(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0084266
(43) 공개일자 2009년08월05일

(51) Int. Cl.
A61K 9/48 (2006.01) *A61K 36/8968* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0010329
(22) 출원일자 2008년01월31일
심사청구일자 2008년01월31일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울 광진구 군자동 98 세종대학교
주식회사 미슬바이오텍
경북 포항시 북구 흥해읍 남송리 3 한동대학교 창업보육센타
(72) 발명자
곽해수
서울 강동구 둔촌동 현대2차아파트 101동 601호
김남철
충남 서산시 동문동 371-122번지 예담아파트 D동 202호
(74) 대리인
황이남

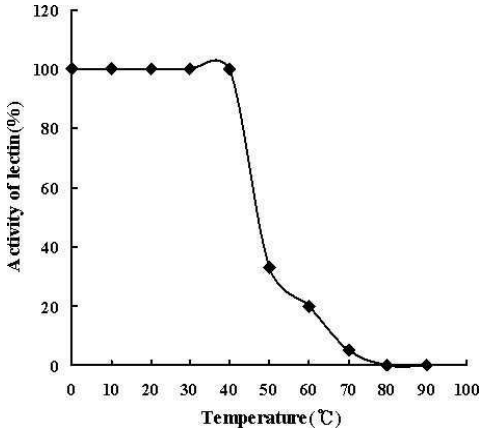
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 한국산 겨우살이 추출물을 함유하는 미세캡슐 및 그제조방법

(57) 요 약

한국산 겨우살이 추출물을 함유하는 미세캡슐 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*) 추출물을 중심물질로 하고, 중심물질을 피막하는 코팅물질로 캡슐화한 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐 및 그 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*) 추출물을 중심물질로 하고, 중심물질을 피막하는 코팅물질로 캡슐화한 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐.

청구항 2

제 1항에 있어서, 중심물질은 인삼추출물, 홍삼추출물, 녹차추출물 및 버섯추출물 중에서 선택된 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 미세캡슐.

청구항 3

제 1항에 있어서, 코팅물질은 중심물질의 중량을 기준으로 하여 10~15배의 폴리글리세롤 모노스테아레이트(PGMS) 또는 중간-사슬 트리글리세리드(MCT) 임을 특징으로 미세캡슐.

청구항 4

제 1항에 있어서, 한국산 겨우살이 추출물은 캡슐 중량을 기준으로 5~7 중량% 임을 특징으로 하는 미세캡슐.

청구항 5

제 1항에 있어서, 미세캡슐은 지름이 15~40㎛ 임을 특징으로 하는 미세캡슐.

청구항 6

한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*) 추출물이 함유된 미세캡슐의 제조에 있어서,

(1)한국산 겨우살이 추출물을 코팅물질 용액에 첨가하는 단계와,

(2)코팅물질과 한국산 겨우살이 추출물이 혼합된 용액을 교반한 후 계면활성제를 함유한 수용액 형태의 분산액에 분무하는 단계와,

(3)코팅물질과 한국산 겨우살이 추출물이 분무된 유화제를 원심분리하여 캡슐화된 부분과 캡슐화 되지 않는 부분으로 분리하는 단계와,

(4)전기의 (3)단계에 의해 캡슐화된 부분을 (2)단계의 유화제에 분무하고 원심분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*) 추출물이 함유된 미세캡슐의 제조방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 폴리글리세롤 모노스테아레이트 또는 중간-사슬 트리글리세리드의 코팅물질과 겨우살이 추출물을 10:1~15:1(w/w)로 첨가하는 특징으로 하는 미세캡슐의 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 폴리글리세롤 모노스테아레이트 코팅물질은 폴리글리세롤 모노스테아레이트에 증류수를 1:3~1:6(w/v)으로 첨가한 용액인 것을 특징으로 하는 미세캡슐의 제조방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 한국산 겨우살이 추출물을 함유하는 미세캡슐 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*) 추출물을 중심물질로 하고, 중심물질을 피막하는 코팅물질로 캡슐화한 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 겨우살이(mistletoe)는 유럽과 동양에서 오랜 세월 동안 고혈압, 당뇨, 류마티즘, 종양 등을 치유하기 위해 민간요법으로 사용 되어져 왔으며, 유럽에서는 건강과 축복을 가져다주는 신비의 식물로 추앙 받고 있다. 겨우살이는 한국을 비롯하여 일본, 중국, 아프리카, 유럽 등지에 분포하며 열매의 색에 따라 종이 분류된다. 세계 전역에는 30속 1,500종의 식물이 있는 것으로 알려져 있고, 독일을 중심으로 한 유럽 지역에서뿐만 아니라 우리나라에서도 오래 전부터 여러 가지 질병에 대한 민간 약재로 사용 되어 왔다. 한국산 겨우살이(Korean mistletoe)는 상록성 관목으로 3속 4종이 서식하는 것으로 알려졌으며, 주로 참나무류, 버드나무, 팽나무, 밤나무, 물오리나무, 자작나무 등에 붙어사는 *Loranthaceae*(겨우살이과)에 속하는 기생식물로서 황록색 줄기와 잎으로 Y자를 만들며 엉켜 자란다.

<3> 여러 종류의 겨우살이 중에서 민간 약재로 사용되었던 것은 주로 Viscum속의 식물로서 유럽지역에 서식하는 것은 *Viscum album loranthacea*이며, 한국 지역에서 서식하는 것은 *Viscum album coloratum*으로서 분류학상 그 차별성이 인정되고 있다(Khwaja TA 등, 1986, Oncology 43 Suppl 1:42-50; Khawaja T.A. 등, 1980. Experimentia, 36: 599-600) 유럽지역에 서식하는 겨우살이는 체액성 및 세포성 면역체계를 자극하는 면역 증강 효과가 있는 것이 인정되었고, 동물 및 인간에 대한 임상 실험 결과, 종양세포에 대하여 직·간접적으로 대응하는 대식세포 및 자연 살해 세포의 활성을 증가시킴으로써 종양세포의 성장을 억제하고, 암환자의 생존율을 증진시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다. 겨우살이의 이러한 항암효과는 겨우살이의 면역 증강 작용뿐만 아니라, 종양세포에 대한 직접적인 세포독성 효과도 관여하는 것으로 알려져 있으며, 대표적인 활성물질인 렉틴(lectin) 성분에 주목하여 이들의 특이성 및 이에 따른 면역학적, 생화학적 연구가 진행되었다.

<4> 겨우살이에는 여러 종류의 아미노산으로 구성된 염기성 단백 복합물질(basic protein complex)들이 존재하며, 세포독성 및 면역증강효과를 나타내는데 역할을 하는 활성물질들로는 분자량 60kD 정도의 히스톤(histon) 모양을 갖는 렉틴(lectin)과 5kD 정도의 분자량을 지니는 폴리펩티드(polypeptide)인 비스코토신(viscotoxin) 그리고 당류인 폴리사카라이드(polysaccharide)와 올리고사카라이드(oligosaccharide) 및 알카로이드(alkaloid) 등이 제시되었으며, 그밖에 티라민(tyramine), 이노시톨(inositol), 히스타민(histamine), 콜린(choline)과 몇 가지 스테롤(sterol) 및 올레노익 에시드(olenoleic acid)가 존재하는 것으로 알려져 있다. 항암인자인 렉틴(lectin)의 연구결과 한국산이 유럽산에 비해 우수하거나 유사한 효능을 보였다(Park 등, 1999, Food Sci, Biotechnol., 8(4), 232-237; Lyu, S.Y. 등, 2000, Arch. Pharm, Res. 23(6), 592-598).

<5> 렉틴에 대한 연구는 1888년 Stillmark에 의해 피마자(*Ricinuscommunis*)의 추출물이 적혈구를 응집시킨다는 사실을 발견한 것이 렉틴 역사의 시작으로 볼 수 있다. 적혈구 및 다양한 세포를 응집시키는 능력을 가진 단백질에 대해 처음에는 phytohemagglutinin 또는 phytoagglutinin이라 불렀으나, 식물 이외에 여러 생물에서 다양하게 발견되므로 Boyd와 Shapleigh는 이러한 물질이 적혈구뿐만 아니라 림프구, 피브로블라스트(fibroblasts), 스펌아토조아(spermatozoa), 박테리아(bacteria), 곰팡이(fungi) 등의 세포도 응집시킬 수 있다는 특이성을 발견하였고, 이를 근거로 하여 라틴어 legere(to pick or to choose)로부터 유래된 lectin이란 용어로 명명하였으며, Goldstein 등은 이 lectin이 당단백질임을 밝혔다.

<6> 겨우살이 추출물 및 렉틴을 혈관 및 피하 투여에 비해 경구투여 시 그 효과가 극명하게 저하되는 것으로 보고되고 있으며, 이는 경구로 섭취했을 때 강산인 위액에 의해 그 활성도가 크게 감소되기 때문으로 밝혀지고 있다. 또한 가공할 때 온도와 pH에 의해 주성분인 렉틴이 불안정하고 파괴되며, 이 추출물은 점도가 높고, 이취와 색깔이 있기 때문에 이러한 문제를 해결하기 위해서 캡슐화가 필요하다.

<7> 캡슐화(encapsulation) 기술은 고체, 액체, 기체상의 물질을 특정 조건하에서 조절된 속도로 내용물을 방출할 수 있도록 어떤 물질이나 조직 내부에 포장하는 기술이다. 특히 미세캡슐화(micro-encapsulation)는 마이크로사이즈(microsize)로 포장하는 기술로 직경이 수 ㎛에서 수 ㎜로 다양하다.

<8> 미세캡슐화를 하는 목적은 액상의 활성물질을 고체처럼 행동하게 하여 상호 반응성이 있는 물질들을 격리시키거나 외부환경으로부터 격리시키고자 하는데 있다. 또한 물질의 표면특성을 변화시켜 활성물질의 방출을 조절함으로써 향미 및 영양성분들을 보호하여 최종제품의 품질을 향상시키는데 있다.

<9> 미세캡슐화 기술은 향료, 영양성분 등의 불안정한 물질을 빛, 산소, 수분, 온도 등의 외부요인으로부터 보호하여 손실을 줄이고 나아가 식품산업에서 식품 첨가물 또는 식품유용물질을 캡슐화함으로써 식품소재의 산화방지 및 보존성 향상, 변화하기 쉬운 식품소재의 방출 속도 조절, 제조 공정의 개선 및 물성 향상 등의 장점을 지니고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<10> 본 발명의 목적은 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*) 추출물을 중심물질로 하고, 중심물질을 피막하는 코팅물질로 캡슐화한 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐을 제공하는데 있다.

<11> 또한, 본 발명은 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<12> 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*) 추출물을 중심물질로 하고, 중심물질을 피막하는 코팅물질로 캡슐화한 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐을 제공한다.

<13> 또한, 본 발명은 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐의 제조방법을 제공한다.

효 과

<14> 본 발명은 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*) 추출물을 중심물질로 하고, 중심물질을 피막하는 코팅물질로 캡슐화한 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐을 제공함으로써, 항암 및 면역 증강 효과가 우수한 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐의 섭취를 용이하게 할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<15> 본 발명은 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*) 추출물을 중심물질로 하고, 중심물질을 피막하는 코팅물질로 캡슐화한 한국산 겨우살이 추출물을 함유하는 미세캡슐을 제공한다.

<16> 상기에서 중심물질은 인삼추출물, 홍삼추출물, 녹차추출물 및 버섯추출물 중에서 선택된 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것이 바람직하다.

<17> 상기에서 버섯추출물은 영지버섯, 차가버섯, 꽃송이버섯, 목이버섯, 송이버섯, 상황버섯 및 느타리버섯 중에서 선택된 어느 하나 이상의 버섯추출물을 포함하는 것이 바람직하다.

<18> 상기 중심물질은 겨우살이 추출물대 인삼추출물, 홍삼추출물, 녹차추출물 및 버섯추출물 중에서 선택된 어느 하나 이상을 5:1~1:1(w/w)로 포함하는 것이 바람직하다.

<19> 겨우살이 추출물은 겨우살이 잎, 줄기 및 열매 중에서 선택된 어느 하나 이상을 100g당 증류수 500~1000㎖를 첨가하고, 믹서기로 분쇄하여 1~10℃에서, 바람직하게는 4℃에서 16~20시간 동안 교반하여 추출하는 것이 바람직하다.

<20> 상기 추출액을 원심분리 한 후, 상등액을 여과한 후, 여과액을 동결 건조하여 갈색의 겨우살이 분말을 얻을 수 있다.

<21> 또한, 인삼추출물, 홍삼추출물, 녹차추출물 및 버섯추출물은 각각의 인삼, 홍삼, 녹차, 버섯을 100g 당 증류수 0.5~2.0ℓ를 첨가하여 70~80℃에서 열수 추출하는 것이 바람직하다. 상기 추출액을 원심분리한 후, 상등액을 여과한 후, 여과액을 동결 건조하여 사용하는 것이 바람직하다.

<22> 미세캡슐의 코팅물질은 중심물질의 중량을 기준으로 하여 10~15배의 폴리글리세롤 모노스테아레이트(PGMS) 또는 중간-사슬 트리글리세리드(MCT)을 사용하는 것이 바람직하다.

<23> 미세캡슐은 캡슐중량을 기준으로 겨우살이 추출물을 5~7중량%를 포함하는 것이 바람직하다.

<24> 본 발명에서 겨우살이 추출물의 미세캡슐화 수율은 52~75%인 것이 바람직하다.

<25> 상기에서, 미세캡슐의 지름은 15~40㎛인 것이 바람직하다.

<26> 본 발명의 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐의 제조는 (1)한국산 겨우살이 추출물을 코팅물질 용액에 첨가하는 단계와, (2)코팅물질과 한국산 겨우살이 추출물이 혼합된 용액을 교반한 후 계면활성제를 함유한 수용액 형태의 분산액에 분무하는 단계와, (3)코팅물질과 한국산 겨우살이 추출물이 분무된 유화제를 원심분리하여 캡슐화된 부분과 캡슐화 되지 않는 부분으로 분리하는 단계와, (4)전기의 (3)단계에 의해 캡슐화된 부분을 (2)단계의 유화제에 분무하고 원심분리하는 단계를 통하여 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐을 제조할 수 있다.

<27> 상기 한국산 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐의 제조에서, 폴리글리세롤 모노스테아레이트 또는 중간-사슬 트리글리세리드(MCT)의 코팅물질과 겨우살이 추출물을 10:1~15:1(w/w)로 첨가하는 것이 바람직하다.

<28> 상기에서, 폴리글리세롤 모노스테아레이트 코팅물질은 폴리글리세롤 모노스테아레이트에 증류수를 1:3~1:6(w/v)으로 첨가한 용액으로 사용할 수 있다.

<29> 본 발명에서 코팅물질로 사용하는 중간-사슬 트리글리세리드(MCT)은 상온에서 액체상태로 존재하여 바로 겨우살이 추출물을 첨가할 수 있지만, 폴리글리세롤 모노스테아레이트는 상온에서 고체이므로, 이를 코팅물질로 사용하는 경우 위에서 언급한 것처럼 폴리글리세롤 모노스테아레이트를 먼저 증류수에 용해시킨 후 겨우살이 추출물을 첨가하는 것이 바람직하다.

<30> 코팅물질과 겨우살이 추출물이 혼합된 용액은 분무하기에 적당하도록 소정의 교반조건, 바람직하게는 1200~2000rpm의 속도로 5분 이내, 바람직하게는 1~5분 동안 교반한다. 교반이 끝나면 코팅물질과 겨우살이 추출물이 혼합된 용액은 분무기를 이용하여 저온의 계면활성제를 함유한 수용액에 분무한다.

<31> 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 겨우살이 추출물의 렉틴의 활성이 40℃까지는 100% 유지되었고, 50℃에서는 33%로 급격히 감소되는 결과를 나타냈으며, 60℃에서는 20%, 70℃에서는 5%로 감소하다가 80℃ 이상의 온도에서는 활성이 완전히 없어졌다.

<32> 따라서 본 발명은 기존의 스프레이 건(spray gun)을 이용한 미세캡슐의 제조에서 코팅물질로 폴리글리세롤 모노스테아레이트를 사용할 경우, 분사 시 온도를 50℃ 내외로 가온 하던 방식에서 40~30℃의 온도에서 제조하는 것이 바람직하다.

<33> 계면활성제는 식품등급의 계면활성제를 이용할 수 있으며, 본 발명에서는 이러한 계면활성제의 일예로서 tween-60을 사용하여 겨우살이 추출물을 코팅하고 있는 코팅물질을 잘 분산시켜 치밀한 구조를 가지는 겨우살이 추출물을 함유한 미세캡슐을 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에서 사용하는 계면활성제를 포함하는 분산액은 계면활성제의 농도를 0.05~1.0%로 조절하여 사용하며, 겨우살이 추출물을 함유하는 미세캡슐의 제조를 위해 분산액의 온도는 5℃ 이하, 보다 좋게는 0~5℃로 유지하는 것이 바람직하다.

<34> 코팅물질과 겨우살이 추출물이 혼합된 용액을 계면활성제를 함유한 수용액 형태의 분산액에 분무하면 분산액 내에서 수용성 겨우살이 추출물이 코팅물질에 의해 코팅되어 미세캡슐화 된다. 그 이후 분산액을 원심분리하여 캡슐화 된 부분과 캡슐화 되지 않는 부분으로 분리하면 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐을 얻을 수 있다. 그리고 미세캡슐화 된 부분을 위에서 언급한 계면활성제를 함유한 분산액에 분무하고, 재차 원심분리 함으로써 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐을 얻을 수 있다.

<35> 본 발명의 겨우살이 추출물이 함유된 미세캡슐은 인공위액 내에서의 안정성이 우수하여 낮은 pH와 펩신(pepsine) 등의 소화효소에 의한 작용을 받지 않으며, 캡슐화된 겨우살이 추출물은 안정하게 소장으로 유입 가능할 것이다. 겨우살이 추출물을 함유한 미세캡슐이 장관 내에서 30분 이상 머물게 될 경우에는 대부분의 미세캡슐로부터 겨우살이 추출물이 방출되어 체내로 흡수되는데 용이할 것이다.

<36> 따라서 본 발명은 겨우살이, 인삼, 홍삼, 녹차, 버섯 등의 추출물을 미세캡슐화하여 섭취시 면역증강 효과를 증대할 수 있으며, 기능성 건강 식품에 활용하는데 용이하다.

<37> 이하 본 발명의 구체적인 내용을 실시예를 통해 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 다만 이들 실시예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

<38>

<39> [실시예 1] 겨우살이 추출물 제조

<40> 본 실험에 사용한 겨우살이(*Viscum album coloratum*)는 강원도 양양지역에서 참나무를 숙주로 하여 자라는 겨우살이로서 1월에 채취하였다. 실험에 사용된 겨우살이는 1년 및 2년생으로서 가지의 끝에서부터 두 마디까지의 잎, 줄기 그리고 열매를 겨우살이로부터 절단하여 증류수로 세척한 후, 건조 시킨 다음 진공 포장하여 추출 시까지 -80℃에서 보관하였다.

<41> 동결된 겨우살이 잎과 줄기를 세절하여, 세절한 겨우살이 50g에 이온교환수지를 통과한 증류수 100㎖를 첨가하고, 믹서기로 2분간 분쇄하여 4℃에서 16시간 교반하였다. 그 후, 원심분리(10,000rpm, 30min, 4℃)하여 얻은 상등액을 포커 사이즈(pore size)가 다른 멤브레인 필터(membrane filter)에 의해 순차적으로 여과한 후(7.2,

0.45, 0.22㎛), 내액을 동결 건조시켜 갈색의 분말(KM-110)을 얻었다.

<42>

<43> [실시예 2] 가열처리에 의한 영향

<44> 스프레이 건(Spray gun)을 이용한 미세캡슐화 공정에서 제조 수율을 높이기 위해서는 50℃ 내외의 가열과정을 필요로 한다. 겨우살이 추출물 중 중요 성분인 렉틴이 온도에 따라 어떠한 영향을 받는지 관찰하기 위하여 0~90℃ 사이의 온도에서 30분간 정치 항온 시킨 후, 즉시 얼음물에 냉각시킨 다음 겨우살이 추출물에 포함된 렉틴의 활성을 측정하였다.

<45> 온도에 따른 겨우살이 추출물의 영향

<46> 0에서 90℃ 사이의 온도에서 30분간 항온 시킨 후 남아있는 렉틴의 활성을 측정하여 도 1에 나타내었다. 40℃까지는 렉틴의 활성이 100% 유지되었고, 50℃에서는 33%로 급격히 감소되는 결과를 나타냈으며, 60℃에서는 20%, 70℃에서는 5%로 감소하다가 80℃ 이상의 온도에서는 활성이 완전히 없어졌다.

<47> 이러한 결과를 토대로 기존의 스프레이 건을 이용한 미세캡슐의 제조에서 코팅물질(coating material)로 폴리글리세롤 모노스테아레이트(polyglycerol monostearate: PGMS)를 사용할 경우, 분사 시 온도를 50℃ 내외로 가온하던 방식에서 40℃ 이하의 온도에서 제조하도록 조절하였다.

<48> [실시예 3] 폴리글리세롤 모노스테아레이트를 이용한 미세캡슐 제조

<49> 코팅물질로 사용한 폴리글리세롤 모노스테아레이트(PGMS: polyglycerol monostearate)는 상온에서 고체 상태로 존재하므로 동량의 증류수와 혼합하여 80℃에서 5시간 정도 가온하여 녹인 후 4℃에서 냉장보관하면서 사용하였다. 이 상태 역시 70℃ 이상으로 가온 해야만 분무가 되는 상태이므로 효과적인 분사를 위해 PGMS의 중량이 5g, 10g, 15g, 20g이 되도록 취한 후, 각각 동일한 양의 증류수와 혼합하여 미세캡슐을 제조하였다.

<50> 증류수와 혼합한 PGMS를 55℃에서 30분간 정치시켜 녹인 후 1,200×g으로 1분 동안 교반(stirring) 후 1g의 겨우살이 추출물을 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합액을 0.05%의 Tween-60이 용해된 4℃의 분산액에 W-300 spray gun (Wagner Spray Tech. Co., Markdorf, Germany)으로 분무하여 미세캡슐을 제조하였다. 이 미세캡슐 분산액을 24,900×g에서 15분간 원심 분리한 후 여액인 상등액을 분리하였으며, 동량의 분산액을 넣어 세척하는 방식으로 2회 더 실시한 후, 미세캡슐화된 겨우살이 추출물을 취하였다. PGMS를 이용한 미세캡슐의 제조방법은 도 2와 같다.

<51> 미세캡슐화 수율측정

<52> 겨우살이 추출물의 미세캡슐화 수율 측정은 겨우살이 추출물과 코팅물질 solution의 혼합물을 분무한 분무액에서 미세캡슐화 되지 않고 외부 용액에 존재하는 겨우살이 추출물의 BCA정량과 sandwich ELISA 분석을 통하여 간접적인 방법으로 수율을 계산하였으며 방법은 다음과 같다.

<53> 미세캡슐 외부 용액을 Whatman No. 540 여과지(Whatman International Limited, Maidstone, England)로 여과한 다음 0.4㎛의 membrane filter(Whatman International Limited, Maidstone, England)로 재여과하여 냉장보관하면서 실험 샘플로 사용하였다.

<54>

<55> (1) Bicinchoninic acid(BCA) assay

<56> Reagent A를 제조하기 위하여 10g BCA (1%), 20g $Na_2Co_3 \circ H_2O$(2%), 1.6g $Na_2C_4H_4O_6 \circ 2H_2O$(0.16%), 4g NaOH(0.4%), 9.5g $NaHCO_3$(0.95%)를 증류수를 통해 전체량을 1L로 하여 NaOH를 이용하여 pH를 11.25로 조정하였다.

<57> Reagent B의 제조를 위해 2g $CuSO_4 \circ 5H_2O$(4%)를 증류수를 통해 전체량을 50㎖로 한다. Reagent A와 B를 50:1의 비율로 혼합하여 Standard Working Reagent (SWR)를 제조하였다.

<58> 표준 곡선(Standard curve) 작성을 위하여 BSA(2mg/㎖)를 테스트 튜브(test tube)에 일정량씩 넣고 D-PBS buffer(조성을 기재하여 주세요)로 최종농도가 25㎍/㎖, 125㎍/㎖, 500㎍/㎖, 750㎍/㎖, 1000㎍/㎖, 1500㎍/㎖, 2000㎍/㎖가 되도록 맞춰 놓고 웰 플레이트(well plate)에 25㎕씩 분주하고, 미리 준비한 SWR를 200㎕씩 첨가한 후 혼합(vortexing)하여 37℃의 배양기에서 30분간 반응시킨 후 상온에서 식힌 후 562㎚에서 흡광

도를 측정하고 표준곡선을 구하였다.

<59> 각각의 조건 별로 제조된 캡슐의 여액을 4배씩 희석한 용액을 top 농도로 하여 순차적으로 2배 희석하여 각각 4개의 샘플을 준비한 후 25㎕씩 웰 플레이트에 분주하고 SWR를 200㎕씩 첨가한 후 562㎚에서 흡광도를 측정하였다.

<60>

<61> (2) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

<62> 항원이 plate에 잘 결합하도록, 항원에 대한 항체를 먼저 플레이트에 결합시키고, 그 항체에 항원을 결합시킨 다음, 직접법이나 간접법으로 조사하는 방법으로, 본 실험에서는 겨우살이 추출물에 포함된 렉틴이 항원이 된다.

<63> 먼저 1차 항체를 코팅하기 위하여 pH 9.6의 코팅 버퍼에 1:30,000으로 희석 후 well plate에 100㎕씩 주입 후 37℃에서 2시간 동안 반응한 후, PBS에 5% non-fat dry milk를 용해시킨 blocking buffer를 각각 200㎕씩 넣은 후 4℃에서 16시간 동안 반응하였다. 렉틴 표준품의 top 농도를 2㎍/㎖로부터 2배씩 희석하여 각 웰에 분주하고, 각각의 조건으로 제조된 미세캡슐의 여액 샘플들의 top 농도를 5배 희석하여 각각 100㎕씩 분주한 후 37℃에서 2시간 동안 반응하였다. 다음 2차 항체를 100㎕씩 넣고 37℃에서 2시간 동안 반응한 후 substrate buffer를 100㎕ 주입하여 암소에서 상온으로 30분간 방치하였다. 2N H_2SO_4를 100㎕씩 주입하여 반응을 중지 시킨 후 ELISA reader로 450㎚에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 반응 단계마다 PBST로 3회씩 세척을 실시하였다.

<64> 코팅물질과 중심물질의 비율에 따른 수율:

<65> 코팅물질과 중심물질의 비율에 따른 수율의 측정값을 표 1에 나타내었다. PGMS와 겨우살이 추출물의 비율이 20:1보다 높은 비율에서는 PGMS의 높은 점성 때문에 spray gun으로 캡슐화 하는데 적합하지 않았다. PGMS와 겨우살이 추출물의 혼합 비율이 5:1일 때의 미세캡슐화 수율은 60.5%로 가장 낮았으며, 10:1일 때는 69.4%, 15:1일 때는 74.5%로 가장 높았고, 20:1일 경우는 66.4%로 PGMS와 겨우살이 추출물의 비율이 15:1일 때 가장 높은 수율을 보였으며, 그 이상의 비율에서는 PGMS의 비율이 높아질수록 수율이 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

<66> <표 1> 코팅물질 PGMS과 중심물질의 비율에 따른 미세캡슐화의 수율[1]

<67>

Ratio(w/v)		Yield(%)
PGMS[2](㎖)	Mistletoe extract(g)	
5	1	60.5[d]
10	1	69.4[b]
15	1	74.5[a]
20	1	66.4[c]

<68> [1]3회의 평균. 한 줄에서 동일한 글자는 유의한 차이가 없음($P<0.05$)

<69> [2]폴리글리세롤 모노스테아레이트

<70>

<71> 증류수 첨가량에 따른 수율:

<72> PGMS를 분무 가능한 상태로 변화시키기 위해서는 증류수의 첨가가 필수적이다. 그래서 이에 따른 미세캡슐화의 수율 변화를 측정하기 위하여 앞의 결과에 따라 PGMS와 겨우살이 추출물의 혼합 비율을 15:1로 하여 증류수의 첨가량을 달리하면서 미세캡슐을 제조한 후 그 수율을 측정한 값은 표 2와 같다.

<73> PGMS와 겨우살이 추출물의 비율이 15:1인 혼합물에 첨가된 증류수의 양이 30㎖일 때와 50㎖때는 수율값이 72.3%와 70.3%로 그 결과값의 유의적 차이가 없었으며, 증류수가 40㎖ 첨가되었을 때77.2%로 가장 높은 수율값을 나타내었고, 증류수의 첨가량이 40㎖ 이상에서는 그 값이 점차적으로 낮아지는 결과를 보였다. 결과적으로 PGMS

와 겨우살이 추출물, 증류수의 비율(w/w/v)이 15 : 1 : 40일 때 미세캡슐화 수율이 가장 효과적이었다.

<74> <표 2> 증류수 첨가량에 따른 수율[1]

<75>

Ratio(v/w/w)			Yield(%)
PGMS[2](g)	Mistletoe extract(g)	DW[3](㎖)	
15	1	30	72.3[b]
15	1	40	77.2[a]
15	1	50	70.3[c]
15	1	60	63.9[d]

<76> [1]3회의 평균. 한 줄에서 동일한 글자는 유의한 차이가 없음(P<0.05). 40℃에서 2분 동안 가열하여 혼합함.

<77> [2]폴리글리세롤 모노스테아레이트

<78> [3]증류수

<79>

<80> 첨가되는 증류수의 양이 30㎖ 이하일 때는 PGMS의 점성이 매우 높아 spray gun으로 분사시키기 어려운 상태를 보였으며, 겨우살이 추출물의 분산상태도 저하되었다. 60㎖ 이상에서는 캡슐화 수율 뿐 아니라 원심분리에 의한 분리력이 떨어져 캡슐을 회수하는데 어려움이 있었다. 이는 유화액 제조 시 피복물질의 점도가 높으면 혼합효과가 저하되고, 점도가 낮으면 핵물질과 균일한 혼합물을 제조하기가 어려워 유화안정성이 낮아지는 것으로 사료된다.

<81>

<82> 분사 압력에 따른 수율:

<83> PGMS를 코팅물질로 하여 겨우살이 추출물을 미세캡슐화 할 때의 가변변수로 분사압력을 달리하였다. 이에 따른 미세캡슐화의 수율 변화를 측정하기 위하여 앞의 결과에 따라 PGMS와 겨우살이 추출물의 혼합 비율을 15:1로 하고 증류수의 첨가량을 40㎖로 고정한 후 spray gun의 분사 압력을 일정한 단위로 조작하여 미세캡슐을 제조한 후 그 수율의 측정값을 표 3에 나타내었다. Spray gun의 압력을1,100 psi로 조절하여 미세캡슐을 제조하였을 때, 54.9%의 수율을 나타내 이전 실험에서 미세캡슐화 수율이 가장 높은 제반조건에서 제조하였음에도 20%가량 수율이 낮아져 미세캡슐을 제조하는데 있어 압력에 따른 영향이 높은 것으로 나타났다. 1,400psi에서는 66.4%, 1,700psi에서는 70.9%의 수율을 나타냈고, 2,000psi에서는 78.3%로 이전 실험의 최고 수율보다 약간 높게 측정되었으나, 유의적 차이는 없었으며 2,000psi의 분사압력으로 제조한 경우 78.9%였다. 마지막 실험군에서도 수율이 증가함을 보였으나, spray gun의 최대 압력이 2,300psi를 넘지 못하여 더 큰 압력에서의 미세캡슐화 수율을 측정하지는 못했으나, 2,000psi에서 제조한 경우의 수율과 유의적 차이를 보이지 않아 그 이상의 압력에서 제조하더라도 미세캡슐화 수율이 크게 증가하지는 않을 것으로 사료된다.

<84> <표 3> 분사 압력에 따른 수율[1]

<85>

Ratio				Yield(%)
PGMS[2](mg)	Mistletoe extract(g)	DW[3](㎖)	Presser(psi)	
15	1	40	1100	54.9[d]
15	1	40	1400	66.4[c]
15	1	40	1700	70.9[b]
15	1	40	2000	78.3[a]
15	1	40	2300	78.9[a]

<86> [1]3회의 평균. 한 줄에서 동일한 글자는 유의한 차이가 없음(P<0.05).

<87> [2]폴리글리세롤 모노스테아레이트

<88>

<89> [실시예 4] 중간-사슬 트리글리세리드(Medium-chain triglyceride: MCT)을 이용한 미세캡슐 제조

<90> MCT를 코팅물질로 한 겨우살이 추출물의 미세캡슐을 제조한 방법은 도 3과 같으며 그 내용은 다음과 같다. 액상의 MCT와 겨우살이 추출물을 일정 비율로 혼합하여 2,000rpm에서 2분간 교반하였으며, 겨우살이 추출물이 직접 첨가한 경우 그 용해도가 매우 떨어져, 유화액에 겨우살이 추출물을 미리 녹인 후 첨가한 실험군을 추가하였다. 겨우살이 추출물과 MCT의 혼합액을 W-300 spray gun으로 0.05%의 Tween-60이 용해된 4℃의 분산액에 분무하고, 이 분무액을 4,520×g에서 10분간 원심분리하여 캡슐화 된 상층부와 캡슐화 되지 않은 여액으로 분리하고 상층부를 취하여 동량의 Tween-60 분산액을 가해 2회 더 세척을 실시한 후 캡슐화 되지 않은 겨우살이 추출물을 포함한 여액을 제거하여 미세캡슐을 제조하였다.

<91> MCT(medium-chain triacylglycerol)은 실온에서 그 자체가 액체 상태로 존재하므로 분무하기 적당한 형태를 가지고 있다. 그래서 MCT와 겨우살이 추출물을 5:1, 10:1, 15:1, 20:1의 비율로 첨가하여 각각의 수율을 측정하였는데, 그 결과는 표 4와 같다. MCT와 겨우살이 추출물의 비율이 5:1일 경우 43.1%였고, 10:1일 때 54.4%로 가장 높은 수율을 나타내었다. 15:1의 비율일 경우 52.9%로 10:1 제조군과 유의적 차이가 없었으며, 20:1일 경우 39.6%로 캡슐화 수율이 대폭 낮아졌다.

<92> 이는 겨우살이 추출물이 MCT상에서 용해되지 않아 고속으로 stirring을 실시하여 분산만 시킨 상태에서 제조한 것에 기인한 것으로 사료되어 파우더(powder) 형태의 겨우살이 추출물을 증류수에 녹인 후, 첨가하여 미세캡슐화하는 실험을 추가로 실시하였다.

<93> 증류수를 이용하여 겨우살이 추출물이 1.0g/㎖, 0.5g/㎖씩 포함되도록 solution을 제조한 후, 겨우살이 추출물만의 함량을 기준으로 하여 분말형태의 겨우살이 추출물을 MCT에 직접 적용하여 미세캡슐화를 실시한 실험과 동일한 비율로 준비하여 spray gun으로 분사시켰다. 즉 겨우살이 자체의 양은 동일하며, 첨가된 증류수의 양이 다른 실험군 간의 수율을 비교하는 것으로 그 결과를 표 5에 나타내었다. 표 5에 나타낸 바와 같이 5:1에서 44.8%, 10:1에서 58.2%의 수율을 나타내어 이전 실험에서 분말형태의 겨우살이 추출물과 혼합하여 제조한 실험에서보다 약간 증가하였으나 큰 차이를 보이지 않았으나, 15:1의 비율로 제조한 경우66.1%의 수율을 나타내 이전 실험의 15:1의 제조 수율보다 13.1%가 증가하였으며, 가장 높은 수율을 나타내었던 10:1의 제조 수율보다도 11.7%가 증가하여 겨우살이 추출물을 분말상태로 혼합하는 것보다 수용액 상태로 혼합하였을 경우 더욱 효과적으로 났으나, 겨우살이 추출물 수용액을 ㎖당 0.5g의 겨우살이 추출물이 포함되도록 제조하여 MCT와 혼합하여 미세캡슐을 제조한 실험군에서는 각각 39.8%, 50.5%, 57.7%, 43.7%의 수율을 나타내 5:1과 10:1의 비율로 혼합하였을 경우에는 이전 실험에서보다 오히려 낮은 수율을 나타냈고, 가장 높은 수율을 나타낸 혼합 비율이 15:1로 이전 실험에서와 다른 비율에서 나타난 것으로 나타났을 뿐 수율의 증가율이 높지 않았다. 이는 증류수의 첨가에 따라 MCT의 유화능이 감소되어 나타난 결과라 사료된다.

<94> <표 4> 코팅물질 MCT와 중심물질의 비율에 따른 미세캡슐화의 수율[1]

<95>

Ratio(w/v)		Yield(%)
MCT[2](㎖)	Mistletoe extract(g)	
5	1	43.1[b]
10	1	54.4[a]
15	1	52.9[a]
20	1	39.6[b]

<96> [1]3회의 평균. 한 줄에서 동일한 글자는 유의한 차이가 없음(P<0.05).

<97> [2]중간-사슬 트리글리세리드

<98>

<99> <표 5> 코팅물질 MCT와 겨우살이 추출물에 첨가된 증류수의 양이 다른 실험군 간의 수율[1]

<100>

Ratio(w/v)			Yield(%)	
MCT[2] (㎖)	Mistletoe extract Solution(1g/㎖)	Mistletoe extract solution(0.5g/㎖)	Mistletoe extract Solution(1g/㎖)	Mistletoe extract solution(0.5g/㎖)
5	1	2	44.8[d]	39.6[e]
10	1	2	58.2[b]	50.5[c]
15	1	2	66.1[a]	57.7[b]
20	1	2	50.3[c]	43.7[d]

<101> [1]3회의 평균. 한 줄에서 동일한 글자는 유의한 차이가 없음(P<0.05).

<102> [2]중간-사슬 트리글리세리드

<103>

<104> [실시예 5] 미세캡슐의 크기 측정

<105> PGMS와 MCT로 제조한 겨우살이 추출물 미세캡슐의 크기를 비교 관찰하기 위하여 각각 10 : 1, 15 : 1, 20 : 1로 제조된 미세캡슐을 범용광학현미경으로 촬영한 후, 캡슐의 지름값을 측정하여 그 평균값을 도 4에 나타내었다. PGMS와 겨우살이 추출물의 비율을 15 : 1로 하여 제조한 미세캡슐의 크기는 지름이 30.0㎛였으며, 10 : 1일 때는 이보다 다소 큰 35.2㎛였고, 20 : 1일 때는 45.6㎛로 그 크기가 증가되었다. MCT와 겨우살이 추출물의 비율이 10 : 1일 때의 미세캡슐의 지름은 17.3㎛로 가장 작게 나타났으며, 15 :1일 때 19.5㎛, 20 : 1일 때 25.7㎛로 PGMS로 제조된 미세캡슐보다 MCT를 코팅물질로 하여 미세캡슐을 제조하였을 때 그 크기가 2배 이상 작아지는 것으로 관찰되었다. 그리고 미세캡슐화 수율이 떨어질수록 미세캡슐의 크기가 커지는 경향을 나타내었는데, 이는 입자의 크기가 증가하여 전체 표면적이 감소함으로써 겨우살이 추출물의 손실이 함께 감소되었다는 것을 시사하는 것이며, 결국 미세캡슐의 입자크기는 핵물질에 대한 코팅물질의 retention과 관계가 있다는 것을 증명하는 것이라고 판단되었다.

<106> [실시예 6] 미세캡슐의 안정성

<107> (1) 인공 위액에서 미세캡슐로부터의 방출량 조사

<108> 겨우살이 추출물 미세캡슐의 안정성조사는 인공위액의 pH와 반응 시간에 따라 미세캡슐로부터 방출된 겨우살이 추출물의 정량분석을 통하여 측정하였으며 방법은 다음과 같다.

<109> 우선 증류수 1㎖에 겨우살이 추출물 미세캡슐 1mg을 첨가하고 펩신(pepsin) 용액(pH 1.2, 1mg/㎖)을 첨가한 후, 1N HCl로 각각 pH 2로 맞추었다. 이 용액을 체내에서의 조건과 유사한 환경에서 반응시키기 위해 체온과 연동운동의 효과를 주기 위해 교반 수조(shaking water bath)에서 37℃, 100rpm 속도로 교반하면서 반응 시간 대별로(0, 10, 20, 30, 40, 50, 60분) 인공 위액상에 방출된 겨우살이 추출물의 렉틴을 정량하였다.

<110>

<111> 기능성 물질에 대한 미세캡슐의 가장 큰 목적은 생체내의 흡수 부위에서 유출되도록 하여 그 효과를 극대화시키기 위함이다. 즉 대부분의 물질이 극히 낮은 pH로 인하여 불활성화되는 위(stomach) 내의 환경에서는 중심물질의 방출을 억제하고, 흡수장관 내에서 방출하여야만 한다.

<112> 겨우살이 추출물의 미세캡슐이 산성영역의 pH와 소화효소(pepsin)의 혼합물 내에서 방출되는 겨우살이 추출물량을 측정하기 위해, 시험관내 인공위액을 제조하여 37℃, 60분 동안 반응시키면서 10분 간격으로 겨우살이 추출물의 방출량을 측정하여 도 5에 나타내었다. 60분간 반응 시킨 후의 겨우살이 추출물의 방출량은 MCT를 코팅물질로 하여 제조된 미세캡슐로부터의 방출량이 17.2%로 PGMS를 코팅물질로 하여 제조된 미세캡슐로부터의 겨우살이 추출물 방출량인 14.8%보다 약간 높았으나, 두 실험군 모두 10분까지의 방출량이 각각 2.1%, 0.8%로 거의 방출되지 않았으며, 10분에서 30분내의 반응시간에 방출량이 급격이 증가하여 각각 13.6%와

14.7%였으며, 30분 이후의 방출량은 약간 증가하는 경향을 보였다.

<113> 두 실험군 모두 20% 미만의 방출량을 나타내 인공위액 내에서의 안정성은 우수하여 낮은 pH와 펩신(pepsine) 등의 소화효소에 의한 작용을 받지 않은 것으로 생각되며, 캡슐화된 겨우살이 추출물은 안정하게 소장으로 유입 가능할 것으로 사료된다.

<114>

<115> (2) 인공 소장에서의 미세캡슐의 방출량 조사

<116> 인공위액으로 각각 다른 pH와 시간별로 반응한 용액에 0.01M 콜릭 에시드(cholic acid), 0.01M 디옥시콜릭 에시드(deoxycholic acid: bile salt), 리파아제(lipase)를 첨가하고 판크레아틴(pancreatin) 용액(1mg/㎖ phosphate buffer, pH 7.4)을 첨가하였다. 이 용액을 1N HCl과 NaOH로 pH를 6, 7, 8, 9로 조정한 후 37℃에서 각 시간(0, 10, 20, 30, 40, 50, 60분)별로 100rpm 속도로 교반하면서 반응(incubation)하여 용액에 방출된 겨우살이 추출물을 정량 하였다.

<117> 겨우살이 추출물을 중심물질로 한 미세캡슐의 다른 두 가지 코팅물질(PGMS, MCT)이 췌장에서 분비되는 리파아제와 다른 여러 활성인자들에 의해 분해되면, 유리된 겨우살이 추출물은 소장의 융모를 통해 체내로 흡수되기 때문에 본 실험에서는 인공 소장액을 제조하여 동일한 양의 겨우살이 추출물을 포함하는 미세캡슐을 넣고, 60분 동안 반응시키면서 10분 간격으로 방출량을 측정한 결과를 도 6에 나타내었다. 전체적인 경향을 보면 10분까지는 방출량이 적었고, 10분부터 30분까지 급격하게 증가하였으며, 이후의 방출량은 거의 증가되지 않고 일정하게 유지되었다. MCT로 제조된 미세캡슐이 첨가된 경우에서는 10분까지 27.6%의 방출량을 나타냈고, 30분까지 83.7%의 방출량을 나타내었으며, 이후 84.3%, 87.3%, 86.1%의 방출량을 보여 전체적으로 85%정도의 겨우살이 추출물이 인공 소장액 내로 방출되었으며, PGMS로 제조된 미세캡슐을 첨가한 경우에는 10분까지 23.8% 정도 방출되었던 반면 30분까지 83.5%의 방출량을 나타내어 급격한 증가를 보였으며, 이후 83.5%, 82.7%, 83.2%의 방출량을 나타내면서 일정하게 유지되어, MCT로 제조된 미세캡슐에서보다 3~4%정도 방출량이 작았다.

<118> 결론적으로 인공 소장액에서 겨우살이 추출물 미세캡슐의 안정성을 보면, 장관 내에서 30분 이상 머물게 될 경우에는 대부분의 미세캡슐로부터 겨우살이 추출물이 방출되어 체내로 흡수되는데 용이할 것이라 사료된다.

도면의 간단한 설명

<119> 도 1은 온도에 따른 겨우살이 추출물의 영향을 나타낸 것이다.

<120> 도 2는 PGMS를 이용한 미세캡슐의 제조방법을 나타낸 것이다.

<121> 도 3은 MCT를 이용한 미세캡슐 제조방법을 나타낸 것이다.

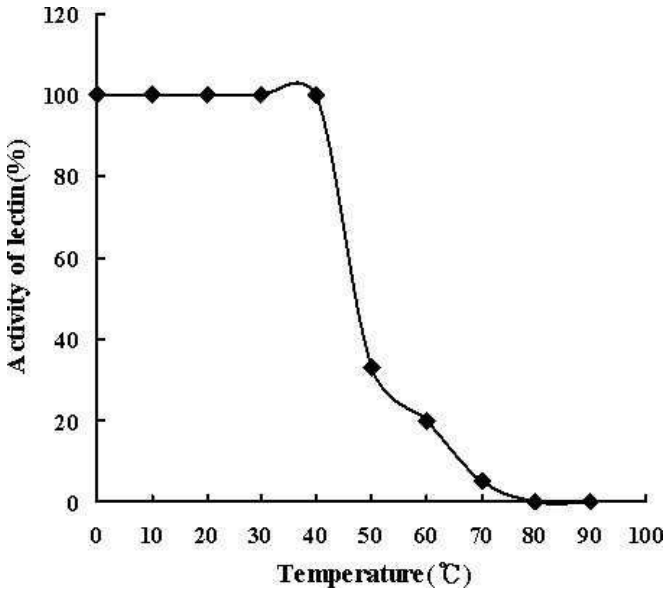
<122> 도 4는 PGMS와 MCT로 제조한 겨우살이 추출물 미세캡슐을 범용광학현미경으로 촬영한 후, 캡슐의 지름값을 측정하여 그 평균값을 나타낸 것이다.

<123> 도 5는 시험관내 인공위액에서 미세캡슐로부터 겨우살이 추출물의 방출량을 측정하여 나타낸 것이다.

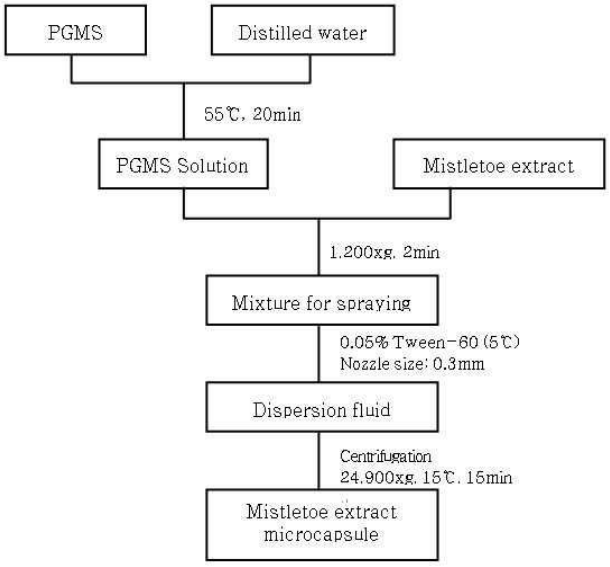
<124> 도 6은 인공 소장에서의 미세캡슐로부터 겨우살이 추출물의 방출량을 측정하여 나타낸 것이다.

도면

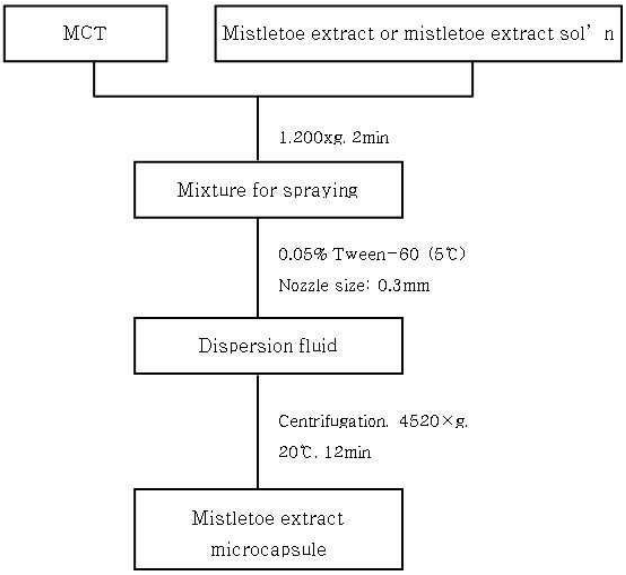
도면1


Activity of lectin(%)
120
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Temperature(℃)

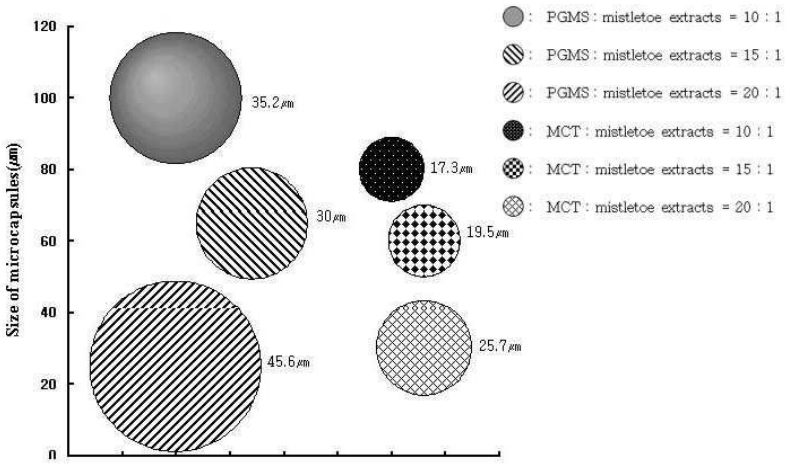
도면2


PGMS
Distilled water
55℃, 20min
PGMS Solution
Mistletoe extract
1,200xg, 2min
Mixture for spraying
0.05% Tween-60 (5℃)
Nozzle size: 0.3mm
Dispersion fluid
Centrifugation
24,900xg, 15℃, 15min
Mistletoe extract microcapsule

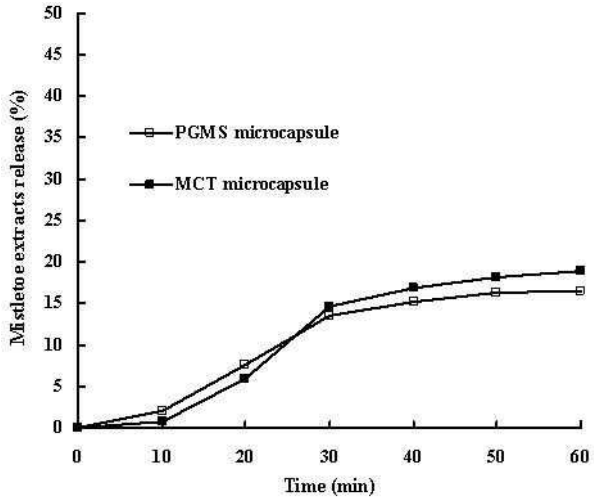
도면3


MCT
Mistletoe extract or mistletoe extract sol' n
1,200xg, 2min
Mixture for spraying
0.05% Tween-60 (5℃)
Nozzle size: 0.3mm
Dispersion fluid
Centrifugation. 4520×g.
20℃. 12min
Mistletoe extract
microcapsule

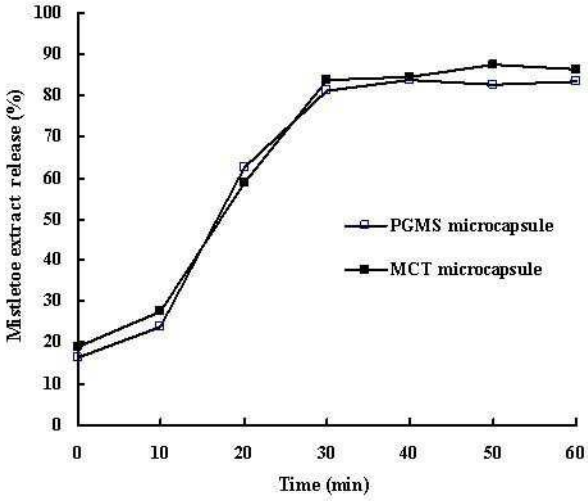
도면4


Size of microcapsules(㎛)
120
100
80
60
40
20
0
35.2㎛
30㎛
45.6㎛
17.3㎛
19.5㎛
25.7㎛
: PGMS : mistletoe extracts = 10 : 1
: PGMS : mistletoe extracts = 15 : 1
: PGMS : mistletoe extracts = 20 : 1
: MCT : mistletoe extracts = 10 : 1
: MCT : mistletoe extracts = 15 : 1
: MCT : mistletoe extracts = 20 : 1

도면5


Mistletoe extracts release (%)
PGMS microcapsule
MCT microcapsule
Time (min)

도면6


Mistletoe extract release (%)
PGMS microcapsule
MCT microcapsule
Time (min)