(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0136087
(43) 공개일자 2021년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08L 89/00 (2006.01) *C08J 3/075* (2006.01)
C08L 101/14 (2006.01) *C08L 5/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08L 89/00 (2013.01)
C08J 3/075 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7032186
(22) 출원일자(국제) 2019년06월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년10월06일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2019/064711
(87) 국제공개번호 WO 2020/177881
국제공개일자 2020년09월10일
(30) 우선권주장
1903090.7 2019년03월07일 영국(GB)

(71) 출원인
캠브리지 엔터프라이즈 리미티드
영국 캠브리지셔 씨비2 1티엔 캠브리지 트리니티 레인 더 올드 스쿨스
(72) 발명자
로드리게즈 가르시아 마크
영국 캠브리지셔 씨비에스 0쥐티 캠브리지 찰스 배비지 로드 3 하우저 포럼 유니버시티 오브 캠브리지
놀스 튜오마스
영국 캠브리지셔 씨비3 0쥐티 캠브리지 찰스 배비지 로드 3 하우저 포럼 유니버시티 오브 캠브리지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

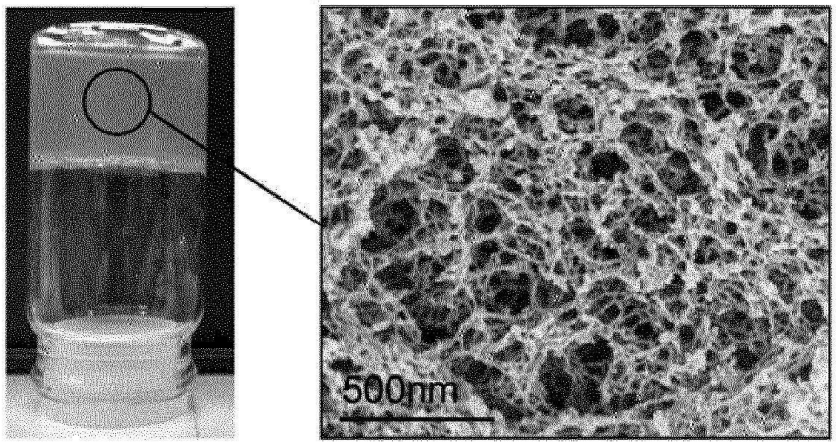
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **식물 기반 기능성 재료**

(57) 요 약

본 발명은 식물 기반 재료, 이의 제조 방법, 및 식물 기반 재료를 포함하는 생체 재료에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C08L 101/14 (2013.01)
C08L 5/00 (2013.01)
C08J 2389/00 (2013.01)
(72) 발명자
레빈 아비아드
영국 캠브리지셔 씨비3 0쥐티 캠브리지 찰스 배비지 로드 3 하우저 포럼 유니버시티 오브 캠브리지
카마다 아야카
영국 캠브리지셔 씨비에스 0쥐티 캠브리지 찰스 배비지 로드 3 하우저 포럼 유니버시티 오브 캠브리지

명 세 서

청구범위

청구항 1

식물 기반 재료(plant-based material)의 제조 방법으로서, 다음 단계들을 포함하는 제조 방법:

a) 용매 시스템 중에 하나 이상의 식물 기반 단백질(들)을 포함하는 용액을 형성하는 단계로서, 상기 용매 시스템은 혼화성 공용매들(miscible co-solvents)을 포함하고, 여기서, 제1 공용매는 상기 식물 기반 단백질(들)의 용해도를 증가시키고, 제2 공용매는 상기 식물 기반 단백질(들)의 용해도를 감소시키는, 단계; 및

b) 상기 용액 중의 상기 단백질이 졸-겔 전이를 겪도록 유도하여 식물 기반 단백질 하이드로겔을 형성하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, c) 상기 식물 기반 단백질 하이드로겔을 구조화 재료(structured material)가 되도록 형성하는 단계;를 포함하는 제조 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 식물 기반 단백질 하이드로겔은, 상기 졸-겔 전이 전, 동안, 또는 후에, 구조화 재료가 되도록 형성되는(formed), 제조 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물 기반 단백질 하이드로겔은 구조화 재료가 되도록 성형(molding)되거나, 또는 상기 식물 기반 단백질 하이드로겔은 마이크로유체 장치(microfluidic device)를 사용하여 구조화 재료가 되도록 형성되는, 제조 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제조 방법은 구조화 재료, 예를 들어, 필름, 박막 필름(thin film), 마이크로패턴화 필름(또는 박막 필름), 마이크로구조화된 또는 나노구조화된 박막 필름, 마이크로겔, 마이크로캡슐, 마이크로비드, 바이오스캐폴드, 바이오 지지체(bio-support), 스펀지, 마이크로규모 스펀지, 경질 캡슐(hard capsule), 또는 기능성 코팅(functional coating)을 제조하기 위해 사용되는, 제조 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물 기반 단백질(들)은 대두, 완두콩, 쌀, 감자, 밀, 옥수수 제인(corn zein), 또는 수수로부터 얻어지고; 바람직하게는, 상기 식물 기반 단백질(들)은 대두 단백질, 완두콩 단백질, 감자 단백질, 및/또는 쌀 단백질로부터 선택되는, 제조 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 공용매는 유기산이며; 바람직하게는, 아세트산 및/또는 α-하이드록시산이며; 여기서, 상기 α-하이드록시산은 바람직하게는 글리콜산, 젖산, 말산, 시트르산, 및/또는 타르타르산 중에서 선택될 수 있으며; 특히 바람직한 유기산은 아세트산 및/또는 젖산인, 제조 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 공용매 또는 추가 공용매(들)은 수성 완충제이며; 바람직하게는, 물, 에탄올, 메탄올, 아세톤, 아세토니트릴, 디메틸술폭사이드, 디메틸포름아미드, 포름아미드, 2-프로판올, 1-부탄올, 1-프로판올, 헥산올, t-부탄올, 에틸 아세테이트 또는 헥사플루오로이소프로판올 중에서, 특히 바람직하게는 물 및/또는 에탄올 중에서, 선택되며; 더욱 특히 바람직하게는 물인, 제조 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용매 시스템은 약 20 부피% 내지 80 부피%의, 바람직하게는 약 20 부피% 내지 60 부피%, 약 25 부피% 내지 55 부피%, 약 30 부피% 내지 50 부피%, 약 20 부피%, 약 30 부피%, 약 40 부피%, 약 50 부피%, 또는 약 60 부피%의, 가장 바람직하게는 약 30 부피% 내지 50 부피%의 공용매 비율을 포함하는, 제조 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 식물 기반 단백질(들) 및 용매 시스템을 포함하는 상기 단백질 용액의 기계적 전단(mechanical shear)을, 바람직하게는 초음파 처리를, 더 포함하는 제조 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 용액은 상기 하나 이상의 식물 기반 단백질(들)의 졸-겔 온도보다 높은 제1 온도로 가열된 다음, 상기 하나 이상의 식물 기반 단백질(들)의 졸-겔 온도보다 낮은 제2 온도로 낮추어져서, 하이드로겔을 형성하는, 제조 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 제조 방법을 사용하여 형성된 식물 기반 하이드로겔.

청구항 13

식물 기반 구조화 재료로서, 상기 식물 기반 구조화 재료는 필름, 박막 필름(thin film), 마이크로패턴화 필름(또는 박막 필름), 마이크로구조화된 또는 나노구조화된 박막 필름, 마이크로겔, 마이크로캡슐, 마이크로비드, 바이오스캐폴드, 바이오 지지체, 스펀지, 마이크로규모 스펀지, 경질 캡슐(hard capsule), 또는 기능성 코팅(functional coating)인, 식물 기반 구조화 재료.

청구항 14

열가역적 저온 경화 겔화 공정(thermoreversible cold-set gelation process)을 통해 형성된 식물 기반 구조화 재료로서, 상기 식물 기반 구조화 재료는 선택적으로(optionally), 필름, 박막 필름, 마이크로패턴화 필름(또는 박막 필름), 마이크로구조화 또는 나노구조화 박막 필름, 마이크로겔, 마이크로캡슐, 마이크로비드, 바이오스캐폴드, 바이오 지지체, 스펀지, 마이크로규모 스펀지, 경질 캡슐, 또는 기능성 코팅일 수 있는, 식물 기반 구조화 재료.

청구항 15

식물 기반 열 가역성 하이드로겔.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 따른 식물 기반 재료, 및 하나 이상의 추가 바이오폴리머, 예를 들어, 단백질 및/또는 다당류를 포함하는 복합재료.

청구항 17

제 12 항에 따른 식물 기반 재료, 제 13 항 또는 제 14 항에 따른 식물 기반 구조화 재료, 제 15 항에 따른 식물 기반 열 가역성 하이드로겔, 또는 제 16 항에 따른 복합재료를 포함하는 식품, 화장품, 약품, 의료 장치, 또는 생체 재료.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물 기반 재료, 이의 제조 방법 및 본 발명에 따른 식물 기반 재료를 포함하는 생체재료에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 플라스틱과 같은 합성 폴리머는 우수한 기계적, 화학적 특성을 나타내며, 지난 60년 동안 널리 사용되어 왔다. 그러나, 이러한 폴리머들은 생분해되지 않고 환경에 축적되어, 경제적 피해를 일으키고, 먹이 사슬과 공기를 통해 인간의 건강에 영향을 미칠 수 있다.

[0003] 높은 수준의 기능성뿐만 아니라 높은 수준의 생분해성 및 생체적합성을 나타내는 재료의 개발은, 포장에서 의약품에 이르는 영역에서, 향상된 재료 성능에 대한 사회적 필요를 충족시키기 위한 핵심 목표이다.

[0004] 자기조립(self-assembly)은 그러한 재료들의 제조를 위한 매력적인 경로로등장했지만, 현재까지 개발된 대부분의 구성 단위들(building blocks)은 원래 합성 재료였다.

[0005] 새로운 기능성 재료를 생성하기 위한 구성 단위들로 역할을 할 수 있는 다양한 유형의 바이오폴리머 중에서, 단백질은 기능적 구조 내로 자기조립되는 능력을 고려할 때 흥미로운 후보이다.

[0006] 현재, 상업적 적용을 위한 이들 재료의 사용은 가용성이 높은, 동물 유래 단백질로 제한된다. 유청 단백질과 같이, 식품에 통상적으로 사용되는 동물성 단백질은, 우수한 생체 적합성, 생분해성, 양친매성 및 기능적 특성, 예를 들어, 수용성, 유화(emulsifying) 및 거품 형성 능력(foaming capacity)을 나타낸다. 그러나, 환경에 미치는 영향이 더 낮을 뿐만 아니라 더 낮은 알레르기성 및 비용의 절감으로 인해, 동물성 단백질을 식물 기반 단백질로 대체하려는 수요가 증가하고 있다.

[0007] 식물 기반 단백질로부터 자기조립된 재료의 형성이 보고되었으며, 여기에서 하이드로겔은 다양한 실험 조건에서 대두 및 완두콩 단백질에서 얻을 수 있다. 그러나, 구조화된 식물 기반 재료로부터 얻은 기계적 특성은 통상적으로 동물 유래 재료로부터 얻은 것의 기계적 특성보다 더 낮고; 식물 단백질은 적어도 부분적으로 물에 대한 고유한 낮은 가용성(solubility) 때문에 가공하기가 더 어렵다.

[0008] 따라서, 현재까지, 식물 기반 단백질은 생체 재료로서 성공적으로 활용되지 않았으며, 환경적으로 지속 가능한 방법에 의해, 재생가능하고 비용 효율적인 공급원으로부터 구조화된 단백질 재료를 생성하는 것은 여전히 과제로 남아 있다.

발명의 내용

[0009] 본 발명의 일 측면에 따르면, 다음을 포함하는 식물 기반 재료의 제조 방법이 제공된다:

[0010] a) 용매 시스템 중에 하나 이상의 식물 기반 단백질(들)을 포함하는 용액을 형성하는 단계로서, 본 용매 시스템은 혼화성 공용매들(miscible co-solvents)을 포함하고, 여기서, 제1 공용매는 식물 기반 단백질(들)의 용해도를 증가시키고, 제2 공용매는 식물 기반 단백질(들)의 용해도를 감소시키는, 단계; 및

[0011] b) 용액 중의 단백질이 졸-겔 전이를 겪도록 유도하여 식물 기반 단백질 하이드로겔을 형성하는 단계.

[0012] 추가 구현예에서, 본 방법은 다음의 단계를 포함한다:

[0013] c) 식물 기반 단백질 하이드로겔을 구조화 재료(structured material)가 되도록 형성하는 단계.

[0014] 식물 기반 단백질 하이드로겔을 구조화 재료가 되도록 형성하면, 겔, 필름, 마이크로겔, 마이크로캡슐, 등과 같은 구조화 재료의 형성이 가능해진다. 바람직한 구현예에서, 단백질 하이드로겔은 성형(molding)에 의해 특정 형상으로 형성될 수 있다. 추가의 바람직한 구현예에서, 단백질 하이드로겔은 마이크로유체 장치를 사용하여 특정 형상으로 형성될 수 있다.

[0015] 본 발명은 식물 기반 단백질로부터 기능성 재료를 제조하는 신규한 방법을 확인하였다. 공용매 혼합물을 사용함으로써 졸-겔 전이를 제어하는 것이 가능하여, 재생가능한 식물 기반 단백질 원천으로부터 구조적으로 견고한 재료의 형성을 가능하게 한다. 이 공정을 통해 하이드로겔, 필름, 마이크로캡슐, 마이크로겔, 마이크로규모 스폰지, 등을 포함하는 많은 구조화 재료들의 생성이 가능하게 된다. 구조화된 재료들은, 재료들을 인체 접촉에 적합한 재료로 만들기 위한 가교제 또는 어떠한 유해 물질없이, 안정적으로 형성될 수 있다. 재료들은 또한, 재생가능한 원천으로부터 유래되므로 합성 유사체에 비해 환경에 미치는 영향을 줄인다.

[0016] 추가의 측면에서, 졸-겔 조건을 제어하여 식물 기반 재료를 형성하기 위해, 용액 중 식물 기반 단백질의 특성을 수정하기 위한 공용매 혼합물의 용도가 제공된다.

[0017] 제1 공용매는 식물 기반 단백질(들)의 용해도를 증가시키고, 제2 공용매는 식물 기반 단백질(들)의 용해도를 감

소시키는, 혼화성 공용매를 포함하는 용매 시스템을 선택함으로써, 졸-겔 조건을 제어할 수 있다.

[0018] 제1 공용매 대 제2 공용매의 비는 약 20 부피% 내지 80 부피%, 약 20 부피% 내지 60 부피%, 약 25 부피% 내지 55 부피%, 약 30 부피% 내지 50 부피%, 약 20 부피%, 약 30 부피%, 약 40 부피% 약 50 부피% 또는 약 60 부피%로 다양할 수 있으며, 가장 바람직하게는 약 30 부피% 내지 50 부피%이다. 이러한 비율은 기능적으로 유용한 재료로 이어진다.

[0019] 용매 시스템은 하나 이상의 제1 공용매(들) 및/또는 하나 이상의 제2 공용매(들)을 함유할 수 있다.

[0020] 처음으로, 확장 가능한 공정(scalable process)을 사용하여, 식물 기반 재료가 안정적이고 재현 가능하게 형성될 수 있다. 졸-겔 조건을 제어할 수 있기 때문에, 생성된 재료의 특성을 조정하거나 및/또는 유용한 생체 재료를 생산할 수 있도록 제조 공정을 조정할 수 있다.

[0021] 본 발명에 따른 공정은 열가역적 저온 경화 겔화 공정(thermoreversible cold-set gelation process)을 통해 형성된 식물 기반의 구조화 재료의 형성을 허용한다. 식물 기반의 구조화 재료는 식물 기반 단백질 초분자(supramolecular) 구조일 수 있거나; 또는 응집되고 얽힌 식물 기반 단백질 초분자 구조의 3차원 네트워크일 수 있다.

[0022] 열가역적 저온 경화 겔화 공정(thermoreversible cold-set gelation process)은, 식물 기반 단백질 분자를, 목적하는 구성이 되도록 처리될 수 있는 액체 용액을 형성하는 온도보다 높게 가열한 후, 이렇게 형성된 액체 용액을 냉각하여, 졸-겔 전이를 가능하게 함으로써, 비공유 분자간 상호작용에 의해 유지되는 자기조립된 단백질 응집체의 네트워크를 형성하는 공정으로 간주될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 겔화 공정은 공유 화학적 가교(covalent chemical cross-linking)를 요구하지 않으므로 가역적이다.

[0023] 따라서, 추가 측면에서, 열가역성 저온 경화 겔화 공정을 통해 형성된 식물 기반 구조화 재료가 제공되며; 여기서, 구조화 재료는 선택적으로(optionally) 필름, 박막 필름(thin film), 마이크로패턴화 필름(또는 박막 필름), 마이크로구조화된 또는 나노구조화된 박막 필름, 마이크로겔, 마이크로캡슐, 마이크로비드, 바이오스캐폴드, 바이오 지지체, 스펀지, 마이크로규모 스폰지, 경질 캡슐(hard capsule), 또는 기능성 코팅(functional coating)일 수 있다.

[0024] 추가 측면에서, 식물 기반 열 가역성 겔이 제공된다.

[0025] 추가 측면에서, 식물 기반 열 가역성 하이드로겔이 제공된다.

[0026] 추가 측면에서, 본 발명에 따른 식물 기반 재료, 및 하나 이상의 추가 생체폴리머, 예를 들어, 단백질, 다당류, 등을 포함하는 복합 재료가 제공된다.

[0027] 추가 측면에서, 본 발명의 방법에 따라 제조된 재료들이 제공된다.

[0028] 본 발명의 식물 기반 재료 및 이의 제조 방법은, 졸-겔 전이의 정밀한 제어를 가능하게 하여, 지금까지, 동물 유래 단백질만을 사용하여 성공적으로 제조되었던 생체재료를 형성하기 위한 식물 기반 단백질의 사용을 시작한다. 적합한 생체재료는 필름, 마이크로비드, 마이크로캡슐, 스캐폴드, 젤, 스폰지, 등을 포함한다.

[0029] 추가 측면에서, 본 발명에 따른 식물 기반 재료를 포함하는 마이크로비드가 제공된다.

[0030] 추가 측면에서, 본 발명에 따른 식물 기반 재료를 포함하는 마이크로캡슐이 제공된다.

[0031] 추가 측면에서, 본 발명에 따른 식물 기반 재료를 포함하는 경질 캡슐(hard capsule)이 제공된다.

[0032] 추가 측면에서, 본 발명에 따른 식물 기반 재료를 포함하는 스펀지, 또는 마이크로규모 스펀지가 제공된다.

[0033] 추가 측면에서, 본 발명에 따른 식물 기반 재료를 포함하는 필름, 바람직하게는 박막 필름(thin film)이 제공된다.

[0034] 추가 측면에서, 본 발명에 따른 식물 기반 재료를 포함하는 나노패턴화 또는 마이크로패턴화 필름이 제공된다.

[0035] 추가 측면에서, 본 발명에 따른 식물 기반 하이드로겔을 포함하는 바이오스캐폴드(bioscaffold)가 제공된다.

[0036] 추가 측면에서, 본 발명에 따른 식물 기반 하이드로겔을 포함하는 기능성 코팅(functional coating)이 제공된다.

[0037] 추가 측면에서, 본 발명에 따른 식물 기반 재료를 포함하는 식료품, 화장품, 약품, 또는 의료 기기가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 다양한 아세트산/탈이온수 공용매 비율들 하에서 형성된 분리 대두 단백질(SPI) 하이드로겔을 보여준다.

도 2는 30 부피% 공용매 비율을 사용하여 생성된 하이드로겔의 SEM(주사 전자 현미경) 이미지를 보여준다.

도 3a는 H_2O:아세트산 공용매 비율의 함수로서 SPI 하이드로겔의 유변학적 특성을 보여준다; 도 3b는 다양한 농도들에서 제조된 SPI 하이드로겔의 전단 박화 거동(shear thinning behaviour)을 나타낸다.

도 4는, FTIR 스펙트럼의 아미드 I 밴드에서 계산된, 다양한 H_2O:아세트산 공용매 비율들 하에서의 SPI 하이드로겔 2차 구조의 구조적 변화를 보여준다.

도 5는 아세트산의 양이 증가함에 따라 증가하는 단백질 가수분해 정도를 나타내는 SDS-PAGE 전기영동도(electrophoretogram)를 나타낸다.

도 6은 본 발명의 하이드로겔을 사용하여 형성된 마이크로비드를 나타낸다. 도 6a는 마이크로비드 형성의 개략도를 보여준다. 도 6b는 수용액(pH=2) 중에 현탁된 안정한 마이크로비드를 나타낸다. 도 6c는 50 μm Tht 수용액 중에 현탁된 Tht 염색된 마이크로비드를 나타낸다. 도 6d는 초임계점 건조에 의해 제조된 마이크로비드의 SEM 이미지이다. 도 6e는 마이크로비드 표면의 겔 네트워크의 SEM 이미지를 나타낸다.

도 7a는 친유성 코어와 친수성 코어가 모두 있는 코어-쉘 마이크로캡슐을 생성하는 데 사용되는 다층 3D 마이크로유체 액적 생성기의 개략도를 보여준다. 도 7b는 수용액 중에 현탁된 친유성 코어를 함유하는 코어-쉘 마이크로캡슐을 나타낸다.

도 8은 가용성 활성 성분(리보플라빈)의 현탁액을 함유하는 친수성 코어를 함유하는 코어-쉘 마이크로캡슐을 나타낸다.

도 9는 모사된 분해의 결과를 보여준다; 도 9a는 수용액 중의 마이크로캡슐을 나타낸다; 도 9b는 SGF(모사 위액) 중에서 60분 후의 마이크로캡슐을 나타낸다; 도 9c는 SIF(모사 장액) 중에서 120분 후의 마이크로캡슐을 나타낸다.

도 10a는 1 wt% HMP 펙틴 중의 리보플라빈 용액으로 이루어진 코어를 함유하는 코어-쉘 마이크로캡슐을 나타낸다; 도 10b는 모사된 조건 하에서 리보플라빈의 누적 방출을 보여주는, HPLC 분석에 따른 2단계 시험관내 소화율 연구의 결과를 나타낸다.

도 11a는 향유가 적재된 식물 기반 단백질 마이크로규모 스폰지의 분포를 보여준다. 도 11b는 단백질 마이크로겔 쉘을 쉽게 관찰할 수 있는 더 높은 배율(20x)에서, 단일 방향제-적재 식물 기반 단백질 마이크로규모 스폰지를 보여준다.

도 12는 안정한 단백질 필름을 생성하는 실시예의 개략도를 보여준다.

도 13a는 본 발명에 따라 제조된 필름에 대한 응력-변형률 곡선을 나타낸다. 도 13b는 영률을 나타내고, 도 13c는 파단 신율(%)을 나타낸다.

도 14a는 대두 단백질 필름 표면의 마이크로기둥들의 균일한 배열의 미세패터닝을 나타내는데, 이는, 미세패터닝되지 않은 대조군 샘플과 비교하여, 물액적의 접촉각(99°)을 크게 증가시킨다. 도 14b는 DVD 디스크 상에 대두 단백질 필름을 캐스팅하여 얻은 나노채널들의 균일한 배열의 나노패터닝을 보여준다. 대두 단백질 필름의 나노구조화 모티프(nanostructured motifs)는 광자 특성(Mie 산란)을 나타낸다.

도 15는 판지 기재 상에 대두 단백질 필름 코팅을 생성하는 개략적인 공정을 나타낸다. 대두 단백질 필름 코팅된 기재는, 코팅되지 않은 대조군 샘플과 비교할 때, 50%의 수분 흡수량 감소를 나타낸다.

도 16a는 2 ml 에펜도르프(Eppendorf) 튜브 기재 주위에 얇은 3차원 하이드로겔 층의 형성을 나타낸다. 도 16b는 성형된(moulded) 3차원 하이드로겔을 건조하고 기재로부터 제거한 후 얻어진 대두 단백질 경질 캡슐(hard capsule)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 다음의 특징들은 본 발명의 모든 측면에 적용된다.

[0040] 임의의 적합한 식물 기반 단백질이 본 발명에서 사용될 수 있다. 적합한 식물 원천은 대두, 완두콩, 쌀, 감자, 밀, 옥수수 제인(corn zein), 수수, 등을 포함한다. 특정 식물 단백질에는 콩 단백질과 완두콩 단백질이 포함된다.

[0041] 식물 유래 단백질의 특징은 본래부터 물에 대한 용해도가 낮다는 것이다. 현재까지, 이것은 생체재료를 생성하는 데 있어 그들의 사용을 제한하여 왔다. 그러나, 본 발명은 이러한 단백질과 관련된 이전의 한계를 극복하였다.

[0042] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 재료는 식물 기반 단백질을 용매 시스템 내로 첨가함으로써 형성되며, 여기서, 용매 시스템은 본 명세서에 정의된 바와 같은 2개 이상의 혼화성 공용매를 포함한다.

[0043] 제1 공용매는 식물 기반 단백질(들)의 용해도를 증가시킨다. 제1 공용매는 가용화(solubilising) 공용매로 간주될 수 있다. 하나 이상의 가용화 공용매(들)가 있을 수 있고, 가용화 공용매(들)는 식물 기반 단백질(들)을 완전히 또는 부분적으로 가용화할 수 있다.

[0044] 가용화 공용매의 예는 유기산이다. 유기산은 산성 성질을 갖는 유기 화합물이다. 적합한 유기산은 아세트산 또는 α-하이드록시산을 포함한다. 적합한 α-하이드록시산은 글리콜산, 젖산, 말산, 시트르산 및 타르타르산을 포함한다. 바람직한 유기산은 아세트산 및 젖산이다. 유기산을 사용하면 식물 단백질의 가용화가 가능하고, 단백질의 온화한 가수분해(mild hydrolysis)도 가능하다. 예를 들어, 이론에 얽매이지 않고, 유기산 중의 식물 기반 단백질의 용해는 i) 단백질의 양성자화(protonation) 및 ii) 소수성 상호작용의 감소에 기여하는 음이온 용매화 층의 존재로 인해 가능하다. 일단 처음에 유기산에 용해되면, 식물 기반 단백질의 양성자화는 물과 같은 비용매(non-solvent)에서 단백질을 안정화하는 데 도움이 될 수 있다.

[0045] 바람직한 구현예에서, 제1 공용매는 유기산이다.

[0046] 제2 공용매는, 제1 공용매에 비해, 식물 기반 단백질(들)의 용해도가 감소하였다. 제2 공용매는 탈가용화 공용매(de-solubilising co-solvent)로 간주될 수 있다. 하나 이상의 탈가용화 공용매(들)가 있을 수 있다.

[0047] 탈가용화 제2 공용매(들)의 예는 수성 완충제 용액이다. 추가 구현예에서, 제2 공용매는 에탄올, 메탄올, 아세톤, 아세토니트릴, 디메틸술폭사이드, 디메틸 포름아미드, 포름아미드, 2-프로판올, 1-부탄올, 1-프로판올, 헥산올, t-부탄올, 에틸 아세테이트 또는 헥사플루오로이소프로판올일 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, 제2 공용매는 물 및 에탄올이다. 추가의 특히 바람직한 구현예에서, 제2 공용매는 물이다.

[0048] 바람직한 구현예에서, 용매 시스템 중 식물 기반 단백질(들)의 농도는 25 내지 200 mg/ml, 바람직하게는 50 내지 150 mg/ml이다. 유기산의 비율은 단백질 농도에 따라 달라질 수 있으며, 예를 들어, 단백질 농도가 증가함에 따라 더 높은 유기산 비율을 사용한다.

[0049] 바람직한 구현예에서, 단백질 가수분해의 정도를 제어하여 생성된 하이드로겔의 특성을 변형시킨다. 예를 들어, 형성 동안 존재하는 산 농도를 증가시키면, 단백질의 가수분해 정도를 증가시킬 것이다. 단백질 가수분해의 정도가 높을수록 덜 단단한 하이드로겔이 형성된다.

[0050] 하나 이상의 식물 기반 단백질(들)을 포함하는 용액을 형성하기 위해, 단백질의 용해를 가능하게 하도록 단백질/용매 시스템 혼합물에 물리적 자극을 가하는 것이 필요할 수 있다. 적합한 물리적 자극에는 초음파 처리, 교반, 고전단 혼합(high-shear mixing) 또는 기타 물리적 기술이 포함된다. 바람직한 기술은 초음파 처리이다.

[0051] 일 구현예에서, 용액은 약 5분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 또는 30분 초과의 기간 동안 초음파 처리된다. 바람직한 초음파 처리 시간은 약 30분이다.

[0052] 단백질 용액은, 액체 용액이 단백질(들)에 대한 졸-겔 전이 온도보다 높은 온도를 유지하도록, 가열된다. 용매 시스템을 변경함으로써(예를 들어, 유기산의 선택, 추가 용매에 대한 유기산의 비율 또는 추가 수단을 통해), 단백질(들)에 대한 졸-겔 전이 온도를 변경하는 것이 가능하다. 적합한 조건의 선택을 통해, 단백질의 졸-겔 전이를 신중하게 제어하여, 하이드로겔의 형성을 제어할 수 있다.

[0053] 일 구현예에서, 단백질 용액은 약 70℃ 이상으로 가열된다. 추가 구현예에서, 단백질은 약 75℃ 이상, 약 80℃ 이상, 약 85℃ 이상, 또는 약 90℃로 가열된다. 바람직한 일 구현예에서, 단백질은 85℃로 가열된다.

[0054] 단백질 용액은 약 5분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 45분 또는 1시간 동안 높은 온도에서 유지될 수 있다. 단백질이 완전히 용해될 수 있도록 하는 바람직한 시간은 적어도 30분이다. 더 오랜 기간 동안 높은 온도에서 단백질 용액을 유지하는 것이 가능하다. 이것은 상업적인 배치 공정(batch process) 또는 더 긴 기간 동안 액체

형태로 단백질 용액을 유지해야 하는 유체 처리 단계에서 사용하는 데 유용할 수 있다.

[0055] 단백질 용액을 단백질의 졸-겔 전이 온도보다 높게 가열한 후, 단백질 용액의 온도를 졸-겔 전이 온도보다 낮은 제2 온도로 낮춰 하이드로겔의 형성을 촉진할 수 있다. 제2 온도는 실온일 수 있다. 단백질 용액은 약 5분, 10분, 15분, 20분, 25분 또는 약 30분의 시간 동안 낮춰진 온도에서 유지될 수 있다. 낮춰진 특정 시간은 약 5분이다. 그러나, 본 발명의 방법은 단백질이 용액 내에 장기간 동안 남아 있게 한다. 따라서, 필요에 따라, 단백질 용액을, 액체 형태로 단백질을 유지하는 데 필요한 기간만큼, 졸-겔 전이 온도보다 높은 온도로 유지할 수 있다. 이것은 수 시간, 수 일 또는 그 이상이 될 수 있다. 또한, 반응은 가역적이기 때문에, 용액은, 예를 들어, 하이드로겔이 형성될 더 낮은 온도(예를 들어, 실온)에서 유지될 수 있지만, 그 후에 졸-겔 전이 온도보다 높게 가열되어, 용액을, 추가 처리를 위한 액체 상태로 되돌릴 수 있다. 이러한 방식의 단백질 하이드로겔은, 하이드로겔이 오랫동안 안정적으로 유지되기 때문에, 수 시간, 수 일, 수 주, 수 개월 또는 수 년 동안 보관될 수 있다.

[0056] 특정 온도는 단백질 공급원의 특성, 사용된 용매 조건 및 따라서 졸-겔 전이 온도에 따라 달라진다. 대안적으로, 고온 및 저온은 상대적으로 정해질 수 있고(예를 들어, 약 85 ℃ 그 다음에 실온), 공용매 혼합물 조건은 선택된 식물 기반 단백질에 적합한 졸-겔 전이 온도를 보장하도록 조정될 수 있다.

[0057] 따라서, 일 구현예에서, 다음을 포함하는 식물 기반 재료를 형성하는 방법이 제공된다:

[0058] a) 하나 이상의 식물 기반 단백질(들) 및 용매 시스템을 포함하는 단백질 용액을 형성하는 단계로서, 용매 시스템은 혼화성 공용매(miscible co-solvents)를 포함하고; 여기서, 제1 공용매는 식물 기반 단백질(들)의 용해도를 증가시키고, 제2 공용매는 식물 기반 단백질(들)의 용해도를 감소시키는; 단계;

[0059] b) 단백질 용액을, 일정 시간 동안, 기계적 교반, 예를 들어, 초음파 처리를 겪도록 하는 단계;

[0060] c) 일정 시간 동안, 단백질 용액의 온도를 졸-겔 전이 온도보다 높은 제1 차 높은 온도로 상승시키는 단계(상기 온도 상승은 단계 b)의 기계적 교반에 의해 야기되거나, 또는 외부 열원에 의할 수 있다);

[0061] d) 식물 기반 단백질들이 하이드로겔로 자가-응집되도록, 단백질 용액의 온도를 졸-겔 전이 온도 미만의 온도로 낮추는 단계; 및 선택적으로(optionally)

[0062] e) 하이드로겔을 정의된 형상, 예를 들어, 마이크로겔, 마이크로캡슐, 마이크로규모 스폰지, 필름, 등으로 형성하는 단계. 형성 단계는 성형(molding) 단계, 즉 하이드로겔을 정의된 형상으로 성형하는 단계일 수 있다. 형성 단계는 마이크로유체 장치(microfluidic device)를 사용할 수 있다.

[0063] 단백질 용액은, 용액이 원하는 최종 형상으로 맞춰지는(conform) 동안, 단계 c)의 고온으로 유지될 수 있다. 예를 들어, 마이크로유체 장치 내에서, 단백질 용액은 장치 저장소 내에서 단계 c)의 고온으로 유지될 수 있지만, 용액이 장치에서 배출됨에 따라, 그 온도는 내려가서, 마이크로겔 또는 마이크로캡슐 쉘을 형성한다. 대안적으로, 단백질 용액은 고온으로 유지되는 한편, 온도가 내려간 후 단백질이 하이드로겔로 형성되도록 하는 적합한 몰드 내에서 성형될 수 있다.

[0064] 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 식물 단백질이 용매 시스템에 첨가될 때, 식물 단백질은 불용성 콜로이드성 단백질 응집체의 고점도 분산액을 형성하는 것으로 생각된다.

[0065] 또한, 초음파 처리와 같은 기계적 교반의 적용은, 큰 콜로이드성 단백질 응집체를 더 작은 것으로 파괴할 뿐만 아니라, 단백질 분자간 상호작용을 방해하는 것으로 생각된다.

[0066] 또한, 공용매 시스템의 존재 하에 단백질 용액을 졸-겔 온도보다 높은 온도로 가열하면, 식물 단백질이 부분적으로 전개되어(unfold), 초기에 단백질 천연 구조 내에 묻혀있던 소수성 아미노산이 노출되는 것으로 생각된다. 일단 부분적으로 전개되면, 공용매는 전개된 단백질 분자들과 상호작용할 수 있다. 예를 들어, 유기산은 아미노산 잔기를 양성자화하기 위한 더 큰 접근 기회(greater access)를 가질 뿐만 아니라, 소수성 상호작용을 안정화시키는 음이온 염 다리의 형성을 가능하게 한다. 또한, 고온에서 가열하면, 단백질-단백질 비공유 분자간 접촉이 파괴된다.

[0067] 또한, 단백질 용액을 졸-겔 온도 미만으로 냉각하면, 단백질-단백질 비공유 분자간 접촉이 가능하여, 식물 단백질 분자들이 자기조립되어 초분자 응집체(supramolecular aggregates)의 네트워크를 형성하는 것을 촉진하는 것으로 추정된다.

[0068] 본 발명의 방법은, 식물 단백질이, 분자간 수소 결합 상호작용에 의해, 및 특히 β-스트랜드(β-strand) 사이에

유지되는 초분자구조로 응집되도록 하는 것으로 생각된다.

[0069] 본 발명의 방법은 높은 수준의 β-시트 분자간 상호작용이 있는 재료들이 형성될 수 있게 한다. 이것은 이전에 만들어진 적이 없는 신규한 재료를 유도한다.

[0070] 본 발명은 필름, 박막 필름(thin film), 마이크로패턴화 필름(또는 박막 필름), 마이크로구조화된 또는 나노구조화된 박막 필름, 마이크로겔, 마이크로캡슐, 마이크로비드, 바이오스캐폴드, 바이오 지지체, 마이크로규모 스폰지, 경질 캡슐 (hard capsule), 또는 기능성 코팅(functional coating)을 포함하는 식물 기반 구조화 재료를 제공한다.

[0071] 본 발명에 따른 재료들은 유리한 기계적 특성을 갖는다. 예를 들어, 온도 변화에 따라 겔에서 액체로 가역적으로 변화하는 능력은, 유리한 제조 능력을 가능하게 한다.

[0072] 일 구현예에서, 본 발명에 따라 제조된 하이드로겔은 10 rad/s에서 500 Pa 초과, 1000 Pa 초과, 2500 Pa 초과, 3000 Pa 초과, 4000 Pa 초과의 저장 모듈러스(G')를 갖는다.

[0073] 일 구현예에서, 하이드로겔은 전단 속도 증가에 따라 점도가 감소하는 전단 박화(shear-thinning) 거동을 나타낸다.

[0074] 따라서, 본 발명에 따라 형성된 하이드로겔은 선행 식물 기반 하이드로겔에서 볼 수 없는 독특한 성질을 갖는다. 여기에는 상업적으로 입수가능한 공급원으로부터 고농도(즉, 5 wt% 내지 15 wt%)의 식물 기반 단백질로부터 하이드로겔을 형성하는 능력, 및 열 변성 시 액체 상태에서 이러한 고농축 단백질 용액을 유지하는 능력이 포함되며, 이는 그것들을 성형(moulding)하여 잘 정의된 물체(well-defined objects)를 형성하도록 하는 것을 가능하게 한다.

[0075] 본 발명의 재료의 특징은, 식물 기반 단백질이 하이드로겔을 자가 형성(self-form)하기 때문에, 가교제를 제공할 필요가 없다는 것이다. 따라서, 본 발명의 구현예에서, 가교제를 함유하지 않거나, 또는 실질적으로 함유하지 않는 식물 단백질 재료(예를 들어, 하이드로겔)이 제공된다.

[0076] 그러나, 대안적인 구현예에서, 본 발명에 따른 하이드로겔은 가교제를 포함할 수 있다. 적합한 가교제는 미생물 트랜스글루타미나제, 글루타르알데하이드, 포름알데하이드, 글리옥살, 페놀계 화합물, 에폭시 화합물, 제니핀 또는 디알데하이드 전분을 포함한다.

[0077] 하이드로겔의 다공성 네트워크로 인해, 하이드로겔 내의 용매 혼합물은 하이드로겔의 기계적 안정성을 손상시키지 않고 다른 용매 혼합물로 교환될 수 있다. 용매 교환 공정을 수행하여 하이드로겔 다공성 네트워크로부터 유기산을 제거할 수 있다.

[0078] 본 발명의 일 구현예에서, 본 방법은 식물 기반 단백질 하이드로겔이 형성된 용매 시스템을 대체 용매 시스템으로 교환하는 단계를 포함한다. 추가 구현예에서, 이는 용매-교환 공정을 사용하여 수행된다. 이 단계는 하이드로겔의 형성 후에 수행될 수 있지만, 하이드로겔이 구조화 재료로 형성된 후에(예를 들어, 본 발명의 방법의 단계 b) 또는 c) 이후에) 수행될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 수성 완충제는 하이드로겔 다공성 네트워크 내의 유기산 공용매 혼합물을 대체하기 위해 사용된다.

[0079] 일 구현예에서, 하이드로겔 내의 용매 혼합물은 증발되어 건조된 재료, 예를 들어, 박막 필름, 미세구조화/나노구조화 박막 필름 또는 마이크로비드를 생성하도록 남겨진다. 추가 구현예에서, 용매 시스템 내의 하나 이상의 공용매(들)은 휘발성 용매이다. 바람직한 구현예에서, 제1 공용매는 아세트산과 같은 휘발성 유기산이다. 바람직한 구현예에서, 제2 공용매 또는 추가 공용매(들)은 에탄올과 같은 휘발성 알코올이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 제1 공용매 및 제2 공용매 둘다 또는 추가 공용매(들)가 휘발성 용매이다.

[0080] 일 구현예에서, 본 발명의 재료들은 하나 이상의 가소제를 포함할 수 있다. 가능한 가소제는 에틸렌 글라이콜, 디에틸렌 글라이콜, 트리에틸렌 글라이콜, 테트라에틸렌 글라이콜, 폴리에틸렌 글라이콜, 프로필렌 글라이콜, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 지방산, 글루코오스, 만노스, 프룩토스, 수크로스, 에탄올아민, 요소, 트리에탄올아민, 식물성 기름, 레시틴, 왁스 및 아미노산을 포함한다.

[0081] 혼입되는 가소제의 양은, 예를 들어, 필름과 같은 재료의 사용에 따라 달라질 것이다. 일 구현예에서, 조성물은 가소제를 약 1% , 약 2%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60% 또는 그 이상으로 포함할 수 있다. 추가 구현예에서, 하이드로겔은 약 5 내지 50%의 가소제, 약 10 내지 50%, 약 20 내지 40%, 약 15 내지 35%, 또는 약 20%의 가소제를 포함할 수 있다.

[0082] 가소제를 추가하면 재료의 기계적 특성에 영향을 줄 수 있다. 통상적으로, 가소제를 추가하면 재료의 탄성을 증가시키지만, 통상적으로, 반대로, 결과로서 생긴 재료의 강도가 감소한다.

[0083] 본 발명의 하이드로겔은 유용한 식물 기반 생체재료의 범위를 형성할 수 있게 한다. 식물 기반 재료를 사용하면 이전에 사용된 동물 또는 석유화학 원료에 비해 많은 이점이 있다. 첫째, 식물 원천은 재생가능하고 환경적으로 효율적인 방식으로 효율적으로 얻을 수 있다. 둘째, 식물 원천은 생분해성이므로 다른 플라스틱에 대한 환경적으로 건전한 대안이다. 셋째, 동물 유래 단백질과 달리, 식물 기반 단백질은 동물 유래 단백질을 인간에게 도입하지 않는다는 상당한 이점이 있다. 이는 동물성 원천의 재료가 유해한 요소가 없다는 것을 확인하기 위해 엄격한 검사와 공정(예를 들어, 프리온, 등을 제거)을 거쳐야 하는 약리학적 및 약학적 관점 모두에서 긍정적인 영향을 미칠 뿐만 아니라, 제품이 베지테리안/비건에게 적합하기 때문이다.

[0084] 식물 기반 단백질은 인간(또는, 다른 동물)의 식단에 자연적으로 존재하기 때문에, 본 발명에 따라 제조된 생체재료는 다당류(예를 들어, 알긴산 또는 키토산)와 같은 다른 바이오폴리머에 비해 더 높은 정도의 소화율을 나타낸다. 이는 약품, 식품 및/또는 화장품 용도에 특히 적합한다.

[0085] 일 구현예에서, 본 발명의 하이드로겔을 사용하여 필름, 예를 들어, 박막 필름을 형성할 수 있다. 식물 단백질 유래 필름은 식품 포장 용도 또는 이식형 장치를 포함한 의료 장치와 함께 사용하기 위한 생분해성 가요성 필름을 형성하는 것을 포함하는 많은 응용 분야를 가지고 있다.

[0086] 동물성 재료(또는, 전분 기반/셀룰로오스 재료)에 비해 본 발명의 식물 기반 재료의 장점은, 물에 대한 고유의 불용성이다. 대부분의 바이오폴리머 필름은 물에 쉽게 녹기 때문에, 식품 포장 용도로는 단독으로 사용할 수 없으며, 합성 폴리머를 사용한 추가 코팅층이 필요하다. 이러한 문제는 본 발명으로 극복된다.

[0087] 필름은 1 내지 1000 ㎛, 1 내지 100 ㎛, 10 내지 100 ㎛, 20 내지 60 ㎛, 30 내지 50 ㎛, 등의 전형적인 두께를 가질 수 있다.

[0088] 필름은 20 MPa 초과, 50 MPa 초과, 80 MPa 초과, 100 MPa 초과, 200 MPa 초과, 300 MPa 초과, 400 MPa 초과, 500 MPa 초과, 600 MPa 초과 또는 그 이상의 영률(Young's modulus)을 가질 수 있다.

[0089] 필름은 10% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 90% 초과, 100% 초과 또는 그 이상의 파단 신율 백분율(elongation break percentage)을 가질 수 있다.

[0090] 필름은 100 nm 내지 1000 ㎛ 범위로 마이트로패턴화될 수 있어, 초소수성(연잎 효과) 또는 구조 색상(미 산란(Mie scattering)에 기인된);과 같은 신규한 기능적 특성을 가능하게 한다.

[0091] 기능성 복합 필름은 가요성 전자 장치 또는 항균 특성을 갖는 필름의 생성을 위해 각각 금 나노입자 또는 은 나노입자와 같은 무기 나노입자를 임베딩(embedding)함으로써 제조될 수 있다.

[0092] 추가 구현예에서, 본 발명의 하이드로겔을 사용하여 마이크로비드를 형성할 수 있다. 식물 기반 원료로부터 마이크로비드를 형성하는 것은 현재 플라스틱 기반 마이크로비드의 환경 문제를 극복한다. 마이크로비드는 통상적으로 가장 큰 치수가 1 밀리미터 미만인 직경을 갖는 고체 입자이다.

[0093] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 마이크로비드는 최대 치수가 1mm 미만, 900 μm 미만, 800 μm 미만, 700 μm 미만, 600 μm 미만, 500 μm 미만, 400 μm 미만, 300 μm 미만, 200 μm 미만, 또는 100 μm 미만의 크기를 가질 수 있다.

[0094] 추가 구현예에서, 본 발명의 하이드로겔을 사용하여 마이크로캡슐을 형성할 수 있다. 마이크로캡슐은 다양한 재료들을 캡슐화하는 데 사용할 수 있으며, 화장품, 식품 용도, 가정용품 용도, 농약 용도 및 약품 용도를 포함하는, 다양한 산업 응용 분야를 찾을 수 있다.

[0095] 본 발명에 따라 제조된 마이크로캡슐은 표준 합성 폴리머 마이크로캡슐화 쉘 재료에 대한 완전히 생분해성인 대안을 제공한다.

[0096] 본 발명에 따라 제조된 마이크로캡슐은 유일하게 식물 기반 재료가 마이크로유체적으로 조립될 수 있도록 한다.

[0097] 본 발명에 따라 제조된 마이크로캡슐은, 예를 들어, 불리한 저장 조건에 대해 우수한 안정성을 제공하고, 활성 성분(예를 들어, 비타민, 필수 지방산, 또는 식품 용도의 항산화제) 또는 소형 분자 및 대형 분자를 모두 포함하는 약품 활성화제를 보존하기 위해 더 안전한 식품 등급 또는 약품 등급 솔루션이 된다.

[0098] 본 발명에 따라 제조된 마이크로캡슐은 또한, 높은 재현성, 복잡한 구조(코어-쉘) 생성 능력을 보장하는 마이크

로유체 기술을 사용하여 생성될 수 있거나, 및/또는 온화한 처리 조건을 사용하여 만들 수 있으므로, 마이크로캡슐에 의해 캡슐화된 활성화제를 보호할 수 있다는 이점을 가질 수 있다.

[0099] 강력한 마이크로캡슐은 또한, 가교제 또는 어떠한 유해 물질이 없는 상태에서 단백질 응집체의 자기조립을 제어함으로써 식물 기반 단백질로부터 생성될 수도 있다.

[0100] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 마이크로캡슐은 소수성 내부 조성물을 캡슐화할 수 있다. 추가 구현예에서, 본 발명에 따른 마이크로캡슐은 친수성 내부 조성물을 캡슐화할 수 있다. 추가 구현예에서, 본 발명에 따른 마이크로캡슐은 살아있는 유기체 조성물을 캡슐화할 수 있다. 추가 구현예에서, 본 발명에 따른 마이크로캡슐은 분말화된 조성물을 캡슐화할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 마이크로캡슐은 수중유(oil-in-water), 유중수(water-in-oil), 유중수중유(oil-in water-in oil), 또는 수중유중수(water-in-oil-in water) 에멀젼 등을 캡슐화할 수 있다.

[0101] 본 발명에 따른 식물 기반 하이드로겔은 마이크로캡슐 쉘을 형성할 수 있다. 일 구현예에서, 쉘은 약 100 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, 600 nm, 700 nm, 800 nm, 900 nm, 1㎛, 2㎛, 3㎛, 4㎛, 5㎛, 6㎛, 7㎛, 8㎛, 9 ㎛, 10 ㎛, 11㎛, 12㎛, 13㎛, 14㎛, 15㎛, 16㎛, 17㎛, 18㎛, 19㎛, 20 ㎛, 25㎛, 30 ㎛, 30 ㎛, 35㎛, 40 ㎛, 또는 50 ㎛, 등의 두께를 가질 수 있다. 다른 두께는 10 nm 내지 50,000 ㎛ 사이, 10 ㎛ 내지 100 ㎛ 사이, 10 ㎛ 내지 50 ㎛ 사이, 10 ㎛ 내지 10 ㎛ 사이, 등을 포함한다.

[0102] 본 발명에 따른 식물 기반 마이크로캡슐은, 비타민, 필수 지방산, 항산화제, 소형 분자, 친수성 소형 분자, 소수성 소형 분자, 단백질, 항체, 항체-약물 접합체, 방향제 및 기타 큰 분자를 포함하여, 임의의 기능식품, 화장품, 약품 또는 농약에 적합한 활성화제를 캡슐화할 수 있다.

[0103] 적합한 캡슐화된 작용제는 다음으로부터 선택된 하나 이상의 작용제(agent)를 포함한다:

[0104] 엘라스토머 제형, 고무 제형, 페인트 제형, 코팅 제형, 접착제 제형, 또는 밀봉제 제형의 중합을 위한 가교제, 경화제, 유기 촉매 및 금속 기반 촉매(예를 들어, 백금, 팔라듐, 티타늄, 몰리브덴, 구리, 또는 아연의 유기 착물 및 무기 착물);

[0105] 잉크, 퍼스널 케어 제품, 엘라스토머 제형, 고무 제형, 페인트 제형, 코팅 제형, 접착제 제형, 밀봉제 제형, 또는 종이 제형을 위한 염료, 착색제, 안료;

[0106] 세제, 가정청소 용품, 개인 위생 용품, 텍스타일(소위 스마트 텍스타일), 코팅 제형을 위한 향료. 본 발명에 유용한 향료는 국제 향료 협회(IFRA)에 의해 발행되고 업데이트된 표준들의 목록에 속하는 임의의 화합물이다;

[0107] 방향제, 향료, 비타민, 아미노산, 단백질, 필수 지질, 프로바이오틱스, 항산화제, 사료 및 식품용 방부제;

[0108] 세제 및 퍼스널 케어 제품을 위한 섬유 유연제 및 컨디셔너;

[0109] 퍼스널 케어 제품, 텍스타일(소위 스마트 텍스타일)을 위한 효소, 비타민, 단백질, 식물 추출물, 보습제, 살균제, 항균제, 자외선 차단제, 약물과 같은 생리 활성 화합물. 이러한 화합물에는 비타민 A, 비타민 B, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 파라 아미노벤조산, 알파 하이드록시산, 장뇌(camphor), 세라마이드, 엘라그산, 글리세린, 글리신, 글라이콜산, 히알루론산, 하이드로퀴논, 이소프로필, 이소스테아레이트, 이소프로필 팔미테이트, 옥시벤존, 판테놀, 프롤린, 레티놀, 레티닐 팔미테이트, 살리실산, 소르브산, 솔비톨, 트리클로산, 티로신이 포함되지만 이에 국한되지 않는다; 및

[0110] 농약용 비료, 제초제, 살충제, 농약(pesticides), 살균제(fungicides), 기피제 및 소독제.

[0111] 본 발명에 따른 식물 기반 마이크로캡슐은 또한, 진단 및 고처리량 스크리닝(high-throughput screening)에 유용할 수 있다.

[0112] 본 발명에 따른 식물 기반 하이드로겔은 또한, 마이크로겔 또는 마이크로규모-스폰지 제조에 유용할 수 있다. 마이크로겔은 마이크로규모의 하이드로겔이다. 마이크로규모 스폰지는 예를 들어, 활성 물질(active substance) 또는 성분 물질(ingredient substance)이 적재되는 마이크로겔로 간주될 수 있다.

[0113] 본 발명에 따른 식물 기반 하이드로겔은 또한, 바이오스캐폴드 및 바이오지지체의 제조에 유용할 수 있다. 이러한 재료들은 세포와 조직을 성장시키기 위해 시험관 내 및 생체 내 모두에서 유용할 수 있다. 하이드로겔은 또한, 의료 기기 및 임플란트를 코팅하는 데 유용할 수 있다.

[0114] 본 발명에 따른 식물 기반 단백질은 단백질의 성질을 변화시키기 위해 작용화되거나 및/또는 유도체화될 수 있

다.

[0115] 본 발명은 이제 다음의 비제한적인 실시예를 참조하여 설명될 것이다.

[0116] 재료

[0117] - 분리 대두 단백질(SPI)(92% 단백질)은 MP Biomedicals로부터 구입하였다.

[0118] - 아세트산(빙초산) 및 젖산(천연, ≥85%), 대두유(Glycine max로부터의 Soya oil),(-)-리보플라빈, 글리세롤 및 PFO(1H,1H,2H,2H-퍼플루오로-1-옥탄올)은 Sigma Aldrich로부터 구입하였다. 펙틴은 Cargil에서 친절하게 제공하였다.

[0119] - Fluorinert(FC-40)는 Fluorochem으로부터 구입하였다.

[0120] - 008-FluoroSurfactant는 RAN Biotechnologies로부터 구입하였다.

[0121] 실시예 1

[0122] 다음 공정에 따라 자립형 하이드로겔(self-standing hydrogels)을 제조하였다.

[0123] 빙초산을 탈이온수와 다양한 비율(10 부피%, 30 부피%, 50 부피%, 70 부피% 및 90 부피%)로 혼합하였다. 분리 대두 단백질을 100 mg/ml의 최종 단백질 농도로 탈이온수/아세트산 용액에 첨가하였다. 불용성 단백질의 분산액을 얻었다. 단백질의 가용화를 위해 혼합물을 30분 동안 초음파 처리에 노출시켰다(고주파 전력 출력=70W, 주파수=20KHz, 진폭=90%). 이 과정에서 샘플 온도는 85 ℃ 내지 90 ℃로 유지되었다. 30분 후, 완전히 반투명한 액체 용액이 얻어졌다. 샘플을 실온에서 5분 동안 냉각되도록 두었다. 이 과정 동안, 액체 샘플은, 바이알 반전 후, 관찰 가능한 반투명 자립형 하이드로겔로 변한다.

[0124] 다양한 아세트산/탈이온수 비율에 대해 실시예 1에 따라 제조된 하이드로겔을 도 1에 나타냈다.

[0125] 자립형 하이드로겔은 10 부피 내지 70 부피% 아세트산/탈이온수 비율에서 관찰되었다. 30 부피% 이상의 용액의 경우, 자립형 하이드로겔을 신속하게 형성하는 완전히 반투명한 용액이 생성된 것이 주목되었다. 겔이 완전히 반투명하였다는 사실은, 겔이, 단백질 저온 경화 겔에서 통상적으로 발견되는 것과 같은 큰 불용성 응집체가 아닌, 작은 가용성 응집체 구조체들로 구성되었다는 것을 시사한다.

[0126] 본 발명에 따라 제조된 하이드로겔은 물과 에탄올 모두에서 여러 번의 세척 단계 후에도 안정했고 그 구조를 유지하였다.

[0127] 주사 전자 현미경 분석

[0128] SEM(주사 전자 현미경) 분석은 30 부피% 공용매 비율을 사용하여 만든 하이드로겔에 대해 수행되었으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 하이드로겔 미세구조는, 미세 가닥 단백질 응집체(fine-stranded protein aggregates)의 조밀하게 패킹된 네트워크(densely packed network)의 존재를 확인시켜 주었다. 도 2는 또한, 아세트산을 제거한 후에도 겔 네트워크가 손상되지 않은 상태로 남아 있음을 보여준다.

[0129] 따라서, 식물 기반 열가역 겔(plant-based thermoreversible gel)이 처음으로 제조된 것이다.

[0130] 대두 단백질 하이드로겔 및 마이크로겔은 마지막 단계에서 100% 건조 에탄올을 사용하여 에탄올 중에서 탈수되었다. 샘플들을 미세다공성 표본 캡슐(78 μm 기공 크기, Agar Scientific)로 옮겼으며, 이때, 옮기는 동안 샘플이 건조되는 것을 방지하기 위해, 상기 캡슐은 100% 건조 에탄올로 적셔지고 부분적으로 채워진 상태였다. 그 다음, 액체 CO_2로 4회 내지 5회 플러싱하고 각각의 플러싱 사이에 적어도 15분 동안 배양하면서, Quorum E3100 임계점 건조기를 사용하여, 샘플들을 임계점 건조(critically point dried)하였다. 전도성 탄소 접착 패드(Agar Scientific)를 사용하여 알루미늄 SEM 스텁(stubs)에 샘플들을 장착하였고, Quorum K575X 스퍼터 코터를 사용하여 15 nm 이리듐으로 샘플들을 코팅하였다. 2 keV 및 25 pA 내지 50 pA 프로브 전류에서 실행되는 FEI Verios 460 주사 전자 현미경을 사용하여 샘플들을 관찰하였다. 2차 전자 이미지는, 무장 모드(field-free mode)(저해상도)의 Everhard-Thornley 검출기, 또는 완전 침지 모드(full immersion mode)(고해상도)의 Through-Lens 검출기를 사용하여, 획득하였다.

[0131] 유변학적 특성분석

[0132] SPI 하이드로겔의 유변학적 특성의 특성분석를 위해, 실시예 1을 통해 생성된 샘플을 실온에서 1시간 동안 냉각시킨 다음, 4℃에서 12시간 동안 유지하였다.

[0133] ARES 제어된 변형률 레오미터(controlled strain rheometer)를 사용하여 유변학적 측정을 수행하였다. 시험은 20 ℃의 온도에서 25 mm 평활 평행판들을 사용하여 수행되었다. 증가하는 양의 아세트산을 함유하는 SPI 하이드로겔 샘플들에 대해 변형률 및 주파수 스윕을 수행하였다. 변형률 스윕은 0.01%로부터 100%까지의 변형율로, 10 rad/s의 주파수를 사용하여, 수행되었다. 주파수 스윕은 0.1 rad/s로부터 100 rad/s까지, 1%의 변형율(선형 점탄성 영역 내)을 사용하여, 수행되었다. 모든 유변학적 측정은 온도 제어(20±0.25 ℃) 하에서 수행되었다.

[0134] SPI 하이드로겔의 유변학적 특성을, H_2O:아세트산 공용매 비율의 함수로서, 도 3에 나타내었다. 이로부터 알 수 있는 바와 같이, 소량의 아세트산(10 부피%)을 첨가하면 약한 하이드로겔이 형성되는데, 이는 단백질의 불완전한 가용화, 및 더 큰 불용성 응집체의 존재에 기인할 수 있다. 반면에, 다량의 아세트산(90 부피%)은 약한 하이드로겔의 형성을 초래하였다. 30 부피% 내지 70 부피%의 공용매 비율로 형성된 하이드로겔은, 2500 Pa보다 큰 G'를 나타내는 30% 및 50% 아세트산(v/v)으로 제조된 하이드로겔을 갖는 더 강한 하이드로겔을 생성하였다.

[0135] FTIR

[0136] 다양 용매 비율들 하에서 하이드로겔 2차 구조의 변화를 조사하였다. SPI 하이드로겔의 구조 분석은 FTIR-Equinox 55 분광계(Bruker)를 사용하여 수행되었다. 하이드로겔 샘플들은 추가 전처리 없이 사용되었고, FTIR 홀더 내로 적재되었으며, 50 부피%(탈이온수/아세트산) 기준의 차감에 의해 분석되었다. 대기 보상 스펙트럼(atmospheric compensation spectrum)이 원래의 FTIR 스펙트럼으로부터 차감되었고, 추가 분석을 위해 2차 도함수를 적용하였다. 각각의 FTIR 측정은 모든 샘플 반복 시료(every sample replicate)에 대해 3회 반복되었다(샘플당 평균 9회의 반복 실험). 기기의 감도는 5%인 것으로 검출되었다. 분리 대두 단백질의 고유 구조(native structure)가 초분자 집합체로 전환되는 것을 해석하기 위해, 단백질 2차 구조와 엄밀한 상관관계가 있는 아미드 I 중에서의 진동 변화를 추적하였다.

[0137] FTIR 측정 결과를 도 4에 나타내었다. 2차 도함수 분석으로부터 분명하게 알 수 있는 바와 같이, SPI 하이드로겔은 α-나선(1656 cm^{-1}) 분자간 평행 β-시트(1625 cm^{-1}) 2차 구조의 높은 함량을 갖는다.

[0138] 실시예 2

[0139] 하이드로겔은 젖산을 공용매로 사용하여 다음 공정에 따라 제조하였다.

[0140] 젖산은 다양한 비율(10 부피%, 30 부피%, 50 부피%, 70 부피% 및 90 부피%)로 탈이온수와 혼합되었다. 분리 대두 단백질은 100 mg/ml의 최종 단백질 농도에서 탈이온수/젖산 용액에 첨가되었다. 불용성 단백질의 분산액을 얻었다. 단백질의 가용화를 위해 혼합물을 30분 동안 초음파 처리에 노출시켰다(고주파 전력 출력=70W, 주파수=20KHz, 진폭=90%). 이 과정 동안, 샘플 온도는 85 ℃ 내지 90 ℃로 유지되었다. 30분 후, 완전히 반투명한 액체 용액이 얻어졌다. 샘플들을 실온에서 5분 동안 냉각되도록 두었다.

[0141] 겔 전기영동

[0142] 다양한 물:젖산 비율(0 내지 90 부피%)에서의 다양한 가수분해된 단백질 단편들의 분석이, MES 완충제를 갖는 NuPAGE 4 내지 12% 겔을 사용하여, 소듐 도데실 술페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 수행되었다.

[0143] 그 결과를 도 5에 나타내었으며, 젖산의 양이 증가할수록 단백질 가수분해도가 높아짐을 알 수 있다.

[0144] 안정한 하이드로겔이 본 발명의 방법을 사용하여 형성될 수 있다는 것을 확립한 후, 이러한 하이드로겔의 사용이, 마이크로겔 및 마이크로캡슐과 같은 불연속적(discrete)이고 균일한 현미경적인 물체를 형성하기 위한 마이크로유체 접근법에 적용되었다.

[0145] 실시예 3 - 마이크로겔 제조

[0146] 마이크로유체 장치(액적 생성기)가, 네거티브 마스터 포토레지스트(SU8 3050)와 함께 표준 소프트 리소그래피 기술을 사용하여, 제작되었다. 연속 오일 상(Fluorinert FC-40 중 2% 008-FluoroSurfactant)을 2 ml 튜브에 적재하였고, 한편, 분산된 액체 SPI 상(40 부피% 아세트산 중 85 mg/ml SPI, 85 ℃에서 유지)을 1.5 ml 튜브에 적재하였으며, 이를 85 ℃의 가열 블록 상에 빠르게 배치하였다. 마이크로유체 장치 내로의 이송 동안 SPI 용액의 겔화를 방지하기 위해, 1/32" ID 스테인리스 스틸 튜브를 포함하는 맞춤형 규소 히터(Holroyd Components)를 사용하여, SPI 저장소와 미세유체 장치의 입구를 연결하는 PTFE 튜브의 온도를 유지하였다. 규소 히터 온도는 맞춤형 온도 제어기로 제어되었다. 압력 구동 시스템(Elveflow OB1)에 의해 두 용액을 표준 흐름 집속 액적 생성기 내로 펌핑하여 ~100 μm 직경의 액적을 생성하였다. 마이크로액적의 단분산 집단이 균일하고 연속적으로

생성될 때까지 다양한 압력 정도(pressure rates)를 시험하였다. 최종 압력 정도는 분산된 수성 상의 경우 175 mbar이었고, 연속 오일 상의 경우 200 mbar이었다. 생성된 액적을 1 ml 피펫 팁에 수집하였고, 겔화 과정이 완료되는 것을 보장하기 위해 실온에서 12시간 동안 유지하였다. 그 다음, 형성된 마이크로겔을 표준 탈유화 절차에 의해 세척하였다: 불소계면활성제를 함유하는 연속 오일 상을 먼저 바이알로부터 제거하였다. 500 ul의 마이크로겔에 대해, Fluorinert FC-40 중의 10% PFO 용액의 동일한 부피를 첨가하고, 30초 동안 철저히 혼합하였다. 그 다음, Fluorinert FC-40 중의 10% PFO 용액을 제거하고, 동일한 부피의 순수 Fluorinert FC-40을 첨가하여, 두 번의 연이은 오일 세척을 수행하였다. 마지막으로, 500㎕의 탈이온수를 바이알에 첨가하여, 오일 상으로부터 수성 상으로 마이크로겔이 옮겨지도록 하였다. 마이크로겔 현탁액을 함유하는 상청액을 별도의 바이알로 옮겼다. HCl을 사용하여 pH=2로 조정된 탈이온수 500 ㎕를 마이크로겔 현탁액에 첨가한 다음, 1000 rpm에서 1 분 동안 원심분리함으로써, 마이크로겔 현탁액으로부터 아세트산을 제거하기 위해 후속된 일련의 세척 단계들을 수행하였다. 상청액을 제거하고, HCl로 pH=2로 조정된 탈이온수 500 ㎕를 첨가하여, 마이크로겔을 재현탁시켰다. 마이크로겔 현탁액으로부터 아세트산을 제거하기 위해 총 3번의 세척 단계를 수행하였다. 최종 세척 단계 후에 탈이온수(pH=2)에 현탁된 기계적으로 안정한 마이크로겔을 얻었다. SEM 분석을 위한 마이크로겔 샘플을 준비하기 위해, 마이크로겔을 다음과 같은 3단계 절차를 통해 100% 에탄올로 세척하였다: 마이크로겔을 먼저 25 부피% 에탄올 수용액에 현탁시키고 3시간 동안 일정한 교반(100 rpm) 하에 두었다. 원심분리 및 상청액 제거 후, 마이크로겔을 50 부피% 에탄올 수용액에 재현탁하고 3시간 동안 일정한 교반(100 rpm) 하에 두었다. 마지막으로 원심분리 및 상청액 제거 후 마이크로겔을 100 부피% 에탄올 수용액에 재현탁하고 12시간 동안 일정한 교반(100 rpm) 하에 두었다.

[0147] 이 실험의 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6a는 마이크로비드 형성의 개략도를 보여준다. 도 6b는 수용액(pH=2)에 현탁된 안정한 마이크로겔을 보여준다. 도 6d는 초임계점 건조에 의해 제조된 마이크로비드의 SEM 이미지를 나타낸다. 도 6e는 마이크로비드 표면의 겔 네트워크의 SEM 이미지를 보여준다.

[0148] 생성된 마이크로겔은, 산성 조건 및 100% 에탄올의 존재 하에서, 수용액 중에서 안정하였다. 자기조립(self-assembled)된 후, 단백질 응집체는 용액에 완전히 불용성이므로 마이크로겔의 안정성이 유지된다.

[0149] 이러한 결과는, 가교제 또는 유해 물질이 전혀 없는 상태에서, 나노 규모에서 단백질 응집체의 자기조립을 제어하기만 하면, 식물 기반 단백질로부터 기계적으로 견고한 마이크로겔을 생성할 수 있음을 실증한다.

[0150] 실시예 4 - 코어-쉘 마이크로캡슐 제조

[0151] 기계적으로 견고한 마이크로겔을 구축시킨 후, 마이크로캡슐화를 위한 하이드로겔의 사용이 탐구되었다.

[0152] 동축 흐름 집속 마이크로유체 장치(co-axial flow-focusing microfluidic device)의 제작을 위해 다단계 포토리소그래피 공정이 후속적으로 수행되었다. 이 포토리소그래피 공정은 문헌 『Tran, TM, Cater, S. & Abate, AR Coaxial flow focus in poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices. Biomicrofluidics 8, 1-7(2014)"』에 설명되어 있으나, 아래에서 간략하게 설명된다.

[0153] 두 개의 SU8 포토레지스트 마스터가 필요하였다. 제1 마스터에서, 내부 채널을 위한 25 ㎛ 포토레지스트 층이 제작된 다음, 중간 채널을 위한 50 ㎛ 층 및 외부 채널을 위한 75 ㎛ 층이 제작되었다. 제2 마스터는 중간 채널을 위한 25 ㎛ 층 및 외부 채널을 위한 50 ㎛ 층을 함유하였다. 최종 동축 흐름 집속 장치를 제작하기 위해, 두 개의 서로 다른 PDMS 슬래브들을 마스터로부터 박리한 다음, 정렬시키고, 플라즈마 산화에 의해 결합하였다. 마이크로유체 채널의 정렬을 가능하게 하기 위해 플라즈마 산화 후 두 개의 PDMS 슬래브들 사이에 소량의 분무된 물 액적을 배치하였다. 최종 정렬된 PDMS 장치는 두 층 사이의 결합을 완료하기 위해 밤새 65 ℃의 오븐에서 구워졌다.

[0154] 코어-쉘 마이크로캡슐을 생성하기 위한 마이크로유체 공정은, 마이크로비드를 생성하기 위해 실시예 3에서 사용된 것과 동일하였다. 그러나, 내부 상(inner phase)(코어)을 위한 추가 입구가 시스템에 추가되었다. 친유성 활성화제를 함유하는 코어-쉘 마이크로캡슐의 제조를 위해, 450 ㎕의 대두유를 550 ㎕ SPI 단백질 용액(20 mg/ml, 30 부피% 아세트산)에 미리 유화시켰다. 물 중 대두유 에멀젼(내부 상), SPI 용액(85 mg/ml, 40 부피% 아세트산, 중간 상), 및 FC-40(2 부피% 008-FluoroSurfactant, 외부 상)을, 압력 구동 시스템(Elveflow OB1)에 의해, 동축 흐름 집속 마이크로유체 장치까지 펌핑하였다. 직경이 ~120 ㎛인 코어-쉘 마이크로캡슐(내부 상 압력(100 mbar), 중간 상 압력(150 mbar) 및 외부 상 압력(100 mbar)의 단분산 집단이 균일하고 연속적으로 생성될 때까지 다양한 압력 정도를 시험하였다. 코어-쉘 비율은, 간단히 내부 상과 중간 상 사이의 상대 압력을 제어함으로써, 조정될 수 있다. 마이크로캡슐을 수집한 후, 이전 섹션에서 설명된 대로 세척하였다.

[0155] 알 수 있는 바와 같이, 내부 코어 재료는 이 실시예에서 쉘 재료와 분리되어 유지되며, 이는, 활성 성분이 사전에 매트릭스 재료와 혼합되는 표준적인 마이크로캡슐화 매트릭스 접근 방식과 다르다. 이 접근법의 사용 이유는, 초기에 존재하는 많은 양의 아세트산으로 인해 출발 단백질 용액의 pH가 매우 낮다는 점, 또한, 단백질 용액을 액체 상태로 유지하기 위해 높은 온도가 요구된다는 점 때문이었다. 그 대신에, 캡슐화된 성분의 안정성을 손상시키지 않으면서 코어-쉘 구조를 쉽게 생성할 수 있는 3D 동축 마이크로유체 장치가 사용되었다.

[0156] 마이크로유체 액적 생성기의 개략도를 도 7a에 나타내었으며, 이는 3D 흐름 집속 마이크로유체 장치를 보여준다. 수용액 중에 현탁된 친유성 코어를 함유하는 본 발명에 따라 제조된 코어-쉘 마이크로캡슐을 도 7b에 나타냈다. 마이크로캡슐 쉘은 자기조립된 SPI 단백질만을 포함하며, 코어는 수중유 마이크로에멀젼(친유성)이다.

[0157] 실시예 5 - 활성 작용제를 캡슐화하는 코어-쉘 마이크로캡슐 제조

[0158] 실시예 4에 기술된 마이크로유체 공정을 반복하여, 친수성 코어를 포함하는 마이크로캡슐을 생성하였다. 코어는 가용성 활성 성분(리보플라빈)의 현탁액을 함유하는 1 wt% HMP 펙틴 용액을 포함하였다.

[0159] 수용액에 현탁된 친수성 코어를 함유하는 본 발명에 따라 제조된 코어-쉘 마이크로캡슐을 도 8에 나타냈다. 마이크로캡슐 쉘은 자기조립된 SPI 단백질만을 포함하고, 코어는 활성 작용제(이 경우 리보플라빈)의 친수성 현탁액이다.

[0160] 실시예 6 - 제어 방출 마이크로캡슐

[0161] 단백질 쉘은 단백질 응집체로만 구성되기 때문에, 2단계 시험관내 소화율 시험를 통해, 소화 효소 존재하에서 단백질 쉘의 분해에 의해 적재물의 방출이 촉발될 수 있음을 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0162] 1 L의 탈이온수에, 0.257 g KCl, 0.061 g KH_2PO_4, 1.05 g $NaHCO_3$, 1.38 g NaCl, 0.122 g $MgCl_2(H_2O)_6$, 및 0.024 g $(NH_4)_2CO_3$를 용해시켜, SGF(simulated gastric fluid: 모사 위액) 전해질 용액의 1L 재고품 용액을 제조하였다. 1 L의 탈이온수에, 0.253 g KCl, 0.054 g KH_2PO_4, 3.57 g $NaHCO_3$, 1.12 g NaCl, 0.335 g $MgCl_2(H_2O)_6$, 0.44 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 및 0.23 g 담즙 추출물을 용해시켜, SIF(simulated intestinal fluid: 모사 장액) 전해질 용액의 1 L 재고품 용액을 제조하였다. SGF 전해질 용액에 펩신 8 mg을 용해시켜 SGF 1 ml를 제조하고, 소량의 1 M HCl을 첨가하여 pH를 pH=2로 조절하였다.

[0163] 실시예 4에 따라 제조된 50 μl의 코어-쉘 마이크로캡슐을, 실시예 4에 기재된 방법을 사용하여(pH=2의 탈이온수 150 μl를 첨가하였다), 오일 상으로부터 세척하였다. 그 다음, 200 μl의 SGF를 마이크로캡슐 현탁액과 혼합한 후 Thermo Shaker에서 37 ℃ 및 300 rpm에서, 60 분 동안 배양하였다. 모사된 장 단계(simulated intestinal phase)를 위해, 3 mg의 판크레아틴을 1 ml의 SIF 전해질 용액에 용해시켰다. 400 ㎕의 SIF를 SGF 용액 중의 앞의 마이크로캡슐에 첨가하였다. 소량의 1 M NaOH를 첨가하여 pH를 7로 조정하였다. 그 다음, 마이크로캡슐을 37 ℃에서 120 분 동안 배양하였다.

[0164] 그 실험 결과를 도 9에 나타냈으며, 도 9a는 수용액 중의 마이크로캡슐을 보여준다; 도 9b는 SGF 중에서 60 분 후에도 여전히 온전한 마이크로캡슐을 보여준다; 그리고, 도 9c는 SIF 중에서 120 분 후 마이크로캡슐의 방출을 보여준다.

[0165] 이 실험이 실증하는 바와 같이, SGF 조건(8 mg/ml 펩신, pH=2) 하에서의 배양은, 마이크로캡슐 내부에 남아 있는 친유성 코어의 안정성을 손상시키지 않으면서, 단백질 쉘의 느린 분해를 촉발하였다. SIF(1.5 mg/ml 판크레아틴, pH=7)에서의 후속 배양은 단백질 쉘의 상당한 분해 및 친유성 코어의 완전한 방출을 초래하였다. 효소가 없지만 동일한 pH 조건 하에서의 대조군 실험은, 단백질 쉘 분해가 주로 효소 소화에 의해 촉발됨을 나타냈다.

[0166] 따라서, 알 수 있는 바와 같이, 마이크로캡슐은 모사 위 조건하에서는 온전하게 남아있지만, 모사 장 조건하에서는 빠르게 분해되어, 본 발명에 따른 마이크로캡슐이 기능성 식품 또는 약물학적 활성 성분의 제어된 전달에 사용될 수 있음을 실증한다.

[0167] 실시예 7 - 활성 작용제를 포함하는 제어 방출 마이크로캡슐

[0168] 실시예 5에 따라 제조된 활성 작용제 리보플라빈을 함유하는 친수성 코어를 함유하는 마이크로캡슐을 사용하여 실시예 6의 실험을 반복하였다.

[0169] 리보플라빈 마이크로캡슐을 도 10a에 나타내었다(즉, 친수성 코어(1% HMP 펙틴 + 리보플라빈)를 갖는 마이크로

캡슐). 도 10b는 2단계 시험관내 소화율 연구 및 후속적인 HPLC 분석의 결과를 보여주는데, 이는 모사된 조건 하에서 리보플라빈의 누적 방출을 보여준다. 알 수 있는 바와 같이, 식물 기반 단백질 마이크로캡슐 쉘 내 친수성 활성 성분의 캡슐화에 의해 가능하게 된, 모사된 위 및 소장 조건 하에서의 리보플라빈의 제어 방출이 존재한다. 캡슐화는 리보플라빈의 빠른 확산을 방지하고 제어된 방출을 촉진하는 것으로 나타났다.

[0170] 실시예 8 - 마이크로규모 스펀지의 제조

[0171] 본 발명에 따라 대두 단백질 마이크로규모 스펀지를 제조하였다. 실시예 2에 기술된 바와 같은 마이크로유체 공정을 반복하여, 대두 단백질 마이크로겔(직경 100 μm)을 생성하였다. 마이크로겔을 다음과 같은 3단계 절차를 통해 100% 에탄올로 세척하였다: 마이크로겔을 먼저 25 부피% 에탄올 수용액에 현탁시키고 1시간 동안 일정한 교반(100 rpm) 하에 두었다. 원심분리 및 상청액 제거 후, 마이크로겔을 50 부피% 에탄올 수용액에 재현탁하고 1시간 동안 일정한 교반(100 rpm) 하에 두었다. 마지막으로, 원심분리 및 상청액 제거 후, 마이크로겔을 100 부피% 에탄올 수용액에 재현탁하고 1시간 동안 일정한 교반(100 rpm) 하에 두었다. 이 시점에서, 에탄올은 마이크로겔 다공성 네트워크 내의 물을 완전히 대체했을 것이다. 마이크로겔 현탁액을 원심분리(1000 rpm, 1분)하고 에탄올 상청액을 제거하였다. 그 다음, 250 μl의 제라늄 오일(천연)을 마이크로겔에 첨가하였다. 에펜도르프(Eppendorf) 바이알을 부드럽게 흔들어 마이크로겔을 오일 용액 중에 현탁시켰다. 이 단계에서, 에탄올과 혼화성인 오일 상이 마이크로겔 다공성 네트워크에 침투하였다. 오일-마이크로겔 현탁액에 500 μl의 탈이온수를 첨가한 후, 오일이 적재된 SPI 마이크로규모 스폰지를 수성 상 내로 옮겼다. 나머지 오일 상을 에펜도르프(Eppendorf) 튜브로부터 제거하였다.

[0172] 도 11a는 향유가 적재된 식물 기반 단백질 마이크로규모 스폰지의 분포를 보여준다. 도 11b는, 단백질 마이크로겔 쉘을 쉽게 관찰할 수 있는 더 높은 배율(20x)에서, 단일 방향제-적재 식물 기반 단백질 마이크로규모 스폰지를 보여준다.

[0173] 이 접근 방식을 사용하여, 물과 비혼화성인 용매를 향유와 같은 식물 기반 단백질 마이크로규모 스폰지 내로 적재할 수 있다. 이 방법은, 코어-쉘 아키텍처와 같은 복잡한 마이크로캡슐 생성 접근 방식이 사용될 필요 없이, 높은 적재 효율성을 가능하게 한다.

[0174] 실시예 9 - 필름의 제조

[0175] 본 발명에 따라 대두 단백질 필름을 제조하였다. 500 mg의 분리 대두 단백질을 5 mL의 30 부피% 아세트산에 용해시켰다(100 mg/ml 단백질 농도). 그 다음, 용액을 30분 동안 초음파 처리(고주파 전력 출력=70W, 주파수=20KHz, 진폭=90%)에 노출시켰다. 초음파 처리가 완료되기 몇 분 전에, SPI 용액에 글리세롤 125 mg을 첨가하고, 남은 시간 동안의 초음파 처리 단계를 통해 혼합하였다. 초음파 처리 단계 직후, 용액을 유리 페트리 접시에 캐스팅하여, 하이드로겔(두께 2 mm)을 형성하였다. 유리 페트리 접시는, 캐스팅 과정 동안 겔화되는 것을 방지하기 위해, 약 100℃로 가열되었다. 그 다음, 유리 접시를 가열판으로부터 제거하고 밤새 공기 건조하였다. 건조 후, 유리 페트리 접시로부터 박막 필름을 제거하고, 추가적으로 사용할 때까지 50% 습도 챔버에 보관하였다. 유리 페트리 접시의 바닥 표면은 필름이 쉽게 벗겨질 수 있도록 테프론 시트로 코팅되었다.

[0176] 생성된 필름과 함께 실시예 9에 따른 공정의 개략도를 도 12에 나타내었다. 기계적으로 견고한 투명 박막 필름이 생성됨을 알 수 있다.

[0177] 인장 특성

[0178] 실시예 9에서 생성된 박막 필름의 인장 특성은 첨가된 가소제의 양의 함수로서 시험되었다. 필름들은 10 wt%, 20 wt%, 30 wt%, 40 wt% 및 50 wt% 글리세롤을 사용하여 제조되었다.

[0179] 필름의 인장 특성은 10 N 로드 셀이 있는 Tinius Olson 5 kN을 사용하여 시험되었다. 필름을 5 mm 너비의 슬립(slips)이 되도록 자르고, 필름의 양쪽 끝을 1 mm의 틈새 길이를 갖는 종이 폴더로 접착하였다. 홀더와 필름을 기계식 시험기에 장착한 후, 측정 전에 종이 폴더를 잘라서, 확실하게 필름에만 하중이 가해지도록 하였다. 측정은 2 mm/min의 속도로 수행하였다. 필름 두께는 디지탈 캘리퍼스를 사용하여 개별 샘플에 대해 측정되었다. 전형적인 필름 두께는 30 ㎛ 내지 50 ㎛였다.

[0180] 본 발명의 필름들에 대한 응력-변형률 곡선을 도 13a에 나타내었다. 필름의 영률을 도 13a에 나타내었으며, 이로부터, 가소제의 양을 증가시키면 필름에 대한 영률이 감소함을 알 수 있다. 파단 신율을 도 13b에 나타냈으며, 가장 큰 신율은 30% 가소제에서 나타난다.

[0181] 이 접근법에 의해 얻은 필름의 기계적 성능은, 종래에 보고된 상업용 대두 단백질로 만든 필름의 기계적 성능보

다 훨씬 우수하다. 이는, 높은 농도의 카오트로픽 작용제(chaotropic agents)(즉, 8 M 요소)에서 모노머성 대두 단백질을 캐스팅하여 생성된 대두 단백질 필름에 통상적으로 존재하는 약한 분자간 상호작용과는 대조적인, 높은 수준의 분자간 상호작용 및 후속적 단백질 분자 자기 조립 때문이다.

[0182] 실시예 10 - 마이크로구조 및 나노구조 패터닝

[0183] 실시예 9에 따라 제조된 필름들을 하기 공정에 따라 마이크로 패터닝하였다.

[0184] 마이크로기둥(micropillars)과 같은 단백질 필름 상의 마이크로구조를 패터닝하기 위해, SU-8 3025를 포토레지스트로 사용하는 표준적인 포토리소그래피 기술을 통해, 20 μm x 20 μm 배열의 마이크로기둥들의 네거티브 패턴을 규소 웨이퍼 상에 제작하였다. 10:1 비율의 폴리디메틸실록산 엘라스토머 및 경화제(Sylgard 184, Dow Corning)의 혼합물을 웨이퍼에 붓고, 65 ℃에서 1 시간 동안 경화시켰다. 경화된 PDMS는 웨이퍼로부터 벗겨져, 대두 단백질 필름를 위한 네거티브 패턴으로 사용되었다. 실시예 9에서 제조된 대두 단백질 용액을 PDMS 상에 캐스팅하고 밤새 건조하였다. SPI 박막 필름은 PDMS 마스터로부터 벗겨졌고, 생성된 마이크로패턴 구조는, 백금의 10 nm 코팅이 적용된 주사 전자 현미경(SEM)(MIRA 3 FEG-SEM, TESCAN)을 사용하여, 관찰되었다. 필름의 접촉각은 FTA1000B(First Ten Angstroms)를 사용하여 측정되었다.

[0185] 초음파 처리된 대두 단백질 용액을, 마이크로패터닝된 기재 상에 간단히 캐스팅함으로써, 필름 표면 상에 마이크로기둥들의 균일한 배열을 제작할 수 있다. 마이크로패터닝된 필름의 접촉각은 99° 였으며, 이는, 마이크로패터닝되지 않은 표면을 갖는 대조군 필름 샘플에서 보다 훨씬 더 높다(도 14a). 이는, 연잎에 자연적으로 존재하는 것과 같은 마이크로기둥들을 식물 기반 단백질 필름 표면 상에 단순히 패터닝함으로써, 소수성 표면 특성을 크게 향상시킬 수 있음을 분명히 보여준다.

[0186] 광자 특성(photonic properties)을 갖는 나노구조화 단백질 필름을 생성하기 위해, DVD 디스크를 몰드 기재로서 사용하였다. 먼저, DVD 디스크로부터 외부 플라스틱 층을 조심스럽게 제거하고, 나머지 중간 층을 사용하였다. PDMS를 DVD 기재 상에 붓고, 65 ℃에서 1 시간 동안 경화시켰다. DVD 기재로부터 패터닝된 PDMS를 벗겨내고, PDMS 기재 상에, 실시예 9에서 제조된 필름-형성 대두 단백질 용액을 캐스팅하고, 실온에서 밤새 건조하였다. SPI 박막 필름이 PDMS 마스터로부터 벗겨졌고, 생성된 나노패턴 구조는, 백금의 10 nm 코팅이 적용된 주사 전자 현미경(SEM)(MIRA 3 FEG-SEM, TESCAN)을 사용하여, 관찰되었다. 필름의 광자 특성(Mie 산란)을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있었다(도 14b).

[0187] 실시예 11- 코팅의 제조

[0188] 식물 기반 단백질 필름의 코팅 특성을 시험하기 위해, 작은 판지 조각(2 x 2 cm)을, 가소제 없이, 실시예 9에서 제조한 필름 형성 SPI 용액에 담갔다. 판지를 필름 형성 용액에 약 5초 동안 담근 후, 판지를 용액으로부터 꺼내어, 밤새 실온에서 공기 건조하였다. 완전히 건조된 후, 단백질 코팅된 판지를 10 mL의 탈이온수에 담그어 판지의 수분 흡수량을 측정하였다. 수분 흡수량은, 다양한 시간 간격으로 탈이온수에 담글 때, 판지의 중량 증가를 측정하여 계산되었다.

[0189] 대조군 시료로서 코팅되지 않은 판지 조각과, 대두 단백질 모노머가 코팅된 판지(알칼리성 조건(pH=9)에서 제조된 대두 단백질 용액에 판지를 담그어 제조)를 시험하였다. 수분 흡수량은 판지 샘플을 물에 담그기 전에 측정된 초기 중량으로 정규화되었다.

[0190] 도 15에서 볼 수 있듯이, 코팅되지 않은 판지 대조군 샘플은 물에 10초 동안 담근 후 매우 높은 수분 흡수율을 나타낸다. SPI 코팅 판지의 수분 흡수량은, 코팅되지 않은 대조군 샘플 또는 알칼리 조건에서 제조된 대두 단백질 용액으로 코팅된 판지 샘플(이 역시 매우 낮은 내수성을 나타냈음)과 비교하여, 거의 50% 감소했다. 이러한 결과는, 고도의 분자간 상호작용으로 단백질로부터 조립된 식물 기반 단백질 필름으로부터 생성된 코팅이 향상된 수분 장벽 특성을 나타낸다는 것을 강조한다.

[0191] 실시예 12 - 경질 캡슐(hard capsule) 제조

[0192] 본 발명에 따라 대두 단백질 경질 캡슐을 제조하였다. 100 mg/ml SPI 용액을 먼저, 5 g의 SPI를 아세트산(40 부피%)을 함유하는 50 ml의 수용액에 용해시켜, 제조하였다. 단백질 분산액을 95 ℃에서 30분 동안 가열한 다음, 초음파 처리에 5분 동안 노출시켰다(고주파 전력 출력=70W, 주파수=20KHz, 진폭=90%). 겔화를 방지하기 위해 용액을 85 ℃로 유지하였다. 2 ml 에펜도르프(Eppendorf)튜브를 가열된 용액에 담근 후, 5초 동안 액체 용액 내에서 유지한 다음, 꺼내었다. 액체 SPI 용액으로부터 꺼낸 후 몇 초 이내에, 2 ml 에펜도르프(Eppendorf) 튜브의 외부 표면 주위에, SPI 하이드로겔의 얇은 층이 형성되었다(도 16a). 그 다음, 하이드로겔 층 내의 물/아세트산

용매 분획의 증발을 보장하기 위해, 바이알을 45 ℃의 오븐에 1시간 동안 둠으로써, 3차원 박막 필름을 생성시켰다. 용매를 증발시킨 후 에펜도르프(Eppendorf) 튜브로부터 경질 캡슐을 꺼내었다(도 16b).

[0193] 이는, 식물 기반 단백질로부터 제조된 경질 캡슐의 형성을 보여주는 최초의 예이다. 이 공정은 이러한 식물 기반 재료의 열가역적 특성으로 인해서만 가능한데, 그러한 열가역적 특성은 기재 상에 얇은 3차원 하이드로겔을 형성시키는 것을 가능하게 한다.

[0194] 의심의 여지 없이, 통상의 기술자에게는 다른 많은 효과적인 대안이 생길 것이다. 본 발명은 설명된 구현예들로 제한되지 않고, 본 명세서에 첨부된 특허청구범위의 사상 및 범위 내에 있는 통상의 기술자에게 자명한 변형을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0195] **참고문헌**

[0196] 1. Ahnert, S. E., Marsh, J. A., Hernández, H., Robinson, C. V. & Teichmann, S. A. Principles of assembly reveal a periodic table of protein complexes. *Science (80-.).* **350,** (2015).

[0197] 2. Mezzenga, R. & Fischer, P. The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions. *Reports Prog. Phys.* **76,** (2013).

[0198] 3. Knowles, T. P. J. & Mezzenga, R. Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials. *Adv. Mater.* 6546-6561 (2016). doi:10.1002/adma.201505961

[0199] 4. Shimanovich, U. *et al.* Protein Microgels from Amyloid Fibril Networks. *ACS Nano* **9,** 43-51 (2014).

[0200] 5. Zhou, X. M. *et al.* Enzymatically Active Microgels from Self-Assembling Protein Nanofibrils for Microflow Chemistry. *ACS Nano* **9,** 5772-5781 (2015).

[0201] 6. Shen, Y. *et al.* Amyloid fibril systems reduce, stabilize and deliver bioavailable nanosized iron. *Nat. Nanotechnol.* **12,** 642-647 (2017).

[0202] 7. NystrÖm, G., Fong, W. K. & Mezzenga, R. Ice-Templated and Cross-Linked Amyloid Fibril Aerogel Scaffolds for Cell Growth. *Biomacromolecules* **18,** 2858-2865 (2017).

[0203] 8. Amagliani, L. & Schmitt, C. Globular plant protein aggregates for stabilization of food foams and emulsions. *Trends Food Sci. Technol.* **67,** 248-259 (2017).

[0204] 9. Munialo, C. D., Martin, A. H., Van Der Linden, E. & De Jongh, H. H. J. Fibril formation from pea protein and subsequent gel formation. *J. Agric. Food Chem.* **62,** 2418-2427 (2014).

[0205] 10. Munialo, C. D., van der Linden, E. & de Jongh, H. H. J. The ability to store energy in pea protein gels is set by network dimensions smaller than 50nm. *Food Res. Int.* **64,** 482-491 (2014).

[0206] 11. Lee, K. H., Ryu, H. S. & Rhee, K. C. Protein solubility characteristics of commercial soy protein products. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **80,** 85-90 (2003).

[0207] 12. Lee, H. *et al.* Soy protein nano-aggregates with improved functional properties prepared by sequential pH treatment and ultrasonication. *Food Hydrocoll.* **55,** 200-209 (2016).

[0208] 13. Jiang, S. *et al.* Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrason. Sonochem.* **38,** 835-842 (2017).

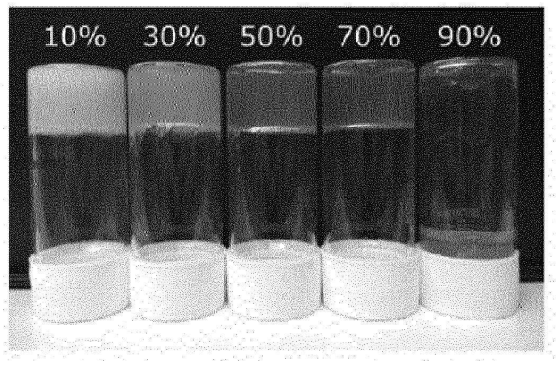
[0209] 14. Mason, T. O. *et al.* Expanding the solvent chemical space for self-assembly of dipeptide nanostructures. *ACS Nano* **8,** 1243-1253 (2014).

[0210] 15. Li, Y. *et al.* Understanding the dissolution of α-zein in aqueous ethanol and acetic acid solutions. *J. Phys. Chem. B* **116,** 12057-12064 (2012).

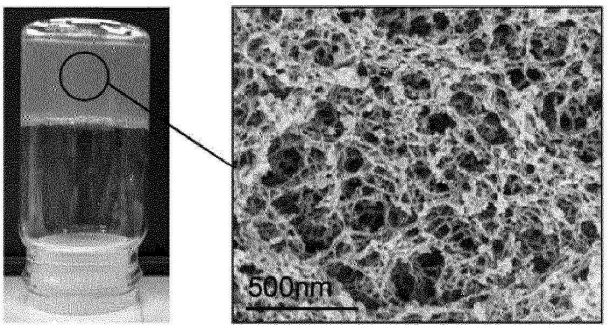
[0211] 16. Akkermans, C. *et al.* Micrometer-sized fibrillar protein aggregates from soy glycinin and soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* **55,** 9877-9882 (2007).

도면

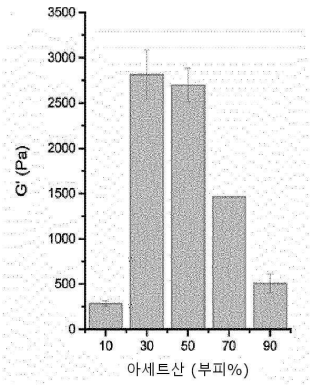
도면1



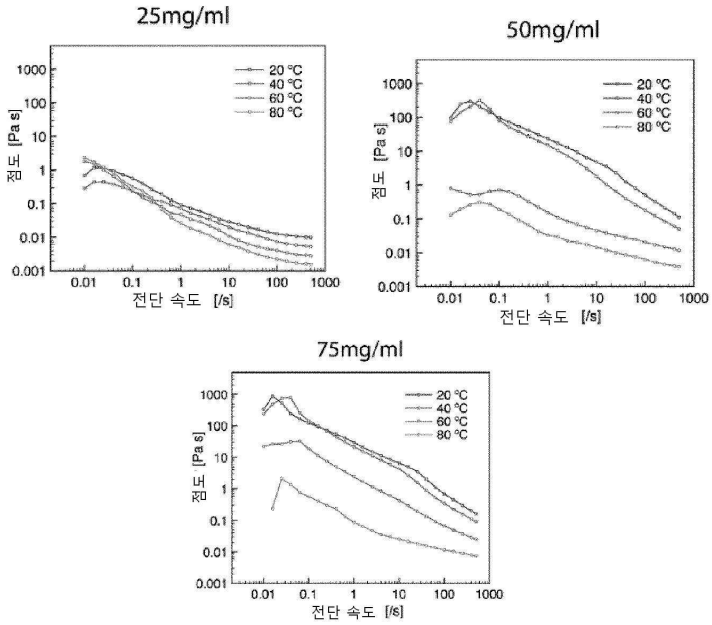
도면2



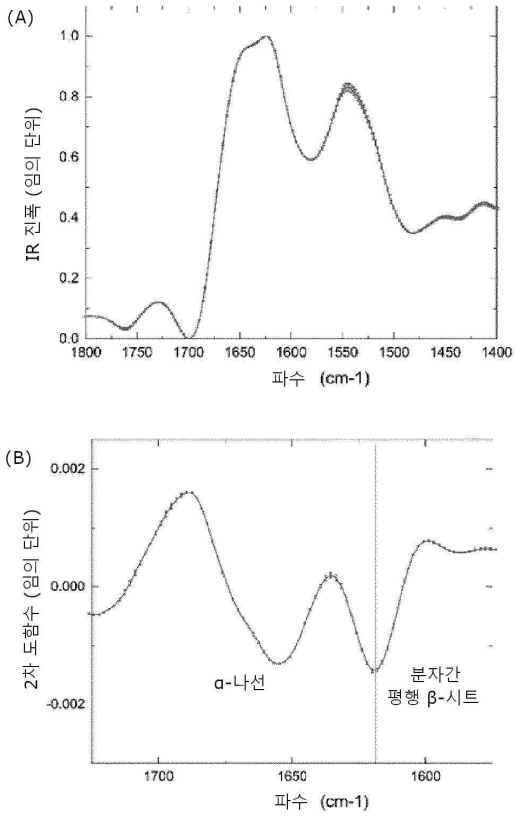
도면3a



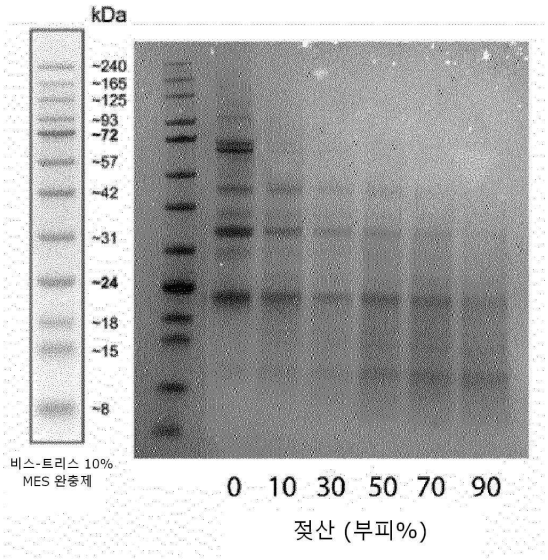
도면3b


25mg/ml
50mg/ml
75mg/ml
20 ℃
40 ℃
60 ℃
80 ℃
점도 [Pa s]
전단 속도 [/s]

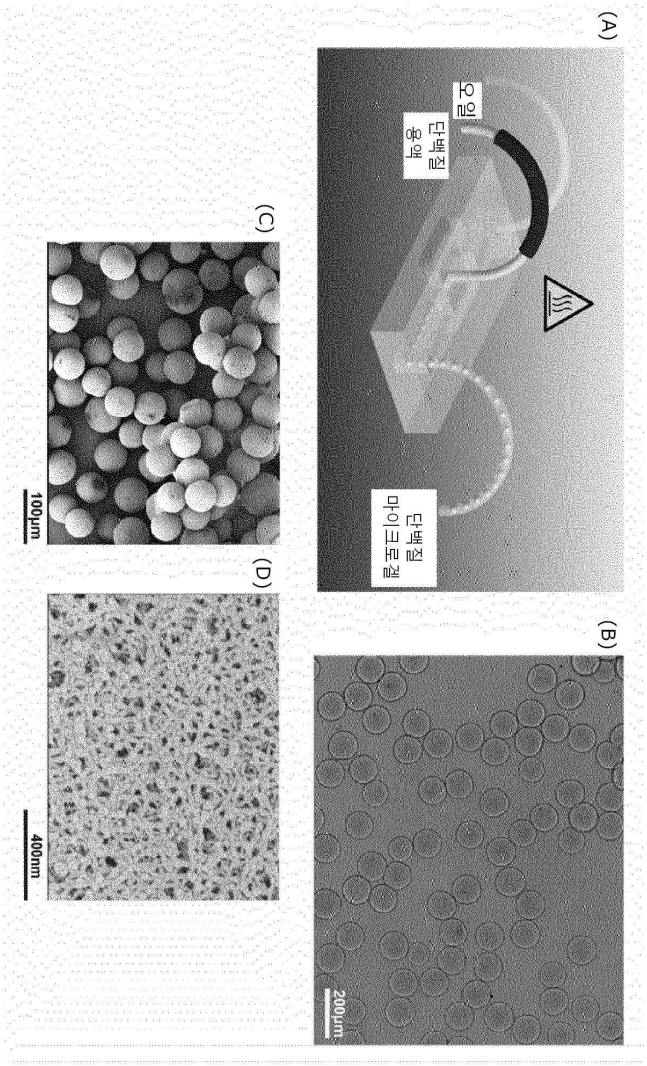
도면4


(A)
IR 진폭 (임의 단위)
파수 (cm-1)
(B)
2차 도함수 (임의 단위)
α-나선
분자간
평행 β-시트
파수 (cm-1)

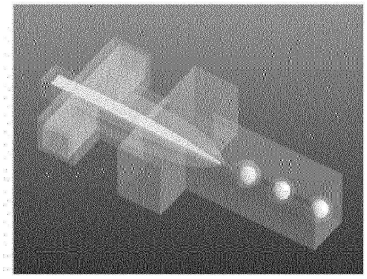
도면5


kDa
~240
~165
~125
~93
~72
~57
~42
~31
~24
~18
~15
~8
비스-트리스 10%
MES 완충제
0 10 30 50 70 90
젖산 (부피%)

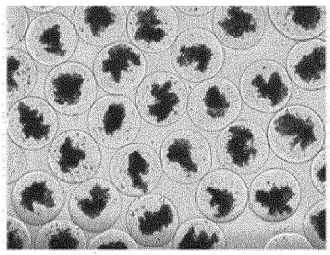
도면6


(A)
금
녹황색 다발형 콜로니
마이크로 다발형 콜로니
(B)
200μm
(C)
100μm
(D)
400nm

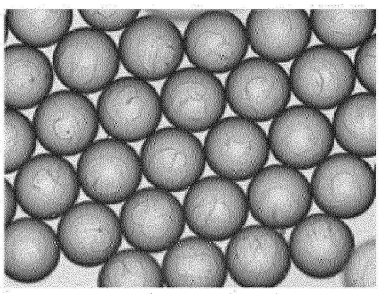
도면7a



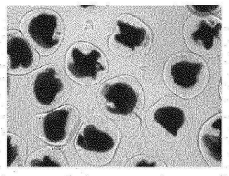
도면7b



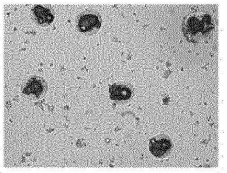
도면8



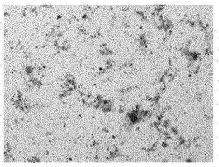
도면9a



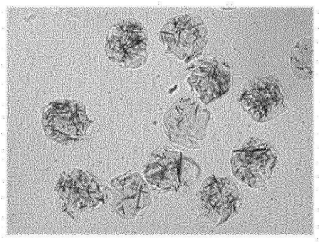
도면9b



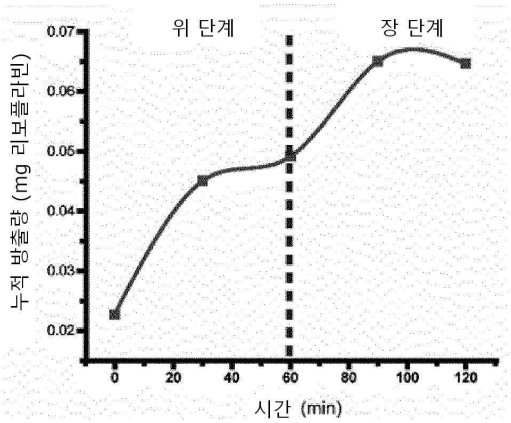
도면9c



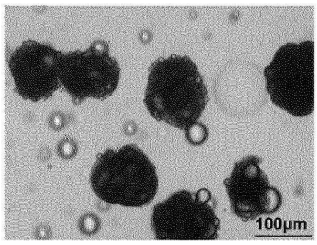
도면10a



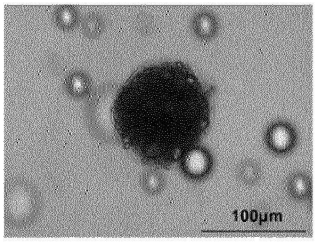
도면10b



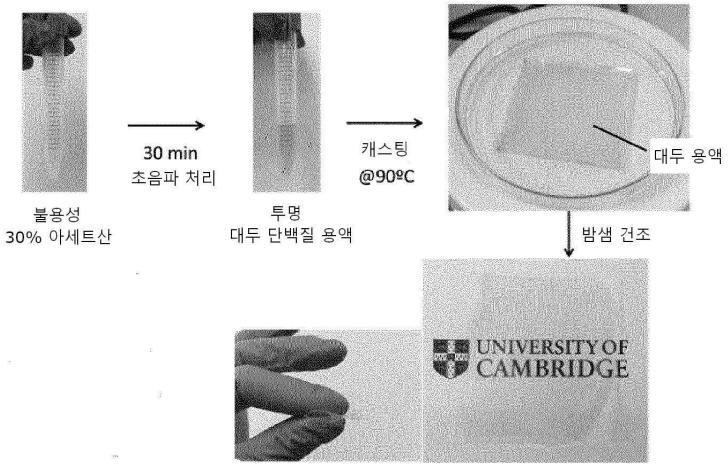
도면11a



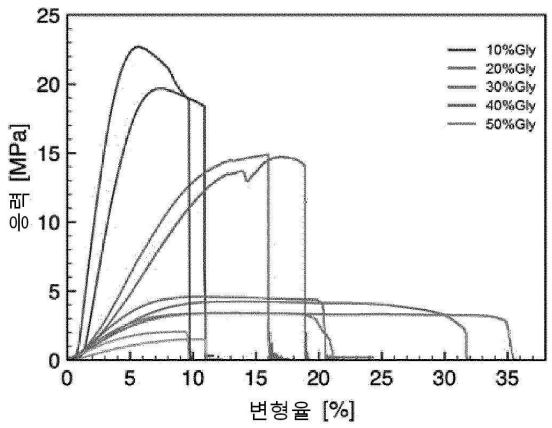
도면11b



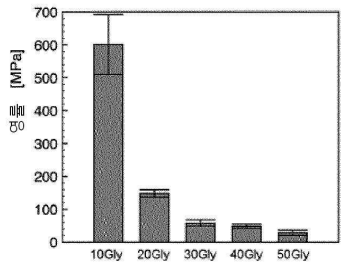
도면12



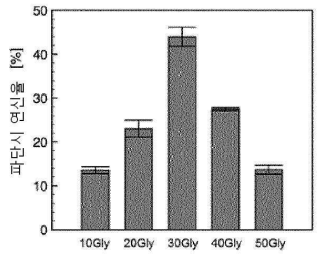
도면13a



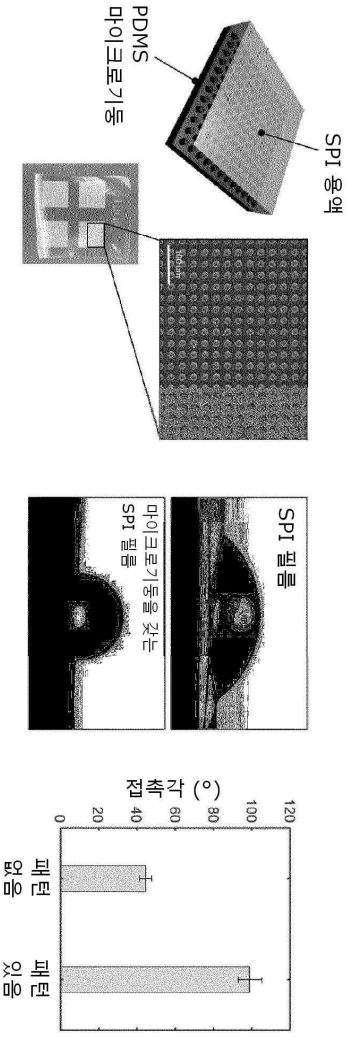
도면13b



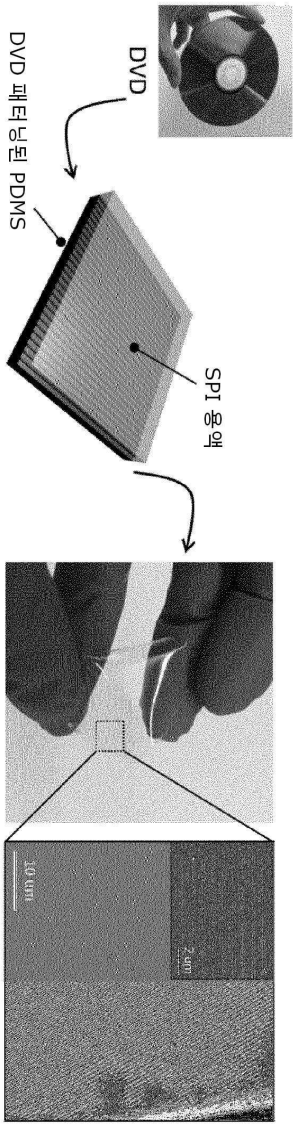
도면13c


파단시 연신율 [%]
50
40
30
20
10
0
10Gly
20Gly
30Gly
40Gly
50Gly

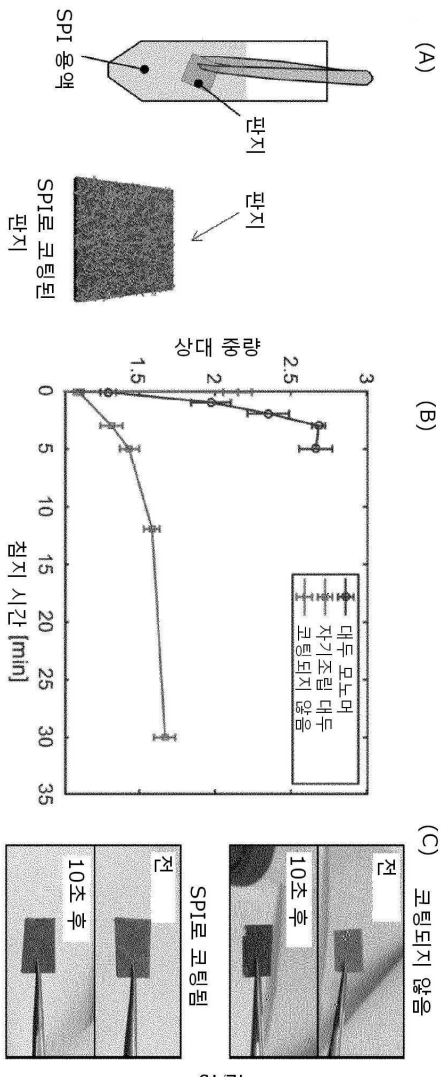
도면14a


PDMS
마이크로기둥
SPI 용액
마이크로기둥을 잡는
SPI 필름
SPI 필름
접촉각 (°)
0
20
40
60
80
100
120
없음
있음

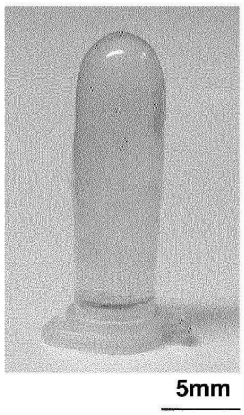
도면14b



도면15


(A)
SPI 용액
팔지
팔지
SPI로 코팅된
팔지
(B)
상대 중량
1.5
2
2.5
3
0
5
10
15
20
25
30
35
첨지 시간 [min]
대두 모노머
자기 조립 대두
코팅되지 않음
(C)
코팅되지 않음
전
10초 후
SPI로 코팅됨
전
10초 후

도면16a


5mm

도면16b

