

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0022709 (43) 공개일자 2013년03월07일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A23L 1/29 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01) A23P 1/06 (2006.01)	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)	
(21) 출원번호 10-2011-0085513	(72) 발명자	
(22) 출원일자 2011년08월26일	이원재	
심사청구일자 2011년08월26일	경상남도 진주시 진주대로815번길 11, 117동 202호 (주약동, 현대아파트)	
	박동준	
	경기도 용인시 수지구 정평로 89, 현대프라임아파트 201동 1501호 (풍덕천동)	
	(뒷면에 계속)	
	(74) 대리인	
	김종관, 권오식, 박창희	

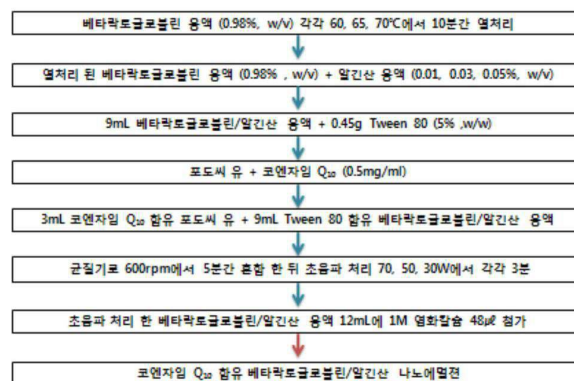
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 내부젤화 기술을 이용한 생리활성 물질 함유 베타락토글로불린 / 알긴산 나노에멀전 전달체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 열처리에 의해 부분 변성 된 베타락토글로불린, 알긴산, 가교제인 염화칼슘의 내부젤화를 이용하여 생리활성 물질인 코엔자임 Q₁₀의 포집효율을 극대화 시켜 생체이용률을 높은 생리활성 물질 함유 나노에멀전 전달체를 제조하는 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이미령

경상남도 진주시 진주대로815번길 11, 117동 202호
(주약동, 현대아파트)

최하늘

경상남도 진주시 금산면 중천리 330번지 진흥더루
벤스 104동 602호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 107072-3

부처명 농림수산식품부

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 콜드젤 기술을 이용한 유청 단백질 나노담체 함유 기능성유제품 가공기술 개발

주관기관 경상대학교

연구기간 2007.05.30 ~ 2010.05.29이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0013978

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 하이드로젤을 이용한 생리활성 나노에멀전 동시전달시스템 개발

주관기관 경상대학교

연구기간 2011.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

56℃ ~ 74℃의 열처리에 의해 부분 변성된 베타락토글로불린, 알긴산, 가교제인 CaCl_2 및 생리활성 물질로 이루어진 생리활성 물질 함유 나노에멀전.

청구항 2

제 1항에서,

상기 생리활성 물질은 코엔자임 Q_{10} 인 생리활성 물질 함유 나노에멀전.

청구항 3

제 1항에서,

상기 생리활성 물질 함유 나노에멀전은 베타락토글로불린과 알긴산의 혼합용액의 0.001% ~ 0.05%의 알긴산을 함유하는 생리활성 물질 함유 나노에멀전.

청구항 4

제 1항에서,

상기 생리활성 물질 함유 나노에멀전은 베타락토글로불린과 알긴산의 혼합용액의 3.5 ~ 4.5 mM의 염화칼슘을 함유하는 생리활성 물질 함유 나노에멀전.

청구항 5

제 1항에서,

상기 생리활성 물질 함유 나노에멀전은 5% 이내의 계면활성제를 포함하는 생리활성 물질 함유 나노에멀전.

청구항 6

a) 베타락토글로불린을 56℃ ~ 74℃의 온도로 열처리하는 단계;

b) 상기 a)단계의 부분 변성된 베타락토글로불린과 알긴산을 혼합하여 혼합용액을 제조하는 단계; 및

c) 상기 b)단계의 혼합용액에 생리활성 물질과 가교제인 염화칼슘을 첨가하여 내부젤화 및 생리활성 물질을 포집하는 단계;

를 포함하는 생리활성 물질 함유 나노에멀전 제조방법.

청구항 7

제 6항에서,

상기 생리활성 물질은 코엔자임 Q_{10} 인 생리활성 물질 함유 나노에멀전 제조방법.

청구항 8

제 6항에서,

상기 생리활성 물질 함유 나노에멀전은 상기 b)단계의 혼합용액의 0.001% ~ 0.05%의 알긴산을 함유하는 생리활성 물질 함유 나노에멀전 제조방법.

청구항 9

제 6항에서,

상기 생리활성 물질 함유 나노에멀전은 상기 b)단계의 혼합용액의 3.5~4.5 mM의 염화칼슘을 함유하는 생리활성

물질 함유 나노에멀전 제조방법.

청구항 10

제 6항에서,

상기 생리활성 물질 함유 나노에멀전은 상기 b)단계의 혼합용액의 5% 이내의 계면활성제를 포함하는 생리활성 물질 함유 나노에멀전 제조방법.

청구항 11

제 1항 내지 5항 중 어느 한 항의 생리활성 물질 함유 나노에멀전을 포함하는 기능성 나노식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 열처리에 의해 부분 변성 된 베타락토글로불린, 알긴산, 및 가교제인 염화칼슘의 결합을 통한 내부젤화를 이용하여 물에 난용성이고 생체이용률이 낮은 생리활성 물질의 포집효율을 극대화시킨 나노에멀전 전달체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 나노에멀전이란 20~200 nm 크기의 입자를 가진 에멀전을 말한다. 나노에멀전은 기존의 기능성 유제품 생산에 이용되었던 미세에멀전과 비교하여, 입자의 크기가 작고(< 200 nm), 표면적이 증가됨으로써 장에서 체류하는 시간과 투과성(permeability)을 향상시킬 수 있어 생체 내 기능성물질의 흡수 측면에서 유리한 점을 가지고 있다. 나노에멀전은 작은 입자크기로 인해 유착(coalescence), 침강(sedimentation)에 대한 에멀전 안정성(stability)을 향상시킬 수 있다. 또한 기존의 미세에멀전이 20% 정도의 계면활성제를 사용하여 제조되어지는 반면, 나노에멀전은 작은 크기로 인해 안정성이 향상되어 3~10% 의 적은양의 계면활성제가 사용되어 화학물질의 사용을 최소화함으로써 고부가가치 기능성 식품 개발에 많은 이점을 제공할 수 있다.

[0003] 베타락토글로불린(β -lactoglobulin, β -lg)은 주요 유청단백질로서, GRAS (generally recognized as safe)하며, 소수성 기능성 물질과의 결합을 증가시키고 젤이나 에멀전을 형성할 수 있는 능력을 가지고 있어 식품의 물리적 특성 향상 및 안전성이 요구되는 식재료로 이용되어 왔다. 베타락토글로불린은 65℃ 이상에서 열처리를 하게 되면 3차원 구조에 변형이 일어나(unfolding) 단백질 내부의 소수성 그룹과 설퍼하이드릴(sulfhydryl) 그룹이 노출된다(비특허문헌 1, Rosenberg & Lee, 2004 ; Line et al., 2005). 따라서, 이러한 열처리 결과 베타락토글로불린 내부에 존재하는 소수성 아미노산기들이 외부로 노출되게 되고 베타락토글로불린의 소수성 아미노산기들과, 소수성 생리활성 물질인 코엔자임 Q₁₀의 상호작용이 증가하여 코엔자임 Q₁₀(큐텐)의 포집효율을 증가시킬 수 있다.

[0004] 알긴산(alginate, Al)은 베타-1,4-D-만누론산(β -1,4-D-mannuronic acid(M))기와 알파-1,4-L-글루쿠론산(α -1,4-L-glucuronic acid)기로 구성된 무독성 비이온성 다당류로 생체분해성이 뛰어나다(비특허문헌 2, Weinbreck et al., 2004 ; Yoo et al., 2006 ; Pongsawatmanit et al., 2006). 알파-1,4-L-글루쿠론산의 카르복실기를 포함하고 있는 알긴산과 가교제인 염화칼슘(CaCl_2)이 결합하게 되면 젤을 형성하는 기능적 특성을 가지고 있으며, 이러한 젤의 형태를 에그박스 모델(egg box model) 이라고 한다(비특허문헌 3, Beaulieu et al., 2002, Rosenberg & Lee, 2004 ; Yoo et al., 2006). 이러한 알긴산 젤은 강산성의 조건(예, 위. pH 1.2)에서 안정하고, 중성의 pH(예, 장. pH 7.5)에서는 쉽게 분해된다. 따라서 기능성 물질의 전달체 제조에 알긴산을 이용하게 되면 기능성 물질의 섭취 시 pH가 낮은 위에서 기능성 물질의 파괴 없이 장내로 전달할 수 있기 때문에 체내 이용률을 높일 수 있다.

[0005] 생리활성 물질 중의 하나인 코엔자임 Q₁₀(Co Q₁₀)은 조효소(ubiquinone)라고도 불리우며 체내에서 합성되는 지용성의 강한 항산화제이다. 모든 세포의 에너지 생산과정에 관여하는 필수보조인자이며, 몸에 활력을 넣어주는 에너지 공급과 인체의 노화를 예방하는 항산화 기능을 한다. 반면, 코엔자임 Q₁₀은 수용액에서 용해도가 낮아 경구 섭취 시 생체이용률이 낮고, 빛, 산소에 민감하며, 낮은 pH(예, 위 pH 1.2)에서 불안정화 되는 단점을 지니고 있다. 따라서, 코엔자임 Q₁₀을 직접 이용 시 발생하는 문제점을 최소화하기 위한 전달체를 이용하는 연구가 활발

히 이루어지고 있다.

- [0006] 그러나 이러한 코엔자임 Q₁₀을 안정적이고 효과적으로 생체 내에 전달하여 생체이용률을 높이는 기술은 아직 만족할만한 수준에 도달하지 못한 실정이며, 이러한 코엔자임 Q₁₀과 같은 소수성 생리활성 물질의 생체이용률을 높이는 기술에 대한 수요와 관심이 증대되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Rosenberg & Lee, 2004 ; Line et al., 2005
(비특허문헌 0002) Weinbreck et al., 2004 ; Yoo et al., 2006 ; Pongsawatmanit et al., 2006
(비특허문헌 0003) Beaulieu et al., 2002, Rosenberg & Lee, 2004 ; Yoo et al., 2006

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 기술적 과제는 생리활성 물질의 생체이용률을 높이는 것이다. 본 발명자는 수차례 연구를 거듭한 결과 생리활성 물질인 코엔자임 Q₁₀의 포집효율을 높일 수 있는 내부젤화 기술을 적용하여 코엔자임 Q₁₀ 함유 베타 락토글로불린/알긴산 나노에멀전을 제조하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 베타락토글로불린의 열처리를 통한 소수성 잔기의 증가와 알파-1,4-L-글루쿠론산의 카르복실기를 포함하고 있는 알긴산의 특정 농도에 따른 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전 전달체를 제조함으로써, 이는 소수성 생리활성 물질인 코엔자임 Q₁₀을 효율적으로 포집하여 체내에 전달할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 본 발명은 열처리에 의해 부분 변성된 베타락토글로불린, 알긴산, 가교제인 CaCl₂ 및 생리활성 물질로 이루어진 생리활성 물질 함유 나노에멀전을 제공한다.
- [0011] 다음으로, 본 발명의 각각의 구성에 대해서 설명한다.
- [0012] 본 발명에서 열처리에 의한 베타락토글로불린의 부분 변성은 열처리에 의해 베타락토글로불린의 3차원 구조에 부분적으로 변형이 일어나(unfolding) 단백질 내부의 소수성 그룹, 특히 소수성 아미노산 잔기와 설퍼하이드릴(sulfhydryl) 그룹이 노출되는 것을 의미한다.
- [0013] 본 발명에서의 베타락토글로불린의 열처리는 56℃~74℃에서 5~40분, 바람직하게는 10분 동안 수행하는 것을 특징으로 한다. 상기 조건에서 열처리를 하게 되면, 약 10% 정도 부분 변성된 베타락토글로불린을 수득할 수 있으며, 이 경우 본 발명에서 목적하는 베타락토글로불린/알긴산의 나노에멀전 형성이 가장 잘 이루어지게 된다.
- [0014] 반면 56℃ 미만에서 열처리를 하게 되면 베타락토글로불린의 변성, 즉 3차원 구조 변형이 충분히 일어나지 않아 소수성 아미노산 잔기와 소수성 기능성 물질인 코엔자임 Q₁₀의 상호작용이 미흡하여 나노 에멀전 형성이 제대로 이루어지지 않게 되며,
- [0015] 또는 74℃를 초과하여 열처리를 하게 되면 베타락토글로불린의 변성이 과다하게 발생하여, 베타락토글로불린 자체가 응집(agggregation)되어 역시 본 발명에서 목적하는 나노 에멀전 형성이 제대로 이루어지지 않게 된다.
- [0016] 상기 알긴산은 베타락토글로불린과 알긴산 혼합용액의 0.001%~0.05% 함유되는 것이 좋다. 알긴산의 농도가 0.001% 미만인 경우 본 발명의 코엔자임 Q₁₀의 생체이용률을 높이는 효과를 얻을 수 없고, 0.05%를 초과하는 경우 상기 나노에멀전의 많은 응집(agggregation)이 생기는 문제점이 있다.
- [0017] 가교제인 염화칼슘의 농도는 혼합용액의 3.5~4.5 mM 인 것이 가장 좋다. 가교제인 염화칼슘을 첨가하여 내부 젤화 시, 알긴산과 베타락토글로불린의 복합체(complex)로 에멀전을 제조하게 되면, 베타락토글로불린만을 사용하

여 에멀전을 제조하는 것과 비교하여 보다 더 얇고 단단한(rigid) 계면 막을 형성하여 기능성물질의 포집효율을 증가 시켜 줄 뿐 아니라, 체내흡수율 및 체내 이용성을 극대화 시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한, 에멀전 입자간의 반데르발스 인력을 감소시키고, 구조적인 반발을 증가시켜 에멀전 입자간의 응집을 방지함으로써 에멀전 안정성을 증가시켜 준다.

- [0018] 베타락토글로불린과 알긴산의 혼합용액은 상기 코엔자임 Q₁₀ 함유 나노에멀전의 5% 이내의 계면활성제를 포함할 수 있다. 상기 계면활성제의 예로는 Tween 80 (Polyoxyethylene (80) sorbitan monooleate) 등이 있다.
- [0019] 또한 본 발명은,
- [0020] a) 베타락토글로불린을 56℃ ~ 74℃의 온도로 열처리하는 단계;
- [0021] b) 상기 a)단계의 부분 변성 된 베타락토글로불린과 알긴산을 혼합하여 혼합용액을 제조하는 단계; 및
- [0022] c) 상기 b)단계의 혼합용액에 생리활성 물질과 가교제인 염화칼슘을 첨가하여 내부젤화 및 생리활성 물질을 포집하는 단계를 포함하는 생리활성 물질 함유 나노에멀전 제조방법을 제공한다.
- [0023] 여기서 상기 b)단계는 초음파 분산 등의 교반단계를 수반할 수 있다.
- [0024] 상기 생리활성 물질은 코엔자임 Q₁₀을 포함한다.
- [0025] 상기 생리활성 물질 함유 나노에멀전은 상기 b)단계의 혼합용액의 0.001% ~ 0.05%의 알긴산을 함유할 수 있다.
- [0026] 상기 생리활성 물질 함유 나노에멀전은 상기 b)단계의 혼합용액의 3.5~4.5 mM의 염화칼슘을 함유할 수 있다.
- [0027] 상기 생리활성 물질 함유 나노에멀전은 상기 b)단계의 혼합용액의 5% 이내의 계면활성제를 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명을 통해 내부젤화 기술을 이용하여 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전을 성공적으로 제조하였으며, 열처리 온도와 알긴산 농도 및 가교제인 염화칼슘의 농도가 나노에멀전의 크기와 표면특성 및 생리활성 물질인 코엔자임 Q₁₀의 포집효율에 영향을 미쳤음을 알 수 있었다. 이와 관련된 내용은 하기 시험 예 1~4에 기재하였다.
- [0029] 이렇게 제조된 생리활성 물질 함유 나노에멀전을 포함하는 기능성 나노식품도 본 발명의 범위에 포함된다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 코엔자임 Q₁₀ 함유 나노에멀전은 물에 잘 녹지 않고, 안정성이 낮으며, 생물학적 이용가능성(bioavailability)이 낮은 코엔자임 Q₁₀과 같은 생리활성 물질의 효율적인 전달체로 사용되어 질 수 있을 것으로 전망된다.
- [0031] 또한 안전성이 확보된 GRAS 한 천연식품소재와 무해한 칼슘과 같은 가교제를 사용하고 5% 이하의 계면활성제를 사용하여 나노에멀전을 제조함으로써 웰빙시대 소비자들의 요구에 부합하고 기존 에멀전 전달시스템 제조공정에서 나타날 수 있는 문제점을 최소화 할 수 있다.
- [0032] 또한 열처리 공정과 알긴산 농도 조절을 통해 생리활성 물질인 코엔자임 Q₁₀의 생체이용성(bioavailability)과 직접 관련된 입자 크기를 조절하고 포집효율을 극대화 시킬 수 있어 기능성 식품과 나노식품에 적용 가능한 생리활성 물질인 코엔자임 Q₁₀의 이용성을 극대화 할 수 있는 고부가가치 기능성 식품소재로 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 코엔자임 Q₁₀ 함유 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 제조방법을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 베타락토글로불린의 열처리 온도에 따른 나노에멀전의 전자현미경 사진 (a) 60℃, (b) 65℃, or (c) 70℃ (열처리시간 10min, Scale bar = 1μm.)
- 도 3은 베타락토글로불린의 열처리 온도에 따른 나노에멀전의 전자현미경 사진 (a) 45℃, (b) 55℃, (c) 75℃, or (d) 85℃ (열처리시간 10min, Scale bar = 1μm.)
- 도 4는 실시예 및 비교예의 제타전위 값(Columns with different letters are significantly different(p<0.05).)
- 도 5는 알긴산 농도에 따른 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 전자현미경 사진 (a) 0.07%, (b) 0.08%, and

(c) 0.09% (베타락토글로불린의 열처리 온도 65℃ * 10 min, Scale bar = 1μm.)

도 6은 알긴산 농도에 따른 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 전자현미경 사진 (a) 0%, (b) 0.01%, (c) 0.03%, (d) 0.05% (베타락토글로불린의 열처리 온도 65℃ * 10 min, Scale bar = 1μm.)

도 7은 염화칼슘의 농도에 따른 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 투과전자현미경 사진 (a) 1mM CaCl₂, (b) 2mM CaCl₂, (c) 3mM CaCl₂, (d) 4mM CaCl₂, (e) 5mM CaCl₂, and (f) 6mM CaCl₂. (베타락토글로불린의 열처리 온도 65℃ * 10 min, Scale bar = 1μm.)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하에서 본 발명을 실시 예 및 시험 예를 통하여 더욱 상세히 설명하나 본 발명이 이들 예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

본 발명의 코엔자임 Q₁₀ 함유 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전은 내부젤화 기법을 이용하여 제조하였다.

[실시예 1]

항온수조(water bath, DAIHAN scientific Co., Ltd, Korea)에서 60℃로 10분간 열처리 된 베타락토글로불린 (0.98%, w/v) 용액을 얼음물에서 5℃로 냉각 시킨 후 베타락토글로불린(0.98%, w/v) 용액과 알긴산 용액의 상호 비율을 각각 0.98 : 0.01(%, w/w)비로 혼합하였다. 혼합 된 베타락토글로불린/알긴산 용액 9ml에 0.45g의 Tween 80 (5%, w/v) 계면활성제를 첨가한 뒤 교반기(stirring, DAIHAN scientific Co., Ltd, Korea)를 이용해 5분간 교반하여 5%의 Tween 80 계면활성제를 포함한 9ml의 베타락토글로불린/알긴산 혼합용액을 제조하였다. 상기 혼합용액에 코엔자임 Q₁₀(0.5mg/ml)이 포함된 오일 3ml를 각각 첨가 한 후 균질기(Homognizer, DAIHAN scientific Co., Ltd, Korea)를 이용하여 600rpm 에서 5분간 혼합한 뒤, 초음파발생장치(Ultrasonic sonicator, BANDELIN electronic Co., Ltd, Germany)를 이용해 70, 50, 30W 각각 3분간 실행하였다. 초음파 처리를 한 에멀전 최종용액 12mL에 1M(몰농도, mol/L)의 염화칼슘을 48μl(4mM) 첨가하여 교반기를 이용해 5분간 교반하였다. 도 1 에 제조과정을 나타내었다.

[실시예 2~9]

실시예 1의 방법으로 제조하되 표 1의 함량 및 제조조건대로 하여 제조하였다.

[표 1] 실시예 및 비교예의 제조조건

예	β-Ig-Alginate 의 함량비		β-Ig-Alginate 9ml에 대한 Tween 80의 첨가량(g)	β-Ig-Alginate 9ml + CO-Q ₁₀ 3ml 에 대한 염화칼슘 첨가량(μl)	열처리온도 (℃)
	β-Ig	Alginate			
비교예1	0.98	0.00	0.45	48	60
비교예2	0.98	0.00	0.45	48	65
비교예3	0.98	0.00	0.45	48	70
실시예1	0.98	0.01	0.45	48	60
실시예2	0.98	0.01	0.45	48	65
실시예3	0.98	0.01	0.45	48	70
실시예4	0.98	0.03	0.45	48	60
실시예5	0.98	0.03	0.45	48	65
실시예6	0.98	0.03	0.45	48	70
실시예7	0.98	0.05	0.45	48	60
실시예8	0.98	0.05	0.45	48	65
실시예9	0.98	0.05	0.45	48	70

[0043] [비교예 1]

[0044] 항온수조(water bath, DAIHAN scientific Co., Ltd, Korea)에서 60℃로 10분간 열처리 된 베타락토글로불린 (0.98%,w/v) 용액을 얼음물에서 5℃로 냉각 시킨 후 베타락토글로불린(0.98%,w/v)용액 9ml에 0.45g의 Tween 80(5%, w/v) 계면활성제를 첨가한 뒤 교반기(stirring, DAIHAN scientific Co., Ltd, Korea)를 이용해 5분간 교반하여 5%의 Tween 80(5%, w/v) 계면활성제를 포함한 9ml의 베타락토글로불린 용액을 제조하였다. 상기 용액에 코엔자임 Q₁₀(0.5mg/ml)이 포함된 오일 3ml를 각각 첨가 한 후 균질기(Homogrizer, DAIHAN scientific Co., Ltd, Korea)를 이용하여 600rpm에서 5분간 혼합 한 뒤, 초음파발생장치(Ultrasonic sonicator, BANDELIN electronic Co., Ltd, Germany)를 이용해 70, 50, 30W 각각 3분간 실행하였다. 초음파 처리를 한 에멀전 최종 용액 12mL에 1M(몰농도, mol/L)의 염화칼슘을 48μl(4mM) 첨가하여 교반기를 이용해 5분간 교반하였다.

[0045] [비교예 2-3]

[0046] 비교예 1의 방법으로 제조하되, 표 1의 함량 및 제조 조건대로 하여 제조하였다.

[0047] 상기 실시예1~9 및 비교예1~3에서 제조한 나노에멀전을 하기 시험에 1~6 와 같이 시험하고 평가하였다.

[0048] [시험에 1 : 입자크기 및 제타전위 측정]

[0049] 실시예 1~9 및 비교예 1~3에서 제조한 나노에멀전의 입자크기 및 제타전위를 측정하였다. 입자크기 및 제타전위는 전기영동 광산란측정기(electrophoretic light scattering spectrophotometer, ELS-8000, Otuska Electronics, Japan)을 사용하여 측정하였다. 앞에서 제조된 실시예 및 비교예의 나노에멀전 용액을 1%(v/v) Tween 80 용액과 1:9(w/w) 비율로 희석 시킨 후, 에멀전 입자크기 및 제타전위 측정 시에는 각각 (scattering) 각을 90도와 20도로 고정하고 He-Ne 레이저로 측정하였다. 입자크기의 결과를 표 2에 나타내었고 제타전위 측정결과 는 도 4에 나타내었다.

[0050] [표 2] 실시예 1~9 및 비교예 1~3에서 제조한 나노에멀전의 입자크기

예	β-lg-Alginate 의 함량비		β-lg-Alginate 9ml에 대한 Tween 80의 첨가량(g)	β-lg-Alginate 9ml + CO-Q ₁₀ 3ml 에 대한 염화칼슘 첨가량(μl)	열처리 온도 (℃)	평균 크기 (3회측정 평균, nm)
	β-lg	Alginate				
비교예1	0.98	0.00	0.45	48	60	173.5 ±9
비교예2	0.98	0.00	0.45	48	65	182.6 ±3
비교예3	0.98	0.00	0.45	48	70	210.0 ±11
실시예1	0.98	0.01	0.45	48	60	172.8 ±18
실시예2	0.98	0.01	0.45	48	65	204.3 ±19
실시예3	0.98	0.01	0.45	48	70	225.0 ±4
실시예4	0.98	0.03	0.45	48	60	163.6 ±14
실시예5	0.98	0.03	0.45	48	65	196.1 ±11
실시예6	0.98	0.03	0.45	48	70	206.3 ±8
실시예7	0.98	0.05	0.45	48	60	167.0 ±13
실시예8	0.98	0.05	0.45	48	65	185.8 ±25
실시예9	0.98	0.05	0.45	48	70	238.5 ±7

[0051]

[0052] [표 2]에서도 알 수 있듯이, 각각의 알긴산 농도에서 열처리 온도가 60℃에서 70℃로 증가함에 따라 입자의 크기는 170nm 에서 240nm로 유의적(p<0.05)으로 증가 하였다.

[0053] 열처리 온도가 60℃ 에서 70℃로 증가하면 베타락토글로불린은 3차원 구조에 변형이 일어나(unfolding), 내부에 있던 소수성 아미노산 잔기들을 노출시키고, 베타락토글로불린 입자들 간의 소수성 상호작용을 증가시켜 좀 더 많은 입자들 간의 부분적인 군집화가 활성화 될 수 있다. 또한 가교제인 CaCl₂가 첨가됨에 따라 베타락토글로불린 군집간의 정전기적 반발력을 감소시켜, 결과적으로 열처리 온도 증가에 따라 나노에멀전의 입자크기가 증가 되었다고 사료된다.

[0054] 도 4는 제타전위를 측정한 결과이다. 제조된 모든 나노에멀전은 -5 mV 에서 -13 mV 사이의 음극(negative)의 제타전위 값을 가졌으며, 나노에멀전 입자들의(droplets) 표면이 음전하를 띄는 것을 알 수 있었다.

[0055] 알긴산의 카르복실기(COOH)의 해리상수(pKa) 는 3.4 ~ 3.7이고 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전이 제조된

pH 7에서는 β -1,4-D-mannuronic acid(M)의 형태보다 α -1,4-L-glucuronic acid의 카르복실기(COO-) 형태로 존재한다. 또한 베타락토글로불린의 등전위점은 pH 5.3(Line et al., 2005 ; Jones et al., 2009)이기 때문에 pH 7에서 베타락토글로불린은 음전하를 가진다. 결과적으로 pH 7에서 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전은 음전하를 띄게 되고 에멀전 입자들간의 정전기적 반발력(electrostatic repulsion)이 일어나 에멀전의 안정성(stability)에 향상에 도움을 줄 것이라고 사료된다.

[0056] 베타락토글로불린은 열처리를 하게 되면 내부에 있던 소수성 아미노산들이 외부로 노출이 된다. 따라서 열처리 온도가 60℃에서 70℃로 증가함에 따라 단백질의 3차원 구조에 변형이 일어나(unfolding)는 부분 변성으로 내부에 존재하던 소수성을 가진 아미노산들이 외부로 더 많이 노출이 되어 제타전위의 값은 증가한다고 사료된다.

[0057] [시험예 2 : 나노에멀전의 코엔자임 Q₁₀ 포집효율 측정]

[0058] 실시예 1~9 및 비교예 1~3에서 제조한 나노에멀전의 코엔자임 Q₁₀ 포집효율(encapsulation efficiency, EE) 측정은 Kwon et al., (2002)의 논문을 참고하여 고성능액체크로마토그래프(HPLC, Waters Technologies Co. Ltd.)를 이용해 수행되었다. 제조된 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전을 초고속 원심분리기(Optima XL-100K, Beckman Coulter, USA)를 사용하여 40,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리 하였다. 상부의 오일층과 하부의 침전 물질 사이에 있는 수용액을 주사기를 이용해 분리한 다음 HPLC로 분석하였다. 코엔자임 Q₁₀ 포집효율은 Chen & Subirade(2006)의 논문을 참고하여 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{포집효율 (\%)} = \frac{\text{코엔자임 Q}_{10}\text{의 총량} - \text{포집되지 않은 코엔자임 Q}_{10}\text{의 양}}{\text{코엔자임 Q}_{10}\text{의 총량}} \times 100$$

[0059]

[0060] HPLC의 조건은 다음과 같다.

파라미터	조건
컬럼(Column)	Xbridge C18 3.5 μ m 4.6 $\times$ 150mm column
디텍터(Detector)	UV / VIS 275nm
이동상(Mobile phase)	methanol : ethanol = 4 : 6 (v/v)
유속(Flow rate)	1.2 ml/min
주입량(Injection volume)	20 μ l

[0061]

[0062] 포집효율 결과는 [표 3] 과 같다.

[0063] [표 3] 실시예 및 비교예의 평균포집효율

예	β -lg-Alginate의 함량비		β -lg-Alginate 9ml에 대한 Tween 80의 첨가량(g)	β -lg-Alginate 9ml + CO-Q ₁₀ 3ml에 대한 염화칼슘첨가량(μ l)	열처리 온도 (℃)	평균포집효율 (3회 측정평균, %)
	β -lg	Alginate				
비교예1	0.98	0.00	0.45	48	60	70.00 $\pm$ 5
실시예1	0.98	0.01	0.45	48	60	75.00 $\pm$ 3
실시예4	0.98	0.03	0.45	48	60	77.00 $\pm$ 3
실시예7	0.98	0.05	0.45	48	60	79.33 $\pm$ 6
비교예2	0.98	0.00	0.45	48	65	74.07 $\pm$ 3
실시예2	0.98	0.01	0.45	48	65	78.00 $\pm$ 4
실시예5	0.98	0.03	0.45	48	65	78.27 $\pm$ 4
실시예8	0.98	0.05	0.45	48	65	79.87 $\pm$ 4
비교예3	0.98	0.00	0.45	48	70	76.40 $\pm$ 3
실시예3	0.98	0.01	0.45	48	70	79.00 $\pm$ 3
실시예6	0.98	0.03	0.45	48	70	79.00 $\pm$ 4
실시예9	0.98	0.05	0.45	48	70	80.93 $\pm$ 3

[0064]

[0065] [표 3]은 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 제조공정요인인 열처리 온도와 알긴산 농도가 코엔자임 Q₁₀의 포집효율에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

- [0066] 60℃ 와 65℃에서 열처리 된 나노에멀전에서 알긴산 농도가 0% 에서 0.05%로 증가함에 따라 코엔자임 Q₁₀의 포집 효율은 70% 에서 80%로 유의적으로(p<0.05) 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 온도가 60℃, 65℃, 70℃로 갈수록 포집효율이 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0067] 결과적으로 pH 7 에서의 알긴산의 카르복실기(COOH)의 pKa는 3.4 ~ 3.7이기 때문에 α-1,4-L-글루쿠론산(COO⁻)의 형태로 존재하며, 베타락토글로불린의 아미노산 등전위점(iso-electric point ,pI) 또한 5.2이기 때문에 음전하로 존재한다. 따라서 소수성 기능성물질인 코엔자임 Q₁₀이 베타락토글로불린과 소수성 결합을 이루고, 음전하를 띄는 베타락토글로불린과 알긴산에 가교제인 CaCl₂를 첨가하면 매트릭스를 이루어 코엔자임 Q₁₀이 포집된다. 또한, 알긴산의 농도가 증가 할수록 CaCl₂와 알긴산 간의 에그 박스(egg box) 형태의 복합체를 많이 이루게 되어 좀 더 단단한 계면 막을 형성한다. 따라서 포집 된 소수성 기능성 물질인 코엔자임 Q₁₀의 추가적인 보호능력으로 포집효율이 증가 한 것으로 사료된다.
- [0068] [시험예 3 : 베타락토글로불린의 열처리 온도에 따른 나노에멀전의 형태학적 특성 비교]
- [0069] 실시예 1~9 및 비교예 1~3에서 제조한 나노에멀전에서 베타락토글로불린의 열처리온도에 따른 나노에멀전의 형태는 투과전자현미경을 이용하여 관찰되었다. 그 결과 150nm 에서 200nm 크기의 구형의 나노에멀전이 성공적으로 형성되었으며, 열처리온도가 60℃ 에서 70℃로 증가함에 따라 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 입자크기도 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(도 2). 60℃로 처리된 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 전자현미경 사진(도 2-a)에서는 150nm 에서 170nm 크기의 나노에멀전 입자가 관찰되었음을 확인 하였고, 반면 70℃의 전자현미경사진(도 2-c)에서는 구형의 형태로 180nm 에서 210nm 크기의 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전이 형성되었음을 관찰 할 수 있었다. 그러나, 45℃, 55℃, 75℃ 및 85℃ 에서 열처리 된 처리구의 전자현미경사진(각각 도 3-a, b, c 및 d)에서는 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전이 형성되지 않았다.
- [0070] [시험예 4 : 알긴산 농도에 따른 나노에멀전의 형태학적 특성 비교]
- [0071] 알긴산 농도가 0% 에서 0.05% 로 증가함에 따라 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 입자크기는 190nm 에서 220nm로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 0% 알긴산이 처리된 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 전자현미경사진(도 6-a)에서는 190nm 에서 210nm 크기의 나노에멀전이 관찰되었다. 반면, 0.05% 알긴산이 처리된 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 전자현미경사진(도 6-d)에서는 220nm 에서 240nm의 나노에멀전이 생성되었으며, 상대적으로 많은 군집화가 이루어진 것을 관찰하였다.
- [0072] 그러나, 알긴산 농도를 각각 0.07%, 0.08% 및 0.09% 로 처리된 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 투과전자현미경 사진(도 5- a, b 및 c)에서는 많은 응집(aggregation)이 생겨 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전이 형성되지 않았다.
- [0073] [시험예 5 : 염화칼슘 농도에 따른 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전 형성여부와 형태학적 특성비교]
- [0074] 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 형성에 염화칼슘 농도가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 도 1의 나노에멀전 제조과정에 의해 제조하되 초음파 처리를 한 에멀전 최종용액 12mL에 1M(몰농도, mol/L)의 염화칼슘을 12μL(1mM), 24μL(2mM), 36μL(3mM), 48μL(4mM), 60μL(5mM), 72μL(6mM) 농도로 각각 다르게 처리하여 제조한 나노에멀전을 투과전자현미경으로 형성여부를 확인하였다(도 7).
- [0075] 염화칼슘의 농도 4mM 에서는 150nm 에서 200 nm 크기의 구형의 나노에멀전이 성공적으로 형성되었다(도 7-d). 그러나 염화칼슘의 농도를 1mM, 2mM, 3mM, 5mM 및 6mM 처리구에서는 나노에멀전이 전혀 형성되지 않았으며, 응집(aggregation)이 된 것을 확인 할 수 있었다(도 7- a, b, c, e 및 f). 결과적으로, 가교제인 CaCl₂ 농도가 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전 형성에 중요한 요인임을 확인 할 수 있었다.
- [0076] [시험예 6 : 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 입자크기, 포집효율 분산분석(ANOVA, Analysis of variance)]
- [0077] 하기 표4와 표5는 나노에멀전 제조공정 요인인 열처리 온도와 알긴산 농도가 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 입자크기와 코엔자임 Q₁₀의 포집효율에 영향을 미치는지 알아보기 위해 분산분석을 이용하여 통계처리한 결과이다. 그 결과 열처리 온도가 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 입자크기에 유의적 영향(p<0.01)을 준다는 것을 확인하였다. 그러나 나노에멀전의 입자크기에 알긴산 농도는 유의적 영향을 주지 않았다(표 4).
- [0078] 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 코엔자임 Q₁₀의 포집효율은 나노에멀전 제조공정 요인인 열처리 온도와

알긴산 농도가 모두 유의적 영향을 준다는 것을 확인 할 수 있었다(표 5). 그러나 mean squares 값을 비교해 보았을 때 열처리온도보다 알긴산의 농도가 코엔자임 Q₁₀의 포집효율에 더 큰 영향을 준다는 것을 확인 할 수 있었다. 결과적으로 열처리온도와 알긴산의 농도가 각각 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 입자크기와 코엔자임 Q₁₀의 포집효율을 조절하는 제조 공정요인임을 알 수 있었으며, 나노에멀전의 코엔자임 Q₁₀의 포집효율 증가시키는데 있어 열처리 온도보다 알긴산의 농도가 중요한 요인임을 알 수 있었다.

[표 4] 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 입자크기에 영향을 주는 요인분석

Processing variables	df	Mean squares	P-value
Heating temperature	2	7741.88	0.0016**
Alginate concentration	3	331.46	0.4665
Error	6	4.46	
R ²	0.8		

** P < 0.01

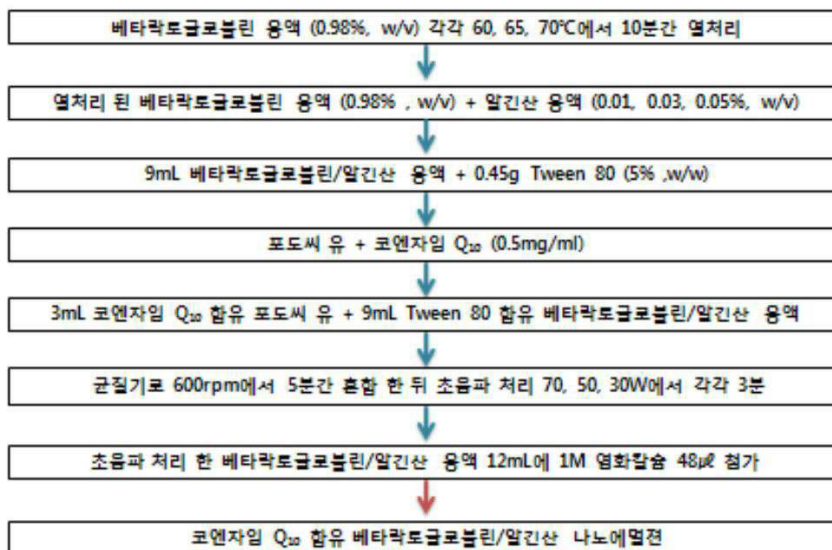
[표 5] 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 코엔자임 Q₁₀ 포집효율에 영향을 주는 요인분석

Processing variables	df	Mean Squares	P-value
Heating temperature	2	34.75	0.0214*
Alginate concentration	3	67.85	0.0033**
Error	6	4.46	
R ²	0.56		

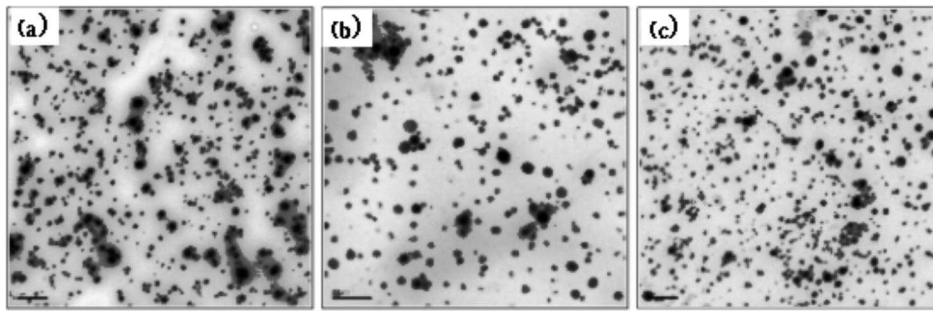
* P < 0.05, ** P < 0.01

도면

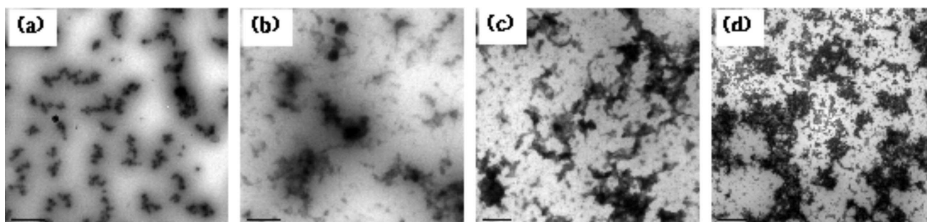
도면1



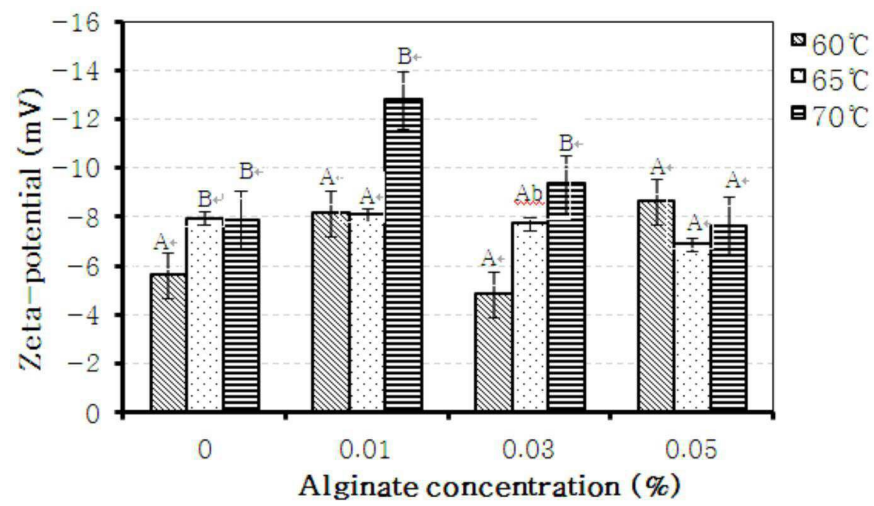
도면2



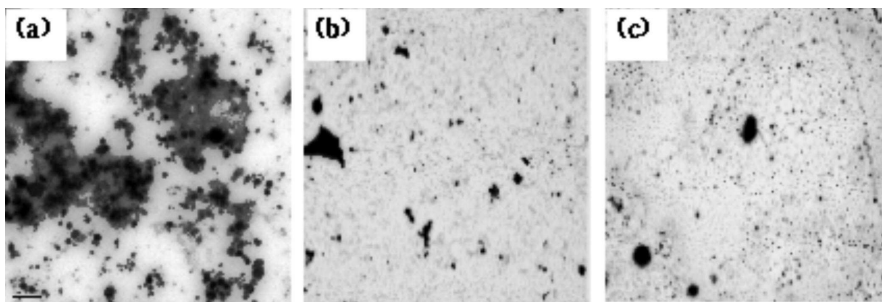
도면3



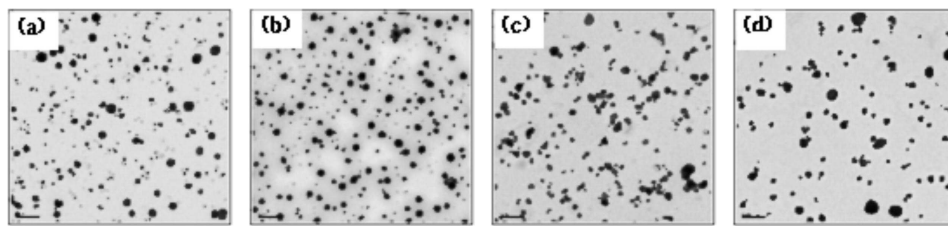
도면4



도면5



도면6



도면7

