드라이 방법을 이용하여 나노 분말화 된 형태이다.	주로 마이크로가 많아 크기 검증이 필요하다.	Gomez et al., 1998; Rattes et al., 2007; Jafaria et al., 2008; Lee et al., 2011; Abreu et al., 2012; Mohajel et al., 2012; Moio et al., 2014; Berendsen et al., 2015; Edris et al., 2016

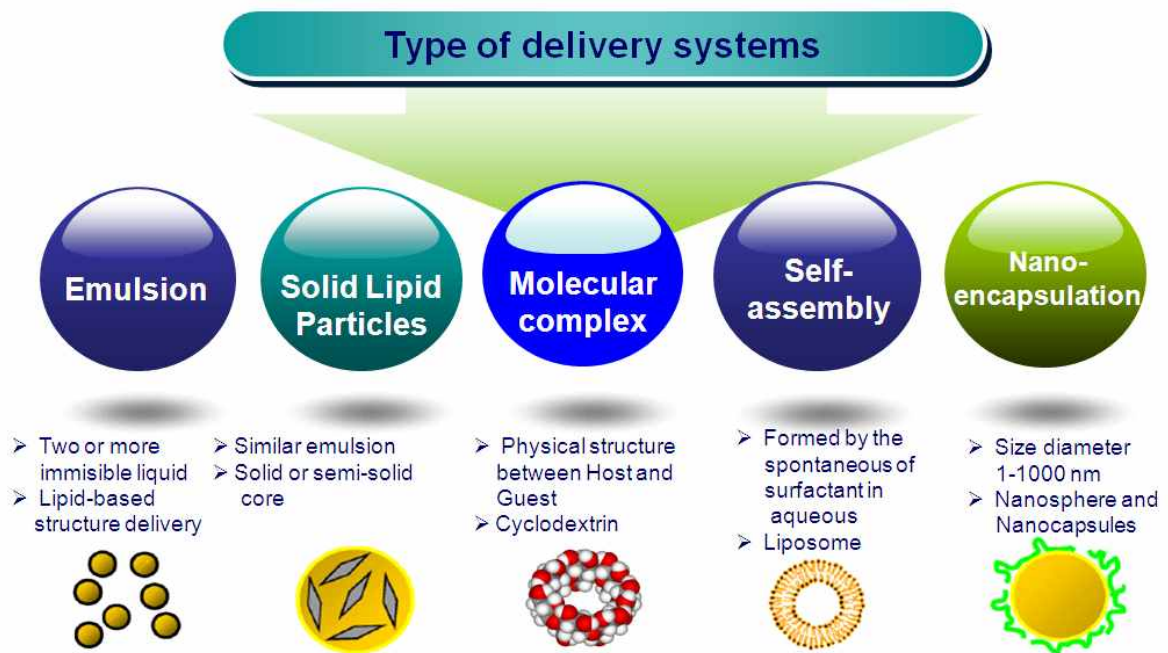


그림 2. 형태별 나노 입자들의 종류.

3) 용도별 분류

기능성 식품에서 가장 많은 의미를 차지하는 분야로 생체이용률 증진을 목적으로 나노 기술을 활용하고 있다. 검색되어지는 수도 가장 방대하고 특히 동물실험까지 실시하여 그 효능이 입증되어 관련 기술 고도화가 많이 이루어져 있다. 판매되고 있는 제품들은 대부분이 기능성 식품으로 판매되어 지고 있으며 주로 홍보용으로 “나노”라는 용어를 사용하고 있다. 실제 나노입자로 존재하는지, 그 양은 얼마나 존재하는지, 실제 광고하고 있는 기능이 나노가 되어 효과가 있는지에 대한 검증이나 관리는 이루어지지 않고 있다.

- 용도별 분류는 나노기술을 실질적으로 사용하는 이유에 해당하는 것으로 주로 기능성 식품의 관점에서 그 체내이용률을 높이기 위해 주로 사용되어진다. 그 종류도 매우 다양하고 실제 제품에서도 “나노”라는 용어를 광고용으로 사용한다.
- 가장 많이 연구되어지고 제품 판매 시 나노기술 접목의 이유인 체내 생체 이용률 증진으로 칼슘, 기타 미네랄 성분, 물에 잘 녹지 않은 지질성분, 예를 들어 CoQ10, CLA, 베타-글루칸, 금, 키토산, 콜라겐, 섬유질 등이 있다.
- 이들은 체내 흡수율이 떨어진다는 특징과 함께 물에 가용화되지 않거나 유기용매에도 녹지 않아 분산이 잘 이루어지지 않아 기타 제형이 나오질 않은 경우가 많은 성분들이다.
- 성분에 따라서는 나노화 뿐만 아니라 코팅 기술을 접목시켜 encapsulation하는데, 대표적인 것이 유산균이다. 코팅의 주된 목적은 외부 환경으로부터 보호하는 것이 1차 목적이고 2차 목적은 원하는 환경에서 코팅막이 녹거나 혹은 코팅 막을 통해 타겟 성분을 유출시켜 일정한 양을 일정한 시간마다 배출시키는 기능을 부여한다. 이러한 목적은 제약공학에서 주로 사용하는 방식을 식품 분야에서 적용시켜 연구를 많이 진행하기 위함이다.
- 제형을 원하는 목적대로 제조 개발한 뒤 세포 실험을 통해 독성을 검증하고 기타 이화학적 특성을 분석하여 저장조건에 따른 안정성 분석, 그리고 동물 실험을 통해 효능 평가까지 이루어진다.
- 홍삼, 유향, 마황 등의 한약 소재들이나 버섯, 식이섬유 등의 bulk의 식품 소재를 마쇄나 milling기를 사용해 제조한 제품들이 많이 판매되어지고 있으나 실제 크기 검증은 이루어지지 않고 있고, 그 크기의 유효성에 대해 의구심이 든다.

표 6. 기능성 식품을 표방한 나노 물질

번호	기술 목적	물질	입자 크기	분류	출처
1	체내 생체 이용률 증진, 난용성/불용성 성분 가용화	칼슘	30-900 nm	논문	Erfanian et al., 2014
2	체내 생체 이용률 증진	칼슘	100-1000 nm	논문	Kim et al., 2014; Ma et al., 2010
3	체내 생체 이용률 증진	칼슘	-	제품	http://biz.khan.co.kr/khan_art_view.html?artid=200910261137478&code=920100
4	체내 생체 이용률 증진	칼슘, 마그네슘	-	제품	http://www.nanotechproject.org/cpi/products/24hr-microactive-r-coq10/
5	체내 생체 이용률 증진	칼슘, 비타민D, 마그네슘	-	제품	http://apexel.co.kr/gnuboard4/bbs/board.php?bo_table=product_ko&wr_id=3&page=2
6	체내 생체 이용률 증진	칼슘, 마그네슘, 철, 구리, 나트륨	-	제품	http://www.biopharmasci.com/nanominerals-mineral-powder-p/33-nanominerals-s.htm
7	체내 생체 이용률 증진	CLA	-	제품	http://news.naver.com/main/read.nhn?mode=LSD&mid=sec&sid1=102&oid=038&aid=0002422863
8	체내 생체 이용률 증진	비타민C	-	제품	http://www.yakup.com/news/index.html?mode=view&cat=12&nid=193945
9	체내 생체 이용률 증진	multivitamin	-	제품	http://www.nanotechproject.org/cpi/products/anabolic-vitakic/
10	체내 생체 이용률 증진	셀포라판	200 nm	논문	Ha et al., 2008
11	체내 생체 이용률 증진	canola oil	30 nm	제품	http://www.reuters.com/article/2008/07/30/us-nanofoods-idUSN3044875220080730
12	체내 생체 이용률 증진	금	65 nm	제품	http://www.nanotechproject.org/cpi/products/mesogold-r/ , https://organa.net/shop/organa-gold
13	체내 생체 이용률 증진	금	< 100 nm	특허	10-2005-0030940 (2005)
14	체내 생체 이용률 증진	키토산	-	특허	10-2009-0065014

15	체내 생체 이용률 증진	키토산	-	제품	http://apexel.co.kr/gnuboard4/bbs/board.php?bo_table=product_ko&wr_id=9&page=2
16	체내 생체 이용률 증진	아이소플라본	50 nm	특허	PCT/EP2006/000827
17	체내 생체 이용률 증진	리코펜	-	특허	Seo et al., 2015
18	체내 생체 이용률 증진	Fulvic acid	-	제품	http://www.fulvic.org/nano_humic_fulvic_acid.html
19	체내 생체 이용률 증진	피쉬 콜라겐	-	제품	http://www.insijournal.com/news/articleView.html?idxno=5640
20	체내 생체 이용률 증진	콜라겐	-	제품	http://storefarm.naver.com/goodbuy365/products/349855452
21	체내 생체 이용률 증진	유청 단백질	-	제품	http://www.biopharmasci.com/nanopro-protein-isolate-powder-p/2np-btl-s.htm
22	체내 생체 이용률 증진	레티난	-	제품	http://www.ipharmnews.com/news/articleView.html?idxno=306
23	코팅기술 체내 생체 이용률 증진	유산균 (<i>L.plantarum</i>)	500 nm - 1 mm	특허	10-2013-0061200
24	체내 생체 이용률 증진	김치유산균	-	제품	http://vip.mk.co.kr/news/view/21/20/1368701.html
25	체내 생체 이용률 증진	cellulose	-	논문	Serpa et al., 2016
26	체내 생체 이용률 증진, 기타 (독성제거)	식이섬유	-	논문	Andrade et al., 2015; Serpa et al., 2016
27	체내 생체 이용률 증진	차가버섯	-	제품	http://www.dailysecu.com/news_view.php?article_id=11322
28	체내 생체 이용률 증진	노루궁뎅이 버섯	-	제품	http://blog.naver.com/mushblog/220138036391
29	체내 생체 이용률 증진	홍삼	-	제품	http://www.dt.co.kr/contents.html?article_no=2015061002109923809019
30	체내 생체 이용률 증진	마황추출물	< 150 nm	논문	Jeong et al., 2010
31	체내 생체 이용률 증진	복분자 추출물	< 100 nm	논문	Jeong et al., 2009
32	체내 생체 이용률 증진	복분자 추출물		특허	10-2010-0119954
33	체내 생체 이용률 증진	홍삼 추출물	100-500 nm	특허	10-2008-0004915

34	체내 생체 이용률 증진	홍삼	-	제품	http://apexel.co.kr/gnuboard4/bbs/board.php?bo_table=product_ko&wr_id=5&page=2
35	체내 생체 이용률 증진	사과	-	제품	http://www.biopharmasci.com/nanogreens-vegetable-supplements-p/1ng10-btl-s.htm
36	체내 생체 이용률 증진, 난용성/불용성 성분 가용화	Vit E	78 nm	논문	Laouini et al., 2012
37	체내 생체 이용률 증진, 난용성/불용성 성분 가용화	β -carotene	< 30 nm	논문	Kim et al., 2013
38	체내 생체 이용률 증진, 난용성/불용성 성분 가용화	CLA	-	논문	Dong et al., 2014
39	난용성/불용성 성분 가용화, 체내 생체 이용률 증진	법제유향	-	특허	10-2006-0062616
40	난용성/불용성 성분 가용화 체내 생체 이용률 증진	지용성 물질	100 nm	특허	10-2009-0106223
41	난용성/불용성 성분 가용화 체내 생체 이용률 증진	백금	-	특허	10-2011-0108928
42	난용성 성분 가용화	캡사이신	< 150 nm	특허	10-2009-0094815
43	난용성/불용성 성분 가용화	키틴, 키토산	-	논문	Chantararataporn et al., 2013
44	난용성/불용성 성분 가용화, 기타 (색도 향상)	산화철(Fe_2O_3)	20-100 nm	논문	Florentine et al., 2011
45	항균 및 gas 보존 포장 기능	고추냉이 수용성 추출물	-	논문	Seo et al., 2010
46	항균 작용, 체내 생체 이용률 증진	금	70-120 nm	제품	https://www.purestcolloids.com/mesogold.php
47	항균 및 gas 보존 포장 기능, 코팅기술	시나몬 오일 에션셜 오일	100-150 nm	논문	Zhang et al., 2016; Francesco et al., 2011
48	코팅기술	lycopene	120 nm	논문	Hu et al., 2013
49	코팅기술	catechin	100-120 nm	논문	Krishnaswamy et al., 2012

50	코팅기술	olive leaf phenolic compounds	< 10 nm	논문	Mohammadi et al., 2016
51	코팅기술	커큐민	270 nm	논문	Xie et al., 2013
52	기타 (베타글루칸 추출효율 개선)	베타글루칸	-	제품	http://www.hanabiotech.co.kr/product/product.php?mode=item&it_id=1245840684
53	기타	키토산	-	특허	10-2014-0010751
54	기타	들깨	< 500 nm	특허	10-2011-0008248
55	기타	플라바논	22-28 nm	논문	Ko et al., 2014
56	기타	과인애플 착즙액	45-53 nm	논문	Park et al., 2015
57	체내생체 이용률 증진	참쌀전분	-	논문	Jeong et al., 2017
58	체내생체 이용률 증진	아사이베리	-	논문	Park et al., 2017
59	체내생체 이용률 증진	탄산칼슘	< 100nm	논문	Kim et al., 2014
60	체내생체 이용률 증진	TiO ₂	< 200nm	논문	Jo et al., 2016
61	체내생체 이용률 증진	SiO ₂	< 5nm	논문	Jo et al., 2016

식품용 나노소재의 분류

식품용 나노소재의 제조법, 형태, 용도 등 조사 - 전문서적, 관련기관 홈페이지, 인터넷 사이트, 연구논문 데이터베이스 등을 통해 자료를 수집하고, 연구진 내부 세미나 및 워크샵 등을 통해 자료를 비교, 분석

I. 형태별 분류

← 나노소재 특성 대변, 제품분석 시 용이

Biopolymeric nanoparticles, Nanoemulsions, Liposomes, Micelles, Nanotubes, Solid lipid nanoparticles, Nanofibers, Bilayers, Nanopowders, etc

II. 제조기술별 분류

Coacervation, Ionic gelation, Emulsification-diffusion, Emulsification-evaporation, Homogenization, Ionic interaction, Thermal gelation, Nanoprecipitation, Spray-drying, Polymerization, Ultrafiltration, Electro-spinning, etc

III. 용도별 분류

Delivery (enzymes, amino acids, vitamins, minerals, phytochemicals, drug), Antioxidants, Preservatives, Enhancement of stability, Control release

* 식약처, 미래식 최종 보고서 (2012): "식품용 나노소재의 분류 체계화 및 이화학적 특성 연구", 5

그림 3. 나노 식품의 제조 방법과 분류, 2013년 식품정책토론회 미래 유망 나노식품 관리 방안 마련 정책 토론회.

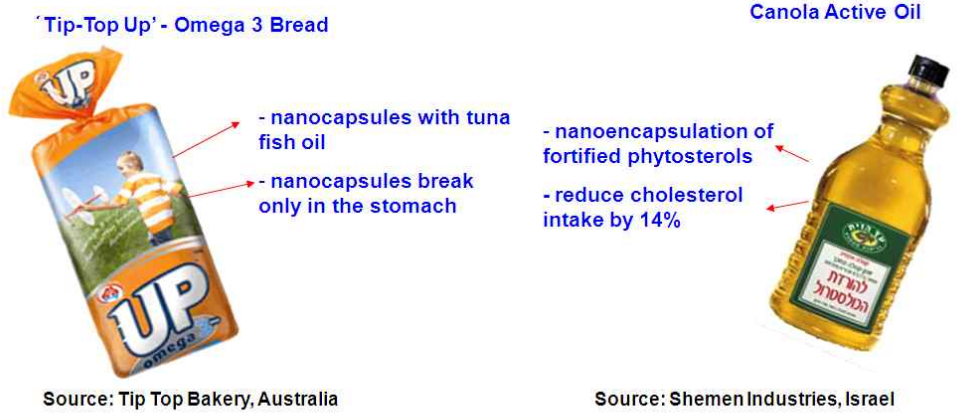
제 3절 일반 식품에 적용된 나노 기술

- 일반식품도 기능성 식품에서 분리한 기술 목적과 동일한 내용을 담고 있으나 기타 이미, 이취의 masking, 향미성분 증진 등의 목적에 나노 기술이 적용된다.
- 하지만 대부분 기능성 식품에서 추구하는 나노 기술 적용 목적과 유사하게 체내 이용률 증진과 난용성/불용성 성분의 가용화가 주를 이루고 있다.
- 최근에는 맛이나 다른 기능 부여에 나노기술을 접목하고자 하는 시도가 많이 있는데, 소금입자를 나노화 하여 동일한 농도의 소금이라 하더라도 나노입자화 하였을 때 혀에서 느껴지는 짠맛의 강도가 더 강하게 느껴진다는 보고가 있다. 또한 나노캡슐로 소금을 코팅하여 제빵 및 제면을 제조했을 시 상대적으로 동일한 농도에 대해서 짠맛에 대한 강도가 높다는 연구 결과가 있다.
- 전혀 밋밋하지 않은 저지방 마요네즈, 칼로리가 줄어든 초콜릿, 윤기가 흐르는 먹음 직스러운 빵 등이 해당된다.
- 영국의 식품연구소 (IFR) 이머징 파트의 책임자인 빅터 모리스 박사는 저지방 원료를 사용하면서 고지방의 질감의 맛을 내거나 과일이나 비타민D가 함유량이 높고 포만감이 좋은 아이스크림 제법을 개발하였다.
- 특히 에멀전의 크기를 나노화 할 경우 아이스크림의 경우 잘 녹지 않아 유통기간이 길어지며, 상대적인 유화제 사용량을 줄여 줄 수 있다고 보고하였다.
- 기타 향미성분 강화시킨 캔디류, 나노입자 코팅을 통해 팽윤제의 premature를 막고 반응을 촉진시켜 제빵의 품질을 좋게 하거나, 기타 영양소 균형표를 맞춘 에너지 바 등에 사용한 예가 있다.



그림 4. 나노 코팅기술을 응용한 일반식품군 예1.

- 실질적으로 오스트리아 Tip-Top 회사에서는 오메가3지방산이 풍부한 식빵을 나노캡슐화하여 판매하였고, 이스라엘의 Shemem Industries에서는 카놀라 오일에 피토스테롤을 첨가하여 코레스테롤 감소 기능성 오일을 판매하였다.



Western Australia : incorporation nanocapsules containing tuna fish oil (a source of omega 3 fatty acids) in their top selling product "Top-Top" up bread.

그림 5. 나노 코팅기술을 응용한 일반식품군 예2.

표 7. 나노기술을 표방하는 일반 식품

번호	기술 목적	물질	입자 크기	분류	출처
1	체내생체 이용률 증진	아이소플라본	50 nm	특허	PCT/EP2006/000827
2	체내생체 이용률 증진	땅콩나물	100-350 nm	특허	10-2012-0092386
3	난용성/불용성 성분 가용화	식물성 스테롤	200-300 nm	특허	10-2008-0109835
4	난용성/불용성 성분 가용화 체내생체 이용률 증진	고추의 매운맛 성분	< 150 nm	특허	10-2009-0094815
5	코팅기술	hemicellulase	98-170 nm < 200 nm	논문	Kim et al., 2015; Kim et al., 2015
6	코팅기술	유청 단백질	100-350 nm	논문	Bejrapha et al., 2011
7	코팅기술	capsicum oleoresin oil	1.7-2.1 mm	논문	Nakagawa a et al., 2011
8	코팅기술	flaxseed oil	2.9-5.2 mm 6.4-15.9 mm	논문	Helena et al., 2013; Frascareli et al., 2012
9	코팅기술	β -carotene, α -tocopherol	1.6 mm	논문	Gaspar et al., 2016
10	코팅기술	EGCG-casein	75-160 nm	논문	Xue et al., 2013
11	코팅기술	nisin		논문	Muhammad et al., 2015
12	코팅기술, 향미 성분 포집	cinnamaldehyde	< 200 nm	논문	Jo et al., 2015
13	향미 성분 포집	향미성분	-	논문	DENG et al., 2014

14	향미성분 포집, 기타(부드러운 식감)	cacao	-	제품	http://www.forbes.com/2006/01/09/in_jw_0109soapboxslide.html
15	기타	대두분말	-	특허	10-2014-0078596
16	기타(저칼로리, 단맛 증진)	이산화규소 (실리카)	4-6 nm	제품	http://dl.dongascience.com/magazine/view/S201007N012
17	향미성분 포집(이취·이미 masking)	어유	-	제품	http://dl.dongascience.com/magazine/view/S201007N012
18	기타(저염)	소금	-	제품	http://dl.dongascience.com/magazine/view/S201007N012
19	코팅기술, 기타(저염)	소금	180-350 nm	특허	10-2013-0098379
20	코팅기술, 기타(안정화)	수용성 활성 성분	120-250 nm	특허	PCT/IB2013/054730
21	코팅기술, 기타(저염)	소금	< 200 nm	특허	10-2016-0050275
22	코팅기술, 기타(저염)	소금	-	특허	10-2014-0195281
23	코팅기술, 기타(저염)	소금	-	논문	Cho et al., 2015
24	효소 고정화	당	-	특허	10-2017-0055167
25	체내생체 이용률 증진	유산균	-	특허	10-2014-0140387
26	기타(저염)	소금	-	특허	10-2015-0021254
27	코팅기술	홍삼추출물	-	특허	10-2014-0039229
28	기타(쓴맛 감소)	홍삼추출물	-	특허	10-2015-0112562
29	체내생체 이용률 증진	칼슘	-	특허	10-2015-0010391
30	체내생체 이용률 증진	유산균	-	특허	10-2016-0080966

제 4절 식품 포장에서 나노 기술

- 식품 포장재에 나노 물질을 첨가하여 여러 가지 기능이 부가되는데, 강도가 증가되거나, nanoclay 등을 사용하여 제작한 용기 내 들어 있는 음료에서 방출되는 gas가 빠져나가는 경로를 길게 만들어 주어 gas 보유 기능을 부여한다.

Nanocomposites for Food Packaging

Smart Packaging System to optimize product shelf-life



Lighter and stronger
Minimizes loss of CO₂ from Beer



Nanoclay particle based Beer Bottle
(Nanocor Inc)

Mitsubishi and Nanocorplastic beer bottles development



The nanocomposites structure minimizes loss of carbon dioxide from the beer and the ingress of oxygen to the bottle, keeping the beer fresher and giving it up to a six-month shelf-life.

그림 6. 식품포장에서 나노구성성분의 응용.

- 기타 천연 항균 물질(주로 계피오일)을 나노화 하여 첨가하거나 은나노나 나노산화 아연 등을 첨가하여 항균성 필름을 개발, 농산물의 유통기간을 연장시켰다(나노인사이드, 2014).
- 사과에서 사용하는 왁스 코팅의 경우도 포장용지의 막 두께를 5 nm로 얇게 만드는 기술을 접목시켜 상용화 시키고 있다. 전문가들은 10년 안에 나노 기술을 이용한 식품포장이 전체 포장에서 25%를 차지할 정도로 비중이 커질 것이라고 전망하고 있다(나노인사이드, 2014).

표 8. 나노기술이 반영된 포장재

번호	기술 목적	물질	입자 크기	분류	출처
1	항균 기능	은	-	특허	10-2005-0087823
2	항균 기능	은	-	논문	Jiang et al., 2013
3	항균 기능	은, 백금	은: 0.1-500 nm 백금: 1-100 nm	특허	10-2015-0108927
4	항균 기능	은, 금, 게르마늄	-	특허	10-2007-0124812
5	향기 용기	vanillin/ cyclodextrin	140-245 nm	논문	Kayaci et al., 2012
6	항균 기능	cinnamon oil	270-410 nm	논문	Wen et al., 2016
7	항균 기능	EVOH	-	논문	Cerisuelo et al., 2012
8	항균 기능	bentonite, montmorillonite, halloysite	-	논문	Meira et al., 2015
9	용기강도 강화	TiO ₂	10-30 nm	논문	10-2008-0136065
10	용기강도 강화	TiO ₂	-	특허	PCT/GB2010/051515
11	용기강도 강화	fish protein	-	논문	Rostamzad et al., 2016
12	용기강도 강화	Cloisite	< 100 nm	논문	Pereira de Abreu et al., 2007
13	기타 (산소 투과성 증가)	montmorillonite	-	논문	Khalaj et al., 2016
14	이취제거	TiO ₂	-	논문	Choi et al., 2015

제 3장 국내 · 외 주요 정책 및 투자동향

제 1절 국내 정책 및 투자동향

○ 다양한 정책 보고서가 여러 부처에서 발간되어 나오나 식품 분야를 기반으로 한 국책연구소나 정부부처에서 발간한 정책과제 관련 보고서가 발간되어 있지 않다. 따라서 중앙 정부 부처에서 통합적으로 발표하는 자료를 통해 식품 맞춤형 나노기술에 대한 방향성을 분석 유추할 수 있다.

1) 2016년 나노기술발전시행계획(안)(2016)

○ 그 가운데서도 전체적인 흐름을 알 수 있는 2016년도 나노기술발전시행계획(안)(제4기 나노기술종합발전계획)을 통해 나노기술에 대한 정부 정책을 살펴볼 수 있다.

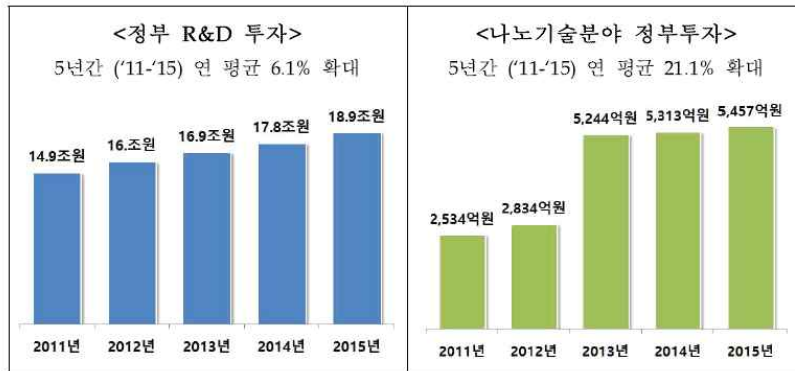


그림 7. 최근 5년간 정부 R&D 투자 및 나노기술분야 투자실적 (출처: 국가과학기술심의회(2016)).

○ (최근 5년간) 우리나라 나노분야 SCI 논문수는 26,144편으로 세계 4위를 차지한다. 연평균 증가율은 7.0%로, 전체 국가 평균 증가율(7.4%)에 비해 다소 낮은 것으로 나타난다.

표 9. 주요지표 성과(출처: 국가나노기술심의 위원회)

구분	2011	2012	2013	2014	2015	비고	
연구개발	특허 (세계 3위)	391건 (세계 3위)	443건 (세계 3위)	452건 (세계 4위)	527건 (세계 3위)	678건 (세계 3위)	· 연평균 14.8% 증가 중이며 '08년 이후 세계 3위유지
	논문 (세계 3위)	4,413편 (세계 3위)	4,960편 (세계 3위)	5,248편 (세계 4위)	5,736편 (세계 4위)	5,787편 (세계 4위)	· 연평균 7% 증가 중이며, 인도(3위)의 높은 성장세로 '13년 4위로 순위 하락
기술사업화	237건	619건	694건	1,049건	-	· '11년 이후 증가 추세	
인프라 이용 건수	48,794건	51,245건	52,817건	50,621건	54,390건	· 연평균 2.8% 증가 추세이나, '12년 이후 변화율 미미	
인력양성	8,498명	8,719명	8,158명	8,548명	9,142명	· 연평균 1.8% 증가추세, 전년대비 6.9% 증가	

* 출처 : (특허) 국가나노기술정책센터 (Wips社 USPTO Data Base, '16.2 기준)
 (논문) 국가나노기술정책센터 (Thomson社의 SCIE Data Base, '16.2 기준)
 (기술사업화) 국가과학기술지식정보(NTIS) 나노분야 국가연구개발사업 DB
 (인프라) 국가나노인프라협의체 운영실적
 (인력양성) 국가나노기술정책센터, 나노기술연감(2011~2015)

· 연구인력 기준 : 정부출연연구원 및 대학연구실 연구원수

- 기술 사업화 성과를 살펴보면 최근 5년간 나노기술의 기술이전 1,200건(징수액 631억원), 사업화 성과 2,912건으로 연평균 35.3% 증가되었다고 보고되었다.
- 2016년 나노분야 정부 투자계획은 2,797억 원으로 전년 대비 6%증가하였다. 부처별 투자계획을 살펴보면 농림축산식품부는 2015년에 29억원을 투자 대비 3,140백만원으로 증가하였다. 식품의약품안전처의 경우도 1,530억원으로 전년도 대비 1,420억에서 7.7% 증가하였다.

표 10. 2016년 실적대비 2016년 계획비교(출처: 국가나노기술심의 위원회)

(백만원, %)

구 분		'15년 실적	'16년 계획	증감액	증감률
기관	▪ 미래창조과학부	171,441	194,973	23,532	14%
	▪ 교육부	65,065	58,046	△7,019	△11%
	▪ 농림축산식품부	2,900	3,140	240	8%
	▪ 산업통상자원부	60,587	66,110	5,523	9%
	▪ 보건복지부	1,000	1,000	-	-
	▪ 환경부	18,782	10,097	△8,685	△46%
	▪ 고용노동부	248	106	△142	△57%
	▪ 식품의약품안전처	1,420	1530	110	7.7%
	▪ 방위사업청	2,826	2,874	48	2%
	▪ 중소기업청	54,806	57,339	2,533	5%
	▪ 출연기관	166,649	184,515	17,866	11%
합 계		545,724	579,730	34,006	6%
부문	▪ R&D	464,931	498,224	33,293	7%
	▪ 인프라	22,740	33,562	10,822	48%
	▪ 인력	58,053	47,944	△10,109	△17%
	합 계	545,724	579,730	34,006	6%

- 식품 분야에서 투자한 금액 대비 나노 관련 논문이나 기술이전에 대한 성과 보고는 아직 나타나지 않으나 지속적인 투자는 이루어질 것으로 사료된다.
- 특히, 식품 가공산업 경쟁력 강화를 위한 나노 가공 원천기술 개발 등을 통해 나노 입자 기술 확립을 통한 가공 식품 개발 및 산업화 추진에 주력을 한다고 보고되었다.
- 기타 나노 바이오 기법을 이용한 유해 물질 검출 및 질병 진단 연구 기반을 확립하여 단일 제제 및 복합제제에 대한 효능 및 안전성 평가를 실시하고 선발 박테리오파지를 활용한 시제품 생산을 추진하고, 항생물질 신속검사를 위한 색 변이 앵타 센서 시스템 확립 및 성능 검증 추진에 주력한다고 보고되었다.

2) 대한민국 나노혁신 2015 보고서(2016) 미래 나노기술

- 본 보고서에서는 전체적인 나노 기술 분야 가운데 나노기술 5개 분야를 분석하였는데 그 가운데 “건강한 삶을 구현하는 나노바이오 기술” 분야에서 나노기술을 적용하여 생명현상을 규명하고 바이오 및 의료 분야에 활용함으로써 질병의 예방/진단/치료가 가능하고 관련 제품과 서비스의 확대가 가능한 기술을 제시한다.

- 고령화에 따른 건강한 생명연장을 위한 식품 및 생활용품의 건강 기능성 부여에 대한 사회적 수요 증대로 고감도 감지 및 표적치료가 가능한 나노기술에 대한 기대가 증가하고 있다.
- 감염병에 대한 선제적 대응 및 효과적 방어 수단으로 나노 기술을 접목시킬 필요가 있다. 특히 최근 발명한 메르스, 조류독감, 신종 플루 같은 신종 감염병을 조기 진단하고 치료할 수 있는 기술에 대한 수요 증가가 요구된다.
- 7대 전략분야로 “식품안전 나노센서” 분야를 소개하고 있는데, 저장, 가공, 유통 중인 식품에서 배출되는 미량의 유해 성분을 분자 수준에서 검출하고 모니터링 가능한 센서를 구축하는 것이 필요하다. 이는 식품산업과 유통시장의 확대에 따라 소비자의 접근이 가능한 높은 신뢰도의 식품안전 모니터링 수요가 증가할 것으로 예측된다(2018년 식품 유해 화합물 검사 시장: 2조 6천억 원).

3) 국내 국책과제별 투자동향

- 부처별 고유 업무분야를 중심으로 기초, 응용, 개발연구를 추진 중이다.
 - 식품 분야와 연관성이 있는 부분도 미래기술로 포함된다.
 - 주로 식품 안전, 작물보호, 바이오 소재 분야에서 나노 기술 응용 연구를 추진한다.
- (농기평) 국책과제로 투자되어온 연구 동향은 주로 농기평에서는 2007년 이후에 나노 관련한 연구과제를 공모하여 수행하였는데 주된 분야는 식품으로 주 목적은 코팅기술을 하거나 그렇지 않더라도 미세화 하여 생리활성 물질에 대한 효율을 증진시키는 연구과제가 주류를 이룬다. 기타 불용성/난용성 성분을 가용화하기 위한 나노 기술의 접목이나 포장재의 소재를 나노물질을 첨가하여 항균 포장재 개발 등에 투자하고 있다. 2015년 이후부터는 이에 대한 기초연구의 산업화, 대량화에 초점을 맞추기 위해 대량 생산을 목적으로 한 과제가 공모 되어 현재 진행 중이다.
- (식약처) 정부 부처 특성상 관리 감독을 위한 나노 과제를 주로 공모 하였는데, 식품과 연관된 과제로는 나노소재의 표준화를 위한 과제가 수행되어져, 나노기술이 응용된 식품 분야의 연구 분야를 분석하여, 형태별, 제조별, 용도별로 구분지어 분석하였다. 이 가운데 11가지의 표준물질을 선정하여 표준 제조 법을 마련했다. 추후에 식품속에 포함된 제품에 대한 분석 방법 및 가이드라인으로 활용이 가능함을 시사한다.
- (연구재단) 식품과 정확히 맞아 떨어지는 기술 분야는 아니어도 기초적인 자료를 마련하는 데 다양한 핵심기술로 다양한 형태의 국책과제가 공모되었다. 선정분야에서는 생명과학 분야의 다소 넓은 영역의 범주에서 과제가 선정되었다.
- (농진청) 농진청에서는 농업분야에 직접적으로 응용할 수 있는 기술에 대한 연구를 중심으로 과제가 공모 및 선정되었는데, 식중독균 검출 센서나 양용작물의 상품성 증진을 위한 기술 기타 기능성 상품 개발 응용에 연구되었다.

제 2절 국외 정책 및 투자동향 (나노기술: 농업의 신 개척지 (농진청: 농·식품분야의 나노기술 적용 사례와 전망 (2014))

- (미국) 식품의약품청(FDA)은 FDA 관할의 모든 나노기술 응용제품에 대한 안전성과 효능, 품질, 성능 평가를 목적으로 그 수단과 기준, 접근방향 정립을 위해 ‘나노기술 규제과학연구계획(2013)’을 마련했다.
 - 나노기술 규제과학연구계획은 규제과학연구가 필요한 우선영역 9가지를 밝힌 ‘2013 규제과학 전략계획서’를 발표하고, 나노기술연구사업의 나노안전(환경, 보건, 안전(EHS)) 연구분야에서 명시한 연구 필요사항을 교차 반영하여 추진하고 있다.
- (미국) 농업부(USDA)는 세계 최초로 농업과 식품에서의 나노기술 적용에 관한 로드맵 작성 (2002)
 - 핵산 바이오엔지니어링, 스마트 유통시스템, 나노바이오프로세싱, 바이오분선용 나노센서, 나노재료 및 바이오표면 연구가 주목받는 분야라 보고하였다.
 - NIA (Nanotechnology Industries Association)의 분석 결과 농업분야 기술 특어의 60%가 최근 4년 사이 신청: 용수처리, 토양회복, 폐기물 최소화 등에 대한 내용이 가장 많다. 작물 보호와 양분 전달을 목적으로 한 나노 분자 및 직접적인 농업생산성 증대방법도 자주 다뤄진 주제들 중 하나이다.

미 농업부/농업연구청(USDA/ARS)의 나노기술 투자 연구 분야 (2013)	
■ 특수 농작물로부터 건강 고부가 식품 생산을 위한 가공기술	
* 식용필름에 메틸셀룰로오스와 키토산 나노입자 응용 등	
■ 식품 안전성과 보안을 위한 영상기술	
* 나노로드를 사용한 라만 산란* 또는 식품 유래 병원균과 독소 검출을 위한 나노 단백질 및 DNA 압타머 사용 등	
※ 빛이 어떤 매질을 통과할 때 빛의 일부가 진행방향에서 이탈해 다른 방향으로 진행하는 현상이 산란, 산란된 빛 중 에너지를 잃거나 얻으면서 산란되는 과정이 라만 산란, 이 산란광은 물질의 고유특성으로 분자의 분자구조를 추론 가능	
■ 농업원료로부터의 새로운 바이오화합물 제조방법	
* 나노복합체, 나노폼, 나노섬유, 마이크로에멀전 및 하이드로겔 생산을 위해 바이오 고분자의 블로우 방사와 전기 방사 등	
■ 짐승의 가죽과 피혁의 친환경 프로세스와 새로운 응용 분야	
* 고효율의 생분해성 공기필터용 콜라겐 기반 나노섬유 등	
■ 사탕무 펄프, 굴껍질 및 기타 식품 공정 부산물의 식물세포벽 다당류로부터 새로운 생활성 및 생체 기반 제품 개발	
* 생활성 식품첨가물의 방출제어와 포장기술 분야 응용을 위한 다당류 기반의 나노입자 등	

* 출처: 2012년 미국의 나노기술 정책 동향. 2012. 국가나노기술정책센터(KISTI)

그림 8. 미국 농·식품 분야 나노분야 투자 연구 분야.

- (미국) 농무부 산하 농식품연구소(NIFA)는 자체 농식품연구계획을 통해 나노기술연구사업(NNI) 5대 연구영역에 예산을 투자하고, 다양한 외부 연구 활동을 지원하고 있다.

표 11. 농식품연구소의 나노기술 연구 지원 분야(FY 2016)

Title	Institution
Development of a multiplex biosensor system with nanobiomolecular probes for rapid detection of common foodborne bacterial pathogens	Auburn University
Development of nanocellulose-based hybrid fuel	Auburn University
Nanoscale elements suppress plant disease, enhance macronutrient use efficiency, and increase crop yield	Connecticut Agricultural Experiment Station
Nanotechnology for improving local systemic activity of copper (Cu) pesticides and measuring sub-surface Cu bioavailability in plant tissue	University of Central Florida
Behavior of nanobiomaterials in the gastrointestinal tract and their risk assessment	University of Georgia
Development of a novel enzyme-enabled raman spectroscopic imaging with nano-scale resolution	Iowa State University
Development of a multi-enzyme biosensor with ink jet printed nanoparticles for real-time multi-pesticide screening in the field	Iowa State University
Elucidation of absorption, accumulation, and toxicity mechanisms of titanium dioxide nanoparticles present in foods	University of Massachusetts
Nanochitosan wood treatments: A combined fire-retardant and antifungal treatment	Forest and Wildlife Research Center
Innovative methods to improve the sensitivity of nanosensors for detection of biomolecules in food systems	Lincoln University
Transforming nanocellulose into an advanced biorenewable reinforcement with hyperbranched polymers	Clemson University
Compounding amyloid reinforcement into rubber	Virginia Polytechnic Institute

○ (캐나다) 보건부에서는 나노프로젝트로 식품 중 나노가 섭취 후 분리되어 소화기관을 쉽게 침투하고, 인체에 유해할 수 있다는 가설 하에 국제적인 측정방법을 개발하고, 인체 동역학 모델링 등을 위한 사업에 참여하고 있다. 또한 국립나노기술연구소(NINT)는 나노기술 분야만 연구하는 연구소로 앨버타 주정부 및 앨버타 대학이 공동으로 지원 및 운영하는 국립 연구기관이다.

- 하이브리드 나노전자: 나노크기에 특수 매커니즘을 적용해 회로 전자 기능을 제공하며, 기존의 전기 회로망은 불가능한 크기의 더 작고, 빠르며, 에너지 효율이

높은 구성품을 개발한다.

- 에너지 생성 및 저장: 에너지 획득, 저장, 회수에 혁신 기술을 이용해 한층 안정적이고 믿을 수 있는 전기 인프라와 신재생 전력 저장 시스템을 구축한다.
- 나노 바이오소재: 화석 연료의 사용과 의존도를 낮출 수 있는 방안으로 재생이 불가능한 석유 원료를 바이오매스로 전환한다.
- 대사체 감지 시스템: 약학, 임상 의약품 시험, 독성학, 이식 모니터링, 신생아 선별 검사 및 임상화학에 막대한 발전을 유도한다.
- 혁신 지원: 국립 나노기술연구소는 지역, 국가, 해외 민간 및 공기업, 공공 기관들과의 프로젝트 활동과 관계를 유지한다.

○ (EU) 나노기술연구소(IoN: Institute of Nanotechnology)의 FP7 프로젝트

- 의학, 환경, 소재, 식품 등 나노기술 활용 일반 분야 10개 선정 및 분석한다.
- 나노기술분야에서 가장 많은 출판물을 간행한 지역으로 중국과 한국은 두드러진 성장세를 보인다.

나노기술연구소의 제7차 프레임워크 프로젝트(FP7, Framework Project)
<ul style="list-style-type: none">▪ 나노셀룰로오스(NanoCelluComp): 채소 가공에서 나오는 찌꺼기에서 추출한 나노섬유를 이용해 기계적 강도가 높은 복합소재 생산▪ 클립(CLIP): 다양한 인쇄기술에 적용 가능한 저비용 전도성 구리잉크 개발▪ 나노밸리드(NanoValid): 가공한 나노물질의 대상으로 위험 인지, 리스크 평가, 수명 주기를 평가하는 방법 개발▪ NMP-델라(DeLA): 중남미국이 권역 내에서 이뤄지는 나노과학, 나노기술, 소재 및 새로운 생산기술 적용▪ 나노디파인(NanoDefine): 검증 및 표준화된 방식을 바탕으로 유럽집행위원회(EC)가 권장하는 나노소재 정의의 적용을 돕기 위한 통합적 접근법 개발▪ EU 나노세이프티 클러스터(NanoSafety Cluster): 각기 다른 환경시스템, 산업, 제품에서 나타나는 나노기술 영향을 분석

* 출처: European Commission, 2014

그림 9. EU 식품 분야 나노분야 투자 연구 분야.

○ 유럽연합은 2014년부터 국가단위 중장기(7년) 연구개발 및 혁신 프로그램인 'Horizon 2020'을 진행하고 있다.

- '미래혁신 및 산업기술의 리더십'의 핵심분야 중 하나로 나노기술을 선정해 정책적으로 기술혁신(상용화)을 추진 중이다.
- 이에 따라 유럽연합 각 회원국들은 식품을 포함한 산업계 전반에 대해 나노물질의 적용 및 위해평가와 관련된 다양한 연구를 진행하고 있다.
- 유럽식품안전청(EFSA)은 2010년 '식품 및 사료의 나노기술 위해평가에 관한 EFSA 과학 네트워크'를 구축해 매년 EU 당국 및 회원국 간 식품 중 나노물질의 위해평가에 관한 과학적 견해를 교환하고, 각 국의 연구 수행 결과를 공유하고 있다.

○ (독일) 식품 분야 관련 독일 나노 기술 전략(국가환경기술정보센터, 유럽환경시장동

향, (2011))을 살펴보면 장기적인 식량 안정성 보장을 위해 나노 기술을 활용한다. 농업 및 가축 사육에 있어서 보다 엄격한 기준치, 표시 의무화 및 생산 요구 사항이 적용되기 때문에 나노기술은 이들과 관련한 최적화된 전자규제 및 제어기술에 기여한다.

- 나노물질을 이용한 식물보호 가능성이 존재하며 농업 분야의 식품 및 사료 생산, 가공 및 분석과 품질평가 분야에 나노기술이 활용될 수 있다.
- 또한 식품 위생 및 보관에 직접적으로 식료품 및 사료의 내용물로 활용될 수 있지만 세심한 평가 및 안전의 문제가 고려되어야 한다고 보고되었다.
- 식품 관련 막스 루부너 연구소(Max Rubner-Institut, MRI)에서는 식료품 분야의 나노 물질 연구, 식품 소화 및 위장 내 나노크기의 운반시스템, 나노입자의 이동, 식품에 대한 나노입자 크기의 영향 및 식료품에서 나노입자의 특성 및 이해과정 조사를 담당하고 있다.
- 보고서에서 주목할 만한 부분은 독일 연방 교육 연구부의 지원 프로그램으로 지원될 6개 아래의 세부내용이다.
 - ① 식물 보호에 있어서 나노기술을 활용으로 농약의 효율을 증가, 농약 양 감소, 성분을 개선한다.
 - ② 동물 및 식물 질병 분석: 신속 정확하면서 저렴한 분석과정을 위한 나노기술 활용한다.
 - ③ 나노 크기의 식료품 상태 및 증명을 위해 분석을 한다.
 - ④ 표면 처리 식료품 포장 및 질 향상: 식료품 보관 및 가공 표면 시 코팅 처리 가능성이 강화된 포장, 식료품 질을 향상시키기 위해 나노 기술을 활용한다.
 - ⑤ 농업용 고성능 엔진 및 변속기를 개발한다.
 - ⑥ 농업 전기제품에 재생 에너지 사용을 위한 컨셉트를 개발한다.

○ (영국) 식품기준청(FSA)은 식품 중 나노기술 사용과 관련하여 다양한 연구를 진행해 왔으며, 연구 진행 현황은 다음과 같다.

연구분류	프로젝트명
소비자 안전 및 규제 영향 관련 평가	소비자 안전 및 규제 영향과 관련하여 식품접촉 물질에 대한 나노기술 적용 평가
	소비자 안전 및 규제적 관리의 영향과 관련하여 식품 첨가물 또는 식품 재료로서 나노물질의 잠재적 사용 평가
체내 및 체외 연구	나노입자 위장 흡수에 관한 인체 내외 연구
	체내 및 체외 모델을 이용한 이산화티타늄 나노입자의 독성 동태 연구
나노입자 탐지 및 특징화 방법 연구	식품 중 나노입자 탐지 및 특징화를 위한 분석법 연구

- ‘소비자 안전 및 규제 영향 관련 평가’는 식품접촉 물질에 대한 나노기술 적용과 예상되는 기술 응용을 검토하고, 영국 내 소비자 안전과 규제 관리 측면에서 잠재적인 영향을 확인하기 위해 수행된다.
- ‘체내 및 체외 연구’에서는 체내 연구를 통해 지원자를 대상으로 나노입자 경구

흡수의 독성동태를 연구하며, 체외 연구 방식으로 각기 다른 입자크기, 화학적 특성, 표면 특성이 나노입자 흡수에 미치는 영향이 검토된다.

- ‘과학 및 기술에 관한 상원위원회’는 2009년 나노기술과 식품에 관한 조사에 착수하였고, 나노물질의 탐지 및 특징화 방법 확인과 장내 나노물질의 작용 이해를 주요 우선순위로 지목하여 관련 연구가 진행 중이다.
- (대만) 경제부 공업국에서는 나노산업 발전 증대를 위해 ‘나노마크제품 검증제도 추진요점’을 마련하여 나노마크 소개와 심의 절차 등을 제시하며, 나노기술산업발전협회에서는 나노마크 검증을 담당하고 있다.
- 대만의 나노식품 분야 연구 주무 기관은 식품약품관리서로 최근 7년간 나노식품, 나노식품 관련 기구 및 용기·포장 등 분야의 주요 연구내용은 다음과 같다.
 - 위생복지부에서는 2017.02-2017.12까지 ‘나노식품 및 기구 및 용기·포장 관리와 설명’이라는 연구에서 관련 종사자들이 상기한 제품의 안전성 평가와 신청 작업 절차에 대한 이해를 돕기 위해 ‘나노식품 신청 작업 지침’과 ‘나노물질 함유 식품용 기구 및 용기·포장 신청 작업 지침’을 작성중이다.
 - 또한 2014년-2016년까지 3년동안 ‘나노식품 및 그 기구 및 용기·포장 관리규범의 연구’를 수행한다.
- (일본) 나노물질의 안전대책에 관한 연구와 대응은 2004년 무렵부터 시작되었으며, 후생노동성, 환경성, 문부과학성, 경제산업성, 농림수산업성 등을 중심으로 추진되고 있다. 2012년 당시까지 후생노동성, 환경성이 보고서 및 가이드라인을 공개하였으나 대부분 공업용 나노물질(carbon nanotube, fullerene, 산화니켈, 산화티탄 등)을 대상으로 한다.

라) 국내 국책과제별 투자동향

- 부처별 고유 업무분야를 중심으로 기초, 응용, 개발연구 추진 중이다.
 - 농·식품 분야와 연관성이 있는 부분도 미래기술로 포함한다.
 - 주로 식품 안전, 작물보호, 바이오 소재 분야에서 나노 기술 응용 연구를 추진한다.
- (농기평) 국책과제로 투자되어온 연구 동향은 주로 농기평에서는 2007년 이후에 나노 관련한 연구과제를 공모하여 수행하였는데 주된 분야는 식품으로 주 목적은 코팅기술을 하거나 그렇지 않더라도 미세화 하여 생리활성 물질에 대한 효율을 증진시키는 연구과제가 주류를 이룬다. 기타 불용성/난용성 성분을 가용화하기 위한 나노 기술의 접목이나 포장재의 소재를 나노물질을 첨가하여 항균 포장재 개발 등에 투자. 2015년 이후부터는 이에 대한 기초연구의 산업화, 대량화에 초점을 맞추기 위해 대량 생산을 목적으로 한 과제가 공모 되어 현재 진행 중이다.
- (식약처) 정부 부처 특성상 관리 감독을 위한 나노 과제를 주로 공모 하였는데, 식품과 연관된 과제로는 나노소재의 표준화를 위한 과제가 수행되어져, 나노기술이 응용된 식품 분야의 연구 분야를 분석하여, 형태별, 제조별, 용도별로 구분지어 분석하였다. 이 가운데 11가지의 표준물질을 선정하여 표준 제조 법을 마련했다. 추후에 식품속에 포함된 제품에 대한 분석 방법 및 가이드라인으로 활용이 가능함을 시사한다.

- (식약처) 2014년도 국내에서 처음으로 나노포장재의 안전관리를 위한 용역과제가 수행되었고, 이후 2015년~2017년까지 나노물질의 종류에 따른 나노포장재의 안전관리에 대한 연구가 진행되었다.
 - 은나노, 나노클레이, 및 무기산화물(이산화티타늄, 이산화규소, 산화아연 등) 나노소재가 적용된 필름을 농도별로 제조하여 재질안정성, 기능성(항균성, 차단성 등)을 분석한다.
 - 농도별로 제조된 시편과 국내 유통되는 나노물질 적용 식품용 기구 및 용기·포장의 제품을 수거하여 모사용매(물, 초산, 에탄올, 헵탄)와 이행환경(온도, 시간 등) 조건에 따른 이행량을 분석한다.
 - 반복사용, 가혹조건에 따른 포장재의 안정성과 기능성 변화 및 이행조건에 따른 이행량 분석을 통해 나노 포장재를 다루는 관련 업체의 담당자와 소비자들을 대상으로 하는 나노포장재에 대한 안내서 및 홍보자료를 제작 중에 있다.
- (연구재단) 식품과 정확히 맞아 떨어지는 기술 분야는 아니어도 기초적인 자료를 마련하는 데 다양한 핵심기술로 다양한 형태의 국책과제가 공모되었다. 선정분야에서는 생명과학 분야의 다소 넓은 영역의 범주에서 과제가 선정되었다.
- (농진청) 농진청에서는 농업분야에 직접적으로 응용할 수 있는 기술에 대한 연구를 중심으로 과제가 공모 및 선정되었는데, 식중독균 검출 센서나 양용작물의 상품성 증진을 위한 기술 기타 기능성 상품 개발 응용에 연구되었다.

표 12. 농·식품 분야에 나노기술이 반영된 국책과제

번호	과제명	목적	수행연도	기관명	분류
1	국민 건강 증진을 위한 알러지 물질이 저감화 된 천연 색소의 발굴 및 나노화를 통한 안정성 향상 기술 개발과 대량 공정 표준화를 통한 산업화	천연색소로 발색 향상	2015부터 수행 중	농기평	식품분야
2	식품 산업 현장의 나노기술 적용확대를 위한 천연 보존소재 및 제품 개발	천연 보존제	2015부터 수행 중	농기평	식품분야
3	마이크로 캡슐화 된 난황항체(IgY)를 함유한 고부가가치 제품 개발	기능성(생리활성)	2015부터 수행 중	농기평	식품분야
4	복합 발효유 유래 미세세포체를 이용한 과민성대장증후군 개선 식품바이오 신소재 개발	기능성(생리활성)	2015부터 수행 중	농기평	식품분야
5	나노전분캡슐화에 의한 세라마이드의 수용화 및 제품화	체내생체 이용률 증진	2010-2013	농기평	식품분야
6	초고압 전이 동결기술에 의한 기공크기제어 기술 및 나노기공소재 개발	소재 사용	2011-2012	농기평	식품분야
7	콜로이드 계면 기술을 이용한 organo-sulfur compounds의 나노구조 미립자 소재화 기술 개발	코팅기술	2008-2011	농기평	식품분야
8	나노-효소기술을 이용한 기능성 수산물의 한방 소재화 및 실용화 기술개발	난용성/불용성 성분 가용화	2005-2010	농기평	식품분야
9	콜드젤 기술을 이용한 유청 단백질 나노담체 함유 기능성 유제품 가공 기술 개발	코팅기술/기능성(생리활성)	2007-2010	농기평	식품분야
10	고분자 키토산 나노분말과 수용성 유도체의 개발; 식품과 혈행장애의 응용 및 성인병 예방효과에 관한 연구	코팅기술/기능성(생리활성)	2007-2009	농기평	식품분야

11	나노기술을 이용한 양용버섯 유래 베타글루칸의 수용성 초미세화 추출기술 확립 및 면역 활성 규명과 건강기능식품 개발	코팅기술/기능성(생리활성)	2007-2008	농기평	식품분야
12	나노무기담체 technology를 이용한 기능성 소재 개발	코팅기술/기능성(생리활성)	2006-2008	농기평	식품분야
13	물리적으로 변성유도 된 나노영역 전분의 식품 소재화 기술개발	기타	2002-2005	농기평	식품분야
14	나노기술을 이용한 친환경자재 개발 및 농약감소를 위한 서방형 나노제의 개발	농약제재	2007-2010	농기평	농업분야
15	은 나노소재와 유용미생물을 활용한 시설재배치 병해 방제	항균	2006-2009	농기평	농업분야
16	ICT 스마트팜 기반 나노버블을 이용한 글루코시놀레이트 함량 증대 물냉이 생산시스템 개발	비료	2015부터 수행 중	농기평	농업
17	나노 생체막을 이용한 <i>Salmonella</i> spp. 신속 편이성 면역학적 검출법의 개발	센서	2002-2005	농기평	센서
18	아·초임계수 처리된 기능성 올리고 펩타이드 나노 제형 공정의 산업체 상용화 기술 개발	체내생체 이용률 증진	2015부터 수행 중	농기평	식품분야
19	저탄소 신가공 및 나노기술을 활용한 가공식품개발	코팅기술	2013-2015	농기평	식품분야
20	2011 미세화 기술을 이용한 난용성 물질의 식품 소재화 및 제품개발	체내생체 이용률 증진	2013-2014	농기평	식품분야
21	다양한 분자량의 단백가수분해물을 이용한 기능성 나노/캡슐 식품 개발	코팅기술/기능성(생리활성)	2010-2015	한국연구재단	식품분야
22	동물의 세포사멸을 조절하는 식용 나노입자의 개발과 응용	기타	2010-2013	한국연구재단	식품분야
23	OECD기준에 따른 나노식품 표준 분석법 개발	나노 표준화	2010-2013	한국연구재단	식품분야
24	고부가가치 식품 소재 개발을 위한 분무동결건조 기술 개발	코팅기술/기능성(생리활성)	2009-2011	한국연구재단	식품분야

25	초고압 효소처리 한 milk protein 가수분해물의 self-assembling 기법을 통한 peptide nano tube 개발	코팅기술/기능성(생리활성)	2011-2012	한국연구재단	전반
26	무기나노 영양성분 전달매개체를 이용한 생리활성물질의 캡슐화 및 in vitro와 in vivo 전달효율, 생체이용률, 독성 안전성 평가 연구	체내생체 이용률 증진/안전성	2009-2012	한국연구재단	식품분야
27	탄소나노튜브가 토양 생태계에 끼치는 환경적 영향 평가	항균	2010-2015	한국연구재단	농업분야
28	환경 media에서 금속 나노 입자의 생태독성, 식물독성 및 생물 이용성	기타	2010-2012	한국연구재단	농업분야
29	난용성 활성 성분 안정화를 위한 계면활성제 자기조립 시스템 연구	기초연구	2010-2015	한국연구재단	식품
30	바이오폴리머 상분리를 이용한 신개념 식품 입자의 기능적 디자인화	기초연구	2010-2013	한국연구재단	전반
31	나노캡슐화로 오디 안토시아닌 색도 및 생리활성의 안정성 향상연구	코팅기술/기능성(생리활성)	2009-2010	한국연구재단	식품
32	기능성 저분자 콜라겐 펩타이드 제조 및 생체이용성 증진을 위한 리포솜 제형화 기술 개발	체내생체 이용률 증진	2014-2017	한국연구재단	식품분야
33	약용작물 고부가 소재개발 및 나노기술적용 상품성 증진연구	코팅기술/기능성(생리활성)	2009-2012	농촌진흥청	식품분야
34	나노바이오 융합기술을 이용한 식중독균 신속 검출 시스템 개발	센서	2009-2011	농촌진흥청	식품분야
35	친환경 진부당귀를 이용한 나노캡슐 신기능성 제품 개발	코팅기술/기능성(생리활성)	2007-2009	농촌진흥청	식품분야
36	유용균 및 나노캡슐 이용 식물병·선충 방제 연구	방충제재	2009-2012	농촌진흥청	농업분야
37	나노 바이오 기술 융합 식물병원미생물 신속다량 진단 키트개발	센서	2009-2011	농촌진흥청	농업분야
38	은나노 실크이용 생활소재 활용기술 개발에 관한 연구	기타	2009-2011	농촌진흥청	농업분야

39	섬유질계 바이오매스를 이용한 바이오-나노 에너지 변환 시스템 개발	기타	2008-2010	농촌진흥청	농업분야
40	나노 바이오 기술 융합에 의한 유색미, 수수 천연색소 이용 인체친화형 소재 개발	천연색소로 발색 향상	2013-2015	농촌진흥청	식품
41	식품 소재 적용 나노기술의 형태별 이화학적 특성 분석법 및 표준제조공정 확립연구	표준화	2015-	식약처	식품분야
42	나노식품의 체내 흡수율 평가 연구	체내생체 이용률 증진	2014-2015	식약처	식품분야
43	식품용 나노물질의 독성평가 기술개발 연구	안전	2014	식약처	식품분야
44	나노기술적용 제품의 나노입자 분석법 확립연구	분석법	2013	식약처	식품분야
45	식품용 나노소재의 형태별 안정성 측정법 확립연구	분석법	2013	식약처	식품분야
46	식품용 나노소재와 생체 내 물질의 상호작용 연구	체내생체 이용률 증진	2013	식약처	식품분야
47	나노칼슘의 90일 반복투여독성시험 연구	안전성	2013	식약처	식품분야
48	식품용 나노소재의 분류 체계화 및 이화학적 특성연구	표준화	2012	식약처	식품분야
49	Smart 나노입자 이용 표적 조절형 나노식품	체내생체 이용률 증진	2007	식약처	식품분야
50	표적 조절형 나노식품의 위해성 평가기술 및 평가방안 연구	안전	2008	식약처	식품분야
51	나노구조 제어 및 신공정 복합기술에 의한 방충기능 다층필름 개발	항균 포장	2011-2014	식약처	포장재
52	나노물질 적용 식품용 기구 및 용기포장 등에 관한 연구	항균 포장	2014	식약처	포장재
53	나노소재 적용 식품용 기구 및 용기·포장 등 관리방안 마련연구	기타	2015-2017	식약처	기타
54	식품 소재 적용 나노기술의 형태별 이화학적 특성 분석법 및 표준제조공정 확립 연구	체내생체 이용률 증진	2015	식약처	식품분야

제 4장 나노 기술 국내 · 외 시장(산업) 동향

제 1절 국내외 시장(산업) 동향

- 한국과학기술정보연구원 정보분석연구소에서 펴낸 “나노융합 신소재의 산업시장 동향: 나노입자를 중심으로”(2013)의 보고서를 보면 2009년 전체 나노 시장규모 117억 달러에서 나노소재 90억 달러로 차지하는 비율이 약 77%로 나타났고, 2015년에는 전체 나노 시장규모 260억 달러에서 나노소재가 196억 달러로 차지하는 비율이 약 75% 나타났다. 즉 식품 분야에서 응용되는 나노소재들도 이에 발맞추어 증가될 수 있음을 시사하는 바이다.

세계 나노기술 시장 규모, 2009~2015 (단위: 달러)

구분		Nanomaterials	Nanotools	Nanodevices	합계
시장규모	2009	90.27억	26.13억	0.31억	116.71억
	2015	196.22억	68.13억	2.34억	260.00억
연평균 성장률		14.7%	3.3%	45.9%	11.1%

출처: BCC Research (2010)



그림. 10. 나노 기술 시장 규모 및 예측자료.

- 건강 치료용 나노소재 시장규모를 예측한 자료에 따르면 세계 시장규모는 매년 22%의 성장을 지속하여 2013년에 약 13억 달러에 이를 것이고, 나노 소재 시장에서 두 번째로 큰 시장이 될 것으로 추정된다. 성장 추세를 고려하면 2015년까지 건강 치료용 나노 소재 세계시장은 약 120억 달러에 이를 것으로 추정된다. 건강치료 산업에는 나노소재는 활성 성분, 약물전달시스템과 같은 제약분야에서 산업적 성공이 나타날 것으로 추정된다. 이는 식품 분야에서 추구하고 있는 건강기능성 식품 소재에서 함께 시장 규모가 커질 것으로 사료된다.

제 2절 기술, 경제, 사회적 미래 전망

1) 기술적 및 경제적 전망

- 나노 기술의 식품 분야 활용 분야는 무한한 잠재력을 지니고 있으나 안전성과 관련하여 여전히 문제점을 지니고 있다.
 - 식품 분야 전반에 걸쳐 나노소재 및 기술을 확대 적용시키기 위해서는 제약 분야나 화장품 분야와 달리 소비자를 안심시키기 위해 개발된 기술이나 제품에 대한 위험성 평가를 반드시 실시하여야 한다.
 - 제조자 측면에서 노출자 빈도에 대한 연구도 식품 분야의 관점에서 위험성 평가에 대한 연구가 필요하다.
 - 포장 및 식품 분야에서 적용 시 환경오염 물질에 영향을 줄 수 있기에 이에 대한 나노 물질의 수명 주기도 분석해야 한다.
- 식품 분야에서도 식품 분야에서는 상당히 많은 연구 논문이 발표되어지고 있고, 다양하게 응용 범위를 넓혀서 적용 및 시도 하고 있으나 여전히 실질적인 상용화 성공에는 미흡한 실정이다.
 - 기존 나노소재의 적용 범위가 체내 흡수율 증진이라는 분야에서 향미성분 코팅, 색 발현 등 다양한 분야로 응용 범위는 확대되어 지고 있으나 실제 대량생산에 응용 가능한 기술은 아직도 검증되지 않았다.
 - 특히 식품 분야의 경우 고려해야할 경제성을 분석하여 실제 산업화와 그에 따른 이윤 및 고용창출이 가능할 수 있도록 산업화를 목적으로 개발할 필요가 있다.
- 상품화 할 수 없는 식재료나 기타 부산물을 활용하여 새로운 제품이나 기능을 발견하여 확대 적용할 수 있는 잠재력을 지니고 있어 순수 기술 개발 관련하여 전망이 밝다.
 - 다만 식품 분야의 경제성과 환경오염을 고려해야 한다.
- 고도화된 다른 과학기술 분야에서 개발된 기술을 적극 활용 접목시켜 식품 분야에 적용될 수 있도록 융합연구를 활성화할 필요가 있다.

2) 사회적 전망

- 나노기술의 부정적 인식을 잘못 심어줄 경우 다른 분야에 비해 민감도가 큰 식품 분야의 발전 제약이 따르므로 긍정적인 효과와 함께 안정을 시킬 주의가 필요하다.
 - 나노 기술은 GMO 기술에 비교하여 설명하는 경우가 많이 되는데 비교적 안정적으로 인식된 GMO 기술처럼 성공하기 위해서는 기술의 발전과 더불어 안전성에 대한 보증과 인식 전환이 불가피하다.
 - 이를 확보하기 위해서는 식품 제조업자들이 알아야 할 나노식품과 관련한 가이드라인(안전성 및 기타 규제안 등)이 마련되어야 한다.
- 나노과학기술 전반에 대한 정책 제언이나 외국 규제 및 사례 보고서가 많이 있는 반면 식품 분야로 한정지은 정책관련 자료가 매우 부족하여 이에 대한 충분한 DB 구축이 필요하다.
 - 식품 분야의 나노 기술에 대한 지속적인 DB 구축과 그에 필요한 기술이 무엇인지 숙고하는 과정이 필요하다.
 - 기존의 기술이 식품 분야에 응용되었을 때 발생하는 차이점과 위험성을 명기하고

산업화 가능성에 대한 지속적인 보고서 작성이 필요하다.

- 나노기술의 고비용을 식품 분야에 적합한 경제적 기술로 전환할 필요가 있다.
 - 나노크기의 고도화는 높이에 기술적인 방법에서는 저비용으로 생산 가능한 기술 개발이 필요하다.
- 역으로 나노소재가 포함되지 않은 식품 제품들에 대한 규제 및 분석 방법을 위해 필요한 관련 기술 마련도 시급하다.

참고문헌

1. 2011 미세화 기술을 이용한 난용성 물질의 식품 소재화 및 제품개발. 농림수산식품기술기획평가원.
2. Abarca RL, Rodríguez FJ, Guarda A, Galotto MJ, Bruna JE. 2016. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chem* 196:968-975.
3. Abreu FOMS, Oliveira EF, Paula HCB, Paula RCMD. 2012. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydr Polym* 89:1277-1282.
4. Aditya NP, Macedo AS, Doktorovova S, Souto EB, Kim S, Chang PS, Ko S. 2014. Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). *LWT-Food Sci Technol* 59:115-121.
5. Alfaro L, Hayes D, Boeneke C, Xu Z, Bankston D, Bechtel PJ, Sathivel S. 2015. Physical properties of a frozen yogurt fortified with a nano-emulsion containing purple rice bran oil. *LWT-Food Sci Technol* 62:1184-1191.
6. Aliabadi HM, Elhasi S, Mahmud A, Gulamhusein R, Mahdipoor P, Lavasanifar A. 2007. Encapsulation of hydrophobic drugs in polymeric micelles through co-solvent evaporation: The effect of solvent composition on micellar properties and drug loading. *Int J Pharm* 329:158-165.
7. Almouazen E, Bourgeois S, Boussaïd A, Valot P, Malleval C, Fessi H, Nataf S, Briançon S. 2012. Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid into macrophages. *Int J Pharm* 430:207-215.
8. Altan M, Yildirim H. 2014. Comparison of Antibacterial Properties of Nano TiO₂ and ZnO Particle Filled Polymers. *Acta Phys Pol A* 125:645-647.
9. Amir HS, Yuan F, Dacid JM. 2013. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions by spontaneous emulsification: Effect of propylene glycol and ethanol on formation, stability, and properties. *Food Res Int* 54:812-820.
10. Amnuakit T. 2016. Formulation development and preparation of fish oil liposome by using high pressure homogenizer for food supplement product. *Asian J Pharm* 11:126-127. Li J, Hwang IC, Chen X, Park HJ. 2016. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. *Food Hydrocolloid* 60:138-147.
11. Anarjan N, Mirhosseini H, Baharin BS, Tan CP. 2010. Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. *Food Chem* 123:477-483.
12. Andrade DRM, Mendonça MH, Helm CV, Magalhães WL, de Muniz GIB, Kestur S G. 2015. Assessment of nano cellulose from peach palm residue as potential food additive: part II: preliminary studies. *J Fodd Sci Tech* 52:5641-5650.
13. Astete CE, Sabliov CM, Watanabe F, Biris A. 2009. Ca²⁺ Cross-linked alginic acid nanoparticles for solubilization of lipophilic natural colorants. *J Agric Food Chem*

57:7505-7512.

14. Avadi MR, Sadeghi AMM, Mohammadpour N, Abedin S, Atyabi F, Dinarvand R, Rafiee-Tehrani M. 2010. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomed-nanotechnol* 6:58-63.
15. Bajpai SK, Sharma S. 2004. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. *React Funct Polym* 59:129-140.
16. Balde A, Aider M. 2016. Impact of cryoconcentration on casein micelle size distribution, micelles inter-distance, and flow behavior of skim milk during refrigerated storage. *Innov Food Sci Emerg* 34:68-76.
17. Behera T, Swain P, Rangacharulu PV, Samanta M. 2014. Nano-Fe as feed additive improves the hematological and immunological parameters of fish, *Labeo rohita* H. *Appl Nanosci* 4:687 - 694.
18. Bejrappa P, Choi MJ, Surassmo S, Chun JY, Min SG. 2011. Formulation and antimicrobial activity on *Escherichia coli* of nanoemulsion coated with whey protein isolate. *Korean J Food Sci Ani Res* 31:543-550.
19. Belhaj N, Arab-Tehrany E, Linder M. 2010. Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochem* 45:187-195.
20. Benavides S, Cortes P, Parada J, Franco W. 2016. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chem* 204:77-83.
21. Berendsen R, Guell C, Ferrando M. 2015. Spray dried double emulsions containing procyanidin-rich extracts produced by premix membrane emulsification: Effect of interfacial composition. *Food Chem* 178:251-258.
22. Bhan S, Mohan L, Srivastava CN. 2014. Relative larvicidal potentiality of nano-encapsulated temephos and imidacloprid against *Culex quinquefasciatus*. *J Asia-Pacific Entomology* 17:787-791.
23. Bueno AM, Marín MA, Contento AM, Ríos A. 2016. Determination of mutagenic amines in water and food samples by high pressure liquid chromatography with amperometric detection using a multiwall carbon nanotubes-glassy carbon electrode. *Food Chem* 192:343-350.
24. Carneiro HC, Tonon RV, Grosso CR, Hubinger MD. 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *J Food Eng* 115:443-451.
25. Cerisuelo JP, Alonso J, Aucejo S, Gavara R, Pilar HM. 2012. Modifications induced by the addition of a nanoclay in the functional and active properties of an EVOH film containing carvacrol for food packaging. *J Membrane Sci* 423-424:23-256.
26. Chantarasataporn P, Yoksan R, Visessanguan W, Chirachanchai S. 2013.

27. Chen D, Szostak P, Wei Z, Xiao R. 2016. Reduction of orthophosphates loss in agricultural soil by nano calcium sulfate. *Science Total Environ* 539:381–387.
28. Cheow WS, Hadinoto K. 2011. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid - polymer hybrid nanoparticles. *Colloids Surf, B* 85:214–220.
29. Cheuk SY, Shih FF, Champagne ET, Daigle KW, Patindol JA, Mattison CP, Boue, SM. 2015. Nano-encapsulation of coenzyme Q 10 using octenyl succinic anhydride modified starch. *Food chem* 174:585–590.
30. Chi J, Xia S, Zhang X, Tan Chen. 2015. The stabilizing effect of antioxidants on ubiquinol-10 in nanoliposomes and the mechanism. *China Sciencepaper Online*.
31. Cho HY, Kim BS, Chun JY, Choi MJ. 2015. Effect of spray-drying process on physical properties of sodium chloride/maltodextrin complexes. *Powder Technol* 277:141–146.
32. Cho YJ, Kim JT, Park HJ. 2012. Preparation, characterization, and protein loading properties of N-acyl chitosan nanoparticles. *J Appl Polym Sci* 124:1366–1371.
33. Cho YJ, Kim JT, Park HJ. 2012. Size-controlled self-aggregated N-acyl chitosan nanoparticles as a vitamin C carrier. *Carbohydr Polym* 88:1087–1092.
34. Choi SW, Kwon HY, Kim WS, Kim JH. 2002. Thermodynamic parameters on poly(D,L-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification-diffusion process. *Colloid Surface A* 201:283–289.
35. Choi YW, Jeon KB, Song KH, Kim JN. 2015 Development of the Functional Films Coated with Nano-TiO₂ Particles for Food Packaging and Removal of Off-flavor from Soybean Sprouts. *Korean Journal Of Food Science And Technology* Vol.47, 6, pp. 733–737.
36. Coester C, Kreutera J, Briesenb HV, Langera K, 2000. Preparation of avidin-labelled gelatin nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA). *Int J Pharm* 196:147–149.
37. Coles D, Frewer LJ. 2013. Nanotechnology applied to European food production – A review of ethical and regulatory issues. *Trends Food Sci Tech* 34:32–43.
38. Dalençon F, Amjaud Y, Lafforgue C, Derouin F, Fessi H. 1997. Atovaquone and rifabutine-loaded nanocapsules: formulation studies. *Int J Pharm* 153:127–130.
39. Deng JJ, Peng JF. 2014. Research progress on preparation and application of nano – flavor. *China Food Additives* 3:188–193.
40. Dong GF, Zou Q, Wang H, Huang F, Liu XC, Chen L, Yang YO. 2014. Conjugated linoleic acid differentially modulates growth, tissue lipid deposition, and gene expression involved in the lipid metabolism of grass carp. *Aquaculture* 432:181–191.
41. Donsì F, Annunziata M, Sessa M, Ferrari G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Sci Technol* 44:1908–1914.
42. Drobne D, Jemec A, Tkalec ŽP. 2009. In vivo screening to determine hazards of

- nanoparticles: nanosized TiO₂. *Environmental Pollution* 157:1157–1164.
43. Dube A, Ng K, Nicolazzo JA, Larson I. 2010. Effective use of reducing agents and nanoparticle encapsulation in stabilizing catechins in alkaline solution. *Food Chem* 122:662–667.
 44. Edris AE, Kalembe D, Adamiec J, Piatkowski M. 2016. Microencapsulation of *Nigella sativa* oleoresin by spray drying for food and nutraceutical applications. *Food Chem* 204:326–333.
 45. Edris AE, Kalembe D, Adamiec J, Piatkowski M. 2016. Microencapsulation of *Nigella sativa* oleoresin by spray drying for food and nutraceutical applications. *Food Chem* 204:326–333.
 46. Einhorn-Stoll U, Weiss M, Kunzek H. 2002. Influence of the emulsion components and preparation method on the laboratory-scale preparation of o/w emulsions containing different types of dispersed phases and/or emulsifiers. *Mol Nutr Food Res* 46:294–301.
 47. Erfanian A, Mirhosseini H, Manap MYA, Rasti B, Bejo MH. 2014. Influence of nano-size reduction on absorption and bioavailability of calcium from fortified milk powder in rats. *Food Research International* 66:1–11.
 48. Esfanjani AF, Jafari SM, Assadpoor E, Mohammadi A. 2015. Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. *J Food Eng* 165:149–155.
 49. Fernandez A, Torres-Giner S, Lagaron JM. 2009. Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine. *Food Hydrocolloid* 23:1427–1432.
 50. Fernandez-Avila C, Trujillo AJ. 2016. Ultra-High Pressure Homogenization improves oxidative stability and interfacial properties of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Food Chem* 209:104–113.
 51. Ferreira SA, Oslakovic C, Cukalevski R, Frohm B, Dahlbäck B, Linse S, Gama FM, Cedervall T. 2012. Biocompatibility of mannan nanogel – safe interaction with plasma proteins. *Biochim Biophys Acta* 1820:1043–1051.
 52. Florentine MH, Jesper TNK, Alexandra T, Frank K, Richard FH, Sotiris EP, Michael BZ. 2011. Incorporation of Mg and Ca into nanostructured Fe₂O₃ improves Fe solubility in dilute acid and sensory characteristics in foods. *J. Food Sci* 76:N2–N10.
 53. Fortunati E, Puglia D, Luzi F, Santulli C, Kenny JM, Torre L. 2013. Binary PVA bio-nanocomposites containing cellulose nanocrystals extracted from different natural sources: Part I. *Carbohydr. Polym* 97:825–836.
 54. Frascareli EC, Silva VM, Tonon RV, Hubinger MD. 2012. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and bioproducts processing* 90:413–424.
 55. Frenzel M, Steffen-Heins A. 2015. Impact of quercetin and fish oil encapsulation

- on bilayer membrane and oxidation stability of liposomes. *Food Chem* 185:48–57.
56. Frenzel M, Steffen-Heins A. 2015. Whey protein coating increases bilayer rigidity and stability of liposomes in food-like matrices. *Food Chem* 173:1090–1099.
 57. Gaspar R, Nele M, Ferraz H. 2016. Encapsulation of α -Tocopherol and β -Carotene in Concentrated Oil-in-Water Beverage Emulsions Stabilized with Whey Protein Isolate. *J Disper Sci Technol* doi: 10.1080/01932691.2016. 1144196.
 58. Ghormade V, Deshpande MV, Paknikar KM. 2011. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advances* 29:792–803.
 59. Gomez A, Bingham D, Juan LD, Tang K. 1998. Production of protein nanoparticles by electrospray drying. *J Aerosol Sci* 29:561–574.
 60. Gong L, Li T, Chen F, Duan X, Yuan Y, Zhang D, Jiang Y. 2016. An inclusion complex of eugenol into β -cyclodextrin: Preparation, and physicochemical and antifungal characterization. *Food Chem* 196:324–330.
 61. Gouda AA, Ghannam SMA. 2016. Impregnated multiwalled carbon nanotubes as efficient sorbent for the solid phase extraction of trace amounts of heavy metal ions in food and water samples. *Food Chem* 202:409–416.
 62. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS. 1999. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Controlled Release* 57:171–185.
 63. Graveland-Bikker JF, Fritz G, Glatter O, Kruif CGD. 2006. Growth and structure of α -lactalbumin nanotubes. *J Appl Cryst* 39:180–184.
 64. Graveland-Bikker JF, Kruif CGD. 2006. Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet. *Trends Food Sci Tech* 17:196–203.
 65. Guan RF, Qian B, Ye XQ, Hao YB. 2006. Recent study of nanotechnology in Food Science. *Food Sci* 2:064.
 66. Ha JH, Han JG, Jeong HS, Oh SH, Kwon MC, Choi YB, Ko JR, Lee HY. 2008. Enhancement of immune activities of natural water-soluble sulforaphane by nano encapsulation process. *Korean J. Medicinal Crop Sci* 16:402–408.
 67. He R, Girgih AT, Rozoy E, Bazinet L, Ju XR, Aluko RE. 2016. Selective separation and concentration of antihypertensive peptides from rapeseed protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chem* 197:1008–1014.
 68. He R, Girgih AT, Rozoy E, Bazinet L, Ju XR, Aluko RE. 2016. Selective separation and concentration of antihypertensive peptides from rapeseed protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chem* 197:1008–1014.
 69. Hebshy E, Buffa M, Guamis B, Blasco-Moreno A, Trujillo AJ. 2015. Physical and oxidative stability of whey protein oil-in-water emulsions produced by conventional and ultra high-pressure homogenization: Effects of pressure and protein concentration on emulsion characteristics. *Innov Food Sci Emerg* 32: 79–90.
 70. Holt C. 1998. Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions

studied by sephacryl column chromatography. J Dairy Sci 81:2994–3003.

71. Hou S, Hong Z, Ying H, Hou S, Huang M, Du Q. 2015. Preservation of EGCG antioxidant properties by loading CS–PAA nanoparticles. China Sciencepaper Online.
72. http://apexel.co.kr/gnuboard4/bbs/board.php?bo_table=product_ko&wr_id=3&page=2
73. http://apexel.co.kr/gnuboard4/bbs/board.php?bo_table=product_ko&wr_id=5&page=2
74. http://apexel.co.kr/gnuboard4/bbs/board.php?bo_table=product_ko&wr_id=7&page=2
75. http://apexel.co.kr/gnuboard4/bbs/board.php?bo_table=product_ko&wr_id=9&page=2
76. http://biz.khan.co.kr/khan_art_view.html?artid=200910261137478&code=920100
77. <http://blog.naver.com/mushblog/220138036391>
78. <http://dl.dongascience.com/magazine/view/S201007N012>
79. <http://isis-pharma-usa.com/nanoceuticals/nano-age.html>
80. <http://item2.gmarket.co.kr/Item/DetailView/Item.aspx?goodscode=416983713>
81. <http://news.naver.com/main/read.nhn?mode=LSD&mid=sec&sid1=102&oid=038&aid=0002422863>
82. <http://storefarm.naver.com/goodbuy365/products/349855452>
83. <http://storefarm.naver.com/iamprotein/products/372516305?NaPm=ct%3Dinze737s%7Cci%3D6300eeede68dd25f9a2d94ff99542c114e16e317%7Ctr%3Ds1s1%7Csn%3D347358%7Cic%3D%7Chk%3D73493718dd542f54060645a3c1810bbfcc3f0e3d>
84. <http://vip.mk.co.kr/news/view/21/20/1368701.html>
85. http://www.4uwellbeing.kr/index.html?branduid=166476&ref=naver_open&NaPm=ct%3Diny6oer4%7Cci%3D429a6272c115ce48b6eaab35f1b886faeab29bc0%7Ctr%3Ds1s1%7Csn%3D55597%7Chk%3Da0f68768a837041c4e8e31577f722fe92f26d17f
86. <http://www.biopharmasci.com/nanogreens-vegetable-supplements-p/1ng10-btl-s.htm>
87. <http://www.biopharmasci.com/nanominerals-mineral-powder-p/33-nanominerals-s.htm>
88. <http://www.biopharmasci.com/nanopro-protein-isolate-powder-p/2np-btl-s.htm>
89. http://www.dailysecu.com/news_view.php?article_id=11322
90. http://www.dt.co.kr/contents.html?article_no=2015061002109923809019
91. <http://www.e2news.com/news/articleView.html?idxno=87728>
92. <http://www.e2news.com/news/articleView.html?idxno=87728>
93. <http://www.focus.kr/view.php?key=2016032100124701510>
94. http://www.forbes.com/2006/01/09/in_jw_0109soapboxslide.html
95. http://www.fulvic.org/nano_humic_fulvic_acid.htm
96. http://www.hanabiotech.co.kr/product/product.php?mode=item&it_id=1245840684
97. http://www.hanabiotech.co.kr/product/product.php?mode=item&it_id=1245841915
98. <http://www.insijournal.com/news/articleView.html?idxno=5640>
99. <http://www.ipharmnews.com/news/articleView.html?idxno=306>
100. <http://www.nano-bio-silver.com/index.html>

101. http://www.nanonature.co.kr/shop/goods/goods_view.php?goodsno=26&category=002003
102. <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/24hr-microactive-r-coq10/>
103. <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/anabolic-vitakic/>
104. <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/bio-sim/>
105. <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/maternal-water/>
106. <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/mesogold-r/>
107. <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/nanotea/>
108. <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/silver-22tm/>
109. <http://www.reuters.com/article/2008/07/30/us-nanofoods-idUSN3044875220080730>
110. <http://www.segye.com/content/html/2015/10/08/20151008000334.html?OutUrl=nave>
r
111. <http://www.siminilbo.co.kr/news/articleView.html?idxno=455271>
112. <http://www.sisafocus.co.kr/news/articleView.html?idxno=130761>
113. <http://www.yakup.com/news/index.html?mode=view&cat=12&nid=193945>
114. <http://www.yeongnam.com/mnews/newsview.do?mode=newsView&newskey=20120225.010080751300001>
115. <http://www.청송기능성사과.kr/>
116. <https://organa.net/shop/organa-colloidal-silver/>
117. <https://organa.net/shop/organa-gold/>
118. <https://www.purestcolloids.com/mesogold.php>
119. Hu L, Zhang X. 2013. Preparation and storage stability of lycopene nanocomplex. China Sciencepaper Online.
120. Hu Y, Du Y, Wang X, Feng T. 2009. Self-aggregation of water-soluble chitosan and solubilization of thymol as an antimicrobial agent. J Biomed Mater Res 90:874-881.
121. Huang D, Mu B, Wang A. 2012. Preparation and properties of chitosan/poly (vinyl alcohol) nanocomposite films reinforced with rod-like sepiolite. Mater Lett 86:69-72.
122. Huang G, Gao J, Hu Z, John JVS, Ponder BC, Moro D. 2004. Controlled drug release from hydrogel nanoparticle networks. J Controlled Release 94:304-311.
123. Ibarguren C, Grosso CRF, Apella MC, Audisio MC. 2012. Anti-Listeria monocytogenes activity of enterocins microencapsulated by ionic gelaion. Food Hydrocolloid 29:21-26.
124. ICT 스마트팜 기반 나노버블을 이용한 글루코시놀레이트 함량 증대 물냉이 생산시스템 개발. 농수산식품기술기획평가원.
125. Ihegwagu NE, Ato RS, Tor-Anyiin TA, Nnamonu LA, Muller X, Maaza M. 2015. Soil lixiviation and slow release pattern of starch-nano sliver particles-encapsulated dichlorvosinsecticide formulation. J. Agriculture. Veterinary Sci 8:15-24.

126. Imran M, Revol-Junelles AM, Paris C, Guedon, E, Linder, M, Desobry S. 2015. Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. *LWT-Food Sci Technol* 62:341-349.
127. Imran M, Revol-Junelles AM, René N, Jamshidian M, Akhtar MJ, Arab-Tehrany E, Jacquot M, Desobry S. 2012. Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocolloid* 29:407-419.
128. Ipsen R, Otte J. 2007. Self-assembly of partially hydrolysed α -lactalbumin. *Biotechnol Adv* 25:602-605.
129. Jafaria SM, Assadpoora E, Bhandarib B, Hec Y. 2008. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Res Int* 41:172-183.
130. Jang KI, Lee HG. 2008. Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. *J Agric Food Chem* 56:1936-1941.
131. Jennifer K, David JM. 2015. Food-grade nanoemulsion filled hydrogels formed by spontaneous emulsification and gelation: Optical properties, rheology, and stability. *Food Hydrocolloid* 45:67-75.
132. Jennings V, Thünemann AF, Gohla SH. 2000. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm* 199:167-177.
133. Jeong HS, Han JG, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi GP, Park UY, Lee HY. 2009. Antioxidant activities and skin-whitening effects of nano-encapsulated water extract from *rubus coreanus* miquel. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17:83-89.
134. Jeong HS, Kim SS, Oh SH, Jeong MH, Choi WY, Seo YC, Na CS, Kwak HG, Lee HY. 2010. Enhancement of anticancer activities of *ephedra sinica* stapf extracts by nano-encapsulation. *Korean J Medicinal Crop Sci* 18:143-150.
135. Jeong HS, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi WY, Seo YC, Choi GP, Kim JC, Lee HY. 2010. Enhancement of immune activities of peptides from *asterias amurensis* using a nano-encapsulation process. *Korean J Food Sci Technol* 42:424-430.
136. Jiang T, Feng L, Wang Y. 2013. Effect of alginate/nano-Ag coating on microbial and physicochemical characteristics of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) during cold storage. *Food chem* 141:954-960.
137. Jiménez-Colmenero F. 2013. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Res Int* 52:64-74.
138. Jin HH, Lu Q, Jiang JG. 2016. Curcumin liposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids and soybean lecithin. *J Dairy Sci* 99:1780-1790.
139. Jo YJ, Chun JY, Kwon YJ, Min SG, Hong GP, Choi MJ. 2015. Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. *LWT-Food Sci Technol* 60:444-451.
140. Joung HJ, Choi MJ, Kim JT, Park SH, Park HJ, Shin GH. 2016. Development of

- food grade curcumin nanoemulsion and its potential application to food beverage system: antioxidant property and In Vitro Digestion. *J Food Sci* N745-753.
141. Jun JY, Nguyen HH, Paik SYR, Chun HS, Kang BC, Ko SH. 2011. reparation of size-controlled bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by a modified desolvation method. *Food Chem* 127:1892-1898.
 142. Kaminski GAT, Sierakowaski MR, Pontarolo R, Santos LA, Freitas RA. 2016. Layer-by-layer polysaccharide-coated liposomes for sustained delivery of epidermal growth factor. *Carbohydr Chem* 140:129-135.
 143. Kanakubo Y, Ito F, Murakami Y. 2010. Novel one-pot facile technique for preparing nanoparticles modified with hydrophilic polymers on the surface via block polymer-assisted emulsification/evaporation process. *Colloid Surface B* 78:85-91.
 144. Kang NS, Choi YJ, Park YS, Son ES, Pyo SN, Kang SC, Eum HA, Son EH. 2008. Development of ionic calcium as food additives; market and technology trends analysis. *Biomater Res* 12:141-147.
 145. Kayaci F, Uyar T. 2012. Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chem* 133:641-649.
 146. Khalaj MJ, Ahmadi H, Lesankhosh R, Khalaj G. 2016. Study of physical and mechanical properties of polypropylene nanocomposites for food packaging application: Nano-clay modified with iron nanoparticles. *Trends Food Sci Tech* 51:41-48.
 147. Khayata N, Abdelwaheda W, Chehna MF, Charcosset C, Fessi H. 2012. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *Int J Pharm* 423:419-427.
 148. Khot LR, Sankaran S, Maja JM, Ehsani R, Schuster EW. 2012. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Prot* 35:64-70.
 149. Kim JY, Seo TR, Lim ST. 2013. Preparation of aqueous dispersion of β -carotene nano-composites through complex formation with starch dextrin. *Food Hydrocolloids* 33:256-263.
 150. Kim KI, Jo YJ, Kim SJ, Seo JH, Min SG, Cho HY, Shin JK, Choi MJ. 2015. Effect of liposome coated hemicellulase on softening of a carrot. *Food Engineering Progress* 19:369-376.
 151. Kim KI, Lee SY, Lee JS, Lee JG, Min SG, Choi MJ. 2015. Effect of liposome-coated hemicellulase on the tenderization of burdock. *Korean J Food Sci Technol* 47:698-703.
 152. Kim MG. 2014. Interaction of food nano calcium carbonates with biological matrices in vitro and in vivo. Seoul Womens Univ MS thesis.

153. Kima DG, Jeonga YI, Choia CY, Rohb SH, Kangc SK, Janga MK, Naha JW. 2006. Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 319:130-138.
154. Kishida K. 2011. Simplified extraction of tetracycline antibiotics from milk using a centrifugal ultrafiltration device. *Food Chem* 126:687-690.
155. Ko MJ, Kwon HL, Chung MS. 2014. Optimum conditions for extracting flavanones from grapefruit peels and encapsulation of extracts. *Korean J Food Sci Technol* 46:465-469.
156. Kreuter J, Hekmatara T, Dreis S, Vogel T, Gelperina S, Langer K. 2007. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *J Controlled Release* 118:54-58.
157. Krishnaswamy K, Orsat V, Thangavel K. 2012. Synthesis and characterization of nano-encapsulated catechin by molecular inclusion with beta-cyclodextrin. *J Food Eng* 111:255-264.
158. Kwon HY, Lee JY, Choi SW, Jang YS, Kim JH. 2001. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. *Colloid Surface A* 182:123-130.
159. Kwon MC, Han JG, Ha JH, Jin L, Choi GP, Park UK, Lee DH, Lee HY. 2008. Extension of storage time of chicon using nanoparticle of machilus thunbergii extracts. *Korean J Medicinal Crop Sci* 16:320-325.
160. Kwon WS, Ru SY, Lee HC, Kim SY. 2010. A study on nano-enzyme complex based portable bio-sensor for agricultural chemical residues. *Jonrnal of KSPE* 811-812.
161. Lamprecht A, Saumet JL, Roux J, Benoit JP. 2004. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int J Pharm* 278:407-414.
162. Landrya FB, Bazile DV, Spenlehauer G, Veillard M, Kreutera J. 1996. Degradation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles coated with albumin in model digestive fluids (USP XXII). *Biomaterials* 17:715-723.
163. Laouini A, Fessi H, Charcosset C. 2012. Membrane emulsification: A promising alternative for vitamin E encapsulation within nano-emulsion. *J Membrane Sci* 423:85-96.
164. Lee BY, Oh SJ, Kim SC, Oh SM, Ko TY, Yang JE. Effects of Soil Amendment Manufactured with Nano Zero Valent Iron (NZVI) on Young Radish Growth. *KJSSF* 10:274.
165. Lee J, Cho EC, Cho K. 2004. Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-block - poly(ethylene oxide) micelles. *J Controlled Release* 94:323-335.
166. Lee MY, Min SG, You SK, Choi MJ, Hong GP, Chun JY. 2013. Effect of β -cyclodextrin on physical properties of nanocapsules manufactured by emulsion -

- diffusion method. *Journal of Food Eng* 119:588–594.
167. Lee SH, Heng D, Ng WK, Chan HK, Tan RBH. 2011. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *Int J Pharm* 403:192–200.
 168. Leong WF, Lai OM, Long K, Yaakob B, Man C, Misran M, Tan CP. 2011. Preparation and characterisation of water-soluble phytosterol nanodispersions. *Food Chem* 129:77–84.
 169. Lertsutthiwonga P, Rojsitthisakb P, Nimmannitc U. 2009. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. *Mater Sci Eng, C* 29:856–860.
 170. Lesmes U, McClements DJ. 2012. Controlling lipid digestibility: Response of lipid droplets coated by β -lactoglobulin-dextran Maillard conjugates to simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloid* 26: 221–230.
 171. Li X, Chen L, Guan W, Chen G. 2002. PE/Ag納米防霉保鮮膜研制. *食品科學* 2:129–132.
 172. Li Y, Zheng J, Xiao H, McClements DJ. 2012. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization. *Food Hydrocolloid* 27:517–528.
 173. Lim JS, Gang HJ, Yoon SW, Kim HM, Suk JW, Kim DU, Lim, JK. 2010. Preparation and its stability of a coenzyme Q10 nanoemulsion by high pressure homogenization with different valve type conditions. *Korean J Food Sci Technology* 42:565–570.
 174. Lim JY, Yun GS. 2013. 나노 물질이 콩나물의 성장에 미치는 영향. *Korean Soc Environ Educ* 245–247.
 175. Lin YH, Chung CK, Chen CT, Liang HF, Chen SC, Sung HW. 2005. Preparation of nanoparticles composed of chitosan/poly- γ -glutamic acid and evaluation of their permeability through caco-2 cells. *Biomacromolecules* 6:1104 - 1112.
 176. Liu J, Hu W, Chen H, Ni Q, Xu H, Yang X. 2007. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *Int J Pharm* 328:191–195.
 177. Liu N, Park HJ. 2010. Factors effect on the loading efficiency of Vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes. *Colloids Surf, B* 76:16–19.
 178. Liu W, Liu W, Ye A, Peng SF, Wei F, Liu C Han JZ. 2016. Environmental stress stability of microencapsules based on liposomes decorated with chitosan and sodium alginate. *Food Chem* 196:396–404.
 179. Liu W, Zhang ZD, Wang Q, Li P. 2006. The inhibitory effects of nanoscale silver on familiar food pollutant bacteria. *Food Res Devel* 5:054.
 180. Livney YD. 2015. Nanostructured delivery systems in food: latest developments and potential future directions. *Curr Opin Food Sci* 3:125–135.
 181. Long M, Wang J, Zhuang H, Zhang Y, Wu H, Zhang J. 2014. Performance and mechanism of standard nano-TiO₂ (P-25) in photocatalytic disinfection of

- foodborne microorganisms - *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 39:68-74.
182. Losa C, Marchal-Heussler L, Orallo F, Jato JLV, Alonso MJ. 1993. Design of new formulations for topical ocular administration: Polymeric nanocapsules containing metipranolol. *Pharm Res* 10:80-87.
183. Ma DD, Zhu WL, Long Z, Liang XJ, Wang N, Zhang WR, Han HY. 2010. Effects of different sources of calcium on bone density in rats. *Food Nutr China* 9:019.
184. Ma Y, Liu J, Ye F, Zhao G. 2016. Solubilization of β -carotene with oat β -glucan octenylsuccinate micelles and their freeze-thaw, thermal and storage stability. *LWT-Food Sci Technol* 65:845-851.
185. Maindarkar S, Dubbelboer A, Meuldijk J, Hoogland H, Henson M 2005. Prediction of emulsion drop size distributions in colloid mills. *Chem Eng Sci* 118:114-125.
186. Manea AM, Vasile BS, Meghea A. 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of green tea extract loaded into nanostructured lipid carriers. *Comptes Rendus Chimie* 17:331-341.
187. Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT, Leong KW. 2001. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Controlled Release* 70: 399-421.
188. Marsanasco M, Márquez AL, Wagner JR, Alonso SDV, Chiaramoni NS. 2011. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Res Int* 44:3039-3046.
189. Matos M, Gutiérrez G, Iglesias O, Coca J, Pazos C. 2015. Enhancing encapsulation efficiency of food-grade double emulsions containing resveratrol or vitamin B12 by membrane emulsification. *J Food Eng* 166:212-220.
190. Meredith AN, Harper B, Harper SL. 2016. The influence of size on the toxicity of an encapsulated pesticide: a comparison of micron- and nano-sized capsules. *Environment International* 86:68-74.
191. Mesiha MS, Sidhom MB, Fasipe B. 2005. Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm* 288:289-293.
192. Miladi K, Sfar S, Frssi H, Elaissari A. 2015. Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to in vitro studies. *Ind Crop Prod* 72:24-33.
193. Minnes R, Ytzhak S, Weitman H, Ehrenberg B. 2008. The effect of solution electrolytes on the uptake of photosensitizers by liposomal membranes: a salting-out effect. *Chem Phys Lipids* 155:38-42.
194. Mohajel N, Najafabadi AR, Azadmanesh K, Vatanara A, Moazeni E, Rahimi A, Gilani K. 2012. Optimization of a spray drying process to prepare dry powder microparticles containing plasmid nanocomplex. *Int J Pharm* 423:577-585.
195. Mohammadi A, Jafari SM, Esfanjani AF, Akhavan S. 2016. Application of

- nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chem* 190:513-519.
196. Mohammadi A, Jafari S. M, Esfanjani A. F. & Akhavan S. 2016. Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chem* 190:513-519.
 197. Moisio T, Damerau A, Lampi AM, Piironen V, Forssell P, Partanen R. 2014. Interfacial protein engineering for spray-dried emulsions - Part I: Effects on protein distribution and physical properties. *Food Chem* 144:50-56.
 198. Motwani SK, Chopra S, Talegaonkar S, Kohli K, Ahmad FJ, Khar RK. 2008. Chitosan - sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation, *Eur J Pharm Biopharm* 68:513-525.
 199. Moura MRD, Aouada FA, Mattoso LHC. 2008. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. *J Colloid Interface Sci* 321:477-483.
 200. Mühlen AZ, Schwarz C, Mehnert W. 1998. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm* 45:149-155.
 201. Nacideh A, Chin PT. 2013. Developing a three component stabilizer system for producing astaxanthin nanodispersions. *Food Hydrocolloid* 30:437-447.
 202. Nakagawa K, Surassmo S, Min SG, Choi MJ. 2011. Dispersibility of freeze-dried poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by gelatin and the effect of freezing. *J Food Eng* 102:177-188.
 203. Nanik P, Sosaku I, Marcos A. N, Kuniyoshi U, Mitsutoshi N, Isao K. 2016. β -lactoglobulin as food grade surfactant for clove oil-in-water and limonene-in-water emulsion droplets produced by microchannel emulsification. *Food Hydrocolloid* 60:98-108.
 204. Nikiforidis CV, Karkani OA, Kiosseoglou V. 2011. Exploitation of maize germ for the preparation of a stable oil-body nanoemulsion using a combined aqueous extraction-ultrafiltration method. *Food Hydrocolloid* 24:1122-1127.
 205. OECD기준에 따른 나노식품 표준 분석법 개발. 한국연구재단.
 206. Ofokansia K, Wintera G, Frickerb G, Coester C. 2010. Matrix-loaded biodegradable gelatin nanoparticles as new approach to improve drug loading and delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 76:1-9.
 207. O'Reilly RK, Joralemon MJ, Wooley KL, Hawker CJ. 2005. Functionalization of Micelles and Shell Cross-linked Nanoparticles Using Click Chemistry. *Chem Mater* 17:5976-5988.
 208. Otalora MC, Carriazo JG, Iturriaga L, Osorio C, Nazareno MA. 2016. Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. *Food Chem* 202:373-382.
 209. Pan Y, Li YJ, Zhao HY, Zheng JM, Xu H, Wei G, Hao JS, Cui FD. 2002.

- Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm* 249:139-147.
210. Park HM, Chae HY, Hong JH. 2015. Physicochemical properties and protease activities of microencapsulated pineapple juice powders by spray drying process. *Korean J Food Preserv* 22:84-90.
211. Pereira de Abreu DA, Paseiro Losada P, Angulo I, Cruz JM. 2007. Development of new polyolefin films with nanoclays for application in food packaging. *Eur Polym J* 43:2229-2243.
212. Perrier-Cornet JM, Marie P, Gervais P. 2014. Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. *J Food Eng* 66:211-217.
213. Poletto FS, Fiel LA, Donida B, Re MI, Guterres SS, Pohlmann AR. 2008. Controlling the size of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by emulsification-diffusion technique using ethanol as surface agent. *Colloid Surface A* 324:105-112.
214. Prasert W, Gohtani S. 2016. Effect of sucrose on phase behavior of aqueous phase/polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester (Tween xx)/vegetable oil systems and food nano-emulsification using low-energy methods. *J Food Eng* 168:119-128.
215. Qian C, McClements DJ. 2011. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization. *Food Hydrocolloid* 25:1000-1006.
216. Rai M, Ingle A. 2012. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Appl Microbiol Biot* 94:287-293.
217. Ramalingam P, Yoo SW, Ko YT. 2016. Nanodelivery systems based on mucoadhesive polymer coated solid lipid nanoparticles to improve the oral intake of food curcumin. *Food Res Int* 84:113-119.
218. Rao J, McClements DJ. 2011. Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydrocolloid* 25:1413-1423.
219. Rattes ALR, Oliveira WP. 2007. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technol* 171:7-14.
220. Relkin P, Jung JM, Ollivon M. 2009. Factors affecting vitamin degradation in oil-in-water nano-emulsions. *J Therm Anal Calorim* 98:13-18.
221. Rikkert B, Carme G, Monrerrat F. 2015. Spray dried double emulsions containing procyanidin-rich extracts produced by premix membrane emulsification: Effect of interfacial composition. *Food Chem* 178:251-258.
222. Rosatamzad H, Paighambari SY, Shabanpour B, Ojagh SM, Mousavi SM. 2016. Improvement of fish protein film with nanoclay and transglutaminase for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life* 7:1-7.

223. Safa S, Isao K, Marcos A. N, Lobna J, Hiroko I, Sami S, Mitsutoshi N. 2014. Interfacial characteristics and microchannel emulsification of oleuropein-containing triglyceride oil - water systems. *Food Res Int* 62:467-475.
224. Sahu A, Bora U, Kasoju N, Goswami P. 2008. Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol) - palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomater* 4:1752-1761.
225. Sahu A, Kasoju N, Bora U. 2008. Fluorescence study of the curcumin-casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells. *Biomacromolecules* 9:2905-2912.
226. Sánchez-López V, Fernández-Romero JM, Gómez-Hens A. 2009. Evaluation of liposome populations using a sucrose density gradient centrifugation approach coupled to a continuous flow system. *Analytica Chimica Acta* 645:79-85.
227. Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Sampaio P, Neufeld R, Ferreira D, 2007. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm Res* 24:2198-2206.
228. SeidMahdi J, Yinghe H, Bhesh B. 2007. Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *Eur Food Res Technol* 225:733-741.
229. Semo E, Kesselman E, Danino D, Livney YD. 2011. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloid* 25: 1270-1276.
230. Seo EY, Kim MH, Kim WK, Chang MJ. 2015. Comparing the anti-inflammatory effect of nanoencapsulated lycopene and lycopene on RAW 264.7 macrophage cell line *J Nutr Health* 48:459-467.
231. Seo YC, Choi WY, Kim JS, Zou YY, Lee CG, Ahn JH, Shin IS, Lee HY. 2010. Enhancement of antimicrobial activity of nano-encapsulated horseradish aqueous extracts against food-borne pathogens. *Korean J Medicinal Crop Sci* 18:389-397.
232. Serpa A, Velásquez-Cock J, Gañán P, Castro C, Vélez L, Zuluaga R. 2016. Vegetable nanocellulose in food science: A review. *Food Hydrocolloid* 57:178-186.
233. Sharma R, Ragavan KV, Thakur MS, Raghavarao KSMS. 2015. Recent advances in nanoparticle based aptasensors for food contaminants. *Biosens Bioelectron* 74:612-627.
234. Silvaa HD, Cerqueiraa MA, Souzaa BWS, Ribeiroa C, Avidesa MC, Quintasa MAC, Coimbrad JSR, Carneiro-da-Cunhae MG, Vicentea AA. 2011. Nanoemulsions of b-carotene using a high-energy emulsification - evaporation technique. *J Food Eng* 102:130-135.
235. Singh J, Lee BK. 2016. Influence of nano-TiO₂ particles on the bioaccumulation of Cd in soybean plants (*Glycine max*): A possible mechanism for the removal of Cd from the contaminated soil. *J Environ Manage* 170:88-96.
236. Smart 나노입자 이용 표적 조절형 나노식품. 식품의약품안전처.
237. Sun C, Shu K, Wang W, Ye Z, Liu T, Gao Y, Zheng H, He G, Yin Y. 2014. Encapsulation and controlled release of hydrophilic pesticide in shell cross-linked

- nanocapsules containing aqueous core. *Int J Pharm* 463:108–114.
238. Suresh S, Karthikeyan S, Jayamoorthy K. 2015. Effect of bulk and nano-Fe₂O₃ particles on peanut plant leaves studied by Fourier transform infrared spectral studies. *J Advanced Research*.
239. Sweileh JA, Misef KY, El-Sheikh AH, Sunjuk MS. 2014. Development of a new method for determination of aluminum (Al) in Jordanian foods and drinks: Solid phase extraction and adsorption of Al³⁺-D-mannitol on carbon nanotubes. *J Food Compos Anal* 33:6–13.
240. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A. 2013. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innov Food Sci Emerg* 19:29–43.
241. Tan CP, Nakajima M. 2005. Effect of polyglycerol esters of fatty acids on physicochemical properties and stability of β -carotene nanodispersions prepared by emulsification/evaporation method. *J Sci Food Agric* 85:121–126.
242. Tang DW, Yu SH, Ho YC, Huang BQ, Tsai GJ, Hsieh HY, Sung HW. 2013. Characterization of tea catechins-loaded nanoparticles prepared from chitosan and an edible polypeptide. *Food Hydrocolloid* 30:33–41.
243. Tasaki H, Yoshida T, Maeda A, Katsuma M, Sako K. 2009. Effects of physicochemical properties of salting-out layer components on drug release. *Int J Pharm* 376:13–21.
244. Troncoso E, Aguilera JM, McClements DJ. 2012. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. *Food Hydrocolloid* 27:355–363.
245. Tsou MJ, Kao FJ, Tseng CK, Chiang WD. 2010. Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration. *Food Chem* 122:243–248.
246. Wan K, Sun L, Hu X, Yan Z, Zhang Y, Zhang X, Zhang J. 2016. Novel nanoemulsion based lipid nanosystems for favorable in vitro and in vivo characteristics of curcumin. *Int J Pharm* 504:80–88.
247. Wang H, Zhong F, Liang R, Li Y, Xu F. 2014. Preparation of clove oil nanoemulsion and its application in chilled meat preservation. *China Sciencepaper Online*.
248. Wang LY, Gu YH, Zhou QZ, Ma GH, Wan YH, Su ZG. 2006. Preparation and characterization of uniform-sized chitosan microspheres containing insulin by membrane emulsification and a two-step solidification process. *Colloids Surf, B* 50:126–135.
249. Water-based nano-sized chitin and chitosan as seafood additive through a case study of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Hydrocolloids* 32:341–348.
250. Wen P, Zhu DH, Feng K, Liu FJ, Lou WY, Li N, Zong MH, Wu H. 2016. Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon

- essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. *Food Chem* 196:996–1004.
251. Wen P, Zhu DH, Wu H, Zong MH, Jing YR, Han SY. 2016. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. *Food Control* 59:366–376.
252. Xia S, Xu S, Zhang X. 2006. Optimization in the Preparation of Coenzyme Q10 Nanoliposomes. *J Agric Food Chem* 54:6358–6366.
253. Xiao J, Yu H, Yang J. Microencapsulation of sweet range oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chem* 125:1267–1272.
254. Xie J, Xia S, Zhang X. 2013. Preparation and characterization of curcumin nanocomplex. *China Sciencepaper Online*.
255. Xue J, Tan C, Xia S, Zhang X. 2013. Preparation and formation mechanism of EGCG-casein nanocomplex. *China Sciencepaper Online*.
256. Yadav KS, Sawant KK. 2010. Modified nanoprecipitation method for preparation of cytarabine-loaded PLGA nanoparticles, *AAPS Pharm Sci Tech* 11:1456–1465.
257. Yang F, Li X, Lv Y, Xia S, Zhang X. 2013. Preparation and characterization of jasmine essence nanocapsules. *China Sciencepaper Online*.
258. Yang M, Kostov Y, Rasooly A. 2008. Carbon nanotubes based optical immunodetection of Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) in food. *Int J Food Microbiol* 127:78–93.
259. Yang Q, Liu CZ, Jiang SS, Liu X, Sun QJ. 2016. Characterization of starch nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Influence of amylose content and starch type. *Ind Crop Prod* 87:182–190.
260. Yang Z, Peng Z, Li J, Li S, Kong L, Li P, Wang Q. 2014. Development and evaluation of novel flavour microcapsules containing vanilla oil using complex coacervation approach. *Food Chem* 145:272–277.
261. Ye A. 2008. Interfacial composition and stability of emulsions made with mixtures of commercial sodium caseinate and whey protein concentrate. *Food Chem* 110:946–952.
262. Yeo MK, Park HG. 2014. 향균, 항박테리아 나노 구조체의 생태계 위해성 논란. *KSBB Journal* 21:30–38.
263. Yin B, Wei Deng W, Xu K, Huang L, Yao P. 2012. Stable nano-sized emulsions produced from soy protein and soy polysaccharide complexes. *J Colloid Interface Sci* 380:51–59.
264. Zanetti-Ramos BG, Lemos-Senna E, Cramail H, Cloutet E, Borsali R, Soldi V. 2008. The role of surfactant in the miniemulsion polymerization of biodegradable polyurethane nanoparticles. *Mater Sci Eng* 28:526–531.
265. Zhang JQ, Jiang KM, Xie XG, Yi, Lin GG 2016. Water-soluble inclusion complexes of trans-polydatin by cyclodextrin complexation: Preparation, characterization and bioactivity evaluation. *J Mol Liq* 219:592–598.

266. Zhang M, Chen H. 2012. Research progress of application of nano-silver in food storage and processing. 31:365-372.
267. Zhang N, Ping Q, Huang G, Xu W, Cheng Y, Han X. 2006. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *Int J Pharm* 327:153-159.
268. Zhang W, Falconer JR, Baguley BC, Shaw JP, Kanamala M, Xu H, Wang G, Liu J, Wu Z. 2016. Improving drug retention in liposomes by aging with the aid of glucose. *Int J Pharm* 505:194-203.
269. Zhang Y, Liu X, Wang Y, Jiang P, Quek S. 2016. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control* 59:282-289.
270. Zhao D, Zhao X, Zu Y, Li J, Zhang Y, Jiang R, Zhang Z. 2010. Reparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 5:669 - 677.
271. Zhao Z, Corredig M. 2016. Colloidal properties of casein micelles suspensions as a function of pH during concentration by osmotic stressing. *Food Hydrocolloid* 60:445-452.
272. 건국대학교 산학협력단, 차의과학대학교 산학협력단. 2016. 저염 건면의 제조방법 및 이에 따라 제조된 저염 건면. 등록번호(출원번호): 10-2016-0050275.
273. 건국대학교 산학협력단. 2014. 저염화 빵의 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2014-0195281.
274. 건국대학교. 2014. 시나몬 오일을 포함하는 나노 에멀전 및 이의 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2014-0083139.
275. 경북대학교 산학협력단, 장동재, 박현진. 2008. 식물성 스테롤을 함유하는 키토산 코팅된 나노 리포솜 및 그 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2008- 0109835.
276. 고려대학교 산학협력단. 2010. 잔류 농약 검출용 키트 및 이를 이용한 잔류농약 검출 방법. 등록번호(출원번호): 10-2010-0010566.
277. 고부가가치 식품 소재 개발을 위한 분무동결건조 기술 개발. 한국연구재단.
278. 고분자 키토산 나노분말과 수용성 유도체의 개발; 식품과 혈행장애의 응용 및 성인병 예방효과에 관한 연구. 농림수산식품기술기획평가원.
279. 국민 건강 증진을 위한 알러지 물질이 저감화 된 천연 색소의 발굴 및 나노화를 통한 안정성 향상 기술 개발과 대량 공정 표준화를 통한 산업화. 농림수산식품기술기획평가원.
280. 권동찬. 2005. 은나노가 함유된 포장용 필름의 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2005-0087823.
281. 기능성 저분자 콜라겐 펩타이드 제조 및 생체이용성 증진을 위한 리포솜 제형화 기술 개발. 한국연구재단.
282. 김철호. 2006. 독성을 제거한 법제유황과 나노입자 크기로 분쇄한 나노법제유황. 등록번호(출원번호): 10-2006-0044505.

283. 나노 바이오 기술 융합 식물병원미생물 신속다량 진단 키트개발. 농촌진흥청
284. 나노 바이오 기술 융합에 의한 유색미, 수수 천연색소 이용 인체친화형 소재 개발. 농촌진흥청.
285. 나노 생체막을 이용한 *Salmonella* spp. 신속 편이성 면역학적 검출법의 개발. 농림수산식품기술기획평가원.
286. 나노구조 제어 및 신공정 복합기술에 의한 방충기능 다층필름 개발. 식품의약품안전처.
287. 나노기술을 이용한 양용버섯 유래 베타글루칸의 수용성 초미세화 추출기술 확립 및 면역 활성 규명과 건강기능식품 개발. 농림수산식품기술기획평가원.
288. 나노기술을 이용한 친환경자재 개발 및 농약감소를 위한 서방형 나노제의 개발. 농림수산식품기술기획평가원.
289. 나노기술적용 제품의 나노입자 분석법 확립연구. 식품의약품안전처.
290. 나노무기담체 technology를 이용한 기능성 소재 개발. 농림수산식품기술기획평가원.
291. 나노물질 적용 식품용 기구 및 용기포장 등에 관한 연구. 식품의약품안전처.
292. 나노바이오 융합기술을 이용한 식중독균 신속 검출 시스템 개발. 농촌진흥청
293. 나노소재 적용 식품용 기구 및 용기·포장 등 관리방안 마련연구. 식품의약품안전처.
294. 나노식품의 체내 흡수율 평가 연구. 식품의약품안전처.
295. 나노입자성 저염 건식소금 및 그 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2013- 0098379.
296. 나노전분캡슐화에 의한 세라마이드의 수용화 및 제품화. 농림수산식품기술기획평가원.
297. 나노칼슘을 함유하는 요구르트 및 그의 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2013-0085372.
298. 나노칼슘의 90일 반복투여독성시험 연구. 식품의약품안전처.
299. 나노캡슐화로 오디 안토시아닌 색도 및 생리활성의 안정성 향상연구. 한국연구재단.
300. 나노형 김치 유산균 .등록번호(출원번호): 10-2013-0061200.
301. 나노-효소기술을 이용한 기능성 수산물의 한방 소재화 및 실용화 기술개발. 농림수산식품기술기획평가원.
302. 난용성 활성 성분 안정화를 위한 계면활성제 자기조립 시스템 연구. 한국연구재단.
303. 남궁선. 2005. 키토산 미립자 및 그 제조 방법. 등록번호(출원번호): 10-2005-0038097.
304. 다양한 분자량의 단백가수분해물을 이용한 기능성 나노/캡슐 식품 개발. 한국연구재단.
305. 다우 아그로사이언시즈 엘엘씨. 2009. 농업용 활성 성분을 포함하는 안정화된 수중 유 에멀전. 등록번호(출원번호): PCT/US2009/036519.
306. 대한민국. 2010. 복분자 추출물을 포함하는 나노 입방형 액저상 조성물 및 그 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2010-0119954.
307. 동물의 세포사멸을 조절하는 식용 나노입자의 개발과 응용. 한국연구재단.
308. 디에스엠 아이피 어셋츠 비. 브이. 2006. 아이소플라본 나노입자 및 그의 용도. 등록번호(출원번호): 10-2007-7030532.
309. 디에스엠 아이피 어셋츠 비.브이. 2014. 수용성 활성 성분을 포함하는 나노겔. 등록번호

호(출원번호): PCT/IB2013/054730.

310. 마이크로 캡슐화 된 난황항체(IgY)를 함유한 고부가가치 제품 개발. 농림수산식품기술기획평가원.
311. 무기나노 영양성분 전달매개체를 이용한 생리활성물질의 캡슐화 및 in vitro와 in vivo 전달효율, 생체이용률, 독성 안전성 평가 연구. 한국연구재단.
312. 물리적으로 변성유도 된 나노영역 전분의 식품 소재화 기술개발. 농림수산식품기술기획평가원.
313. 바이오제닉스코리아 주식회사. 2013. 나노형 김치 유산균. 등록번호(출원번호): 10-2013-0061200.
314. 바이오폴리머 상분리를 이용한 신개념 식품 입자의 기능적 디자인화. 한국연구재단.
315. 보은군. 2011. 대추 추출물이 포집된 키토산 나노입자의 제조방법 및 이를 함유한 식품 조성물. 등록번호(출원번호): 10-2011-0101312.
316. 복합 발효유 유래 미세소포체를 이용한 과민성대장증후군 개선 식품바이오 신소재 개발. 농림수산식품기술기획평가원.
317. 서원대학교 산학협력단, 강원대학교 산학협력단, 주식회사 두산에코비즈넷. 2013. 방제 활성이 증진된 비타민 B1 유도체 나노 입자 수용액 및 그 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2013-0061978.
318. 서원대학교 산학협력단, 주식회사 두산에코비즈넷, 강원대학교 산학협력단. 2013. 작물병 방제 효과를 갖는 티아민 다이-라우릴 설페이트 나노입자 및 이의 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2013-0061980.
319. 섬유질계 바이오매스를 이용한 바이오-나노 에너지 변환 시스템 개발. 농촌진흥청.
320. 세종대학교산학협력단. 2012. 나노 땅콩나물 분말을 포함하는 유제품의 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2012-0092386.
321. 순천대학교 산학협력단. 2014. 키토산 또는 나노키토산 분말을 첨가한 마리보 치즈와 그 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2014-0010751.
322. 식품 산업 현장의 나노기술 적용확대를 위한 천연 보존 소재 및 제품 개발. 농림수산식품기술기획평가원.
323. 식품 소재 적용 나노기술의 형태별 이화학적 특성 분석법 및 표준제조공정 확립연구. 식품의약품안전처.
324. 식품용 나노물질의 독성평가 기술개발 연구. 식품의약품안전처.
325. 식품용 나노소재와 생체 내 물질의 상호작용 연구. 식품의약품안전처.
326. 식품용 나노소재의 분류 체계화 및 이화학적 특성연구. 식품의약품안전처.
327. 식품용 나노소재의 형태별 안정성 측정법 확립연구. 식품의약품안전처.
328. 아·초임계수 처리된 기능성 올리고 펩타이드 나노 제형 공정의 산업체 상용화 기술 개발. 농림수산식품기술기획평가원.
329. 약용작물 고부가 소재개발 및 나노기술적용 상품성 증진연구. 농촌진흥청.
330. 여수시. 2009. 나노칼슘 콜로이드 농축액에 의한 기능성 돌산갓 김치의 제조방법 및 이를 이용한 기능성 돌산갓 캔 김치. 등록번호(출원번호): 10-2009 -0065014.
331. 연세대학교 산학협력단. 2008. 나노 이산화티타늄을 포함하는 광촉매 코팅 조성물, 이의 제조방법, 콩나물 포장용 필름 및 이의 제조 방법. 등록번호(출원번호):

- 10-2008-0136065.
332. 영남대학교 산학협력단. 2013. 순무청을 이용한 은나노입자의 친환경적인 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2013-0107464.
333. 울산대학교 산학협력단. 2011. 백금 나노입자를 포함하는 골다공증 치료 또는 예방용 조성물. 등록번호(출원번호): 10-2011-0108928.
334. 유용균 및 나노캡슐 이용 식물병·선충 방제 연구. 농촌진흥청.
335. 윤복선. 2011. 식품용 칼슘제의 중화 및 안정화 방법과 이를 이용한 조성물. 등록번호(출원번호): 10-2011-0065687.
336. 은 나노소재와 유용미생물을 활용한 시설재배치 병해 방제. 농림수산식품기술기획평가원.
337. 은나노 실크이용 생활소재 활용기술 개발에 관한 연구. 농촌진흥청.
338. 이습 리서치 디벨롭먼트 컴퍼니 오브 더 히브루 유니버시티 오브 예루살렘, 엘티디. 2007. 친지성 약물을 함유하는 나노캡슐을 포함하는 미소구체. 등록번호(출원번호): PCT/IL2007/000084.
339. 잔다리마을공동체 농업회사법인 주식회사. 2014. 생대두 미세분말을 이용한 무첨가 무조정 두유의 제조 방법 및 이에 의해 제조되는 무첨가 두유. 등록번호(출원번호): 10-2014-0078596.
340. 장내환경개선효과를 갖는 나노형 김치 유산균 조성물. 등록번호(출원번호): 10-2016-0080966.
341. 저탄소 신가공 및 나노기술을 활용한 가공식품개발. 농림수산식품기술기획평가원.
342. 전순희. 2015. 백금 나노 항균 수지 필름의 제조 방법 및 이로부터 제조된 신선도 유지 백금 나노 항균 수지 필름. 등록번호(출원번호): 10-2015-0108927.
343. (주)삼정디씨피. 2012. 장기내구성 및 항균성이 향상된 나노 복합체의 제조방법 및 이를 이용한 관체. 등록번호(출원번호): 10-2012-0054529.
344. 주식회사 농심. 2011. 나노 분말 들깨유. 등록번호(출원번호): 10-2011- 0008248.
345. 주식회사 미지나노텍. 2009. 지용성 식품의 수용성 나노입자와 그 수용성 나노입자의 제조방법 및 그 수용성 나노 입자가 첨가된 오이로가 그 오일의 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2009-0106223.
346. 주식회사 아모그린텍. 2007. 기능성이 부가된 나노섬유를 이용한 포장지. 등록번호(출원번호): 10-2007-0124812.
347. 주식회사 에스에프. 2006. 인체 내 고밀도 콜레스테롤 함량을 증가시키는 건강 기능성계란. 등록번호(출원번호): 10-2006-0062616.
348. 주식회사 이노바이오. 2005. 나노 은함유 사료 첨가제 및 그의 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2005-0006612.
349. 주식회사 한국인삼공사. 2008. 마이크론 이하 크기의 홍삼 나노입자를 함유한 기능성 음료. 등록번호(출원번호): 10-2008-0004915.
350. 차의과학대학교 산학협력단, 건국대학교 산학협력단. 2013. 나노입자성 저염 건식소금 및 그 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2013-0098379.
351. 초고압 전이 동결기술에 의한 기공크기제어 기술 및 나노기공소재 개발. 농림수산식품기술기획평가원.

352. 초고압 효소처리 한 milk protein 가수분해물의 self-assembling 기법을 통한 peptide nano tube 개발. 한국연구재단.
353. 친환경 진부당귀를 이용한 나노캡슐 신기능성 제품 개발. 농촌진흥청.
354. 콜드젤 기술을 이용한 유청 단백질 나노담체 함유 기능성 유제품 가공 기술 개발. 농림수산물기술기획평가원.
355. 콜로이드 계면 기술을 이용한 organo-sulfur compounds의 나노구조 미립자 소재화 기술 개발. 농림수산물기술기획평가원.
356. 키토산과 젤라틴을 이용한 쓴맛이 감소된 홍삼 추출물 함유 나노캡슐. 등록번호(출원번호): 10-2014-0037021.
357. 탄소나노튜브가 토양 생태계에 끼치는 환경적 영향 평가. 한국연구재단.
358. 표적 조절형 나노식품의 위해성 평가기술 및 평가방안 연구. 식품의약품안전처.
359. 한국식품연구원. 2009. 고추의 매운맛 성분을 포함하는 나노에멀전의 제조방법. 등록번호(출원번호): 10-2009-0094815.
360. 화인코주식회사. 2005. 향산화 피브로인 조성물. 등록번호(출원번호): 10-2005-0030940.
361. 환경 media에서 금속 나노 입자의 생태독성, 식물독성 및 생물 이용성. 한국연구재단.
362. 홍삼추출물, 공액리놀레산 및 감마리놀렌산의 혼합물을 함유한 나노캡슐. 등록번호(출원번호): 10-2014-0039229.
363. 효소 고정화 자성나노입자를 이용한 팜나무 부산물로부터의 당의 대량생산 방법. 등록번호(출원번호): 10-2015-0158002.
364. 훈츠만 피엔에이 유케이 리미티드. 2011. 안정한 나노 티타니아 졸 및 이의 제조 방법. 등록번호(출원번호): PCT/GB2010/051515.
365. 유럽식품안전청, 2016 식품 및 사료의 나노기술 위해평가에 관한 EFSA 과학 네트워크(<https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/1145e>).
366. 영국 식품기준청(<https://www.food.gov.uk/science/novel/nano>).
367. 농식품연구소의 나노기술 연구 지원 분야(FY 2016)(<https://cris.nifa.usda.gov/cgi-bin/starfinder>).
368. 나노방출 식품첨가물 컨소시엄(<https://nanorelease.org/>).
369. 캐나다 국립 나노기술연구소(<https://www.nint-innt.ca/>).
370. 대만 나노기술산업발전협회, 나노마크제품 검증제도 작업요점('16.11.1) (<https://www.nanomark.org.tw>).
371. 스키야마 시게루, 2012. 식품에서 나노테크놀로지의 전개, 식품과 용기, 53: 10.

[별첨 2]

나노개발기술의 현장 보급 및 확산을 위한 관련 연구 보고서

< 목 차 >

제1장. 나노개발기술의 현장 보급 및 확산을 위한 정책 현황	3
제1절. 국가별 나노기술관련 정책 추진 현황	3
제2절. 국내 정책 및 기업현황	4
제3절. 나노기술 연구개발 활동 및 산업화 성과	6
제4절. 식품분야 나노기술 적용 사례	7
제2장. 나노개발기술의 현장 보급 및 확산을 위한 홍보 현황	12
제1절. 식품산업의 미래경쟁력은 나노식품 기술에서 나온다	12
제2절. 나노에멀전 기술을 이용한 고추음료 개발	13
제3절. 더치커피 상용화 이끈 초임계 기술	13
제4절. 신선도 유지와 부패 측정을 위한 나노기술	14

제 1장 나노개발기술의 현장 보급 및 확산을 위한 정책 현황

제 1절 국가별 나노기술관련 정책 추진 현황

- 산업체, 연구소, 대학, 정부가 상호 독립적인 연구개발을 추진하던 개별 추진전략에서 벗어나 산·학·연·관 사이의 상호 협력 및 조정 기능 강화를 바탕으로 나노기술 R&D 지원과 성과 확산 및 사업화를 중심으로 국가차원의 지원전략을 체계적으로 수립하여 추진하고 있다.

표 1. 국가별 나노융합분야 공공정책

국가	나노융합분야 공공정책
미국	<ul style="list-style-type: none"> • 부처 간 협력체계를 구축하고, 지속적인 나노기술 R&D 예산 투자를 통해 제품화 강화를 적극 추진 <ul style="list-style-type: none"> - 백악관 과학기술정책실(OSTP) 및 나노기술조정사무국(NNOO)중심의 전략과 부처 간 협력 강화 - 나노기술 상용화를 촉진하기 위해 범부처 Nanotechnology Signature Initiatives(NSI) 프로그램을 추진('10)하는 등 정부투자 지속 확대 - 나노분야 환경·보건·안전(EHS)분야 연구지원 및 범부처 차원의 대응전략 마련('08.2)
일본	<ul style="list-style-type: none"> • 나노기술의 융합화를 통한 신산업 창출 및 산업경쟁력 강화를 위해 산·학·연·관 협력에 중점을 둠 <ul style="list-style-type: none"> - 효율적인 나노기술 산업화를 위해 기초·응용단계부터 산·학·연 및 부(府)·성(省) 적극 연계 - '06~'10년까지 나노분야 R&D 투자금액은 연평균 10% 증가 - 나노물질 안전 대책 관련 검토위원회 설치 및 나노 재료의 안전대책 수립 검토('09.03, 후생노동성)
유럽	<ul style="list-style-type: none"> • 연구성과의 상업화 촉진을 위해 민간·공공부분간 협력을 강화하고 전략적인 R&D투자 <ul style="list-style-type: none"> - 산·학·연 연계 강화를 통해 나노기술 연구성과의 산업계 이전을 촉진하고, 금융권과 연계함으로써 상업화 기반강화 - 나노분야 예산은 제7차 프레임워크프로그램(FP7 '07~'13)에서 제6차 프로그램(FP6,'02~ '06, 13억 유로)에 비해 2.7배 증가한 34.67억 유로를 투자할 계획 - 나노물질 안전성 확보를 위해 관련분야 R&D예산 확대

- 미국은 부처 간 협력체계를 구축하고, 지속적인 나노기술 R&D예산 투자를 통해 상용화를 적극 추진했다. 또한 미국은 나노기술의 상용화 추진을 위해 2010년 Nanotechnology Signature Initiatives(NSI) 21) 프로그램을 추진하는 등 정부투자를 지속적으로 확대해 왔다. 제 4차 NSI 계획('12.5월)에서는 나노물질의 독특한 성질 및 특성 예측 모델, 시뮬레이션 장치 및 데이터베이스 개발 촉진을 목표로 설정했으며, 백악관 과학기술정책실(OSTP) 및 국가나노기술조정사무국(NNCO)을 중심으로 부처간 협력 강화를 강조했다.
- 또한 국가나노기술전략(National Nanotechnology Initiative, NNI)을 통해 전주기적 나노기술 연구개발 추진하였다('15년 예산: 15억 달러). 국가나노기술전략(NNI)에서 환경보건안전(EHS)을 핵심요소로 설정하고 다학제간 나노 EHS관련 개발 지원 나

노과학기술의 상용화를 통해 국가경쟁력 강화를 추진하기 위해 첨단 제조업부흥계획(AMP) 및 나노기술 사업화전략(NSI) 추진하였다.

- 일본은 나노기술의 융합화를 통한 신산업 창출과 산업경쟁력 강화를 위한 산학연관 협력에 중점을 두었다. 또한 일본은 효율적인 나노기술 산업화를 위해 기초 응용단계에서부터의 산학연관 연계를 위해 노력했으며, 나노물질 안전 대책을 위해서는 관련 검토위원회를 2009년부터 설치 운영하고 있다.
- EU는 연구성과의 상업화 촉진을 위해 민간 공공부분 간 협력을 강화하고 전략적인 R&D 투자를 실시하고 있다. 산 학 연 연계강화를 통해 나노기술 연구성과의 산업계 이전을 촉진하고 있으며, 금융권과의 연계를 통한 상업화 기반강화를 위해 노력하고 있다.
- 이러한 노력은 제7차 프레임워크프로그램(FP7)을 통해 나타나고 있으며, 본 프로그램을 통해 34.67억 유로(제6차 프로그램('02~'06)대비 2.7배 증가)를 나노기술이 적용된 그린카(10억 유로), 에너지효율빌딩(10억 유로), 미래 공장(12억 유로) 등('10)에 투자할 계획이다.
- 또한 나노기술을 '미래혁신을 위한 기술' 중 하나로 선정하고 기술개발 상용화를 통해 유럽의 발전과 경쟁력 확대 모색과 동시에 차세대 제조업, 에너지 효율향상, 저탄소에너지 운송 관련 연구개발 및 상용화를 추진하였다('15년 예산: 2억 5천 2백만 유로).
- 중국은 베이징, 상하이, 광저우지역 및 연안지역에 나노기술 산업화 거점 구축 및 운영을 통해 나노기술 산업화 발전 추진하고있으며, 타이타늄을 포함한 항공·우주 분야 핵심부품을 중점 개발하고 3~5개 수준의 글로벌 기업 육성을 계획하였다(12차 전략적 신흥산업 5개년 계획).

제 2절 국내 정책 및 기업현황

- 현재 식품 사업에서 나노기술 개발 방향은 다음 표와 같이 이루어지고 있다.

표 2. 식품사업에서의 나노기술 개발 방향
(제 2기 국가나노기술지도 총괄보고서 2014. 미래부)

제품	핵심방향	기술개발 트렌드	나노기술 적용영역	나노기술에 대한 요구사항
식품유해물질 검출기	실시간 검출	휴대형	시료 전처리와 검출기 일체형	미세유체구조/ 나노구조체
		고감도	나노입자 소재	나노입자 소재/ 생체인식물질 고정화
식품이력 바코드	식품유통 정보화	복제 및 제거 불가능	나노-바이오 바코드	생체물질의 나노 캡슐화
식품 포장재	친환경 식품안전	항균 생분해성 포장재	생분해성 포장소재, 고향균 천연소재	천연항균제의 안정화
기능성 식품	고기능성	질병발생 위험 감소, 노화억제	식품소재의 생체 내 안정화 증대	식품소재의 나노 스케일 나노 캡슐화

- 세계 4위의 우수한 기술경쟁력을 바탕으로 2020년도 나노산업 강국 실현을 추진하는 정책목표를 수립하였다 (2015년도 정부업무 보고).
- 기업은 신제품·신공정 개발을 위한 기술혁신인프라(시설·장비 등) 지원, 기술 개발 투자리스크 분담 등을 희망하며 ①기술적 어려움 ②나노기술 안전 우려 ③정보 부족을 사업화 장애요인으로 제기하였다 (570개 기업조사결과, '14.12).
- 국내 나노산업은 급속히 성장하는 초기단계로서 '11년 대비 '12년 나노산업 매출 27.7% 증가(129조원), 고용 11.9% 증가하였다(13.8만명) (출처: 2013 나노융합산업조사).
- 우리나라는 “나노기술개발촉진법” 및 “나노기술종합발전계획” 등 국가단위 나노기술 혁신 프로그램과 이를 뒷받침하는 법제도를 초기에 잘 마련하였다. 하지만 이러한 시스템 하드웨어(국가단위 계획 등)는 그 역할을 제대로 수행하고 있지 못하고 있다. “나노기술개발촉진법”은 제정 이후 10여년이 넘는 기간 동안 내용의 수정·변화가 없이 환경변화에 대해 대처하지 못하고 있으며, 범부처 종합발전계획은 현재 제3기 정책까지 발전하면서 정책조정기구의 부재로 부처의 역할만 구분하였을 뿐 실효성 있는 혁신의 파이프라인의 역할을 제대로 하지 못하고 있다. 더불어 국가연구개발사업의 나노기술 관련 예산은 연도별로 점차 증가하였지만, 총 연구개발 투자 대비 나노기술분야 비중은 그림 10에 나타난 것과 같이 연도별 4% 정도를 유지하고 있다. 게다가 나노기술분야 연구개발 투자예산은 주요국 나노기술 관련 예산의 25-63% 수준(2013년 기준)에 머무르고 있다. 국가단위 나노기술 개발 프로그램은 존재하나, 프로그램을 구동할 예산은 연도별로 큰 변화 없이 지속되어 왔다. 다만 2013년 나노기술 관련 총 투자액은 급격하게 증가하였으나 이는 실제 투자가 증가한 것이 아니라, 나노기술 발전 시행계획과 국가연구개발사업 조사분석(NTIS)의 투자 예산과의 정합성을 맞추기 위해 대상 사업을 확장하여 예산이 증가한 것이다.

표 3. 국가연구개발사업(NTIS)의 나노기술(NT) 분야 연구개발비 투자비중 추이

구분	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014 (계획)	Total	
연구개발	연구비(억원)	955	1,589	1,644	1,631	1,700	1,938	2,045	1,963	2,304	2,075	2,178	2,623	4,691	4,990	32,326
	증가율(%)	-	66%	3%	-1%	4%	14%	6%	-4%	17%	-10%	5%	20%	79%	6%	14%
	비중(%)	90.8%	74.9%	69.2%	65.8%	63.5%	69.5%	72.7%	74.7%	90.6%	85.5%	86.0%	92.5%	89.4%	87.8%	80.4%
인프라	연구비(억원)	30	456	626	702	840	688	610	526	110	224	225	181	210	210	5,638
	증가율(%)	-	1420%	37%	12%	20%	-18%	-11%	-14%	-79%	104%	0%	-19%	16%	0%	16%
	비중(%)	2.9%	21.5%	26.4%	28.3%	31.4%	24.7%	21.7%	20.0%	4.3%	9.2%	8.9%	6.4%	4.0%	3.7%	14.0%
인력양성	연구비(억원)	67	76	105	147	136	162	159	139	130	128	131	30	344	484	2,238
	증가율(%)	-	13%	38%	40%	-7%	19%	-2%	-13%	-7%	-1%	2%	-77%	1047%	41%	16%
	비중(%)	6.4%	3.6%	4.4%	5.9%	5.1%	5.8%	5.7%	5.3%	5.1%	5.3%	5.2%	1.1%	6.6%	8.5%	5.6%
총투자액	연구비(억원)	1,052	2,121	2,375	2,480	2,676	2,788	2,814	2,629	2,543	2,427	2,534	2,834	5,245	5,684	40,202
	증가율(%)	-	102%	12%	4%	8%	4%	1%	-7%	-3%	-5%	4%	12%	85%	8%	14%

※ 출처 : 미래창조과학부 나노기술발전시행계획(2002~2014)

- 한국산업기술평가관리원은 2013년 나노제품 생산 또는 개발 중인 250개 기업을 중심으로 국내 나노기술 사업화 애로요인에 관한 설문조사를 진행하였다. 그 결과를 다음 표에 나타내었으며, 중소/중견 기업의 경우 R&D자금 부족을 가장 큰 이유로 대답하였으며, 대기업은 우수연구인력 부족이 가장 높은 것으로 나타났다.

표 4. 사업화 애로요인 현황(2013)

(단위: 개, %)

구분	합계	R&D자금 부족		우수연구인력 부족		기술정보 부족		시장정보 부족		협력파트너 부족		R&D인프라 부족	
		기업수	비중	기업수	비중	기업수	비중	기업수	비중	기업수	비중	기업수	비중
합계	212	91	42.9	71	33.5	19	9.0	14	6.6	8	3.8	9	4.2
중소기업	190	85	44.7	63	33.2	15	7.9	11	5.8	7	3.7	9	4.7
중견기업	14	6	42.9	4	28.6	3	21.4	1	7.1	0	0.0	0	0.0
대기업	8	0	0.0	4	50.0	1	12.5	2	25.0	1	12.5	0	0.0

※ 250개 대상업체 중 응답업체 212개사 기준(2013 나노기업의 기술혁신역량 조사분석 결과 기준, KEIT)

제 3절 나노기술 연구개발 활동 및 산업화 성과

- 2003년부터 발행하고 있는 나노연감자료를 바탕으로 나노분야의 주요 성과를 분석한 결과 '03년 51건에서 '12년 120건으로 2배 이상 증가하였다.
 - 나노소재분야 199건(31%), 나노바이오 155건(24%), 나노소자 125건(20%), 나노기반 94건(15%), 나노에너지 환경 65건(10%) 순이다.
 - 연구수행 주체별 성과는 대학(550.3건, 73.5%)과 출연연(139.8건, 18.7%) 이 전체 성과의 92.1%를 차지하고, 기업의 성과는 42.8건으로 5.7%를 차지한다.
 - 대학 성과가 대부분을 차지하고 있으며 비중 또한 지속적으로 증가하고 있다.
- 나노관련기관이나 기업체에서 산업화를 달성하였거나 추진 중인 사업의 대외발표자료와 국내 일간지, 정부 및 각 연구기관의 보도자료를 바탕으로 분석한 국내의 나노기술분야에 대한 주요 산업화 성과 분석결과는 다음과 같다.
 - 2004년 119건에서 2005년에는 77건, 2006년에는 75건 등 감소하는 추세이다.
 - 연구수행 주체별 성과는 기업 515.8건(94.6%)으로 출연연 16.2건(3.0%), 대학 4.2건(0.8%)의 순이다.
 - 대학의 상용화 성과는 2010년까지는 거의 없었으나 2011년 1.3%(0.5건), 2012년 3.9%(1.7건)로 다소 증가하였다.
- 나노 핵심 기술 상용화 진단 및 전망
 - 나노기술의 상용화는 기술의 제품화 산업화로 인해 직접적으로 발생하는 산업적 경제적 효과 외에도 다양한 파급효과를 미치는 것으로 보고되었다.
 - 상용화의 성공은 제품 개발과 공정 개선 등의 직접적인 산업 경제적 효과를 일으키는 동시에 아직 상용화 이전의 기술개발단계에 있는 타 기술의 혁신활동을 촉진시킴으로서 나노 기술간의 상호 시너지 효과를 발생시킨다.

제 4절 식품분야 나노기술 적용 사례

- 나노기술은 식품산업에서 이미 다양하게 개발 및 적용 중이다.
 - 고기능성 물질의 나노제품화를 위한 소재와 공정, 식품안전성을 측정/검사/모니

터링 할 수 있는 식품유해물질 나노검출기술, 식품 유통을 최적화할 수 있는 유통이력 및 포장재 기술개발이 확대될 것으로 전망된다.

- 사회가 점점 노령화되고 소비자의 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라, 식품산업계의 신제품 개발 방향이 나노기술을 이용한 건강기능식품으로 전환되고 지속적으로 개발·보급이 확대될 것으로 전망된다.



그림 1. 식품산업의 나노기술 전망

출처: 제2기 국가나노기술지도 총괄보고서(2014. 미래부)

표 5. 식품산업에서의 나노기술 개발방향

제품	핵심방향	기술개발 트렌드	나노기술 적용영역	나노기술에 대한 요구사항
식품유해물질 검출기	실시간 검출	휴대형	시료 전처리와 검출기 일체형	미세유체구조/ 나노구조체
		고감도	나노입자 소재	나노입자 소재/ 생체인식물질 고정화
식품이력 바코드	식품유통 정보화	복제 및 제거 불가능	나노-바이오 바코드	생체물질의 나노 캡슐화
식품 포장재	친환경 식품안전	항균 생분해성 포장재	생분해성 포장소재, 고향균 천연소재	천연항균제의 안정화
기능성 식품	고기능성	질병발생 위험 감소, 노화억제	식품소재의 생체 내 안정화 증대	식품소재의 나노 스케일, 나노 캡슐화

출처: 제2기 국가나노기술지도 총괄보고서(2014. 미래부)

1) 식품안전

- 영양분 섭취라는 식품의 고유 기능을 넘어 식품의 안전성, 질병발생위험 감소 및 노화 억제 분야에 대한 국민의 관심이 집중된다.
 - 미세유체구조 및 나노 구조체 형성과 생체인식물질의 최적 고정화 기술 및 나노 입자 응용 기술이 융합된 식품위해물질 검출기술 개발이 필요하다.
 - 대량급식을 제공하는 곳에서 현장에서 실시간으로 식품위해물질을 검출할 수 있는 바이오센서 등 휴대용 식품위해물질 검출기의 개발 요구가 증대되고 있다.
- 개발사례
 - 하버드대학의 Cui 연구팀은 나노 FET(Field-Effect Transistor)와 바이오틴(Biotin)으로 코팅된 실리콘 나노와이어(SiNW)를 이용하여 스트렙타비딘(Streptavidin)을 1 pM 농도까지 측정할 수 있는 나노바이오센서를 개발하였다.
 - * 이 센서는 형광물질 라벨을 붙일 필요가 없고, 실시간으로 화학물질이나 바이오물질을 고감도로 검출할 수 있어 식중독균의 현장 검출용 나노바이오센서 개발에도 응용 가능
 - 미시간주립대학교(Michigan State Univ.) 연구팀은 나노와이어에 고정된 항체를 사용하여 6분 안에 식중독균인 바실러스균(Bacillus cereus)(약 10~100개/ml)을 전기적 신호로 검출할 수 있는 고감도 나노바이오센서를 개발하였다.
 - * 반응시간이 짧고 민감하며 소형이어서 실제 현장에서 사용이 매우 용이하고 바이오테러에 이용될 수 있는 탄저균을 신속 감지하는데도 이용 가능
 - 한국식품연구원과 미국 미주리대학(Univ. of Missouri-Columbia) 연구팀은 살모넬라균(약 1000마리/ml)을 간편하고 초고속(5분 이내)으로 실시간 검출할 수 있는 고감도 광학 바이오센서를 개발하였다.
 - * 항체를 광섬유에 고정시키고 살모넬라균이 있는 용기에 침지시켜 균이 항체와 결합하면 2개의 형광나노입자가 10 nm 내로 가까워져 둘 사이에 에너지 전달이 일어나 발생하는 빛의 세기 변화를 측정하여 살모넬라균을 검출
 - 농촌진흥청에서는 임피던스 바이오센서를 이용하여 약 3분에 10,000 마리/ml의 살모넬라균을 검출하는 기술을 개발하였다(2006).
 - * 금 전극(Gold Electrode) 표면 위에 뉴트라비딘(Neutravidin), 항체, 살모넬라를 연속 반응시킨 후 나노입자가 결합된 항체를 결합시키는 샌드위치 방법에 의해 신호를 증폭

2) 식품유통 정보화

- 식품유통 정보화에 기여할 수 있는 복제, 제거가 불가능한 나노-바이오 바코드 개발이 필요하다.
 - 먹거리 신뢰 향상을 위해 원산지 판별 시 복제 및 제거가 불가능한 나노바코드를 제작하여 활용함으로써 식품유통의 정보화를 실현한다.
- 개발 사례
 - 스위스 취리히공과대학(ETH Zurich) Robert Grass 교수 연구팀은 나노기술과 DNA기술을 이용하여 올리브 오일의 생산정보 확인 및 위조방지 가능한 라벨을 개발하였다(2014).
 - * 수 그램의 미량으로도 이탈리아에서 생산되는 전체 올리브 오일의 생산정보와 위조여부를 확인 가능
 - * DNA를 실리카로 코팅 처리하여 화학물질과 외부환경으로부터 DNA를 보호할 수 있게 하였고, 오일에서 쉽고 빠르게 골라내기 위해 산화철 나노입자를 부착하는 방식으로 자석화된 태그 개발

3) 친환경 식품포장(표 6)

- 식품 보존기간 연장 및 친환경 식품안전성 증대를 위해 고향균 천연 소재의 나노 캡슐화와 생분해성 포장 재료를 응용한 새로운 개념의 친환경 식품 포장재 개발이 필요하다.
 - 천연 항균제가 포함된 생분해성 친환경 포장기술 개발을 통해 식품의 안전성 및 유통기간을 증가시키고 환경오염 감소 등의 효과가 있다.
 - 식품소재의 나노화 및 나노 캡슐화를 통해 영양소나 생리활성물질의 생체 내 활성을 높이거나 장시간 유지가 가능하다.
- 더 신선하고 오래 보존할 수 있는 식품 포장재 개발이 활발하다.
 - 식품 포장재의 나노센서로 박테리아에 의한 부패나 영양소 손실을 감지한다.
 - * 나노산화아연과 은 나노입자가 포함된 항균성 필름은 식품으로부터 자외선 차단
 - * 아이스크림 제조에 나노코팅을 이용하면 포장용지에 아이스크림이 덜 묻으면서 잘 찢어지지 않아 모양도 잘 유지

표 6. 식품포장에 이용하는 나노 물질

상품명	제조사	함유 나노물질	품질 설명
듀레탄 Durethan® KU 2-2601	Bayer (독일)	폴리머 기반의 나노 복합체로 만든 실리카	<ul style="list-style-type: none"> • 플라스틱 내의 실리카 나노입자들은 포장재로 산소와 가스의 침투를 차단하여 제품의 유통기한을 연장
하이트 맥주 Hite Brewery beer (3중층의 1.6L 맥주병)	Honeywell (미국)	나일론기반의 나노합성물질 (허니웰의 Aegis® OXCE)	<ul style="list-style-type: none"> • 산소 & 이산화탄소 차단 • 투명성 • 재활용성 • 예비형성(preform)의 용이성 • 가공성 • 맛/냄새/향기 차단 • 구조적인 무결성 • 얇은 층 갈라짐 저항성 • Aegis® barrier 나일론수지는 전 세계적으로 다수의 적용사례 있음
밀러 맥주 Miller Beers • Lite • Genuine Draft • Ice House	Nanocor (미국)	임퍼름(Imperm) 나일론/나노합성물 장애(barrier) 기술	<ul style="list-style-type: none"> • 임퍼름(Imperm)은 점토 나노입자로 이루어진 플라스틱 • 점토 나노입자는 병 깨지는 것을 예방하여 병의 수명을 6개월까지 연장
나노플라스틱랩 Nano Plastic Wrap	Songsing Nanotechnology (대만)	나노아연 광촉매	<ul style="list-style-type: none"> • 항균성, UV 차단, 온도 내성, 불연성
캐드버리 슈웨프스: Cadbury Schweppes: • Cadbury® Dairy • Milt™ Milk Tray™ • Cadbury® Eden chocolate boxes 등	Plantic Technologies (호주)	나노합성바이오 폴리머 (Thermoformed Plantic ® R1 trays)	<ul style="list-style-type: none"> • 사용 후 생분해가 가능 • 퇴비화 가능 (유럽규격 EN13432 충족) • 재생가능·지속가능한 자원이용 (비유전자변형-옥수수 전분) • 물에 녹고, 지하수/수로 오염 방지 • 2002년부터 사용

출처 : Jason C. White., 2013. Nanotechnology Use in Agriculture: Benefits and potential risks, APHL Annual Meeting.

4) 고기능성 식품

- 나노물질은 크기가 작아서 다른 물질과 잘 반응할 뿐만 아니라, 체내의 세포막을 뚫고 들어갈 수 있고 혈관 속으로도 침투 가능하여 위험요소가 높으므로 생체에 안전하게 흡수 전달될 수 있는 기능성 나노식품을 개발하는 것이 최고의 과제이다.
 - * 나노식품(Nanofood)은 나노단위의 식품 구성물이 첨가되거나 나노분자가 첨가되어 만들어진 물질들과 함께 나노기술로 포장된 식품
- 나노기술은 식품의 영양성분을 높이고, 식품의 유통기한을 연장한다.
 - 나노물질을 이용하면 음료, 아이스크림, 초콜릿, 과자 등의 지방, 탄수화물, 칼로리의 양을 줄이고 단백질, 식이섬유, 비타민 등의 영양분 함량을 높일 수 있다.
 - 향균제, 조미료, 영양학적 보조제 등을 나노기술을 통해 식품에 첨가하여 균에 의한 부패와 영양분 손실을 줄일 수 있다.
- 질병 및 노화 억제 효과가 있는 나노기술 적용 식품 개발과 이들의 효능 측정 및 표준화된 안전성 평가 시스템 개발이 요구된다.
- 식품에 함유된 성분의 체내 흡수율을 최상으로 높이거나 지방성분을 획기적으로 줄일 수 있는 나노캡슐화에 대한 연구·개발이 진행 중이다.
 - * 나노캡슐: 수십nm 크기의 지방캡슐 안에 기능성물질을 넣어, 체내 원하는 부위에서 물질이 서서히 방출되도록하여 흡수율 및 생체이용률 향상
 - * 마요네즈에서 지방을 줄이면 부드러움이 덜해지면서 맛이 떨어지는데, 나노크기의 지방
- 캡슐 안에 물질을 넣으면 칼로리가 반으로 줄어들고 씹는 질감은 일반 마요네즈와 전혀다르지 않게 된다.
- 환경단체인 ‘지구의 벗’에 따르면, 나노입자가 들어간 식품이나 관련 제품 100가지 이상이 이미 시장에서 유통 중이다.
 - * 나노입자를 이용해 칼로리를 낮춘 다이어트 코코넛 분말인 ‘슬림 셰이크(Slim Shake)’, 소금양을 줄이면서 짠맛을 유지하는 감자칩, 어유(魚油)를 나노캡슐화한‘오메가3’, 철분, 비타민C, 이소플라본, 키토올리고당 캡슐 등
- 개발 사례
 - 나노기술을 이용, 저지방 원료를 사용하면서도 고지방의 맛을 내거나, 과일이나 비타민D 함량을 늘려 부드러우면서도 포만감을 느끼게 해주는 아이스크림 제조법을 개발 중이다 (영국 식품연구소(IFR: the UK’s Institute of Food Research)의 빅터 모리스 박사).
 - * 아이스크림 유화제를 나노구조로 바꾸어 유화제의 막이 소장 끝부분인 회장에 이를 때까지 파괴되지 않도록 하여 지방 섭취를 막을 수 있음
 - * 나노기술을 통해 아이스크림의 원료 분자를 아주 작게 쪼개면 유화제의 사용을 90%까지 줄일 수 있음
 - * 초콜릿 향을 내는 감미료를 아주 작은 나노크기로 쪼개어 배합하면 더 강한 초콜릿 향을 가진 아이스크림을 만들 수 있음

출처 : 김형자. 2014. 식품산업 바꾸는 나노푸드의 세계. 나노인사이드(NANO INSIDE)

제 2장 나노개발기술의 현장 보급 및 확산을 위한 홍보 현황

제 1절 식품산업의 미래경쟁력은 나노식품 기술에서 나온다

- 미래탐험연구소 이준정 대표는 2015년 12월 ‘식품산업의 미래경쟁력은 나노식품기술에서 나온다’라는 주제의 사설을 통해 식품산업에서도 나노기술은 엄청난 미래시장을 열어줄 핵심기술로 인식된다고 하였다. 특히 식품의 색조나 향을 조절하는 기술, 전혀 새로운 식감의 발현, 영양성분으로서의 인체에 흡수되는 방법의 변화, 그리고 식품의 변질을 막을 수 있도록 항박테리아성 나노 구조를 만들어 주는 등 다양한 응용 가능성을 열어주었다고 하였다(그림 1).

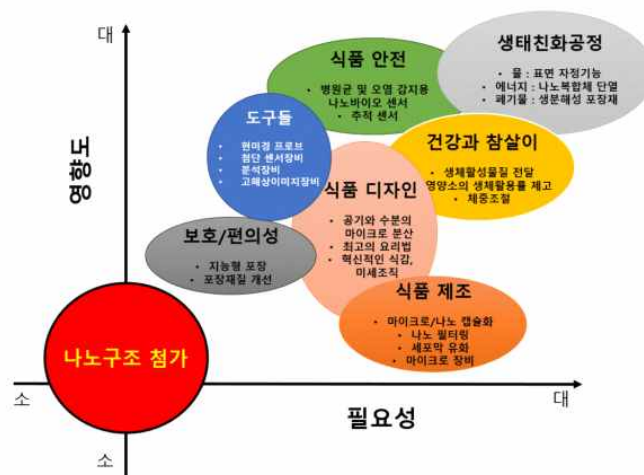


그림 2. “Nanotechnology in Food Physics”
[Leslie Pray and Ann Yaktine, National Academy Press].

- 식품업계는 지용성 영양소, 비타민, 기능성 식품을 전달하고 보호하기 위한 수단으로 나노 크기의 캡슐을 개발하는 데 최근 관심이 급격히 높아지고 있다. 식품산업에서 나노전달시스템을 활용하는 기술이 필요한 이유는 기능식품의 유용한 성분을 장내의 소화기까지 무사히 전달하여 인체에 흡수가 잘 될 수 있도록 하기 위함이며, 생체활성 성분을 첨가해서 인체에 이용되는 효율을 높이기 위해선 소화기에서 흡수될 때까지 변질되지 않아야 한다.
- 나노 크기의 전달물질을 이용하면 식품 속에서나 섭취 후 위장관내를 통과하는 과정에서도 화학적으로 변질되지 않고, 나중에 소장이나 대장에서 지용성 기능성분을 인체에 흡수시킬 수 있기 때문이다.
- 생체활성 성분들이 음식이나 약품으로 섭취한 이후에 위 속에서 분해되지 않고, 소화 장기에 도달한 이후에는 분해되어 인체에 잘 흡수되도록 설계하는 방법으로 나노전달물질을 사용한다. 바이오폴리머 나노입자들이나 식이섬유로 된 마이크로 겔을 캡슐로 코팅을 해주면 원하는 생체물질들이 분해되지 않도록 감싸주므로 대장까지 무사히 전달되어 인체에 흡수된다고 한다.

제 2절 나노에멀전 기술을 이용한 고추음료 개발

- 캡사이신의 매운 성분이 다이어트에 도움이 된다는 사실로 인해 많은 소비자들이 매운 음식 다이어트에 관심이 있었으나 과도한 캡사이신의 섭취 후 위장과 구장에 쓰라림을 느끼게 된다. 한국식품연구원에서 나노에멀전과 나노입자 제조방법 기술을 기반으로 하여 매운맛은 덜하면서 비만과 당뇨 억제 등의 효능은 극대화한 건강기능식품 ‘고추음료’를 개발하였고, 개발된 기술에 대한 홍보영상을 유튜브를 이용하여 홍보하고 있다(그림 2).



그림 3. 나노에멀전 기술을 적용한 고추음료 개발.

제 3절 더치커피 상용화 이끈 초임계 기술

- 콜드브루란 찬물로 우려내는 커피로 일명 더치커피라고도 부른다. 더치커피는 다른 커피에 비해 쓴맛이 없고, 향이 오래간다는 장점이 있지만 1리터를 만드는데 무려 12시간이나 걸려 대량생산하기 어렵다. 하지만, 나노미터 단위의 좁은 틈까지 비집고 들어가 물질의 성분을 추출하는 ‘초임계기술’을 적용하며, 기존 더치커피보다 1000배 이상 빠른 속도로 커피를 만들 수 있다고 한다.
- 초임계 기술은 액체와 기체의 중간 상태를 이용하는 기술로 물이나 이산화탄소를 넣고 높은 압력을 주면서 온도를 조절하다 보면 두 가지 상태를 모두 갖는 초임계 상태가 나타난다. 이때 물과 이산화탄소는 기체처럼 빠르게 확산되고, 액체처럼 다른 물질을 용해시키는 성질을 동시에 갖게 된다. 이런 특징 덕분에 물질에 나 있는 나노미터 단위의 작은 틈까지 파고 들어가 성분을 녹여내는 능력이 탁월하다.
- 이윤우 서울대 화학생물공학부 교수는 커피 원두를 100만 분의 1m(마이크로미터) 단위로 갈아낸 뒤 미지근한 물을 초임계상태로 만들어 빠르게 반응시킴으로 2시간 만에 약 4만 리터(약 40만 잔)의 커피를 만들 수 있는 원액을 생산할 수 있는 기술을 개발하였고, 한국야쿠르트에서 이 기술을 이용해 처음 콜드브루 제품을 생산하였고, 현재 다른 업체에서도 이 교수팀의 기술을 활용하고 있다. 이러한 홍보자료는 카드뉴스 형태로 제작되었다(그림 3).



맛있는 나노기술

작년부터 편의점에서 새로운 종류의 커피가 눈에 띄더니, 어느새 히트상품으로 자리 잡았다. 콜드브루 커피다. 콜드브루는 뜨거운 물로 추출하는 드립 커피와 달리 찬물로 우려내는 커피를 말한다. 일명 '더치 커피'라고도 부른다.



더치 커피는 다른 커피에 비해 쓴맛이 없고 향이 오래 간다는 장점이 있지만 1리터(약 10잔)를 만드는 데 무려 12시간이나 걸려서 대량생산하기 어렵다. 이 커피를 어떻게 편의점에서 판매할 수 있게 됐을까? 비밀은 나노기술에 있다.

커피의 유전자를 변형했다거나, 새로운 첨가물을 집어넣은 것은 아니다. 10억 분의 1m에 불과한 나노미터 단위의 좁은 틈까지 비집고 들어가 물질의 성분을 추출하는 '조임계 기술'을 적용했다. 이 기술을 활용하면 기존 더치 커피보다 1000배 이상 빠른 속도로 커피를 만들 수 있다.

그림 4. 나노기술을 이용한 더치커피의 대량생산 기술.

제 4절 신선도 유지와 부패 측정을 위한 나노기술

- 식품의 신선도를 측정하고 유지하기 위해서도 나노기술이 사용되고 있다. 선물용 육류 포장에 쓰이는 쿨러 백은 단순히 온도를 차갑게 유지해 주기만 하는 게 아니라, 살균 효과가 있는 은과 참숯 성분을 내뿜어 육류의 신선도를 유지하는 데 도움을 준다. 이런 성분이 밖으로 빠져 나오게 하기 위해 쿨러 백에는 나노미터 단위의 보이지 않는 미세한 구멍들이 수없이 뚫려 있다.
- 아직 상용화되지는 않았지만, 외국에서는 식품 포장지에 다양한 센서를 부착해 포장된 식품의 상태를 모니터링 하는 기술도 개발되었다. 인도 아미티 고등연구소 연구팀은 이산화티타늄(TiO₂) 분자를 기반으로 만든 나노센서를 포장지에 넣음으로 진공포장 내부로 공기가 새어 들어오면 센서의 색이 변하도록 만든 것이다.
- 나노 물질을 이용해 냄새만으로 과일 of 상태를 측정해 주는 센서도 나왔는데, 미국의 씨투센스(C2Sense)라는 기업은 2015년 나노물질과 과일의 냄새 분자가 일으키는 반응으로 과일이 신선한지 부패하고 있는지를 알아내는 후각센서를 개발했다. 이 후각센서에는 탄소나노튜브라는 나노물질이 들어 있는데, 이 물질이 과일에서 나오는 에틸렌 가스를 흡수했을 때 나타나는 전류의 변화를 측정해 과일의 상태를 파악하게 된다. 에틸렌은 과일의 숙성을 유도, 촉진하는 식물호르몬의 일종이기 때문에, 이 가스가 얼마나 나오는지 알면 과일의 상태를 추정할 수 있는데, 후각센서로 암모니아와 생체 아민도 측정할 수 있어서 과일뿐 아니라 육류와 생선, 가공육의 부패 정도도 확인할 수 있게 되었다.



식품의 신선도를 측정하고 유지하는 데에도 나노기술이 쓰인다. 선물용 육류 포장에 쓰이는 '쿨러 백'이 대표적인 예다. 쿨러 백은 살균 효과가 있는 은과 잠숫 성분을 내뿜어 육류의 신선도를 유지하는 데 도움을 준다. 이런 성분이 밖으로 빠져나오게 하기 위해 쿨러 백에는 나노미터 단위의 보이지 않는 미세한 구멍들이 수없이 뚫려있다.



아직 상용화되지는 않았지만 외국에서는 식품 포장지에 다양한 센서를 부착해 포장된 식품의 상태를 모니터링하는 기술도 개발됐다. 인도 아미티고등연구소 연구팀은 이산화티타늄(TiO₂) 분자를 기반으로 만든 나노센서를 포장지에 심었다. 진공포장 내부로 공기가 새어 들어오면 센서의 색이 변하도록 만든 것이다.



나노 물질을 이용해 냄새만으로 과일 상태를 측정해 주는 센서도 나왔다. 미국의 씨투센스(C2Sense)라는 기업은 2015년 나노물질과 과일의 냄새 분자가 일으키는 반응으로 과일이 신선한지 부패하고 있는지를 알아내는 후각센서를 개발했다.



이 후각센서에는 탄소나노튜브라는 나노물질이 들어 있는데, 이 물질이 과일에서 나오는 에틸렌 가스를 흡수했을 때 나타나는 전류의 변화를 측정해 과일의 상태를 파악한다. 에틸렌은 과일의 숙성을 유도, 촉진하는 식물호르몬의 일종이기 때문에 이 가스가 얼마나 나오는지 알면 과일의 상태를 추정할 수 있다.

그림 5. 식품의 신선도 측정, 후각센서 등에 사용되는 나노기술.

[별첨 3]

대량생산 체제에서 최적 공정 확립 보고서

< 목 차 >

제1장. 리포솜 scale up 연구	3
제1절. 제조용량에 따른 blank 리포솜의 최적 제조 공정	3
제2절. 제조조건에 따른 pilot scale 콜라겐 펩타이드 리포솜의 최적 제조 공정	8
제3절. 제조용량에 따른 콜라겐 펩타이드 리포솜의 최적 제조 공정	12
제2장. Blank 에멀전 scale up 연구	16
제1절. Pilot-scale에서의 강황추출물 나노에멀전 제조를 위한 반응기 제작	16
제2절. 제조한 반응기를 사용한 pilot scale에서의 강황추출물 나노에멀전 제조	17
제3절. 제조용량에 따른 강황추출물 나노에멀전 최적 조건 비교.....	20

제 1장 리포솜 scale up 연구

제 1절 제조용량에 따른 blank 리포솜의 최적 제조 공정

- 제조 용량에 따른 blank 및 펩타이드 리포솜의 제조 용량에 따른 최적 제조 조건을 다음 표 1에 기재하였다.

표 1. Blank 리포솜 및 펩타이드 리포솜의 제조 및 저장 조건.

	Treatment	Condition	Treatment time
Primary homogenization condition	High speed homogenizer	4,000 rpm, 8,000 rpm, 12,000 rpm	3 min
Secondary homogenization condition	Ultra sonification	40 W, 60 W, 80 W	3 min
Peptide concentration	Concentration	3%, 6%, 12%, 24%	
Storage condition	Refrigeration	4°C	4 weeks

- Blank 및 펩타이드 리포솜의 균질 조건, 펩타이드 농도, 제조용량에 따른 입자크기, pdI, 제타전위의 이원 배치 분산 분석결과를 다음 표 2에 나타내었다.
- 1, 2차 균질에서는 제조 용량이 입자크기와 제타 전위에 유의적으로 가장 큰 영향을 미쳤으며($p < 0.001$), pdI는 2차 균질 조건에서 제조용량을 제외하고는 어떤 요인도 유의적으로 영향을 미치지 않았다($p > 0.05$). 펩타이드 농도에 따라서 리포솜을 제조하였을 때는 입자크기 및 제타 전위에 펩타이드 농도가 가장 크게 유의적으로 영향을 주었으며($p < 0.001$), pdI에는 유의적으로 영향을 미친 요인이 존재하지 않았다($p > 0.05$).

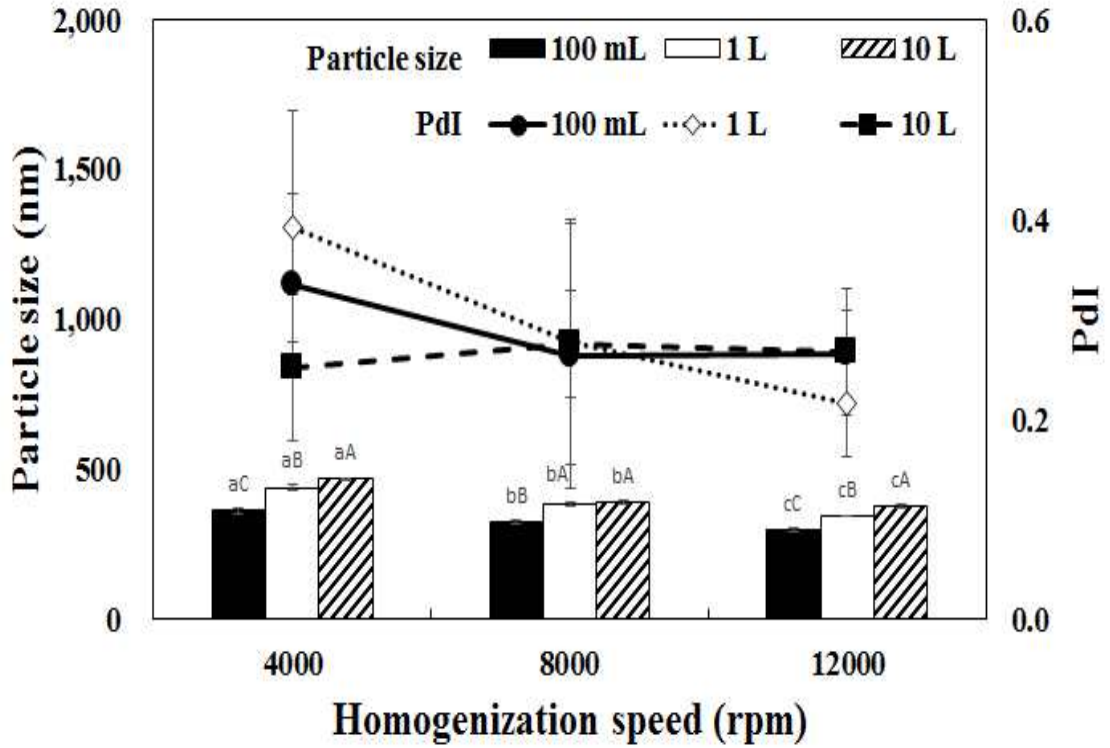
표 2. Blank 및 펩타이드 리포솜의 균질 조건, 펩타이드 농도, 제조용량에 따른 입자크기, pDI, 제타전위의 F-value.

		Particle size	PdI	Zeta potential
Primary homogenization condition	Homogenizer speed	359.83***	1.77	4.18*
	Manufacture scale	392.93***	0.29	33.73***
	Homogenizer speed +Manufacture scale	11.28***	0.99	2.96*
Secondary homogenization condition	Ultrasonification power	10.93***	2.29	18.18***
	Manufacture scale	3255.50***	35.62***	57.02***
	Ultrasonification power +Manufacture scale	5.44**	0.81	12.53***
Peptide concentration	Peptide concentration	673.82***	0.62	53.71***
	Manufacture scale	555.56***	0.72	1.97
	Peptide concentration +Manufacture Scale	148.47***	0.69	0.56

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

- 1차 균질 조건 및 제조용량에 따라 입자 크기 및 제타 전위를 측정된 결과를 그림 1에 나타내었다. 전반적인 입자크기는 300 nm에서 450 nm 사이에서 리포솜이 형성되었으며, 균질 속도가 증가할수록 입자크기가 유의적으로 감소하였으며, 제조용량이 증가할수록 입자크기가 증가하는 결과가 나타났다. PdI값은 균질 속도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 제타전위 측정결과 100 mL 단위로 제조하였을 때 균질속도가 증가함에 따라서 유의적으로 제타전위의 절대 값이 증가하였으나 8,000 rpm, 12,000 rpm에서는 균질속도에 따른 유의적 차이는 보이지 않았다(그림 1).
- 2차 균질 조건 및 제조용량에 따라 입자 크기 및 제타 전위를 측정된 결과를 그림 2에 나타내었다. 2차 균질 이후 전체적인 입자크기는 감소하였으며 초음파 균질 전력이 증가함에 따라 입자크기는 감소하였으며, 또한 제조용량이 증가함에 따라서 입자크기 또한 증가하여 1차 균질 조건 결과와 같은 경향이 보였다. 이는 초음파 균질기의 probe가 용액의 중앙에서 초음파를 처리하는 형태로 진행되기 때문에 용량이 커질수록 초음파가 영향이 적어진 것으로 생각된다. 또한 제조용량이 10 L일 때, 다른 제조 용량에 비해서 pDI값이 높은 것으로 나타났다. 제타 전위 측정 결과, 제조용량이 증가함에 따라서 증가하는 경향을 나타냈으며, 균질 전력에 따른 입자크기는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 40 W에 비해서 60 W와 80 W 조건에서 제타 전위가 안정된 결과를 보였다. 산업적 공정비용을 고려할 때, 60 W를 최적 조건으로 선정하였다(그림 2).

A



B

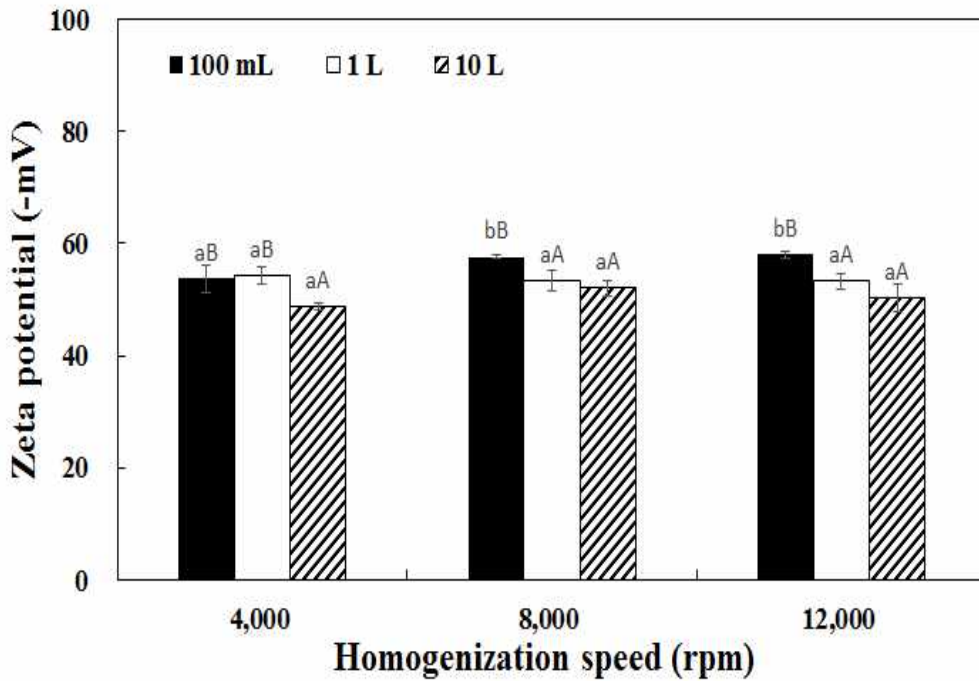


그림 1. 리포솜의 제조용량과 균질 속도에 따른 (A)입자크기와 (B)제타전위

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between homogenizer condition at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between manufacture scale at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

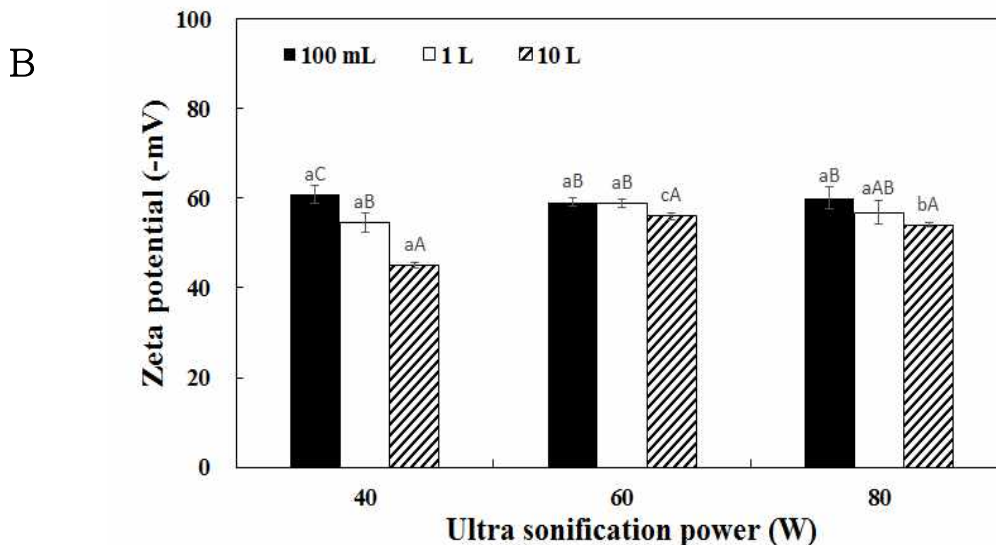
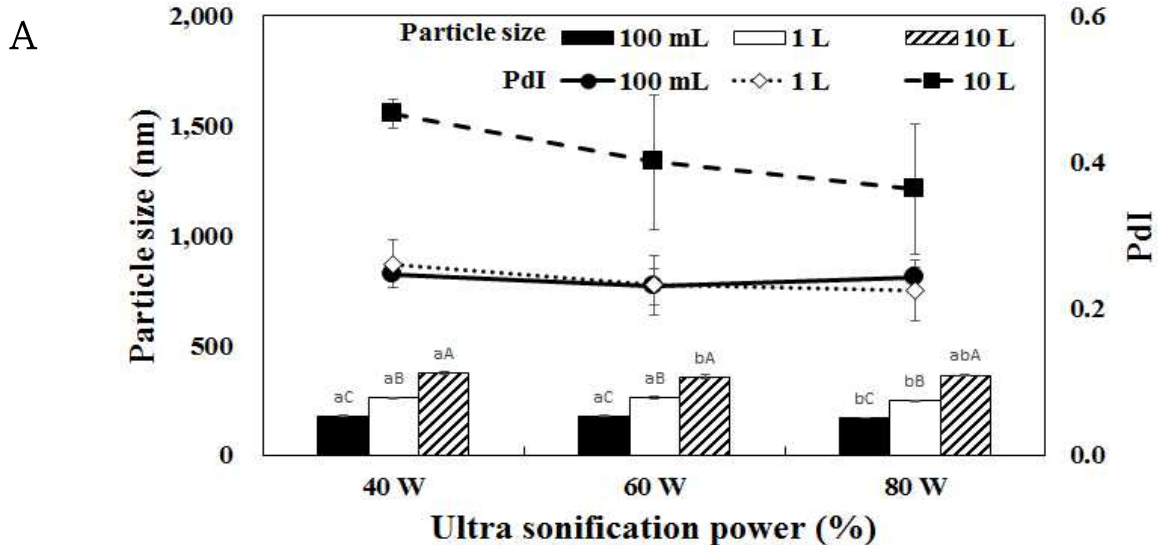


그림 2. 리포솜의 제조용량과 초음파 전력에 따른 (A)입자크기와 (B)제타전위

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between ultrasonicator condition at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between manufacture scale at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

- 펩타이드 첨가 농도가 및 제조 용량이 증가함에 따라서 리포솜의 입자크기는 유의적으로 증가하였으며, 제타 전위는 감소하는 경향이 나타났다. 제타전위 값의 경우 절대 값이 blank 리포솜에 비해서 크게 감소하였다. Prototype type으로 펩타이드를 제조하였을 때 3, 6% 펩타이드 리포솜은 430-480 nm의 크기를 나타내었고, 12%와 24%에서 각각 유의적으로 증가하는 경향이 나타났다($p < 0.05$). 특히 10 L 단위 제조에서 펩타이드 농도를 24%이상 첨가하였을 때, 입자크기는 1 mm 이상으로 크게 증가하였으며, 이에 따라 이후 저장 실험에서는 24%를 제외한 3, 6, 12% 세 가지 어피 펩타이드 농도를 설정하여 진행하였다(그림 3).

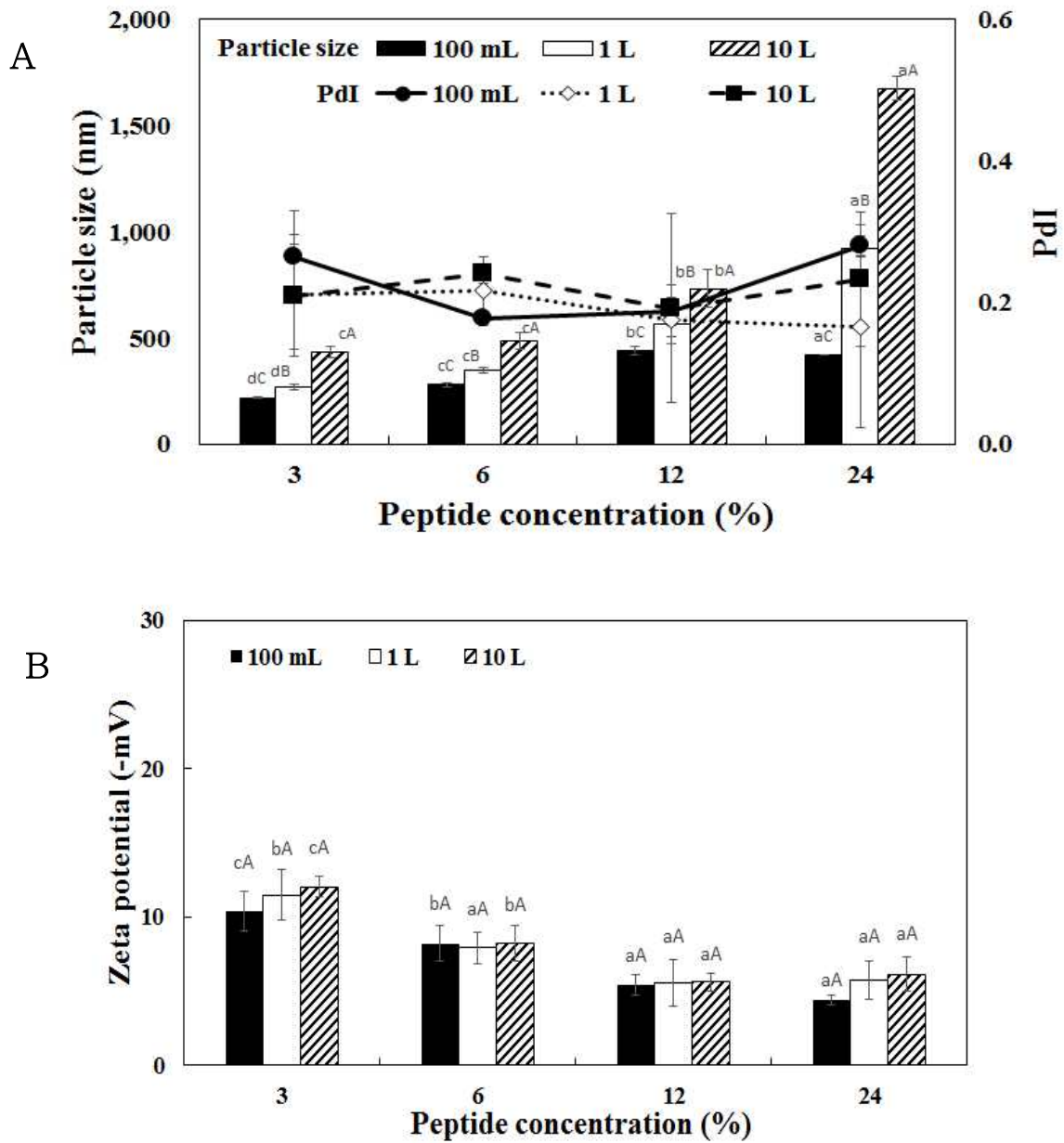


그림 3. 리포솜의 제조용량과 펩타이드 농도에 따른 (A)입자크기와 (B)제타전위

^{a-d}Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between manufacture scale at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

제 2절 제조조건에 따른 pilot scale 콜라겐 펩타이드 리포솜의 최적 제조 공정

1) 어피 펩타이드 농도별 리포솜 제조

- 물 10 L에 어피 펩타이드를 농도별(6, 12, 24% w/v)로 첨가하여 용해한 뒤 레시틴 1%(w/v, 10 g)을 첨가하여 30분 동안 교반하여 완전히 용해시킨다. 이 후 High speed homogenizer를 사용하여 8,000 RPM에서 3분간 균질화를 진행하고, ultrasonicator를 사용하여 30% 전력으로 3분간 2차 균질화를 진행하였다.
- 펩타이드 농도가 증가할수록 입자의 크기는 증가하였다. 특히 24%에서는 2 mm의 크기를 나타내었고, 12%에서 약 1000 nm의 크기를 나타내었다. 이는 기본적으로 pilot 단위에서 제조 시 약 300 nm의 크기에 비해 3배 정도 증가한 결과이다. PDI 값은 0.2-0.4의 단분상 분포도를 나타내어 균일한 입자크기임을 알 수 있다(그림 4).
- 하지만 2012년 식약처에서 공표한 나노식품관리방안 가이드라인에서 제시한 submicron 입자의 크기 범주에 들어감으로 적합한 크기로 사료된다.
- 제타 전위 값은 펩타이드 첨가량이 증가함에 따라 절대 값이 증가하는 경향을 나타내었으나 전체적인 값의 양으로 보서는 유의적인 의미가 없는 수치이다.

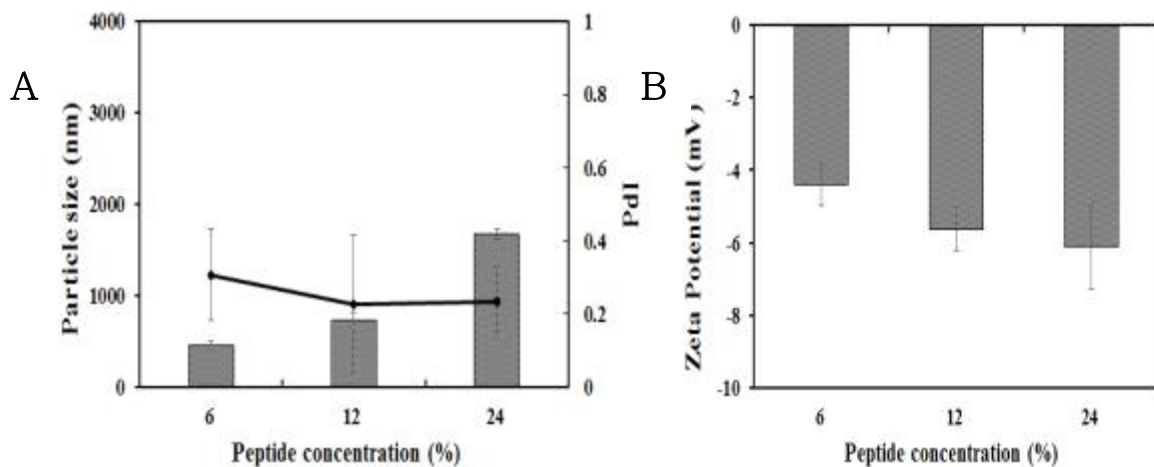


그림 4. 대량생산 시 어피 펩타이드 농도가 (A)입자크기 및 (B)제타전위에 미치는 영향
(High speed homogenizer : 8000 rpm, 3 min, Ultra sonificator : 30% power, 3 min.)

- 식약처에서 2012년에 공표한 나노식품관리방안 가이드라인에서 제시한 내용인 submicron입자의 크기 범주에 들어가도 특징이 바뀌어 효과를 보인다면 이는 나노식품 범주로 넣는다는 조항에 따라 적합한 크기로 사료된다.
- 제타 전위 값은 펩타이드 첨가량이 증가함에 따라 절대 값이 증가하는 경향을 나타내었으나 전체적인 값의 양으로 보서는 유의적인 의미가 없는 수치이다.
- 현미경 상에서 관찰된 입자들의 형상은 고른 크기를 보였고 일부 입자들이 aggregation 되어 다소 크게 나타나는 입자들도 관찰되어졌다. 펩타이드 농도간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(그림 5).

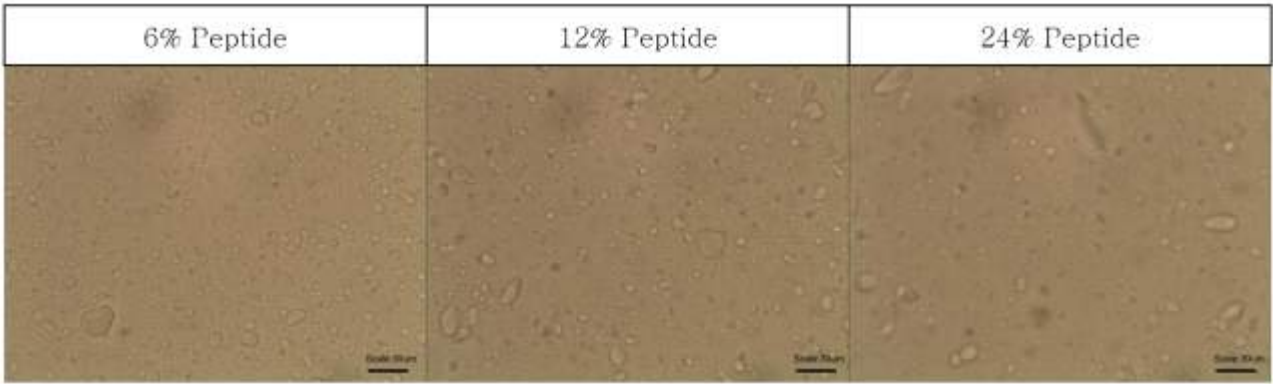


그림 5. 대량생산 된 어피 펩타이드 농도에 따른 현미경 관찰 (x400).
(High speed homogenizer: 8000 rpm, 3 min, Ultra sonificator: 30% power, 3 min)

2) 균질 속도에 따른 어피 펩타이드 리포솜 제조

- 앞서 실행한 조건에서 12%의 농도를 최적 조건으로 삼아 고정한 후 대량생산 시 균질 속도에 따른 입자크기 변화를 관찰하였다. 물 10 L에 어피 펩타이드를 12%(w/v)로 첨가하여 용해한 뒤 레시틴 1%(w/v)을 첨가하여 30분 동안 교반하여 완전히 용해시킨다. 이후 High speed homogenizer를 사용하여 속도에 따라 (4,000, 8,000, 12,000 RPM)에서 3분간 균질화를 진행하고, ultrasonicator를 사용하여 60W 전력으로 3분간 2차 균질화를 진행하였다.
- 초고속 균질기의 속도를 조절하여 입자크기를 관찰한 결과 속도에 따른 입자 변화는 나타나지 않았고, 그에 따른 전위차도 변화가 없었다. Peptide 농도가 증가할수록 제타 전위 값은 다소 증가하는 경향을 나타낸 것에 반해, 펩타이드 농도가 일정한 상태에서 균질기의 속도를 높여 주었을 때 입자의 크기 변화도 일어나지 않아 제타 전위 값이 일정하게 유지되는 것으로 사료된다. 이는 랩 단위에서도 균질기가 어느 속도 이상이 되면 아무리 속도를 증가시켜도 입자크기가 작아지는 데는 영향을 미치지 못한다는 연구내용과 일치하는 바이다(그림 6).

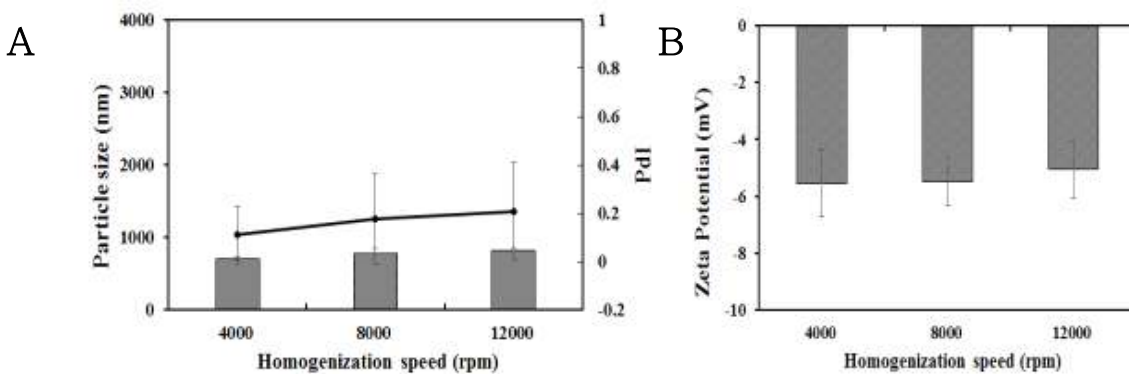


그림 6. 대량생산 시 균질기의 속도가 (A)입자크기 및 (B)제타전위에 미치는 영향
(Peptide 농도: 12%, Ultra sonificator: 30% power, 3 min)

- 현미경 상에서 관찰된 입자들의 형상은 고른 크기를 보였고 균질기 속도 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(그림 7).

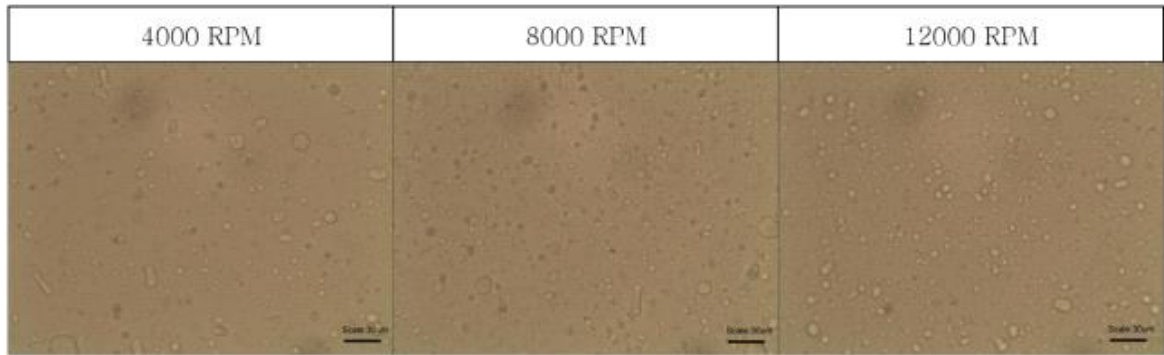


그림 7. 대량생산 시 균질기의 속도에 따른 현미경 관찰 (x400).

(Peptide 농도: 12%, Ultra sonicator: 30% power, 3 min)

3) 초음파 균질기 전력에 따른 어피 펩타이드 리포솜 제조

- 균질기의 속도는 에너지 효율 면에서 8000 rpm을 최적 조건으로 잡아 초음파 균질기의 전력을 조절하여 다음의 조건을 잡아 주었다. 물 10 L에 어피 펩타이드를 12%(w/v)로 첨가하여 용해한 뒤 레시틴 1%(w/v)을 첨가하여 30분 동안 교반하여 완전히 용해시킨다. 이 후 High speed homogenizer를 사용하여 8,000 RPM에서 3분간 균질화를 진행하고, ultrasonicator를 사용하여 전력량(20%, 30%, 40%)에 따라서 3분간 2차 균질화를 진행하였다.
- 2차 균질기에 해당하는 sonification 처리는 전체적으로 입자의 크기를 1 mm로 균일하고 1차 균질 후 보다 작게 제조 되었다. 하지만 power에 따른 크기 변화는 나타나지 않았고, 제타전위 값도 동일하게 나타났다. 그러나 1 mm의 크기로 입자의 크기를 고정하기 위해서는 1차 균질과 함께 대량생산에서도 2차 균질이 필요함을 확인할 수 있었다(그림 8).

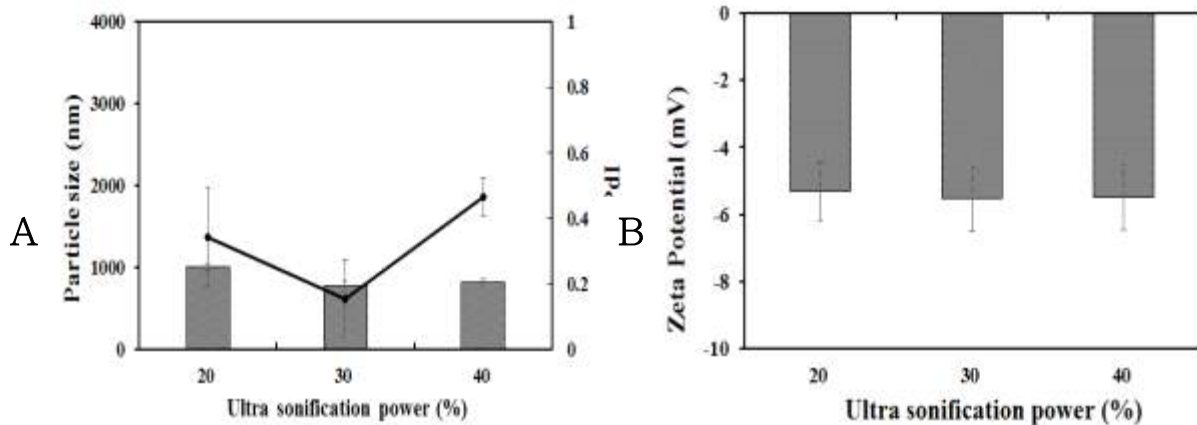


그림 8. 대량생산 시 2차 균질기(ultrasonification) power가 (A)입자크기 및 (B) 제타전위에 미치는 영향. (Peptide 농도: 12%, High speed homogenizer: 8000 rpm, 3 min)

- 현미경 상에서 관찰된 입자들의 형상은 고른 크기를 보였고 균질기 power 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(그림 9).

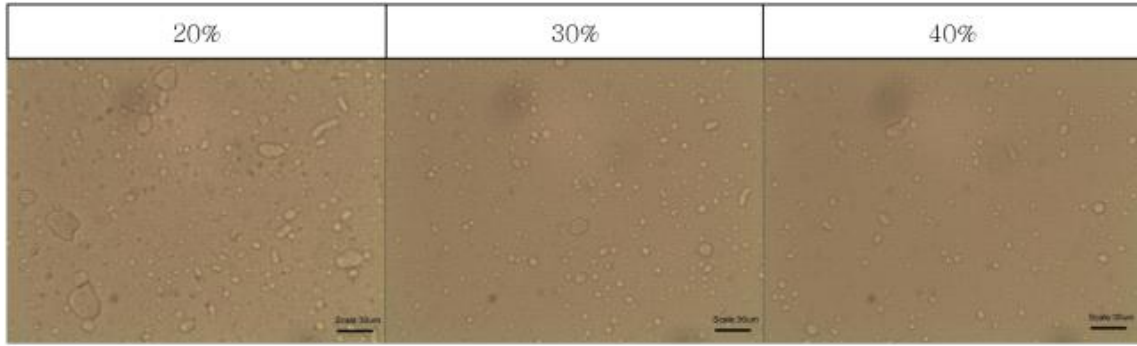


그림 9. 대량생산 시 ultrasonicator power에 따른 현미경 관찰 (x400).
(Peptide 농도: 12%, high speed homogenizer: 8000 rpm, 3 min)

제 3절 제조용량에 따른 콜라겐 펩타이드 리포솜의 최적 제조 공정

○ 펩타이드 리포솜의 입자크기와 제타전위에 펩타이드 농도와 제조 용량, 저장 기간이 미치는 영향을 이원분석한 결과를 표 3에 나타냄. 입자크기 및 제타전위는 농도, 제조용량, 저장기간 3가지 요인 모두에서 유의적으로 영향을 받는 것으로 나타났으며($p < 0.001$), 표 1의 펩타이드 제조 농도와 동일하게 펩타이드 농도가 입자크기와 제타 전위에 유의적으로 가장 큰 영향을 미침($p < 0.001$). PdI는 저장기간에 가장 크게 유의적으로 영향을 받았으며($p < 0.001$), 펩타이드 농도와 제조 용량은 유의적으로 영향을 미치지 않은 것으로 나타남($p > 0.001$).

표 3. 펩타이드 리포솜의 펩타이드 농도, 제조용량, 저장기간에 따른 입자크기, pdI, 제타전위의 F-values.

	Particle size	PdI	Zeta potential
Peptide concentration	576.14***	0.01	223.87***
Manufacture scale	530.09***	0.23	107.94***
Storage period	18.13***	8.97***	110.61***
Peptide concentration +Manufacture scale	4.64***	0.39	38.24***
Peptide concentration +Storage period	7.88***	1.36	14.29***
Manufacture scale +Storage period	6.25***	1.23	25.32***
Peptide concentration +Manufacture scale +Storage period	6.11***	2.31*	10.37***

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

- 입자크기는 제조용량과 펩타이드 농도가 증가함에 따라서 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며, 저장기간이 증가함에 따라서 감소하는 하였다. 제타전위는 저장기간이 증가함에 따라서 증가하였다. 10 L 용량으로 제조하였을 때 저장기간에 따라서 입자크기가 감소하였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 제타 전위는 펩타이드를 3, 6% 첨가하였을 때 저장기간이 증가함에 따라서 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며, 12%에서는 저장기간에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않음. 추가적으로 실험을 진행하면서 12% 농도로 10 L로 제조한 리포솜은 3주 이상 저장하였을 시에 침전물이 발생하여 상대적으로 불안정한 것으로 생각되어 6% 농도의 어피 펩타이드 리포솜이 산업적으로 적용하기에 적절한 것으로 생각됨(그림 10,11,12).

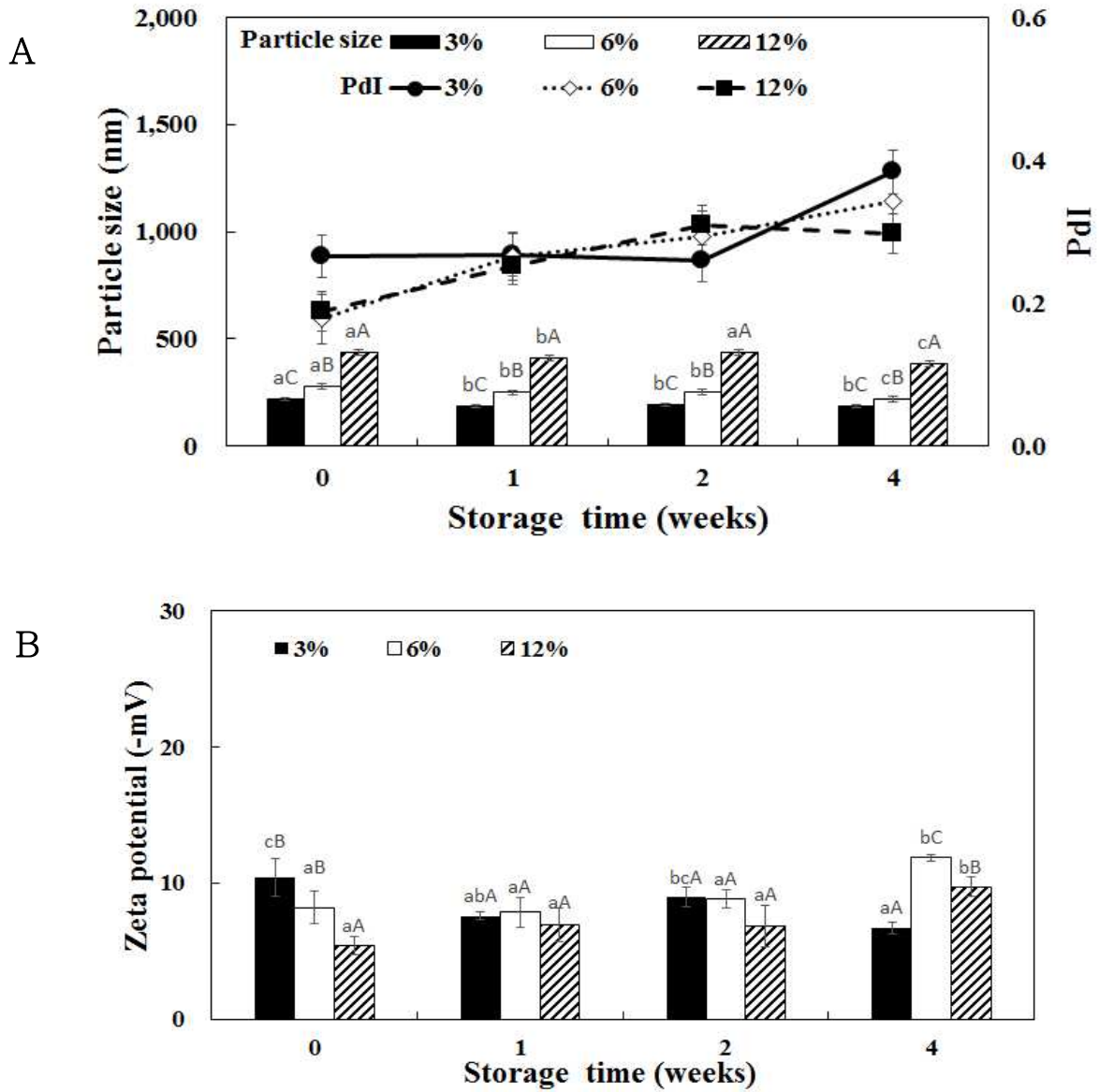
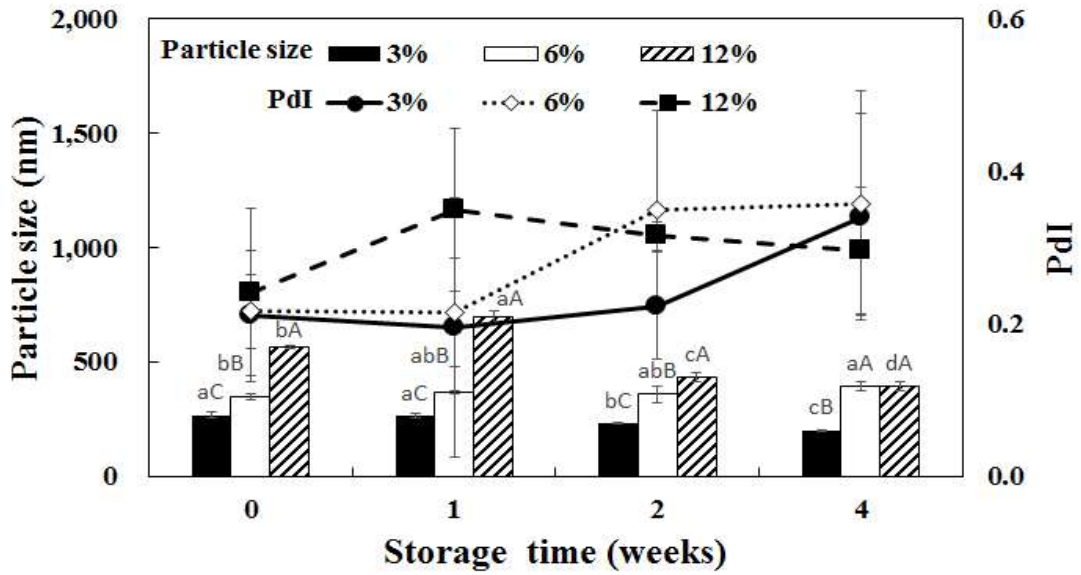


그림 10. 100 mL 단위로 제조한 펩타이드 리포솜의 저장기간과 펩타이드 농도에 따른 (A) 입자크기와 (B) 제타전위

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between storage time at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

A



B

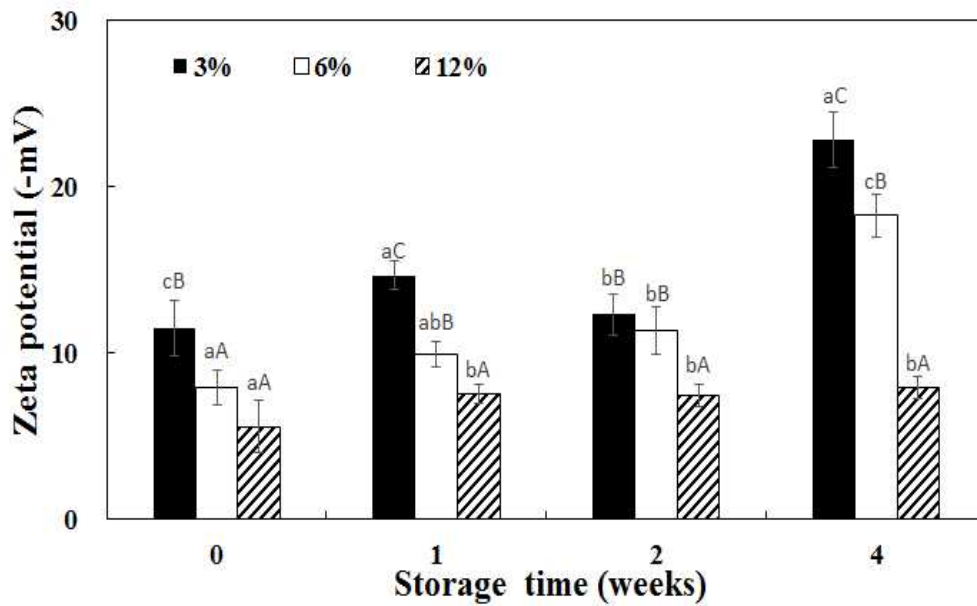


그림 11. 1 L단위로 제조한 펩타이드 리포솜의 저장기간과 펩타이드 농도에 따른 (A)입자크기와 (B)제타전위

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-D}Different superscript letters mean significantly different between storage time at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

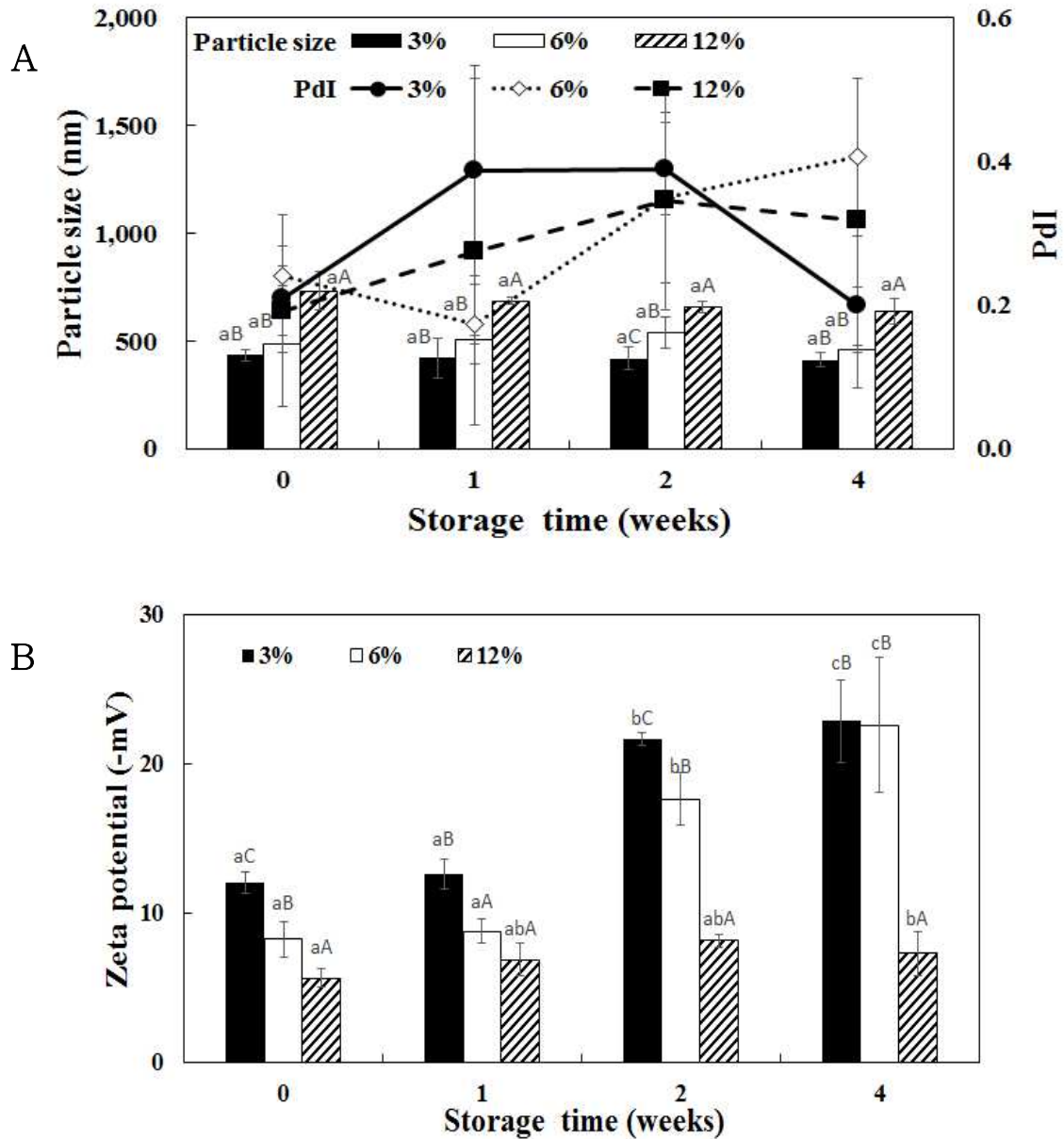


그림 12. 10 L단위로 제조한 펩타이드 리포솜의 저장기간과 펩타이드 농도에 따른 (A)입자크기와 (B)제타전위

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between storage time at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

제 2장 나노 에멀전 scale up 연구

제 1절 pilot-scale에서의 강황추출물 나노에멀전 제조를 위한 반응기 제작

- Scale-up을 위해서는 ultrasonication의 capacity가 10 L 이상을 처리할 수 있어야 하며, 현재 ultrasonication probe는 종류에 따라 20 L까지도 처리가 가능하다.
- 그림 13은 lab-scale에서 pilot-scale로 scale-up을 위해 사용한 HSH와 US 장비들이다. HSH는 최대 2.5 L까지 처리가 가능한 Dispersing Tool “HT1025” probe를 사용하였고, US 처리는 최대 20 L까지 처리가 가능한 probe를 사용하였다.

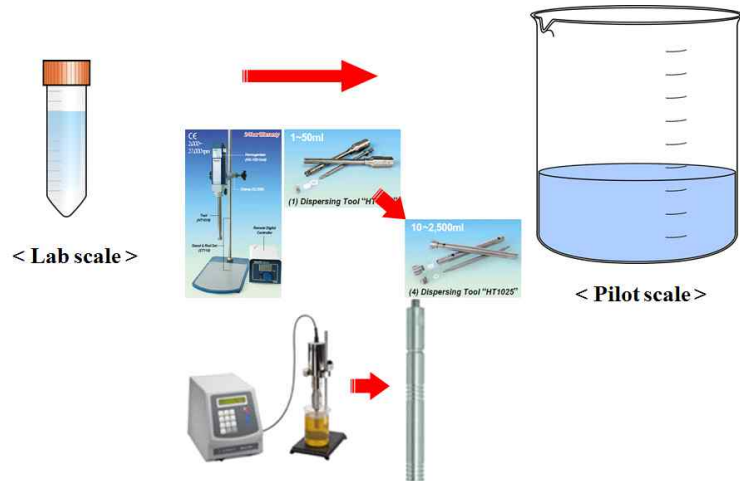


그림 13. Pilot-scale (1.5 L) 생산을 위한 HSH와 US 장비들.

- 그림 14은 철저한 검토와 신중한 설계에 따라 제작된 plant-scale (최대 20 L)의 대용량 반응기이다. 대용량 반응기는 1차 혼합기와 2차 반응기가 연결되어 있고, heating과 cooling system을 조절할 수 있어 대량생산이 가능한 반응기이며, 실제 대용량의 강황추출물 나노에멀전을 제조하는 공정을 보여주고 있다.



그림 14. Plant-scale의 대용량 반응기 및 강황추출물 나노에멀전 제조 공정

제 2절 제조한 반응기를 사용한 pilot scale에서의 강황추출물 나노에멀전 제조

- Pilot-scale에서의 강황추출물 나노에멀전을 제조하기 위한 조성은 다음 표4와 같이 제조하였으며, magnetic stirring은 300 rpm에서 2시간, HSH 처리는 5,000 rpm에서 20분간 처리하였고, US 처리 시간을 30분 단위로 하여 총 6시간(360분)까지 처리하였다.

표 4. Pilot-scale (1.5 L) 생산을 위한 성분 비율

MCT oil (g)	레시틴 (g)	Tween 80 (g)	DW (mL)	강황추출물 (g)
112.5	61.875	50.625	1,275	22.5

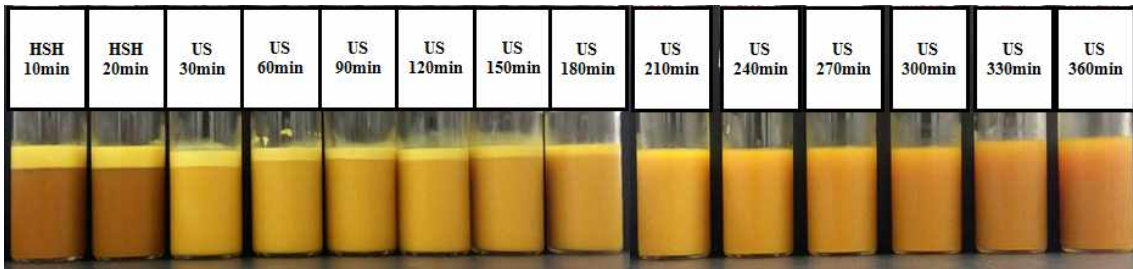


그림 15. US 처리 시간에 따른 pilot-scale의 강황추출물 나노에멀전.

- 그림 15는 HSH 처리 후 US 처리시간에 따른 pilot-scale의 강황추출물 나노에멀전을 나타낸 사진이다. 그림에서 보듯이 HSH를 10분과 20분 처리한 경우 상층부에 심각한 층 분리가 발생한 것을 볼 수 있으며, 추가적으로 US 처리 시간이 증가함에 따라 분리된 층의 정도가 감소하는 경향을 보였다.
- 하지만, US 처리 시간이 210분(3시간30분)까지는 아직까지 육안으로도 관찰되는 층 분리가 있었고, US 처리 240분(4시간) 이상부터는 이러한 층 분리가 관찰되지 않아 최소 4시간 이상의 US 처리 시간이 필요하다고 판단된다.
- US 처리시간을 30분에서 최대 360분(6시간)으로 증가하면서 US 처리 시간에 따른 입자 크기의 변화를 그림 16에 나타내었다. Pilot-scale로 제조된 강황추출물 나노에멀전의 입자크기는 US 처리시간이 30분인 경우 평균 입자의 크기가 약 623.3 nm로 큰 입자가 형성되었음을 알 수 있었다.
- 특히, 층분리가 관찰되었던 최대 210분 처리에서도 입자의 크기는 약 334.1 nm 였으며, 240분 이상 처리하였을 경우에 300 nm이하의 입자가 제조되는 것을 알 수 있었다.
- US 6시간(360분) 처리한 시료는 178.8 nm로 200 nm 이하의 입자를 제조할 수 있었으며, 산업체에서 생산을 위한 조건에서도 6시간 이상의 US 처리는 이용하는데 어려움이 있어 최대 6시간까지 처리하였다.

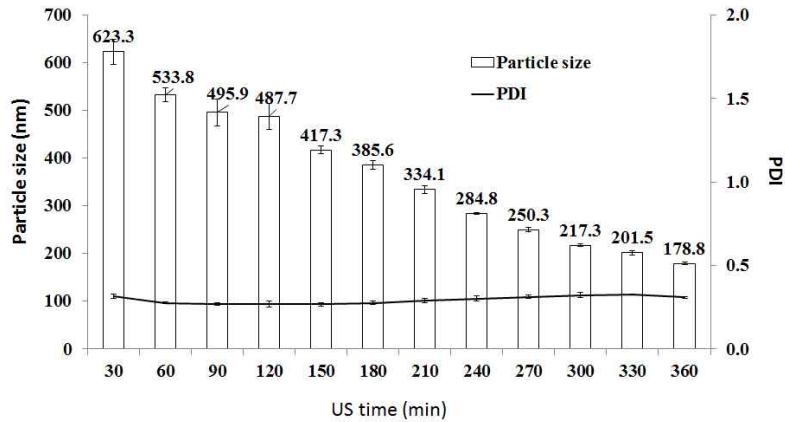


그림 16. US 처리시간에 따른 pilot-scale 강황추출물 나노에멀전의 입자크기 및 PDI.

○ 표 5에 나타낸 성분비율로 오일상과 수상을 제조하여 1차 혼합기에 제조된 오일상과 수상을 넣고, 75도의 온도에서 섞어주면서 균일하게 혼합해 준다. 균일하게 혼합된 혼합용액을 2차 반응기로 옮겨 US 처리 시간에 따른 강황추출분말 나노에멀전을 제조하며, 시간에 따른 입자의 크기와 제타전위를 측정하였다.

표 5. Plant-scale (10 L) 생산을 위한 성분 비율

MCT oil (g)	레시틴 (g)	Tween 80 (g)	DW (mL)	강황추출물 (g)
750	412.5	337.5	8,500	150

○ 그림 17은 plant-scale의 대용량 반응기를 이용하여 강황추출물 나노에멀전을 생산하면서 1차 혼합기에서 혼합된 에멀전과 US 처리 3시간, 4시간, 5시간 동안 균질화 한 시료의 사진을 나타내었다. 그림에서 보듯이 1차 혼합기로만 혼합된 에멀전의 경우 상층부에 층분리가 뚜렷하게 관찰되었고, US 처리시간이 증가함에 따라 층분리가 없는 안정한 강황추출물 나노에멀전으로 만들어짐을 관찰할 수 있었다.

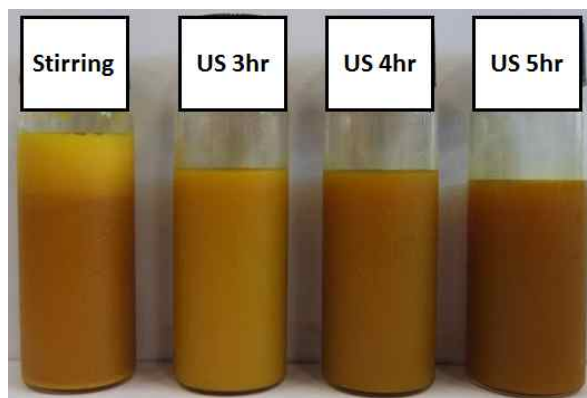


그림 17. Plant-scale의 대용량 반응기를 이용한 강황추출물 나노에멀전.

- 그림 18는 plant-scale의 대용량 반응기로 제조하면서 US 처리시간에 따른 강황추출물 나노에멀전의 입자크기, PDI 및 제타전위를 나타낸 것으로 1차 혼합기에서 제조된 시료의 경우 입자크기가 약 738.8 nm이며 앞의 사진에서 보듯이 층분리가 있으며, 제타전위는 측정이 안 되었다. 하지만 US 처리시간이 3시간부터는 입자의 크기가 크게 감소하면서 약 230 nm가 되었고, 4시간, 5시간으로 US 처리시간이 증가함에 따라 입자크기는 더욱 감소하여 137.6 nm의 입자를 얻을 수 있었다.
- 제타전위의 경우에는 약 -33 mV를 나타내었으며, US 처리시간이 3시간 이후에는 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.
- 대용량의 경우 총 10 L의 원료를 US 5시간으로 처리하여 얻은 강황추출물 나노에멀전의 수율은 9.8 L로 98%의 수율을 나타내었다.

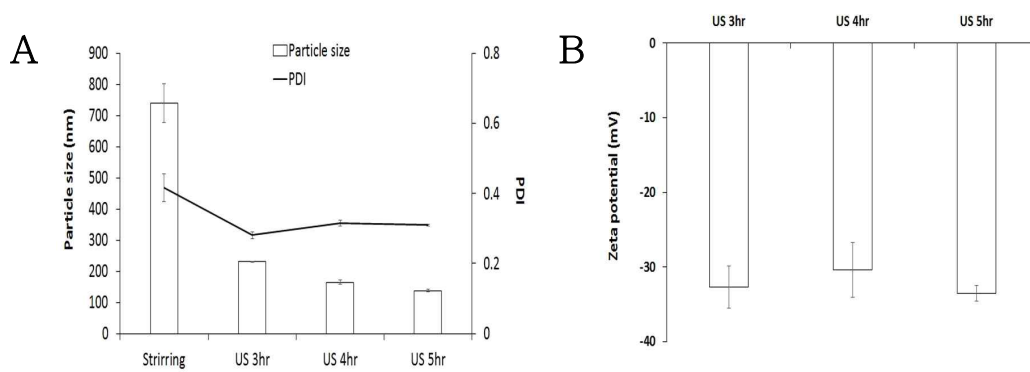


그림 18. Plant-scale의 대용량 반응기에서 US 처리시간에 따른 강황추출물 나노에멀전의 (A)입자크기, PDI, 및 (B)제타전위.

제3절 제조용량에 따른 강황추출물 나노에멀전 최적 조건 비교

- 그림 19은 강황추출물 나노에멀전의 lab-scale에서 pilot-scale과 plant-scale로의 scale-up에 따른 최적의 제조 공정을 비교한 것이다.

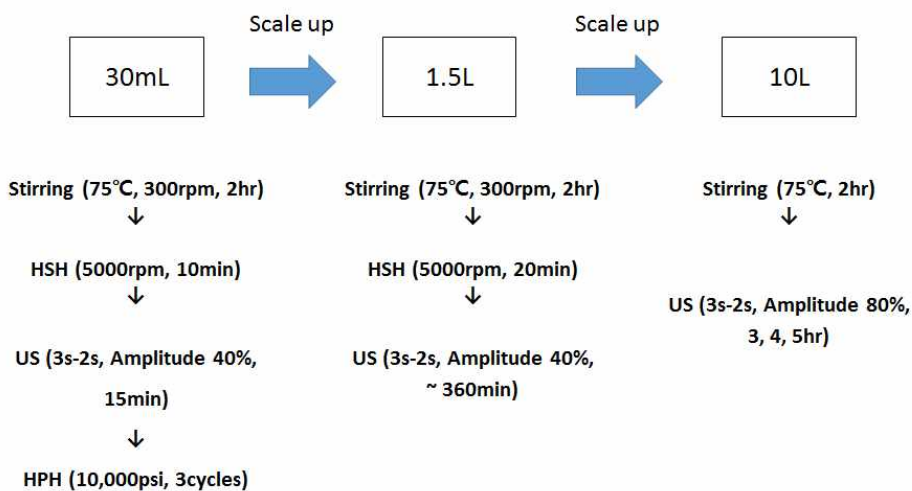


그림 19. 제조용량에 따른 강황추출물 나노에멀전 제조 조건.

- Plant-scale (10 L)의 대용량 반응기를 이용하여 제조한 강황추출물 나노에멀전의 입자 크기가 pilot-scale (1.5L)로 제조한 나노에멀전에 비해 같은 시간의 US 처리별로 비교할 때 전체적으로 작은 경향을 나타내고 있는데, 이는 반응기를 통해 장치의 효율이 증가하였기 때문으로 보인다(그림 20).

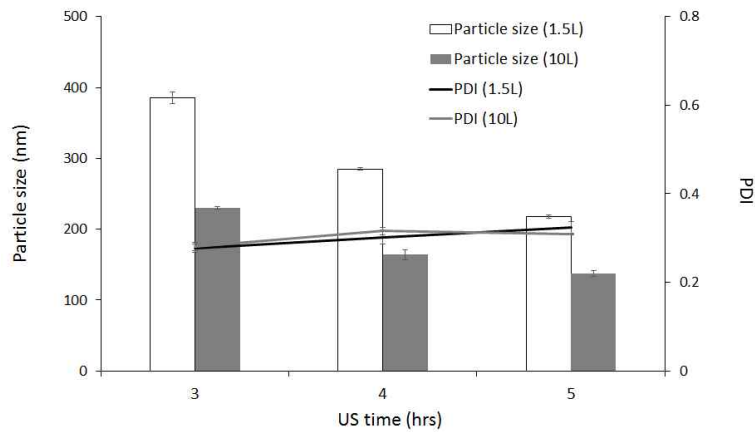


그림 20. 제조용량별 US 시간에 따른 입자크기 및 PDI

- 그림 21은 각 용량별 최적의 제조조건으로 제조 하였을 때의 강황추출물 나노에멀전의 입자크기 및 제타전위를 비교한 것으로 lab-scale (30 mL)에서는 US 처리시간도 짧고, 제조된 입자의 크기도 감소되는 경향을 보였으나 scale-up에 따른 제조 용량이 증가함에 따라 제조 시간도 크게 증가하였고, 제조된 나노에멀전 입자의 크기도 증가하는 경향을 보였다.
- 하지만, pilot-scale (1.5 L)과 plant-scale (10 L)에서는 제작된 대용량 반응기를 이용한 강황추출물 나노에멀전은 입자 크기가 137.6 nm이며, 제타전위는 -33.52 mV로 균일하고 안정한 나노에멀전을 제조할 수 있었다.

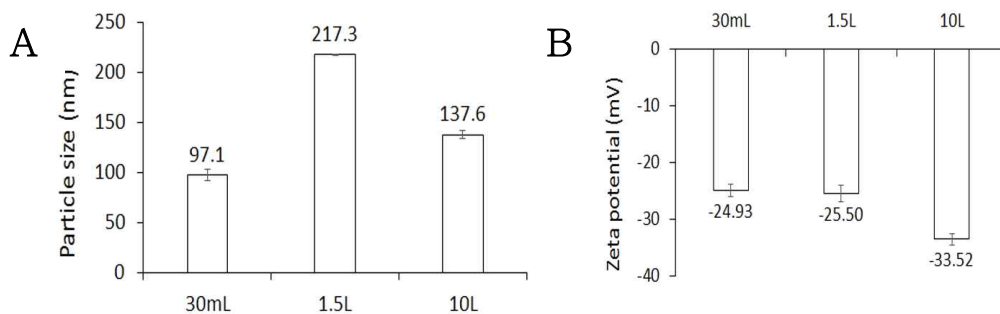


그림 21. 용량별 최적조건에서의 (A)입자크기 및 (B)제타전위.

[별첨 4]

**나노소재 고도화 및 시제품(식품)을
활용한 단계별 현장 실증(적용)시험 결과
보고서**

< 목 차 >

제1장. 콜라겐 펩타이드 리포솜 제조	3
제1절. 프로젝트 flow chart	3
제2절. 콜라겐 펩타이드 리포솜의 제조 공정	4
제3절. 제조된 콜라겐 펩타이드 리포솜의 안정성	5
제2장. 콜라겐 펩타이드 리포솜의 현장 적용	12
제1절. 어피 펩타이드 리포솜 생산라인 탐색	12
제2절. 어피 펩타이드 리포솜의 scale-up 제조 및 이를 첨가한 유자 음료 제조	16
제3절. 유자 펩타이드, 유자 펩타이드 코팅 리포솜의 동결건조 수율 비교 조사	17
제3장. 강황추출물 나노에멀전 제조	19
제1절. 프로젝트 flow chart	19
제2절. 강황추출물 제조 최적화	20
제3절. 강황추출물 함유 나노에멀전 제조공정 확립	23
제4장. 강황추출물 나노에멀전의 현장 적용	32
제1절. Spray dryer를 이용한 강황추출물 나노에멀전의 분말화	32
제2절. 강황추출물 나노에멀전을 적용한 햄 시제품 개발	32
제3절. 미분쇄 강황분말을 적용한 백세강황한 시제품 개발	35

제 1장 콜라겐 펩타이드 리포솜 제조

제 1절 프로젝트 flow chart

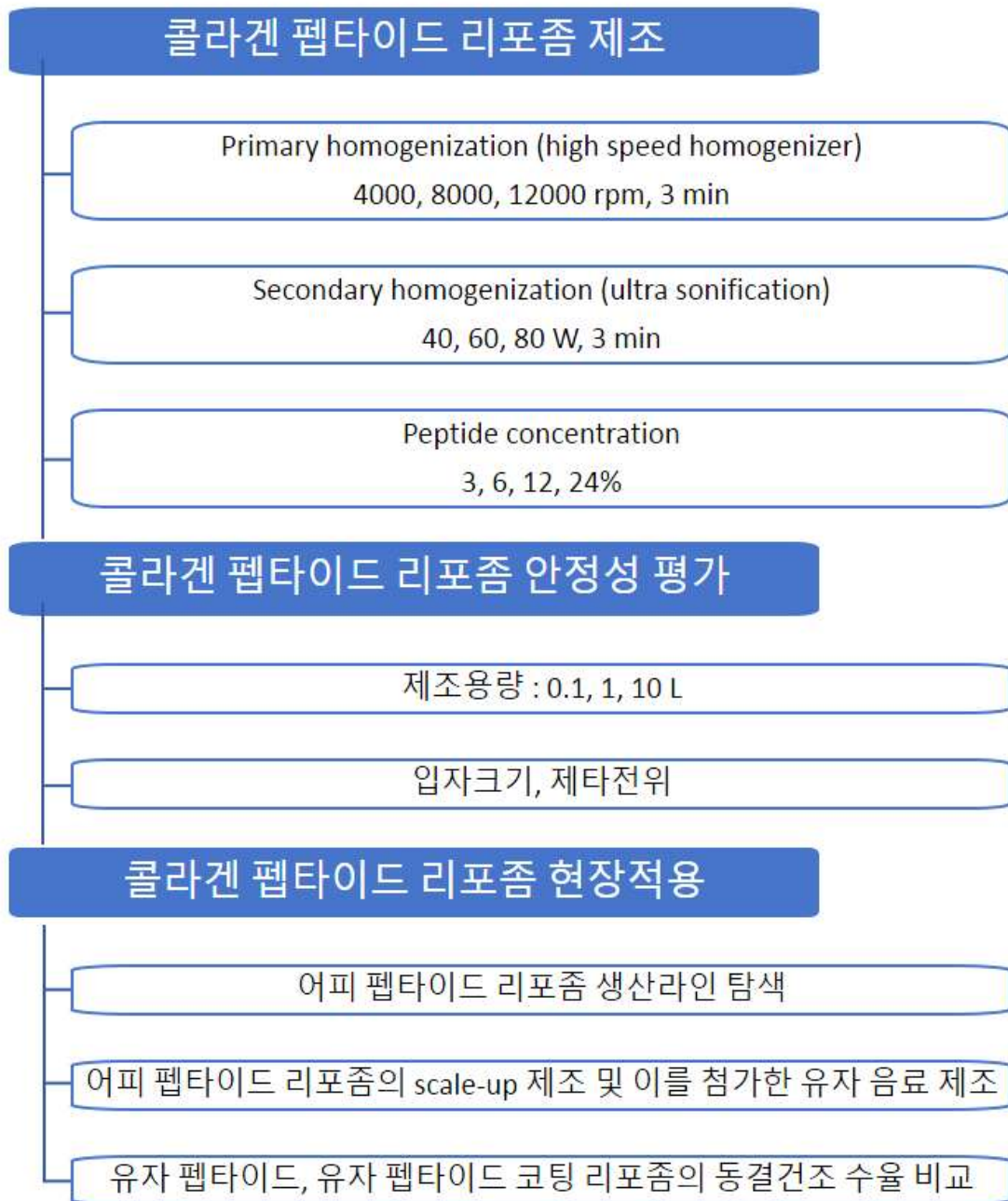


그림 1. 콜라겐 펩타이드 리포솜 프로젝트 flow chart

제 2절 콜라겐 펩타이드 리포솜의 제조 공정

- 코팅제인 레시틴(LIPOID S 75, fat free soybean phospholipids with 70% phosphatidylcholine)은 Lipoids GmbH (Ludwigshafen, Switzerland)에서 구입하여 사용하였고, 콜라겐 펩타이드(Marine P)는 Weishardt International (Graulhet, France)에서 구입하였다.

- 리포솜 제조 공정은 증류수에 1% 레시틴을 첨가하여 30분 동안 교반하여 1% 레시틴 용액을 100 mL, 1 L, 10 L 용량으로 각각 1차, 2차 균질을 진행하여 제조하였다. 1차 균질 조건은 High speed homogenizer (T25 digital Ultra-turrax high-speed mixer, IKA, Germany)를 사용하여 3분간 각각 4,000, 8,000, 12,000 rpm으로 균질하여 리포솜을 제조하여 입자크기 및 제타전위를 측정하였다. 1차 균질 최적 조건을 설정하여 2차 균질 조건은 초음파균질기(Model HD-2200, BANDELIN electronic · GmbH & Co. KG, Berlin, Germany)를 이용하여 각각 40, 60, 80 W로 3분간 균질하여 2차 균질 최적 조건을 확립하였다. 최적화된 Blank 리포솜에 콜라겐 펩타이드 농도 3%, 6%, 12%로 각각 펩타이드 리포솜을 제조하여 최적 조건을 설정하였다.
- 제조 용량에 따른 blank 및 펩타이드 리포솜의 제조 용량에 따른 최적 제조 조건을 다음 표 1에 기재하였다.

표 1. Blank 리포솜 및 펩타이드 리포솜의 제조 및 저장 조건.

	Treatment	Condition	Treatment time
Primary homogenization condition	High speed homogenizer	4,000 rpm, 8,000 rpm, 12,000 rpm	3 min
Secondary homogenization condition	Ultra sonication	40 W, 60 W, 80 W	3 min
Peptide concentration	Concentration	3%, 6%, 12%, 24%	
Storage condition	Refrigeration	4°C	4 weeks

제 3절 제조된 콜라겐 펩타이드 리포솜의 안정성

- 1차 균질 조건 및 제조용량에 따라 입자 크기 및 제타 전위를 측정한 결과를 그림 2에 나타내었다. 전반적인 입자크기는 300 nm에서 450 nm 사이에서 리포솜이 형성되었으며, 균질 속도가 증가할수록 입자크기가 유의적으로 감소하였으며, 제조용량이 증가할수록 입자크기가 증가하는 결과가 나타났다. PdI값은 균질 속도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 제타전위 측정결과 100 mL 단위로 제조하였을 때 균질속도가 증가함에 따라서 유의적으로 제타전위의 절대 값이 증가하였으나 8,000 rpm, 12,000 rpm에서는 균질속도에 따른 유의적 차이는 보이지 않았다.

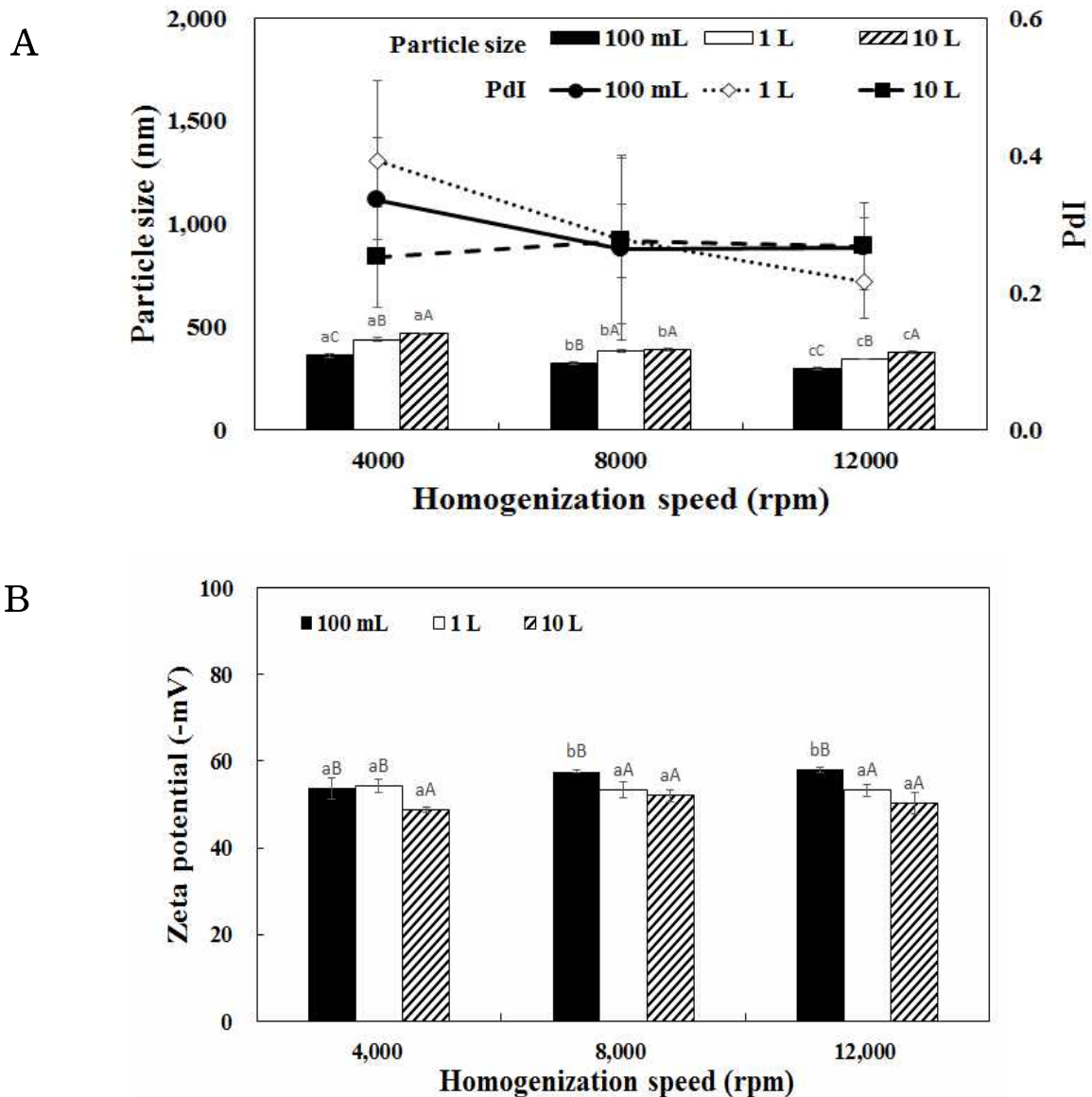


그림 2. 리포솜의 제조용량과 균질 속도에 따른 (A)입자크기와 (B)제타전위

a-c Different superscript letters mean significantly different between homogenizer condition at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

A-C Different superscript letters mean significantly different between manufacture scale at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

○ 2차 균질 조건 및 제조용량에 따라 입자 크기 및 제타 전위를 측정된 결과를 그림 3에 나타내었다. 2차 균질 이후 전체적인 입자크기는 감소하였으며 초음파 균질 전력이 증가함에 따라 입자크기는 감소하였으며, 또한 제조용량이 증가함에 따라서 입자크기 또한 증가하여 1차 균질 조건 결과와 같은 경향이 보였다. 또한 제조용량이 10 L일 때, 다른 제조 용량에 비해서 pdI값이 높은 것으로 나타났다. 제타 전위 측정 결과, 제조용량이 증가함에 따라서 증가하는 경향을 나타냈으며, 균질 전력에 따른 입자크기는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 40 W에 비해서 60 W와 80 W 조건에서 제타 전위가 안정된 결과를 보였다. 산업적 공정비용을 고려할 때, 60 W를 최적 조건으로 선정하였다.

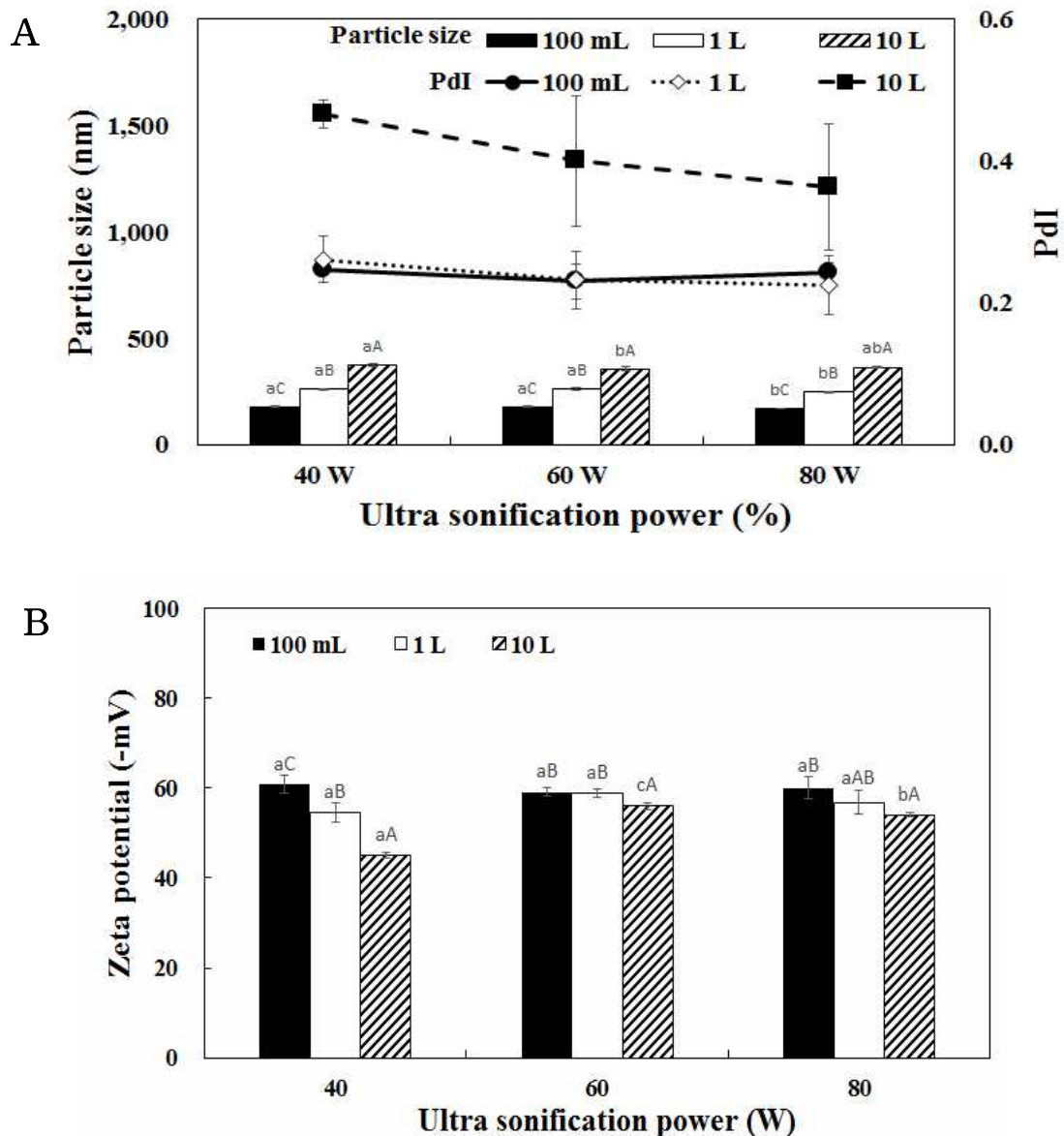


그림 3. 리포솜의 제조용량과 초음파 전력에 따른 (A)입자크기와 (B)제타전위

a-c Different superscript letters mean significantly different between ultrasonicator condition at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

A-C Different superscript letters mean significantly different between manufacture scale at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

- 펩타이드 첨가 농도가 및 제조 용량이 증가함에 따라서 리포솜의 입자크기는 유의적으로 증가하였으며, 제타 전위는 감소하는 경향이 나타났다. 제타전위 값의 경우 절대 값이 blank 리포솜에 비해서 크게 감소하였다. Prototype type으로 펩타이드를 제조하였을 때 3, 6% 펩타이드 리포솜은 430-480 nm의 크기를 나타내었고, 12%와 24%에서 각각 유의적으로 증가하는 경향이 나타났다($p < 0.05$). 특히 10 L 단위 제조에서 펩타이드 농도를 24%이상 첨가하였을 때, 입자크기는 1 mm 이상으로 크게 증가하였으며, 이에 따라 이후 저장 실험에서는 24%를 제외한 3, 6, 12% 세 가지 어피 펩타이드 농도를 설정하여 진행하였다(그림 4).

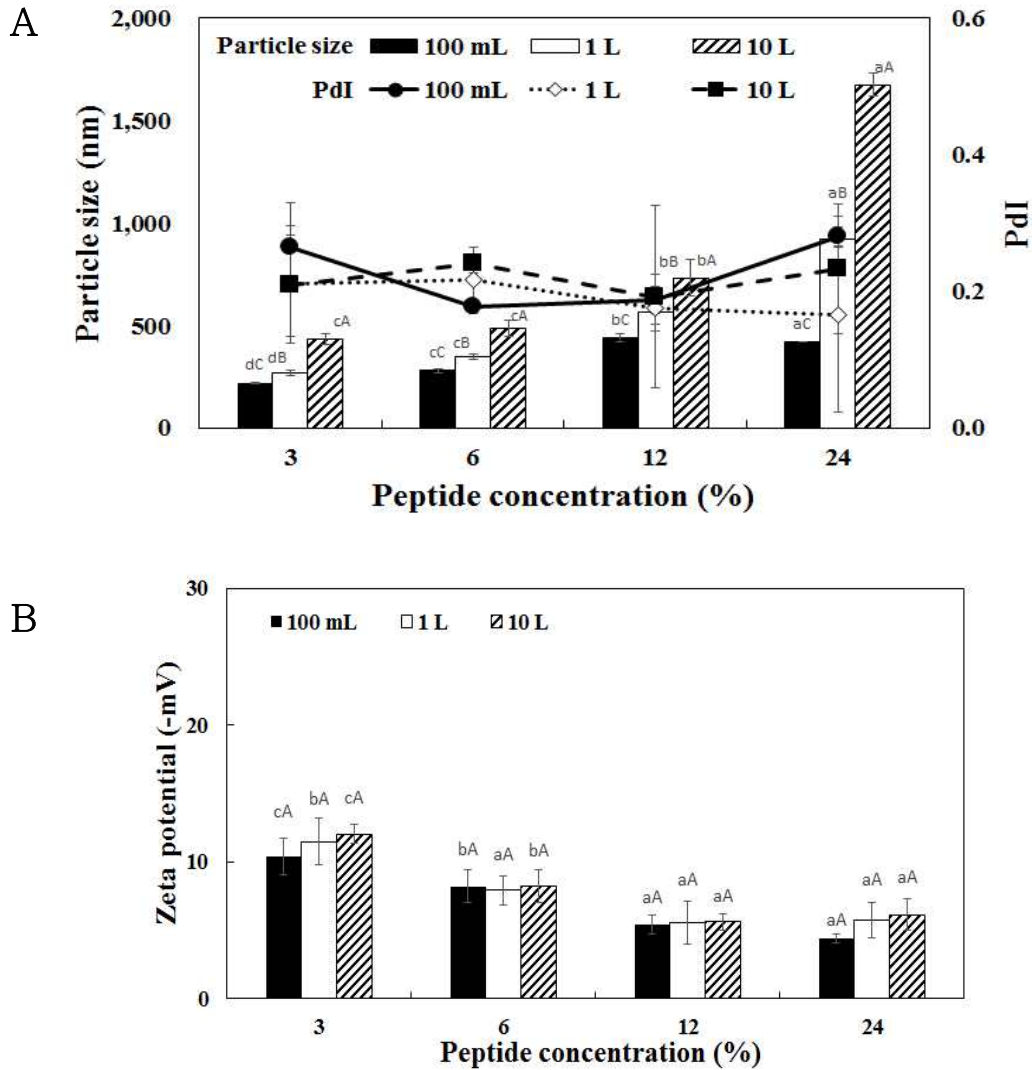


그림 4. 리포솜의 제조용량과 펩타이드 농도에 따른 (A)입자크기와 (B)제타전위

a-d Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

A-C Different superscript letters mean significantly different between manufacture scale at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

- 다음 그림 5, 6, 7에 제조 용량 및 펩타이드 농도에 따라서 펩타이드 리포솜을 제조한 뒤 저장 기간에 따라서 입자크기 및 제타 전위를 측정 한 결과를 나타내었다.
- 입자크기는 제조용량과 펩타이드 농도가 증가함에 따라서 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며, 저장기간이 증가함에 따라서 감소하는 하였다. 제타전위는 저장기간이 증가함에 따라서 증가하였다. 10 L 용량으로 제조하였을 때 저장기간에 따라서 입자크기가 감소하였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 제타 전위는 펩타이드를 3, 6% 첨가하였을 때 저장기간이 증가함에 따라서 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며, 12%에서는 저장기간에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 추가적으로 실험을 진행하면서 12% 농도로 10 L로 제조한 리포솜은 3주 이상 저장하였을 시에 침전물이 발생하여 상대적으로 불안정한 것으로 생각되어 6% 농도의 어피 펩타이드 리포솜이 산업적으로 적용하기에 적절한 것으로 사료된다.

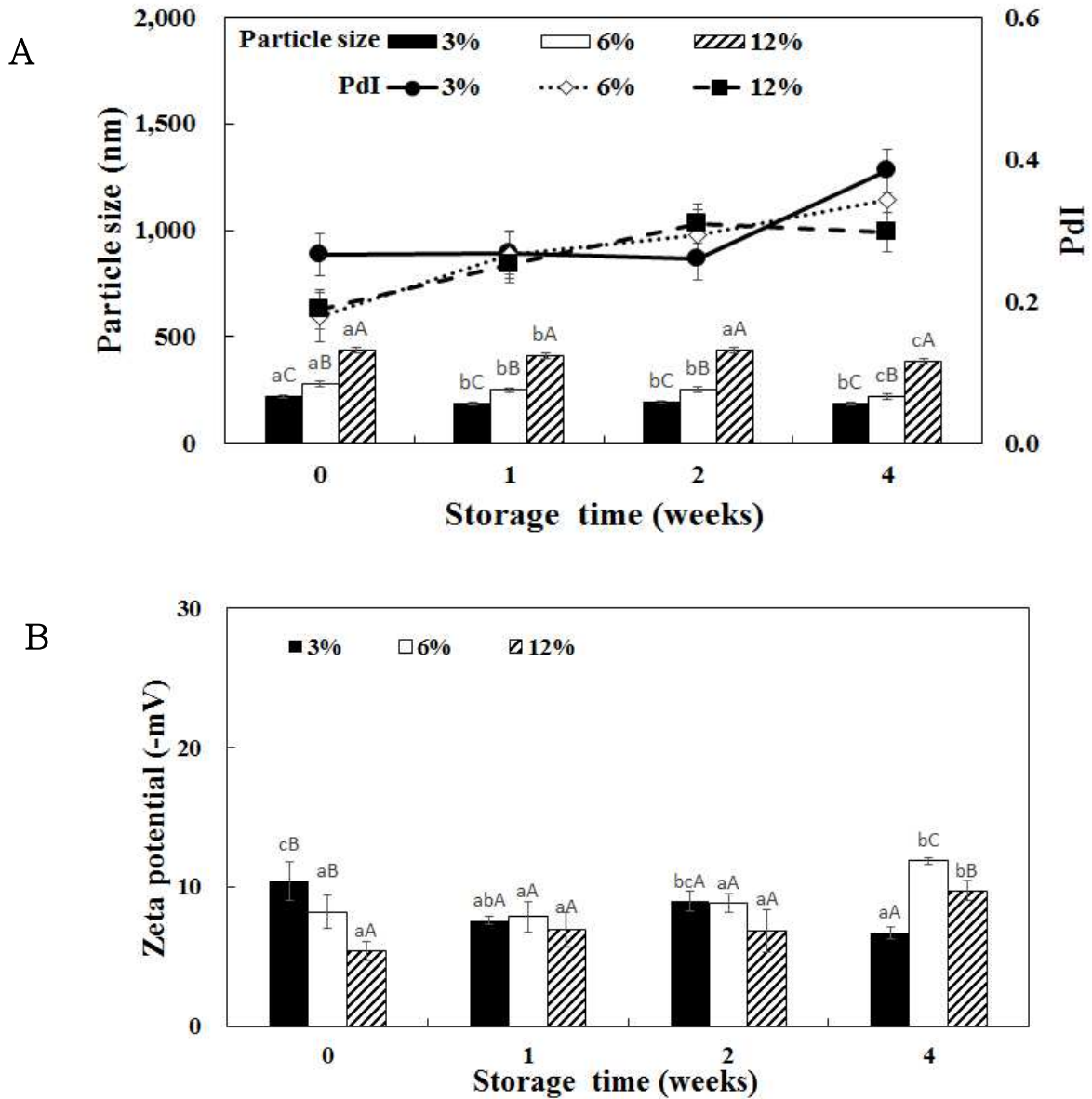


그림 5. 100 mL 단위로 제조한 펩타이드 리포솜의 저장기간과 펩타이드 농도에 따른 (A) 입자크기와 (B) 제타전위

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between storage time at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

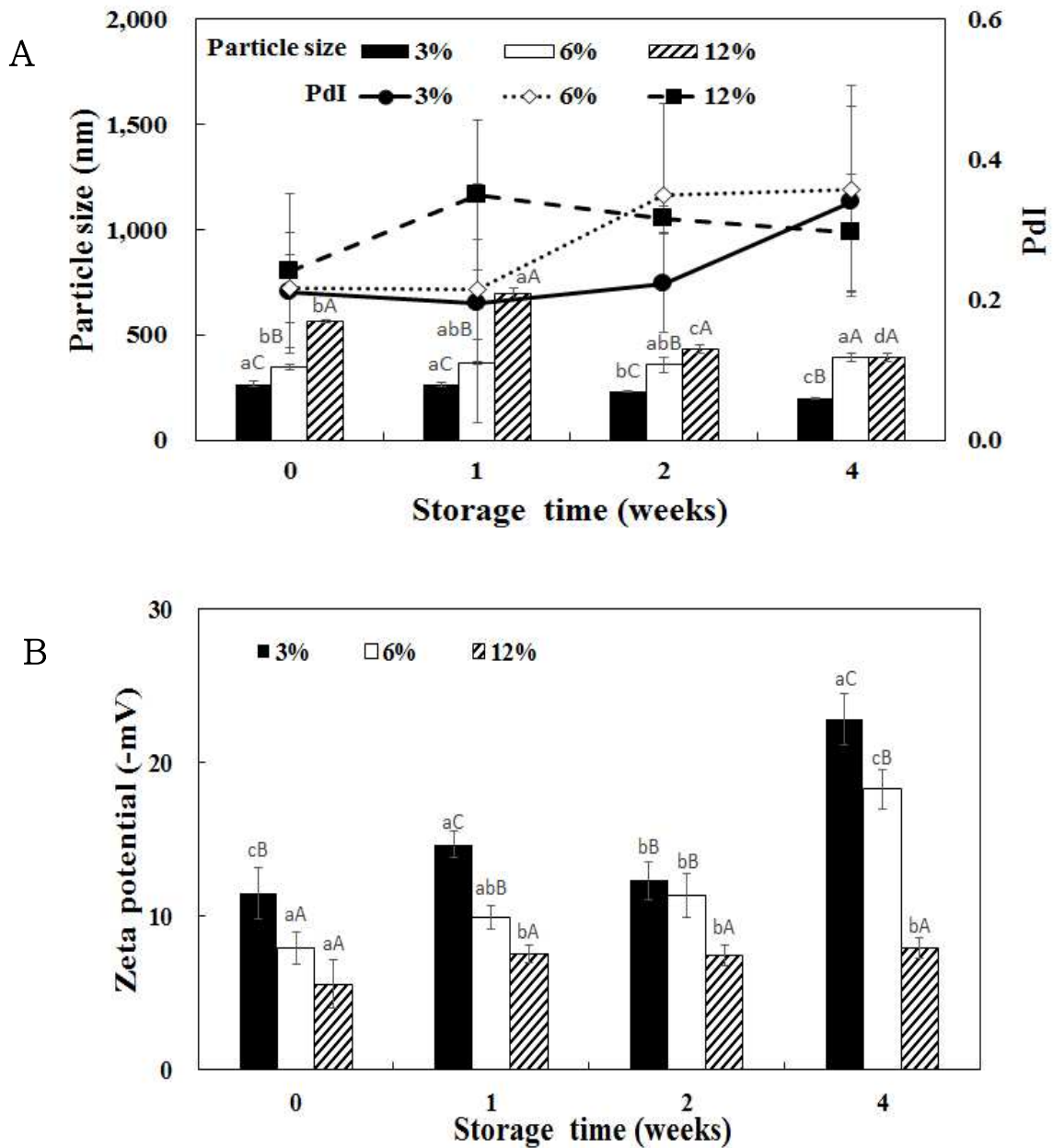


그림 6. 1 L단위로 제조한 펩타이드 리포솜의 저장기간과 펩타이드 농도에 따른 (A)입자크기와 (B)제타전위

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between storage time at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

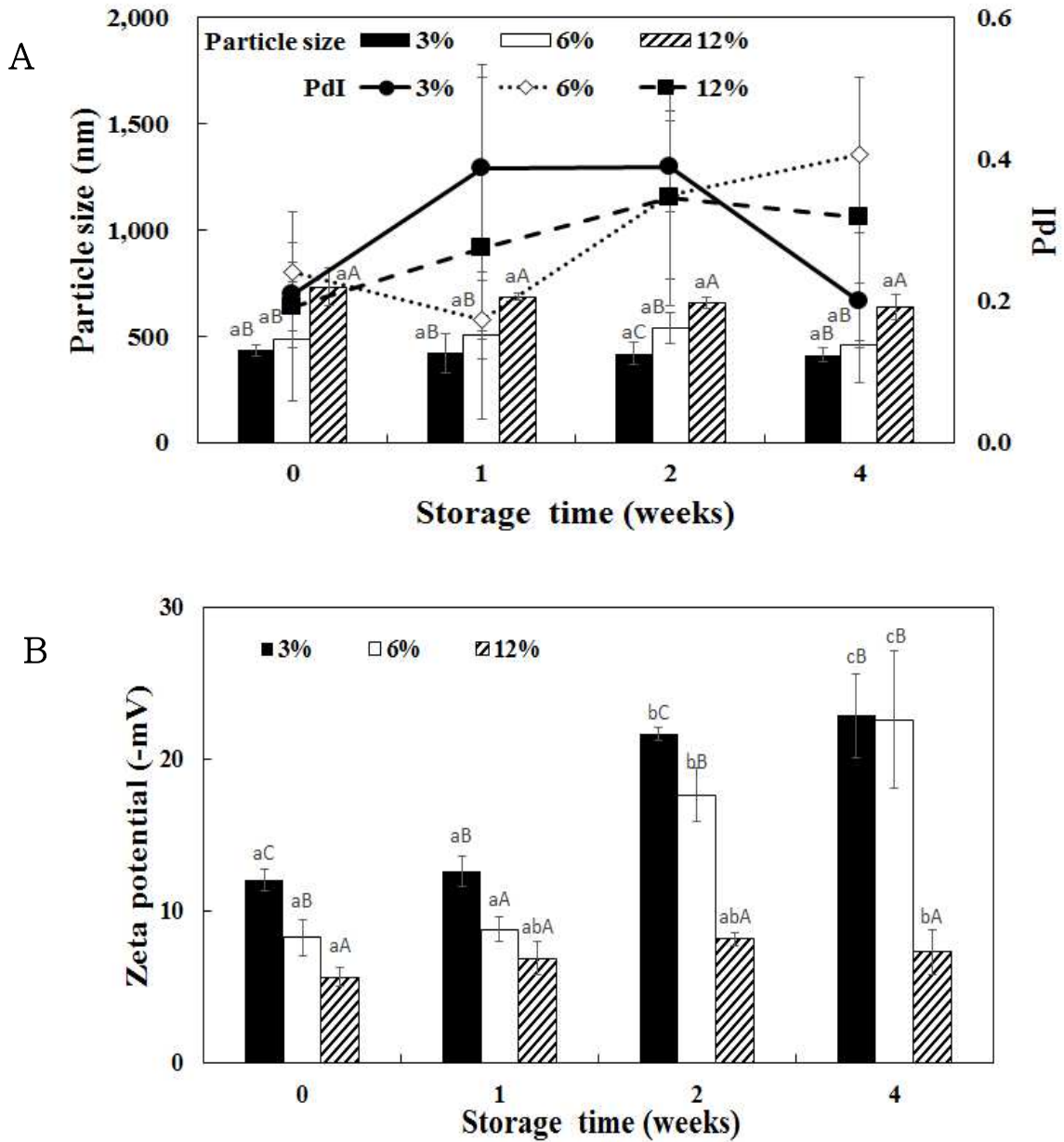


그림 7. 10 L단위로 제조한 펩타이드 리포솜의 저장기간과 펩타이드 농도에 따른 (A)입자크기와 (B)제타전위

^{a-c}Different superscript letters mean significantly different between peptide concentration at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

^{A-C}Different superscript letters mean significantly different between storage time at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

제 2장 콜라겐 펩타이드 리포솜의 현장 적용

제 1절 어피 펩타이드 리포솜 생산라인 탐색

- 참여기업 에덴식품의 제품형태와 1일 생산량에 3%의 어피펩타이드를 첨가하기 위한 어피펩타이드 리포솜의 생산량을 계산이 필요하여, 상용화 되고 있는 유자 음료의 생산량을 조사 하였다. 그에 대한 정보는 아래 도표(표 2)에서 나타내었다.
- 일반적인 음료로 섭취하는 “유자즙”의 경우는 내열 PET로 포장되어 한 포장단위당 약 120 mL의 양이 들어가고 1일 생산량은 약 14,000개를 생산하여 최소 생산량은 약 0.5 톤의 양을 생산한다.

표 2. 참여기업인 에덴식품에서 생산하는 1일 유자즙의 생산량 및 기타 제품 정보

시제품	제품형태	음료수	음료수
	포장형태	내열PET	유리병
	용량	120 mL	180 mL
제품1일 생산 대비	전체 최소 생산량	0.5 톤	0.5 톤
	1일 생산량	14,000개/120 mL/일	10,000개/220 mL/일
	최소생산량	7,000개/120 mL/일	5,000개/180 mL/일

- 또한 대량 생산된 시료의 어피 펩타이드 plant 현장 적용을 위한 공장 라인을 답사를 실시하여 주입 단계를 결정하였다. 생산라인 및 개별 생산라인은 아래의 그림 8와 같다. 대량생산된 어피 펩타이드 리포솜 주입단계는 개별 단위 포장 전으로 결정하였다.

- 대용량 제품 생산라인



- 파우치 및 PET 타입 제품 생산라인



그림 8. 에덴식품의 음료 생산 시설.

제 2절. 어피 펩타이드 리포솜의 scale-up 제조 및 이를 첨가한 유자 음료 제조

- 12% w/v 어피 펩타이드 용액 5 L에 레시틴을 1% w/v 첨가하여 500 rpm에서 60분 이상 교반시킨 후 대형 균질기(WSB70, Waring, Torrington, CT, USA)를 이용하여 8,000 rpm으로 3분간 균질하였다.
- 어피 펩타이드 리포솜의 plant scale 적용을 위해 예덴식품의 음료 공정라인을 이용하였다. 로타리식 자동 포장기계(SPS-R380, S-Pack, Daegu, Korea, 그림 9)에 유자 액기스 5 kg과 물 5 L를 혼합한 후 절반인 5 L에 12% w/v 어피 펩타이드 용액 5 L를 첨가하였으며 나머지 5 L에 12% 어피 펩타이드 리포솜을 첨가하여 각각을 98°C에서 3분간 열처리 살균하였다. 로타리식 자동 포장기계를 이용하여 각 음료를 120 mL 용량의 파우치 형태로 포장하였다(20개/1분).



그림 9. 로타리식 자동 포장기계.

- 그림 10, 11, 12에서 음료 공정 라인에 사용되는 장치가 제시되어있다. 상단부의 용기에 펌프를 통해 시료를 주입하여 연속적으로 처리가 가능하여 포장하기 직전 저장 탱크에 대량 생산된 리포솜을 혼합하여 펩타이드 혼합유자 추출액을 제조하였다.
- 유리병의 경우도 전체 생산량은 0.5톤가량 되어 실제 어피 펩타이드가 들어가는 양을 계산해보면 10%의 펩타이드 용액 50 kg과 0.5톤의 유자추출액을 혼합하면 1%의 펩타이드 함량 유자 추출액 제조가 가능하다. 최종 펩타이드 함량조건은 순차적으로 논의 후 결정될 예정이며 본 실험에서 나온 결과를 토대로 유자추출액과 혼합 후 6%의 펩타이드 코팅 리포솜이 4주 저장 시 입자가 안정되어 12%의 펩타이드 용액을 기준으로 제조하였다.
- 연속식 공정에서 실제 모든 0.5톤의 모든 시료를 시행하지 않고, 최종 용량이 10 L를 기준으로 하여 plant line에 주입하여 펩타이드 유자 음료는 제조하였다.



그림 10. 혼합 후 가열 공정.



그림 11. (A)어피 펩타이드 및 (B)리포솜을 첨가(C, D)하는 공정.

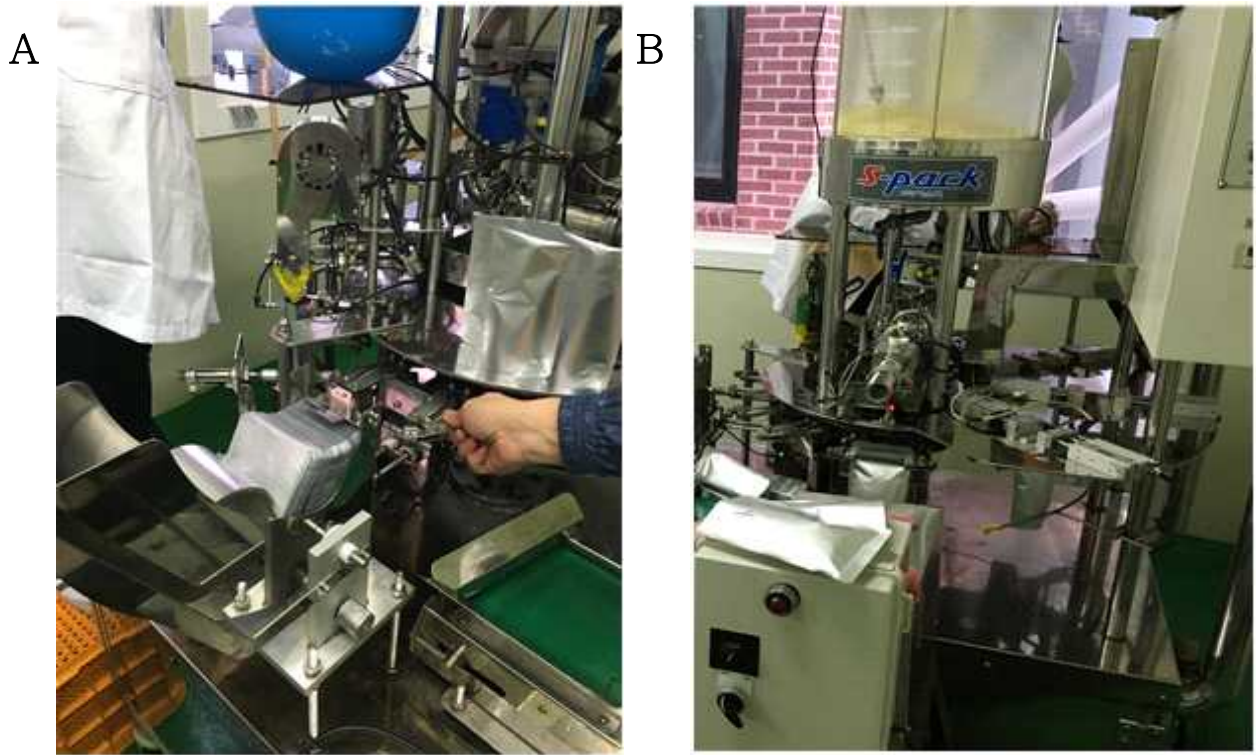


그림 12. 포장 공정 과정.

- 가열 공정(그림 10)은 98℃에서 3분간 진행되며, 이후 위의 그림 12과 같이 자동으로 파우치가 공급되며, 배출구를 통해 시료가 주입된 후 자동으로 진공포장이 진행된다. 다음은 진공포장을 마친 뒤 최종적으로 제조된 시제품이다(그림 13, 120 mL).

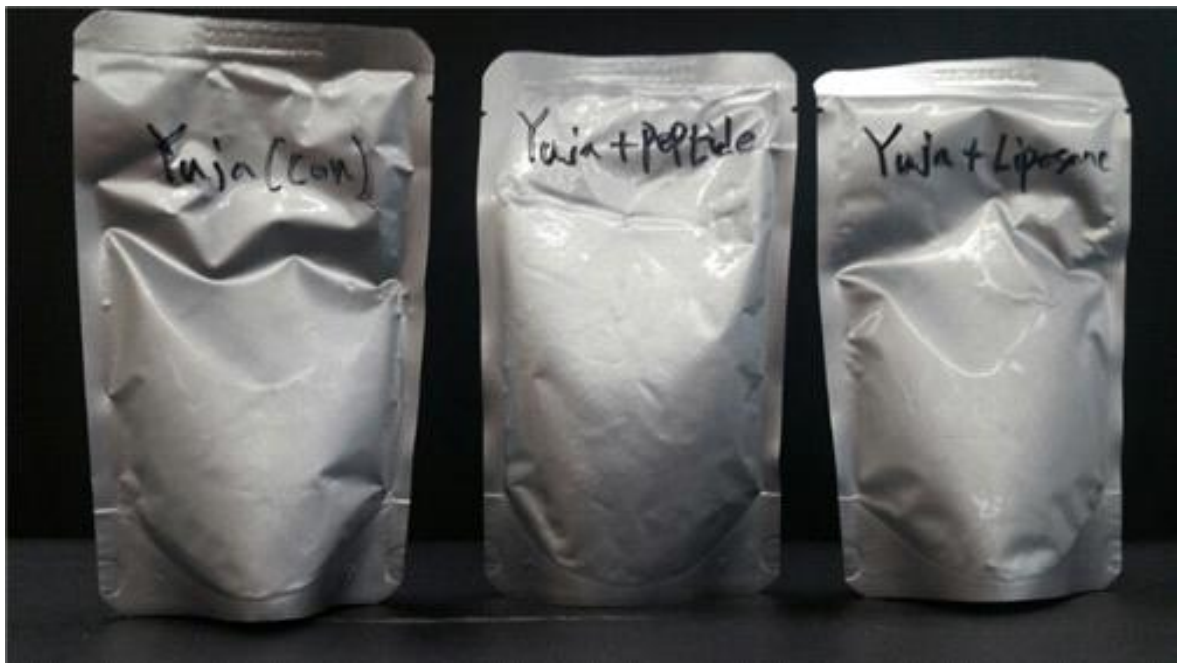


그림 13. 펩타이드 및 펩타이드 코팅 리포솜이 들어간 유자 음료 시제품

제 3절 유자 펩타이드, 유자 펩타이드 코팅 리포솜의 동결건조 수율 비교 조사

○ 다음 그림 14의 장비를 사용하여 펩타이드 및 리포솜이 첨가도니 유자음료의 대용량 동결 건조를 실시하였다.

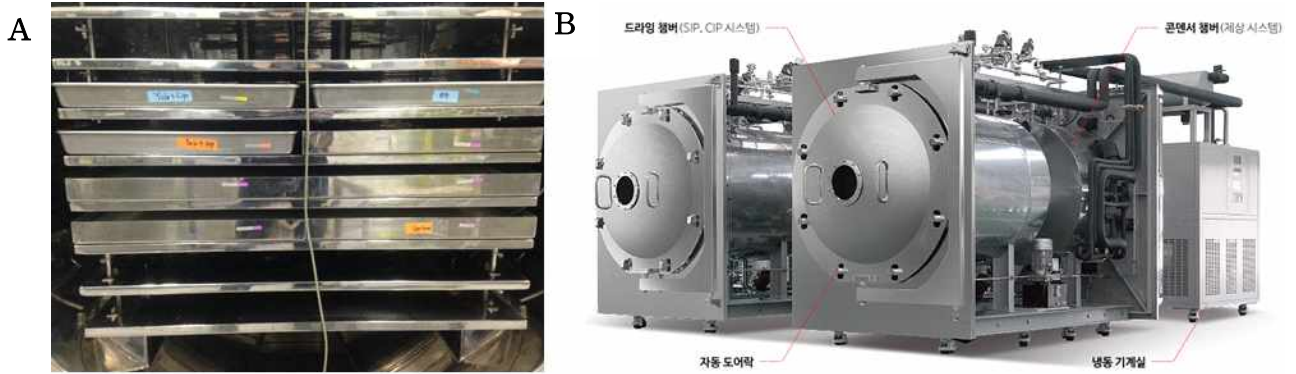


그림 14. 펩타이드 및 리포솜이 첨가된 유자음료의 대용량 동결건조;
(A)동결 건조 전, (B)동결건조기

○ 다음 그림 15는 동결건조 후 분쇄기로 분쇄하여 분말화한 사진이다.

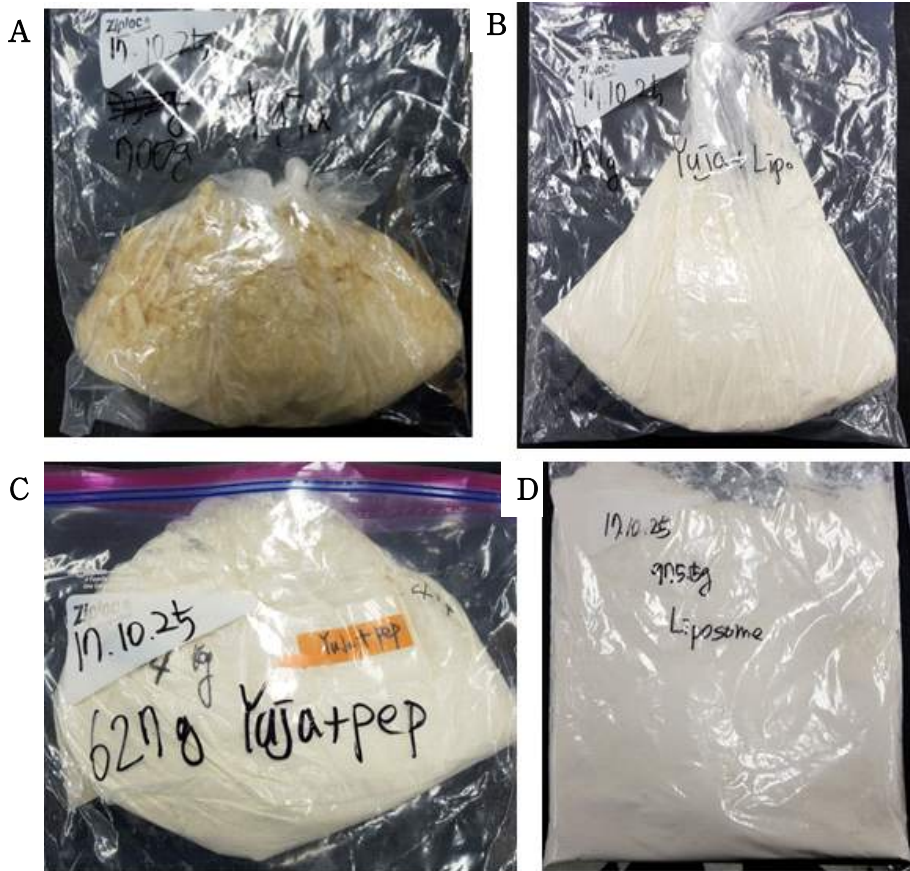


그림 15. 펩타이드 및 리포솜이 첨가된 유자음료의 분말;
(A)유자음료, (B)리포솜을 첨가한 유자음료, (C)펩타이드를 첨가한 유자음료, (D)리포솜

- 리포솜 코팅된 유자 펩타이드의 동결건조 후 수율이 유자 펩타이드와 함께 측정되었다. 표 3에서 보여지듯이, 유자 펩타이드는 67.95%를 나타내는 반면, 리포솜 코팅된 유자 펩타이드는 72.43%로 다소 증가함을 보였다.

표 3. 유자, 유자 펩타이드, 유자 펩타이드 코팅 리포솜의 동결건조 수율 비교

	유자	유자 펩타이드	유자 리포솜	리포솜	단위
용액 고형분 함량	0.33	0.28	0.28	0.06	%
용액량	7500	7500	7500	30000	ml
고형분함량	2475	2100	2100	1800	g
건조후 무게	1500	1427	1521	1775.5	g
수율	60.61	67.95	72.43	98.64	%

제 3장 강황 추출물 나노 에멀전 제조

제 1절 프로젝트 flow chart

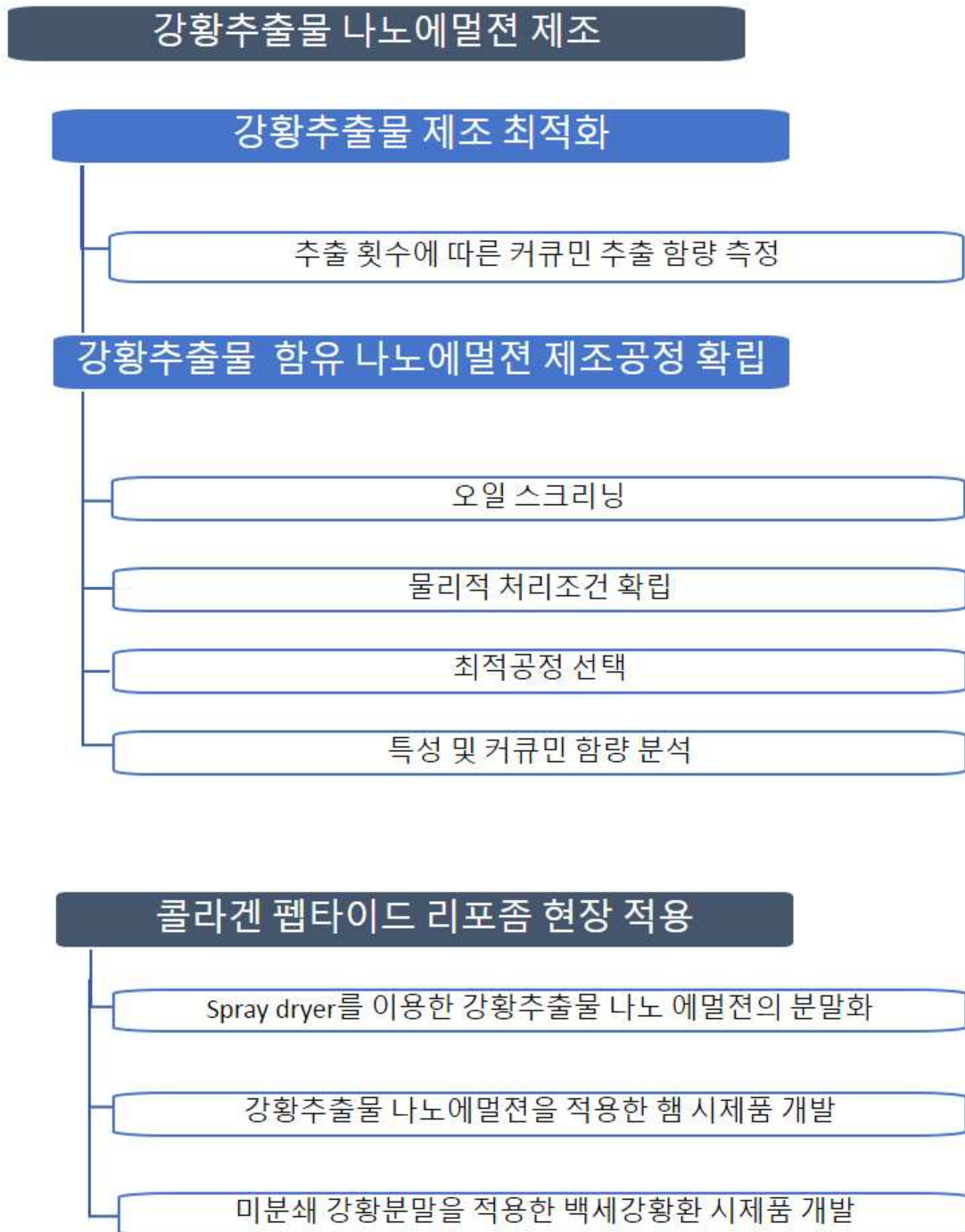


그림 16. 강황 추출물 나노 에멀전 flow chart

제 2절 강황추출물 제조 최적화

1) 제조 최적화

- 강황에 함유된 기능성 성분이 커큐민은 강황에 약 5% 정도 함유하고 있기 때문에 고농도의 커큐민을 추출하는 방법은 에탄올이나 헥산, DMSO(dimethyl sulfoxide) 등과 같은 유기용매를 사용하고 있는데, 식품으로 허가되기 위해서는 유기용매가 아닌 물 또는 에탄올만을 사용하여 추출하여야 한다.
- 커큐민은 물에 대한 용해도가 매우 낮기 때문에 에탄올의 농도별(30%, 50%, 70%, 및 95%)로 추출되는 효율을 비교하기 위해 물과 에탄올에 강황 분말을 1 mg/mL와 10 mg/mL의 농도로 침지하여 상온에서 24시간 동안 정치한 후 추출된 커큐민의 함량을 분석하여 최적의 용매를 선정하였다.
- 그림 17은 1 mg/mL의 농도와 10 mg/mL의 농도의 강황 분말을 증류수, 30%, 50%, 70%, 및 95%의 에탄올에서 추출한 시료의 사진으로 저농도와 고농도 모두의 조건에서 50% 에탄올과 70%에탄올에서 커큐민의 함량이 높게 추출되는 결과를 얻었다.
- 하지만, 그림 17에서 보듯이 1 mg/mL의 저농도 보다는 10 mg/mL의 고농도로 추출한 경우 50% 에탄올에서 더욱 뚜렷한 색깔의 변화를 보이고 있어 더 많은 양의 커큐민이 추출되었을 것으로 예측되었다.

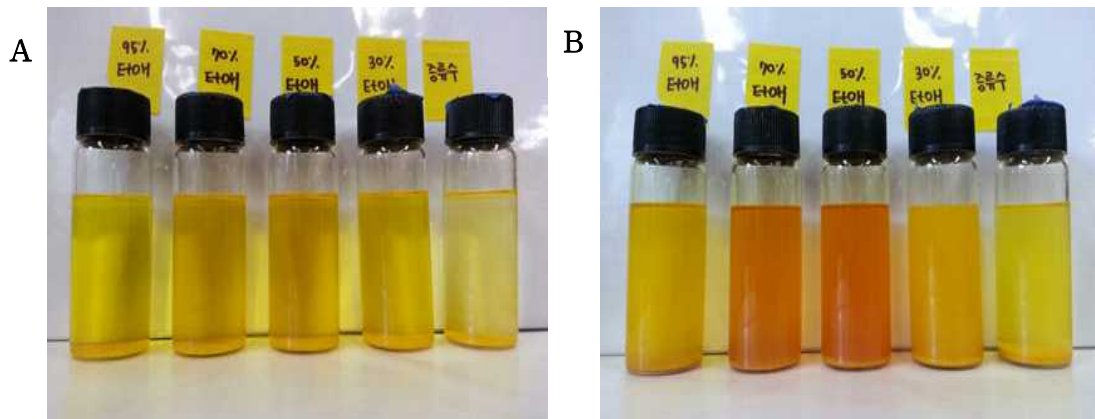


그림 17. 강황분말의 농도를 (A)1 mg/mL과 (B)10 mg/mL으로 사용한 추출 용매별 시료.

- 추출용매에 따른 커큐민의 함량을 분석하기 위해 커큐민 표준물질을 DMSO 용매에 5가지 농도 조건의 표준용액으로 제조하고, 제조된 표준용액을 UV 분광광도계를 이용하여 425 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다(그림 18a).
- 각 용매에서 추출한 강황 추출물을 UV 분광광도계로 흡광도를 측정한 후 표준곡선에 대입하여 커큐민 농도를 계산한 결과 그림 18b에 나타난 것과 같이 내었다. 예상했던 것과 같이 물(DW)에서는 9.16 $\mu\text{g/mL}$ 의 커큐민이 추출되어 용해도가 낮은 물로 추출하는 것은 효율적이지 않았다.
- 에탄올을 이용한 추출방법에서는 물 추출에 비해 크게 증가하는 경향을 보였는데, 30%에서 95%의 에탄올에서는 85.68~115.34 $\mu\text{g/mL}$ 사이의 커큐민이 추출됨을 알 수 있으며, 특히, 커큐민의 함량이 최대치를 보인 조건은 50%의 에탄올로 추출한 조건이었다. 50% 이상의 에탄올에서는 오히려 커큐민의 추출이 감소하였는데, 70%와 95% 에탄올을 사용한 경우 각각 110.21 $\mu\text{g/mL}$ 과 97.00 $\mu\text{g/mL}$ 로 감소되는 경향을 보였다.

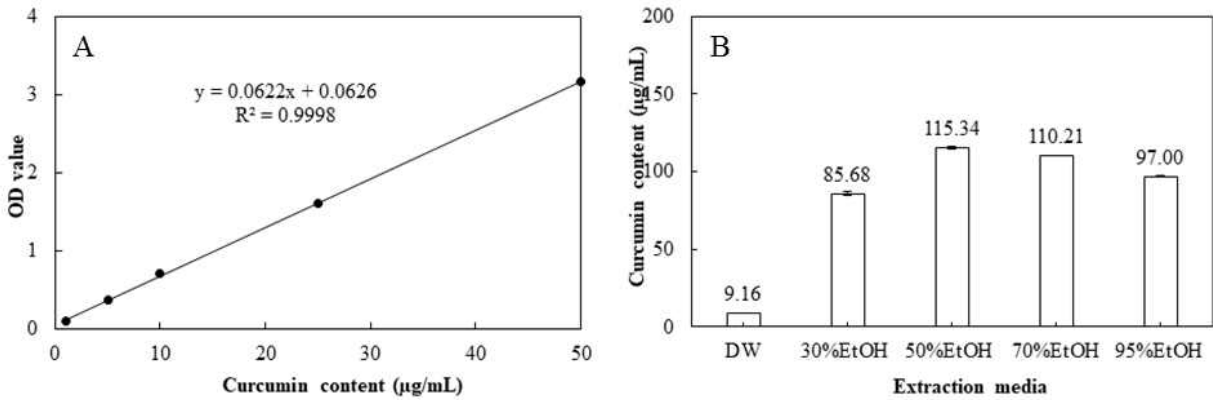


그림 18. 커큐민의 (A)표준곡선과 (B)추출용매에 따른 커큐민의 함량.

- 위의 결과를 토대로 50%와 70% 에탄올과 비교를 위한 대조군으로 물을 선정하였고, 추출시간은 12시간 단위로 최대 48시간까지 추출하면서 커큐민의 함량을 분석한 결과 그림 19에서 보는 것과 같이 50% 에탄올에서 가장 높은 흡광도를 보였고, 추출시간에서는 36시간에서 최대 함량을 보였다.

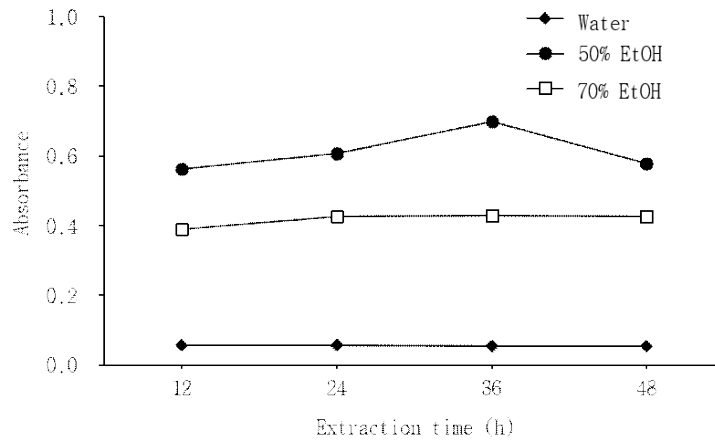


그림 19. 추출시간에 따른 물, 50% 에탄올, 및 70% 에탄올에서의 커큐민의 함량.

2) 추출 횟수에 따른 커큐민 추출 함량

- 최적의 추출용매로 선별된 50% 에탄올을 이용하고, 추출 횟수에 따른 상황에서 커큐민 추출조건을 최적화하기 위해 50% 에탄올로 24시간 씩 추출하는 공정을 총 3회 반복하여 추출하였다. 정확한 커큐민의 함량을 분석하기 위해 HPLC (Shimadzu D-20A HPLC, Kyoto, Japan)를 사용하였고, 분석조건으로 detector는 UV detector를 사용하였고, 검출 파장은 425 nm를 사용하였다. 칼럼은 ACE5 C18 column (4.6 × 250 mm, 5 mm; advanced chromatography Technologies, Aberdeen, UK), mobile phase는 acetonitrile과 2% acetic acid를 65:35의 비율로 혼합하여 사용하였고, flow rate는 1.0 mL/min, injection volume은 20 µL로 설정하였다.
- HPLC를 이용한 표준 커큐민을 가지고 표준곡선을 구하고, 추출물에 함유된 커큐민의 함량을 계산하는데 사용하였다. 그림 20는 전형적인 HPLC spectrum과 커큐민 표준용액에 의한 표준곡선이다.

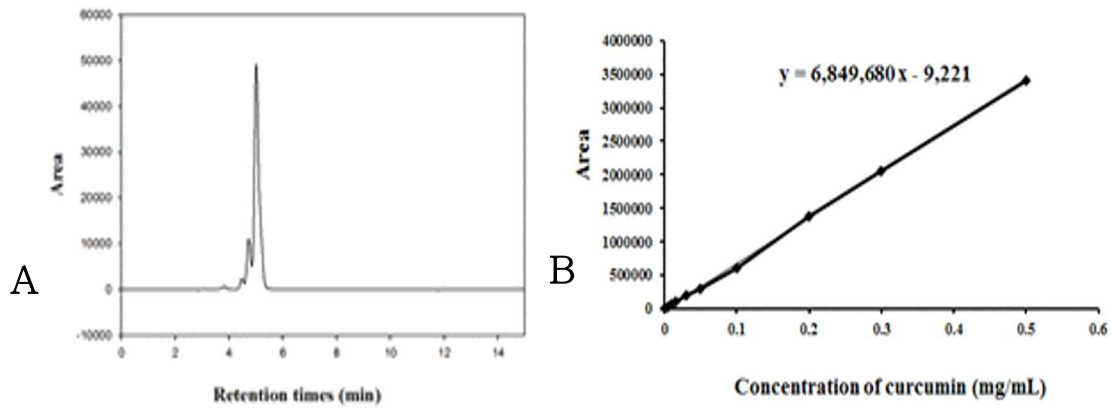


그림 20. (1)HPLC spectrum과 (2)커큐민의 표준곡선.

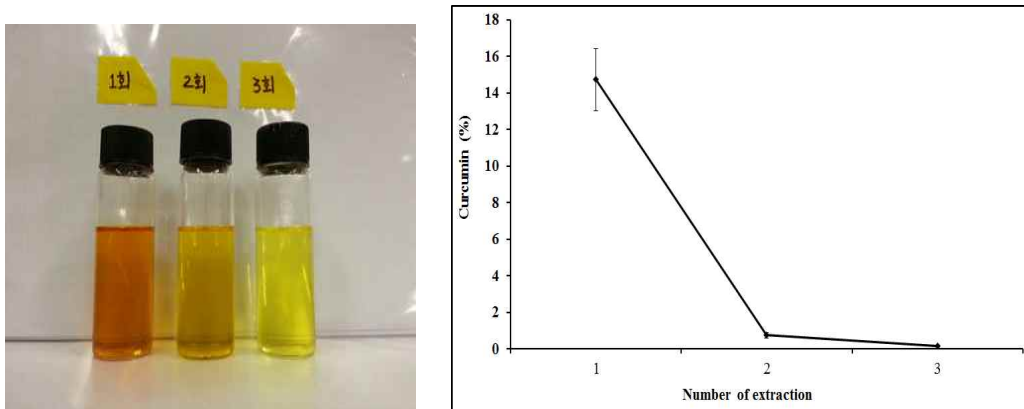


그림 21. 추출 횟수에 따른 강황추출물 사진과 커큐민의 함량.

- 10 mg/mL의 강황을 50% 에탄올에 추출하면서 추출횟수에 따른 추출되는 커큐민의 함량을 분석한 결과 그림 21에서 보는 것과 같이 1회에서는 진한 갈색을 보이며, 2회, 3회 반복하여 추출하였을 경우 색이 옅어지는 경향을 보였다. 또한 HPLC를 이용한 정량분석 결과에서도 1회 추출에서는 커큐민의 함량이 15%를 나타내지만 2회 추출에서는 1% 이하를 보이며 유의적인 차이를 보였다.

제 3절 강황추출물 함유 나노에멀전 제조공정 확립

1) 오일 스크리닝

- 강황추출물 함유 나노에멀전을 제조하기 위해 강황추출물에 함유된 기능성분인 커큐민을 가장 많이 용해시키는 오일을 선별하였다. 에멀전에서 oil phase의 역할은 기능성분의 캡슐화 효율(encapsulation efficiency)와 직접적인 영향이 있으며, 기능성 커큐민을 가장 많이 용해시키는 오일을 선정하는 것은 매우 중요하다.
- 식용 가능한 5가지의 오일(MCT oil, Canola oil, Corn oil, Sesame oil, Soybean oil)에 강황추출물 1mg/mL의 농도로 첨가하여 잘 혼합한 후 10,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상등액과 침전액을 분리하면, 상등액에는 오일 층에 용해된 커큐민이 함유되어 있으며, 침전액에는 용해되지 않은 성분들로 구성된다. 상등액의 흡광도를 측정하여 커큐민을 정량 하였다.

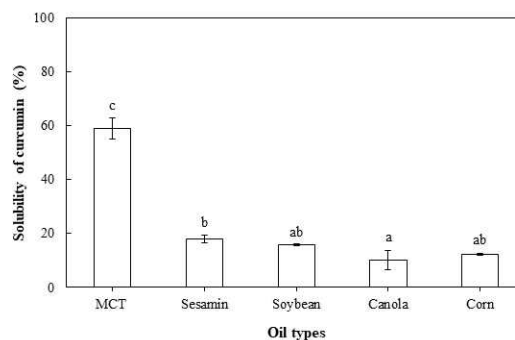


그림 22. 오일의 종류에 따른 커큐민의 용해도.

- 오일의 종류에 따른 커큐민의 추출 함량 결과는 그림 22에서 보이는 것처럼 MCT 오일에서 약 59.0%로 가장 높은 수치를 보였고, sesame 오일, soybean 오일, 및 corn 오일에서는 각각 17.9%, 15.7%, 및 12.3%의 커큐민이 용해되는 것을 알 수 있었다. 하지만 canola 오일의 경우 10.2%로 다른 오일들에 비해 현저하게 낮은 값을 보였다.
- 강황추출물에 있는 커큐민이 가장 많이 용해되는 MCT (medium chain triglyceride) 오일은 중쇄지방산인 C8~C12인 지방산들로 구성되어 있으며, 무색, 무취의 특성을 가지고 있어 다양한 식품에 적용되고 있다.

2) 강황추출물 나노에멀전 제조를 위한 물리적 처리 조건 확립

- 강황추출물 나노에멀전을 개발하기 위해 본 연구에서는 물에 잘 녹지 않는 강황추출물을 오일스크리닝을 통해 선정된 MCT 오일에 용해시키고, 물과 유화제의 함량을 조절하여 최적의 함량 비율을 확립하고자 하였다.
- 하지만, 에멀전의 입자크기가 나노입자 수준에서 안정한 상태를 지속하기 위해서는 물리적인 힘이 더해져야 하며, 일반적으로 혼합 및 균질화를 위해 magnetic stirring, high speed homogenization (HSH), ultrasonication (US), 및 high pressure homogenization (HPH) 등의 물리적인 방법이 사용되고 있다.
- 강황추출물 나노에멀전의 제조는 7.5% (w/w)의 강황추출물과 대두 레시틴을 MCT 오일에 넣어 oil phase를 제조하고, 증류수와 tween 80을 혼합하여 aqueous phase를 제조한 후 oil phase와 aqueous phase를 혼합하여 상온에서 magnetic stirring을 2시간 동안 처리하면서 균일하게 혼합시켰다.

- 혼합된 에멀전의 입자 크기를 줄이고, 안정성을 향상시키기 위해 high speed homogenization (HSH), ultrasonication (US), 및 high pressure homogenization (HPH) 처리를 수행하면서 각각의 입자크기 변화를 비교하였다.
- 그림 23은 강황추출물 에멀전의 제조에서 처리한 대조군과 HSH, US, 및 HPH 처리에 따른 시료의 사진으로 사진에서 보는 것처럼 HSH 처리 한 시료의 경우 색이 옅은 갈색을 보이고, 상층에 크림링(creaming)이 형성되는 것을 볼 수 있다. 이는 균질과정에서 형성된 크림층이 남아 있기 때문이다.
- US와 HPH 처리된 시료의 경우 색이 더 진한 갈색을 보이고 있으며, 크림층이 형성도 관찰되지 않고 균일한 용액을 얻을 수 있어 HSH 처리에 비해 더 균일한 에멀전을 형성한 것으로 보인다.
- 입자의 크기는 HSH 처리된 시료의 경우 약 500 nm 수준의 입자가 형성되지만 US처리와 HPH 처리를 한 시료의 경우에는 100 nm 이하의 평균 입자크기를 보이고 있고, PDI 값도 HSH 처리에 비해 낮은 값을 보이고 있어. US 처리와 HPH 처리 시 균일하고, 안정한 나노에멀전이 형성 되었다고 판단된다(그림 24A).
- 제타전위의 경우 HSH 처리된 시료는 층 분리와 함께 에멀전의 상태가 불안정해 정확한 제타전위의 측정이 어려웠으며, US 처리와 HPH 처리한 시료의 제타전위는 그림 24B에서 보는 것과 같이 각각 -24.93 mV와 -32.29 mV를 나타내었다.

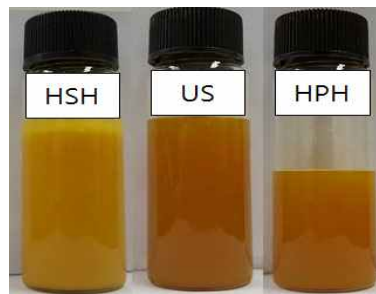


그림 23. HSP, US, 및 HPH 처리된 강황추출물 나노에멀전 사진.

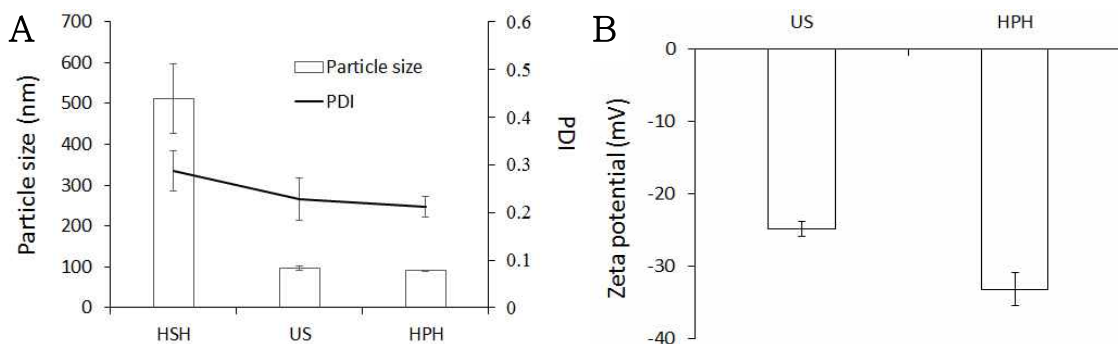


그림 24. 물리적인 처리에 의한 강황추출물 나노에멀전의 (A)입자크기, PDI 및 (B)제타전위.

- 나노에멀전을 제조하기 위해서는 물의 함량이 80% 이상이 필요하고, 오일과 유화제의 비율을 1: 0.5, 1: 1.0, 1: 1.5, 및 1: 2.0으로 달리하면서 에멀전의 입자크기 및 제타전위의 변화를 측정하였다(표 4).

표 4. 오일 : 유화제의 비율에 따른 강황추출물 나노에멀전 제조 비율

오일: 유화제	오일(%)	유화제(%)	물 (%)
1: 0.5	13.34	6.66	80
1: 1.0	10.00	10.00	80
1: 1.5	8.00	12.00	80
1: 2.0	6.66	13.34	80

- 그림 25는 oil과 surfactant 비율에 따라 제조한 강황추출물 나노에멀전의 사진을 나타낸 것으로 육안으로 관찰 시 오일과 유화제의 비율이 1 : 0.5인 경우에는 노랑색을 띄고 있지만 유화제의 비율이 점차 증가할수록 나노에멀전의 색이 짙은 갈색으로 변화하는 것을 알 수 있었다. 이는 앞의 유화제를 첨가할수록 커큐민이 많이 추출된다는 결과에서와 같이 나노에멀전 제조 시에도 고농도의 커큐민이 용해되기 때문일 것으로 사료된다.
- 유화제의 비율이 증가함에 따라 입자크기, PDI 및 제타전위는 그림 26에 나타내었다. 강황추출물 나노에멀전의 입자크기는 오일: 유화제의 비율이 1: 0.5에서는 약 250 nm였고, 제타전위는 약 -30 mV를 나타내었다.
- 오일: 유화제의 비율이 1: 1인 조건에서는 강황추출물 나노에멀전의 입자크기는 156.4 nm로 가장 작은 입자를 나타냈고, 제타전위는 -32 mV를 보이며 다소 증가하는 경향을 보였다. 하지만 유화제의 비율이 더 증가함에 따라서는 나노에멀전의 입자크기가 400 nm까지 유의적인 증가를 보였고, 제타전위는 약 -40 mV까지 증가하였다(그림 26).
- 강황추출물 나노에멀전의 입자크기가 가장 적고, 제타전위도 안정한 상태를 보이는 조건인 오일: 유화제의 비율이 1: 1인 조건을 선택하여 오일과 유화제의 비율을 고정한 후 다음 실험을 진행하였다.

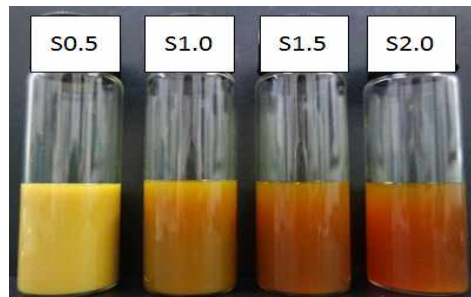


그림 25. 유화제의 비율에 따른 강황추출물 나노에멀전 시료 사진.

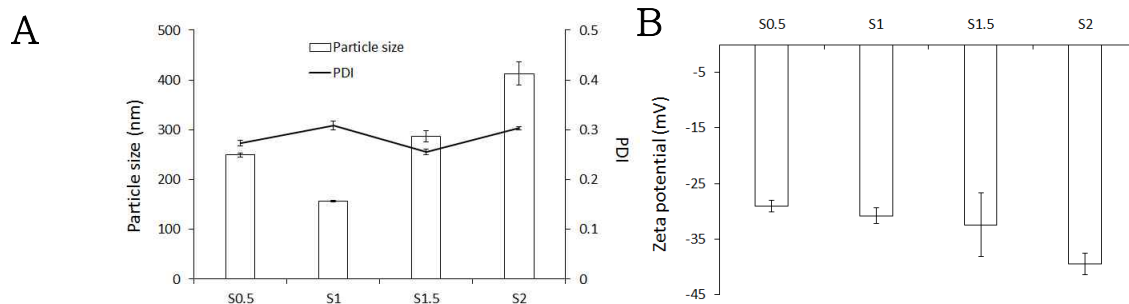


그림 26. 유화제의 비율에 따른 강황추출물 나노에멀전의 (A)입자크기, PDI 및 (B)제타전위.

- 오일:유화제의 비율을 1: 1로 고정시킨 후 유화제로는 레시틴과 tween 80을 혼합하여 사용하였고, 물의 함량을 낮추기 위해 85%에서 60%까지 낮추어 가며 나노에멀전을 제조하였다(표 5).
- 물의 비율 변화에 따른 강황추출물 나노에멀전의 입자크기는 그림 27에서 보는 것과 같이 유의적인 차이를 보이며, 물의 함량이 줄어들수록 입자의 크기는 증가하는 경향을 보였다. 물의 비율이 85%인 경우(Sample W1) 입자크기는 약 89.6 nm를 나타내며, 제타전위는 -33.59 mV로 가장 안정한 값을 보였다. 하지만 물의 비율이 60%인 Sample W5의 경우에는 입자의 크기가 1049.8 nm로 마이크로 크기의 입자크기를 보였고, 제타전위도 크게 감소하면서 약 -23 mV를 나타내었다.

표 5. 오일 : 유화제의 비율에 따른 강황추출물 나노에멀전 제조 비율

Sample	오일	레시틴	Tween 80	물 (%)
W1	7.5	4.13	3.38	85
W2	10.0	5.55	4.50	80
W3	12.5	6.88	5.63	75
W4	15.0	8.25	6.75	70
W5	20.0	11.00	9.00	60

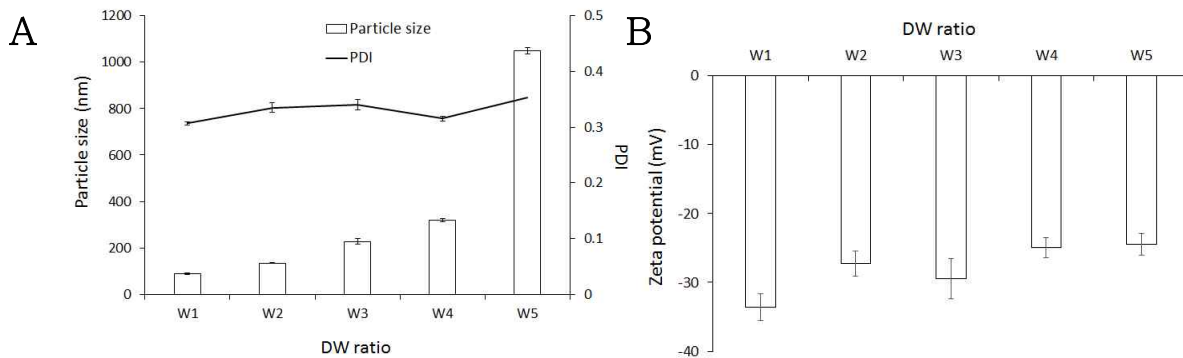


그림 27. 물의 함량 변화에 따른 강황추출물 나노에멀전의 (A)입자크기, PDI 및 (B)제타전위.

- HLB (hydrophilic-lipophilic balance)란 친수성과 소수성의 비율을 나타내는 것으로 전체의 중량에서 친수성이 차지하는 중량에 20을 곱하여 계산된다(eq. 1).

$$HLB = \frac{M_h \times 20}{M} \quad (\text{eq. 1})$$

- 강황추출물 나노에멀전의 안정성을 향상시키기 위해 non-ionic 유화제인 tween 80 (HLB 4.0) 이외에 anionic 유화제인 레시틴(HLB 15.0)을 혼합하였다. 유화제의 비율에 따라 HLB 값이 달라지며, 이렇게 HLB 값에 따른 나노에멀전의 특성을 조사하였다.

- 일반적으로 O/W emulsion의 HLB value 범위는 약 8~18으로 알려져 있어 중간 값인 10~14 범위 내에서 에멀전을 제조하였고, 식품회사에서는 상용화된 제품으로 개발하기 위해서는 실제 식품회사에서 더 많이 사용되고 있는 레시틴의 함량을 높이려고 하였으나 일정량 이상에서는 심각한 층 분리와 함께 불안정한 에멀전이 형성되어 최적의 함량을 구하였다.
- 표 6은 HLB value에 따른 강황추출물 나노에멀전을 제조 조건으로 이전의 실험 결과를 바탕으로 오일과 유화제를 1: 1의 비율로 고정하고, 레시틴과 tween 80의 조성을 변경하여 HLB 값이 10.2, 10.6, 11.0, 11.8, 12.6, 및 13.8로 맞추었다. 물의 함량은 실험의 경향성을 보기 위해서 85%(W1)와 80%(W2) 두 가지 조성을 각각 살펴보았다.

표 6. HLB 값에 따른 강황추출물 나노에멀전 제조 조성 비율

HLB	Sample NO	오일 (%)	레시틴 (%)	Tween 80 (%)	물 (%)
H10.2	W1	7.5	4.50	3.00	85
H10.6			4.13	3.38	
H11.0			3.75	3.75	
H11.8			3.00	4.50	
H12.6			2.25	5.25	
H13.8			1.13	6.38	
H10.2	W2	10.0	4.50	3.00	80
H10.6			4.13	3.38	
H11.0			3.75	3.75	
H11.8			3.00	4.50	
H12.6			2.25	5.25	
H13.8			1.13	6.38	

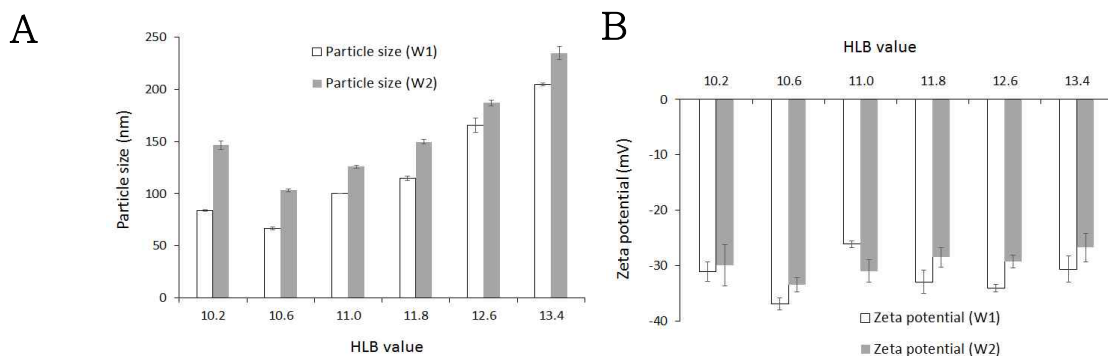


그림 28. HLB 값에 따른 강황추출물 나노에멀전의 (A)입자크기 및 (B)제타전위.

- 그림 28에서 보는 것과 같이 HLB 값에 따른 강황추출물 나노에멀전의 입자크기는 약 66.6 nm~234.6 nm 사이를 나타내며, W1과 W2 조건 모두에서 HLB 값에 따른 입자크기의 변화는 똑같은 경향성을 보이고 있다. 즉, HLB 값이 10.6에서 가장 작은 입자크기가 만들어졌고, HLB 값이 증가함에 따라 입자크기도 점점 증가하는 경향을 보였다.

- 제타전위의 경우, HLB 값에 따른 경향성은 확인할 수 없었지만 HLB 값이 10.6인 조건에서 약 -36 mV로 매우 안정한 강황추출물 나노에멀전을 형성함을 알 수 있었다.

3) 강황추출물 나노에멀전 최적공정 확립

- 강황추출물 나노에멀전을 제조하기 위한 최적공정은 다음과 같다. 우선 커큐민의 용해도가 가장 높았던 MCT 오일 7.5g에 강황추출물을 오일과 같은 양으로 혼합하고, 친유성 유화제인 레시틴을 4.13g 넣고, 잘 혼합하여 오일상(oil phase)을 제조하였다. 물 85 mL에 친수성 유화제인 tween 80을 3.38g 넣고, 혼합하여 수상(aqueous phase)을 제조한 후 오일상과 수상을 서로 혼합하였다.
- 오일상과 수상의 혼합용액을 magnetic stirring으로 30분간 처리하여 1차적으로 혼합시키고, 다음으로 high speed homogenization (HSH)를 5,000 rpm에서 10분간 처리하며, 이어서 probe type의 ultrasonication을 40%의 진폭(amplitude)으로 15분간 균질화 하였다.
- 강황추출물 나노에멀전 제조 단계별 공정은 그림 29, 30에 사진으로 나타내었다.

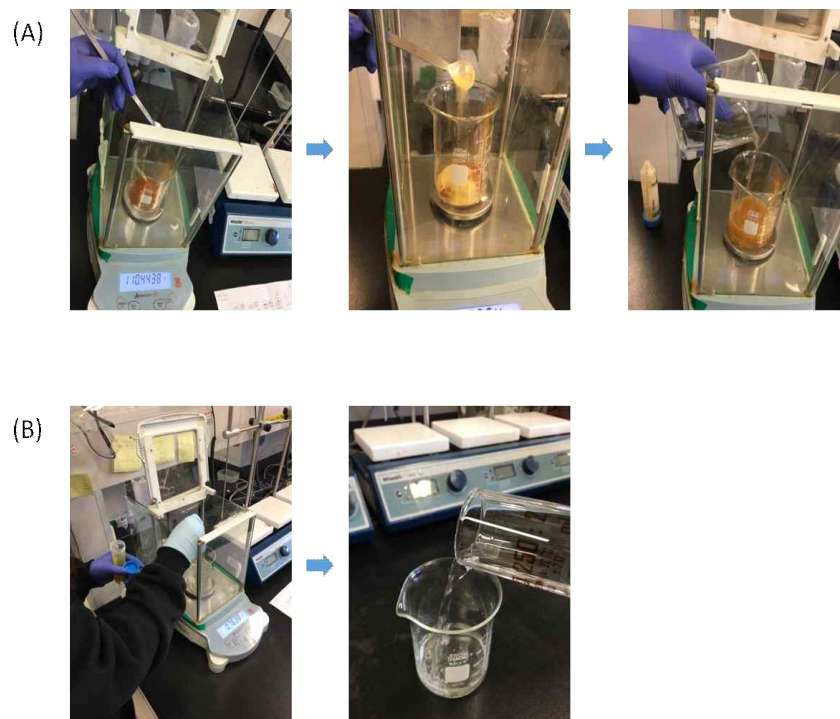


그림 29. (A)오일상(oil phase)과 (B)수상(aqueous phase)의 제조 공정.

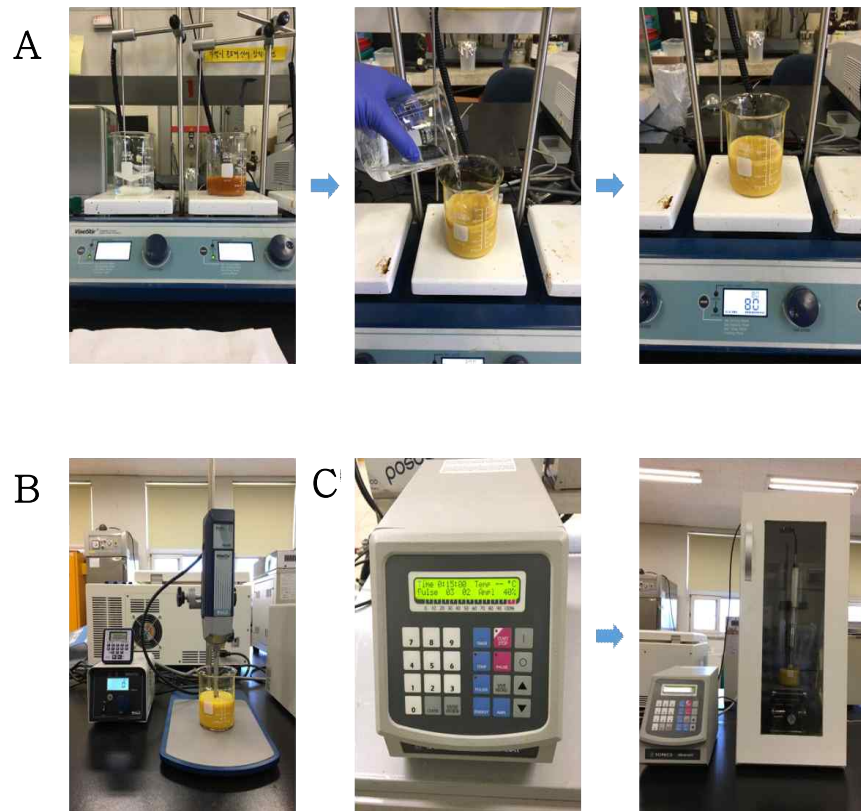


그림 30. 나노에멀전 제조를 위한 (A)magnetic stirring, (B)HSH 및 (C)US 처리.

4) 강황추출물 나노에멀전의 특성 및 커큐민 함량 분석

- 강황추출물 나노에멀전의 형태적인 특성을 분석하기 위해 샘플 1 μL 를 carbon coating mesh grid에 loading 하고, 약 2분간 고정한 후 남은 수분을 왓트만페이퍼를 이용하여 흡수하고, 샘플 로딩과 수분흡수 공정을 3회 반복한다. 다음은 2% phosphotungstic acid로 염색하여 상온에서 12시간 건조시켜서 TEM grid에 샘플 코팅을 완료한 후 TEM 분석장비를 이용하여 강황추출물 나노에멀전의 입자 크기와 형태를 분석하였다.
- 그림 31에서 보듯이 강황추출물 나노에멀전의 one droplet의 TEM image 구형 또는 타원형으로 되어 있고, 입자의 크기는 나노입도분석기로 측정된 입자크기의 결과 값과 비슷한 범위의 크기인 100 nm 정도의 크기를 보여주고 있다.

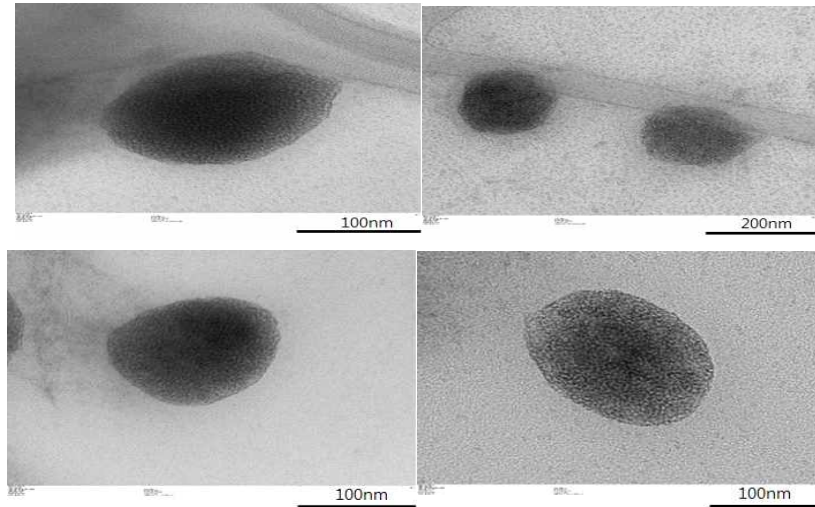


그림 31. 강황추출물 나노에멀전의 TEM images.

- 강황추출물 나노에멀전 제조 시 강황추출물의 함량을 100~500% (w/w 오일)로 하여 제조한 나노에멀전에 함유된 커큐민의 함량을 분석하기 위해 순도 99%의 커큐민 표준용액을 US spectrophotometer를 이용하여 425 nm에서 농도별로 측정하여 표준곡선을 작성하고, 표준식에 시료의 흡광도를 측정하여 커큐민의 함량을 계산하였다.
- 측정방법은 시료 1 mL을 9 mL의 methanol에 희석한 후 흡광도를 측정하였다. 강황추출물의 함량이 증가함에 따라 커큐민의 함량도 증가하는데, 100% 강황추출물을 첨가한 시료에서는 32.6 $\mu\text{g/mL}$ 의 커큐민이 분석되었고, 500%의 강황추출물을 첨가한 시료에서는 765.2 $\mu\text{g/mL}$ 의 커큐민이 함유되어 있었다. 이는 강황추출물의 함량이 증가함에 따라 커큐민의 함량도 증가하는 경향을 보였으나 정확하게 비례하지는 않았다(표 7).

표 7. 강황추출물 함량에 따른 나노에멀전에 함유된 커큐민의 함량

강황추출물 함량 (%, w/w 오일)	커큐민 함량 ($\mu\text{g/mL}$)
100	32.55
200	144.55
300	347.64
400	560.85
500	765.25

제 4장 강황 추출물 나노 에멀전의 현장 적용

제 1절 Spray dryer를 이용한 강황추출물 나노에멀전의 분말화

- 강황추출물 나노에멀전의 분말화를 위해 제조된 액상의 나노에멀전을 분무건조기(KL-8, Seogang Engineering Co., Ltd., Cheonan, Korea)로 건조하였다. 분무건조 시 입자들 간의 접도를 낮추어 응집을 방지하기 위해 덱스트린(dextrin)을 강황추출물 나노에멀전의 총 고형분량과 같은 양으로 첨가하였다. 분무건조기의 주입 온도는 180℃, 방출 온도는 100℃로 설정하였고, 시료의 공급 속도는 시간당 1 L/hr의 속도로 하였다. 분무건조에 의해 건조된 강황추출물 나노에멀전 분말(TE-NEP)은 -20℃ 이하의 냉동실에 보관하여 다음 실험을 진행하였다. 분무건조기를 이용한 분말화 과정 및 제조된 TE-NEP는 그림 32에 나타내었다.

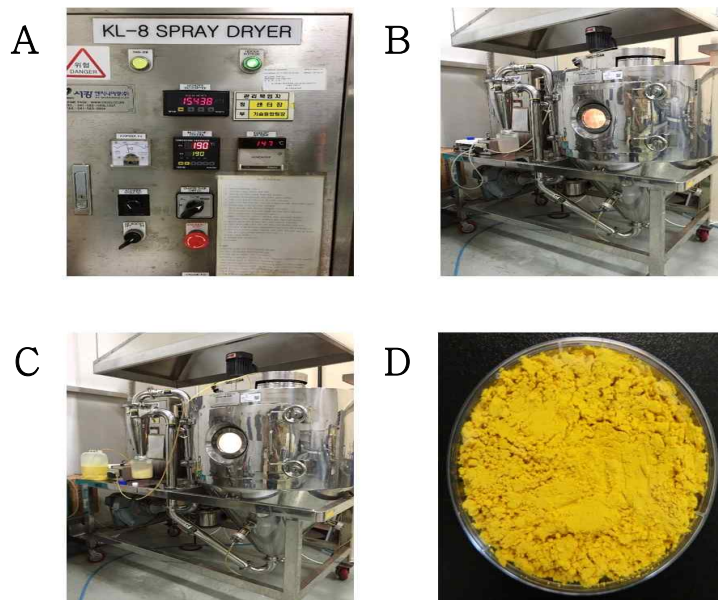


그림 32. 강황추출물 나노에멀전의 분말화 과정 및 제조된 TE-NEP.

제 2절 강황추출물 나노에멀전을 적용한 햄 시제품 개발

- 햄 제조 과정은 그림 33에서 보여 지는 것과 같이 6단계의 공정에서 제조하였다. 1)원료준비 공정에서는 원료의 검수 및 분말 원료를 계량한다. 2) 분쇄 공정에서는 민스기를 이용하여 돼지고기를 4~5 mm 크기로 분쇄한다. 3) 혼합 공정에서는 pilot vacuum mixer 기기를 이용하여 진공상태와 저온(-20℃)을 유지하면서 분쇄된 고기를 분말원료와 혼합한다. 4)숙성 공정에서는 4℃이하에서 18~28시간 정도로 장시간 숙성을 통해 혼합된 원료를 안정화시킨다. 5) 충전 공정에서는 캔에 충전한 후 진공상태에서 용기속의 잔존산소를 모두 제거한 뒤 시밍(seaming) 작업한다. 6)살균 공정(121℃ for 22분)에서는 스팀온도와 압력을 가해 캔 내용물을 살균한다.
- 강황추출물 나노에멀전을 적용한 햄 배합비는 표 8에 보는 것과 같이 주된 성분인 정제염, 시즈닝, 향신료분말, 백설탕, 비타민 C, 카라기난은 동일한 비율로 첨가하고, 대조군으로 커큐미노이드를 첨가하고, 강황, 강황추출물 분말, 강황추출물 나노에멀전 분말을 각각 실험군 1, 실험군 2, 및 실험군 3으로 하여 제조하였다.



그림 33. 햄 제조 공정과 제조된 햄.

표 8. 강황추출물 나노에멀전 적용 햄 배합비

	원재료명	Blank	대조군	실험군 1	실험군 2	실험군 3
1	정제염	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5
	시즈님	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
2	향신료분말	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
	커큐미노이드		3.0			
	강황분말			3.0		
	강황추출물 분말				3.0	
	강황추출물 나노에멀전 분말					3.0
3	백설탕	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0
	비타민 C	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
4	카라기난	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	정제수	41.5	38.5	38.5	38.5	38.5
	총합	80	80	80	80	80

○ 표 8의 배합비에 따라 제조된 햄의 사진을 그림 34에 나타내었다. blank는 기존의 제품이고, 대조군은 커큐미노이드, 실험군 1은 강황분말, 실험군 2는 강황추출물 분말, 및 실험군 3은 강황추출물 나노에멀전 분말을 같은 비율로 첨가한 것이다. 그림에서 보듯이 blank에 비해 커큐미노이드를 첨가한 대조군의 경우 매우 진한 노란색을 보이고 있으며, 커큐미노이드와 같은 비율의 강황분말과 강황추출물 분말의 경우에도 색상이 다소 옅어졌지만 노란색을 나타내고 있다. 하지만 강황추출물 나노에멀전 분말을 첨가한 실험군 3의 경우 blank와 비슷한 색상을 보였다.

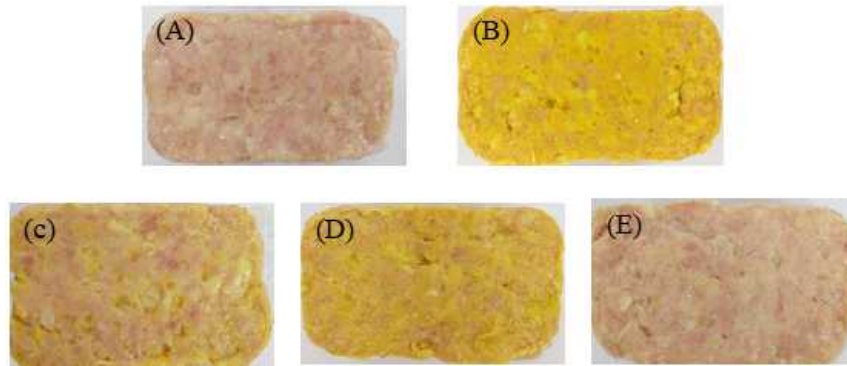


그림 34. 배합비에 따라 제조된 햄의 사진.
(A)Blank, (B)대조군, (C)실험군 1, (D)실험군 2, 및 (E)실험군

- 참여기업인 (주)오뚜기의 중앙연구소 연구소원 15명을 대상으로 하여 관능검사를 수행하였다. 관능검사 방법은 10점 평정법을 사용하여 점수가 높을수록 특성이 강해지고, 기호도가 좋아지는 결과를 나타내는 것이며, ANOVA를 이용한 통계처리에 의해 유의차 검증을 수행하였다.
- Blank, 대조군, 실험군 1, 실험군 2 및 실험군 3 시료에 대한 조리하지 않은 경우와 조리한 후로 나누어 관능평가를 수행하였고. 관능평가 결과 조리하지 않은 경우 노란색이 강할수록 기호도가 낮았으며, 이미, 이취의 강도는 강황분말 보다 강황추출물 분말이 유된 실험군 2에서 더 낮은 점수를 받았다(표 9).
- 전체적인 맛에 대한 결과에서는 강황추출물 나노에멀전 분말을 첨가한 실험군 3의 경우 blank와 유사한 점수를 받았으나 실험군 2과 실험군 2의 경우 특유의 흠냄새와 같은 향미가 느껴지면서 관능평가에서 낮은 점수를 받은 것으로 분석되었다.
- 조리한 제품의 경우에는 관능적인 차이는 다소 줄어들었는데, 이는 굽는 과정에서 색상의 변화가 생겼기 때문이며, 이미, 이취의 경우에도 굽는 과정에서 많이 줄어들었기 때문으로 분석되었다.
- 표 10은 햄의 색도를 나타낸 것으로 blank와 비교하여 실험군 1과 실험군 2에서는 a 값(redness)은 크게 감소하였고, b 값(yellowness)은 크게 증가하였으나 강황추출물 나노에멀전 분말을 첨가한 실험군 3의 경우 blank와 가장 유사한 결과를 보였다.

표 9. 햄의 관능평가 결과

Sample	조리 전			조리 후		
	색상의 기호도	이미/이취 강도	복합미	색상의 기호도	이미/이취 강도	복합미
Blank	7.93	0.00	7.64	7.86	0.00	7.21
실험군 1	7.20	0.47	6.86	7.00	0.21	7.00
실험군 2	6.87	0.00	7.29	7.71	0.00	7.07
실험군 3	7.80	0.00	7.43	7.43	0.00	7.43

표 10. 햅의 색도 분석

Sample	L	a	b	ΔE
Blank	58.62±0.01	9.42±0.01	9.63±0.02	
실험군 1	58.76±0.01	4.87±0.02	24.13±0.05	15.20
실험군 2	57.18±0.01	5.10±0.03	29.17±0.03	20.06
실험군 3	60.33±0.01	8.13±0.01	11.88±0.02	3.11

제 3절 미분쇄 강황분말을 적용한 백세강황환 시제품 개발

- 강황분말을 미분쇄하여 이를 이용하여 백세강황환을 생산하여 기존의 강황분말로 제조한 것과 비교하고자 하였다.
- 백세강황환의 제조공정도는 그림 35에 나타내었다. 1)원료준비 공정에서는 원료 검수 및 계량한다. 2)원료분쇄 공정에서는 발아현미분말, 순카레, 카레분을 분쇄한 후 체로 거른다. 3)참쌀풀 준비 공정에서는 참쌀분을 배합수 1에 잘 풀고, 배합수 2를 끓여준 후 잘 풀어준 참쌀분을 넣고, 호화가 되어 점성이 생길때까지 저어준다. 4)원료혼합 공정에서는 분말원료부터 혼합한 후 참쌀풀과 아카시아꽃을 투입하여 최종 혼합한다. 5)제환 공정에서는 혼합한 반죽을 제환기 투입구에 넣은 후 이를 회전하는 롤러 사이에 통가시켜 원하는 크기의 구형으로 환을 만든다. 6)정환 및 건조 공정에서는 당의기에 환을 넣고 회전시키면서 원형에 가까운 모양으로 다듬고, 환을 열풍건조기에 넣고 온도와 시간을 설정한 후 건조한다. 7)선별 공정에서는 원하는 크기와 모양의 환만을 선별한다. 8)건조 공정에서는 60℃에서 15시간동안 열풍 건조 한다. 9)충전 공정에서는 규격에 맞게 병에 포장한다. 10)검사 공정에서는 수분과 커큐민 함량을 분석하고, 봉해도는 제1액에서 60분 내에 녹지 않고, 잔류물이 남아있을 경우, 제2액에서 60분 동안 봉해 실험을 실시한다.
- 미분쇄한 강황분말로 제조한 백세강황환의 사진은 그림 36에 나타내었다. 일반 강황분말과 미분쇄한 강황분말을 이용하여 제조된 백세강황환의 차이를 비교하기 위해 색도 및 관능평가를 수행하였다. 미분쇄한 강황분말은 일반 강황분말과 비교하여 a 값은 다소 낮았고, b 값이 유의적으로 증가하며 더욱 진한 노란색을 띠었다. 하지만 강황환으로 제조한 이후에는 색도의 차이는 거의 없었다.
- 관능평가에서는 일반 강황분말을 첨가한 제품과 비교하여 색상 및 강황 향에 대한 기호도가 다소 높은 평가가 되었으나 그 외에는 유의적인 차이는 없었다.

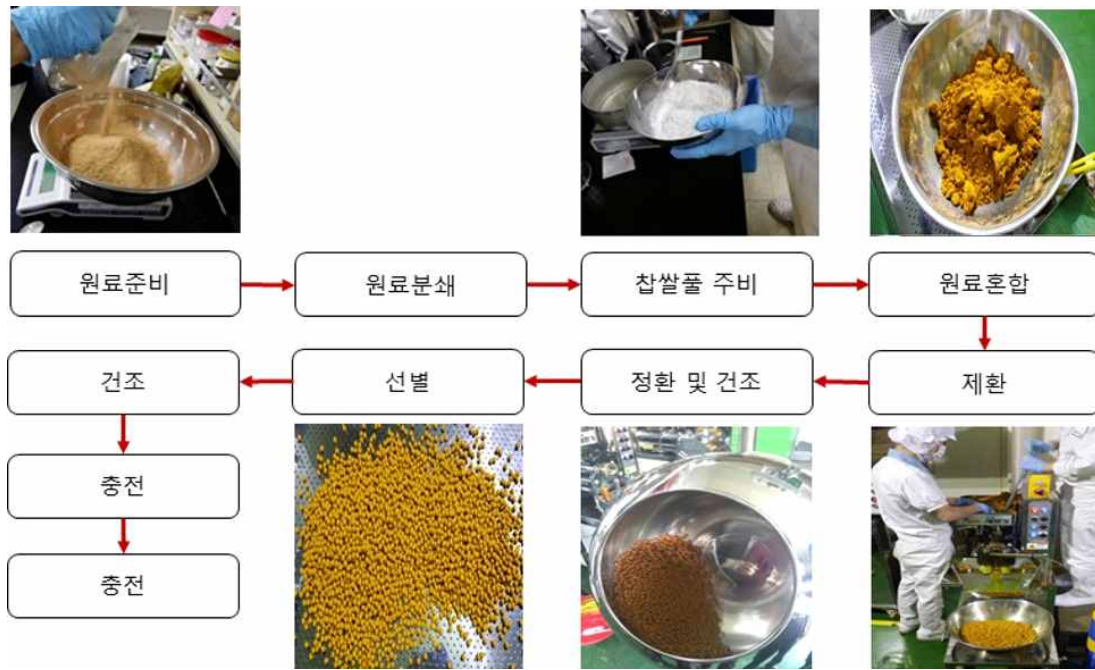


그림 35. 백세강황환 제조 공정.



그림 36. 미분쇄 강황분말로 제조한 백세강황환 시제품.

8. 뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.