

발간등록번호

11-1541000-001081-01

보안과제( ), 일반과제(√) 109124-2

Xanthophyll 함유 식물 소재로부터  
황반변성 억제 기능성 식품 개발

(Development of functional food suppressing macular degeneration from plant resources containing xanthophyll)

Xanthophyll 분석과 생이용성 및 전임상 연구  
(Analysis of xanthophyll and bioavailability study)

Xanthophyll 원료 선정 및 제품화  
(Selection of xanthophyll source and industrialization)

시료 전처리 기술개발 및 생이용성 증대 기술 개발  
(Development of pretreatment technology and stability test )

한국과학기술연구원

농림수산식품부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Xanthophyll 함유 식물 소재로부터 황반변성 억제 기능성 식품 개발” 과제(세부과제 “Xanthophyll 분석과 생이용성 및 전임상 연구”, “Xanthophyll 원료 선정 및 제품화”, “시료 전처리 기술개발 및 생이용성 증대 기술 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2011 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원

주관연구책임자 : 관 철 호

세부연구책임자 : 관 철 호

연 구 원 : 정 상 훈

연 구 원 : 차 광 현

연 구 원 : 구 송 이

연 구 원 : 송 대 근

협동연구기관명 : 중앙대학교

협동연구책임자 : 이 동 언

협동연구기관명 : 대상(주)

협동연구책임자 : 하 월 규

# 요 약 문

## I. 제 목

Xanthophyll 함유 식물 소재로부터 황반변성 억제 기능성 식품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근, 전 세계적으로 증가하고 있는 고령 인구의 증가와 함께 환경오염으로 인한 오존층 파괴, 업무환경 변화에 따른 잦은 전자기기의 사용은 눈에 대한 스트레스로 이어져 안질환 예방에 대한 수요로 이어지고 있다. 대표적 안질환인 백내장과 노인성 황반변성의 공통된 발병요인은 눈 속에 존재하는 제아잔틴과 루테인이라고 하는 xanthophyll의 감소 때문인 것으로 밝혀졌다. 황반 내에 존재하는 xanthophyll의 함량은 나이가 들어감에 따라 저절로 줄어들기 때문에 식품을 통한 꾸준한 섭취가 요구되고 최근 이러한 필요성에 따라 건강기능식품으로서 루테인 시장이 크게 성장하고 있다. 국내에서는 2007년 금잔화 유래의 루테인 소재가 황반밀도를 증가시킬 수 있는 눈 기능성을 승인받아 개별인정형 기능성 원료로 인정받고 현재 많은 업체에서 루테인 소재를 사용한 눈 건강기능식품을 판매하고 있지만 제품 원료의 90% 이상을 해외에서 수입하고 있어 국내 기술 및 소재를 이용한 눈 건강기능식품 개발이 시급한 실정이다.

국내의 클로렐라 관련 기술은 대상(주) 업체를 중심으로 큰 성장을 이루어왔다. 클로렐라에는 최근 루테인이 매우 다량으로 함유되어 있음이 밝혀져 클로렐라를 이용한 루테인 소재 개발 연구가 부각되고 있다. 그러나 클로렐라는 두꺼운 세포벽으로 인하여 소화율이 현저히 떨어지는 문제가 있어 클로렐라 내의 루테인 소재의 생이용성은 매우 떨어질 것으로 여겨진다. 또한 카로티노이드는 지용성이기 때문에 세포막 내에 비교적 단단히 결합된 형태를 취하고 있어 효과적인 흡수를 위해서는 적절한 가공방법이 필요하다고 보고되고 있다.

본 과제에서는 국산 원료를 이용하여 xanthophyll을 주성분으로 하는 황반변성 억제 기능성을 가지는 기능성 식품을 개발하는 것을 최종 목표로 한다. 이를 위하여 본 연구팀은 기존에 루테인이 다량 존재하는 것으로 밝혀진 클로렐라 소재를 주요 루테인 소스로 정하고 클로렐라로부터 루테인의 생이용성을 증대시키는 기술을 개발하는데 초점을 맞추었다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 황반변성 억제 활성을 갖는 기능성 식품을 찾기 위하여 다음과 같은 내용으로 연구를 수행하였다. 첫째, 황반변성 억제 활성을 갖는 것으로 알려진 xanthophyll이 풍부한 소재를 찾기 위해 국내산 원료로부터 루테인 및 제아잔틴의 함유량을 분석하고 산업적 이용가치를 평가하였다. 또한 본 과제에서 주요 루테인 소스로 사용하고자 하는 클로렐라로부터 루테인 함유량이 높은 종균을 얻기 위해 클로렐라 종균개량 연구와 배양기술 개발 연구를 수행하였다. 둘째, 소화율이 낮은 클로렐라로부터 루테인의 생이용성을 증대시키기 위한 물리적 가공 기술을 개발하였다. 산업적 이용이 가능한 물리적 가공기술 중 고전압 펄스 처리 기술과 초고압 처리 기술, 그리고 습식분쇄기 (microfluidizer)를 이용한 분쇄 방법을 이용하여 클로렐라의 세포벽에 손상을 입히고 효율을 분석하였다. 셋째, in vitro 생이용성 시스템을 구축하여 물리적 가공 처리를 거친 시료의 생이용성 증대효과를 분석하였다. 위-장-관 모사 시스템을 통하여 본 연구에서 개발된 시료로부터 xanthophyll이 효과적으로 배출되는지를 측정하였고 Caco-2 장세포 분석법과 결합하여 카로티노이드의 세포수송 효율을 확인하였다. 넷째, in vitro 생이용성 시스템에서 얻은 결과를 검증하기 위하여 in vivo 동물실험을 이용한 시료의 생이용성 분석 연구를 수행하였다. 또한 실제로 시료 속 xanthophyll이 눈 세포에서 생리활성을 갖는 지를 확인하기 위하여 retinal ganglion 세포를 이용한 in vitro, in vivo 실험을 동시에 수행하였다. 다섯째, 생이용성이 증가된 시료를 산업적으로 활용하기 위하여 식품제형 연구를 수행하였고 이를 바탕으로 시제품을 제조하였다.

### IV. 연구개발결과

xanthophyll을 다량으로 함유하고 있는 소재를 찾기 위해 국내산 작물과 미세조류로부터 소재 탐색을 수행하였다. 특히 루테인과 함께 황반 내에 다량 분포하는 것으로 알려진 제아잔틴 분석 결과 국내산 고추, 파프리카, 구기자 등에 많은 양의 제아잔틴이 있었음을 알 수 있었다. 해수클로렐라의 한 종인 *Chlorella ellipsoidea*는 고추나 파프리카에 비해 10-100배 이상 많은 제아잔틴을 함유하고 있었다. 또한, 고추의 제아잔틴이 소화흡수력이 떨어지는 것으로 알려진 zeaxanthin diesters 위주로 구성되어있는 반면 해수클로렐라는 흡수가 잘 되는 것으로 알려진 fatty acid free 형태의 제아잔틴이 주성분으로 존재하기 때문에 품질 면에서 우수할 것으로 기대된다.

루테인이 풍부한 미세조류 종균을 얻기 위하여 루테인 및 아스타잔틴 고 함량 균주를 선별하는 실험을 수행하였다. 25 종 이상의 미세조류 중 총 5 종의 클로렐라를 선별하였으나 기존 제품 생산에 이용하는 클로렐라 종균에 비해 성장속도와 바이오매스 함량이 낮아 실용화가 어려웠다. 이에 xanthophyll 함량 증대를 위해 인위적인 돌연변이원 처리를 통한 우수 종자 선별 실험을 수행하였고, 클로렐라로부터 카로티노이드 생산성을 증대시키기 위해 최적배양방법을 개발하는 연구를 수행하였다. 반응요인설계를 통한 클로렐라 배양배지조건 설정 실험에서 EDTA (g), MgSO<sub>4</sub> (g), A5 (mL)가 중요한 영양인자로 확인되었으며 최적배지 내에 1 : 8 : 12로 구성되었을 때 가장 높은 카로티노이드 생산성을 나타내었다.

클로렐라의 생이용성을 증진시키기 위해 다양한 물리적가공처리를 수행하였고 고전압 펄스 처리, 초고압 처리, 습식분쇄를 이용하였다. 클로렐라의 추출 및 생이용성 증대에는 습식분쇄가 가장 효과적인 것으로 판단되어 습식분쇄에 대한 최적화 실험을 수행하였다. 습식 분쇄는 고압 균질기인 microfluidizer를 사용하여 이루어졌고 클로렐라에 적용 시 압력, 반복 횟수를 증가시키면 따라 클로렐라 입자 크기가 작아져 분쇄효율이 늘어남을 확인할 수 있었다. 공정 조건을 최적화하기 위한 실험에서 클로렐라 용액의 희석 배수와 처리 압력, 통과 횟수가 중요한 영향 요인이었다. 클로렐라의 분쇄 시 농축 배양액을 5-10배 희석한 후 80 MPa 이상의 압력으로 5 회 이상 처리하는 조건이 클로렐라 입자 저감화에 효과적이었다.

클로렐라 루테인의 생이용성을 연구하기 위해 위-장-관 모사 시스템을 구축하여 분석하였다. Microfluidization을 거친 시료의 경우 아무런 가공처리를 하지 않은 시료에 비해 체내 흡수가 가능하다고 알려진 micelles이 소화 과정 시 보다 효율적으로 생성됨을 확인할 수 있었다. Caco-2 세포수송 분석 시스템을 이용한 연구에서 분쇄처리를 한 클로렐라가 실제로 장내 세포에 더 높은 효율로 수송되었다. 위-장-관 모사 시스템의 효율성, 재현성을 검증하기 위하여 동물실험을 수행하였다. 쥐에게 생이용성이 증가된 시료를 투여했을 때 일반 시료를 투여했을 때보다 3배 이상 높은 농도의 루테인이 쥐의 혈장에서 분석되었다. 또한 쥐의 간, 눈 조직으로부터 루테인 분석을 실시했을 때 높은 농도의 분쇄 클로렐라를 투여한 그룹일수록 조직 내 루테인 함량도 높은 것으로 측정되었다. 특히 동물실험 결과와 위-장-관 모사 시스템 결과를 비교하였을 때 일치하는 부분이 많아 본 과제에서 구축한 위-장-관 모사 시스템이 클로렐라로부터 루테인 생이용성을 분석하는데 적합한 모델임을 확인할 수 있었다.

클로렐라 내 xanthophyll이 안구세포에서 갖는 기능성을 분석하기 위해 xanthophyll이 다량 함유되어있는 클로렐라 추출물을 망막신경절세포에 처리하여 생리활성을 탐색했다. 클로렐라 추출물은 산화스트레스를 받은 세포를 다시 회복시키고 활성산소 생성을 억제하는 효과가 있었으며 apoptotic 단백질의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 클로렐라 추출물이 안구 세포에 대해 갖는 기능성으로 유추해볼 때 생이용성이 증가된 클로렐라를 섭취 시에도 황반변성

억제 효과가 나타날 가능성이 높을 것으로 보인다.

나노화 클로렐라를 음료 제형으로 적용하기 위한 가공 적성 평가를 수행하였다. Suspension의 안정성은 10배 희석과 80 MPa 이상의 압력에서 5 cycle 이상일 때 가장 안정하게 유지되었고 20일 이후에도 안정성이 유지됨을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 포스파티딜세린을 첨가한 기능성 클로렐라 시제품을 생산하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통해 얻은 성과는 다음과 같다. 첫째, 클로렐라로부터 루테인 생이용성을 증대시키기 위해 microfluidizer를 이용하는 기술을 개발하였고 기업체에 기술이전을 계획 중이다. 루테인 생이용성이 증가된 분쇄 클로렐라 분말을 이용하여 루테인 성분 강화 클로렐라 제품을 산업화할 예정이다. 둘째, 본 연구과제와 관련된 특허 3건(“녹색도가 개선된 클로렐라의 제조방법 (10-2009-0130478)”, “클로렐라로부터 아임계 용매를 이용하여 카로티노이드 및 클로로필을 생산하는 방법 (10-2010-0085602)”, “클로렐라 초미세화를 이용한 루테인 추출을 증대시키는 방법 (10-2010-0036920)”)을 출원하였다. 셋째, 본 연구과제의 도출 결과를 바탕으로 1편의 SCI 논문 (Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*, 2010, Journal of agricultural and food chemistry, Vol. 58, pp. 4756-4761)을 발표하였으며, 3편의 논문 (“클로렐라의 생이용성 및 추출 증대를 위해 클로렐라를 습식 분쇄하는 방법”, “분쇄 클로렐라의 in vitro 생이용성 효과”, “분쇄 클로렐라의 in vivo 생이용성 효과”)이 투고될 예정이다. 넷째, 기술이전을 할 기업체에 루테인을 비롯한 카로티노이드 분석기술과 제품 QC 방법을 알려줌으로써 산업지원을 할 계획이다. 이외에도 본 과제에서 얻은 루테인 생이용성이 증가된 분쇄 클로렐라에 대해 추가로 인체 적용실험을 수행한다면 황반변성 억제 가능성을 가진 클로렐라로서 식약청으로부터 개별인정형 기능성 원료 인정을 받을 수 있으며 산업적 활용 가치를 높일 수 있다고 여겨진다.

# SUMMARY

## (영문 요약문)

Recently, the needs for the pharmaceuticals preventing eye disease are growing because of worldwide growing elderly population, ozone depletion caused by environmental pollution, and the frequent use of electronic equipments which continued to stress for the eye. It was reported that cataract and age-related macular degeneration, two typical eye diseases, were caused by a reduction of xanthophyll (lutein and zeaxanthin). As the content of xanthophyll present in the macula was decreased with aging, many people must intake lutein or zeaxanthin as food for the health of eye. According to these demands, lutein market as pharmaceuticals is growing significantly.

Chlorella is a rich source of lutein and there are many reports related in the extraction of lutein from chlorella. Though chlorella has abundant lutein, it is considered that the extraction efficiency of lutein and its bioavailability is very low due to the thick cell wall of chlorella. In this reason, physical processing improving the lutein bioaccessibility from chlorella is important for industrialization.

This research aims to develop functional food suppressing macular degeneration from plant resources composed of xanthophyll. To this end, we are focused on developing technology which enables to increase the lutein bioavailability from chlorella containing high levels of lutein.

To select the xanthophyll-rich materials, the extent of xanthophyll was analyzed using LC-MS from various plant and microalgae. Zeaxanthin was abundant in paprika and korean red pepper. Especially, *Chlorella ellipsoidea*, a kind of seawater microalgae, has 10 times higher level of zeaxanthin than paprika. In order to improve the lutein productivity from chlorella, culture method for lutein-rich chlorella was optimized with response surface design.

Physical processing using pulsed electric field generator, high hydrostatic press, and microfluidizer was carried out to overcome the limitation of chlorella in nutrition absorption and to increase lutein bioavailability of chlorella. Microfluidization was most effective

technique among three processing technologies. The key factors of microfluidization to be determined were dilution level, treatment pressure, and recycle number.

In order to evaluate the effect of physical processing on the lutein bioavailability of chlorella, *in vitro* digestion system was established and applied to the microfluidized chlorella. The lutein micelles that are actually available to human body were more efficiently formed comparing with no treatment group. The result of Caco-2 cell transmembrane analysis showed that the cellular transport of lutein was approximately three times greater from microfluidized chlorella than from untreated chlorella. Also, *in vivo* rat model was performed to assess the reliability of *in vitro* digestion system developed from this project. The level of lutein in the plasma, liver, and eye from rats to which the microfluidized chlorella was administrated had the concentration-dependent manner, while no organs from rats to which the general chlorella was injected were analyzed to increase the lutein significantly. In addition, the protective activity of chlorella extracts mainly composed to lutein on retinal ganglion cells was carried out in order to evaluate the actual function of lutein originated from chlorella on the eye. Chlorella extracts had very effective in the inhibition of reactive oxygen and the decrease of the expression of apoptotic proteins on the eye. In these results, it was concluded that physical processing using microfluidization enabled to improve the bioaccessibility of lutein from chlorella.

For the industrialization of nano chlorella into beverage market, the physicochemical properties of microfluidized chlorella and its processing properties were studied. Finally, xanthophyll product, which has the bioavailable lutein, was developed with the addition of phosphatidyl serine.

Through our research, the application of physical processing on the chlorella was effectively increased the lutein bioavailability from chlorella and we developed the novel functional food containing the high level of xanthophyll.



# CONTENTS

## (영 문 목 차)

<b>Chap 1. Outline of the Project</b> .....	<b>15</b>
Part 1. Necessity of Research and Development .....	15
1. Importance of functional product concerning eye-health .....	15
2. Xanthophyll, zeaxanthin and lutein .....	16
3. Market in functional food for eye-protection and possibilities on its R&D .....	18
4. Need of introducing physical processing technology of xanthophyll production .....	20
Part 2. Goal of Research and Development .....	21
1. Final goal .....	21
2. Details of the goal .....	21
<b>Chap 2. Updated Domestic and Foreign Technical Developments</b> .....	<b>23</b>
Part 1. Comparison of the Level between Domestic and Foreign Technology .....	23
1. Physical processing technology for increasing bioavailability .....	23
2. Technology for evaluation verification of bioavailability .....	23
3. Technology for culturing/producing Chlorella .....	24
Part 2. Patent Analysis .....	24
Part 3. Paper Analysis .....	26
Part 4. Product Analysis .....	28
1. Domestic products and market status .....	28
2. Foreign products and market status .....	28

<b>Chap 3. Details of the Project – Studies and Results</b> .....	<b>31</b>
Part 1. Research Methods and Strategies .....	31
1. Recruitment of research team .....	31
2. Core strategy and technology .....	32
3. Research scheme .....	34
Part 2. Scope of the Research and Research Methods .....	35
1. Primary Supervision: Korea Institute of Science and Technology .....	35
2. Primary Cooperate: Chung-Ang University .....	36
3. Secondary Cooperate: Daesang Co., Ltd. ....	36
Part 3. Results I: Screening of the Optimal Material (Daesang Co., Ltd.) .....	37
1. Search of zeaxanthin-containing material .....	37
2. Screening of high-carotenoid strain .....	38
3. Strain improvement experiment for increased xanthophyll content .....	39
4. Effect of media composition for increased xanthophyll content .....	42
5. Optimization of culture media for increased xanthophyll content (Statistical experimental design) .....	44
Part 4. Results II: Development of Ultra-fine Nano-grinding Technology (Chung-Ang Univ.) .....	46
1. Details of study on development of nano-grinding technology .....	46
2. Abstract of research result .....	62
Part 5. Results III: Application of Physical Processing Technology / Development of Xanthophyll Extraction and Analysis Technology (Korea Institute of Science and Technology) .....	63
1. Quantitation method establishment and stability verification of xanthophyll .....	63
2. Analysis and extraction of xanthophyll from micro-algae .....	66
3. Pre-treatment sample preparation using physical processing technology .....	69
4. Chlorella nano-grinding study using electron-microscope .....	72
5. Establishment of gastro-intestinal mimicry system and study of bioavailability .....	74

Part 6. Results IV: Effect of Chlorella extract on retinal damage protection (Korea Institute of Science and Technology) .....	76
1. Cellular toxicity assay .....	76
2. Cell viability assay – MTT assay .....	77
3. Cell viability assay – PI/Hoechste 33342 double stain method .....	78
4. Effect of Chlorella extract on oxidative stress-induced reactive-oxygen-species production .....	79
5. Effect on oxidative stress-induced glutathione reduction .....	80
6. Effect on apoptotic protein expression .....	81
7. Effect of NMDA treatment on retinal tissue .....	82
8. Damage to retinal ganglion cell-layer by NMDA treatment .....	83
 Part 7. Results V: Evaluation of Bioavailability of Chlorella Lutein (Korea Institute of Science and Technology) .....	 84
1. in vitro study .....	84
2. in vivo study .....	92
 Part 8. Results VI: Evaluation on Process Suitability of Beverage from Nano-Ground Chlorella (Chung-Ang Univ.) .....	 102
1. Details of study on process suitability .....	102
2. Abstract of research result .....	113
 Part 9. Results VII: Prototype research (Daesang Co., Ltd.) .....	114
1. Development of xanthophyll product .....	114
 <b>Chap 4. Degree of Achievement / Contribution to the Related Fields .....</b>	<b>115</b>
 Part 1. Focus and Criteria of Project Evaluation .....	115
 Part 2. Annual Objectives and Achievements .....	116
 Part 3. Contribution to the Technological Development of Related Fields .....	118

<b>Chap 5. Study Outcome and its Future Plan for the Application .....</b>	<b>120</b>
Part 1. Outcome / Future Plan for the Application .....	120
<b>Chap 6. Foreign Scientific and Technical Informations Obtained During the Study ...</b>	<b>121</b>
Part 1. in vitro Digestion System .....	121
Part 2. Technology of Chlorella Bioavailability .....	127
<b>Chap 7. References .....</b>	<b>129</b>

# 목 차

제 1 장	연구개발 과제 개요	15
제 1 절	연구개발의 필요성	15
1.	눈 건강 기능성 제품의 중요성	15
2.	Xanthophyll, 제아잔틴과 루테인	16
3.	눈 보호 기능성 식품 시장의 현황 및 연구개발 가능성	18
4.	Xanthophyll 생산을 위한 물리적 가공기술 도입의 필요성	20
제 2 절	연구개발의 목표	21
1.	최종목표	21
2.	세부연구목표	21
제 2 장	국내외 기술개발 현황	23
제 1 절	국내외 기술 수준 비교	23
1.	생이용성 증대를 위한 물리적 가공처리 기술	23
2.	생이용성 평가 검증 기술	23
3.	클로렐라 배양/생산 기술	24
제 2 절	특허 분석	24
제 3 절	논문 분석	26
제 4 절	제품 분석	28
1.	국내 제품생산 및 시장 현황	28
2.	국외 제품생산 및 시장 현황	28
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	31
제 1 절	연구수행 방법 및 전략	31
1.	연구팀 구성	31
2.	핵심전략 및 기술	32

3. 연구추진체계 .....	34
제 2 절 연구범위 및 연구수행 방법 .....	35
1. 제1세부: 한국과학기술연구원 .....	35
2. 제1협동: 중앙대 .....	36
3. 제2협동: 대상㈜ .....	36
제 3 절 수행결과 I: 최적소재 탐색 연구 (대상㈜) .....	37
1. Zeaxanthin 함유소재 탐색 .....	37
2. 고 카로티노이드 균주 선별 실험 .....	38
3. Xanthophyll 함량 증대를 위한 균주 개량 실험 .....	39
4. Xanthophyll 함량 증대를 위한 클로렐라배지 성분 영향 확인 실험 .....	42
5. Xanthophyll 함량 증대를 위한 배양배지 최적화 실험 (통계학적 실험 설계) .....	44
제 4 절 수행결과 II: 초미세 나노 분쇄화 기술 개발 (중앙대) .....	46
1. 나노 분쇄화 연구 수행 내용 .....	46
2. 연구개발 수행 결과 요약 .....	62
제 5 절 수행결과 III: 물리적 가공기술의 적용 및 xanthophyll 추출 및 분석 기술 개발 (한국과학기술연구원) .....	63
1. Xanthophyll 정량 분석법 확립 및 안정성 검증 .....	63
2. 미세조류로부터 xanthophyll 분석 및 추출 .....	66
3. 물리적 가공처리를 이용한 클로렐라 전처리 시료 제조 .....	69
4. 전자현미경을 통한 클로렐라 나노분쇄화 연구 .....	72
5. 위-장-관 모사 시스템 구축 및 생이용성 연구 .....	74
제 6 절 수행결과 IV: 클로렐라 추출물의 망막 손상 보호효과 (한국과학기술연구원) ...	76
1. 세포 독성평가 .....	76
2. 세포 생존율 평가 .....	77
3. PI/Hoechste 33342 이중 염색을 통한 세포생존율 평가 .....	78
4. 산화스트레스에 의해 유도된 활성산소 생성에 대한 클로렐라 추출물의 효과 .....	79
5. 산화스트레스에 의해 유도되는 글루타티온(GSH)의 감소량에 대한 효과 .....	80
6. Apoptotic protein의 발현에 대한 클로렐라 추출물의 효과 .....	81
7. NMDA처리에 의한 망막조직에 미치는 영향 .....	82
8. NMDA처리에 의한 망막 신경절 세포층의 손상 .....	83

제 7 절	수행결과 V: 클로렐라 루테인의 생이용성 평가 (한국과학기술연구원)	84
1.	in vitro 생이용성 평가	84
2.	in vivo 생이용성 평가	92
제 8 절	수행결과 VI: 나노화 클로렐라의 음료 가공적성 검증 (중앙대)	102
1.	가공적성 연구개발 수행 내용	102
2.	연구개발 수행 결과 요약	113
제 9 절	수행결과 VII: 시제품 연구 (대상주)	114
1.	Xanthophyll 제품 개발	114
<b>제 4 장</b>	<b>목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b>	<b>115</b>
제 1 절	연구과제평가의 착안점 및 기준	115
제 2 절	연도별 연구 목표 및 달성도	116
제 3 절	관련분야의 기술 발전에의 기여도	118
<b>제 5 장</b>	<b>연구개발 성과 및 성과활용 계획</b>	<b>120</b>
제 1 절	성과 / 활용 계획	120
<b>제 6 장</b>	<b>연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b>	<b>121</b>
제 1 절	in vitro digestion 시스템	121
제 2 절	클로렐라 생이용성에 관한 기술	127
<b>제 7 장</b>	<b>참고문헌</b>	<b>129</b>

# 제 1 장 연구개발 과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 눈 건강 기능성 제품의 중요성

“오는 2030년에 이르면 65세 이상 고령층에 지출되는 의료비 규모가 16조 달러에 달할 것으로 예측되고 있는 현실에서 각종 노인성 질병을 예방하는데 효과적인 기능식품의 중요성이 과거 어느 때보다 자명하게 부각되고 있다”

→ 미국 기능식품교육협회(Dietary Supplement Education Alliance)

엘리어트 발버트 회장



우리나라는 지난 2000년 65세 이상 노인인구가 340여만 명으로 총인구의 7.1%를 나타내며 이미 고령화 사회로 진입하였다. 환경오염에 의한 오존층 파괴와 업무환경 변화에 따른 잦은 전자기기의 사용은 외부환경에 직접 노출되는 신체부위인 피부와 눈에 대한 스트레스로 이어지고 있어 **안질환 예방에 대한 수요가 급증할 것으로 보인다**. 실제 건강보험관련 기관의 발표 자료에 의하면 65세 이상 노인층 백내장 수술 건수는 2003년 18만8천6백여 건으로 1,650억 원의 수술비용이 발생되었으며, 특히 백내장과 함께 후천적 실명을 초래하는 것으로 알려진 **노인성 황반변성 (AMD, age-related macular degeneration)** 환자가 2000년 대비 3배 증가하여 10만 명에 달하는 것으로 보고되었다.



그림 1. 노인성 황반변성에 의한 시력저하



## 2. Xanthophyll, 제아잔틴과 루테인

최근 연구에 의하면 백내장 및 노인성 황반변성의 공통된 발병요인은 눈 속에 존재하는 제아잔틴(zeaxanthin)과 루테인(lutein)이라고 하는 두 xanthophyll의 감소 때문인 것으로 밝혀졌다. Xanthophyll은 산소원자가 포함된 카로티노이드를 일컬으며, 특히 제아잔틴과 루테인은 눈에서 빛을 받아들이는 부위인 황반의 주요 구성성분으로 청색광을 필터링하고 항산화작용을 통해 시세포를 보호해주는 역할을 한다.

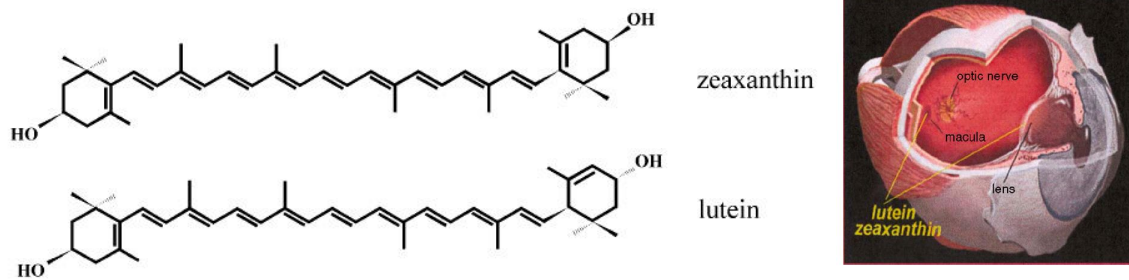


그림 2. 황반 내에 존재하여 눈 보호 기능을 담당하는 제아잔틴과 루테인

황반 내의 제아잔틴과 루테인의 함량은 25세부터 감소하기 시작하여 50세에는 절반으로 줄어들기 때문에 식품을 통한 꾸준한 섭취가 요구된다. 많은 연구에서 제아잔틴과 루테인의 섭취량이 6 mg/일 이상이 될 경우 황반변성 억제 기능이 있음을 보고하고 있으나 실제 평균섭취량은 1 내지 2 mg/일 정도로 보조제에 의한 추가 섭취가 필요한 실정이다. 특히 노인성 황반변성의 경우 수술 치료가 어렵고 완치가 불가능하므로 예방을 위한 기능성 식품의 중요성이 강조되고 있다 (1).

루테인에 대한 이러한 기능성은 이미 오래 전에 입증되어 1994년 미국에서 건강보조제로 인정받았으며 현재 세계 각국에서 판매되고 있다. 루테인 시장은 1999년 \$64 million 에서 2004년 \$139 million 규모로 급성장하였으며, 건강보조제형태의 루테인 생산량은 2000년에서 2007년 사이 20배 이상 증가할 정도로 판매량이 늘어나는 상황이다 (2).

GLOBAL LUTEIN CONSUMPTION FOR SUPPLEMENTS, 2000-2007  
(TONS CRYSTALLINE)

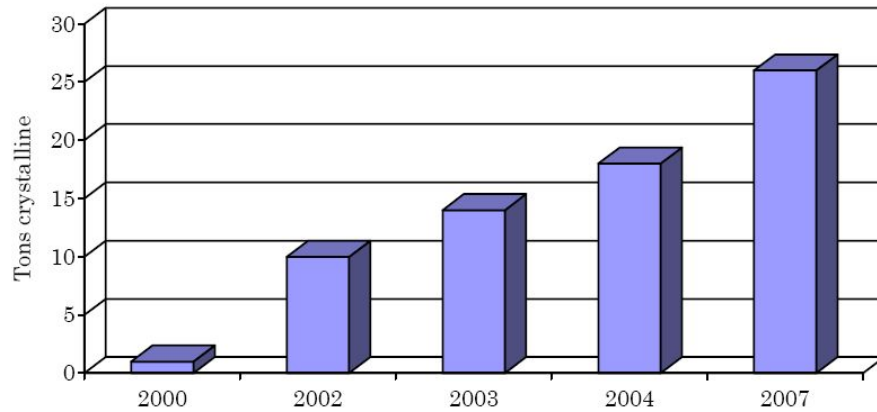


그림 3. 루테인 건강보조제 관련 세계 소비량 (BCC Research)

국내에서는 2007년 11월 미국 Kemin Foods 사의 FloraGLO lutein이 식약청으로부터 개별 인정 기능성 원료로 승인을 받았다. 최근 보령제약, 일동제약, CJ, 한국알리코팜, 코오롱 등의 제조업체에서 해당 원료를 사용한 루테인 제품을 만들어 판매하고 있다



그림 4. 국내에서 판매되고 있는 루테인 제품들

### 3. 눈 보호 기능성 식품 시장의 현황 및 연구개발 가능성

#### 가. 소재의 90% 이상이 수입원료

국내에서 판매되고 있는 루테인 제품은 주원료로 식약청에서 기능성 허가를 받은 FloraGLO 루테인을 사용하고 있다. 수입원료 사용에 따른 기술실시료를 지불해야하는 상황이므로 국내 눈 보호 기능성 식품 시장을 위한 국산원료를 개발하고 해당 소재의 기능성 및 안전성을 검증받는 것이 요구된다.

표 1. 국내 개별인정형 황반변성 억제 기능성원료로 인정받은 FloraGLO 루테인의 조성

Estimated composition of FloraGLO <sup>®</sup> Purified Crystalline Lutein <sup>a</sup>	
Ingredient	Formulation (% dry weight)
Lutein	76
Zeaxanthin	7
Total pigments	85
Other carotenoids	1.4
Waxes	9.0
Fatty acids	1.5
Potassium	0.4
Water	0.4
Other	<1

<sup>a</sup> Kemin Foods, L.C., Des Moines, IA.

#### 나. 기존 시장은 루테인 제품 중심 → 제아잔틴 제품 개발의 필요성

세계적으로 눈 보호와 관련된 기능성 식품은 루테인을 중심으로 발전해왔으며 국내에서도 관련 건강기능식품은 루테인이 유일하다. 한편, 제아잔틴은 루테인과 비슷한 기능을 나타냄에도 불구하고 2001년 뒤늦게 연구가 시작되어 2006년 Zeavision사에서 처음 상품화되었다. 실제로 우리 체내의 혈액 중에는 루테인:제아잔틴이 3:1의 비율로 존재하지만 **황반 내에는 오히려 제아잔틴의 함량이 루테인의 2배 이상 존재하는 것으로 보고되고 있어 향후 제아잔틴의 중요성이 더욱 부각될 것으로 여겨진다 (3).**

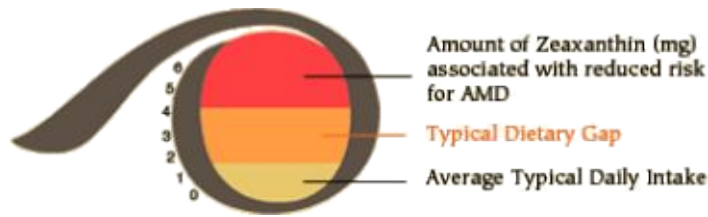


그림 5. 하루 2 내지 4 mg의 추가 섭취가 요구되는 제아잔틴 (Zeavision Co.)

다. 국산 농작물 및 부산물을 이용한 제아잔틴, 루테인 생산 가능성

제아잔틴의 경우 구기자 열매, 파프리카, 고추 등에 매우 풍부한 것으로 보고되고 있어 (구기자 열매의 경우 100 g 당 150 mg 이상의 제아잔틴이 함유) 제아잔틴 생산을 통한 고부가가치 제품 생산이 가능하다 (4). 한편, 우리가 흔히 섭취하는 케일, 시금치, 브로콜리, 고구마 등에는 루테인이 다량 함유되어 있으며 미세조류의 일종인 클로렐라에는 케일의 10배에 해당하는 루테인이 존재한다 (5).

Carotenoid content of various fruits and vegetables

Vegetable	β-Carotene	Lycopene	Lutein/zeaxanthin
Broccoli	779	-	2,445
Brussel sprouts	450	-	1,590
Cabbage	65	-	310
Carrots, baby	7275	-	358
Corn	30	-	884
Green beans	377	-	640
Grapefruit, red	603	1462	13
<b>Kale, raw</b>	<b>9226</b>	-	<b>39,550</b>
Leaf lettuce	1272	-	2,635
Oranges	51	-	187
Papaya	276	-	75
Peas (green)	320	-	1,350
<b>Spinach</b>	<b>5597</b>	-	<b>11,938</b>
Winter squash	220	-	38
Summer squash	410	-	2,125
Tomatoes	393	3025	130

Units: μg/100 g. From U.S. Department of Agriculture (1998).



그림 6. 채소 내 카로티노이드 함량(왼쪽) 및 루테인(위), 제아잔틴(아래)이 풍부한 식물

#### 4. Xanthophyll 생산을 위한 물리적 가공기술 도입의 필요성

구기자 및 케일, 클로렐라를 대상으로 한 선행연구에서 해당소재로부터 루테인, 제아잔틴과 같은 xanthophyll을 생산하는데 있어 물리적 가공기술의 도입이 생산효율을 증대시킬 수 있다. 실제로 본 연구팀의 선행 연구를 통하여 구기자 열매에서 제아잔틴을 추출함에 있어 일반적인 방법에 비해 분쇄처리를 병행하였을 때 추출효율이 5배 이상 증가하였으며 클로렐라 추출 시에도 용매증류에 의한 방법보다 고온고압의 아임계 상태에서 짧은 시간 내에 추출하는 것이 루테인 횡수를 증가시켰음을 확인하였다.

식물 내에서 카로티노이드는 세포막 내에 그림 7과 같은 형태로 존재하며 제아잔틴, 루테인은 수용성 부분과 지용성 부분을 모두 가지고 있어 세포막 내에 비교적 단단히 결합된 형태를 취하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 이유로 xanthophyll과 같은 카로티노이드의 유출이 일반적인 조건에서는 저해되는 것으로 보인다 (6).

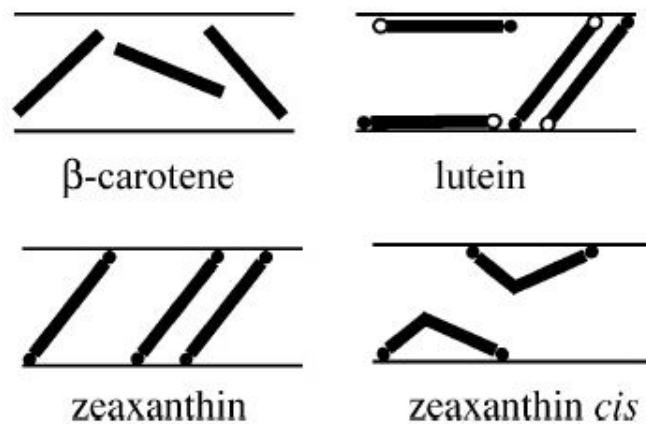


그림 7. 세포막 내 카로티노이드의 분포

이들 xanthophyll 성분을 세포막으로부터 분리해내기 위해 분쇄화, 초고압 처리, 고전압 처리 등과 같은 물리적 가공기술이 필요하며 최근 제트밀 분쇄나 초임계를 이용한 카로티노이드 추출 증대효과가 보고되고 있어 물리적 가공처리가 중요한 산업화 기술이 될 수 있다 (7-8).



그림 8. 초미세분체 사진 및 KIST 강릉분원에 구축된 물리적 가공 장치

## 제 2 절 연구개발의 목표

### 1. 최종목표

본 연구는 국산 원료를 이용하여 xanthophyll을 주성분으로 하는 황반변성 억제 기능성 식품을 개발하는 것을 최종목표로 한다. 연구에서 사용한 주된 국산 원료는 루테인 함량이 산업적 이용이 가능할 정도로 매우 풍부한 것으로 밝혀진 클로렐라 소재이며, 클로렐라의 낮은 생이용성을 높이기 위한 분쇄기술을 개발하고 클로렐라로부터 향상된 루테인 생이용성을 평가하고자 한다.

### 2. 세부연구목표

#### 가. 최적소재 선정

클로렐라 외 xanthophyll을 다량 함유하고 있는 것으로 알려진 구기자, 케일, 파프리카, 고추, 미세조류 등으로부터 루테인 및 제아잔틴의 함유량을 분석하고 산업적 이용가치를 평가한다. 또한 루테인 함유량이 높은 클로렐라 종균을 얻기 위해 클로렐라 종균개량 연구와 배양기술 개발 연구를 수행한다.

#### 나. 생이용성 증대를 위한 물리적 가공 기술 개발

본 과제에서는 클로렐라를 주요 루테인 소스로 이용하고자 하였으며 클로렐라의 생이용성이 낮은 점을 극복하기 위해 산업적 이용이 가능한 물리적 가공기술을 도입하기로 한다. 높은 온도의 고에너지를 사용하는 아임계유체를 이용한 추출효율 증대연구를 수행함과 동시에 30,000 볼트 이상의 전기적인 힘을 이용하는 고전압 펄스 처리 기술과 5,000 기압 이상의 초고압을 이용하는 초고압 처리 기술을 수행하도록 한다. 또한 클로렐라를 잘게 분쇄할 수 있도록 건식분쇄에 의한 micrometer 영역 분쇄체 확보, 습식분쇄에 의한 nanometer 영역 분쇄체 확보, 분쇄체의 물리적 특성 분석 및 비중 별 분획 확보 연구를 수행하여 제아잔틴, 루테인 최대함유 분획을 얻는다.

#### 다. in vitro 생이용성 분석 시스템 개발

시료로부터 루테인을 비롯한 xanthophyll이 체내로 효율적으로 흡수되는지를 확인하기 위해 전임상 실험 전에 in vitro 단계에서 생이용성을 분석할 수 있는 위-장-관 모사 시스템을 구축한다. 카로티노이드 생이용성 분석에 적합한 in vitro digestion 조건을 확립하고 xanthophyll의 장내 세포에 대한 막수송 효율을 평가하기 위해 Caco-2 장세포를 이용한 membrane transport 효율을 분석하도록 한다. 물리적 가공처리 기술에 의한 생이용성 증대 여부를 확인한다.

#### 라. in vivo 생이용성 평가

생이용성이 향상된 최적시료를 rat에 섭취 시킨 후 혈장, 간 내의 xanthophyll 함량을 분석하여 흡수율을 비교한다. 또한 안구 내의 xanthophyll 함량이 증대되었는지 여부를 확인하여 황반변성 억제 가능성을 평가한다. 구축된 in vitro digestion 시스템과 전임상 생이용성 분석 결과와의 비교를 통해 위-장-관 모사 시스템의 효율성 여부를 파악한다.

#### 마. 클로렐라 루테인의 in vitro, in vivo 눈 생리활성 탐색

클로렐라 루테인의 황반변성 억제 활성을 평가하기 위하여 산화유도 retinal ganglion cell에서의 xanthophyll 활성실험을 수행한다. 또한 in vivo 실험에서 혈중 또는 안구 중의 xanthophyll 함량을 정량분석하고 안구 중의 황반변성 억제 효과를 확인하도록 한다.

#### 바. 분쇄 클로렐라 산업화 연구

본 과제에서 산업화하고자 하는 주요 타겟인 분쇄 클로렐라의 산업화를 위해 실험실 규모의 생산 공정을 확립하도록 하며 일반식품제형 적용을 위한 용해성 및 열안정성 검증 연구와 모델식품 적용에 따른 물성 및 관능적 특성 파악을 통해 제품 QC를 수행하도록 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 기술 수준 비교

#### 1. 생이용성 증대를 위한 물리적 가공처리 기술

식품산업에서 이용 가능한 물리적 가공처리 기술에는 고전적인 열처리 기술과 최근 비열살균을 위해 도입된 초고압 처리 기술과 고전압 처리 기술 등이 있다. 초고압 처리 기술과 고전압 처리 기술은 유럽을 중심으로 발전해왔으며 국내의 기술 수준은 유럽의 절반 수준에 미치는 실정이다. 그러나 해당 기술이 살균 목적으로 이용되고 있기 때문에 본 과제에서 목적으로 하는 생이용성 증대를 위한 세포막 파괴 방법으로서의 효과는 연구된 바가 거의 없으므로 국내외 모두 아직 초기 수준에 머물러 있다고 볼 수 있다. 한편 본 연구에서 독자적으로 수행한 클로렐라에 대한 습식 분쇄 기술은 아직 적용된 사례가 없는 독창적인 기술이며 국내는 물론 국외 기술과 비교하였을 때도 산업화가 유리한 우수한 기술이다.

#### 2. 생이용성 평가 검증 기술

본 연구에서 생이용성 증대기술 효과를 탐색하기 위해 적용한 위-장-관 모사시스템은 미국과 유럽을 중심으로 최근 활발히 연구가 진행되고 있으며 국내에서는 해당 기술을 이용한 논문이 보고된 바 없다. 미국의 Failla 그룹과 영국의 O'brien 그룹이 카로티노이드 생이용성에 대한 대표 연구그룹이라고 할 수 있다.

표 2. 관련기술의 국내외 기술수준

개발기술명	관련기술 최고보유국	과제수행 전 기술수준		기술개발 수준	비고
		우리나라	연구팀		
물리적가공기술에 의한 카로티노이드 추출기술	미국	60%	60%	85%	
카로티노이드 생이용성 증대기술	미국	50%	40%	75%	



### 3. 클로렐라 배양/생산 기술

국내 최대 클로렐라 생산업체인 대상(주) 건강연구소는 1993년 클로렐라 종속배양 연구를 시작으로 클로렐라를 중심으로 한 건강기능식품 소재 연구의 중심이 되어 왔으며, 현재 연간 1,000톤을 생산, 200톤 이상의 일본수출 성과를 보이고 있다.

국내에서는 클로렐라를 직접 배양/생산하는 업체는 없으며, 해외에서 수출한 원료를 바탕으로 소재 및 완제 시장에 진출하고 있으며, 대상(주)의 생산규모 및 생산성을 따라올 업체는 전무한 상태이다. 국외에서는 대표적인 경쟁업체로 대만, 중국, 일본이 있으나 대상(주)의 특화된 탱크배양과는 달리 옥외(pond)배양법을 사용하여 기후에 따라 클로렐라의 품질과 생산량이 차이가 난다.

## 제 2 절 특허 분석

2011년 3월을 기준으로 국내와 국외(미국, 일본, 유럽, 독일)를 대상국가로 하여 *Chlorella* 라는 keyword로 특허 조사를 수행 한 결과, 검색 건수가 국내 212건, 해외 3360건이 존재했다. 같은 검색기준으로 *Chlorella* 내 lutein 추출법 및 정제법과 관련된 유효 특허 건수는 88건으로 우리나라 0건, 해외 88건이며 관련성은 약 3% 정도로 미비한 상태였다. *Chlorella*는 lutein을 다량 함유함에도 불구하고 lutein이 세포막에 분포하고 있는 점, 그리고 단단한 조직의 세포벽 때문에 소화흡수 및 유용성 성분 추출이 곤란하다. 습식분쇄를 통하여 클로렐라로부터 lutein의 효율적 추출방법을 최적화 하는 것은 기존의 다른 제조기술과 차별성이 충분하여 특허등록이 가능할 것으로 판단되었다.

표 3. 특허검색범위

대상국가	국내, 국외 (미국, 일본, 유럽)
특허 DB	WIPS
검색기간	최근 15년간
검색범위	제목 및 초록

표 4. 관련특허 비교분석

개발기술명		물리적가공기술에 의한 카로티노이드 추출기술	카로티노이드 생이용성 증대기술
Keyword		(processing or hydrostatic or grinding or mill or nanoparticle or extraction or pulsed electric) and (carotenoid or zeaxanthin or lutein or xanthophyll or carotene or lycopene or astaxanthin)	(bioavailability or stability or encapsulation) and (carotenoid or zeaxanthin or lutein or xanthophyll or carotene or lycopene or astaxanthin)
검색건수		398	297
유효특허건수		104	63
핵심특허 및 관련성	특허명	Process for extraction and purification of lutein, zeaxanthin and rare carotenoids from marigold flowers and plants	Trans-lutein enriched xanthophyll ester concentrate and a process for its preparation
	보유국	미국	미국
	등록년도	2007	2003
	관련성 (%)	60	70
	유사점	천연물소재로부터 카로티노이드 생산을 증대시키기 위한 공정연구	생이용성이 높은 카로티노이드 생산
	차이점	마리골드로부터 카로티노이드를 추출하는 기술과 관련됨. 본 과제는 시료 자체를 이용하여 해당 카로티노이드의 생이용성과 활성을 증대시키는 것임.	해당특허는 ketonic solvent를 사용하여 흡수율이 높은 루테인만을 선택 추출하는 방법을 취함. 본 연구팀이 개발하고자 하는 기술은 열, 온도, 압력 등에 의한 다양한 조건에서 생이용성을 증대시키는 것임.

### 제 3 절 논문 분석

국내외 논문 데이터베이스를 이용해 *Chlorella* 내 lutein 추출법 및 정제법에 관해 조사한 결과, 관련된 유효 논문 편수는 7편이 존재하였고, 관련성은 약 15% 정도로 파악되었다. *Chlorella*내 lutein성분은 1990년대부터 연구되었으며, 2000년대 들어서부터 주목을 받기 시작하였지만 아직 다양한 연구가 이뤄지지 않는 실정이다.

표 5. 논문검색범위

대상국가	한국, 미국, 일본, 유럽
논문 DB	SciFinder, pubmed DB( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ), 국내학술지(KISS)
검색기간	최근 15년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

표 6. 관련논문 비교분석

개발기술명		물리적가공기술에 의한 카로티노이드 추출기술	카로티노이드 생이용성 증대기술
Keyword		(processing or hydrostatic or grinding or mill or nanoparticle or pulsed electric) and (zeaxanthin or lutein or xanthophyll or carotene or lycopene or astaxanthin or carotenoid)	(bioavailability or encapsulation) and (zeaxanthin or lutein or xanthophyll or carotene or lycopene or astaxanthin)
검색건수		863	712
유효논문 건수		139	98
핵심논문 및 관련성	논문명	Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing	Carotenoid bioaccessibility from whole grain and degermed maize meal products
	학술지명	J Agric Food Chem	J Agric Food Chem
	저 자	Sánchez-Moreno C, Plaza L, Elez-Martínez P, De Ancos B, Martín-Belloso O, Cano MP	Kean EG, Hamaker BR, Ferruzzi MG
	게재년도	2005	2008
	관련성(%)	80	90
	유사점	고전압이라는 물리적 가공처리를 통해 오렌지 주스로부터 카로티노이드 성분 다량 추출	three stage <i>in vitro</i> digestion 시스템에 의한 카로티노이드 생이용성 확인
	차이점	고전압 처리 기술을 추출이 아닌 막봉괴를 통한 생이용성 증대에 이용	대상 소재가 옥수수를 비롯한 곡식류

## 제 4 절 제품 분석

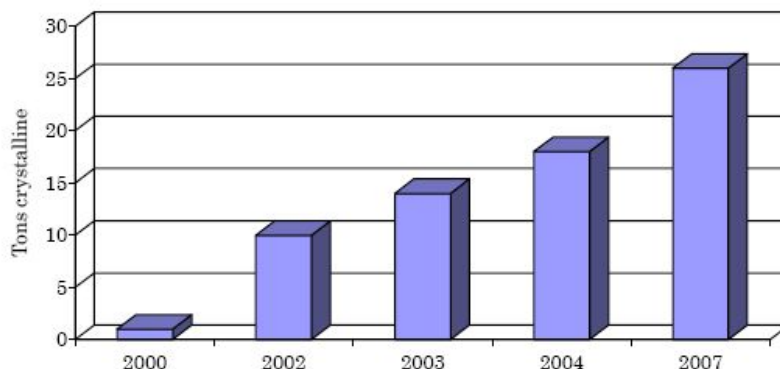
### 1. 국내 제품생산 및 시장 현황

국내 눈 보호 건강기능식품 시장은 2007년 11월 루테인 소재가 황반변성억제 기능성원료로 인정받으면서 2008년에 본격적으로 형성되기 시작하였다. 따라서 현재 국내 시장은 이제 막 시장이 형성되는 시기이며 BCC Research에 따르면 루테인 제품은 2007년도에 4백만 불의 아시아 시장이 형성되어 있다.

### 2. 국외 제품생산 및 시장 현황

BCC Research의 2008년도 보고 (FOD025C. The Global Market for Carotenoids)와 Frost & Sullivan의 2007년 보고 (M09A-88. Strategic Analysis of the Global Markets for Lutein in Human Nutrition)에 따르면 루테인 기능성 제품의 소비는 꾸준히 증가하고 있으며 루테인 제품 시장은 미국과 유럽 시장은 안정기, 아시아 시장은 성장기에 놓여 있음을 알 수 있다.

GLOBAL LUTEIN CONSUMPTION FOR SUPPLEMENTS, 2000-2007  
(TONS CRYSTALLINE)



LEGEND

2000	2002	2003	2004	2007	CAGR% 2000-2007
1	10	14	18	26	59.3

Source: BCC Research

그림 9. 건강기능식품으로서 루테인의 연간 소비량

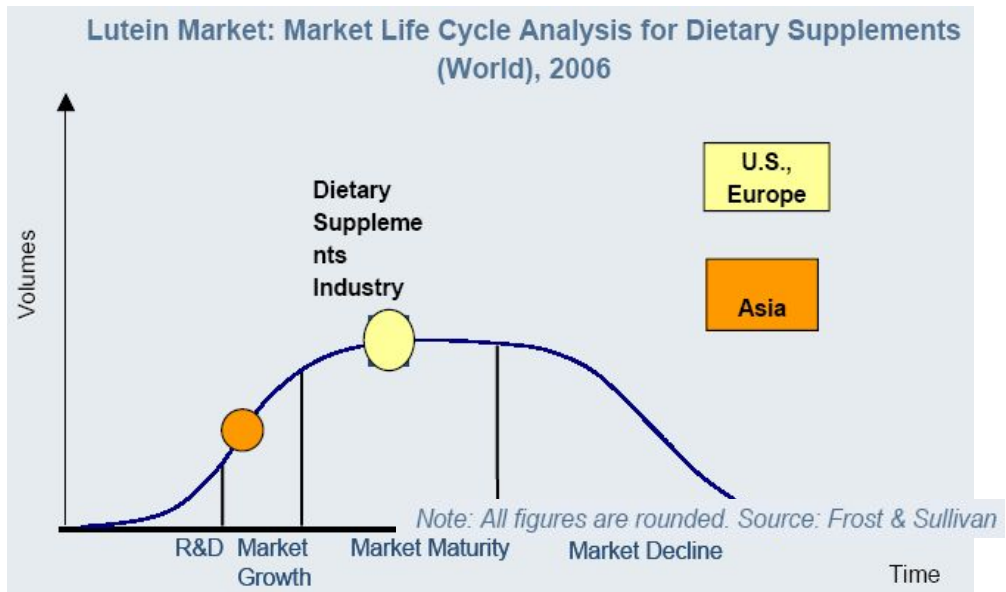


그림 10. 루테인 건강기능식품시장 지역별 분석

루테인 시장은 향후 세계적으로 지속적인 성장을 유지할 것으로 전망되며 2012년에는 1,800억 원의 세계시장규모를 형성할 것으로 보인다.

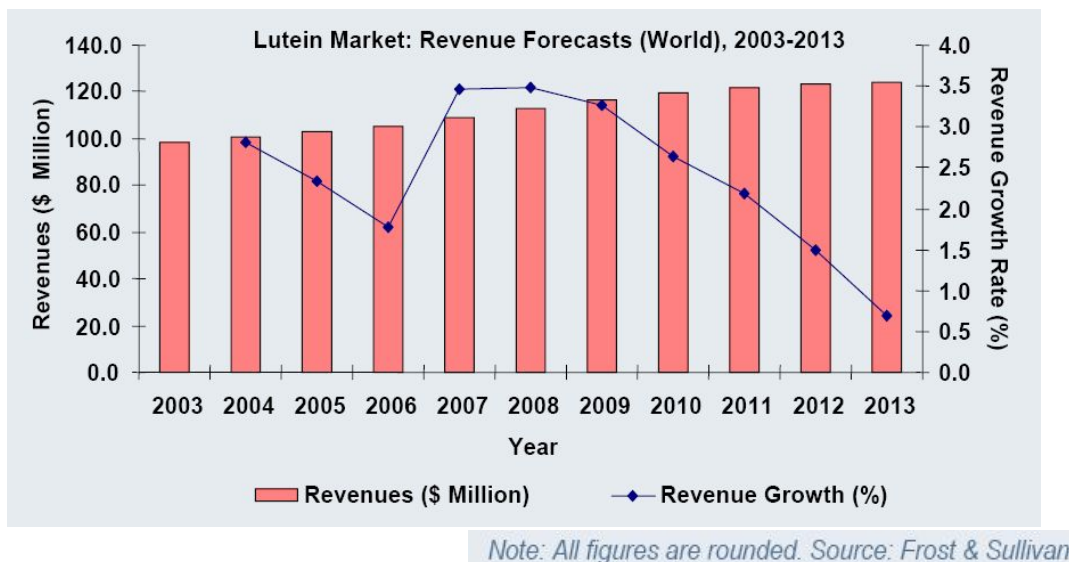
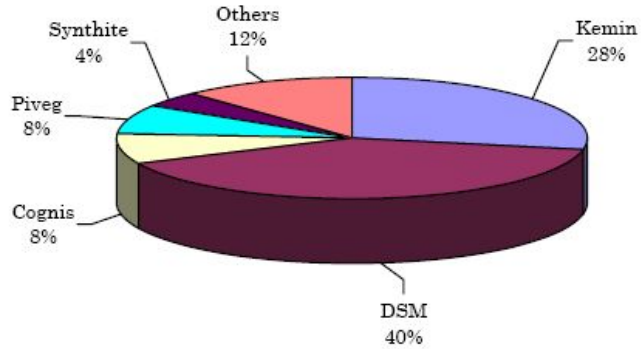


그림 11. 루테인 건강기능식품시장 전망

루테인 제품은 세계적 식품기업인 DSM과 Kemin에 의해 생산되고 있으며 국내에서 판매되는 루테인은 모두 Kemin 사의 FloraGLO 루테인을 그 원료로 제품화되고 있음.

**MARKET SHARES OF LUTEIN SUPPLIERS FOR SUPPLEMENTS, 2007**  
(%, 25 TONS)



Source: BCC Research

그림 12. 루테인 제조회사들의 시장점유율

# 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

## 제 1 절 연구수행 방법 및 전략

### 1. 연구팀 구성

연구개발을 효율적으로 수행하기 위하여 産 (대상연구소), 學 (중앙대), 研 (한국과학기술연구원) 3개 기관이 연구팀을 이루어 프로젝트를 수행하였다. 각 기관의 장점을 살려 대상 연구소에서는 시료 선정 및 공급과 산업화 부분을 담당하였고 중앙대에서는 초미세 분체화 기술의 적용과 물리적 특성을 연구하는 소재 전처리 기술을 개발하는 역할을 맡았다. 한국과학기술연구원은 주관기관으로서 모든 시료의 분석을 수행하였으며 다양한 물리적 가공기술을 적용하였다. 또한 *in vitro*, *in vivo* 상에서의 생리활성 및 생이용성을 검증 분석하는 일을 수행하였다.



그림 13. 연구수행기관 별 강점분야



## 2. 핵심전략 및 기술

황반변성 억제 활성을 갖는 기능성 식품을 개발하기 위하여 기존에 이미 알려진 루테인을 중심으로 한 xanthophyll이 풍부한 소재를 찾는다. 대부분의 제품이 xanthophyll 류를 별도로 추출하여 추출물 형태를 띠고 있는데 본 연구에서는 루테인이 풍부한 클로렐라를 주 소재로 하여 클로렐라 제품을 섭취하였을 때 황반변성 억제 활성이 나타날 수 있도록 제품의 생이용성 및 기능성을 증대시키는 방법을 개발하여 기존의 방법과 차별화하고자 한다.



그림 14. 핵심전략 (1): 생이용성이 증가된 클로렐라를 통해 황반변성 기능성 식품을 개발

클로렐라의 소화율이 낮은 문제는 클로렐라 시장의 성장을 저해할 정도로 업계의 비상한 관심거리이자 해결과제이다. 본 연구과제에서는 루테인의 함유량이 매우 뛰어나지만 소화율이 떨어지는 클로렐라의 생이용성을 증대시키기 위해 산업적으로 이용이 가능한 물리적 가공 방법들을 적용하는 것을 특징으로 한다. 수 만 볼트의 고전압을 처리해주어 세포막 붕괴에 전기적인 힘을 이용하는 고전압 펄스 처리장치와 5,000 기압 이상의 높은 압력을 처리해주는 초고압 처리 장치를 현재 한국과학기술연구원 강릉분원에서 갖추고 있다. 또한 고압 하의 물리적 충돌 에너지를 이용하여 액상 시료를 나노 사이즈의 크기로 분쇄할 수 있는 microfluidizer 장비를 협동연구기관인 중앙대 식품공학과에서 보유하고 있기 때문에 다양한 물리적 가공처리를 통한 클로렐라의 루테인 생이용성 증대연구를 수행할 수 있었다.

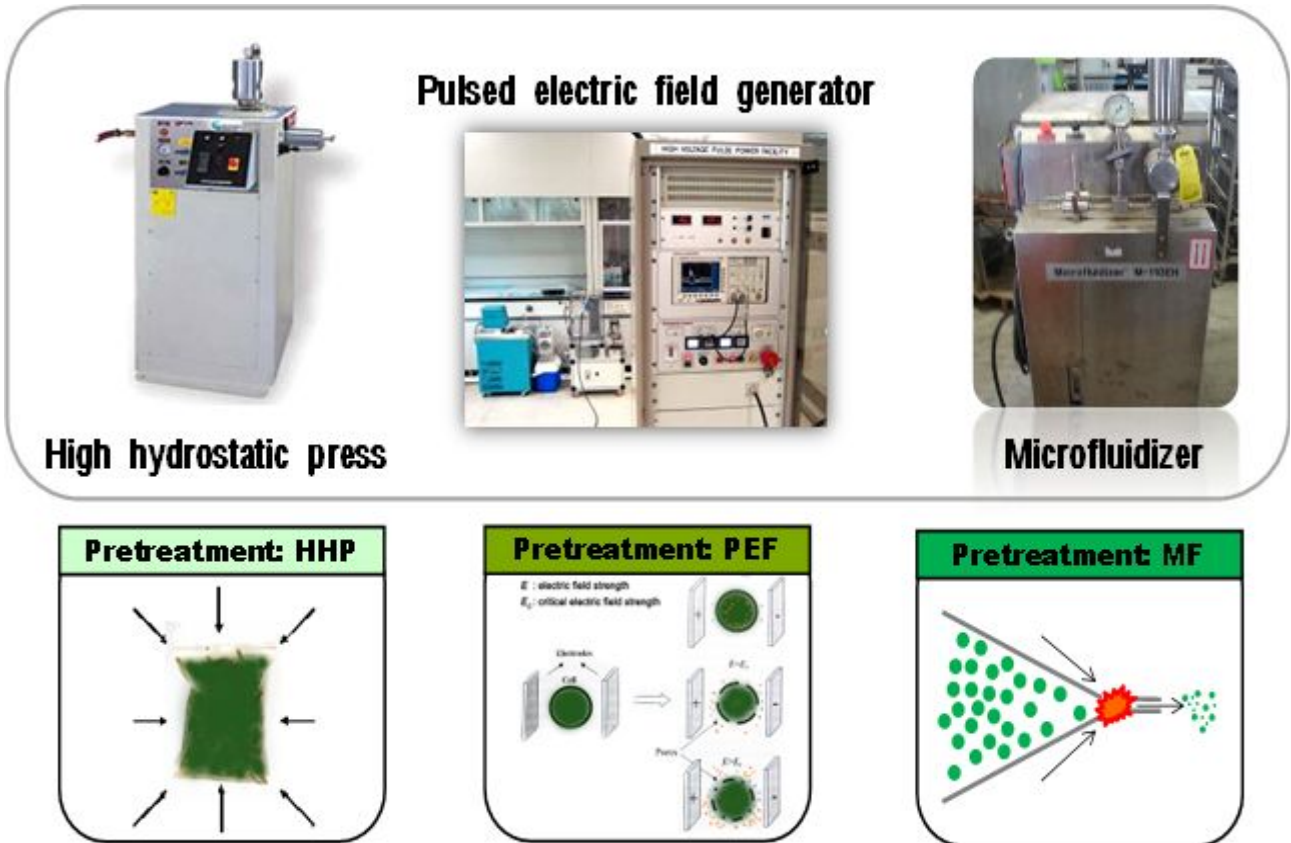


그림 15. 핵심전략 (2): 물리적 처리를 통한 클로렐라의 루테인 생이용성 증대기술 개발  
 HHP: high hydrostatic press, PEF: pulsed electric field generator, MF: microfluidizer

연구수행 단계를 크게 1) 최적시료 선정, 2)활성 xanthophyll 획득, 3) 활성검증, 4)제품화 4단계로 나누고 각 단계별 핵심기술을 선정하여 최종 제품에 고부가가치를 창출할 수 있도록 추진하였다.

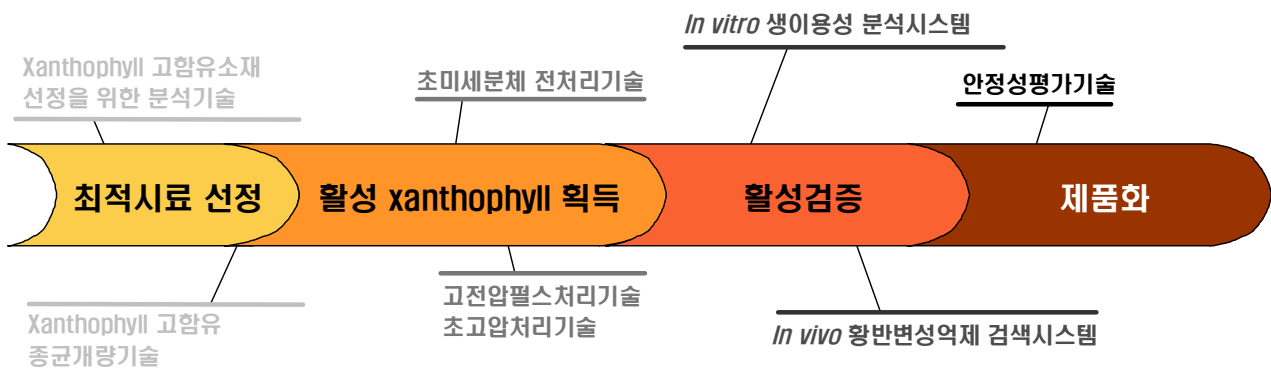
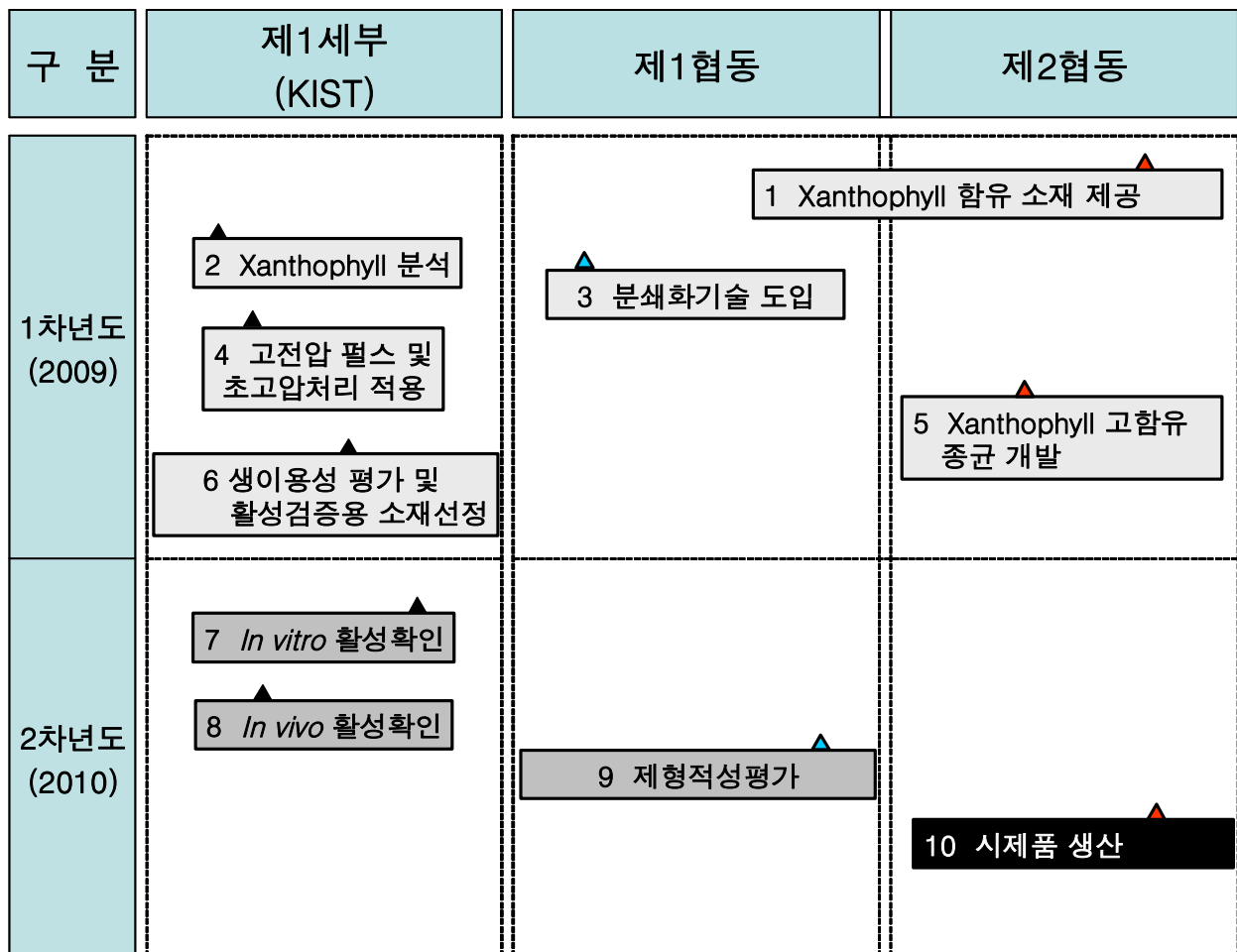


그림 16. 단계별 핵심기술

### 3. 연구추진체계

연구를 추진함에 있어 총 2차년도 동안 각 기관별로 표 7과 같은 단계로 서로 유기적으로 협동 연구를 수행할 수 있도록 하였다. 제2협동기관인 대상 연구소에서 제공하는 소재들에 대하여 제1세부기관인 한국과학기술연구원과 제1협동기관인 중앙대는 고전압 펄스, 초고압 처리, 분쇄화 등의 물리적 가공 처리를 수행하였으며 이 과정에서 모든 xanthophyll 류의 분석은 한국과학기술연구원에서 전담하여 진행하였다. 3개 기관의 협력을 통해 선정된 xanthophyll 고함유/생이용성 향상 소재에 대해서 생이용성 평가와 활성검증을 수행하기 위해 in vitro, in vivo 실험이 이루어졌고 최종제품화를 위해 실험에서 사용한 기술의 최적화와 제품의 제형적성평가를 중앙대에서 수행하였다. 최종적으로 대상 연구소에서 황반변성 억제 활성을 가지는 시제품을 생산하였다.

표 7. 기관별 연구추진체계



## 제 2 절 연구범위 및 연구수행 방법

각 기관별 연구범위와 연구수행방법, 세부내용은 다음과 같다.

### 1. 제1세부: 한국과학기술연구원

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
Xanthophyll 정량분석	HPLC Spectrophotometer	lutein, zeaxanthin의 이미 알려진 absorption coefficient 값과 HPLC 크로마토그램을 이용하여 시료 내 xanthophyll 함량을 결정함.
미세조류로부터 루테인 추출	Maceration Soxhlet Ultrasonic assisted extraction Pressurized liquid extraction	미세조류 내 lutein 함량을 측정하기 위해 다양한 추출방법을 이용하여 최적 추출방법을 결정하고 총 lutein 함량을 구함.
물리적 가공기술 적용	High hydrostatic press Pulsed electric field generator Microfluidizer	압력, 전기, 분쇄를 이용한 시료 전처리를 통해 xanthophyll 생이용성을 증진시키고자 함. (자세한 처리 조건은 세부연구 수행 결과에 기재)
위장관 모사 시스템 구축	In vitro digestion model	입, 위, 소장에서의 소화과정을 화학 반응으로 재현한 in vitro model을 이용하여 시료 내 xanthophyll의 변화를 추적함.
생이용성 연구	In vitro digestion model Caco-2 cell uptake test In vivo model	세포모델을 적용하여 in vitro digestion 시 xanthophyll 수용화의 비율을 계산하고 실제 대장세포에 흡수된 양을 계산함.
클로렐라 분쇄화 확인	Scanning electron microscope	전자현미경을 이용하여 물리적 가공처리를 거친 클로렐라를 관찰함.

## 2. 제1협동: 중앙대

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
클로렐라/나노입자의 크기 분석조건 확립	광학 현미경 Particle size analyzer Zetasizer Mastersizer Nanoparticle tracking analysis	클로렐라 분체의 크기를 측정하기 위해 nm 사이즈에서부터 um 사이즈를 측정할 수 있는 제반의 측정 장비를 이용
Microfluidization 최적화	Microfluidizer	희석, 처리압력, 처리횟수와 관련된 최적조건 탐색
재응집억제 조건 탐색	계면활성제 적용 Microfluidizer	MF 처리 후 재응집이 되는 문제를 해결하기 위해 tween 용액과 같은 계면활성제 처리효과를 확인

## 3. 제2협동: 대상

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
최적시료 선정	추출, HPLC	클로렐라, 케일, 시금치, 고추, 파프리카, 구기자 등으로부터 lutein, zeaxanthin 함량 분석.
xanthophyll 고함유 균주개발	순수분리, 배양 (5 L)	5 종의 클로렐라를 대상으로 lutein 함량 분석 후 가장 함량이 높은 균주를 대상으로 순수 분리 및 대량배양

### 제 3 절 수행결과 I: 최적소재 탐색 연구 (대상주)

#### 1. Zeaxanthin 함유소재 탐색

파프리카, 고추, 구기자, 케일, 신선초 및 해수클로렐라 (*Chlorella ellipsoidea*)를 대상으로 zeaxanthin 함량을 분석 비교하였다. 분석 결과, 단위 g 당 zeaxanthin의 함량은 해수클로렐라가 다른 원료에 비해 10-100배 이상 많은 것으로 확인되었다.

zeaxanthin 표준품과 비교를 통한 정량분석을 진행한 결과는 아래와 같다 (그림 17).

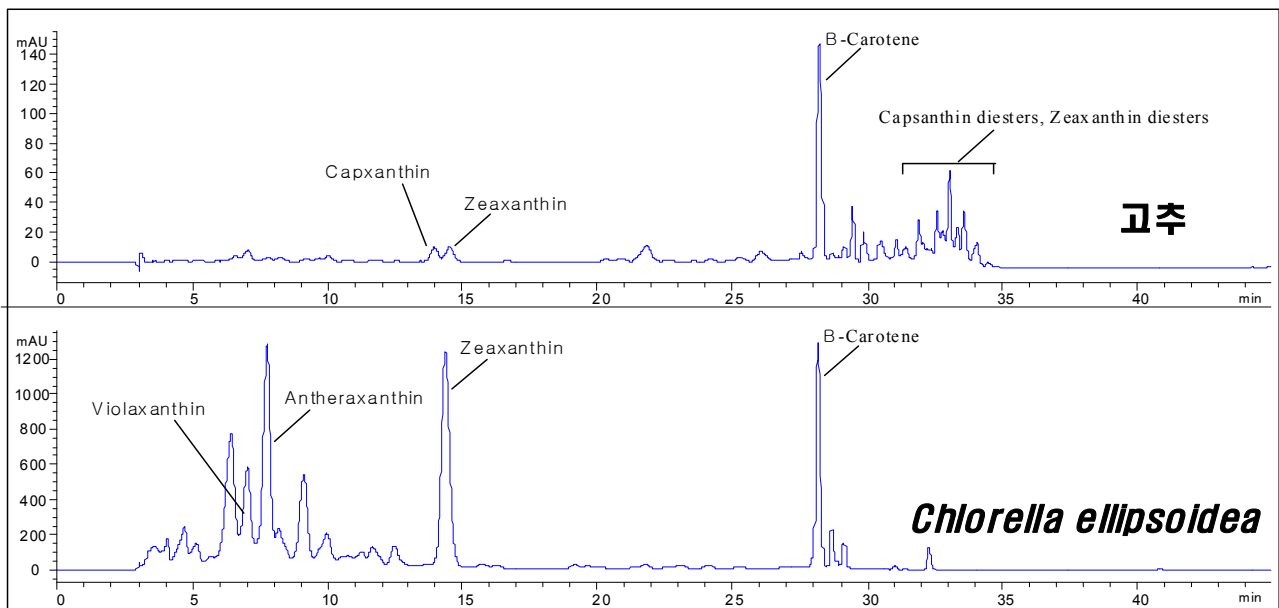


그림 17. 고추와 해수클로렐라의 주요카로티노이드 HPLC 크로마토그램

정량분석 결과, 현재 zeaxanthin의 산업적 생산을 위해 이용되고 있는 고추에 비해 해수클로렐라의 zeaxanthin 함량이 10배 이상 많음을 확인하였다. 또한, 고추에는 소화흡수력이 떨어지는 것으로 알려진 zeaxanthin diesters가 주된 형태로 존재하는 반면 해수클로렐라는 흡수가 잘 되는 것으로 알려진 free 형태의 zeaxanthin이 주성분으로 존재하기 때문에 상업적 가치가 매우 높을 것으로 사료된다.

## 2. 고 카로티노이드 균주 선별 실험

클로렐라로부터 카로티노이드를 생산하는 주요 논문 (9-15)을 토대로 xanthophyll 고 함량 균주를 선별하는 실험을 수행하였다 (표 8).

표 8. Carotenoid를 생산하는 균주 목록

균종	배양법*	축적 carotenoid	Carotenoid 농도 [mg/100g]
<i>Chlorella zofingiensis</i> ATCC 30412	H	Astaxanthin	101
<i>Chlorella zofingiensis</i> CCAP 211-14	A	Lutein	282
<i>Chlorella zofingiensis</i> CCAP 211-51	A	Lutein	235
<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-32	A	Lutein	340
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> 15-2070	H	Lutein	320
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> 15-2071	H	Lutein	190
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> HKU-003	H	Lutein	350
<i>Chlorella protothecoides</i> CS-41	H	Lutein	535
<i>Chlorella vulgaris</i> HKU-004	H	Lutein	340
<i>Chlorella vulgaris</i> 15-2075	H	Lutein	320
<i>Chlorella vulgaris</i> CS-42	H	Lutein	390
<i>Chlorella fusca</i> SAG 211-8c	A	Lutein	422
<i>Tetracystis aplanosporum</i> SAG 91.80	A	Lutein	586
<i>Tetracystis intermedium</i> SAG 94.80	A	Lutein	352
<i>Tetracystis tetrasporum</i> SAG 94.80	A	Lutein	439
<i>Dunaliella salina</i> SAG 19-3	A	$\beta$ -catorene	248
<i>Dunaliella bardawil</i> UTEX 2538	A	$\beta$ -catorene	0.8 pg/cell
<i>Muriellopsis</i> sp.	A	Lutein	555
<i>Monoraphidium braunii</i> SAG 202.7d	A	Lutein	360
<i>Neosporangiococcus gelatinosum</i> SAG 64.80	A	Lutein	720
<i>Clorococcum citrifforme</i> SAG 62.80	A	Lutein	760
<i>Scenedesmus armatus</i> UTEX 2533	A	Lutein	390
<i>Haematococcus phuvialis</i> flotow	A	Astaxanthin	4000
<i>Haematococcus phuvialis</i> flotow	A	Astaxanthin	4000

\*Note: H (Heterotroph, 유기종속영양), A (Autotroph, 광독립영양)

논문을 참고하여 대상(주)의 배양 기술 및 시설에 맞는 유기종속영양 배양이 가능하고 lutein 과 astaxanthin 생산성이 높은 균주를 선별하였다.

- *Chlorella zofingiensis* (ATCC 30412)
- *Chlorella pyrenoidosa* (Carolina 15-2070)
- *Chlorella vulgaris* (Carolina 15-2075)
- *Chlorella protothecoides* (CSIRO CS-41),
- *Chloella vulgaris* (CSIRO CS-42)

각 균주들을 배양 한 후, 각각의 콜로니 별로 성장패턴과 클로로필 함량, 녹색도, 지질 및 루테인 함량을 분석하여 최적의 콜로니를 선별하는 작업을 수행하였다. 실험의 수행은 Flask 실험 및 5L 배양 조에서 진행하였다.

1차 년도에서 논문을 토대로 선별된 루테인, 또는 아스타잔틴 고함량 클로렐라 균주인 *Chlorella zofingiensis* (ATCC 30412), *Chlorella pyrenoidosa* (Carolina 15-2070), *Chlorella vulgaris* (Carolina 15-2075), *Chlorella protothecoides* (CSIRO CS-41), *Chloella vulgaris* (CSIRO CS-42)를 검토한 결과, 대상(주)에서 기존 배양하는 클로렐라에 비해 성장속도와 바이오매스함량이 낮아 제품적용을 통한 실용화에 어려움이 있었다.

신 균주에서의 고 카로티노이드 균주 선별대신, 기존 대상(주) 클로렐라 균주 내에서의 카로티노이드 함량을 증대 시키는 방향으로 실험 진행을 변경하였다. 추가적으로, 대상(주)에서 기존 배양하는 클로렐라를 가지고 녹색도를 결정하는 실험을 진행하였으며 그것이 배지 성분 중 KNO<sub>3</sub>임을 확인하였다. 이외에 클로렐라 액상에서 분말 타입으로 변형 시킬 때 사용되어지는 Spray dry 실험을 통해 클로렐라의 녹색도를 결정하는 조건을 확립하여 특허 1건을 출원하였다.



### 3. Xanthophyll 함량 증대를 위한 균주 개량 실험

본 연구에 사용된 클로렐라 균주는 대상(주)에서 배양 및 관리해 온 균주로 암 배양 조건에서 실험을 진행하였다. 고루테인 생산 우수 종자의 선별을 위해 순수 분리 및 인위적인 돌연변이 원 (UV, NTG) 처리를 통한 우수 종자 선별을 수행하였다.

NTG 돌연변이는 DNA상에서 guanine과 thymine의 수소결합에 alkylation을 일으켜, AT→GC, GC→AT로 유전자의 염기서열을 변화시키는 원리를 이용하였다. NTG 돌연변이의 처리농도는 100 $\mu$ g, 200 $\mu$ g, 300 $\mu$ g, 400 $\mu$ g, 500 $\mu$ g로, 처리시간은 10분, 20분, 30분으로 조건별 돌연변이 처리하였다. 처리한 결과는 아래그림에 나타내었다 (그림 18).

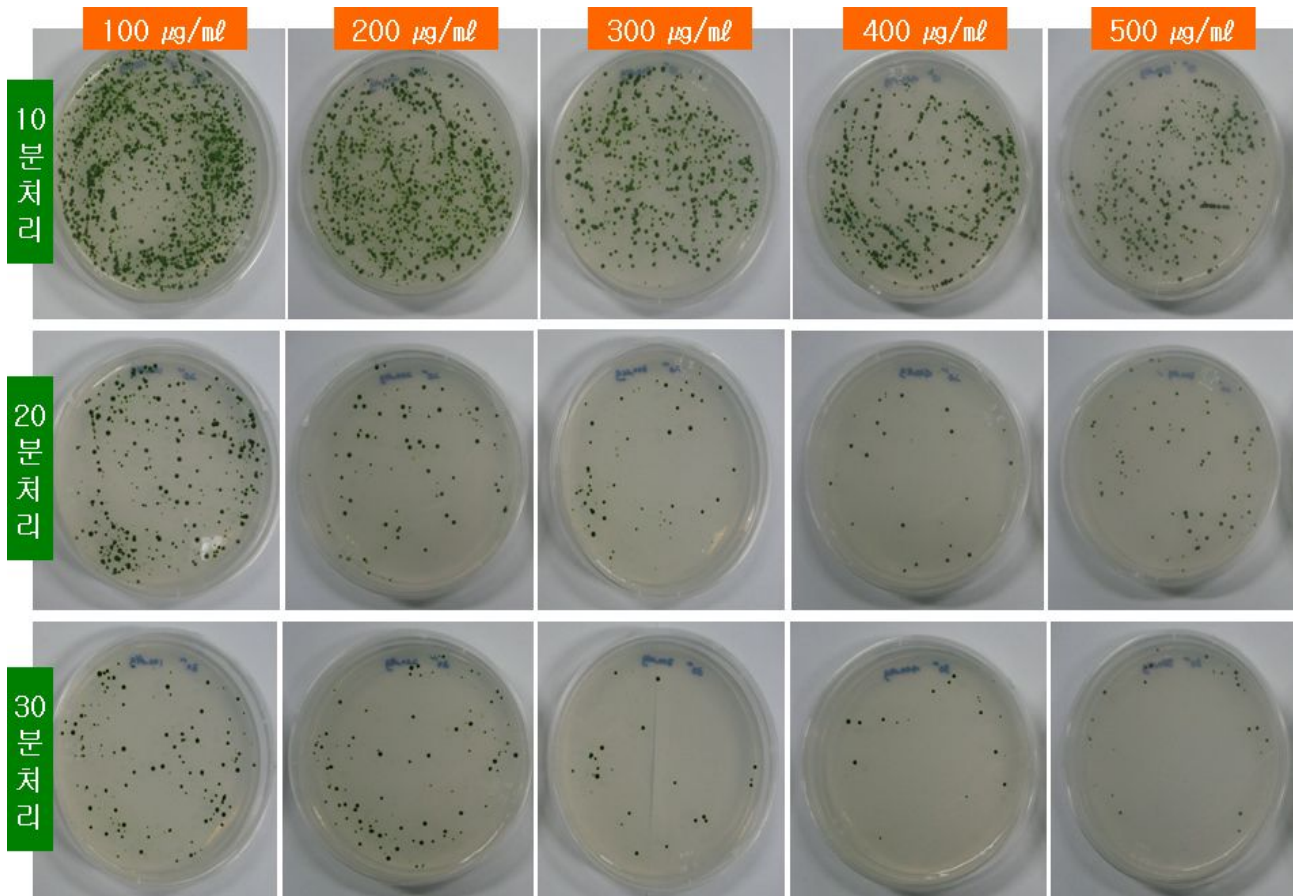


그림 18. 클로렐라를 농도별(100에서 500 $\mu$ g/ml), 시간별(10에서 30분) NTG 돌연변이 처리 결과

NTG 돌연변이 처리의 적정 조건은  $300\mu\text{g/ml}$  농도에서 20분 처리하는 것이 바람직한 것으로 판단된다. 정해진 NTG 돌연변이 조건으로 처리한 뒤, 24개의 단일 콜로니를 분리하여 생육 및 생산성에 대한 분포를 flask에서 배양하여 확인하였다 (그림 19).

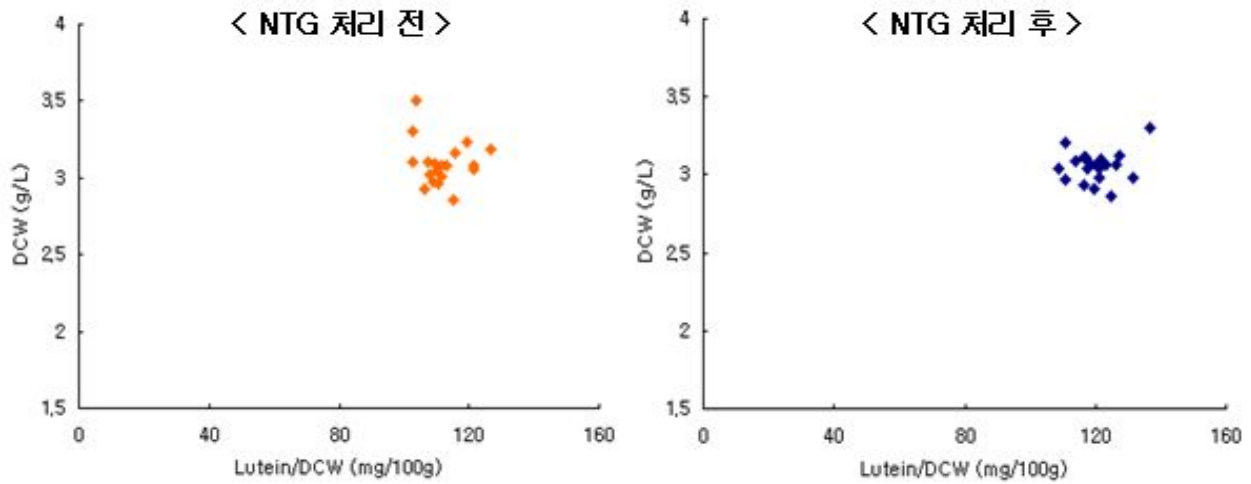


그림 19. NTG 처리 전, 후 균주의 생육 및 루테인 생산성 분포

건조 균체량은 NTG 처리 전은 평균 3.06 g/L, NTG 처리 후는 평균 3.00 g/L 이었으며, 단위균체당 루테인 생산성은 NTG 처리 전은 111.28 mg/100g, NTG 처리 후는 120.08 mg/g 으로 7% 정도 향상되는 것을 확인하였다. 이것으로 볼 때, 루테인을 생산하는 클로렐라에 대한 NTG 처리는 균체량의 변화에는 크게 영향을 미치지 않았고, 단위균체당 루테인 생산성의 향상은 어느 정도 있었지만, 오차 범위에 속하는 정도 이므로 NTG 처리를 통해 단위 균체당 루테인 생산성이 변화된 균주를 개발하는 데는 루테인 생산성 향상에 대한 한계가 있음을 알 수 있었다.

#### 4. Xanthophyll 함량 증대를 위한 클로렐라배지 성분 영향 확인 실험

배지 성분이 클로렐라의 생육이나 클로로필의 함량에 미치는 영향을 알기 위해 CR 배지 성분을 하나씩 제거한 배지를 이용하여 클로렐라를 배양한 결과를 다음에 나타내었다 (그림 20).

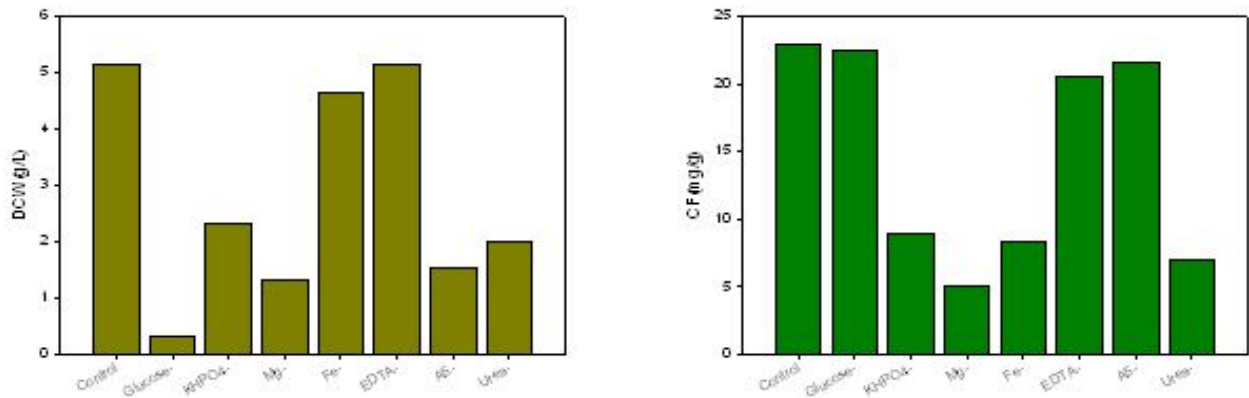


그림 20. CR 배지성분의 제거에 대한 건조 균체량과 클로로필 함량

FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O와 금속이온들의 침전을 막기 위해 첨가된 EDTA는 제거하여도 control (대조군)보다 당이 먼저 고갈되었으며, 균체량도 대조군과 비슷하게 나타났다. EDTA는 클로로필 함량도 control과 비슷하게 나타나 클로렐라의 생육과 클로로필 함량에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O는 클로로필 함량이 8.4 mg/g으로 22.44 mg/g 인 control에 비해 현저히 낮게 나타나 클로렐라의 생육에는 영향을 미치지 않지만 클로로필 함량에 영향을 미침을 알 수 있었다.

미량성분 (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub> MoO<sub>4</sub>)으로 이뤄진 A5 solution은 클로로필 함량은 비슷하게 나타났으나 균체량이 낮게 나타나 클로로필 함량보다는 클로렐라의 생육에 영향을 미침을 알 수 있었다. 질소원인 urea, pH완충제 역할을 하는 KHPO<sub>4</sub> (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)나 클로로필의 구성요소인 MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O이 제거된 경우에는 이 성분들의 부족이 클로렐라의 생육을 저해해 균체량이 낮고 클로로필 함량도 낮게 나타난 것으로 볼 때 클로로필 합성에도 영향을 미치는 것으로 판단된다. 질소원과 탄소원은 모든 생물에 있어 필수 성분이므로 이들 성분의 부족에 의한 생육의 저해는 당연한 결과라 생각된다. 또한 질소원으로 사용된 urea와 KHPO<sub>4</sub> (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) CR배지에서는 pH 완충작용을 하는 성분으로 생각되며 이들 성분의 제거로 배양에 알맞은 pH조건이 형성되지 않아 종자의 생육이 이루어지지 못하고 클로로필의 함량도 감소한 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 바탕으로 탄소원인 glucose와 질소원인 urea를 제외한 배지 성분 중  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  및 A5 solution이 균체량과 클로로필 함량에 영향을 미친다고 판단하여, 이 세 가지 배지성분의 농도를 2배로 제조하여 배지성분 강화에 대한 영향을 알아보았다 (그림 21). 당의 소비는 모두 control과 비슷하거나 더 빨리 고갈되었다. 그러나 예상과 달리 균체량과 클로로필 함량의 큰 증가는 없었다.

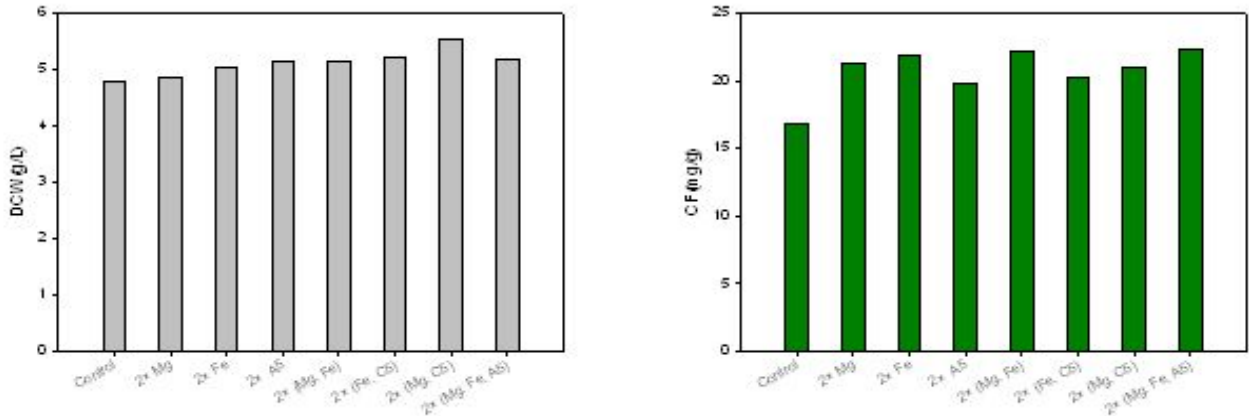


그림 21. CR배지성분의 강화에 대한 건조 균체량과 클로로필 함량

배지조성은 클로렐라의 생육에 있어 개별적인 영향도 미치겠지만, 각 배지 성분 간의 상호작용을 통하여 동시다발적 영향을 미칠 것이라 사료된다. 각각의 성분을 하나씩 제거해 클로렐라 생육 및 클로로필 함량 차이를 실험해본 위의 결과를 바탕으로  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  및 A5 solution이 균체량과 클로로필 함량에 영향을 미칠 것이라 예상하며, 각 배지 성분 간의 상호작용 관계를 파악하여 카로티노이드 함량을 증대시키기 위하여 최적의 배지조성 비율을 구하기 위하여 통계학적 실험 설계를 실시하였다.

## 5. Xanthophyll 함량 증대를 위한 배양배지 최적화 실험 (통계학적 실험 설계)

반응요인설계 (Fractional Factorial Design, FFD)를 통한 클로렐라 내 Xanthophyll 함량 증대를 위한 배양배지조건을 설정하였다. 배지의 조성성분을 요인설계를 통하여 독립적인 영향과 상호작용의 영향을 고려하여 루테인 함량에 영향을 주는 성분을 선별해 내기 위한 실험을 진행하였다. 각 배양플라스크에서 다른 시약의 배지배양 조건으로 10개의 중심점을 포함한 42개의 조건으로 클로렐라 플라스크 배양 실험을 수행하였다 (그림 22).

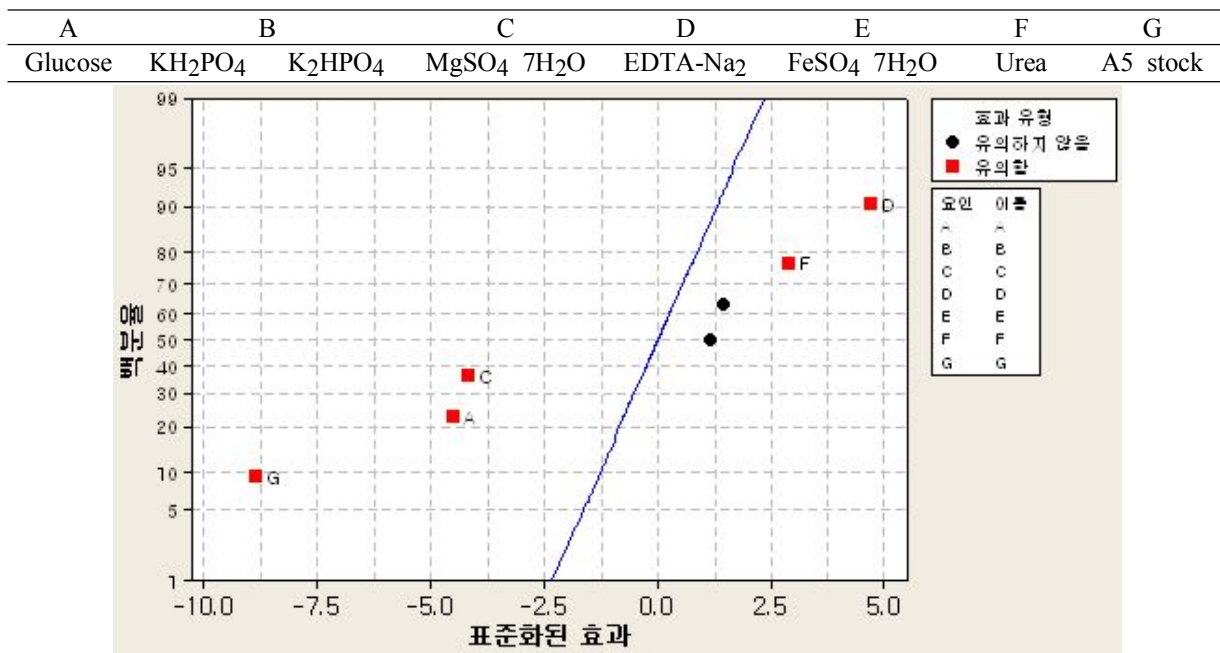


그림 22. 표준화된 효과의 정규 확률 플롯 (Lutein, P<0.01)

클로렐라 배양배지의 각각의 시약에 대하여 반응요인설계 실험을 수행하여 Xanthophyll 함량에 영향을 미치는 영향인자 5가지 (Glucose, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, EDTA-Na<sub>2</sub>, Urea, A5 stock)를 선별하였다. 이 결과는 상기 각 조성을 하나씩 제거하고 실험한 결과와 유사하였다. 이를 바탕으로 각 배지성분은 상호 작용을 통하여 클로렐라의 생육에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

반응표면분석 (Central Composite Design, CCD)을 통한 클로렐라 내 Xanthophyll 생산 최적 배양배지조건을 설정하였다. 반응요인설계 (FFD)를 통해 확인된 영향인자 5가지 (Glucose, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, EDTA-Na<sub>2</sub>, Urea, A5 stock)에 대하여 클로렐라 내 Xanthophyll 생산을 위한 최적 조건을 확인하였다 (배양배지 함량).

기존배지의 성분비 EDTA (g) : MgSO<sub>4</sub> (g) : A5 (ml) = 1 : 6 : 20

최적배지의 성분비 EDTA (g) : MgSO<sub>4</sub> (g) : A5 (ml) = 1 : 8 : 12

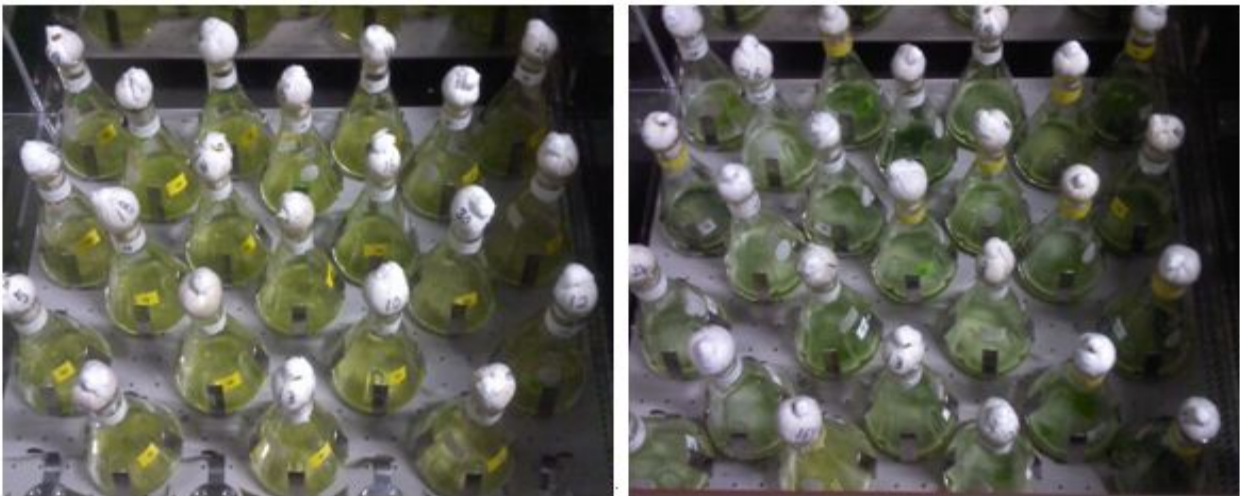


그림 23. 반응표면분석설계를 바탕으로 클로렐라 배양

변경된 배지 (고루테인 생산배지)에서 성장한 클로렐라의 채도가 진해지는 것을 확인하였다. 이는 클로렐라 내 루테인의 함량이 높아짐에 따라 색소계의 변화를 주어 채도에 영향을 미치는 것이라 사료된다.

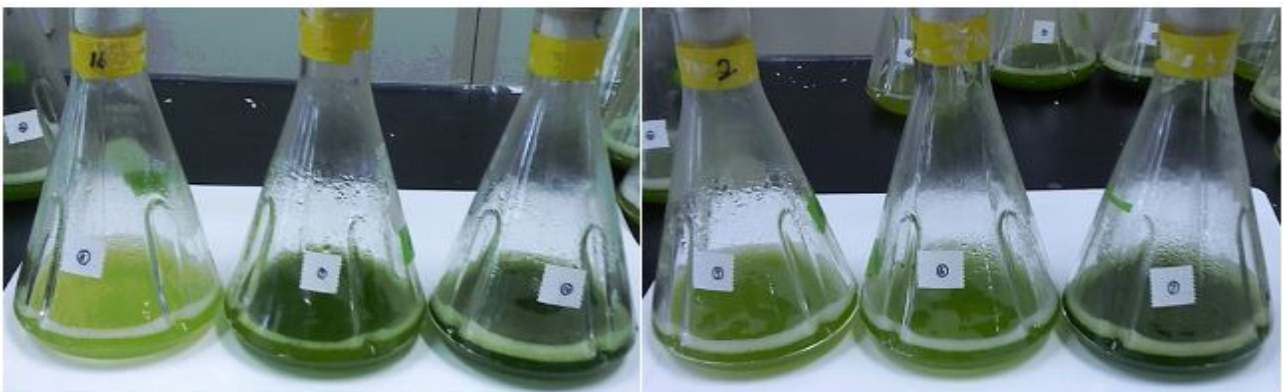


그림 24. 배지성분에 따라 클로렐라 생육 및 색소생산의 차이를 나타낸 결과

## 제 4 절 수행결과 II: 초미세 나노 분쇄화 기술 개발 (중앙대)

### 1. 나노 분쇄화 연구 수행 내용

가. 클로렐라의 습식분쇄를 통한 나노화 최적 조건의 확립

#### (1) 클로렐라 나노 분쇄를 위한 고압 균질기의 특징

고압균질기는 습식상태에서 입자 및 이물질 크기의 축소 효능이 우수한 장비이다. 나노 이물질, 세포 파쇄, 리포솜 형성 등에 사용 할 수 있는 장비로 의학 분야, 식품이나 식품첨가물 분야, 화장품과 바이오산업의 연구 생산 분야에 다방면으로 적용되고 있다 (16-20).

본 실험에 사용된 고압균질기인 Microfluidizer (Model M-110Y, Microfluidics, USA)는 diamond coating된 Z-type의 마이크로 채널을 장착하고 있어 이물질 등 액체의 처리보다 클로렐라와 같은 고체의 분쇄 및 크기 저감화에 유리하도록 제작되어 있다.

Microfluidizer의 주요 구성부분은 유체를 고압으로 가압하게 되는 intensifier pump, 그리고 가압된 유체가 처리되는 interaction 챔버이다 (그림 25). 현재 보유 장비인 Microfluidizer는 외부에 설치된 20마력의 air compressor 와 intensifier를 이용하여 최대 138 MPa의 압력 사용이 가능하다.

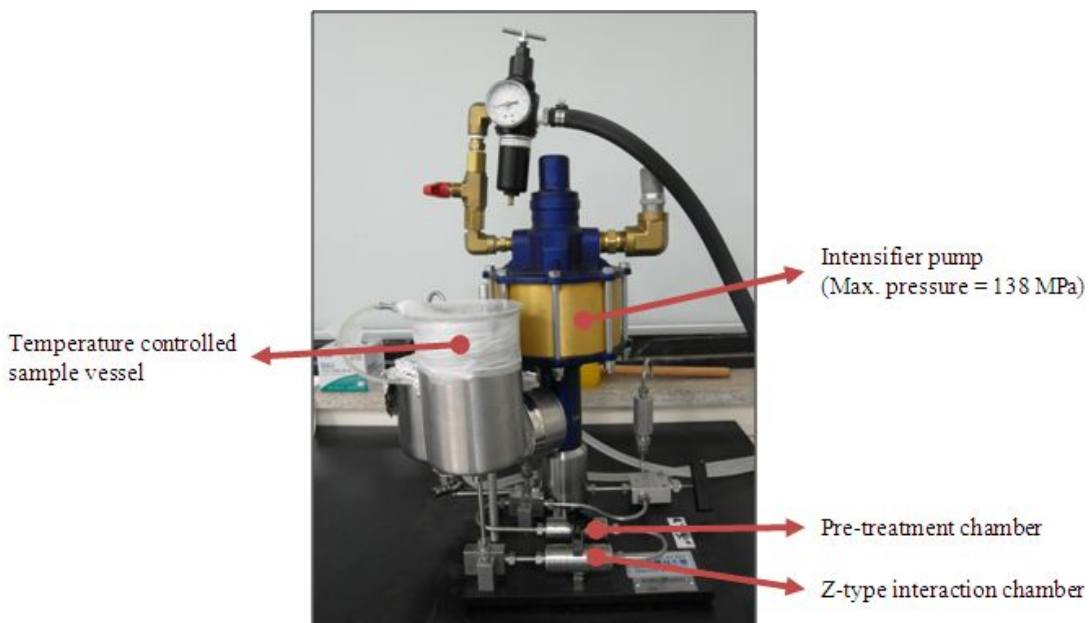


그림 25. Microfluidizer Model M-110Y, Microfluidics, Newton, USA

(2) 클로렐라/나노 입자의 크기분석 조건 확립

(가) 클로렐라 시료의 광학 현미경 관찰

- ① 연구 대상 시료인 클로렐라의 형태를 광학현미경 (Eclipse, Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다 (그림 26).
- ② 관찰된 클로렐라를 참고자료 (그림 27)와 비교 했을 때 유사한 형태를 띠었으며 크기는 약 2-3  $\mu\text{m}$ 로 관찰되었다.

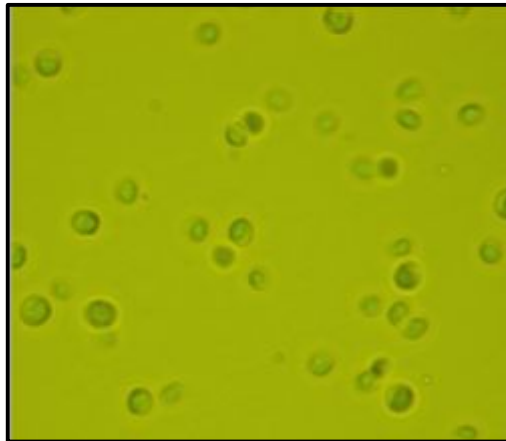


그림 26. Untreated *Chlorella vulgaris* (x1000)

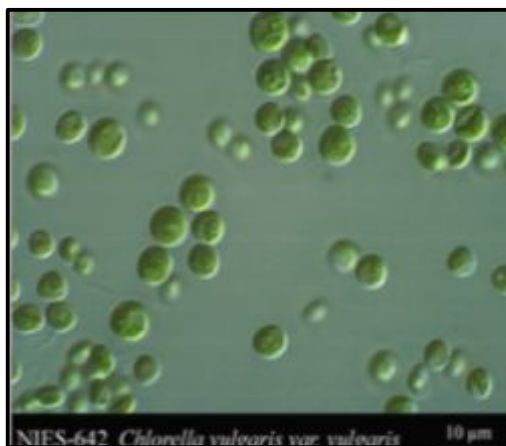


그림 27. *Chlorella vulgaris* (from <http://www.bae.uky.edu>)



(나) PSA를 이용한 나노 입자 분석

- ① 그림 28의 장비는 laser diffraction particle size analyzer (Model 11320, Beckman, Brea, USA)로 0.02 - 2000  $\mu\text{m}$ 의 측정 범위를 가지고 있다.
- ② PSA를 이용하여 고압균질 이전 클로렐라를 측정하였을 때 size distribution curve는 그림 29와 같다. 측정 결과 평균 입도가 3  $\mu\text{m}$  정도 알려진 클로렐라의 크기와 일치함을 확인 할 수 있었다.



그림 28. Laser Diffraction Particle size Analyzer 11320

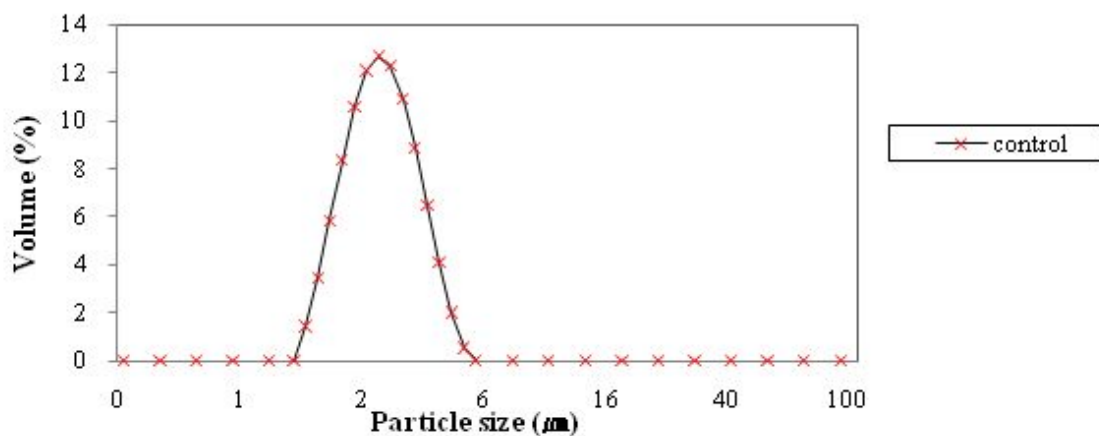


그림 29. Size distribution of untreated chlorella control

(다) Mastersizer를 이용한 나노 입도 분석

- ① 그림 30의 장비는 mastersizer 2000 (Malvern, UK)으로 측정 범위가 0.2-2000  $\mu\text{m}$ 로 광범위한 범위의 size 측정이 가능한 장비이다. 또한 Pump/stirrer가 장착되어 있어 일정하게 시료분산을 유지시켜 주며 ultrasonication이 분산을 도와준다.
- ② 희석 조건별 고압균질 처리된 (103 MPa, 10 cycle) 현탁액을 mastersizer 2000으로 측정한 결과는 그림 31과 같다.
- ③ Control과 비교하였을 때 고압균질 처리 후 size는 nm영역과  $\mu\text{m}$ 영역 전반에 걸쳐 측정되었다.

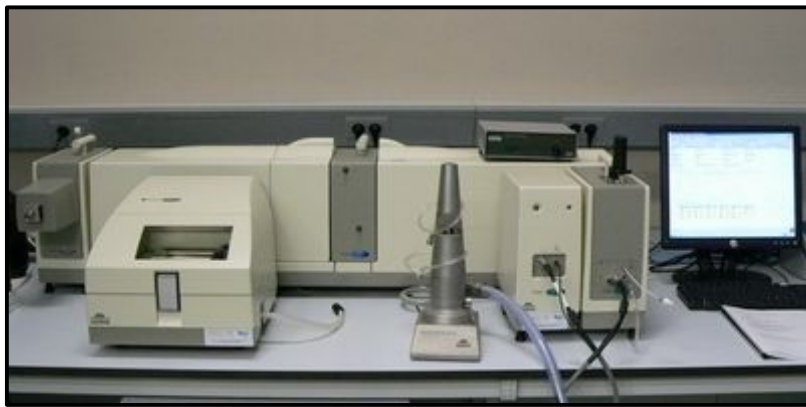


그림 30. Mastersizer (Mastersizer 2000, Malvern, UK)

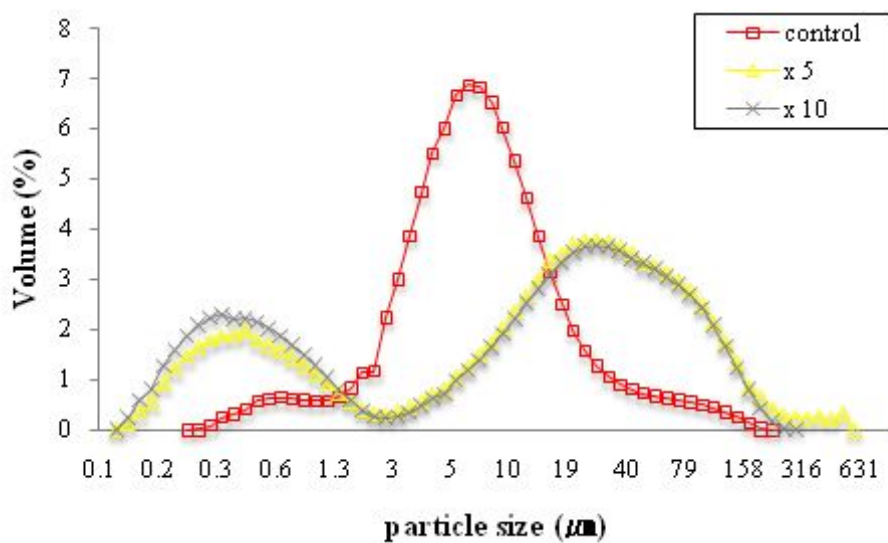


그림 31. Particle size distribution of chlorella nanodispersion prepared by microfluidization technique (103 MPa, 10 cycles)with different dilution

(라) Zetasizer를 이용한 나노 입자 분석

- ① Size 및 zeta potential 모두 측정 가능한 장비는 Zetasizer Nano ZS (Malvern, England)로 0.6 nm - 6  $\mu\text{m}$ 의 size 측정이 가능하다 (그림 32). 처리 전 클로렐라와 처리 후의 나노 입자 크기 모두 측정 가능 범위로 본 실험의 주요 입도 측정 장비로 사용하였다.



그림 32. Zetasizer Nano ZS

② 동일한 희석 조건에서의 압력과 통과 횟수에 따른 size 측정 결과는 표 9와 같다.

표 9. Particle size data for chlorella sub-micron suspension prepared by different microfluidization cycle and three different pressures

Pressure (MPa)	Cycle	Z-Average (d.nm)	PDI
0	0	2226±108	0.185±0.06
	1	2056±171	0.272±0.02
	5	1664±178	0.429±0.09
40	10	1251±110	0.440±0.03
	1	1713±315	0.406±0.07
	5	729±46	0.490±0.04
80	10	622±26	0.468±0.02
	1	1125±32	0.484±0.02
	5	658±53	0.460±0.04
120	10	604±13	0.452±0.10

(마) NTA를 이용한 나노 입자 분석

- ① Nanosight LMO NTA system (quotation, UK)은 10 nm - 1000 nm의 측정 범위를 갖는 장비이다 (그림 33).
- ② 나노 입자 분석을 실시간 시각화하며 이미지 분석은 입자들이 격렬히 분산된 것과 브라운 운동의 측정을 통하여 입자 크기를 전체 평균치로 가정하지 않고 실효치의 입자를 분석 할 수 있다.
- ③ 처리 즉시 측정이 가능하기 때문에 입도 측정을 수행하였고 그 결과는 그림 34와 같다. Nanosight의 경우 1  $\mu\text{m}$  이하에서만 측정이 가능하기 때문에 클로렐라 control과 1  $\mu\text{m}$  이상의 파쇄물 측정이 불가능하여 본 연구목적에는 부합하지 않았다.

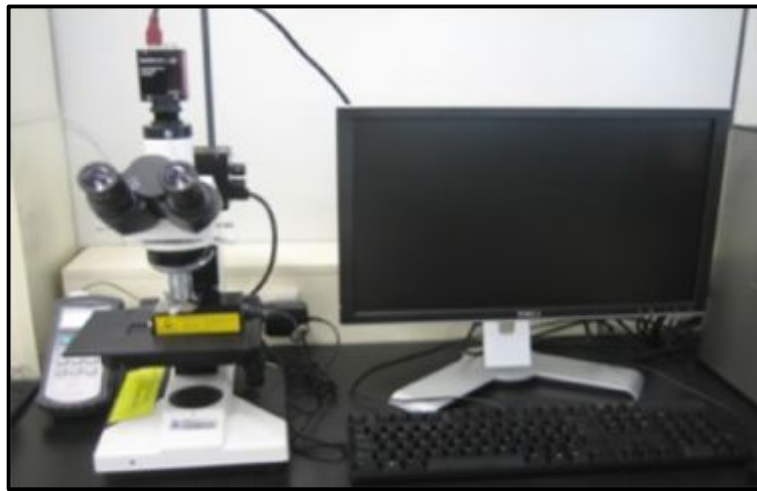


그림 33. NanoSight Nanoparticle Analysis

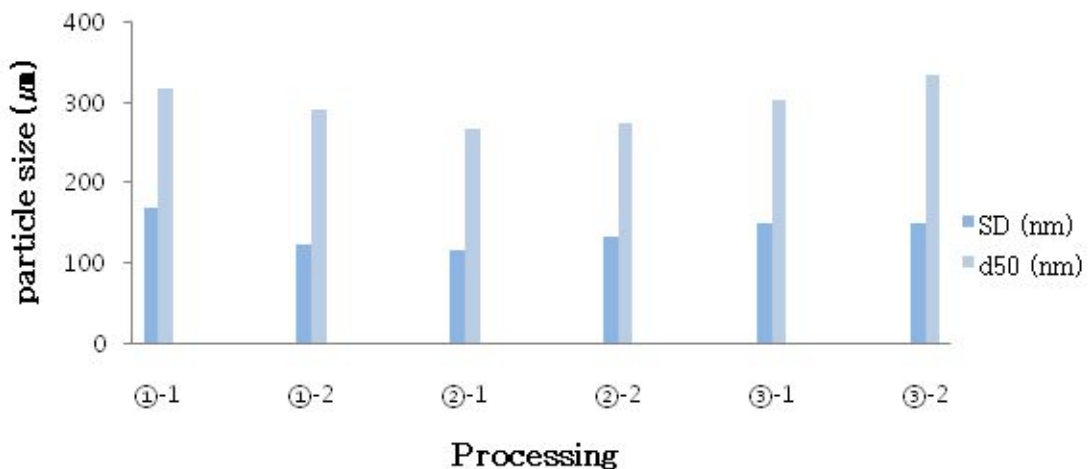


그림 34. Particle size of the tween 20 according to the processing mode

(3) 클로렐라 나노화를 위한 MF 조건 최적화

- ① 동일 압력과 통과 횟수 (124 MPa, 10 cycles) 조건에서 control부터 20배까지 희석 조건에 변화를 주어 고압균질 처리한 결과는 그림 35와 같다.

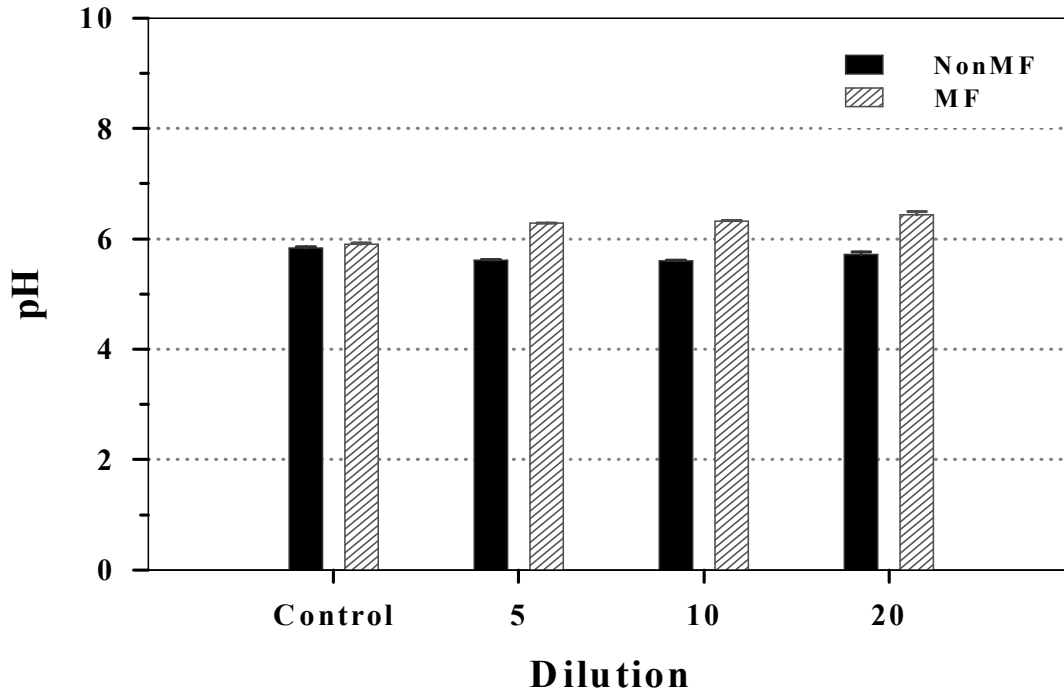


그림 35. Measurement of pH according to Dilution and Microfluidization processing

- ② 고압균질처리가 고압균질처리 하지 않은 것보다 pH가 상승하였다. 이것은 클로렐라가 가지고 있는 중성 물질이 고압균질 처리 시 세포벽이 파쇄 되면서 cytosol이 용출 되어 pH가 상승한 것으로 판단된다.
- ③ 고압균질 처리 시 conductivity의 측정결과 그림 36 에서와 같이 pH와 마찬가지로 증가 하였다. 이는 cytosol 용출로 이온들이 빠져 나오게 되어 conductivity가 상승한 것으로 판단된다.

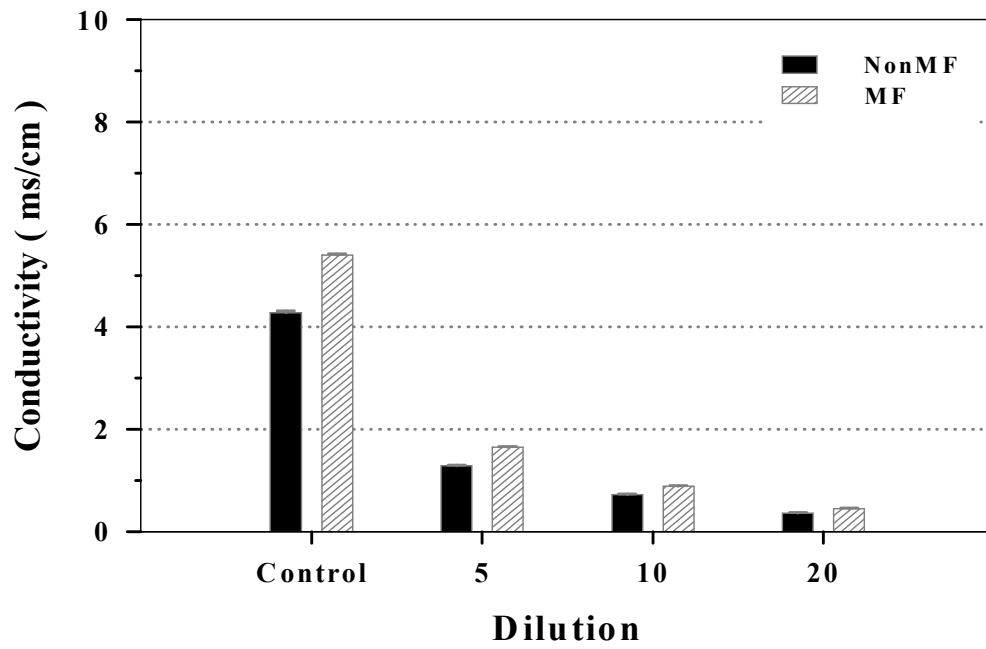


그림 36. Measurement of conductivity according to Dilution and Microfluidizer processing

(4) 가열처리 클로렐라 배양액의 나노화를 위한 MF 공정 조건 최적화

① MF 조건 최적화를 위한 첫 번째 공정변수 : 클로렐라 용액의 희석 (Dilution)

㉞ 동일 압력과 통과 횟수에서의 희석 조건에 따른 입도 측정 결과 그림 37과 같다.

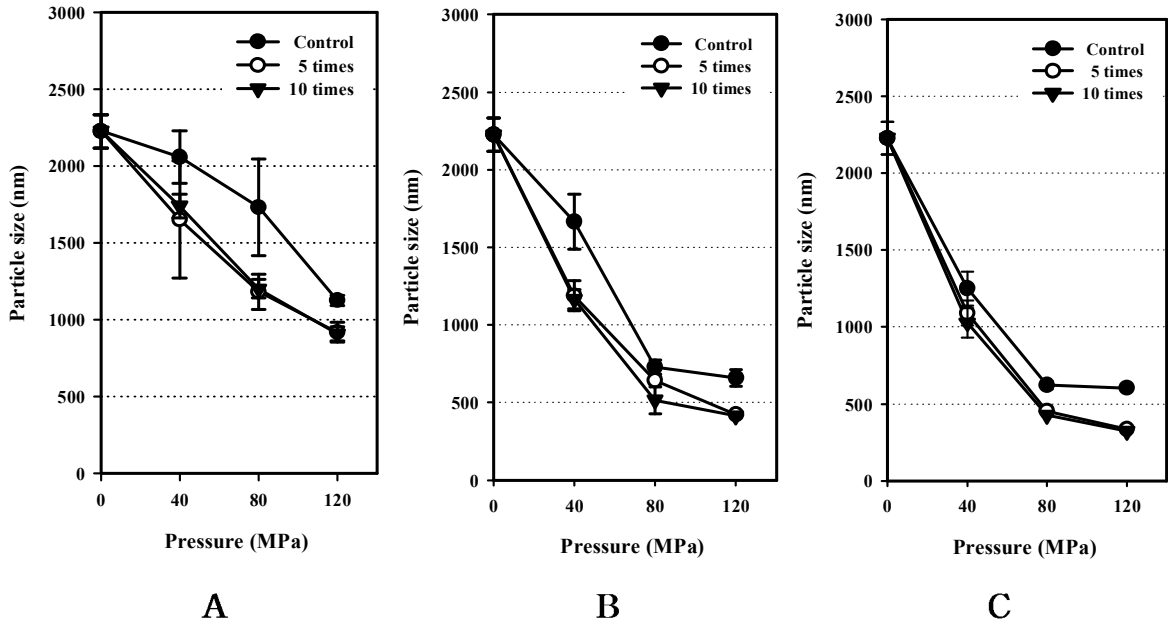


그림 37. Particle size distribution of chlorella sub-micron suspension by microfluidizer form different pressures and dilution. (A:1 cycle, B:5 cycles, C:10 cycles)

- ㉞ 희석하지 않은 control은 각각 5배와 10배 희석한 시료에 비해 동일 압력 조건일 때 상당히 입자 size 감소에 영향을 주는 것으로 나타났다.
- ㉞ 5배와 10배 희석에 따른 입자 size 감소의 차이는 거의 발견되지 않았다. 이것은 곧 희석을 많이 할수록 입자 size가 비례하여 감소하는 것은 아니며 더 이상 효과를 증가시킬 수 없는 적정 희석 배수가 있다는 것을 의미한다.
- ㉞ 희석 조건은 10배와 5배 희석간의 차이가 미미하므로 한 번에 보다 많은 양의 클로렐라를 처리할 수 있는 5배 희석 조건이 산업적 생산에 보다 적합할 것으로 판단된다.



② MF 조건 최적화를 위한 두 번째 공정변수 : 처리 압력 (Pressure)

㉑ 동일 희석 배수와 통과 횟수조건에서 압력 조건 변화를 통한 입도 측정 결과는 그림 38과 같다.

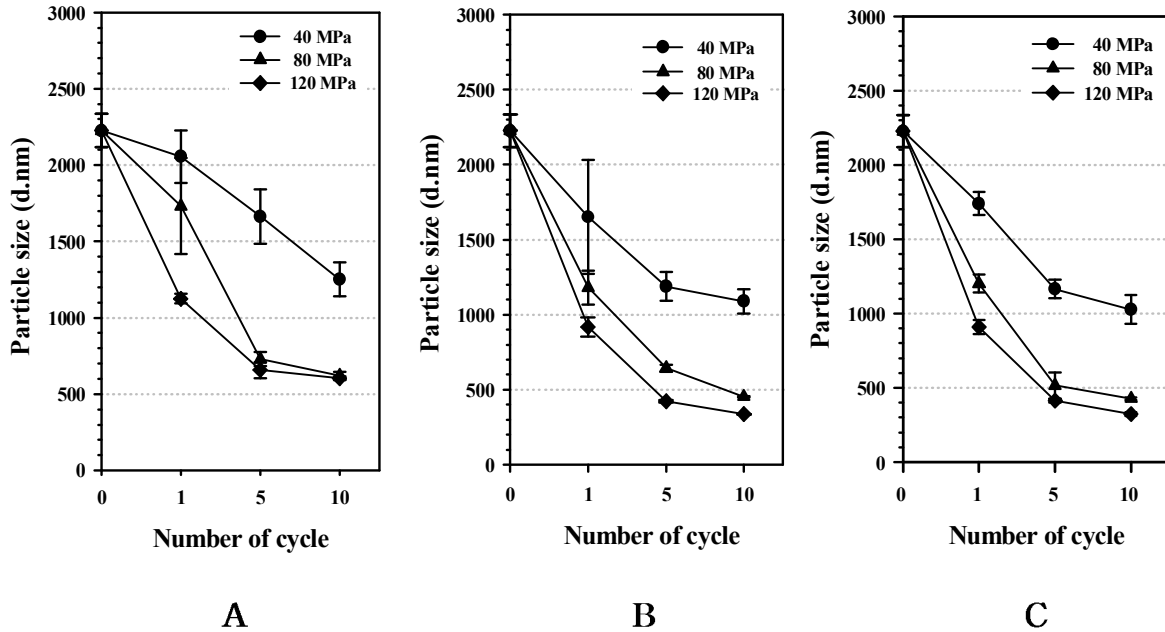


그림 38. Particle size distribution of chlorella sub-micron suspension by microfluidizer form different pressures and number of cycle. (A:Control, B:5 times, C:10 times)

- ㉒ 앞선 결과에서 가장 효율적인 것으로 판단된 5배 희석 조건을 고정한 채 압력에 변화를 주어 최적의 크기 저감화 조건을 탐색하고자 하였다.
- ㉓ 압력별 입자 size의 감소는 현저한 차이를 보여주고 있다. 가장 낮은 압력인 40 MPa에서는 입자 size가 control과 비교 하였을 때 크기 감소의 정도가 가장 적었다. 반면 80 MPa과 120 MPa은 각각 1 cycle만 처리하여도 control의 절반 size이하로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- ㉔ 압력에 따른 클로렐라 입자의 크기 감소를 살펴볼 때, 80 MPa 과 120 MPa 사이의 크기감소 효과가 크지 않아 80 MPa 로 처리하는 것이 보다 경제적인 방법으로 판단되었다.

③ MF 조건 최적화를 위한 세 번째 공정변수 : 클로렐라 용액의 통과 횟수 (Cycle)

㉞ 동일 회석 조건에서 압력별 cycle 변화를 주어 고압균질 후 입도 측정 결과는 그림 39와 같다.

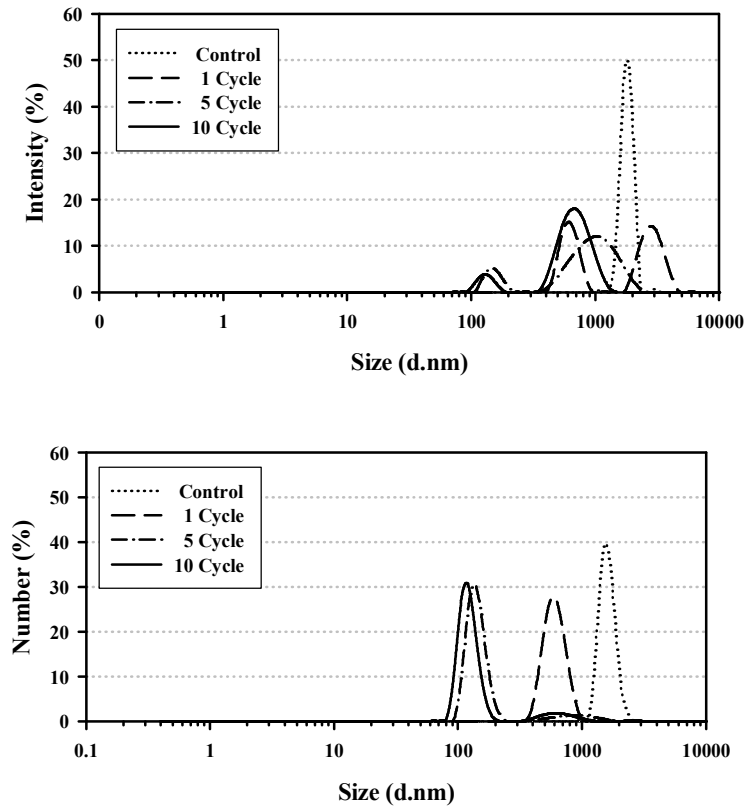


그림 39. Influence of number of cycle through the microfluidizer on particle size distribution of chlorella sub-micron suspension (120MPa)

㉞ 클로렐라 입자 크기는 cycle의 증가에 반비례하여 감소하였다.

④ 처리 이후 클로렐라 분쇄 입자의 광학 현미경적 확인

㉞ 광학현미경을 이용하여 처리조건에 따른 클로렐라 입자를 확인하였다 (그림 40).

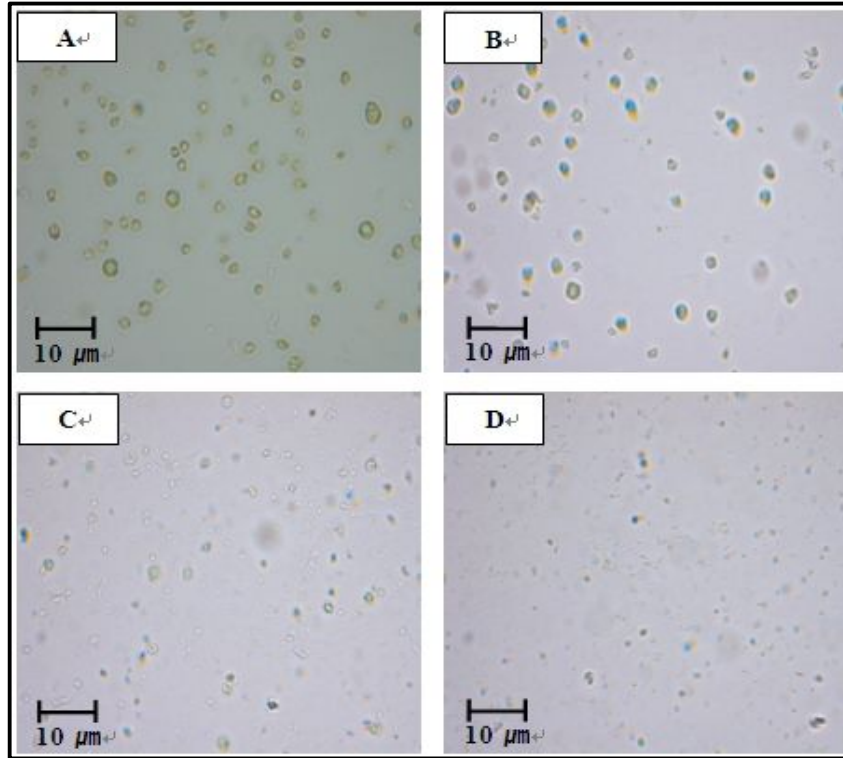


그림 40. Microscopic images of chlorella sub-micron suspension prepared by MF condition (10cycles) : (A) Control, (B) 40 MPa, (C) 80 MPa, (D) 120 MPa  
- Magnifications: 1000X (A, B), 400X (C, D)

- ㉞ 고압균질 처리 전의 모습은 구형으로 약 2~3  $\mu\text{m}$ 이다. 압력별 처리된 클로렐라는 낮은 압력에서는 분쇄되어 터진 모습과 분쇄되지 않은 형태 모두 관찰 되었다.
- ㉞ 압력이 높을수록 분쇄 효율이 향상되었고, 가장 높은 압력인 120 MPa은 거의 대부분 미세하게 분쇄되어 그 형태 관찰에 한계가 있었다.
- ㉞ 고압균질 처리 후 클로렐라는 입도 측정 결과와 광학현미경 관찰 (21) 모두 분쇄가 많이 될수록 압력과 통과 횟수에 따라 입자 size가 감소되었다.

## 나. MF 처리 조건별 클로렐라의 lutein 추출 함량 분석

### (1) 실험방법

#### (가) MF 처리 클로렐라의 분체화

- ① 클로렐라 배양액을 각 40 ~ 120 MPa 압력 조건에서 1~10 cycle 통과 횟수 변화에 따른 MF 처리 후 동결건조기 (Ilshin Lab, Korea)를 이용하여 동결 건조 후 분체는 입도 분석 및 HPLC 분석에 사용되었다.

#### (나) MF 조건에 따른 lutein 추출

- ① (가)에서 처리한 클로렐라 분말의 0.5 g에 90 % ethanol 50 ml을 첨가하여 0 ~ 120분 동안 sonication (Elmasonic S, Elma, Germany)처리 하였다.
- ② 시간 별 추출물은 Whatman No 1. 여과지를 통하여 여과시켰다. 여과된 추출물은 HPLC 분석을 위해 0.2  $\mu$ m membrane filter로 여과시켜 준비하였다.

#### (다) HPLC를 이용한 정량분석

- ① HPLC를 이용하여 chlorella가 함유하는 lutein의 정량분석은 Cha의 방법에 따라 분석하였다 (22).
- ② 클로렐라로부터 lutein 분리를 위한 HPLC system은 Dionex, Column은 YMC사의 carotenoid column (3  $\mu$ m particle size, 150 mm 4.6 mm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였으며, 검출기는 Dionex사의 DAD-3000로 Lutein은 445nm, chlorophylls은 660nm로 동시에 사용하였다.
- ③ 용매 A (methanol)와 용매 B (0.8 tert-butyl methyl ether)를 처음에 7분까지 A 용매를 100 %로 하고 7-8 분 동안은 A : B = 95 : 5, 8-20분에는 A : B = 95 : 5를 유지하다가 20-21분 동안은 A : B = 65 : 35, 21-40분은 A : B = 65 : 35로 한 뒤 54분 까지 다시 처음과 같은 A 용매 100 %와 같은 조건으로 하였다. 그리고 flow rate는 30°C에서 1ml/min로 하였다.

(2) 실험결과 및 고찰

(가) 처리 조건에 따라 동결 건조 후 획득한 클로렐라 분말로부터 루테인 추출 결과는 그림 41, 42와 같다.

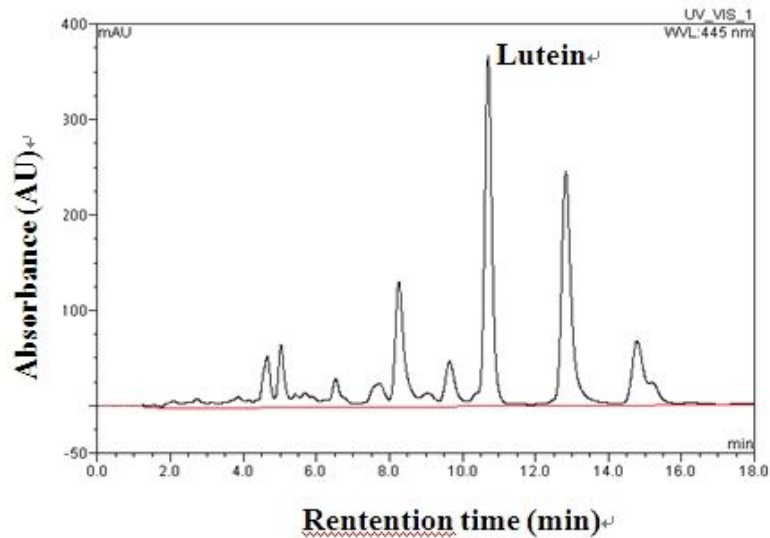


그림 41. Chromatogram of lutein obtained by extraction of chlorella with various treatment conditions

(나) 추출 시간 경과와 처리 조건에 따라 루테인 함량은 증가하였다. Control과 비교하였을 때 압력과 통과 횟수, 희석 배수 증가로 최대 약 6배 정도 높은 루테인 함량을 나타내었다.

(다) Control의 경우, 90% 에탄올로 추출 시 초음파 처리 직후 루테인이 거의 추출 되지 않았으며 30분 후 0.62 mg/g, 60분 후 0.81 mg/g, 120분 후 1.17 mg/g 으로 시간에 따라 추출량이 서서히 증가하였다.

(라) 클로렐라 원액을 고압 처리하여 크기를 저감화 시킨 샘플에서는 압력의 증가에 따라 lutein의 추출이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

(마) 클로렐라 원액을 10배 희석 한 후 압력별로 5회 통과시켰을 경우, 40 MPa의 경우 추출 시작 직후 0.61 mg/g, 추출 30분 후 3.33 mg/g 등 무처리 대조군에 비해 2배 이상 빠르게 루테인이 추출되는 것을 확인할 수 있었다.

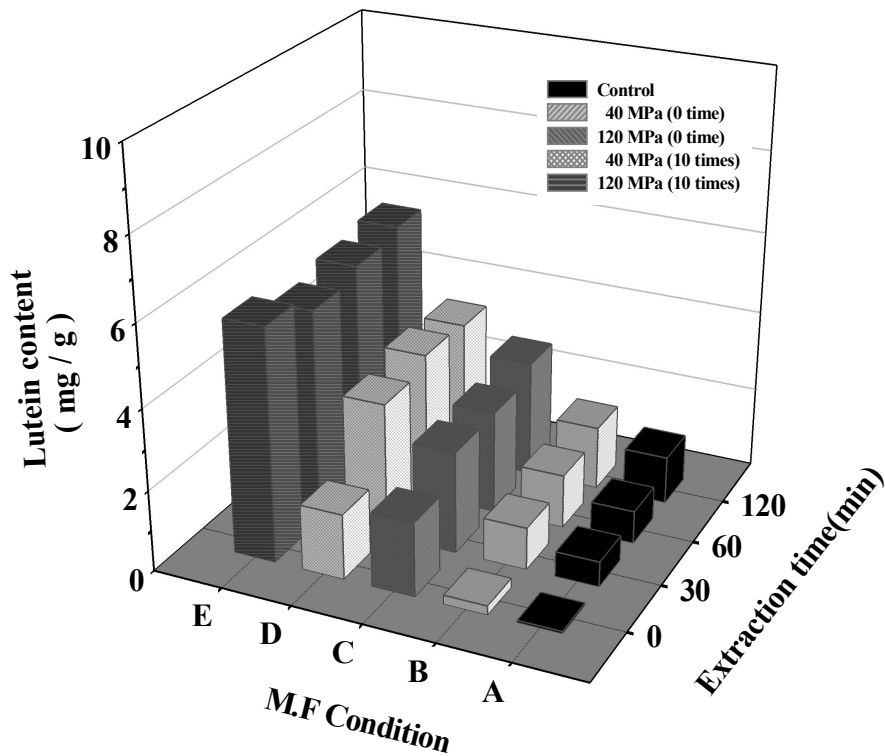


그림 42. Contents analysis of lutein by extraction time with conditions of chlorella suspension

(바) 클로렐라 원액을 10배 희석 한 후 120 MPa에서 처리하였을 때는 추출 직후 5.75 mg/g의 루테인이 검출되어 추출 용매를 넣음과 동시에 클로렐라가 함유한 루테인이 거의 최대로 추출되는 것으로 관찰되었다.

(사) 클로렐라의 단단한 세포벽, 세포막의 손상 또는 파쇄로 인한 size 감소는 루테인 추출과 매우 밀접한 관계를 갖으며 그 추출 효율을 증대 시키는데 효과적인 것으로 판단된다.

## 2. 연구개발 수행 결과 요약

- 가. 클로렐라 나노화를 위한 고압균질기의 실험 조건 최적화를 수행하였다. 클로렐라 농축 배양액을 5~10배 희석한 후 80 MPa 이상의 압력으로 5회 이상 처리하는 조건이 클로렐라의 입자 저감화에 효과적이었으며 수백 nm 영역의 평균입도를 얻을 수 있었다.
- 나. 나노화된 클로렐라의 루테인은 추출 시간과 고압균질 공정조건에 따라 추출 효율의 차이를 보였다. Control의 경우 30분의 추출시간 동안 0.62 mg/g의 루테인이 측정되었다. 반면 40 MPa 압력에서 5 cycle과 120 MPa의 압력에서 5 cycle을 30분 동안 추출한 결과 루테인 함량은 각각 0.33 mg/g과 5.27 mg/g으로 나타내서 8배 이상 효율적으로 루테인이 추출되는 것을 확인하였다.
- 다. 고압균질 공정변수인 희석, 압력, 통과 횟수에 따라 클로렐라 분쇄 정도의 효율 차이를 보였다. 클로렐라 분쇄로 인한 크기 감소는 루테인 추출 효율 증대에 효과적인 것으로 판단된다.

## 제 5 절 수행결과 III: 물리적 가공기술의 적용 및 xanthophyll 추출 및 분석 기술 개발 (한국과학기술연구원)

### 1. Xanthophyll 정량 분석법 확립 및 안정성 검증

본 연구과제에서 주요 타겟으로 하는 xanthophyll 류는 눈의 황반변도 형성에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있는 lutein과 zeaxanthin이므로 두 카로티노이드에 대한 표준품을 확보하여 HPLC를 통한 정량 분석법을 확립하였다.

- lutein (SIGMA X6250)
- zeaxanthin (SIGMA 14681)

lutein과 zeaxanthin을 분석하기 위해 HPLC 조건을 탐색한 결과 다음과 같은 조건에서 물질 분리가 가장 잘 이루어졌다.

표 10. HPLC를 이용한 카로티노이드 정량분석 조건

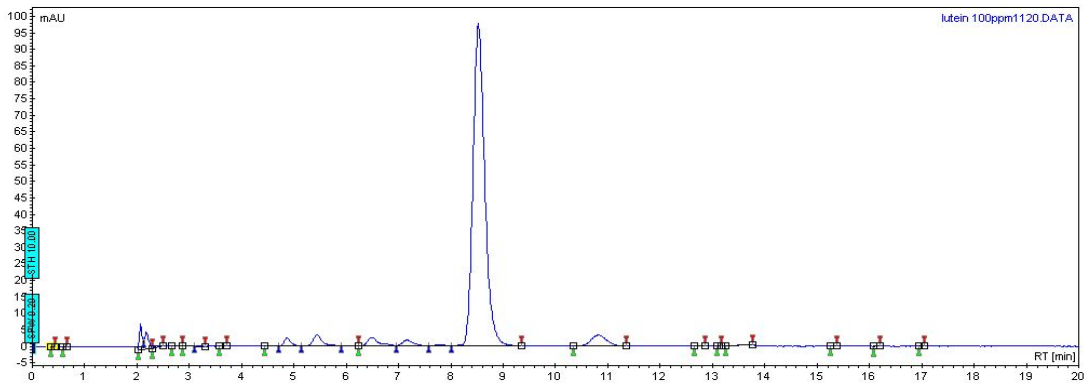
Column	YMC C30 150 X 4.6 mm, 3 μm	
Temperature	30 °C	
Injection	20 μL	
Flow rate	1 mL/min	
Time (min)	Solvents (%)	
	<i>tert</i> -butyl methyl ether	methanol
0 - 5	5	95
- 20	15	85
- 30	55	45
- 40	90	10
- 45	90	10

유기용매는 *tert*-butyl methyl ether (TBME)와 methanol을 이용하였을 때 카로티노이드의 분석이 가장 효과적이었음을 확인하였다. 분석칼럼은 카로티노이드 분석에 적합하다고 알려진 C30 칼럼을 사용하였으며 분당 1 mL의 유속으로 흐르게 하였다.



정량을 위해 lutein과 zeaxanthin의 흡광계수를 이용하여 spectrophotometer와 HPLC의 병용을 통해 분석된 피크의 양을 구하였다.

- Absorption coefficients of lutein ( $A^{1\%}_{1cm}$ ): 2550 (ethanol)
- Absorption coefficients of zeaxanthin ( $A^{1\%}_{1cm}$ ): 2348 (diethyl ether)



	Time	Quantity	Height	Area	Area %
Lutein STD 100 ppm	8.52	84.43	97.6	25.4	84.427

그림 43. 루테인 표준품 (100 ppm)의 HPLC 크로마토그램

루테인은 8.52분의 retention time에서 분석되었으며 95% 이상의 purity를 보여 표준품으로 이용하기에 적합함을 확인하였다.

Lutein, zeaxanthin 안정성과 관련된 최근 논문들에 의하면 in vitro digestion 시 lutein과 zeaxanthin의 안정성이 높은 것으로 보고되고 있음을 확인하여 루테인에 대한 안정성 테스트는 추가로 수행하지 않았다 (23).

표 11. Zeaxanthin, Lutein의 stability와 관련된 실험결과<sup>1</sup>

Time of digestion, <i>min</i>	Zeaxanthin		Lutein	
	RT	YT	RT	LB
	%			
60	92 ± 5	102 ± 4	131 ± 41	79 ± 12
120	131 ± 11	101 ± 12	149 ± 24	96 ± 26
180	113 ± 5	91 ± 8	124 ± 10	70 ± 17
240	108 ± 16	93 ± 5	127 ± 9	88 ± 31
300	124 ± 17	94 ± 5	138 ± 5*	87 ± 28

<sup>1</sup> Values are means ± SEM, *n* = 3. \*Different from 0 min (T0), *P* < 0.05.

- RT: red tomato, YT: yellow tomato, LB: lycopene beadlet

## 2. 미세조류로부터 xanthophyll 분석 및 추출

Lutein 함량이 케일, 시금치 등의 녹색 채소의 10배 이상인 것으로 알려져 있는 클로렐라로부터 xanthophyll 함량분석을 실시하였다 (그림 44). 클로렐라에는 루테인이 주 카로티노이드로 존재하고 약간의 베타 카로틴이 함께 들어있음을 확인할 수 있었다. 또한 카로티노이드 외에도 클로로필 a, b가 다량 함유되어있음을 확인할 수 있었고 클로로필의 분해산물인 pheophorbide와 pheophytin도 함께 검출되었다.

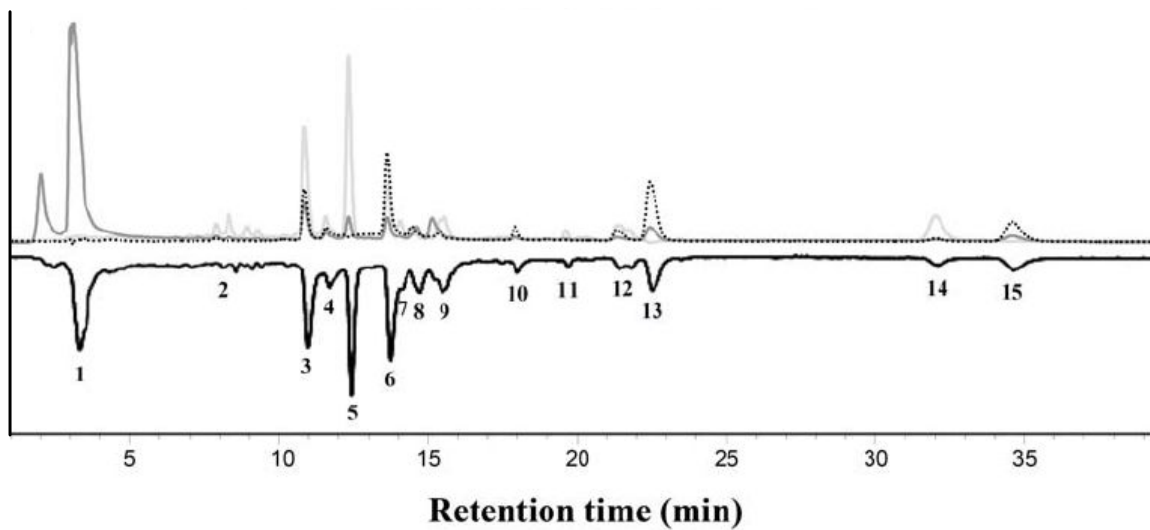


그림 44. 대상클로렐라의 카로티노이드 및 클로로필 성분 분석. 1. hydrophilic compounds, 2. pheophorbide a, 3. chlorophyll b, 4. chlorophyll b', 5. lutein, 6. chlorophyll a, 7. lutein, 8. chlorophyll a', 9. lutein, 10. pyrochlorophyll b, 11.  $\beta$ -carotene, 12. pheophytin b, 13. pheophytin a, 14. pyropheophytin b, 15. pyropheophytin a

카로티노이드 분석을 위한 최적 추출법을 선정하기 위하여 침지법 (maceration: MAC), 증류법 (Soxhlet, SOX), 초음파추출법 (ultrasonic assisted extraction, UAE), 아임계유체추출법 (pressurized liquid extraction, PLE)을 이용하여 클로렐라로부터 xanthophyll 및 chlorophyll 생산을 위한 최적추출법을 비교분석하였다.

표 12. 클로렐라로부터 카로티노이드 추출을 위한 추출법 적용실험

Comparison of the Chemical Composition of Extracts from *C. vulgaris* Using Four Different Extraction Methods<sup>a</sup>

extraction method <sup>b</sup>	carotenoids (mg/g sample)		chlorophylls (mg/g sample)			
	lutein	$\beta$ -carotene	chlorophyll a	chlorophyll b	pheophorbide a	pheophytin a
MAC <sup>c</sup>	2.97 ± 0.31	0.08 ± 0.01	4.26 ± 0.53	2.58 ± 0.09	0.85 ± 0.09	2.31 ± 0.17
SOX <sup>d</sup>	3.42 ± 0.11	0.26 ± 0.09	3.32 ± 0.30	3.45 ± 0.28	** 5.15 ± 0.59	* 3.90 ± 0.16
UAE <sup>e</sup>	* 3.83 ± 0.28	0.10 ± 0.02	5.12 ± 0.29	* 3.71 ± 0.41	* 2.15 ± 0.71	2.64 ± 0.94
PLE 160 <sup>f</sup>	** 3.78 ± 0.19	** 0.50 ± 0.25	*** 9.63 ± 0.65	*** 5.77 ± 0.68	*** 0.01 ± 0.00	** 5.64 ± 1.07

<sup>a</sup> Values marked with an asterisk are significantly different from MAC as the control method. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*  $P < 0.01$  using Student's *t*-test with  $n = 3$ . <sup>b</sup> All extractions used 90% ethanol as the extraction solvent. All components were quantified using the corresponding standard. <sup>c</sup> MAC was performed at room temperature for 6 h. <sup>d</sup> SOX was performed using hydrodistillation for 2 h. <sup>e</sup> UAE was performed at room temperature for 2 h. <sup>f</sup> PLE 160 was performed at 160 °C for 30 min.

표 12에 의하면 클로렐라로부터 루테인을 추출함에 있어 초음파추출법 (UAE)과 아임계유체추출법 (PLE 160)이 효율적임을 알 수 있다. 일반적인 침지법 (MAC)의 경우 6시간 이상 추출하였을 때 약 3 mg carotenoids/g sample 의 추출효율을 보였지만 아임계유체추출법은 30분 만에 더 높은 추출효율로 카로티노이드를 얻을 수 있었다. 특히 아임계유체추출법은 카로티노이드뿐만이 아니라 클로로필의 추출에도 2배 이상 높은 효율로 추출해낼 수 있었다. 따라서 클로렐라로부터 카로티노이드 및 클로로필을 추출하기 위해 최적의 효율을 보인 아임계유체추출법을 이용하여 모든 분석을 수행하였다.

반응표면분석을 통한 아임계유체추출법 최적조건을 설정하기 위해 CCD (central composite design)를 이용하였으며, 총 13번의 run 동안 추출온도와 추출시간을 서로 다른 요인으로 설정하여 루테인과 베타 카로틴의 추출효율을 비교하였다.

표 13. CCD를 이용한 PLE 최적추출법 조건 설정

Central Composite Design with 13 Runs for All Possible Combination of Factors Levels

run order	coded variables		natural variables	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	temperature (°C)	time (min)
1	0	0	105	19
2	1	1	160	30
3	0	0	105	19
4	0	1.414	105	34.6
5	0	0	105	19
6	1.414	0	182.8	19
7	0	0	105	19
8	0	0	105	19
9	-1.414	0	27.2	19
10	1	-1	160	8
11	0	-1.414	105	3.4
12	-1	1	50	30
13	-1	-1	50	8

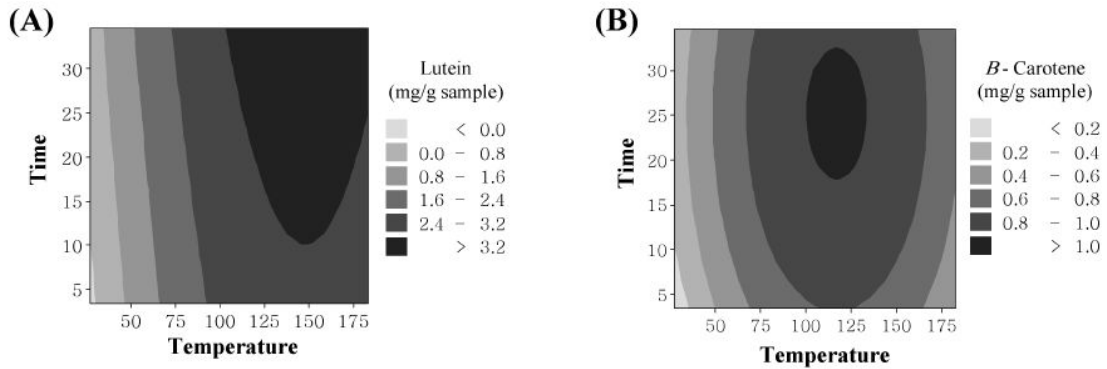


그림 45. 클로렐라로부터 카로티노이드 추출을 위한 PLE 표면맵

그림 45에 의하면 루테인의 최적추출조건은 148.2°C, 34.6분이었으며 이때의 최대추출량은 3.65 mg/g 클로렐라였다. 또한 베타 카로틴의 최적추출조건은 116.8°C, 25.1분이었고 0.75 mg/g 클로렐라의 최대추출량을 나타냈다. 주요 활성물질인 lutein의 함량이 클로렐라 1 g 당 3 mg 이상으로 200-300 µg/g 수준으로 알려진 케일, 시금치 등과 비교하여 10배가 넘는 것을 확인하였다. 따라서 클로렐라 내에 함유된 루테인을 효율적으로 활용하기 위해 눈 건강기능성 식품으로서의 생이용성 증대 연구에 집중하였다.

한편, 클로렐라 내 카로티노이드의 항산화능을 확인하기 위해 아임계 추출을 통해 생성된 클로렐라 추출물들로부터 항산화활성 (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)을 측정하였다 (그림 46). 실험결과 온도가 높아질수록 (최대 160°C) lutein을 비롯한 항산화물질의 생성이 증가됨을 확인할 수 있었다.

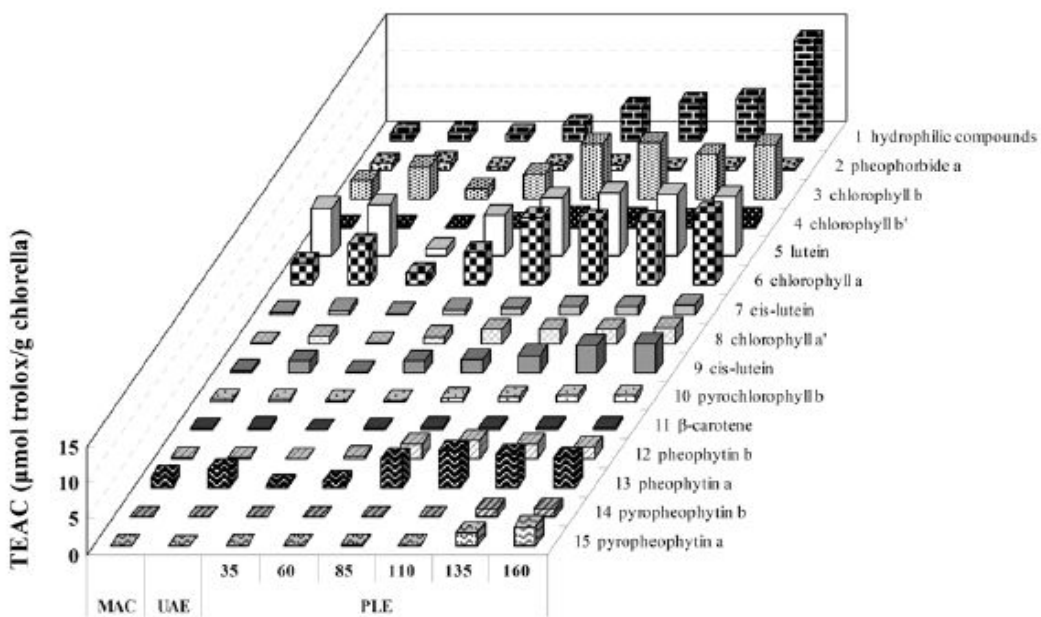


그림 46. 클로렐라로부터 카로티노이드 및 클로로필 추출 시 항산화 효과 프로파일

### 3. 물리적 가공처리를 이용한 클로렐라 전처리 시료 제조

클로렐라 분말 섭취를 통한 눈 건강기능성 획득을 위해 전기, 압력, 분쇄 등의 물리적 가공처리를 거친 시료를 제조하였다.

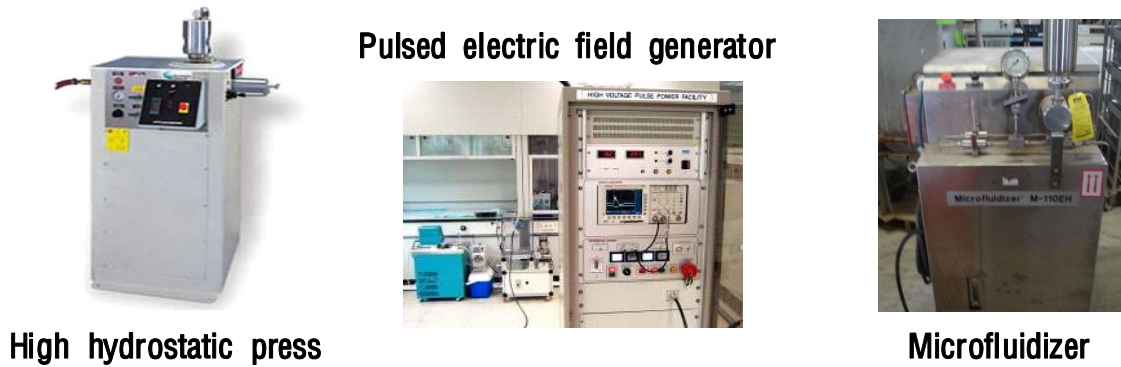


그림 47. 클로렐라 전처리에 사용된 물리적 가공장치

High hydrostatic press (초고압 처리 장치)는 최대 5,000기압의 정수압을 시료에 가해줄 수 있는 장비로 클로렐라의 세포막 붕괴를 위해 적용하였다. 압력처리 시 high hydrostatic press를 이용하여 10,000, 30,000, 60,000 psi의 압력을 클로렐라 배양액에 10분 동안 가하여 HHP 클로렐라를 제조하였다.

Pulsed electric field generator (고전압 펄스 처리 장치)는 최대 40,000 V/cm의 고전압을 시료에 인가해줄 수 있는 장비로 전기적인 힘을 이용한 미생물의 사멸에 이용된다. 미생물이 죽는 것과 비슷한 원리로 클로렐라 세포의 자가 분열을 통한 막붕괴를 유도하기 위해 적용하였다. 전기 처리 시 pulsed electric field generator를 이용하여 5,000-10,000 V의 전압을 100-600  $\mu$ s 동안 처리한 PEF 클로렐라를 제조하였다.

Microfluidizer (초미세분쇄장치)는 최대 25,000 psi의 압력 하에서 시료들이 부딪히게 함으로써 충돌에너지를 이용해 시료를 분쇄하는 장비로 수  $\mu$ m 사이즈의 작은 클로렐라를 물리적으로 분쇄하기 위해 적용하였다. 분쇄 처리 시 Microfluidizer를 이용하여 클로렐라 배양액에 18,000 psi로 총 10회 처리해줌으로써 MF 클로렐라를 제조하였다.



그림 48. 클로렐라 배양액에 전기적 자극을 주는 모습

처리된 시료들은 동결건조기를 이용하여 건조시켰으며 각각의 건조분말은 추출효율 테스트, 생이용성 실험 등에 이용되었다. 특히 microfluidization 된 클로렐라 (MF 클로렐라)는 그림 49와 같이 처리된 압력의 강도에 따라 건조 분말의 색깔에 차이가 났다. 20,000 psi 이상에서 처리된 MF 클로렐라의 경우 색깔이 더욱 연해졌음을 확인할 수 있었고 이것은 막봉괴로 인한 카로티노이드의 유출 때문으로 판단되었다.

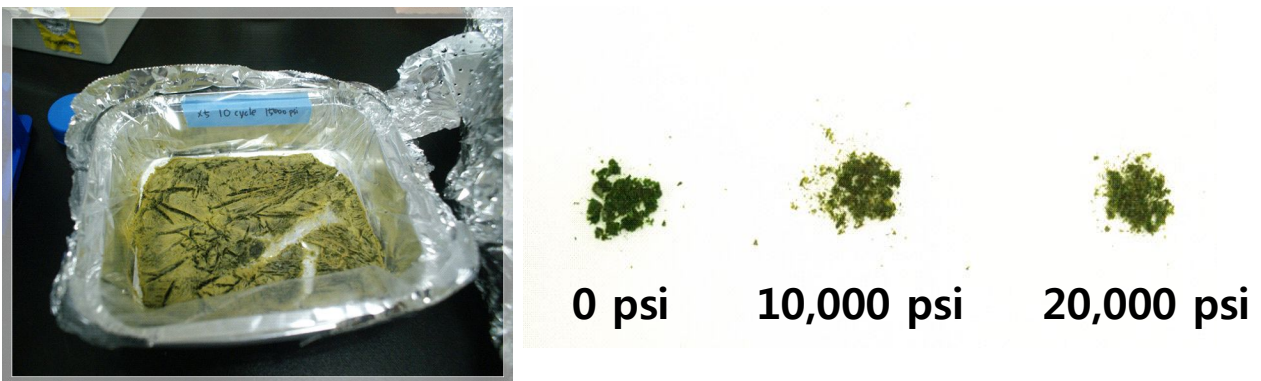


그림 49. 동결건조된 MF 클로렐라

HHP 처리시료와 PEF 처리시료, MF 처리시료의 총 루테인 함량과 가공처리 효과를 간접적으로 확인하기 위하여 추출 실험을 수행하였다. 막봉괴가 이루어진 클로렐라 시료의 경우 짧은 시간 내에 카로티노이드의 추출이 효율적으로 이루어질 수 있는데 실제로 실험결과 MF 시료에서 단시간 내에 가장 많은 루테인이 추출됨을 확인할 수 있었다 (그림 50).

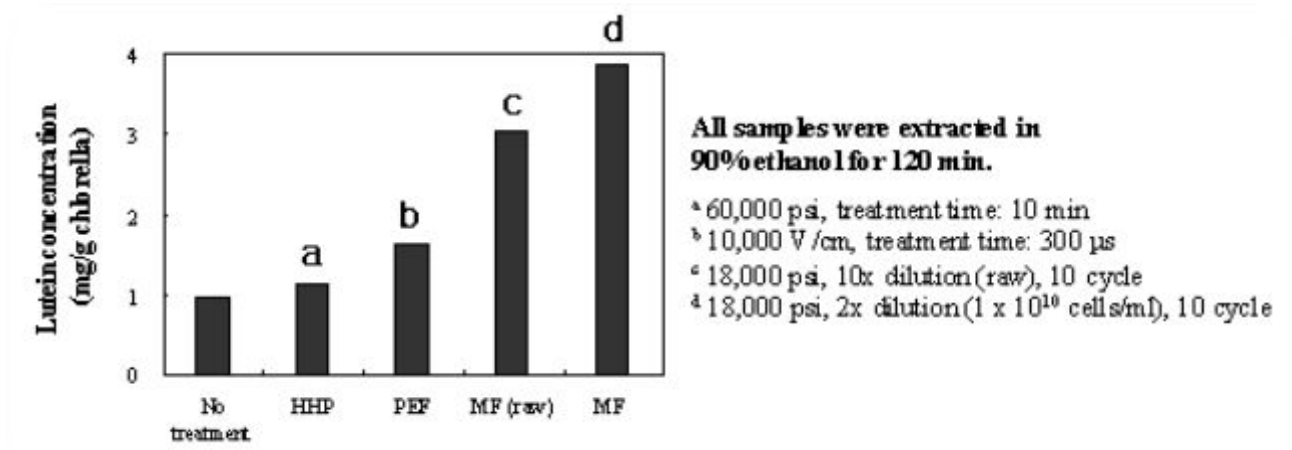


그림 50. 물리적 가공처리와 lutein 추출효과

물리적 가공처리를 한 시료들 (a, b, c, d)이 아무런 처리를 하지 않은 시료보다 추출효율이 높아 가공처리 효과가 있었음을 알 수 있었다. HHP 처리와 PEF 처리보다 MF 처리 시에 2배 이상 높은 추출 효율을 보였으므로 MF 방법을 이용한 생이용성 최적화 실험을 수행하였다.

한편, 무처리 시료, 초고압 시료, 고전압 시료, MF 시료 모두 클로렐라로부터 루테인을 최대한 추출해냈을 때는 클로렐라 1 g 당 약 3-4 mg의 루테인을 함유하고 있었다.



#### 4. 전자현미경을 통한 클로렐라 나노분쇄화 연구

물리적 가공처리를 거친 클로렐라의 세포 파괴 정도를 확인하기 위해 전자현미경 분석을 실시하였다. 분석에 앞서 클로렐라 세포의 변형을 최소화하기 위하여 물리적 가공처리를 거친 시료를 고정화하였다. 시료 전처리 방법은 표 14와 같다.

표 14. 전자현미경 분석을 위한 시료 전처리 방법

Procedure	Chemical	Temperature	Time	Repetitions	Descriptions (for 4 samples)
Primary fixation	- 250 $\mu$ l of chlorella culture - 250 $\mu$ l of 0.2 M sodium cacodylate - 250 $\mu$ l of 4% (w/v) glutaraldehyde - 250 $\mu$ l of 0.2 M phosphate buffer	on ice include	1 hr	1	- 100억 cells - MW: 214.03, 51.36 mg in 1.2 ml DDW - 8% stock (10 ml), 0.6 ml DDW + 0.6 ml stock - 5.28 g sodium phosphate monobasic 43.45 g sodium phosphate dibasic in 1L DDW (pH 7.4)
Wash	- 1 ml of distilled water	RT	5 min	3	- 3,000 rpm
Secondary fixation	- 250 $\mu$ l of 0.2 M sodium cacodylate, 4% osmic acid  - 250 $\mu$ l of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4)	on ice include	1 hr	1	- 107 mg in 25 ml DDW (0.2 M sodium cacodylate) (1) - 1 g osmium tetroxide in (1) sol. (very toxic 분주해서 -20°C 보관, 후드 사용, 잘 다운 시에는 ep tube 사용, but 1시간 반응 시에는 갈락 유리 vial 에서...!)  - ↑ 위에서 만든 solution 사용
Wash	- 1 ml of distilled water	RT	5 min	3	- 3,000 rpm
Dehydration	- 50% (w/v) ethanol - 70% ethanol - 80% ethanol - 90% ethanol - 100% ethanol	RT	5 min 5 min 5 min 5 min 5 min	1 1 1 1 2	- 3,000 rpm
Substitution	- 2-methyl-2-propanol ( <i>tert</i> -Butanol)	RT	10 min	1	- 3,000 rpm
Dry	- Deep freezer $\rightarrow$ Freeze dryer	-60°C	2 days	1	

Sodium cacodylate와 glutaraldehyde를 반응시약으로 사용하였으며 이때의 총 세포 수는 약 100억 개의 세포를 대상으로 수행하였다. 1시간의 반응 후에 증류수로 세척하였으며 2차고정하는 osmic acid를 사용하여 수행하였다. 에탄올 농도를 50-100%로 단계별로 올려주면서 dehydration을 수행하였고 최종적으로는 *tert*-butanol로 치환한 후 동결건조를 통해 건조분말을 얻을 수 있었다.

이렇게 얻은 고정화된 시료분말은 osmium 코팅 후 전자현미경 분석을 하였다. 전자현미경 분석 조건은 다음과 같다.

<분석조건>

- 장비명: HITACHI SU-70
- accelerating voltage: 15,000 V
- magnification: 10,000 배

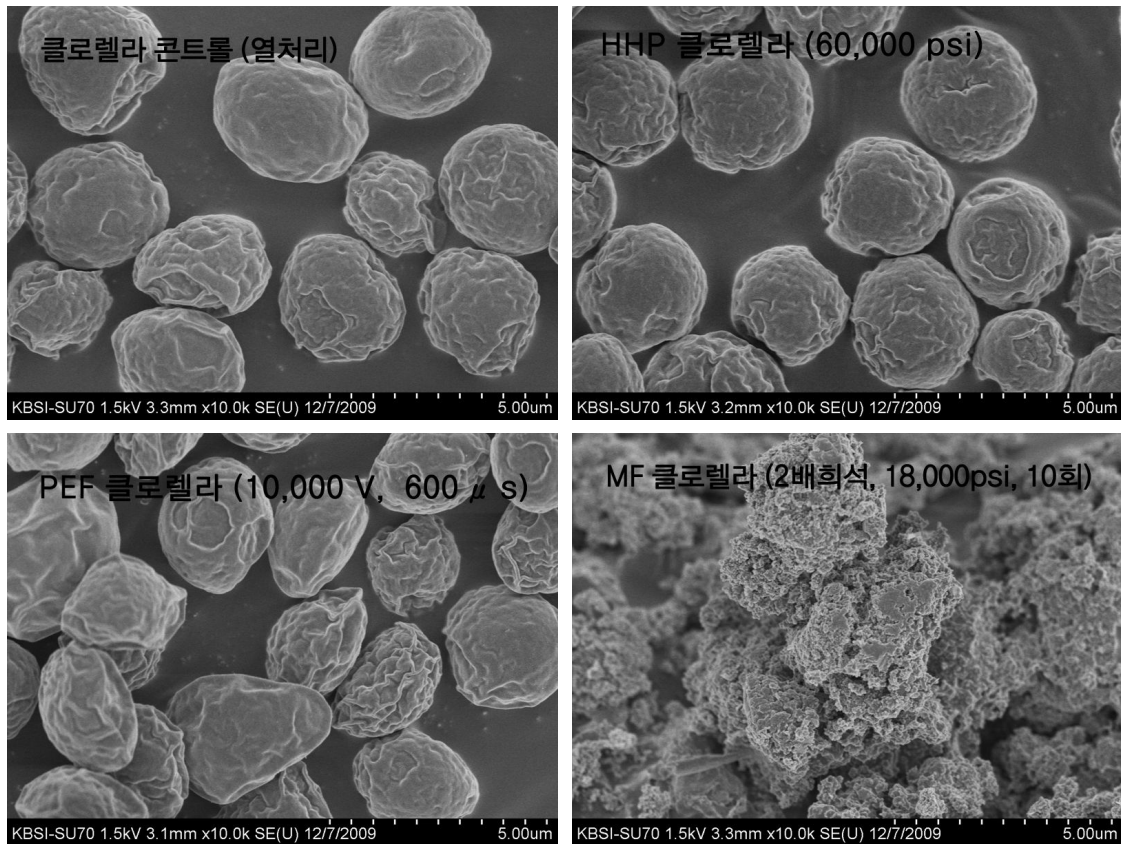


그림 51. 물리적 가공처리 클로렐라의 전자현미경 분석 사진 (10,000배)

HHP 클로렐라의 경우, 클로렐라 세포 표면에 큰 변형이 관찰되지 않지만 PEF 클로렐라는 세포 표면의 형태에 약한 변형이 생김을 확인하였다. MF 클로렐라의 경우 세포형태를 찾아볼 수 없을 정도로 완전히 분쇄되었음을 알 수 있었다.

## 5. 위-장-관 모사 시스템 구축 및 생이용성 연구

물리적 가공 처리를 거친 클로렐라 시료의 실제 소화 시 루테인 생이용성을 확인하기 위해 in vitro digestion system을 구축하여 테스트하였다. 위-장-관 실험모델은 카로티노이드 생이용성과 관련된 in vitro digestion 전문연구그룹인 Failla 그룹의 모델을 적용하였다.

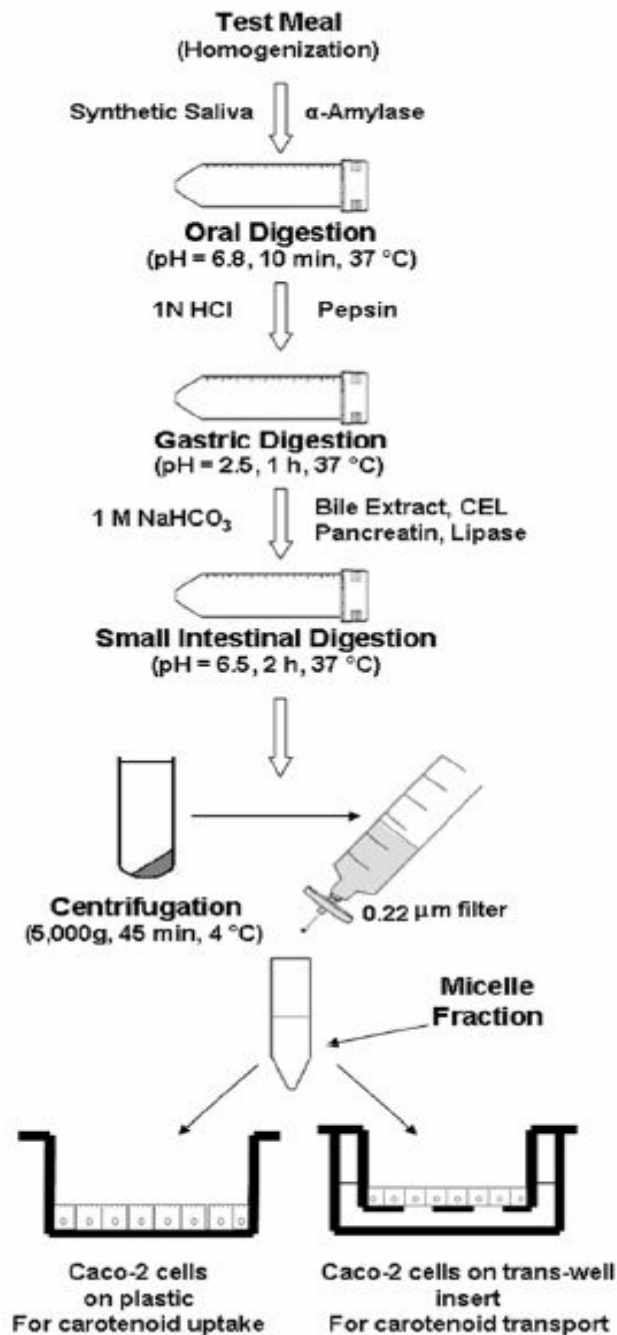


그림 52. Failla 그룹의 위장관 모사시스템

구축된 in vitro digestion 시스템의 특징은 다음과 같다.

- 입, 위, 소장의 모사 시스템
- in vivo 실험을 통해 모델의 우수성이 이미 검증됨.
- Caco-2 대장세포를 이용하여 수용화된 카로티노이드 성분이 실제 장내 세포로 uptake 되는 양과 transport 되는 양을 탐색할 수 있음.
- 연속식으로 작동하는 dynamic system이 아니므로 실제 장내 반응과는 차이가 있을 수 있음.

물리적 가공처리 방법 중 효과가 좋았던 PEF 클로렐라와 MF 클로렐라를 사용하여 구축한 in vitro digestion 시스템을 통해 분석한 결과는 표 15와 같다.

표 15. 물리적 가공처리 클로렐라 시료의 생이용성 증대효과

	Lutein ratio (%) vs. serving		
	serving	digesta	micelles
CV	100.00	15.96	1.18
PEFCV	100.00	61.81	6.33
MFCV	100.00	93.41	21.95

실험 결과, Microfluidization > Pulsed electric field treatment > no treatment 순으로 생이용성 효율이 높았다.

일반 클로렐라의 경우 섭취 시 소화과정에서 lutein의 release가 거의 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 이것은 클로렐라의 카로티노이드를 이용하기 위해서는 생이용성을 증대시킬 수 있는 물리적 가공처리 방법이 반드시 필요함을 보여준다.

Microfluidization 처리를 한 클로렐라의 경우 클로렐라 내에 함유되어 있는 총 루테인의 양 중 20% 정도가 생물학적으로 이용 가능한 형태로 전환됨을 확인하였다 (일반 클로렐라의 20 배).

## 제 6 절 수행결과 IV: 클로렐라 추출물의 망막 손상 보호효과 (한국과학기술연구원)

클로렐라 추출물을 이용하여 산화스트레스로부터 유도한 망막 신경세포 퇴화 보호 활성을 *in vitro*, *in vivo* 실험에서 확인하였다.

### 1. 세포 독성평가

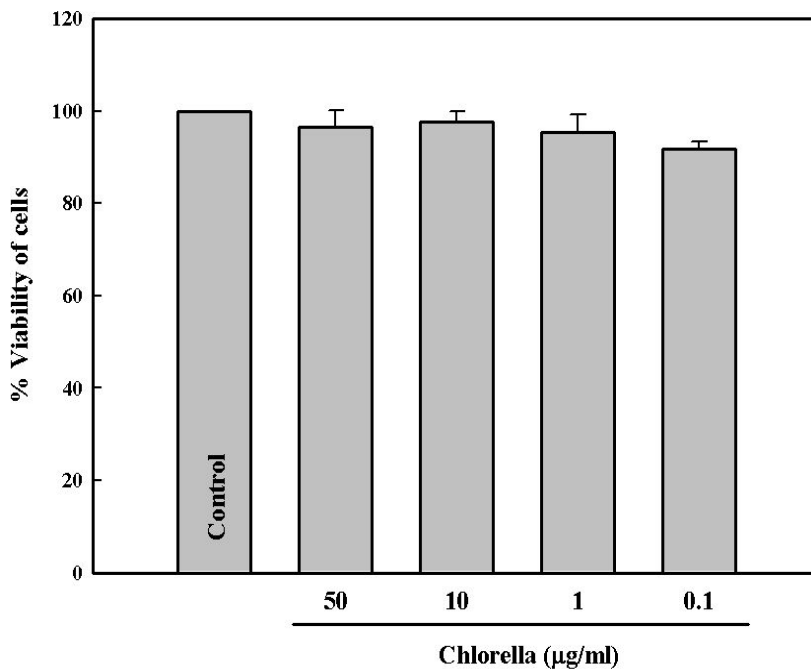


그림 53. 클로렐라 추출물의 세포독성 효과

클로렐라 추출물을 농도 별로 망막신경절세포 (RGC-5)에 처리하여, MTT assay를 통하여 세포독성을 평가하였을 때, 클로렐라가 RGC-5 세포를 사멸시키는 자체 독성이 없음을 확인하였다.

## 2. 세포 생존율 평가

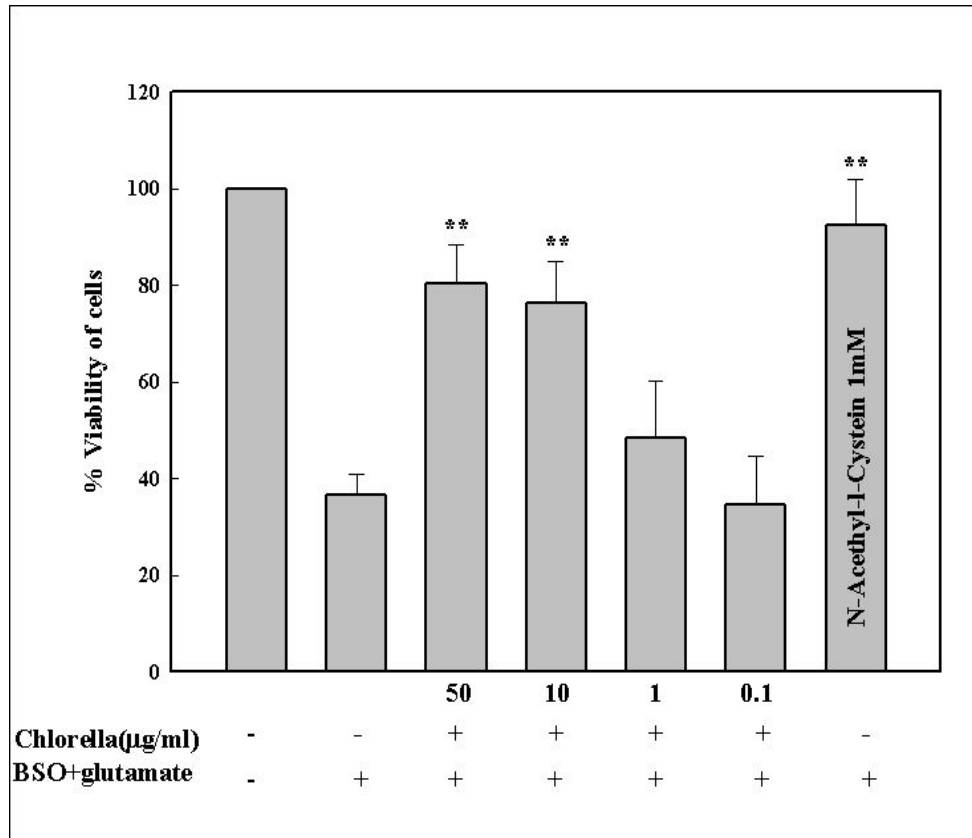


그림 54. RGC-5 망막신경세포에 대한 클로렐라 추출물의 세포생존율 효과

클로렐라 추출물의 망막 신경 세포 (RGC-5) 보호 효과를 측정하기 위하여, 세포 배양 후, 클로렐라 추출물을 농도별로 전처리한 다음, 0.5 mM 1-부티오닌 설펍시민[1-buthionine-(S,R)-sulfoximine; BSO] 및 10mM L-글루탐산(L-glutamamic acid; glutamate)을 24시간 동안 처리 후 MTT 방법을 사용하여 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 BSO와 glutamate만을 처리한 군과 비교하였을 때 클로렐라 추출물을 처리한 군은 농도 의존적으로 세포생존율을 높였다. 따라서 클로렐라 추출물은 산화스트레스에 의한 세포사멸을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

### 3. PI/Hoechste 33342 이중 염색을 통한 세포생존을 평가

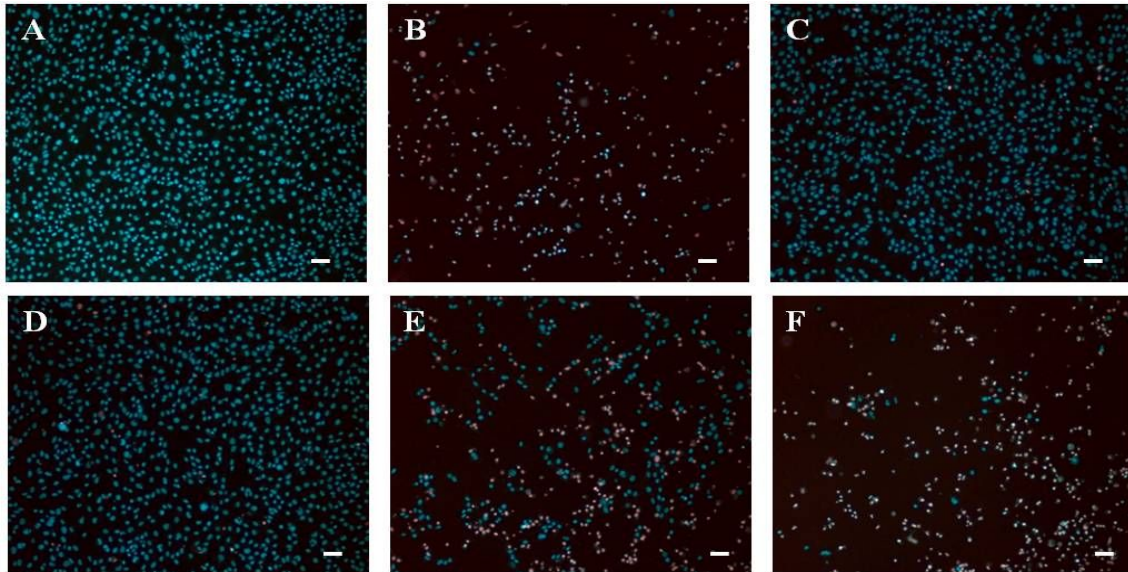


그림 55. 클로렐라 추출물의 세포생존율에 대한 효과 (형광현미경 관찰)

Panel A: Control Panel B: BSO+glutamate (alone)

Panel C: Chlorella 50 µg/ml Panel D: Chlorella 10 µg/ml

Panel E: Chlorella 1 µg/ml Panel F: Chlorella 0.1 µg/ml

정성적으로 세포 생존율을 관찰하기 위하여 PI/Hoechst33342 이중염색을 실시하였다. Hoechst33342는 막 투과성이 있어 살아있는 세포와 죽어있는 세포를 모두 파란색으로 염색을 시키는 반면 PI는 막 투과성이 없어 죽어있는 세포만을 붉은색으로 염색을 시킨다. 아무것도 처리하지 않은 control군에서는 파란색으로만 염색이 되어있지만, BSO와 glutamate를 24시간 처리한 군에서는 PI에 positive한 세포들이 많이 발견되었다. 클로렐라 추출물을 전처리하였을 때 농도 의존적으로 PI positive한 세포들을 확연히 감소시키는 것으로 보아, cell viability 결과와 마찬가지로 망막세포 보호효과가 뛰어남을 확인 할 수 있었다.

#### 4. 산화스트레스에 의해 유도되는 활성산소 생성에 대한 클로렐라 추출물의 효과

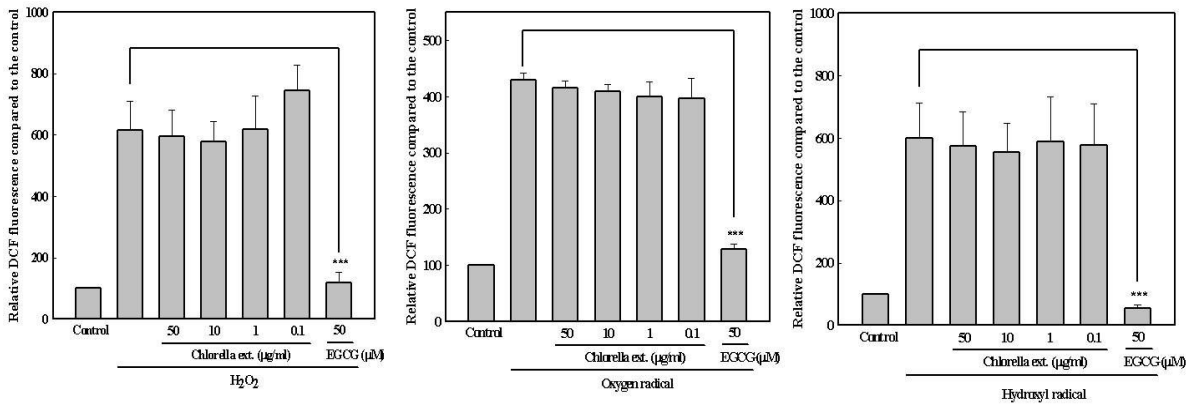


그림 56. 클로렐라 추출물의 활성산소 생성 억제 효과

클로렐라 추출물이 다양한 산화스트레스 ( $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ )에 의해 생성되는 활성산소 저해 효과를 확인하기 위하여, 세포내의 활성산소를 정량적으로 측정 할 수 있는 DCFH-DA방법을 사용하였다.

그 결과, 클로렐라 추출물은 세 가지 산화스트레스에 의하여 생성되는 활성산소를 저해하지 못하였다. 따라서 클로렐라 추출물은 산화 라디칼에 의한 활성산소 생성을 저해하는 효과가 없음을 확인하였다.



5. 산화스트레스에 의해 유도되는 글루타티온(GSH)의 감소량에 대한 효과

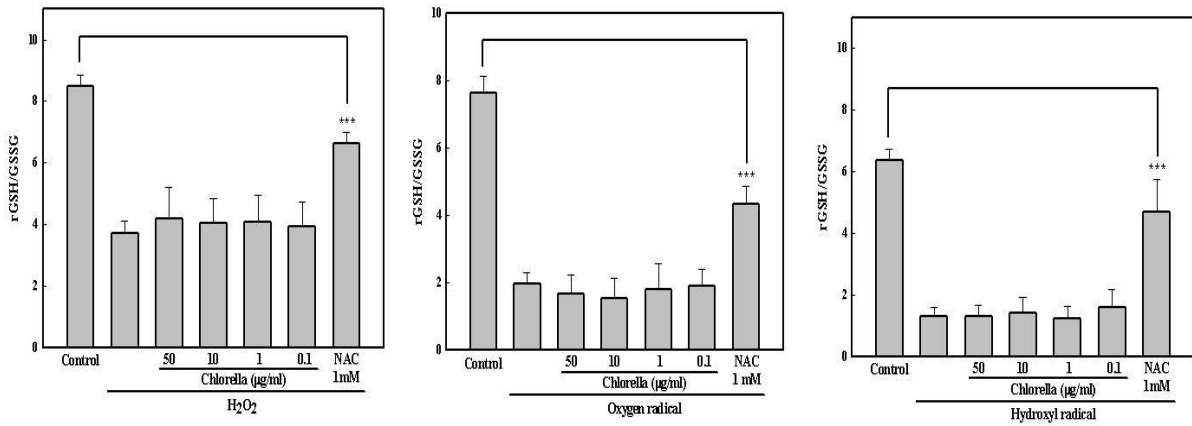


그림 57. 클로렐라 추출물의 망막신경세포에 대한 글루타티온 회복 효과

클로렐라 추출물로 망막 신경 세포 (RGC-5)에서 글루타티온 (Glutathione; GSH) 회복 효과를 확인하기 위하여, 전체 글루타티온 (GSH) 함량을 Rahman 등의 방법을 변형하여 측정하였고, 그 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 라디칼, O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 라디칼 및 OH<sup>·</sup> 라디칼에 의해 유도된 산화 라디칼에 의한 글루타티온 함량의 감소에서, 클로렐라 추출물을 전처리한 경우, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 라디칼, O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 라디칼 및 OH<sup>·</sup> 라디칼만 처리한 경우와 비교하였을 때, RGC-5세포의 글루타티온 감소를 회복시키지 못함을 확인하였다. 따라서 클로렐라 추출물은 산화 라디칼에 의한 망막 신경 세포의 글루타티온의 감소를 회복하는 효과가 없음을 확인하였다.

6. Apoptotic protein의 발현에 대한 클로렐라 추출물의 효과

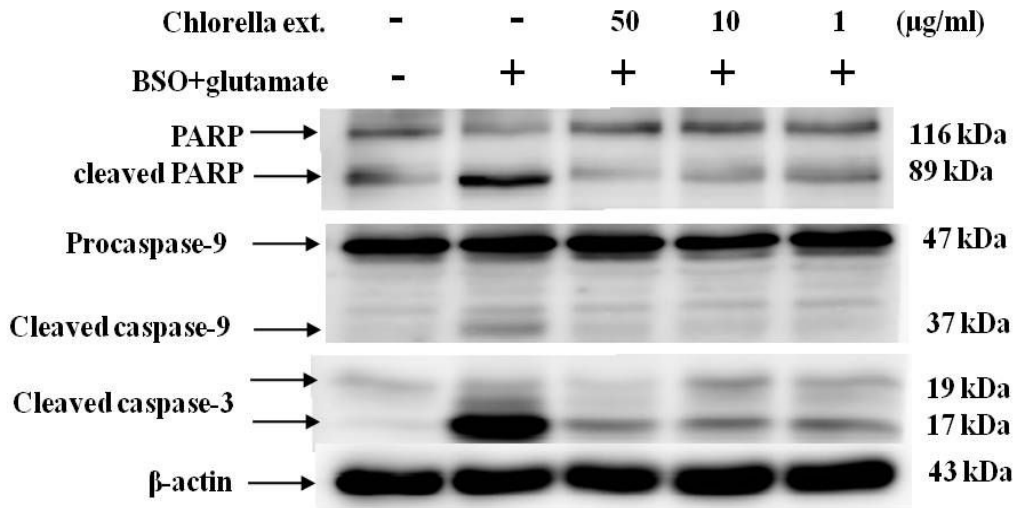


그림 58. 클로렐라 추출물의 apoptotic 단백질 발현 억제 효과

산화스트레스에 의한 세포사멸 (apoptosis)과 관련된 apoptotic protein의 발현을 확인하기 위해 western blot 방법을 사용하였다. Apoptosis를 일으키는 인자들 중에 PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase), caspase-9, cleaved caspase-3를 target으로 하여 산화스트레스에 의한 망막 신경절 세포의 단백질 발현을 확인하였다. 두 가지의 산화스트레스를 처리한 군에서 apoptosis를 일으키는 단백질인 cleaved PARP (89 kDa), cleaved caspase-9 (37 kDa), cleaved caspase-3 (17k Da) 발현이 증가함을 관찰 할 수 있었다. 그러나 클로렐라 추출물을 처리한 군에서는 cleaved PARP (89 kDa), cleaved caspase-9 (37 kDa), cleaved caspase-3 (17k Da) 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다.

## 7. NMDA치리에 의한 망막조직에 미치는 영향

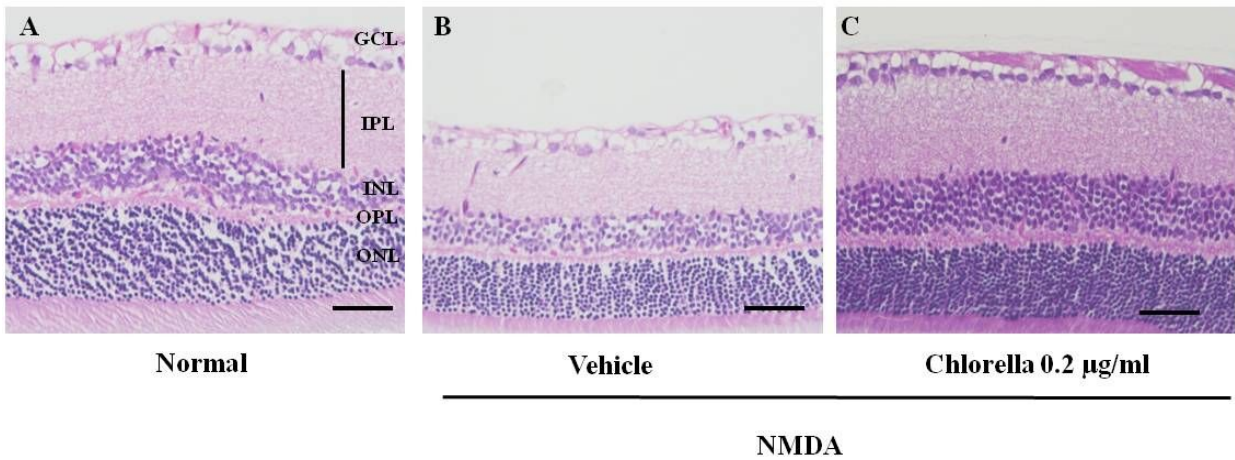


그림 59. 클로렐라 추출물의 망막 손상 회복 효과

망막층의 손상 정도를 조직학적으로 관찰하기 위해, NMDA에 의한 excitotoxicity 손상 5일 후 안구를 적출하여 H&E 염색을 수행하였다. H&E 염색을 수행하였을 때, 핵은 보라색으로 세포질은 붉은색으로 염색되는 것으로 관찰되었다. Control군과 NMDA를 처리한 군을 비교하였을 때, NMDA를 처리한 군은 IPL의 두께가 현저하게 얇아지는 것을 확인하였다. 그러나 클로렐라 추출물을 처리한 군에서 IPL의 두께가 얇아짐을 회복시키는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 NMDA에 의한 망막두께 층이 얇아짐을 클로렐라 추출물이 보호하는 효과가 있음을 확인하였다.

## 8. NMDA치리에 의한 망막 신경절 세포층의 손상

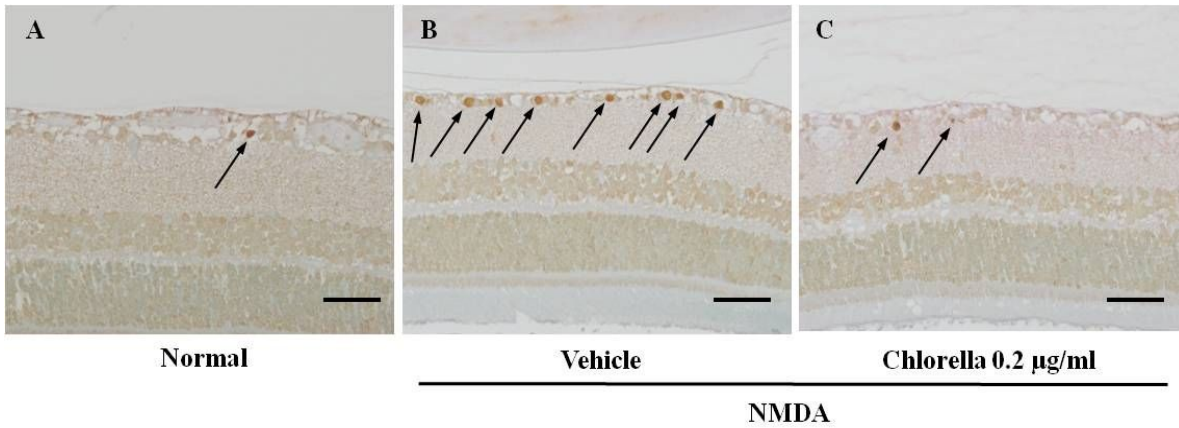


그림 60. 클로렐라 추출물의 망막신경절 세포 손상 회복 효과  
(화살표는 TUNEL positive 세포를 표시)

NMDA에 의한 세포사멸 (apoptosis)을 확인하기 위해서 apoptotic cell에 특이적으로 positive 하게 염색되는 TUNEL 염색 기법을 사용하였다. NMDA에 의한 excitotoxicity 손상 1일 후 망막 신경절 세포의 apoptosis를 관찰하였다. 이 때 TUNEL positive 세포는 진한 암갈색의 핵으로 표지 되는 것으로 관찰되었다. Control 군에서는 TUNEL positive 한 세포들이 발견되지 않았으나, NMDA를 처리한 vehicle 군에서는 TUNEL positive 한 세포들이 증가함을 보였다. 그러나 클로렐라 추출물을 처리한 군에서는 positive한 세포의 감소가 관찰되었다. 따라서 클로렐라 추출물은 NMDA에 의한 excitotoxicity로 인해 세포사멸을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

# 제 7 절 수행결과 V: 클로렐라 루테인의 생이용성 평가 (한국과학기술연구원)

## 1. in vitro 생이용성 평가

### 가. in vitro digestion 시스템의 최적화

5 절에서 물리적 가공기술들의 가공적성을 확인하기 위해 구축하였던 Failla 그룹의 in vitro digestion 시스템을 클로렐라 루테인의 생이용성 평가에 적합하도록 본 연구팀 내에서 방법을 최적화시켰다 (24). 기존의 방법은 루테인의 함량이 클로렐라에 비해 상대적으로 적은 채소류의 분석에 적합한 in vitro digestion 방법이므로 클로렐라 내 루테인의 분석을 위해서는 개선된 방법이 필요하였다 (그림 61). Failla 그룹에서 제시한 carotenoid 소화 과정 프로토콜 상에서 micellization을 유도하는 반응 시약이 부족한 문제를 해결하기 위해 영국의 O'Brien 그룹의 반응조건을 추가시켰으며 장내 세포로의 카로티노이드의 uptake 및 transport 여부를 측정하기 위해 Caco-2 transmembrane 분석법과 in vitro digestion 시스템을 결합하여 in vitro 카로티노이드 생이용성 분석을 수행하였다. 구축된 시스템은 MF 클로렐라의 in vitro 생이용성 증대효과를 연구하는데 이용되었다.

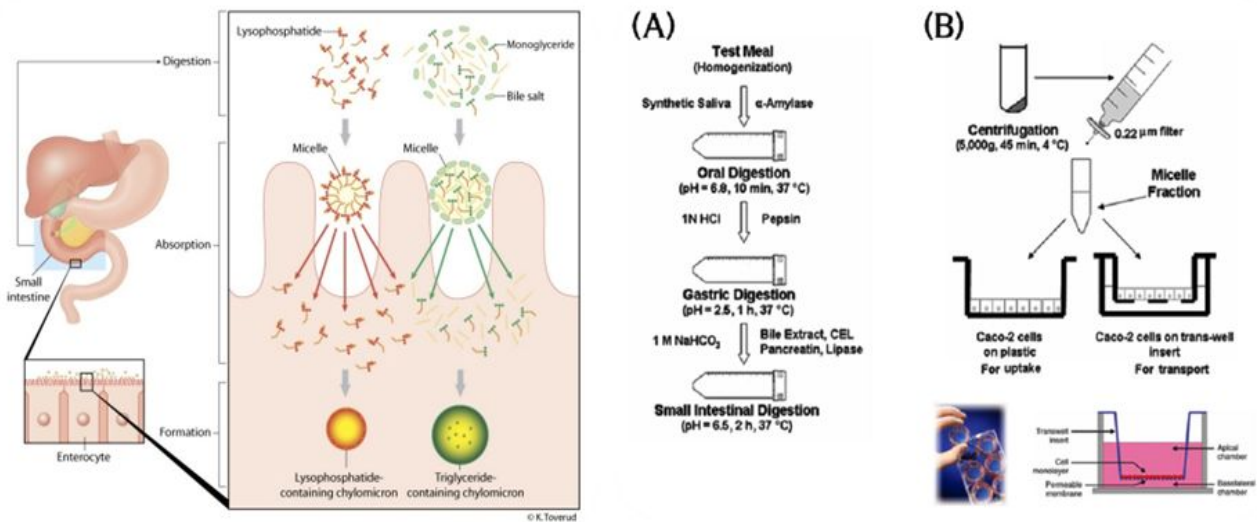


그림 61. 클로렐라 루테인 분석에 최적화된 in vitro digestion + Caco-2 분석 시스템

## 나. 카로티노이드 흡수 원리

실제로 식품 속에 존재하는 카로티노이드가 인체 내로 흡수되는 소화 메커니즘은 그림 62와 같다. 카로티노이드가 흡수되기 위해서는 일차적으로 식품으로부터 카로티노이드의 유출이 일어나야 한다. 특히 클로렐라와 같이 두꺼운 세포벽으로 둘러싸여있는 식품의 경우 이 과정이 제대로 이루어지지 않기 때문에 분쇄와 같은 가공처리가 카로티노이드의 외부유출을 증대시킬 수 있다. 이렇게 유출된 카로티노이드는 다양한 지방들과 emulsion을 형성하여 emulsion 내에 포집된다. 이렇게 포집된 카로티노이드는 pancreatic lipase와 bile salt와 같은 체내 소화효소에 의하여 mixed micelles을 형성하는데 이렇게 만들어진 micelles은 물에 녹는 형태이므로 simple diffusion이나 막수송단백질에 의하여 장내 세포벽을 투과하여 흡수된다. 이러한 카로티노이드의 수화 과정을 micellization 이라고 한다. 이때 함께 섭취되는 지방의 종류가 emulsion의 형성과 micellization 효율에 중요한 영향을 미친다 (25).

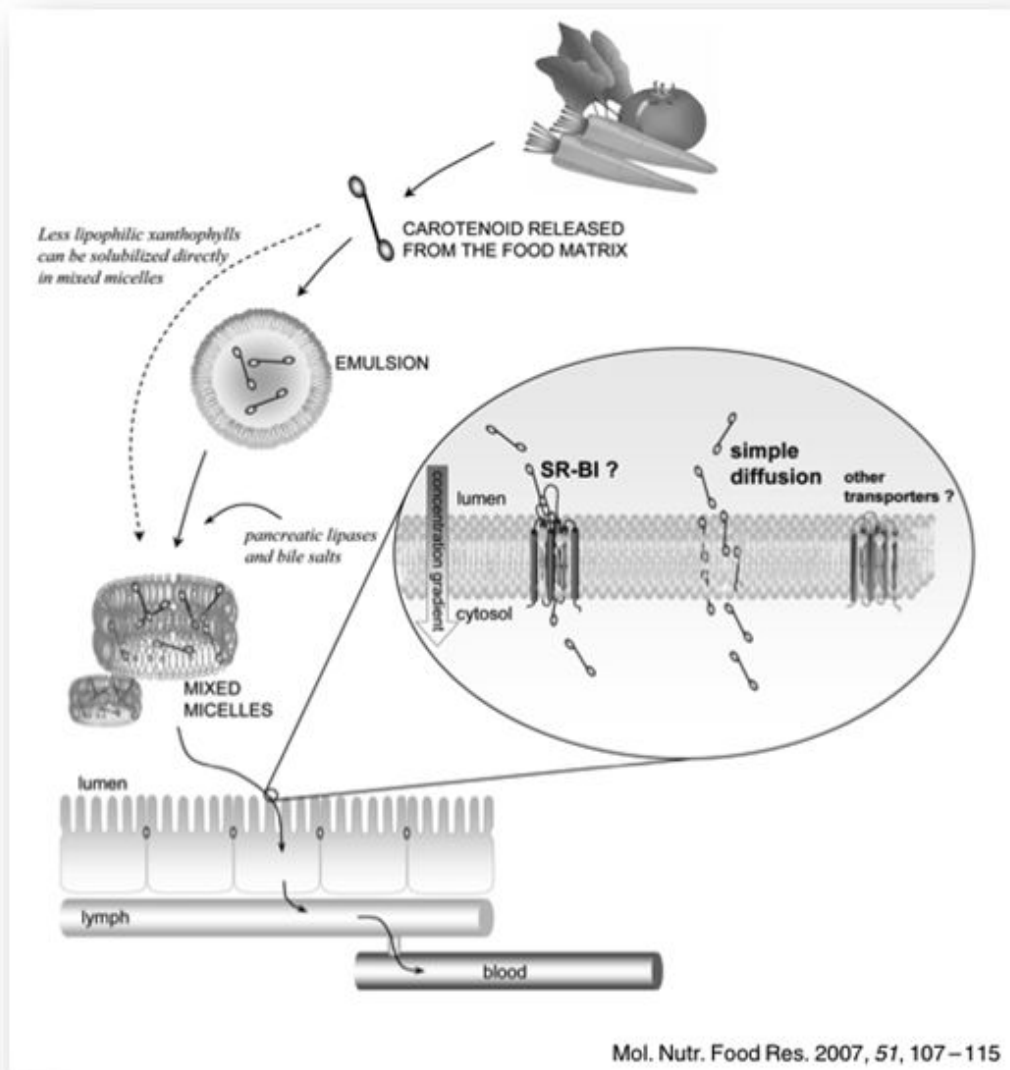


그림 62. 식품 내 카로티노이드의 소화 메커니즘

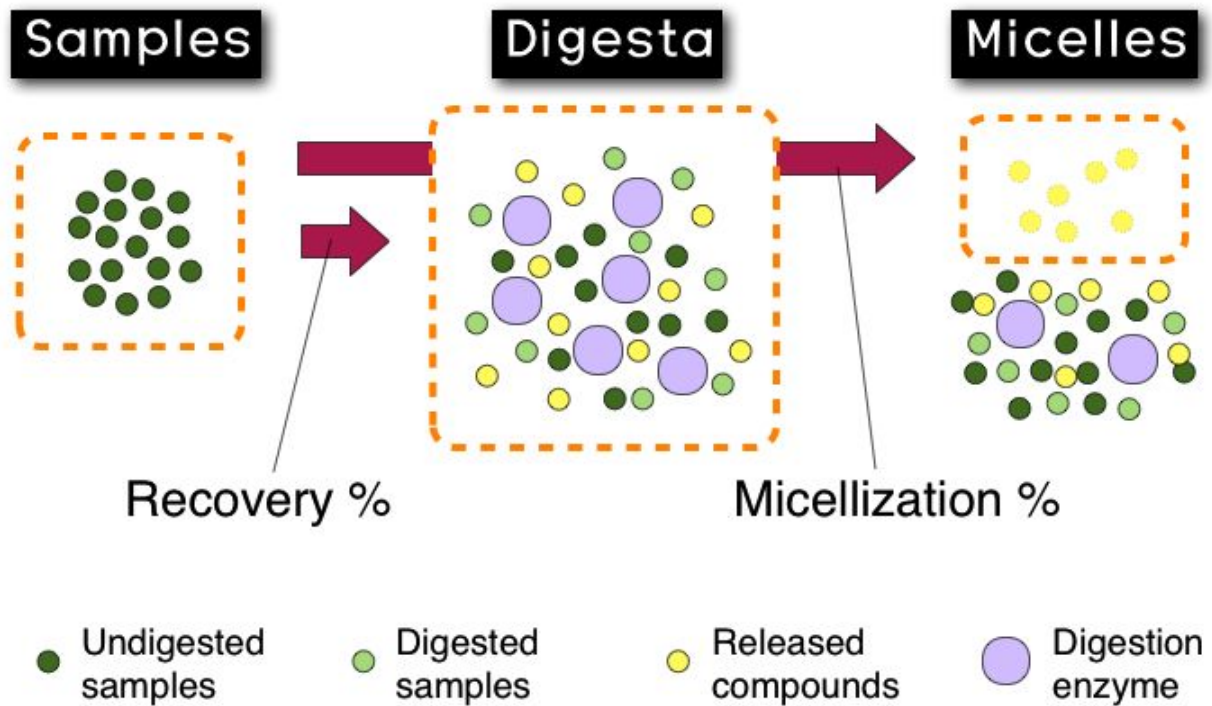


그림 63. 카로티노이드의 micellization 반응

클로렐라 내에 존재한 루테인의 함량은 클로렐라 중량의 1/500 수준으로 매우 많은 양을 함유하고 있지만 실제로 루테인이 체내에 흡수되기 위해서는 소화과정에서 클로렐라로부터 빠져나와야하며 이렇게 유출된 카로티노이드 중에서도 리피드와 emulsion을 이룬 다음 소화효소의 계면활성 작용에 의해 micelles 형성이 된 카로티노이드만이 흡수가 된다.

실험에서는 sample 내에 존재하는 루테인의 함량과 소화과정 후 digestate에 존재하는 루테인의 함량 비교를 통해 소화과정에서의 루테인 stability를 확인하는 recovery %를 측정하였다.

또한 digestate 내의 총 루테인 중 실제로 소화효소의 계면활성 작용을 거쳐 micelles을 형성한 카로티노이드 비율을 계산하기 위해 digestate를 초원심분리한 후에 0.4  $\mu\text{m}$  필터로 거른 다음 카로티노이드 함량을 분석하여 micellization %를 구하였다.

다. in vitro digestion 용 분석시료 준비

(1) in vitro digestion 실험에 사용한 클로렐라의 양은 in vivo 동물실험에 사용할 양에 준하여 정하였으며 클로렐라 속에 들어있는 루테인의 함량과 같은 양이 되도록 루테인 제품을 가공하여 대조군으로 사용하였다.

(2) 방법

- ① 50 mL 튜브에 클로렐라를 종류별로 1.8 g 씩 넣는다.
- ② 증류수 30 mL 넣어 클로렐라를 섞는다.
- ③ 3 mL을 덜어 in vitro digestion 용 50 mL 튜브에 옮긴다 (180 mg).
- ④ 똑같이 3 mL을 덜은 후 oil 18 uL 넣어 oil 처리군을 만든다.
- ⑤ 루테인 시료군은 아래와 같이 두 개 그룹으로 나눈다.

㉠ 루테인 I

- 루테인 제품 2 알 (40 mg)을 oil 4 mL에 녹인다.
- 증류수 30 mL에 위 oil 용액 180 uL (1.8 mg)를 넣는다.
- 손으로 세차게 흔들어 oil을 풀어준 후 즉시 3 mL을 덜어 in vitro digestion 용 50 mL 튜브에 옮긴다 (180 ug).

㉡ 루테인 II

- 루테인 제품 2 알 (40 mg)을 Ethyl acetate (EA) 4 mL에 녹인다.
- Lakshminarayana의 논문 (26)을 참조하여 micelled lutein을 제조한다.
- monooleoyl glycerol, sodium oleate, lyso-phosphatidylcholine에 8 mL EA을 넣고 루테인 EA 용액 2 mL을 넣는다.
- glycodeoxycholate, taurodeoxycholate, taurocholate를 에탄올 10 mL에 녹인 후 위 루테인 혼합액과 섞는다.
- 최종 혼합액 20 mL로부터 1.8 mL을 덜어 질소퍼징으로 건조한다 (1.8 mg).
- 증류수 30 mL을 넣어 섞은 후 3 mL을 덜어 in vitro digestion 용 50 mL 튜브에 옮긴다 (180 ug).



라. in vitro digestion 처리

(1) in vitro digestion 처리는 O'connell의 방법을 본 실험에 맞게 개선하여 수행하였다 (27).

(2) 수행방법은 그림 64와 같다.

<b>Reference:</b> Nutrition Research 27 (2007) 258-264	<b>Sample</b>	
pH를 맞추는 때는 측정 시 샘플의 손실을 줄이기 위해 pH 용 클로렐라 그룹을 가지고 볼륨을 정할 것.	<b>Homogenization</b>	18 mL saline 넣고 손으로 세차게 흔들기.
	<b>Gastric Phase</b>	pH 2.0 with 1 N HCl (100 uL 정도) 40 mg pepsin (40 mg in 1 mL 0.1 N HCl) 37°C, 95 rpm, 1 hr
	<b>Small intestine Phase</b>	pH 5.3 with 1 M sodium bicarbonate (200 uL) <b>SI solution</b>  pH 7.4 using HCl or NaOH adjust volume 20 mL 37°C, 95 rpm, 2.5 hr
	<b>SI solution</b> (in 1 mL saline) - 20 mg pancreatin - 8 mg taurocholate - 20 mg pancreatic lipase  100 mg bile extract in EP	<b>Sampling</b>

그림 64. in vitro digestion 처리 프로토콜

마. in vitro digestion 분석 결과

표 16. in vitro digestion 후 digestate 와 micelles 내의 루테인 함량

samples	lutein content ( $\mu\text{g}/20 \text{ mL}$ )	
	digestate	micelles
UC	255.3 $\pm$ 11.4	77.0 $\pm$ 4.1
MC10000	258.6 $\pm$ 3.4	170.0 $\pm$ 6.6
MC20000	265.8 $\pm$ 29.8	218.2 $\pm$ 21.6
LT	243.3 $\pm$ 10.7	182.3 $\pm$ 23.2

- (1) 가공처리를 하지 않은 클로렐라 (UC), MF 처리한 클로렐라 (MC10000: 10,000 psi, MC20000: 20,000 psi), micellized lutein (LT)에 대해 in vitro digestion 한 결과는 그림 65와 같다.
- (2) 처리된 시료의 루테인 함량을 모두 300  $\mu\text{g}$  수준으로 동일하게 일치시켜 주었을 때 digestate 내의 총 루테인 함량은 서로 비슷하였다. 이것은 물리적 가공처리를 거친 시료 내에도 일반 시료와 동일한 함량의 루테인이 있음을 보여준다.
- (3) digestate 내의 루테인 함량이 비슷한 것과는 달리 원심분리를 통해 최종적으로 얻은 micelles 내의 카로티노이드 함량은 각 시료가 서로 달랐다. 일반 클로렐라의 경우 전체 루테인의 70% 이상이 흡수되지 못한 형태로 유지되고 있음을 알 수 있다. MF 클로렐라는 높은 비율의 카로티노이드가 micelles을 형성했음을 알 수 있고 이것은 MF 처리가 클로렐라의 루테인 생이용성을 증가시켰기 때문으로 판단된다.
- (4) 특히 MC20000의 경우 positive control로 사용한 루테인보다도 높은 생이용성을 보여주어 산업적 효용가치가 매우 높을 것으로 보인다.

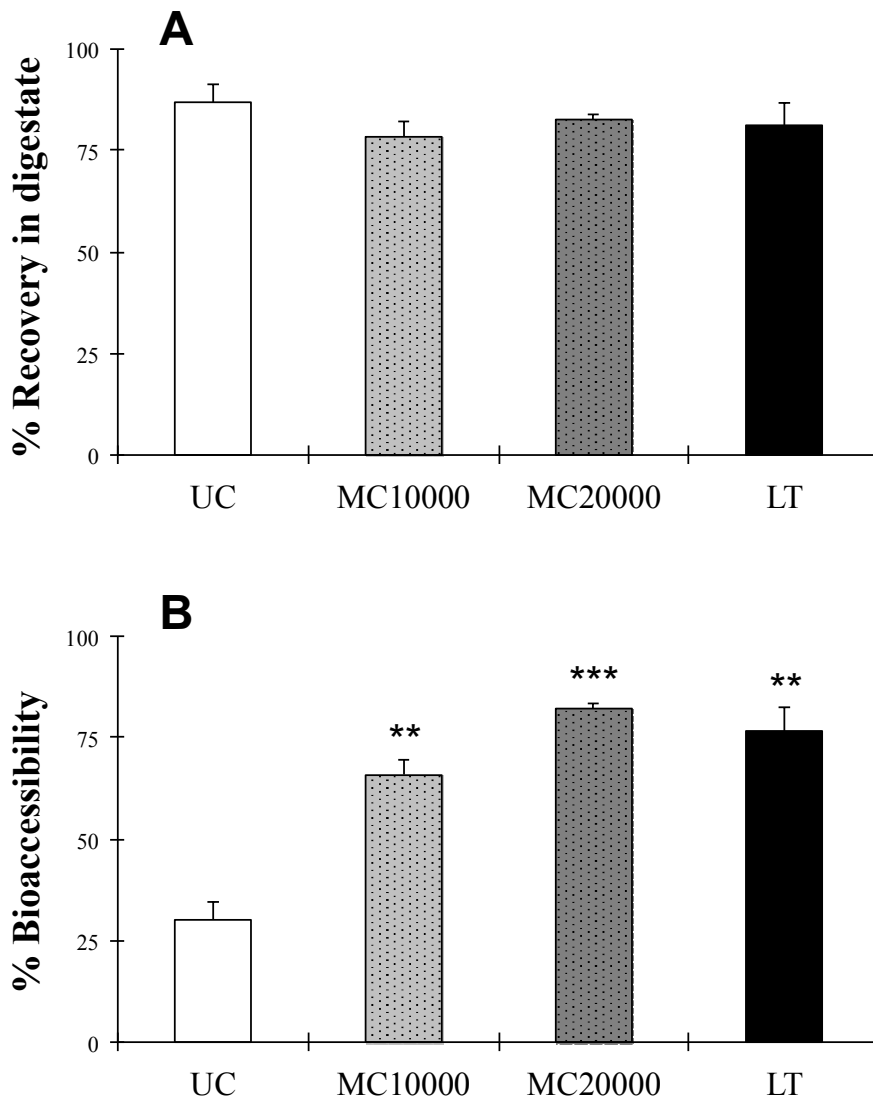


그림 65. in vitro digestion 후 시료의 recovery와 bioaccessibility

(\*\*\* P < 0.005 and \*\* P < 0.05, as compared to UC using Student's t test with n = 3)

- (5) 표 16의 결과로부터 시료 내 루테인의 recovery와 bioaccessibility를 구한 결과는 그림 65와 같다.
- (6) 실험결과 recovery %는 앞서 설명한 것과 같이 75-80% 수준으로 서로 비슷하여 물리적 가공처리가 시료 내 루테인의 안정성에 미치는 영향은 적음을 확인하였다.
- (7) Bioaccessibility (micellization)은 MF 처리를 거친 클로렐라가 가공처리를 하지 않은 클로렐라에 비해 3배 이상 높음을 알 수 있었다.

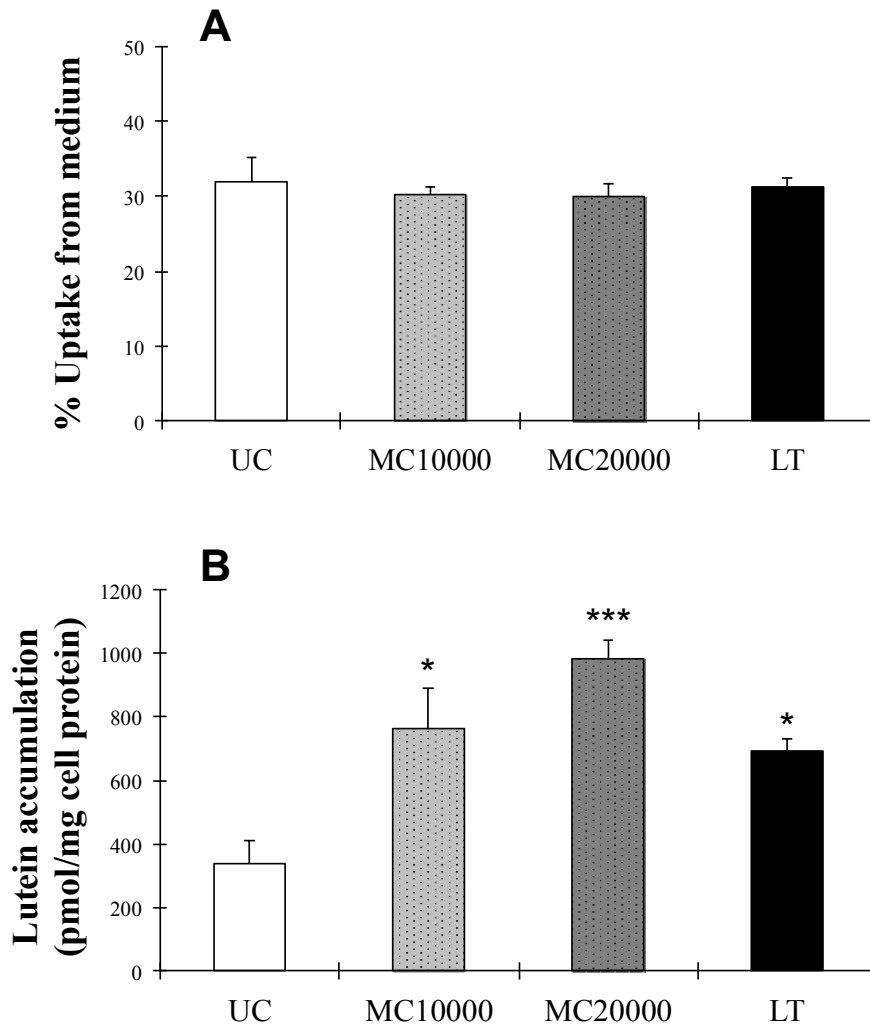


그림 66. in vitro digestion 후 Caco-2 cell uptake 분석  
 (\*\*\*)  $P < 0.005$  and (\*)  $P < 0.05$ , as compared to UC using Student's t test with  $n = 3$ )

(8) 표 16에서 측정된 micelles을 배지로 25% 희석하여 Caco-2 실험을 수행하였다 (그림 66).

(9) 그림 65의 (A)에서 uptake 비율이 동일한 것으로 볼 때 처리해준 양과 비례하여 Caco-2 세포 내에 흡수됨을 알 수 있었다.

(10) 실제로 세포에 처리된 micelles의 함량이 MC20000이 가장 많았기 때문에 세포 내에 축적된 루테인의 절대량도 MC20000에서 가장 높게 측정되었다. 루테인 축적량은 처리된 micelles에 영향을 받음을 확인할 수 있었다. 한편, 그림 65와 그림 66의 루테인 bioaccessibility와 accumulation 데이터를 보면 루테인 제품의 경우 세포 내 축적효율이 클로렐라보다 떨어지는 것을 알 수 있다. 이것은 MF 클로렐라의 질적 가치가 높음을 간접적으로 보여준다.

## 2. in vivo 생이용성 평가

### 가. in vivo 실험모델 디자인

- (1) in vitro 실험에서 얻은 결과를 통해 microfluidization을 거친 클로렐라 시료의 생이용성 증대효과를 확인할 수 있었다. 실제로 in vivo 실험에서도 비슷한 효과를 얻을 수 있는지 검증하기 위하여 in vivo 동물실험 모델을 적용하였다.

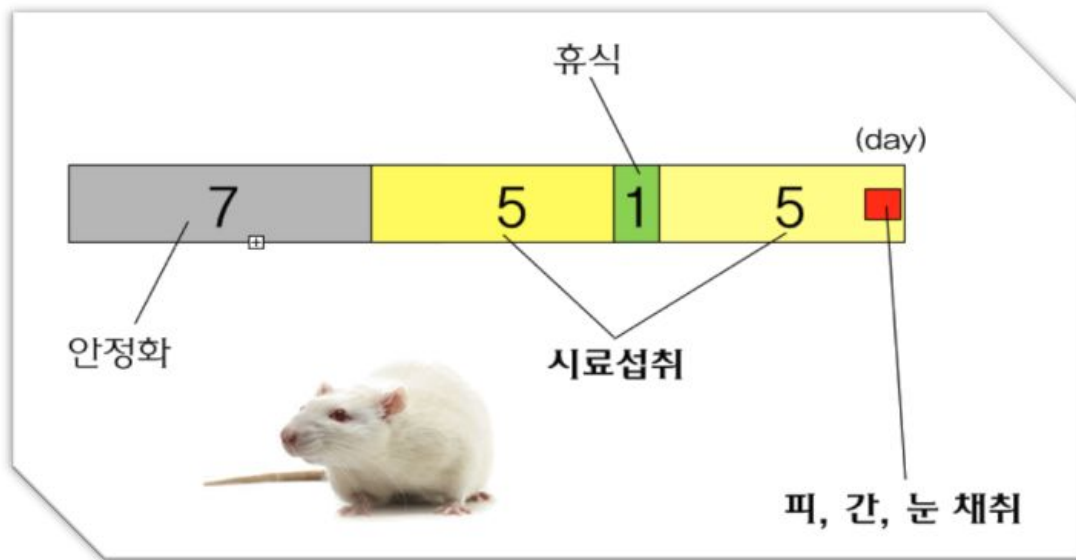


그림 67. in vivo 실험모델 스킴

- (2) 그림 67은 in vivo 실험모델의 스킴을 보여준다. 실험에 사용한 동물은 (주) 오리엔트 바이오의 SD rat (그림 68)을 사용하였으며 7주령의 쥐를 구입하여 7일 간 안정화 기간을 거친 후 intubation을 통해 시료를 투입하였다. 시료 투여 당시 쥐의 무게는 약 300 g 정도였다. 시료는 매일 한 번 씩 표 17에서 제조한 시료를 쥐 100 g 당 1 mL 씩 주입하였다. 총 10일 간 투여한 후 마지막 날 투여 70분 후에 림폰 마취제를 이용하여 쥐를 해부한 후 피와 간, 2개의 눈을 채취하였다. 실험모델은 Lakshminarayana (2006) 논문을 참조하여 수행되었다 (28).
- (3) 실험 그룹은 1) 사료만 섭취한 그룹 (feed only), 2) 가공처리를 하지 않은 일반 클로렐라를 투여한 그룹 (UC), 3) MF 클로렐라를 투여한 그룹 (MC), 4) 루테인을 투여한 그룹 등 총 4 그룹으로 나누었으며 MC 그룹은 농도별로 다시 3개 그룹으로 나누어 동물실험을 진행하였다. 각 그룹당 7마리 씩 같은 시료를 투여하여 통계적 처리를 하였다.

## OUTBRED RATS

### CD® IGS Rats

학명 : CrI:CD(SD)

유래 : 1925년 hybrid hooded 수컷과 Wister rat 의 암수 혼종으로부터 Robert W. Dawley에 의하여 유래. 1950년 Sprague Dawley, Inc로부터 Charles River로 도입.  
1991년 IGS Foundation Colony를 형성하기 위하여 8개의 Colony가 선택됨.  
1997년 isolator foundation colony로 다시 유래됨.  
IGS란 International Genetic Standard System을 사용하여 동물사육을 하는 것.

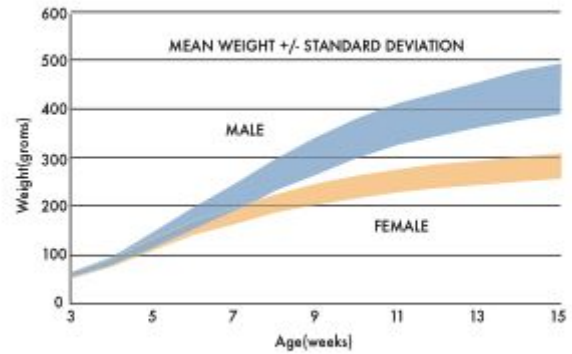
2000년 (주)오리엔트바이오로 도입.

모색 : Albino.

적용 : General multipurpose model, safety and efficacy testing, aging, nutrition, diet-induced obesity, oncology

특징/ 용도

- 비교적 대형으로 발육이 좋다
- 번식성이 양호하다
- 순해서 취급하기가 쉽다
- 오랫동안 걸쳐 전세계에서의 사용실적이 있다
- 발암성을 포함한 안전성 평가시험 등에 사용된다



### CD® Hairless Rats

학명 : CrI:CD-Hr<sup>hr</sup>

유래 : 이 자연변이 모델은 1980년대 후반 Charles River Wilmington에 있는 CrI:CD(SD) colony로부터 분리되었다.  
1993년 다시 유도되어서 barrier room 생산을 위하여 Charles River Raleigh, NC로 도입됨.  
이 모델은 다른 hairless 모델에서 발견되는 발모 및 탈모에 대한 전형적인 특징을 보이지 않음.  
mutation 확인을 위한 특정유전자분석은 착수되지 않았음. 조직병리학적으로 euthymic 모델로 밝혀짐.

모색 : Hairless, albino background.

적용분야 : Wound healing model, dermatology



그림 68. in vivo 동물에 사용된 SD rat의 정보

## 나. 조직샘플 채취 및 추출방법

### (1) 혈장

#### (가) 조직 채취

- ① 쥐로부터 10 mL 정도의 피를 채취하여 헤파린이 첨가된 vacutainer에 담근다.
- ② 3,500 rpm 에서 15 분 동안 원심분리 한다 (4°C).
- ③ 상층부에 있는 plasma를 회수한다 (약 4-5 mL).
- ④ deep freezer에서 보관한다.

#### (나) 카로티노이드 추출

- ① 37 도에서 재빨리 해동시킨 후, 3,500 rpm 에서 5 분 동안 원심분리한다.
- ② plasma 1 mL을 15 mL 튜브에 옮긴다.
- ③ MeOH 1 mL, Hexane(HX) 2 mL을 넣고 1 분 동안 섞어준다.
- ④ 3,500 rpm에서 5 분 간 원심분리한다.
- ⑤ HX 층 (1.8 mL)을 2 mL tube에 회수한다.
- ⑥ SpeedVac을 이용하여 날린다.
- ⑦ MeOH/TBME (9:1) 100 uL로 녹여낸다.
- ⑧ 14,000 rpm에서 5분간 원심분리한다.
- ⑨ 8-90 uL를 HPLC vial로 옮긴다.
- ⑩ HPLC로 분석한다.

### (2) 간

#### (가) 조직 채취

- ① 쥐로부터 피를 뽑은 후, 정맥을 자르고 portal vein에 주사기를 찔러 PBS로 간 관류를 한다.
- ② 간 조직을 떼 내어 무게를 재고 50 mL 튜브에 넣는다.
- ③ deep freezer에 보관한다.
- ④ 37도에서 빠르게 해동시킨다.
- ⑤ dish에 옮겨 칼로 자른 후 동량의 PBS를 첨가하여 homogenization을 수행한다 (간 무게: 10-15 g).
- ⑥ homogenization 후 최종회수 볼륨을 확인하고 3 mL을 15 mL 튜브에 옮긴다.

(나) 카로티노이드 추출

- ① Liver or eye solution 을 15 mL 튜브에 옮긴다.
- ② 10N KOH 1 mL을 넣고 65도에서 10 분 동안 반응시킨다.
- ③ MeOH 1 mL, HX 2 mL을 넣고 1 분 동안 섞어준다.
- ④ 3,500 rpm에서 5 분 간 원심분리한다.
- ⑤ HX 층 (1.8 mL)을 2 mL tube에 회수한다.
- ⑥ SpeedVac을 이용하여 날린다.
- ⑦ MeOH/TBME (9:1) 100 uL로 녹여낸다.
- ⑧ 14,000 rpm에서 5분간 원심분리한다.
- ⑨ 8-90 uL를 HPLC vial로 옮긴다.
- ⑩ HPLC로 분석한다.

(3) 눈

(가) 조직 채취

- ① 쥐로부터 양쪽 눈을 모두 채취한 후 cryotube에 함께 담는다.
- ② deep freezer에 보관한다.
- ③ 분석 전에 눈 무게를 측정한다 (200-400 mg).
- ④ PBS 1 mL을 넣고 함께 homogenization 한 후 15 mL 튜브에 옮긴다.

(나) 카로티노이드 추출

: 간 추출방법과 동일



다. in vivo 동물실험 결과

(1) 동물 사료 속에 포함된 카로티노이드 함량과 각 그룹에 투여한 시료의 카로티노이드 농도는 표 17과 같다.

표 17. in vivo 실험에 사용한 사료와 시료 내 카로티노이드 함량 분석

	carotenoid content				
	feed (µg/g)		test samples (µg/mL)		
			UC	MC	LT
Lutein	0.737 ± 0.065	61.667 ± 1.015	66.545 ± 2.046	65.397 ± 2.387	
Zeaxanthin	0.330 ± 0.028	N.D.	N.D.	7.051 ± 0.695	
β-Carotene	0.099 ± 0.005	8.927 ± 0.169	9.056 ± 1.146	1.329 ± 0.249	

(2) 표 17과 같이 각 그룹에 투여한 루테인의 농도는 거의 동일하게 유지시켜 주었으며 클로렐라 시료에서는 베타 카로틴이 루테인의 15% 정도 포함되어 있었다. 루테인 제품은 클로렐라 시료에서는 발견되지 않은 제아잔틴이 약 10% 가량 포함되어 있었다.

(3) 기본 사료로 이용된 (주)오리엔트 바이오의 LabDiet 5L79은 알팔파와 옥수수수를 이용하여 만들어 졌고 이러한 이유로 일정량의 루테인과 제아잔틴이 분석되었는데 이것은 매일 투여된 루테인 함량의 약 10%에 해당하는 양이다. 수행한 동물실험 모델에서는 기본적으로 루테인을 섭취하는 상태에서 루테인 제형의 보강효과를 확인할 수 있다. 기본 사료에 대한 정보는 그림 69와 같다.



사료 입자모양



사료 1:1 SIZE

#### Ingredients

Ground corn, wheat middlings, dehulled soybean meal, animal fat preserved with BHA, fish meal, dehydrated alfalfa meal, cane molasses, calcium carbonate, salt, ground oats, ground wheat, ground soybean hulls, dried beet pulp, wheat germ, dried whey, dicalcium phosphate, DL-methionine, corn gluten meal, menadione dimethylpyrimidinol bisulfite, silicon dioxide, magnesium oxide, thiamin mononitrate, pyridoxine hydrochloride, vitamin A acetate, soybean oil, d-alpha tocopheryl acetate, cholecalciferol, folic acid, biotin, calcium pantothenate, riboflavin, nicotinic acid, cyanocobalamin, manganous oxide, zinc oxide, ferrous carbonate, copper sulfate, zinc sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate, sodium selenite.

# LabDiet 5L79

LabDiet 5L79 모델은 벨릿 형태로 멸균 상태에서 Autoclave가 가능한 제품입니다. 정밀한 제조 과정을 거친 사료들로 Rat, Mouse 동물들에게 꼭 필요한 영양소만 공급할 수 있도록 최적화되어 고품질의 영양을 균일하게 제공할 수 있는 제품입니다.

#### 제품의 특징

- 멸균 상태에서 Autoclave 가능
- 천연 단백질 18% 추가 미네랄 3.5% 함유
- 사전 검사로 인한 최대한의 영양분 제공 및 유실 방지
- GLP 요구를 충족함
- Rat & Mouse 동물들에 2~3일 정도 유지될 수 있게 공급
- 항상 신선한 물과 쾌적한 환경에서 공급
- 타원형 벨릿 및 가루형



#### 성분 요약표

Rat and Mouse Diet	
Product Code	5L79
Nutrients	
Protein	18%
Fat, ether extr	5.2%
Fat, acid hydr	-
Crude fiber	6.7%
Ash	5.7%
Calcium	0.85%
Phosphorus	0.62%
Certified	-
Irradiated	-
Autoclavable	■
Appropriate for:	
Rats	■
Mice	■
Hamsters	■

#### Vitamins

Carotene, ppm	2.8
Vitamin K (as menadione), ppm	3.4
Thiamin Hydrochloride, ppm	92
Riboflavin, ppm	8.0
Niacin, ppm	60
Pantothenic Acid, ppm	24
Choline Chloride, ppm	1300
Folic Acid, ppm	4.2
Pyridoxine, ppm	12
Biotin, ppm	0.28
B12, mcg/kg	19
Vitamin A, IU/gm	44
Vitamin D3 (added), IU/gm	1.5
Vitamin E, IU/kg	80
Ascorbic Acid, mg/gm	trace

#### Calories provided by:

Protein, %	21.028
Fat (ether extract), %	13.668
Carbohydrates, %	65.304

그림 69. in vivo 동물에 사용된 사료의 정보: 5L79 (주)오리엔트 바이오

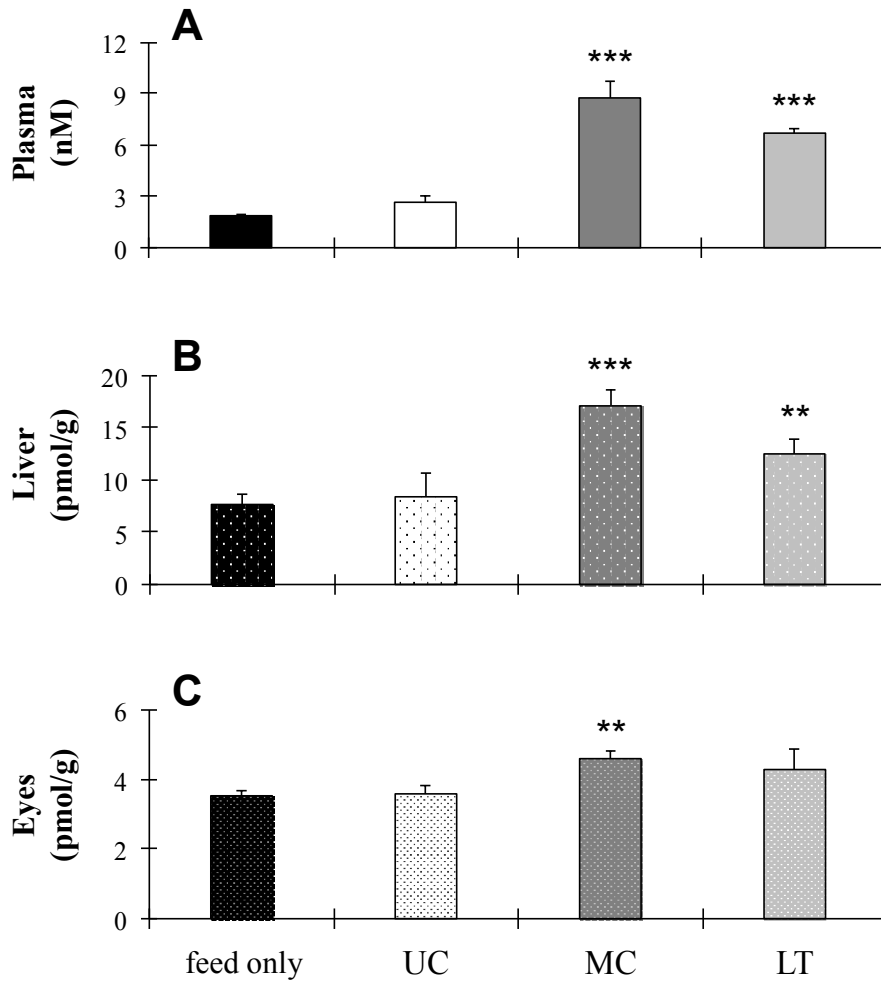


그림 70. in vivo 실험 후 혈장, 간, 눈 속의 루테인 함량 분석

(\*\*\* P < 0.005 and \*\* P < 0.05, as compared to feed only group using Student's t test with n = 3)

(4) 10 일간의 시료 투여 후에 채취한 혈장, 간, 눈 속의 루테인 함량을 HPLC를 통하여 분석하였다. 그림 70에 의하면 각 그룹별 조직 내 루테인 함량을 확인할 수 있다. 일반 클로렐라 (UC)를 투여하였을 경우 혈장, 눈, 간 모두 사료를 섭취한 그룹과 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 못했다. 이것은 일반 클로렐라를 그대로 섭취 시에는 루테인의 흡수가 제대로 이루어지지 않음을 보여준다. 반면, MF 클로렐라의 경우 동일한 양의 루테인을 섭취 시 일반 클로렐라 섭취 시보다 혈장 및 간에서 3배 가까이 루테인 함량이 증가하였음을 알 수 있다.

(5) 사료만 먹은 그룹에서도 루테인 함량이 측정된 것은 (3)에서 설명한 것과 같이 사료 내에 미량의 루테인이 존재하였기 때문인 것으로 여겨진다.

(6) MC 그룹의 경우 루테인 제품을 투여한 LT 그룹보다도 높은 생이용성을 나타냈다.

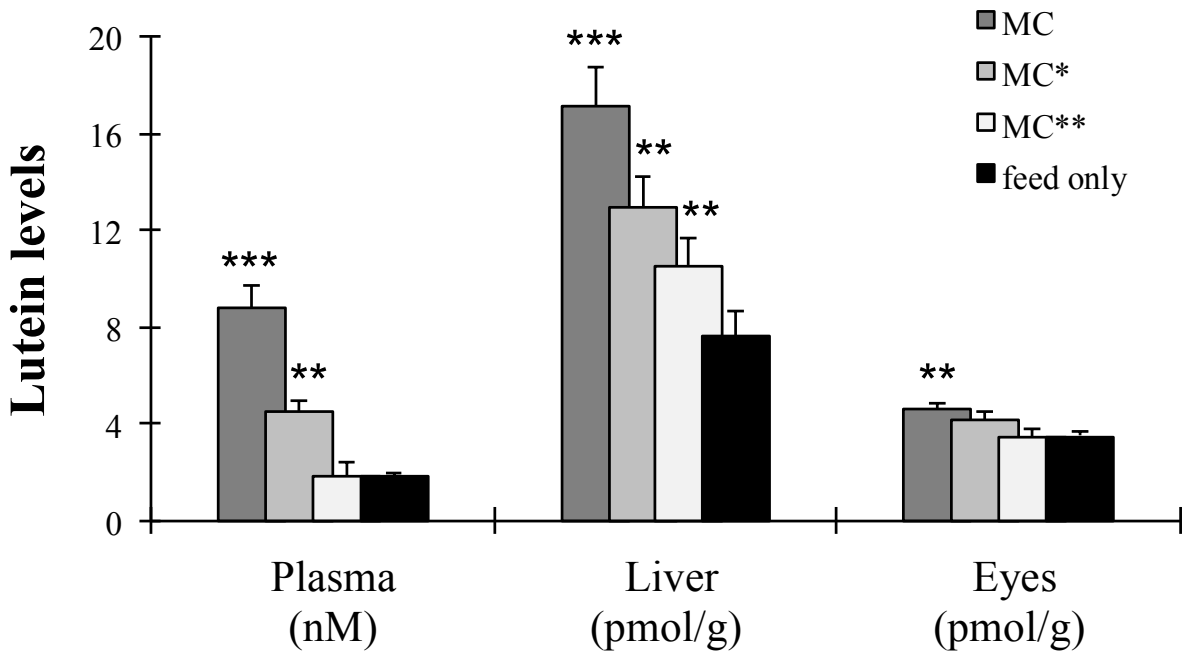


그림 71. in vivo 실험에서 MF 시료 농도별 혈장, 간, 눈 속의 루테인 함량 분석  
 - MC (600 mg/kg), MC\* (300 mg/kg), MC\*\* (150 mg/kg)

(\*\*\* P < 0.005 and \*\* P < 0.05, as compared to feed only group using Student's t test with n = 3)

(7) MC 그룹의 농도별 in vivo 생이용성 분석을 수행한 결과는 그림 71과 같다. 실험결과, 흡수된 루테인의 양은 처리된 시료의 농도에 비례하여 농도 의존적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 특히 본 과제에서 목적으로 하는 황반변성 억제 활성을 나타내기 위해서는 눈 쪽에서의 루테인 함량이 증가되어야하는데 실험에 의하면 확연하지는 않지만 MC 농도에 따라 눈 속 루테인의 함량이 증가됨을 알 수 있다.

(8) 생이용성 실험에서 쥐 1 kg 당 600 mg 의 MC를 처리하였을 때에만 눈에서의 루테인 함량 증가가 유의적이었다. 이는 MF 처리 클로렐라라고 하여도 일정량 이상을 섭취해야 루테인 보강효과를 나타낸다고 판단할 수 있다.

표 18. in vivo 실험에 사용한 시료의 in vitro digestion과 cell transport 분석

Samples	Lutein content ( $\mu\text{g}/20 \text{ mL}$ )							
	Food		Micelle		Medium		Cellular transport	
UC	284.32 $\pm$ 11.28		74.56 $\pm$ 5.42		18.05 $\pm$ 1.72		2.93 $\pm$ 0.27	
MC	322.17 $\pm$ 24.11		221.77 $\pm$ 18.04		54.45 $\pm$ 3.40		9.53 $\pm$ 1.73	
MC*	160.15 $\pm$ 8.30		132.93 $\pm$ 7.42		31.91 $\pm$ 1.39		5.47 $\pm$ 0.99	
MC**	79.98 $\pm$ 6.64		68.79 $\pm$ 3.09		16.84 $\pm$ 1.63		2.97 $\pm$ 0.21	
LT	287.09 $\pm$ 10.88		199.06 $\pm$ 24.80		50.31 $\pm$ 9.33		7.60 $\pm$ 0.28	

(9) 표 18은 in vivo 실험에 사용된 각 시료들을 동일한 양만큼 in vitro digestion 시스템에서 소화 반응을 시킨 후 각 단계에서의 총 루테인 함량을 측정하고 Caco-2 세포 내 transport 효율을 분석한 결과이다. in vivo plasma 결과와 비슷하게 MC 그룹이 UC 그룹보다 3배 이상 높은 생이용성을 나타내었으며 세포 내로 수송된 cellular transport 양도 처리된 양에 비례하였다.

(10) in vitro 실험에서도 in vivo 실험과 동일하게 MC의 농도에 따라 최종 cellular transport의 함량이 달라짐을 확인할 수 있었다. 한편 루테인의 경우 MC와 비슷한 micellization %를 보이지만 실제로 세포 내로 수송되는 비율은 낮아 총 생이용성이 MC보다 낮게 측정되었다.

표 19. in vivo 실험과 in vitro digestion 실험결과의 비교

	In vitro digestion	In vivo digestion
UC	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.12
MC	3.25 ± 0.11	3.30 ± 0.12
MC*	1.86 ± 0.13	1.70 ± 0.11
MC**	1.01 ± 0.11	0.87 ± 0.19
LT	2.59 ± 0.06	2.52 ± 0.16

(11) 그림 71의 in vivo 혈장 분석 결과와 표 18의 transport 효율을 서로 비교하기 위해 각각의 실험에서 가공처리를 하지 않은 클로렐라를 투여한 그룹 (UC)을 1로 놓고 상대적 비교를 수행하였다 (표 19). 각 데이터가 거의 일치함을 보여 본 연구에서 구축한 in vitro digestion, Caco-2 transport fusion analysis 방법이 in vivo 실험에서의 혈장흡수 결과를 효과적으로 대체할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이것은 앞으로 동물실험 모델을 대체할 수 있는 효과적인 in vitro digestion 평가 시스템을 구축했다는 점에서 큰 의의가 있다.

## 제 8 절 수행결과 VI: 나노화 클로렐라의 음료 가공적성 검증 (중앙대)

### 1. 가공적성 연구 수행 내용

가. 최적 조건을 이용한 클로렐라 나노 suspension 제조

#### (1) 클로렐라 nano-suspension 제조

- (가) 1차년도 과제 수행 결과 나노 영역으로 분쇄처리 된 클로렐라가 루테인 추출에 효율적임을 확인하였다.
- (나) 클로렐라의 입자 크기 저감화와 산업 현장에서의 생산 가능성을 고려하여 농축 클로렐라 배양액을 10배 희석 한 후 고압균질기를 이용하여 80 MPa의 압력으로 5회 통과 시키는 조건을 최적조건으로 설정하여 나노영역의 평균 입자크기를 갖는 클로렐라 suspension을 제조하였다.
- (다) 나노화 클로렐라를 루테인 용출 특성이 우수한 건강지향 음료로 제조하기 위해서는 유통기간 중 입자가 가라앉지 않는 현탁 안정성 (suspension stability)이 필수적이다. 따라서 나노화 클로렐라의 음료 제형 적용을 위한 현탁 안정성을 검증하였다.

나. 나노화 클로렐라의 음료 적용을 위한 suspension 안정성 검증

#### (1) Turbiscan을 이용한 nano-suspension 안정성 확인

(가) 나노 서스펜션의 상층부 청징 안정성 (Clarification stability)

- ① 클로렐라 농축 배양액을 10배 희석 후 동일 압력인 80 MPa에서 cycle 조건을 변화시켜 고압 균질 처리하였다.
- ② 각 시료는 Turbiscan (Turbiscan LAB, formulation, France)을 이용하여 음료제형의 안정성을 측정 하였다 (29-30). Turbiscan을 이용한 방법은 현탁액을 상층부-중간부-하층부로 나누어 각각 구간의 안정성을 가속하여 측정할 수 있다는 장점이 있다.
- ③ Cycle 조건에 따른 시료는 30분 간격으로 총 7시간 동안 현탁 안정성을 측정하였다

(그림 72). Bottom (A)구간의 BS (backscattering)가 증가하고 Top (C)구간의 BS가 감소하면 침전 현상임을 알 수 있다. 또한 Middle (B)구간에 변화가 없으면 응집이 일어나지 않아 크기 변화가 없다. C 구간의 profile들의 간격이 조밀하게 분포될수록 침전 속도가 느림 (안정성)을 알 수 있다.

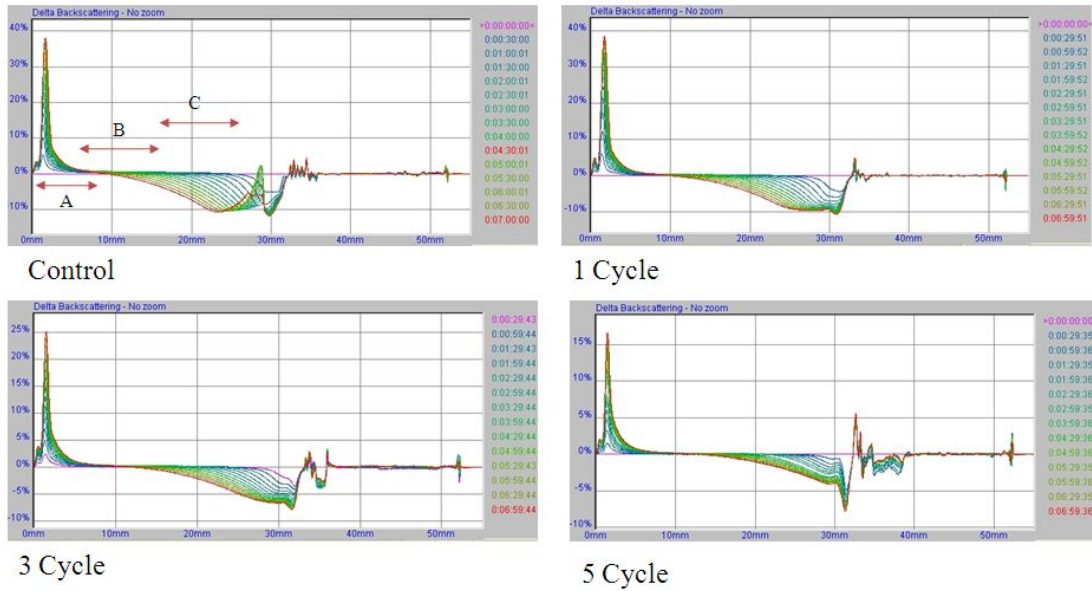


그림 72. Dispersion stability of chlorella suspension for different microfluidization cycles.



④ 시료 상층부 (clarification layer)의 시간에 따른 농도 감소로 인한 BS의 감소는 그림 73에 mean value kinetics로 나타내었다. 시료의 높이에 대한 구간은 4 시료에 대하여 동일하게 meniscus에서부터 15 mm 아래로 선택하여 계산하였다. Kinetics에서 확인할 수 있는 것처럼 시료 5 cycles > 3 cycles > 1 cycle > control의 순서로 5 cycles의 시료가 침전이 덜 일어나 보다 분산 안정성이 있는 시료임을 알 수 있다.

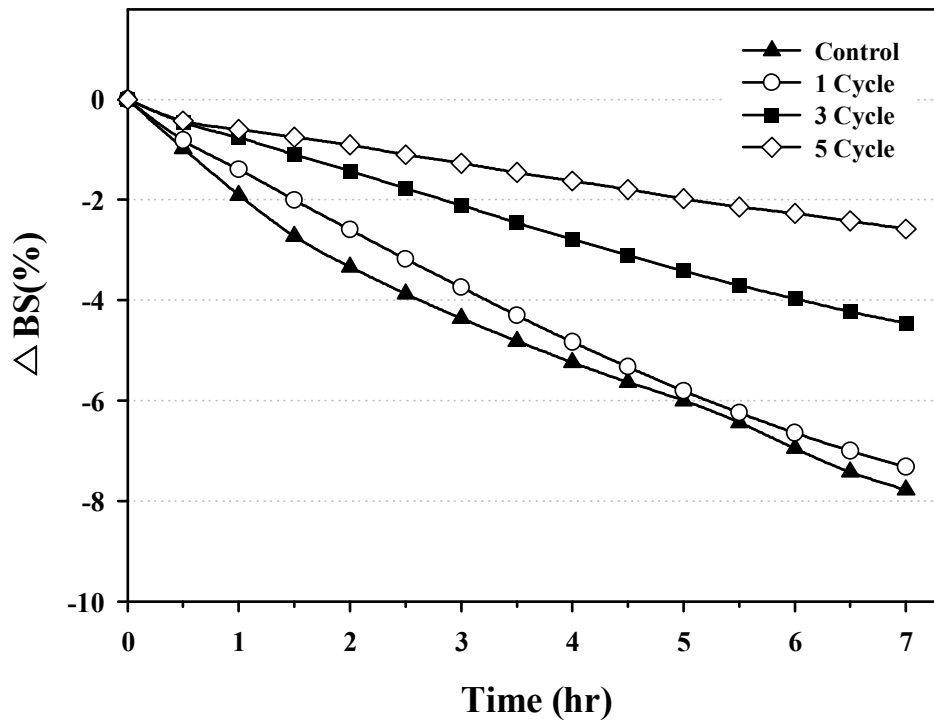


그림 73. Mean value kinetics for clarification layer in delta backscattering (%)

(나) 나노 서스펜션의 하층부 침전 안정성 (Sedimentation stability)

- ① 4개 시료간의 침전현상에 의한 분산 안정성의 차이를 그림처럼 시료 하층부 (Sedimentation layer)의 시간에 따른 농도 증가로 인한 backscattering의 증가를 그림 74에 mean value kinetics로 나타내었다.

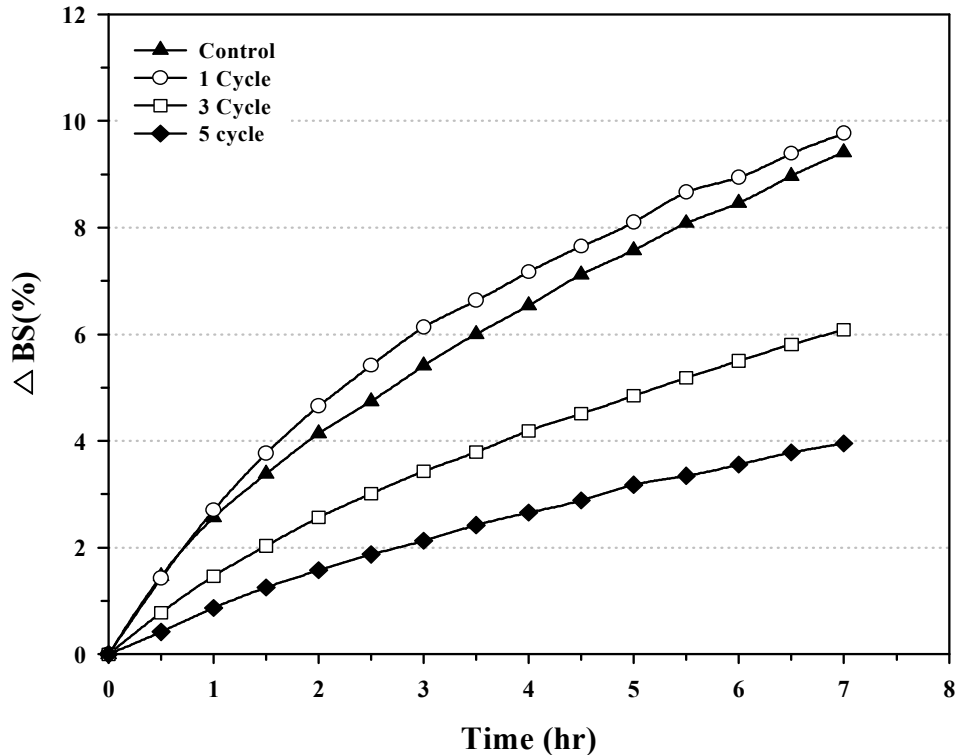


그림 74. Mean value kinetics for sedimentation layer in delta backscattering (%)

- ② 시료에 대한 높이의 구간은 네 시료에 대해 동일하게 바닥면 0 mm에서 부터 7 mm를 선택하여 계산하였다.
- ③ Sedimentation kinetic 결과 시료는 5 cycles > 3 cycles > 1 cycle ≒ control 로 Clarification kinetic과 마찬가지로 5 cycle의 suspension이 가장 안정한 상태를 유지하는 것을 확인하였다.

(2) 음료 적용을 위한 클로렐라 나노 서스펜션의 저장기간 중 현탁 안정성

(가) 실험방법

- ① 앞선 실험에서 최적화한 고압균질 공정조건인 클로렐라 농축 배양액을 10배 희석 후 80 MPa의 압력에서 cycle 조건을 변화시켜 클로렐라 나노 서스펜션을 제조하였다.
- ② 샘플 병에 시료를 분취하여 4 °C에서 22일간 저장 하였다.
- ③ 클로렐라 나노 서스펜션의 clarification을 측정하기 위해서 14,000 rpm에서 15분 원심분리 전 후 각각 시료의 상층액 1 ml를 사용하였다.
- ④ 클로렐라 나노 서스펜션의 청정(clarification)도 측정을 위해 가시광선영역에서 흡광도를 측정한 결과, 흡광도 피크가 가장 큰 550 nm 에서의 측정을 선정하였다 (그림 75) (31).

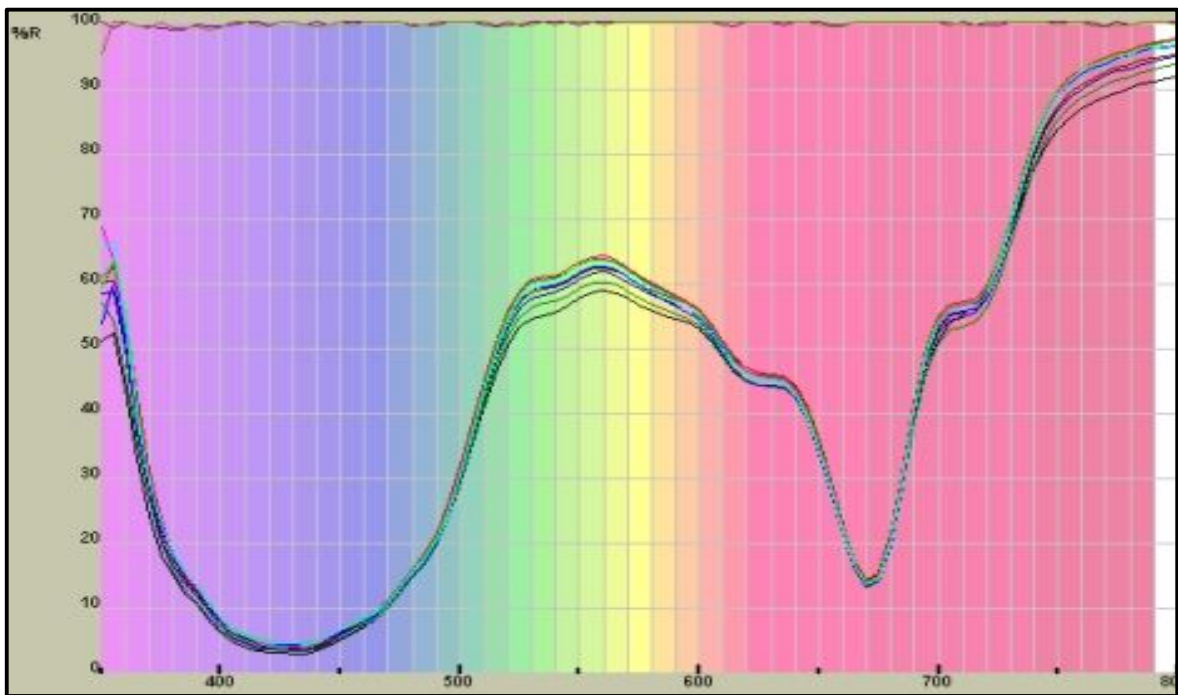


그림 75. Absorbance spectrum of chlorella suspension in visible range ( $\lambda = 400\sim 800$  nm)

- ⑤ Clarification은 relative turbidity (T%)로 계산하였다.  $T_C$ 는 원심분리 전  $T_0$ 는 원심분리 후의 값을 나타낸다 (32-34).

$$T \% = \frac{T_C}{T_0} \times 100$$

(나) 실험결과 및 고찰

- ① 클로렐라 나노 서스펜션의 안정성은 청징도 (clarification)로 측정하였다. 저장 동안의 clarification의 증가는 침전으로 인한 상층액의 투명성을 의미한다.
- ② 클로렐라 나노 서스펜션의 22일간의 저장 실험의 결과는 그림 76과 같다. Control의 경우 저장 1~2일 안에 급격한 침전으로 인해 clarification이 약 40 % 이상 급격히 증가되었으며, 저장 2일 이후로도 침전은 지속적으로 증가되어 현탁 안정성이 매우 열악함이 확인되었다.

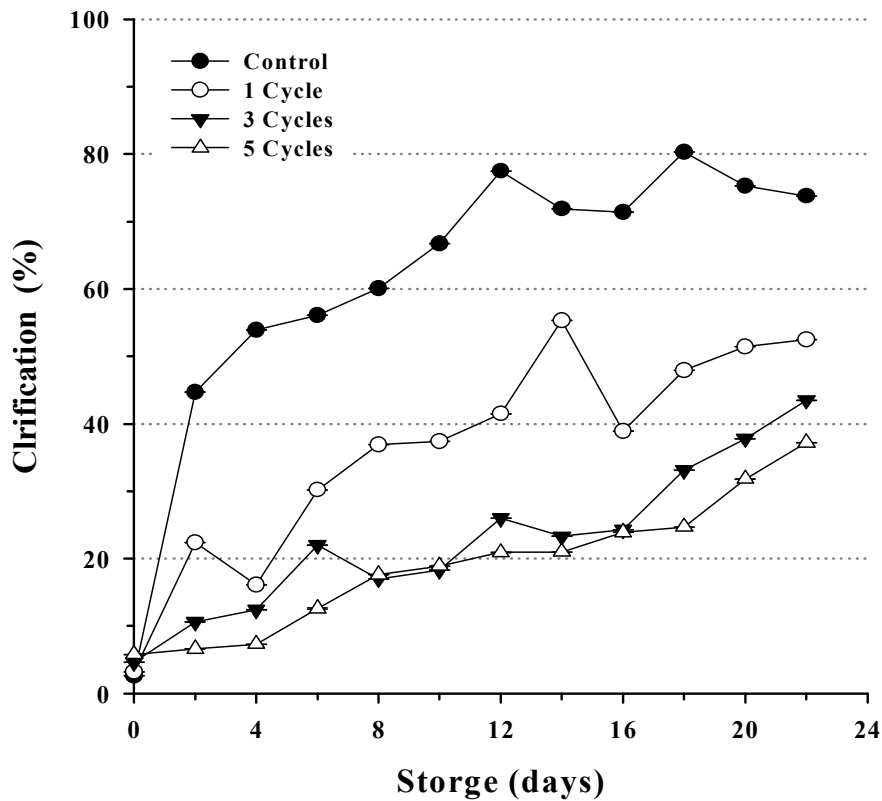


그림 76. Changes of the stability in chlorella suspension during 22 day of storage at 4°C

- ② 3 cycles과 5 cycles 처리한 클로렐라 나노 서스펜션의 안정성은 control에 비해 현저히 안정하게 유지되었다. 1 cycle은 3 cycles 이상의 시료 보다는 안정성이 낮게 관찰되었지만 control 보다는 안정성이 높게 유지되었다.
- ④ 클로렐라 나노 서스펜션은 22일 동안 clarification이 매우 서서히 증가하며 control에 비해 4배 이상 느리게 침전되는 것을 확인하였다.

- ⑤ 클로렐라 나노 서스펜션 색상을 원심분리 후 상등액으로 관찰하였다 (그림 77). 80 MPa에서 5 cycles 처리 시 가장 진한 녹색을 띄었으며 분쇄 정도에 따라 색의 차이가 있음을 확인하였다.



그림 77. Image of supernatant after centrifuging treatment from nanosuspension of chlorella (Dilution : 10 times, Pressure : 80 MPa)

⑥ 클로렐라 나노 서스펜션 시료를 22일 동안 4℃와 25℃에 각각 보관하여 관찰한 시료는 그림 78에 사진으로 나타내었다.

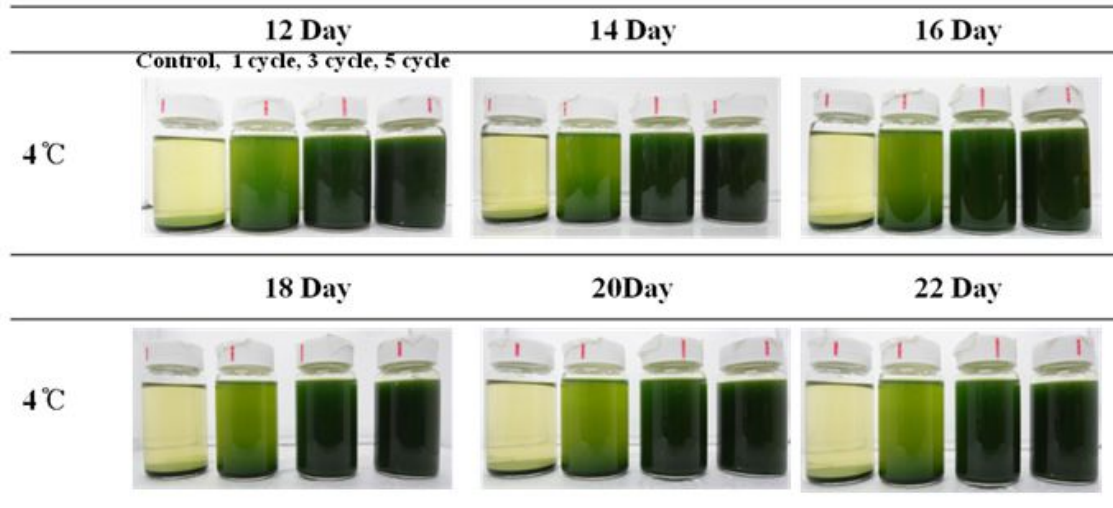


그림 78. Changes of the stability in chlorella suspension during 22 days of storage at 4 °C and 25 °C (Dilution : 10, Pressure : 80 MPa)

- ⑦ 육안으로 확인하였을 때도 control의 경우 2일 동안 절반이상 침전되었으며 4일째는 대부분이 침전된 것을 확인 할 수 있었지만 나노화 서스펜션의 경우 뛰어난 안정성을 갖고 있음이 확인되었다.
- ⑧ 실온에 저장한 시료들은 4℃ 저장 시료들 보다 침전이 빠르게 진행되었다. 6일째에는 미생물 등의 오염물질에 의해서 갈변한 것으로 판단되어진다.

(3) 클로렐라 nano-suspension의 색도 변화

(가) Nano-suspension은 4℃에서 저장되었으며 22일 동안의 색도 변화를 Clara의 방법을 변형하여 측정하였다 (35). 그 결과는 그림 79에 나타내었다.

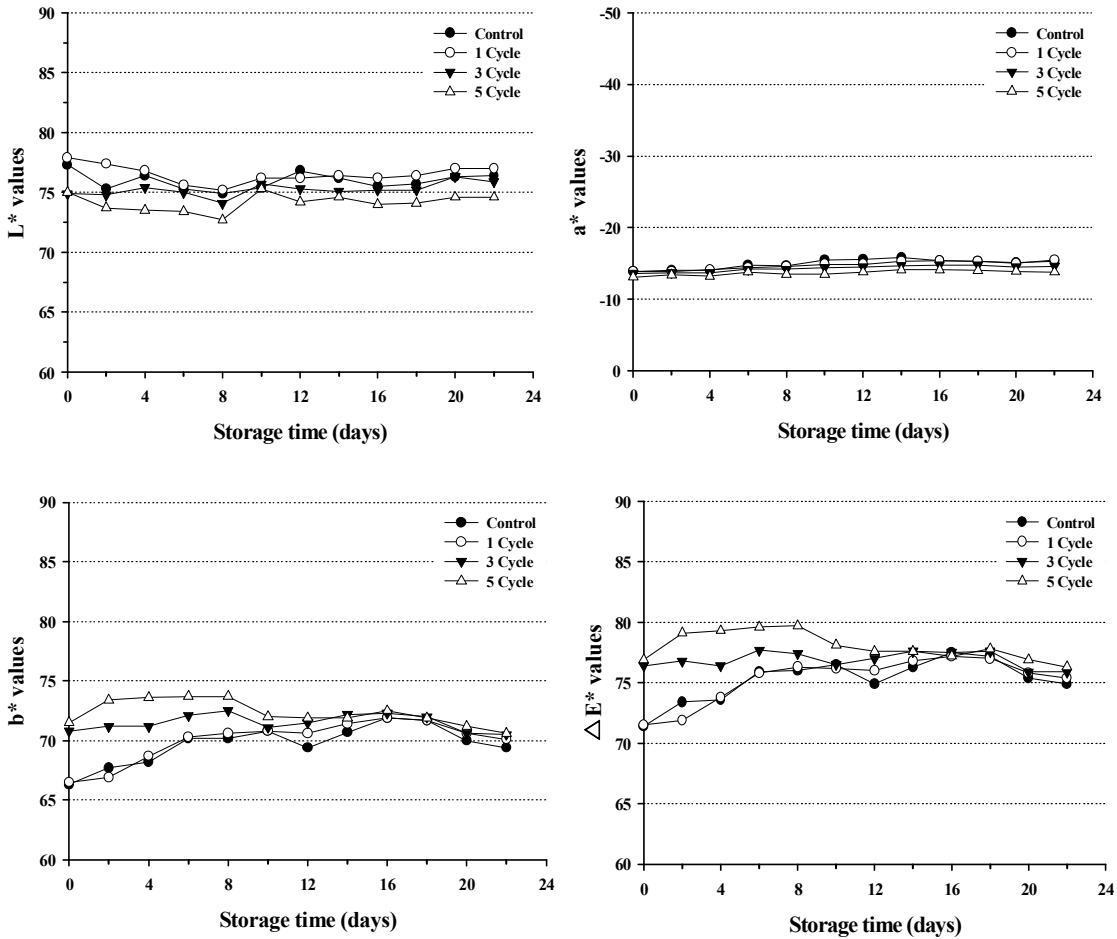


그림 79. Changes of the color in chlorella suspension during 22 days of storage at 4℃ (Dilution : 10, Pressure : 80 MPa)

(나) 색도는 Color Difference Meter (UltraScan PRO, Hunterlab, U.S.A)를 이용하여 처리시료를 20배 희석하여 L,a,b와 delta 값을 분석하였다.

(다) L\* 값과 a\* 값의 경우 저장 기간 동안 시료간의 큰 변화를 찾을 수 없었다.

(라) Control과 1 cycle은 저장 10일간  $b^*$  값이 약 4.5 정도 증가하는 경향을 보였다. 반면에 3 cycles과 5 cycles의 경우는 처리한 날부터 control 보다 초기  $b^*$  값이 5.2 정도 더 높게 측정되었고 8일까지 색의 변화 없이 유지되었다.

(마) 전반적인 색변화는 고압균질 처리에 따라 약간의 색도 차이가 발견되었다. 그러나 8일 이후로는 큰 변화가 없었다.



(4) 저장 동안의 pH 변화

(가) 클로렐라 농축액을 10배 희석 후 80 MPa의 압력에서 처리 후 22일 동안 4℃에 보관된 시료의 pH를 측정하였다. 결과는 그림 80에 나타내었다.

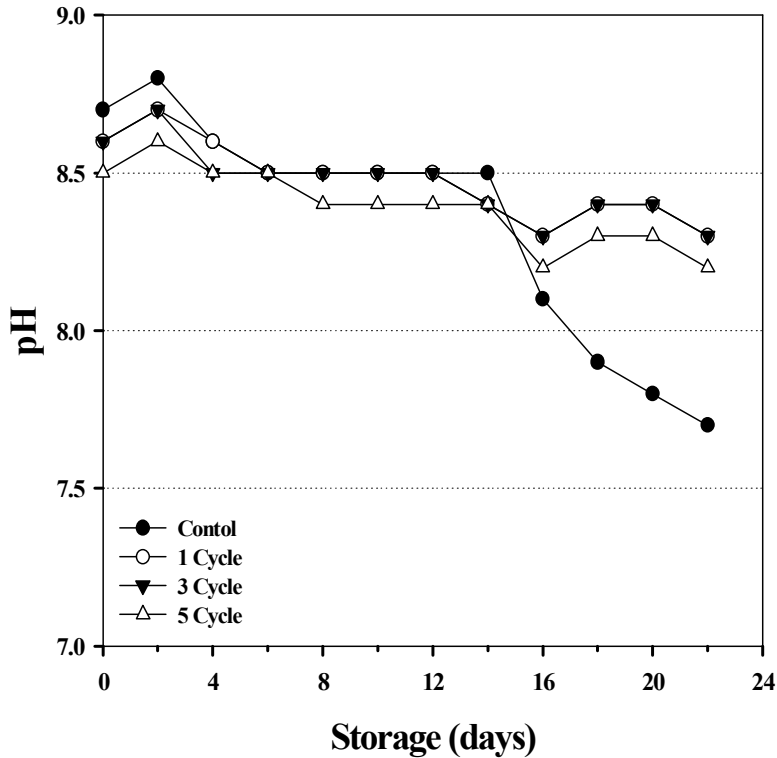


그림 80. Changes of the pH in chlorella suspension during 22 days of storage at 4 °C (Dilution : 10, Pressure : 80 MPa)

(나) 클로렐라 pH는 약 8.5로 측정되었으며 처리한 시료의 경우 control 보다 조금 높은 pH값으로 측정되었다.

(다) 처리한 시료들은 2주 동안 대부분 균일한 pH 값을 유지하다가 그 이후에는 pH가 조금씩 감소하는 경향을 보였다. 특히 control의 경우 그 변화의 폭이 다른 시료보다 큰 것으로 측정되었다.

(라) 2주 후의 pH 변화의 원인은 부패 및 변패 등으로 인한 감소로 보인다.

## 2. 연구개발 수행 결과 요약

- 가. 나노화 클로렐라의 음료 제형 적용을 위한 suspension 안정성은 10 배 희석과 80 MPa 이상의 압력에서 5 cycles 이상일 때 가장 안정하게 유지되었다.
- 나. Turbiscan 안정성 측정 결과 5 cycles의 안정도는 5.90으로 control의 0.94보다 6배 높은 안정성을 나타냈다. 혼탁 안정성 결과 역시 control은 1~2 안에 clarification이 40 %로 급격히 상승하여 침전이 빠르게 증가되었지만 5 cycles은 clarification이 20일 후에도 20 % 이하로 안정성이 유지되었다.
- 다. 클로렐라 배양액은 80 MPa의 압력에서 5 cycles로 처리한 nanosuspension은 22일 동안 안정성이 유지되었으며, 상등액 관찰 결과에서도 진한 녹색으로 관찰되어 안정성과의 연관성을 확인하였다.
- 라. 나노화 클로렐라의 건강 지향 음료로 제조하기 위한 고압균질기 최적 공정조건은 10배 희석과 80 MPa의 압력과 5 cycles이며, 이를 토대로 suspension의 안정성 및 lutein 용출이 우수한 건강지향 음료로 제조가 가능할 것으로 판단된다.

## 제 9 절 수행결과 VII: 시제품 연구 (대상㈜)

### 1. Xanthophyll 제품 개발

#### 가. 제품 컨셉 설정

: 제품 컨셉 설정: 저출산 고령화 사회를 대비한 노인 대상 건강기능식품 개발의 하나로 고루테인 함유 클로렐라 첨가한 노인용 인지질 제품 개발

#### 나. Xanthophyll 함유 제품 개발

: 원료 선정: 주원료로 클로렐라 분말 + 대두유래 포스파티딜세린 (PS)

- (1) 포스파티딜세린은 뇌신경에 존재하며, 뇌의 인지질 중 15%를 차지하고 있는 물질로 대두 유래 포스파티딜세린은 소뇌 유래 포스파티딜의 광우병에 대한 걱정이 없는 안전한 원료이다.
- (2) 포스파티딜세린의 작용기작은 다음과 같다. 뇌세포에서 손상된 세포막에 존재하는 PS를 복구하여 세포막 구조를 건강하게 유지시킴으로써 세포 보호 작용을 하고, 뇌에서 신경 신호의 발생, 저장, 전달, 수신 등 신경세포 기능의 주요한 역할에 관여하는 단백질을 활성화 시키거나 조절하는 역할을 한다.
- (3) 개발 하고자 하는 제품의 원료가 배합비 중에서 지질 성분의 함량이 약 80% 정도이다. 지용성 비타민은 지질과 함께 섭취하면 흡수율이 20% 이상 높아지는 것을 논문 자료를 통해 확인하였다 (36-37). 이와 같은 원리로 클로렐라 분말 내의 카로티노이드는 지용성으로 지질성분과 함께 섭취하여 클로렐라 분말에 포함된 루테인의 인체 내 흡수율을 높이는데 도움을 줄 수 있다.

#### 다. 시제품 생산

: 현재 시제품 생산을 완료하였음

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구과제평가의 착안점 및 기준

구분	연도	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2009	Xanthophyll 분석	10 %	· Xanthophyll 정량 분석법 확립 여부
		물리적 가공기술 적용에 따른 생이용성 연구	50 %	· 물리적 가공기술 적용에 의한 xanthophyll 생산성 향상 여부 · 물리적 가공기술 적용 시료에 대한 생이용성 평가 여부
		초미세 나노 분쇄화 기술개발	20 %	· 1 μm 이하 분쇄화 여부 · 분쇄화에 의한 추출효율 향상 여부
		Xanthophyll 함유 제품 개발을 위한 최적 시료 선정	10 %	· 제아잔틴 생산을 위한 산업용 소재 1종 이상 선정 · 루테인 생산을 위한 산업용 소재 1종 이상 선정
		미세조류를 활용한 xanthophyll 함유 증대균주 개발	10 %	· Xanthophyll 고 함유 미세조류 선정 여부
2차 년도	2010	최적원료선정, 제형연구 및 in vitro digestion	20 %	· 나노분말 시료의 위장관 모사 시스템에서 생이용성 평가 여부 · 나노분말 시료의 대장 세포 흡수 평가 여부
		In vivo 황반변성 억제 기능성 확인	40 %	· 동물 모델에서 황반변성 증가 여부
		제품에서 xanthophyll 안정성 검정	5 %	· 시제품에서 xanthophyll 안정성 평가 여부
		초미세 나노 분획의 식품가공 적성 검증	20 %	· 음료 개발을 위한 나노 이멀전 제조 여부 · 나노 이멀전의 안정성 검증 여부
		Xanthophyll 함유 증대균주 개발을 위한 배양방법 최적화	5 %	· Xanthophyll 함유 증대를 위한 미세조류 배양 배지 및 배양 방법 개선 여부
		시제품 생산	10 %	· Xanthophyll 함유 제품 개발 및 시제품 생산 여부

## 제 2 절 연도별 연구 목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	제1세부 (주관)	Xanthophyll 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Xanthophyll 정량 분석법 확립</li> <li>- 미세조류로부터 lutein 분석 및 추출 기술 개발</li> <li>- 물리적 가공기술 적용에 따른 시료 중 xanthophyll 안정성 검정</li> </ul>
	Xanthophyll 분석과 생이용성 및 전임상 연구	물리적 가공기술 적용에 따른 생이용성 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 위-장-관 모사 시스템 구축</li> <li>- 위-장-관 모사 시스템에서 생이용성 연구                             <ul style="list-style-type: none"> <li>· 고전압펄스기술 적용 시료</li> <li>· 초고압처리기술 적용 시료</li> <li>· 초미세 분쇄 적용 시료 (제1협동 제공)</li> </ul> </li> <li>- 전자현미경 분석을 통한 분쇄화 확인</li> </ul>
	제1협동 (중앙대)	초미세 나노 분쇄화 기술개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시료의 물리·화학적 특성분석</li> <li>- 시료액의 화학적 특성 조절</li> <li>- 처리 온도, 압력, 시간 조건 확립</li> <li>- 초미세화 시료의 비중별 분획화</li> <li>- Size distribution 확인</li> </ul>
	시료 전처리 기술개발 및 생이용성 증대기술개발	Xanthophyll 함유 제품 개발을 위한 최적 시료 선정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 구기자, 케일, 파프리카, 고추, 미세조류 등 소재의 Xanthophyll 함유량 평가</li> <li>- 제품 개발 컨셉 및 Xanthophyll 함량에 따른 최적 시료 선정</li> </ul>
	제2협동 (대상)	미세조류를 활용한 xanthophyll 함량 증대균주 개발 및 배양 방법 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Xanthophyll 고 함유 제품 개발에 적합한 미세조류 선정</li> <li>- 다양한 종류의 xanthophyll함유 미세조류 개발</li> <li>- Xanthophyll 함량 증대를 위한 미세조류 배양 배지 및 배양 방법 개선</li> </ul>
	원료 선정 및 제품화			

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도 (%)	연구범위
2차 년도 (2010)	제1세부 (주관)	○최적원료선정, 제형연구 및 in vitro digestion	90	- 액상형태의 클로렐라 추출물과 클로렐라 나노분말 원료에 대한 in vitro digestion 실험 및 최적 원료 선정 - in vitro digestion, 대장세포 흡수 실험을 통한 제형효과 탐색
	Xanthophyll 분석과 생이용성 및 전임상 연구	○In vivo 황반변성 억제 기능성 확인	100	- Retinal pigment epithelium cell에서 xanthophyll 활성실험 - Retinal ganglion cell에서 xanthophyll 활성실험 - 동물 모델에서 xanthophyll 체내 흡수를 검정 - 동물 모델에서 xanthophyll 섭취에 의한 황반밀도 검정
		○ 제품에서 xanthophyll 안정성 검정 (제2협동에서 제품 제공)	80	- 개발된 제품에서 xanthophyll 함량 분석 - 제품 중 xanthophyll의 안정성 검정
	제1협동 (중앙대) 시료 전처리 기술개발 및 생이용성 증대기술개발	○초미세 나노 분획의 식품가공 적성 검증	100	- 나노 분획을 이용한 이멸전 제조 - 이멸전 안정성 예측(Stoke's eq)과 검증(Turbiscan) - 초미세 나노화 시료의 식품 적용 - 물성, 관능적 특성비교
	제2협동 (대상)	○배양법 최적화	100	- xanthophyll 함량 증대를 위한 배양 배지 개선 및 배양법 최적화
	원료 선정 및 제품화	○Xanthophyll 제품 개발	100	- 제품 컨셉 설정 및 판매 유통 설정 - Xanthophyll 함유 제품 개발

### 제 3 절 관련분야의 기술 발전에의 기여도

#### Xanthophyll 함유 기능성분의 식품소재화 연구 플랫폼 확보

본 과제 수행을 통해 제아잔틴, 루테인 등에 대한 생산 및 정제 기술을 확보하고 향후 비올라잔틴, 네오잔틴 등과 같은 활성 카로티노이드를 기반으로 하는 일련의 기능성 소재 연구로 확장, 발전이 가능하다. 이를 통해 기능성 xanthophyll 분야에 있어서 해당 참여기업의 글로벌 리더십을 강화할 수 있다.

#### 클로렐라 유래 루테인의 개별인정형 기능성 원료 인증

소재별 (클로렐라, 구기자, 케일, 파프리카, 고추 등) 생리활성에 대한 개별인정형 기능성 원료 인증을 통해 부가가치 창출을 유도할 수 있다.

#### 유사 활성 소재의 생산을 위한 물리적 가공기술 도입

본 과제를 통해 카로티노이드 활성 소재 생산을 위한 최적가공기술을 개발하고 기능성, 안전성을 검증 받음으로써 다른 소재로부터 유래한 유사활성 소재 (아스타잔틴, 라이코펜)의 생산에 해당가공기술을 적용할 수 있다

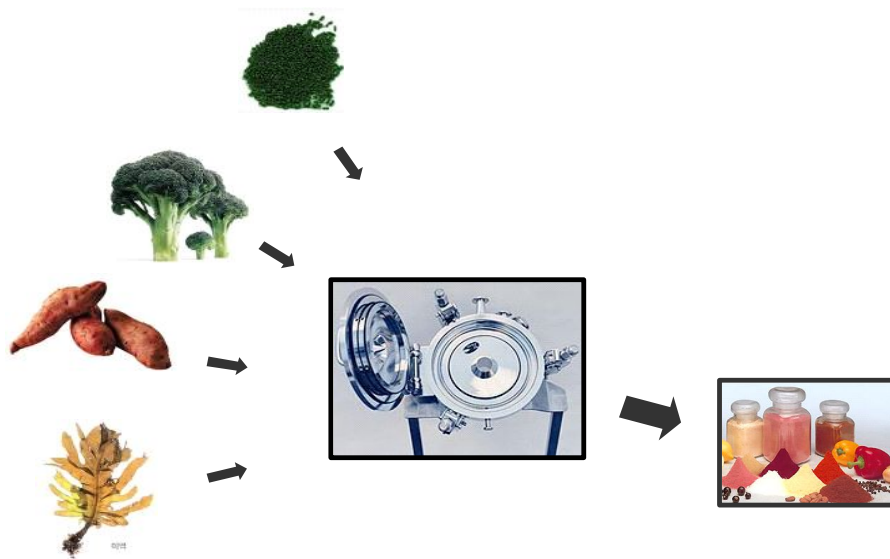


그림 81. 개발된 초미세 분쇄화 공정의 활용방안: 소재별 적용 다양화

### 눈 보호 관련 건강기능식품 대체제 개발

현재 눈 보호 관련 건강기능식품으로는 루테인이 국내에서 판매되고 있으나 국내에서 판매되는 루테인 소재의 90% 이상이 미국의 Kemin Food사의 원료를 이용하므로 기술실시료를 지불해야하는 상황이다. 이에 우리에게 친숙한 케일 및 구기자과 같은 식물로부터 황반변성 억제 활성을 가진 제품을 개발함으로써 루테인 제품의 대체제로 수입대체효과를 가져올 수 있다 (2004년 루테인 관련 아시아 시장: 200억 원 규모 - BCC Research).

### 나노클로렐라의 화장품 소재로의 적용

Frost & Sullivan의 최근 시장보고서에 따르면 눈 건강 소재인 루테인은 피부미용 분야에서 항산화 효과가 입증되고 있어 향후 나노클로렐라를 화장품 소재로 활용될 경우 급격한 시장 확대가 이루어질 것으로 보인다 (38).

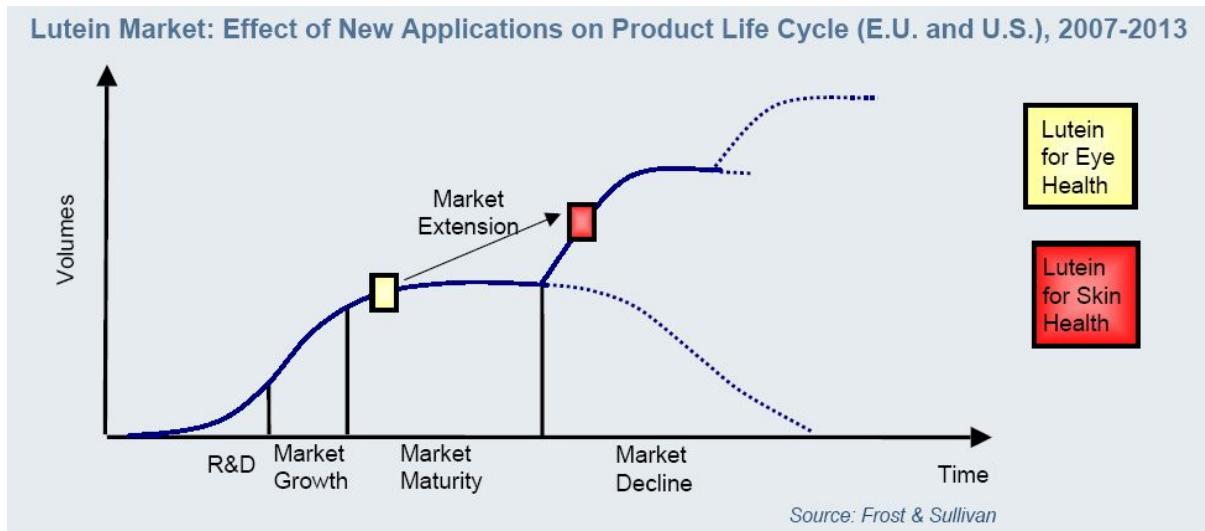


그림 82. 루테인 식품시장과 피부시장의 상승 전망



# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 성과 / 활용 계획

본 연구 결과는 다음과 같이 활용될 수 있을 것이다.

### 1. 기술실시 / 산업화

- 가. 루테인 생이용성이 증가된 분쇄 클로렐라 분말을 이용하여 루테인 성분 강화 클로렐라 제품을 산업화할 예정이다.
- 나. 클로렐라로부터 루테인 생이용성을 증대시키기 위해 microfluidizer를 이용하는 기술에 대해 기업체에 기술이전을 할 예정이다.

### 2. 산업지원

- 가. 기술이전을 할 기업체에 루테인을 비롯한 카로티노이드 분석기술과 제품 QC 방법을 함께 이전함으로써 산업지원을 할 계획이다.

### 3. 특허 (총 3건)

- 가. 녹색도가 개선된 클로렐라의 제조방법에 관한 특허를 출원함 (10-2009-0130478).
- 나. 클로렐라로부터 아임계 용매를 이용하여 카로티노이드 및 클로로필을 생산하는 방법에 관한 특허를 출원함 (10-2010-0085602).
- 다. 클로렐라 초미세화를 이용한 루테인 추출을 증대시키는 방법에 관한 특허를 출원함 (10-2010-0036920).

### 4. 논문

- 가. Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris* (2010) J Agric Food Chem, 58:4756-4761 게재
- 나. 클로렐라의 생이용성 및 추출 증대를 위해 클로렐라를 습식 분쇄하는 방법에 관한 논문을 2011년 투고할 예정이다.
- 다. 분쇄 클로렐라의 in vitro 생이용성 효과에 대한 논문을 2011년 투고할 예정이다.
- 라. 분쇄 클로렐라의 in vivo 생이용성 효과에 대한 논문을 2011년 투고할 예정이다.

### 5. 기타 활용 계획

- 가. 본 과제에서 얻은 루테인 생이용성이 증가된 분쇄 클로렐라에 대해 추가로 인체 적용실험을 수행한다면 황반변성 억제 가능성을 가진 클로렐라로서 식약청으로부터 개별인정형 기능성 원료 인정을 받을 수 있으며 산업적 활용 가치를 높일 수 있음.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 in vitro digestion 시스템

가. 카로티노이드 생이용성 연구

- 카로티노이드의 in vitro 생이용성 연구는 미국 오하이오 주립대학교의 Mark Failla 교수에 의해 주도되어 왔다.



**Mark Failla**  
110 ARPS HALL  
614/247-2412  
[mfaila@ehe.osu.edu](mailto:mfaila@ehe.osu.edu)

#### Position

Professor, Department of Human Nutrition

Associate Dean for Research, College of Education and Human Ecology

[View Mark Failla's curriculum vitae.](#)

#### Education

B.S. Chemistry, St. Francis College,  
Brooklyn, NY, 1970

M.S. Microbiology, Indiana University,  
Bloomington, IN, 1975

Ph.D. Microbiology, Indiana University, 1976

NCBI Resources How To

PubMed.gov  
U.S. National Library of Medicine  
National Institutes of Health

Search: PubMed  
failla ml

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Recently Added

Results: 1 to 20 of 110

- [Digestive stability and transport of norbixin, a 24-carbon carotenoid, across monolayers of Caco-2 cells.](#)  
1. Polar-Cabrera K, Huo T, Schwartz SJ, Failla ML.  
J Agric Food Chem. 2010 May 12;58(9):5789-94.  
PMID: 20408560 [PubMed - Indexed for MEDLINE]  
[Related citations](#)
- [Anti-inflammatory activities of extracts of Thai spices and herbs with lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 murine macrophages.](#)  
2. Tuntipopipat S, Muangnoi C, Failla ML.  
J Med Food. 2009 Dec;12(6):1213-20.  
PMID: 20041774 [PubMed - Indexed for MEDLINE]  
[Related citations](#)
- [In vitro bioaccessibility of beta-carotene in orange fleshed sweet potato \(Ipomoea batatas, Lam.\).](#)  
3. Failla ML, Thakkar SK, Kim JY.  
J Agric Food Chem. 2009 Nov 25;57(22):10922-7.  
PMID: 19919124 [PubMed - Indexed for MEDLINE]  
[Related citations](#)
- [Transport and metabolism of equol by Caco-2 human intestinal cells.](#)  
4. Walsh KR, Failla ML.  
J Agric Food Chem. 2009 Sep 23;57(18):8297-302.  
PMID: 19715333 [PubMed - Indexed for MEDLINE]  
[Related citations](#)

그림 83. Failla 교수 정보 및 최근 논문

- Failla 그룹에서는 시금치, 케일 등으로부터 루테인, 제아잔틴의 in vitro digestion 방법을 구축하였다. 루테인, 제아잔틴 등의 nutraceutical에 대한 in vitro 생이용성 연구도 수행하였으며 토마토로부터 lycopene 생이용성 연구 결과도 보고한 바 있다. 최근에는 Caco-2 장내세포 실험과 결합하여 카로티노이드의 체내 흡수에 대한 연구를 수행하고 있다.

#### 나. Dynamic in vitro digestion 장비

- 네덜란드의 세계적인 식품 연구소인 TNO에서는 자동화된 위-장-관 모사시스템 구축 연구를 수행하고 있으며 현재 소장 모델에 적용 가능한 gastrointestinal model (TIM-1)과 대장모델에 적용 가능한 TIM-2를 제조하여 인체 소화시스템과의 유사성 및 재현성을 검증하고 있다.

## GASTROINTESTINAL MODELS (TIM) WITH HIGH PREDICTIVE POWER

The TIM models save time and reduce the need for animal testing. These unique gastrointestinal models are flexible, accurate and produce highly reproducible results. Nutritional and functional properties of food **TNO innovation for life** can be assessed under simulated physiological digestion conditions. The systems are well validated and offer broad versatility in experimental strategies and goals.

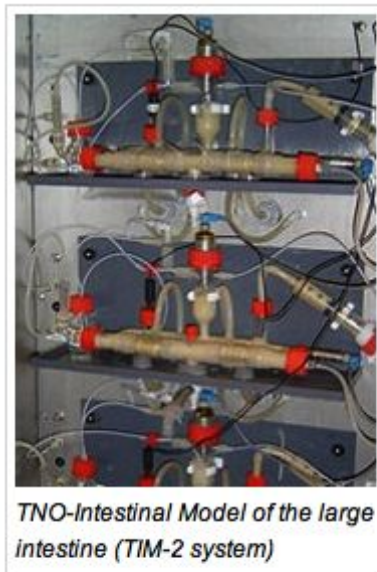


The TIM models are assembled as multi-compartmental, dynamic computer-controlled models. TIM-1 simulates the digestive processes of stomach and small intestines. TIM-2 represents the colon and includes a rich microbial gut-derived flora. The models have been extensively validated based on data from human and animal nutritional research. In the TIM systems, behaviour of single compounds as well as complete meals can be studied. Results are characterized by an unparalleled predictive power. TIM studies are published in over 40 peer-reviewed papers (Cf R. Havenaar in Entrez Pubmed). The TIM systems proved to be excellent tools for studying a.o.:

- availability for absorption of macro- and (formulated) micro-nutrients;
- interactions between nutritional and functional food compounds,
- effects of food processing on the nutritional and functional quality
- stability of probiotics and efficacy of prebiotics in the upper and lower GI tract

그림 84. TNO 사의 TIM-1

- 해당 장비들은 체온과 같은 온도를 유지해줄 수 있으며, 침이나 소화액들이 실제 사람의 소화메커니즘과 유사한 flow와 mixing 작용을 거치도록 최적화되어 있다. 또한 각 조직의 pH에 맞게 조절이 가능하며 투석관을 통해 소화된 물질들의 연속식 제거가 가능한 것이 특징이다.



### **SIMULATION OF THE COLON: TIM-2**

The **TIM-2** system simulates the conditions in the large intestine (colon). This includes pH, anaerobiosis and gradual intake of pre-digested meal compounds coming from the small intestine. The compartments contain a high density metabolic-active microflora of human origin (healthy persons or patients). Selected beneficial or pathogenic bacteria can be added to this microflora.

In TIM-2, the fermentation properties of dietary compounds such as fibres, pro- and prebiotics, and anti-oxidants can be investigated by analysis of metabolites (SCFA's, amino acids) and/or composition and metabolic activity of the colon microbiota. Single or repeated addition of the compounds to the model is possible. Samples can be taken in time for chemical and microbial analysis (e.g. with the intestinal chip) and functional cell-based assays. The results will give reliable information about bioaccessibility, biofunctionality, produced

metabolites, and changes in microbiota composition.

그림 85. TNO 사의 TIM-2

- TIM-1과 TIM-2를 사용한 논문은 다음과 같다.

#### **Gastro intestinal models**

Profiling human gut bacterial metabolism and its kinetics using [U-(13)C]glucose and NMR. de Graaf AA, Maathuis A, de Waard P, Deutz NE, Dijkema C, de Vos WM, Venema K. NMR Biomed. 2009 Jul 10. [Epub ahead of print]

Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. Hamer, H.M.; Jonkers, D.M.A.E.; Bast, A.; Vanhoutvin, S.A.L.W.; Fischer, M.A.J.G.; Kodde, A.; Troost, F.J.; Venema, K.; Brummer, R-J.M. Clinical Nutrition 28 (2009) p. 88-93.

Bioconversion of red ginseng saponins in the gastro-intestinal tract in vitro model studied by high-performance liquid chromatography-high resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Kong H, Wang M, Venema K, Maathuis A, van der Heijden R, van der Greef J, Xu G, Hankemeier T. J Chromatogr A. 2009 Mar 13;1216(11):2195-203.

Linking phylogenetic identities of bacteria to starch fermentation in an in

vitro model of the large intestine by RNA-based stable isotope probing. Kovatcheva-Datchary P, Egert M, Maathuis A, Rajili-Stojanovi M, de Graaf AA, Smidt H, de Vos WM, Venema K. *Environ Microbiol.* 2009 Apr;11(4):914-26.

Improving in vitro simulation of the stomach and intestines, pages 314-339 in *Designing functional foods: Measuring and controlling food structure breakdown and nutrient absorption.* K Venema, R Havenaar and M Minekus. Edited by D J McClements and E A Decker.

The role of colonic metabolism in lactose intolerance. He, T.; Venema, K.; Priebe, M.G.; Welling, G.W.; Brummer, R.J.M.; Vonk, R.J. *European Journal of Clinical Investigation* 38 (2008) 8, p. 541-547.

Antioxidant and anti-inflammatory potency of different wheat varieties and fractions. Mateo Anson, N.; Berg, R. v.d.; Havenaar, R.; Haenen, G.; Bast, A. *Proceedings of the Nutrition Society* 67 (2008) p. E56.

Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. Mitea, C.; Havenaar, R.; Drijfhout, J.W.; Edens, L.; Dekking, L.; Koning, F. *Gut* 2008;57:25-32.

### **Human Intervention Trials**

Lactotriptides and antihypertensive effects: a critical review. Boelsma E, Kloek J. *Br J Nutr.* (2009) 101:776-86.

Short-chain fructo-oligosaccharides improve magnesium absorption in adolescent girls with a low calcium intake. Van den Heuvel EG, Muijs T, Brouns F, Hendriks HF. *Nutr Res.* (2009) 29:229-37.

Postprandial ghrelin responses are associated with the intermeal interval in time-blinded normal weight men, but not in obese men. Blom WA, de Graaf C, Lluch A, Stafleu A, Schaafsma G, Hendriks HF. *Physiol Behav.* (2009) 23:742-8.

Clustering of dietary intake and sedentary behavior in 2-year-old children. Gubbels JS, Kremers SP, Stafleu A, Dagnelie PC, de Vries SI, de Vries NK, Thijs C. *J Pediatr.* (2009) 155:194-8.

Short-term fatty acid intervention elicits differential gene expression responses in adipose tissue from lean and overweight men. Van Erk MJ, Pasma WJ, Wortelboer HM, van Ommen B, Hendriks HF. (2008) *Genes & Nutrition* 3 (3-4):127-137.

### **Complex Microflora Analysis**

Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. *BMC Microbiol.* 2009 Dec 15;9:259.

Mixed-species genomic microarray analysis of fecal samples reveals differential transcriptional responses of bifidobacteria in breast- and formula-fed infants. Klaassens, E.S., Boesten, R.J., Haarman, M., Knol, J., Schuren, F.H.J., Vaughan, E.E., de Vos, W.M. *Appl Environ Microbiol.* 2009 May;75(9):2668-76 Epub 2009 Mar 13.

A Bifidobacterium mixed species microarray for high resolution discrimination between intestinal bifidobacteria. Boesten, R.J., Schuren, F.H.J., de Vos, W.M. *J Microbiol Methods.* 2009 Mar;76(3):269-77. Epub 2008 Dec 24.

Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. Keijser, B.J.F., Zaura, E., Huse, S.M., van der Vossen, J.M.B.M., Schuren, F.H.J., Montijn, R.C. ten Cate, J.M., Crielaard, W. *J Dent Res.* 2008 Nov;87(11):1016-20.

다. Caco-2 cell transmembrane assay

- 약물의 흡수 메커니즘을 연구하기 위해 Caco-2 세포를 이용한 uptake 및 transport 연구가 세계적으로 활발하게 이루어지고 있다. 본 연구에서는 Nature Protocol에 제시된 논문을 참고로 하여 실험을 수행하였으며 실험과정에서 생길 수 있는 여러 가지 문제점들에 대한 해결방법을 찾을 수 있었다 (39).

PROTOCOL

## Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers

Ina Hubatsch, Eva G E Ragnarsson & Per Artursson

Department of Pharmacy, Uppsala University, Box 580, SE-751 23 Uppsala, Sweden. Correspondence should be addressed to P.A. (per.artursson@farmaci.uu.se).

Published online 23 August 2007; doi:10.1038/nprot.2007.303

Step	Problem	Possible reason	Solution
1	Cells do not detach during trypsinization	Cell layer in the culture flask is too confluent	Trypsinize at lower confluence (70–90%)
1 and Box 1	Multilayer formation	There are too many cells and/or cell aggregates	Remove cell aggregates before seeding Reduce the number of cells added to the filters
		The FCS has not been properly tested	Use another source of FCS
5	Cells are observed on both sides of the filter	The pore diameter is too large	Use filters with 0.4 µm pore diameter
14	Variable TER values are detected before the transport experiment	Poor cell culture technique, for example, owing to poorly resuspended cells or perforation of some monolayers by physical contact from the pipette	Improve cell culture technique
	Low TER values are observed in all filters before the experiment	Damaged or non-confluent monolayer	Improve the cell culture technique
		The FCS has not been properly tested	Use another source of FCS that passes the recommended tests
15	The donor concentration is lower than anticipated	The compound has precipitated or adsorbed to the test tube	Use freshly prepared solutions Include DMSO as a co-solvent Use glass vials Consider addition of BSA
15–19	Poor mass balance at the end of the experiment	The compound has adsorbed in significant amounts to the experimental device (the plastic of the 12-well plate, the filter device or the filter itself)	Add BSA to the basolateral transport buffer as an additional sink (attention: if BSA is added in the donor compartment, the free concentration of the compound might be changed)
		The compound is retained inside the cells or in the cell membranes	Lyse the cells and determine the cellular concentration
		The compound is metabolized	Use LC-MS/MS to detect metabolites
19	Low or no TER values after the experiment	Toxic compound or co-solvent	Perform the recommended integrity test with mannitol (see Box 1) to check the test compound/co-solvent toxicity and find nontoxic conditions
		Too vigorous shaking or pipetting	Calibrate shaker to allow reproducible shaking at a rate that does not compromise the monolayers Improve the pipetting technique

그림 86. Caco-2 cell transmembrane analysis 시의 분석 팁

## 2. 클로렐라 생이용성에 관한 기술

- 일본의 Sun Chlorella 사에서는 클로렐라의 생이용성을 증대시키기 위해 클로렐라를 분쇄하여 만든 나노 클로렐라를 판매하고 있다. 해당 제품은 본 연구에서 사용한 microfluidizer를 사용한 것이 아니라 dyno-mill을 이용하였기 때문에 분쇄 원리가 다르다고 할 수 있다. 분쇄된 입자의 크기, 분쇄효율, 분쇄과정에서 이물질에 대한 오염문제 등에 있어서 dyno-mill 분쇄법보다 microfluidizer 분쇄법이 좋은 장점을 가지고 있으며 특히 본 과제의 in vivo 생이용성 실험에서 확인된 결과에 의하면 microfluidizer의 유화 작용으로 인해 클로렐라 루테인의 micelles 형성 효율이 증가되어 생이용성이 상승되는 효과가 있는 것으로 밝혀졌기 때문에 본 연구팀에서 개발한 생이용성 증대기술이 보다 우수하다고 할 수 있다.

그림 87. 분쇄 클로렐라 제품을 현재 판매하고 있는 일본의 Sun Chlorella 사



- 또한 SUN Chlorella 사의 클로렐라는 루테인 영양성분에 대해서는 강조가 되고 있지 않다는 점도 본 연구팀에서 개발하고자하는 루테인 강화 기능성 클로렐라 제품과의 차이점이라 할 수 있다.

General composition		Vitamins	
Moisture	5.2g	Chlorophyll	2,700mg
Fat	12.5g	Chlorophyll b	Detected
Protein	60.8g	Carotene	20,300µg
Carbohydrate	5.8g	Vitamin B1	1.82mg
Fiber	9.6g	Vitamin B2	4.52mg
Ash	6.1g	Vitamin B6	1.81mg
Calorie	417kcal	Vitamin B12	0.43mg
Minerals		Vitamin C	7mg
Calcium	340mg	Vitamin D	479µg
Iron	120mg	Vitamin E	5.0mg
Magnesium	330mg	Vitamin K1	1,280µg
Zinc	1.0mg	Vitamin K2	Not detected
Copper	Not detected	Niacin	54.7mg
Potassium	950mg	Pantothenic acid	8.89mg
Sodium	34mg	Folic acid	2.9mg
Iodine	Not detected	Biotin	272µg
Phosphorus	1,500mg	Inositol	248mg

그림 88. Sun Chlorella 사에서 판매하고 있는 클로렐라 제품의 영양성분표

## 제 7 장 참고문헌

- (1) Alves-Rodrigues A, Shao A. The science behind lutein. *Toxicol Lett* **2004**. 150:57-83.
- (2) Market research report: The Global market for carotenoids. *BCC Research*. FOD025C.
- (3) Granado F, Olmedilla B, Blanco I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Brit J Nutr* **2003**. 90:487-502.
- (4) Inbaraj BS, Lu H, Hung CF, Wu WB, Lin CL, Chen BH. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum Linnaeus* by HPLC-DAD-APCI-MS. *J Pharm Biomed Anal* **2008**. 47:812-818.
- (5) Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**. 74:1163-1174.
- (6) Gruszecki WI, Strzałka K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta* **2005**. 1740:108-115.
- (7) Shibata S, Ishihara C, Matsumoto K. Improved separation method for highly purified lutein from Chlorella powder using jet mill and flash column chromatography on silica gel. *J Agric Food Chem* **2004**. 52:6283-6286.
- (8) Katherine LS, Edgar CC, Jerry WK, Luke RH, Julie CD. Extraction conditions affecting supercritical fluid extraction (SFE) of lycopene from watermelon. *Bioresour Technol* **2008**. 99:7835-7841.
- (9) Y. Wang and J. Peng. Growth-associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta), *W J Microbiol Biotechnol* **2008**. 24:1915-1922.
- (10) Ip P. F.. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture, *Proc Biochem* **2004**. 39:1761-1766.

- (11) Feng Chen. US patent: Methods for production of astaxanthin from the green microalgae *Chlorella* in dark-heterotrophic cultures.
- (12) Wang T. and Tao C. The biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorella zofingiensis*, *W J Microbiol Biotechnol* **2008**. 24:2927-2932.
- (13) Wu Z. Y. Modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* in batch and fed-batch cultures, *W J Microbiol Biotechnol* **2007**. 23:1233-1238.
- (14) Shi X. M. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains, *J appl phycol* **1997**. 9:445-450.
- (15) Shi X. M. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture, *Biotechnol Prog* **2002**. 18:723-727.
- (16) Verma, S.; Gokhale, R.; Burgess, D. J., A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. *Int J Pharm* **2009**. 380:216-222.
- (17) Junghanns, Jens-Uwe A H.; Muller R. H. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine* **2008**. 3:295-309.
- (18) Kotyla, T.; Kuo. F.; Moolchandani, V.; Wilson, T.; Nicolosi, R., Increased bioavailability of a transdermal application of a nano-sized emulsion preparation. **2008**. 347:144-148.
- (19) Doucha, J.; Livansky, K., Influence of processing parameters on disintegration of chlorella cells in various types of homogenizers. *Appl Microbiol Biotechnol* **2008**. 81:431-440.
- (20) Jafari, S. M.; He, Y.; Bhandari, B., Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *Eur Food Res Technol* **2007**. 225:733-741.

- (21) Cha, K.H.; Koo, S. Y.; Lee, D. U., Antiproliferative Effects of Carotenoids Extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on Human Colon Cancer Cells. *J Agric Food Chem* **2008**. 56:10521-10526.
- (22) Cha, K.Y.; Lee, H. J.; Koo, S.Y.; Song, D.G.; Lee, D.U.; Pan, C.H. Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophyll from *Chlorella vulgaris*. *J Agric Food Chem* **2010**. 58:793-797.
- (23) Sedlmeyer, F.; Brack, M.; Rademacher, B.; Kulozik, U., Effect of protein composition and homogenisation on the stability of acidified milk drinks. *Int Dairy* **2004**. 14:331-336.
- (24) Blanquet-Diot S, Soufi M, Rambeau M, Rock E, Alric M. Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal system. *J Nutr* **2009**. 139: 876-883.
- (25) Yonekura, L.; Nagao, A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res* **2007**, 51:107-115.
- (26) Lakshminarayana, R.; Raju, M.; Krishnakantha, T. P.; Baskaran, V. Enhanced lutein bioavailability by lyso-phosphatidylcholine in rats. *Mol Cell Biochem* **2006**, 281:103-110.
- (27) O'Connell, O. F.; Ryan, L.; O'Brien, N. M. Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutr Res* **2007**, 27:258-264.
- (28) Lakshminarayana, R.; Raju, M.; Krishnakantha, T. P.; Baskaran, V. Lutein and zeaxanthin in leafy greens and their bioavailability: Olive oil influences the absorption of dietary lutein and its accumulation in adult rats. *J Agric Food Chem* **2007**, 55:6395-6400.
- (29) Lee, J. U.; Mok, C. K., Dispersion stability determination of saengshik beverage by optical methods. *Food Engineering Prog* **2010**. 14:41-48.

- (30) Du, B.; Li, J.; Zhang, H.; Huang, L.; Chen, P.; Zhou, J., Influence of molecular weight and degree of substitution of carboxymethylcellulose on the stability of acidified milk drinks. *Food Hydrocolloids* **2009**. 1420-1426.
- (31) Gouveria, L.; Veloso, V.; Reis, A.; Fernandes, H.; Novais, J.; Empis, J., Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technol* **1996**. 57:157-163.
- (32) Zhang, H.; Wang, Z.; Xu, S. Y., Optimization of processing parameter for cloudy ginkgo(*Ginkgo biloba* Linn.) juice. *J Food Engineering* **2007**. 80:1226-1232.
- (33) Tipvarakarnkoon T.; Einhorn-Stoll U.; Senge B. Effect of modified acacia gum (supergum) on the stabilization of coconut/water emulsions. *Food hydrocolloids* **2010**. 24:595-601.
- (34) Sedlmeyer, F.; Brack, M.; Rademacher, B.; Kulozik, U., Effect of protein composition and homogenisation on the stability of acidified milk drinks. *Int Dairy* **2004**. 14:331-336.
- (35) Clara C.; Maria J E.; Ana F. Color of orange juice treated by high intensity pulsed electric fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice. *Food control* **2008**. 19:151-158.
- (36) Richard S Bruno, Scott W Leonard, Su-il Park, Yanyun Zhao, and Maret G Traber. Human vitamin E requirements assessed with the use of apples fortified with deuterium-labeled  $\alpha$ -tocopheryl acetate. *Am J Clin Nutr* **2006**.
- (37) Melody J Brown, Mario G Ferruzzi, Minhthy L Nguyen, Dale A Cooper, Alison L Eldridge, Steven J Schwartz, and Wendy S White. Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am J Clin Nutr* **2004**.
- (38) Strategic analysis of the global markets for lutein in human nutrition. *Frost & Sullivan*. M09A-88.

- (39) Hubatsch, I.; Ragnarsson, E. G. E.; Artursson, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc* 2007, 2:2111-2119.

## 주 의

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