

## ARTICLE

# 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체 제조 및 물리화학적 특성연구

하호경<sup>1</sup> · 김진욱<sup>1</sup> · 한경식<sup>2</sup> · 윤송섭<sup>3</sup> · 이미령<sup>4</sup> · 이원재<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 동물생명과학과(농업생명과학연구원), <sup>2</sup>삼육대학교 동물생명자원학과, <sup>3</sup>(주)이담, <sup>4</sup>대구대학교 식품영양학과

## Development and Characterization of a Hydrolyzed Goat Milk Protein/Chitosan Oligosaccharide Nano-Delivery System

Ho-Kyung Ha<sup>1</sup>, Jin Wook Kim<sup>1</sup>, Kyoung-Sik Han<sup>2</sup>, Sung Seob Yun<sup>3</sup>, Mee-Ryung Lee<sup>4</sup>, and Won-Jae Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Animal Bioscience (Institute of Agriculture and Life Science), Gyeongsang National University, Jinju, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Animal Biotechnology and Resource, Sahmyook University, Seoul, Korea

<sup>3</sup>R&D Center, Edam Co., Ltd, Okcheon, Korea

<sup>4</sup>Dept. of Food and Nutrition, Daegu University, Gyeongsan, Korea

Received: September 15, 2017  
Revised: September 25, 2017  
Accepted: September 26, 2017

\*Corresponding author :  
Won-Jae Lee

Dept. of Animal Bioscience (Institute of Agriculture and Life Science), Gyeongsang National University, Jinju Korea.  
Tel : +82-55-772-1884,  
Fax : +82-55-772-1889,  
E-mail : wjleewisc@gnu.ac.kr

Copyright © 2017 Korean Society of Milk Science and Biotechnology.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

The aims of this study were to manufacture a hydrolyzed goat milk protein (HGMP)/chitosan oligosaccharide (CSO) nano-delivery system (NDS) and to investigate the effects of production variables, such as sodium tripolyphosphate (TPP), HGMP, and CSO concentration levels, on the formation and physicochemical properties of the NDS. An HGMP/CSO NDS was produced using the ionic gelation method at pH 5.5. Transmission electron microscopy and a particle size analyzer were used to determine the morphological and physicochemical properties of NDSs, respectively. The size of the HGMP/CSO NDS decreased from 225 to 138 nm as HGMP and CSO concentration levels decreased. The NDS had a positive surface charge, with a zeta-potential value of +23 mV. The encapsulation efficiency (EE) of docosahexaenoic acid was enhanced as the HGMP concentration level increased. Additionally, increasing the concentration level of CSO resulted in an increase in the EE of resveratrol. The HGMP/CSO NDS exhibited good physical stability during freeze-drying. Thus, our findings showed that the HGMP/CSO NDS was successfully manufactured and that HGMP and CSO concentration levels were key factors affecting the physicochemical properties of the NDS.

### Keywords

hydrolysed goat milk protein, chitosan oligosaccharide, nano delivery system

## 서론

나노 전달체(nano delivery system)는 약 1~200 nm 크기를 지니는 운반체(carrier)로 건강기능성 물질을 포집하고 보호할 수 있다(Fathi *et al.*, 2012). 특히 나노 전달체는 1  $\mu$ m 이상 크기를 지니는 미세입자에 비해 입자크기가 작고 넓은 표면적을 지니고 있어, 구강 섭취 시 위장관에서 머무는 시간이 길고, 소장 점막 부착율이 높아 소장 상피세포와 상호작용이 증가되어 건강기능성 물질의 생체이용률을 향상시킬 수 있다(Acosta, 2009; Ha *et al.*, 2015). 특히 최근에는 식품 적용을 위하여 합성물질이 아닌 generally recognized as safe(GRAS)한 소재인 casein(Semo *et al.*, 2007), whey protein(Ha *et al.*, 2017; Hwang *et al.*, 2017)과 같은 단백질 및 키토산(Ha *et al.*, 2013), 알긴산(Lee *et al.*, 2013)과 같은 다당류를 이용하여 food-grade 나노 전달체 제조에 관한 연구가 널리 수행되고 있다.

산양유는 영양학적 가치가 높고, 단백질 조성이 모유와 유사할 뿐만 아니라(Kaminarides and Anifantakis, 1993; Urbiene *et al.*, 1997), 젖소유에 비해 위에서 응유 정도가 적어 소화력(digestibility)이 뛰어나고 상대적으로 알레르기 항원성(allergenicity)이 낮아 알레르기 반응이 적게 나타나는 장점을 지닌다(Park, 1994; Haenlein, 2004). 그러나 산양유에는 젖소유와 마찬가지로 모유에 존재하지 않는 주요 알레르기원인 베타락토글로불린이 존재하며(Haenlein, 2004) 또한 젖소유에 비해 적은양이지만 위에서 응고되어 소화를 방해할 뿐만 아니라 주요 알레르기원으로 작용하는  $\alpha_{s1}$ -카제인이 존재한다(Bernacka, 2011; Jung *et al.*, 2016). 이러한 단점을 개선하기 위해 단백질 분해효소를 이용하여 베타락토글로불린과  $\alpha_{s1}$ -카제인을 포함한 산양유 단백질을 가수분해하여 유단백질의 알레르기 항원성을 저감하는 연구가 수행되었다(Jung *et al.*, 2016). 본 연구에서는 alcalase를 이용하여 베타락토글로불린을 포함한 산양유 단백질을 가수분해시킨 산양유 단백질 가수분해물(hydrolysed goat milk protein, HGMP)의 이용성을 증진시키고, 새로운 기능성 유식품 소재로 활용하기 위하여 소수성 건강기능성 물질(예, DHA, 레스베라트롤)을 전달 가능한 무지방 기반(non-fat based) 나노 전달체를 제조하고자 하였다. 특히 전달체 제조 시 단백질과 함께 펙틴(Ron *et al.*, 2010), 알긴산(Lee *et al.*, 2013) 등과 같은 다당류를 이용할 경우, 추가적인 보호 효과를 제공하기 때문에 건강기능성 물질을 보다 효과적으로 포집, 보호할 목적으로 다당류인 키토올리고당(chitosan oligosaccharide)을 이용하여 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노복합체를 제조하고자 하였다. 단백질과 탄수화물은 정전기적 상호작용, 소수성 결합, 수소결합 등에 의해 복합체(complex)를 형성할 수 있으며, 특히 단백질-탄수화물간 정전기적 인력 작용(electrostatic attraction)을 통해 정전기적 복합체(electrostatic complex)를 형성할 수 있다(Schmitt and Turgeon, 2011). 단백질과 탄수화물의 정전기적 인력작용에는 단백질/탄수화물의 전하에 영향을 미치는 pH와 이온강도뿐만 아니라, polymer 농도 및 비율이 매우 중요한 영향을 미친다(Doublier *et al.*, 2000). 따라서 본 연구에서는 이러한 정전기적 인력작용에 영향을 미치는 나노 전달체 제조 공정요인(pH, 가교제농도, polymer 농도 등)이 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체의 형성뿐만 아니라, 입자 크기, 표면전하, 건강기능성 물질 포집 효율 등과 같은 물리화학적 특성에 중요한 영향을 미칠 것이라는 가설을 설정하였다. 본 연구의 목적은 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체를 제조하고, 제조 공정요인(pH, 가교제농도, 산양유 단백질 분해물 농도, 키토올리고당농도)이 형성된 나노 전달체의 물리화학적 특성에 어떠한 영향을 미치는지 규명하는 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

산양유 단백질 분해물(hydrolysed goat milk protein, HGMP)은 Jung 등(2016)의 방법에 따라 alcalase를 이용하여 산양유 단백질을 가수분해하여 준비하였고, 키토올리고당은 Amicogen Inc.에서 제공받아 실험에 이용하였다. Sodium tripolyphosphate(TPP), docosahexaenoic acid(DHA), 레스베라트롤(resveratrol)은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하였다.

### 2. 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체 제조

산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체는 modified ionic gelation 방법(Ha *et al.*, 2013)을 이용하여 제조하였다. 우선 산양유 단백질을 증류수에 용해시켜 다양한 농도(0.02, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6%, w/v)의 산양유 단백질 분해물 수용액을 준비한 뒤 probe-type 초음파처리기(Sonoplus HD 3100, Bandelin, Germany)를 이용하여 50 W에서 90초간 초음파 처리하였다. 초음파 처리된 산양유 단백질 분해물 수용액과 키토올리고당 수용액을 혼합하여 다양한 농도의 산양유 단백질 분해물(최종농도: 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3%, w/v)/키토올리고당(최종농도: 0.01, 0.05, 0.1, 0.2%, w/v) 혼합용액을 준비한 후, 0.1 M HCl을 이용하여 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 혼합액의 pH를 조절하였다(최종 pH: 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0). 그런 다음 나노 전달체 제조를 위해 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 20 mL에다 교제인 0.1 M TPP를 각각 0, 20, 40, 60, 100  $\mu$ L 처리(TPP 최종농도: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mM)하였다. 소수성 건강기능성 물질(DHA 및 레스베라트롤)을 나노 전달체에 포집하기 위해서 각각 20 mg/mL와 5 mg/mL 농도로 에탄올에 용해시킨 DHA와 레스베라트롤 용액 200  $\mu$ L를 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 혼합액 19.8 mL에 첨가하고, 0.1 M HCl을 이용하여 pH를 5.5로 조절한 후 가교제인 0.1 M TPP 20  $\mu$ L를 처리하였다.

### 3. 나노 전달체의 형태학적 특성 평가

나노 전달체의 형태학적 특성은 투과전자현미경(transmission electron microscopy, TEM, phillips Tecnai 12, Philips, Netherlands)을 이용하여 측정하였다. 제조된 나노 전달체는 증류수를 이용하여 10배희석 후 카본코팅된 200-mesh copper grid 위에 올린 다음 2% uranyl acetate를 이용하여 90초간 음성염색(negative staining)하였다. 그런 다음 염색된 그리드를 투과전자현미경에 삽입하여 120 kV에서 나노 전달체의 형성 유무와 형태를 관찰하였다.

### 4. 나노 전달체의 물리화학적 특성 분석

산양유 단백질 분해물의 분산 정도와 제조된 나노 전달체의 입자 크기(particle size), 다분산지수(polydispersity index), 제타 전위(zeta-potential)는 입도 분석기(particle size analyzer, Nano-ZS, Malvern, UK)를 이용하여 측정하였다. 나노 전달체 현탁액을 증류

수를 이용하여 2배 희석한 후 173°의 scattering angle에서 입자 크기와 다분산지수를 측정하였다. 제타전위는 나노 전달체 현탁액 1 mL를 zeta-potential cuvette에 넣고, electrophoretic mobility ( $\mu\text{m/s}$ )를 측정한 후 Smoluchowski equation을 이용하여 제타전위 값으로 변환하여 얻었다.

## 5. 소수성 건강기능성 물질 포집 효율 측정

본 연구에서 이용한 소수성 건강기능성 물질인 DHA와 레스베라트롤의 포집 효율(encapsulation efficiency, EE, %)은 변형된 Ha 등(2013)의 원심분리 방법을 이용하여 평가하였다. 포집 효율 측정을 위해 DHA 또는 레스베라트롤을 함유한 나노 전달체 현탁액을 10,000 g에서 30분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과한 다음 상층액 내 free(포집되지 않은) DHA와 레스베라트롤 함량을 C<sub>18</sub> 컬럼(Gemini-NX C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm, Phenomenex, USA)이 장착된 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC, Agilent 1260 Series, Agilent Technologies, USA)를 이용하여 측정하였다. DHA 분석을 위한 이동상은 acetonitrile/methanol/water 혼합액(75:11:14, v/v/v)을 이용하였고, 레스베라트롤 0.5% (v/v)는 아세트산메탄올/증류수(52:48, v/v) 혼합액을 이용하여 측정하였다. DHA와 레스베라트롤의 검출파장은 각각 400 nm 및 303 nm로 설정하였고, DHA와 레스베라트롤 표준용액을 이용한 표준곡선을 사용하여 상층액 내의 free DHA와 레스베라트롤 함량을 계산한 후 아래의 식에 대입하여 포집 효율을 계산하였다.

$$EE(\%) = \frac{\text{첨가한 건강기능성 물질 농도} - \text{상층액 내 건강기능성 물질 농도}}{\text{첨가한 건강기능성 물질 농도}} \times 100$$

## 6. 나노 전달체의 동결 건조

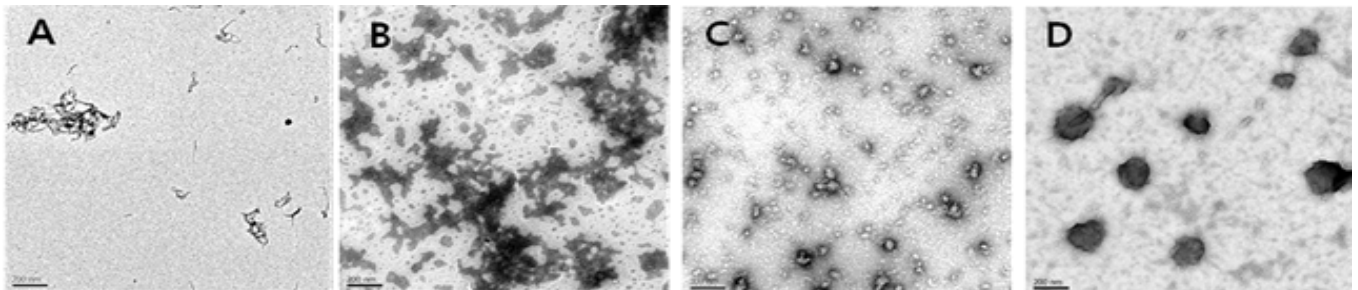
제조된 나노 전달체의 분말화 공정은 동결건조기(FD-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Japan)를 이용하여 수행되었다. 제조된 나노

전달체 현탁액을 -80°C에서 12시간 동결시킨 후 동결건조기를 이용하여 3일간 건조하였다. 분말화 된 나노 전달체는 1 mg/mL 농도로 증류수에 분산시킨 후, 입도 분석기를 이용하여 입자크기 및 다분산지수를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체의 형태학적 특성

나노 전달체 제조 공정을 확립하기 위해 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 복합체 형성에 영향을 미치는 제조 공정요인(pH, 가교제농도, 단백질/탄수화물 농도)에 따른 나노 전달체의 형성 및 형태학적, 물리화학적 특성을 연구하였다. pH는 산양유 단백질 분해물과 키토올리고당 간 정전기적 결합을 변화시킬 수 있다. 또한 음전하를 띠는 가교제인 TPP 첨가는 양전하를 띠는 키토올리고당의 아미노기와 이온 결합을 유도하여 나노 전달체 형성에 영향을 미친다(Chen and Subirade, 2005). 제조 공정요인에 따른 나노 전달체의 형성 유무와 형태학적 특성은 투과전자현미경을 이용하여 평가하였다(Fig. 1~3). pH에 따른 나노 전달체의 형성 유무와 형태학적 특성을 측정 한 결과, pH 4.0과 4.5 조건에서는 1  $\mu\text{m}$  이상 크기의 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 응집체(large aggregate)가 형성되었고, pH 6.0에서는 응집이 거의 발생하지 않은 반면, pH 5.0과 5.5에서는 약 100~200 nm 크기의 구형의 입자가 성공적으로 제조된 것을 확인하였다(data not shown). 특히 pH 5.0에 비해 pH 5.5에서 더 작고 균일한 나노 전달체 형성이 관찰되었기 때문에, 나노 전달체 제조의 최적 pH를 5.5로 선택하고, 추후 연구에 이용하였다. 최적 pH인 5.5에서 가교제인 TPP 농도(0, 0.1, 0.3, 0.5 mM)에 따른 나노 전달체의 형태학적 특성 측정 결과, TPP를 0.5 mM 처리 시 큰 응집체가 형성된 반면, TPP 농도 0.3 mM 이하에서는 200 nm 이하의 구형의 나노 전달체가 형성되었다(data not shown). 특



**Fig. 1.** Impacts of hydrolysed goat milk protein (HGMP) concentration level on the morphological properties of hydrolysed goat milk protein/chitosan oligosaccharide (CSO) nano delivery systems. HGMP solutions (0.01 (A), 0.05 (B), 0.1 (C), and 0.2% (w/v) (D)) were mixed with CSO solutions (0.1%, w/v) and adjusted to pH 5.5 followed by treatment with 0.1 mM TPP. Scale bar = 200 nm.

히 0.1 mM TPP 처리시 가장 작고 균일한(homogeneous) ~100 nm의 나노 전달체가 형성되었다(data not shown).

산양유 단백질 분해물 농도와 키토올리고당 농도에 따른 나노 전달체의 형태학적 특성 측정 결과는 각각 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. 산양유 단백질 분해물 농도가 0.01과 0.05%(w/v)에서는 나노 전달체가 형성되지 않은 반면(Fig. 1A, Fig. 1B), 0.1%(w/v) 이상 농도의 산양유 단백질 분해물이 이용된 경우, 나노 전달체가 성공적으로 형성되었다(Fig. 1C, Fig. 1D). 키토올리고당 농도의 경우, 0.01% (w/v)에서는 나노 전달체가 형성되지 않았으나(Fig. 2A), 0.05~0.2%(w/v) 농도에서는 구형의 나노 전달체가 성공적으로 제조되었음을 확인하였다(Fig. 2B~2D).

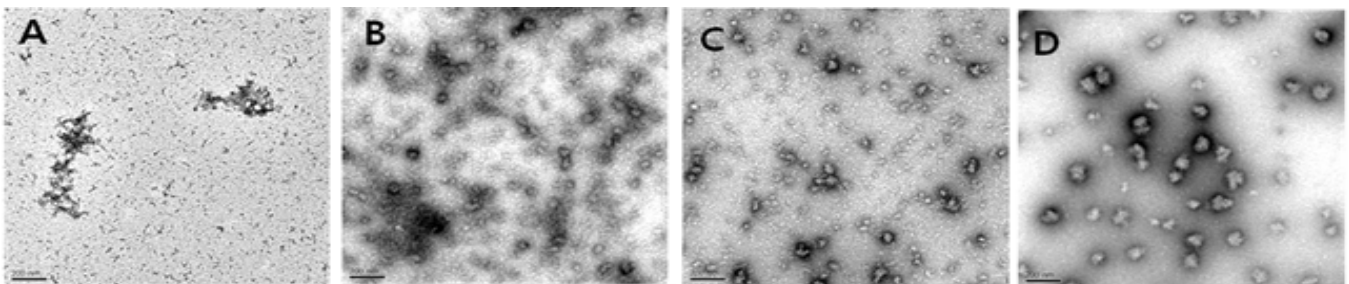
## 2. 나노 전달체의 물리화학적 특성

제조 공정요인에 따른 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체의 물리화학적 특성은 입도 분석기를 이용하여 입자크기, 다분산지수, 제타전위 측정을 통해 평가하였다. 최적 pH인 5.5에서 가교제인 TPP 농도에 따른 나노 전달체의 물리화학적 특성 측정 결과, TPP를 쓰지 않았을 경우, 179 nm 크기와 0.305의 다분산지수를 지닌 나노 전달체가 형성된 반면, TPP를 0.1~0.2 mM 첨가하였을 경우, 입자크기와 다분산지수가 각각 141~148 nm와 0.223~0.242로 감소하였다(data not shown). 그러나 TPP를 0.3 mM 처리하였을 경우, 0~2 mM TPP 처리구에 비해 입자크기(294 nm)와 다분산지수(0.394)가 유의적( $P < 0.05$ )으로 증가하였다(data not shown). 다분산지수는 0에서 1 사이 값을 가지고 있는데, 전달체의 다분산지수가 0에 가까울수록 단분산(monodisperse) 분포를, 1에 가까울수록 다분산(polydisperse) 분포를 지니고 있음을 의미하며, 일반적으로 다분산지수 0.3 이하일 경우, 균일(homogeneous)한 입도 분포를 지닌다(Gaumet *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008). 본 실험 결과, 가교제인 TPP를 처리하지 않았을 경우, 다분산지수가 0.3 이상인 반면 TPP를 0.1~0.2 mM 처리시 다분산지수가 0.3 이하로 보다 균일한 입자가 형성되었음을 알 수 있었다. 따라서 보다 작은 크기와 균일한 나노 전달체 형성을 위해서는 0.1~0.2 mM의 TPP 사용이

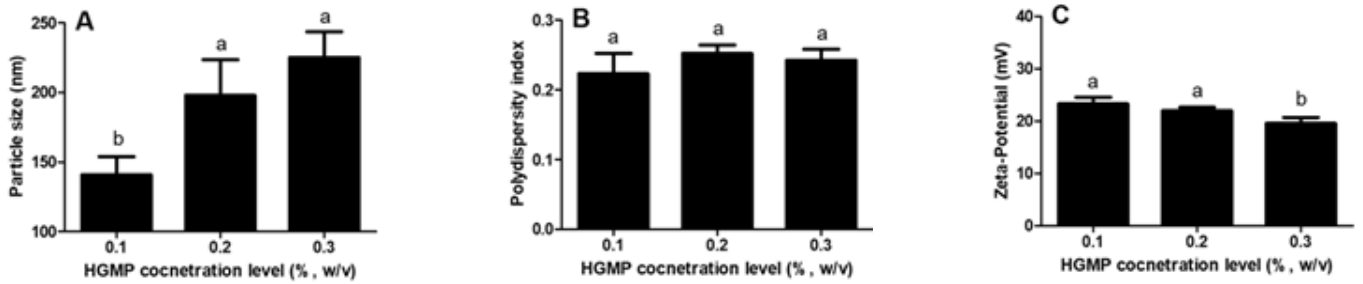
필요하며, 0.1과 0.2 mM간 유의적인 차이는 없으므로 추후 연구에 이용된 나노 전달체 제조에는 0.1 mM 농도의 TPP가 이용되었다. 제타전위 실험의 경우, TPP 농도는 제타전위값에 유의적인 영향을 미치지 않았으며, 나노 전달체들은 약 +22.0~23.3 mV 제타전위값을 지니고 있었다(data not shown). 결과적으로 제조된 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체는 양전하의 표면 전하를 지님을 확인하였다.

Fig. 3은 나노 전달체 최적 제조 조건으로 선정된 pH 5.5 및 TPP 농도 0.1 mM에서 산양유 단백질 분해물 농도에 따른 나노 전달체의 물리화학적 특성 결과이다. 산양유 단백질 분해물 농도가 0.1에서 0.3%(w/v)로 증가함에 따라 입자 크기가 141에서 225 nm로 유의적( $P < 0.05$ )으로 증가하였다. 단백질(펩티드)과 다당류 간 결합에는 정전기적 상호작용이 매우 중요하며, 펩티드-다당류간 농도 비율은 이들의 상호작용에 영향을 미치는 중요한 요인으로 알려져 있다(Ye, 2008). Hu 등(2011)의 카제인 유래 생리활성 펩티드/키토산 나노 전달체 연구에 따르면 펩티드와 키토산 농도 비율 변화는 이들의 정전기적 상호작용을 변화시켜 결과적으로 입자크기와 표면전하에 영향을 미친다고 보고하였다. 본 연구에서 이용된 산양유 단백질 분해물은 등전위점이 ~4.4이고(data not shown), 키토올리고당의 pKa는 6.3(Bhattarai *et al.*, 2010)이기 때문에, 나노 전달체 제조의 최적 pH인 5.5에서 산양유 단백질 분해물과 키토올리고당은 각각 음전하와 양전하를 지니고 있다. 따라서 정전기적 인력작용(electrostatic attraction)을 통해 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 복합체를 형성할 수 있으며, 음전하를 띠는 산양유 단백질 분해물량의 증가는 양전하를 띠는 키토올리고당과의 정전기적 인력작용을 통한 association을 향상시켜 결과적으로 더 큰 크기의 나노 전달체가 제조된 것으로 사료된다.

다분산지수의 경우, 산양유 단백질 분해물 농도에 따른 유의적인 차이없이 0.223~0.252로 매우 균일한(homogeneous) 입도 분포를 지닌 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체가 형성되었음을 확인하였고(Fig. 3), 이를 통해 산양유 단백질 분해물 농도는 나노 전달체의 homogeneity에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.



**Fig. 2.** Effects of chitosan oligosaccharide (CSO) concentration level on the morphological properties of hydrolysed goat milk protein (HGMP)/CSO nano delivery systems. HGMP (0.1%, w/v) solutions were mixed with CSO solutions (0.01 (A), 0.05 (B), 0.1 (C), and 0.2% (w/v) (D)) and adjusted to pH 5.5 followed by treatment with 0.1 mM TPP. Scale bar = 200 nm.



**Fig. 3.** Impacts of hydrolysed goat milk protein (HGMP) concentration level on the physicochemical properties of HGMP/chitosan oligosaccharide (CSO) nano delivery systems. Particle size (A); Polydispersity index (B); Zeta-potential value (C). Various concentration of HGMP solutions were mixed with 0.1% (w/v) CSO solutions and adjusted to pH 5.5 followed by treatment with 0.1 mM TPP. Different letters on a column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

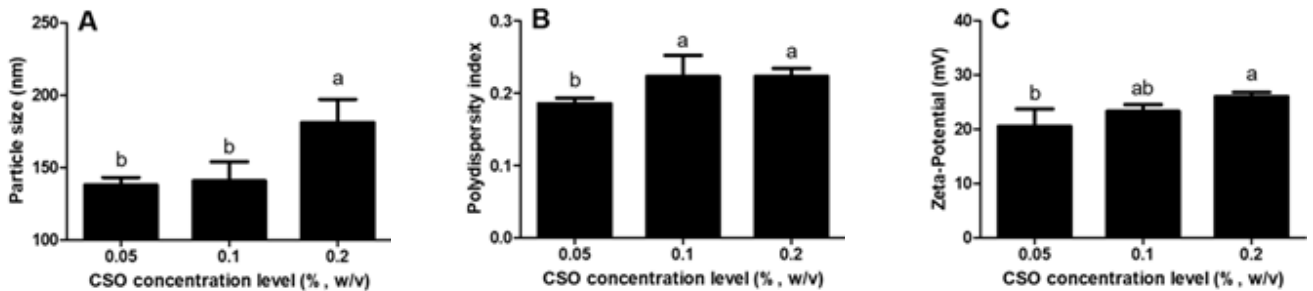
제타전위의 경우, 산양유 단백질 분해물 농도가 증가함에 따라 제타 전위값은 +23.3에서 +19.6 mV로 감소하였는데(Fig. 3), 이러한 결과는 나노 전달체 제조 pH인 5.5에서 음전하를 띠는 산양유 단백질 분해물의 양이 많아짐에 따라, 나노 전달체 표면 전하의 양전하가 줄어든 것으로 사료된다.

나노 전달체 최적 제조 조건인 pH 5.5 및 TPP 농도 0.1 mM에서 키토올리고당 농도에 따른 나노 전달체의 물리화학적 특성 측정 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 키토올리고당 농도를 0.05에서 0.2%(w/v)로 증가시키기에 따라 나노 전달체의 입자크기는 138에서 181 nm로, 제타전위는 +20.6에서 +26.1 mV로 유의적( $P < 0.05$ )으로 증가하였다(Fig. 4). 키토올리고당은 양전하를 띠는 아미노기를 지니고 있어, 음전하를 띠는 산양유 단백질 분해물과 association 할 수 있을 뿐만 아니라 음전하를 띠는 가교제인 TPP를 사용하여 가교결합(cross-linking)될 수 있다(Hu et al., 2008). 키토올리고당 농도 증가에 따른 양전하를 지니는 키토올리고당의 아미노기 증가는 음전하를 띠는 산양유 단백질 분해물과의 정전기적 인력작용을 증진시켜 결과적으로 더 큰 크기의 나노 전달체가 형성된 것으로 사료된다(Fig. 4A). 제타전위 결과의 경우, 키토올리고당 농도의 증가는 나노 전달체 형성에 더 많은 양의 키토올리고당이 관여하게 되고, 결과적으로 제조된

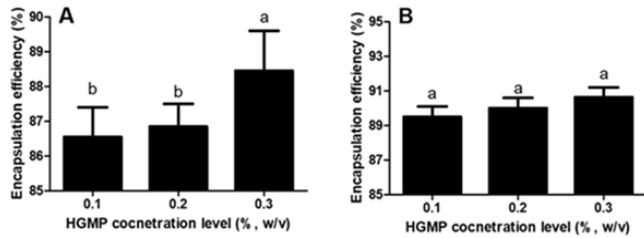
나노 전달체 표면에 존재하는 양전하의 키토올리고당이 더 많이 존재하게 되어, 나노 전달체의 표면전하를 나타내는 제타전위가 증가된 것으로 사료된다(Fig. 4C). 반면, 다분산지수는 키토올리고당 농도에 따른 유의적인 차이 없이 0.186~0.224로 매우 균일한 입도 분포를 지니고 있었으며(Fig. 4B) 이러한 결과를 통해 키토올리고당 농도는 나노 전달체의 homogeneity에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

### 3. 소수성 건강기능성 물질 포집 효율

소수성 건강기능성 물질 전달체로서 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체의 DHA와 레스베라트롤의 포집 효율 측정 결과는 각각 Fig. 5와 Fig. 6에 제시되었다. 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체의 DHA 포집 효율은 약 86.5~88.5%로 산양유 단백질 분해물 농도가 0.1에서 0.3%(w/v)로 증가함에 따라 DHA 포집 효율이 86.6%에서 88.5%로 유의적( $P < 0.05$ )으로 증가한 반면(Fig. 5A), 레스베라트롤의 포집 효율에는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 5B). 본 연구에서 제조한 산양유 단백질 분해물은 모든 베타락토글로불린이 가수분해되고, 약 40%의  $\alpha_s$ -카제인이 가수분해된 소재로, 산양유 단백질 분해물의 주요 단백질인 카제인은 레스베라트롤에 비해 DHA와 상대적으로 강한 affinity를 지니고 있다.



**Fig. 4.** Effects of chitosan oligosaccharide (CSO) concentration level on the physicochemical properties of hydrolysed goat milk protein (HGMP)/CSO nano delivery systems. Particle size (A); Polydispersity index (B); Zeta-potential value (C). HGMP (0.1%, w/v) solutions were mixed with various concentration of CSO solutions and adjusted to pH 5.5 followed by treatment with 0.1 mM TPP. Different letters on a column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



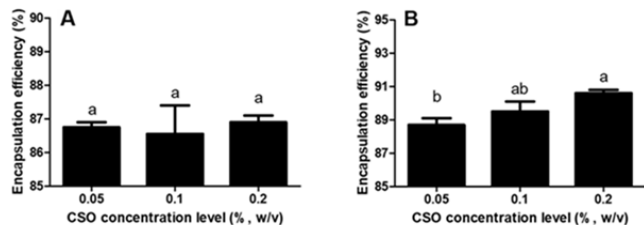
**Fig. 5.** Impacts of hydrolysed goat milk protein (HGMP) concentration level on the encapsulation efficiency of DHA (A) and resveratrol (B). Different letters on a column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

레스베라트롤-카제인 간 binding constant는  $1.9 \sim 2.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (Bou-rassa *et al.*, 2013)인 반면, DHA-카제인 간 binding constant는  $8.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (Zimet *et al.*, 2011)로, 카제인 1 mol은 약 1.2 mol의 레스베라트롤과 결합 가능하지만, DHA의 경우 약 3~4 mol과 결합 가능하다고 보고되었다. 따라서 산양유 단백질 분해물 농도의 증가는 레스베라트롤에 비해 보다 많은 양의 DHA와 상호 결합을 증가시켜 상대적으로 나노 전달체의 DHA 포집 효율을 효과적으로 향상시킨 것으로 사료된다.

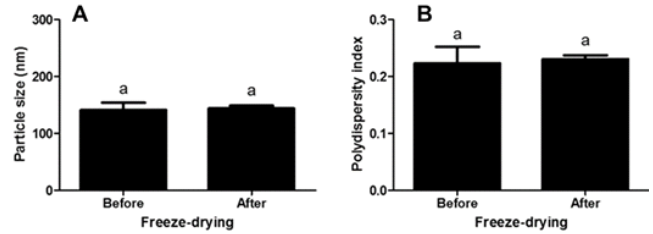
키토올리고당 농도에 따른 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체 내 DHA 및 레스베라트롤 포집 효율은 Fig. 6에 제시되었다. 그 결과, 키토올리고당 농도는 DHA 포집 효율에는 영향을 미치지 않았으나(Fig. 6A), 키토올리고당 농도가 0.05에서 0.2%(w/v)로 증가함에 따라 레스베라트롤 포집 효율은 88.7에서 90.6%로 유의적( $P < 0.05$ )으로 증가하였다(Fig. 6B). 키토올리고당 농도 증가에 따른 레스베라트롤 포집 효율 향상은 단백질/다당류 전달체 제조시 다당류(예, 펙틴, 알긴산, 이눌린) 농도 증가에 따른 전달체의 보호효과와 immobilization 효과 향상으로 인한 것으로 사료된다. 즉, 키토올리고당 농도 증가는 내부에 포집된 레스베라트롤이 빠져나가지 못하도록 함으로써 포집 효율을 증가시킨 것으로 사료된다(Ron *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013, Ha *et al.*, 2016).

#### 4. 나노 전달체의 동결건조

제조된 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체의 식품 적



**Fig. 6.** Effects of chitosan oligosaccharide (CSO) concentration level on the encapsulation efficiency of DHA (A) and resveratrol (B). Different letters on a column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 7.** Particle size (A) and Polydispersity index value (B) of hydrolysed goat milk protein/chitosan oligosaccharide nano delivery systems before and after freeze-drying. Different letters on a column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

용성 증진을 위한 분말화는 동결건조를 통해 실시하였다. 동결건조 과정 중 나노 전달체의 물리적 안정성 평가는 건조 전후의 입자크기 및 다분산지수 측정을 통해 평가하였다(Fig. 7). 그 결과 동결건조 전후 나노 전달체의 입자크기와 다분산지수 모두 유의적인 차이를 보이지 않았다. 즉, 나노 전달체는 동결건조 과정 중 뛰어난 물리적 안정성을 지니는 것을 알 수 있었다.

#### 요약

본 연구에서는 산양유 단백질 분해물과 키토올리고당을 이용하여 약 138~225 nm 크기를 지니는 구형의 나노 전달체를 성공적으로 제조하였다. 제조된 나노 전달체는 소수성 건강기능성 물질인 DHA와 레스베라트롤을 각각 ~22 mg/100 mL와 ~4.5 mg/100 mL 씩 포집 가능하며, 제조 공정요인(예, TPP 농도, 산양유 단백질 분해물 농도, 키토올리고당 농도) 조절을 통해 입자 크기, 표면전하등과 같은 나노 전달체의 물리화학적 특성과 소수성 건강기능성 물질의 포집 효율을 조절할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 산양유 단백질 분해물/키토올리고당 나노 전달체는 동결건조를 통해 분말화가 가능하기 때문에 식품 적용성이 뛰어나다. 결론적으로 본 연구에서 food-grade 물질인 산양유 단백질 분해물과 키토올리고당을 이용하여 제조한 나노 전달체는 저지방 및 무지방 유식품에 적용 가능한 무지방 기반(non-fat based)의 소수성 건강기능성 물질 전달체로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

#### 감사의 말

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업(314045-03)의 지원을 받아 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

#### References

Acosta, E. 2009. Bioavailability of nanoparticles in nutrient

- and nutraceutical delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14:3-15.
- Bernacka, H. 2011. Health-promoting properties of goat milk. *Medycyna Weterynaryjna.* 67:507-511.
- Bhattarai, N., Gunn, J. and Zhang, M. 2010. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62:83-99.
- Bourassa, P., Bariyanga, J. and Tajmir-Riahi, H. A. 2013. Binding sites of resveratrol, genistein, and curcumin with milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins. *Phys. Chem. B.* 117:1287-1295
- Chen, L. and Subirade, M. 2005. Chitosan/ $\beta$ -lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. *Bio-material.* 26:6041-6053.
- Doublier, J. L., Garnier, C., Renard, D. and Sanchez, C. 2000. Protein-polysaccharide interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5:202-214.
- Fathi, M., Mozafari, M. R. and Mohebbi, M. 2012. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trend Food Sci. Tech.* 23:13-27.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R. and Delie, F. 2008. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69:1-9.
- Ha, H. K., Kim, J. W., Lee, M.-R. and Lee, W.-J. 2013. Formation and characterization of quercetin-loaded chitosan oligosaccharide/ $\beta$ -lactoglobulin nanoparticle. *Food Res. Int.* 52:82-90.
- Ha, H.-K., Jeon, N.-E., Kim, J. W., Han, K.-S., Yun, S. S., Lee, M.-R. and Lee, W.-J. 2016. Physicochemical characterization and potential prebiotic effect of whey protein isolate/inulin nano complex. *Korean J. Food Sci. An.* 36:267-274.
- Ha, H.-K., Kim, J.-W., Lee, M.-R., Jun, W. and Lee, W.-J. 2015. Cellular uptake and cytotoxicity of  $\beta$ -lactoglobulin nanoparticles: The effects of particle size and surface charge. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 28:420-427.
- Ha, H.-K., Nam, G.-W., Khang, D., Park, S. J., Lee, M.-R. and Lee, W.-J. 2017. Development of two-step temperature process to modulate the physicochemical properties of  $\beta$ -lactoglobulin nanoparticles. *Korean J. Food Sci. An.* 37:114-124.
- Haenlein, G. F. W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Res.* 51:155-163.
- Hu, B., Pan, C., Sun, Y., Hou, Z., Ye, H., Hu, B. and Zeng, X. 2008. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. *J. Agric. Food Chem.* 56:7451-7458.
- Hwang, J.-Y., Ha, H.-K., Lee, M.-R., Kim, J. W., Kim, H.-J. and Lee, W.-J. 2017. Physicochemical property and oxidative stability of whey protein concentrate multiple nanoemulsion containing fish oil. *J. Food Sci.* 82:437-444.
- Jung, T.-H., Yun, S.-S., Kim, J.-W., Ha, H.-K., Yoo, M., Hwang, H.-J., Jeon, W.-M. and Han, K.-S. 2016. Hydrolysis by Alcalase improves hypoallergenic properties of goat milk protein. *Korean J. Food Sci. An.* 36:516-522.
- Kaminarides, S. E. and Anifantakis, E. M. 1993. Comparative study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using HPLC. *J. Dairy Res.* 60:495-504.
- Lee, M.-R., Choi, H.-N., Ha, H.-K. and Lee, W.-J. 2013. Production and characterization of beta-lactoglobulin/alginate nanoemulsion containing coenzyme Q10: Impact of heat treatment and alginate concentrate. *Korean J. Food Sci. Anim.* 33:67-74.
- Park, Y. W. 1994. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Res.* 14:151-159.
- Ron, N., Zimet, P., Bargarum, J. and Livney, Y. D. 2010. Beta-lactoglobulin-polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. *Int. Dairy J.* 20:686-693.
- Schmitt, C. and Turgeon, S. L. 2011. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Adv Colloid Interface Sci.* 167:63-70.
- Semo, E., Kesselman, E., Danino, D. and Livney, Y. D. 2007. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloid.* 21:936-942.
- Urbienne, S., Ciuckinas, A. and Margelyke, J. 1997. Physical and chemical properties and the biological value of goat's, cow's and human milk. *Milchwissenschaft.* 52:427-430.
- Ye, A. 2008. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *Int. J. Food Sci. Tech.* 43:406-415.
- Zimet, P., Rosenberg, D. and Livney, Y. D. 2011. Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nanovehicles for  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloid.* 25:1270-1276.