

# Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems

김 범 근  
식품기능연구본부

## I. Introduction

Vitamins, probiotics, bioactive peptides 및 antioxidant 등과 같은 bioactive compounds를 food system에 incorporate 할 경우 기능성 식품 개발을 가능하게 하여 생리학적 이득을 주고, 질병에 대한 위험을 감소시킬 수 있다. 식품 내에서 중요한 영양원으로서, 단백질은 gel이나 emulsion을 형성할 수 있는 등의 독특한 기능성을 지니고 있으며, 이로 인해 이들은 bioactive compounds를 encapsulation 할 수 있는 이상적인 물질로서 작용할 수 있다. 단백질의 물리화학적 성질을 기본으로 하여, 본문에서는 식품 단백질이 nutraceutical delivery systems을 개발하는데 있어서 기질(hydrogel, micro-, nano-particles 등)로서 사용에 관한 잠재적 기능을 설명한다. 또한, 이러한 식품 단백질의 적용 및 delivery-sensitive nutraceutical compounds에 관해서 설명되어 있으며, 입자 크기가 용출 양상에 미치는 영향에 관해서 강조되어 있다.

Health benefits를 가지고 있는 dietary compounds

가 나오면서 인간의 건강을 증진시키기가 용이해졌다. Nutraceutical로 알려진 이물질은 최근 몇 년간 학계, 소비자 및 식품 제조자 등으로부터 많은 관심의 대상이 되어 왔다. Nutraceutical compounds의 종류 (vitamins, probiotics, bioactive peptides, antioxidants 등)는 무한대이며, 이들이 건강을 증진시키는 food ingredients로 사용되는 연구 결과들이 많이 보고되고 있다 (Wildman, 2001). Nutraceutical substances들이 생리학적 기능에 관여한다는 것에 대해서는 완전히 알려진 바가 없으나, 이들을 식품에 첨가하게 될 경우 질병에 대한 위험도가 감소할 것이라는 전망에 관해서는 잘 알려져 있다. 학계는 혁신적인 기능성 식품을 개발하여 생리학적 이득을 얻고, 오랜 기간 알려진 질병을 감소시킬 수 있도록 노력해야 한다 (Elliot & Ong, 2002). 예를 들어, 지난 20 여년간 다양한 형태의 암에 관해서 많은 연구가 되어져 왔음에도 불구하고, 여전히 대부분의 암은 치유되기 어려우며 오랜 기간 예방이 필요하며, 특히 세포 분화로부터 종양의 발견까지는 약 10-15년이 소요된다.

질병 예방 차원에서의 nutraceutical products의 효과는 active ingredients의 생체이용율을 얼마나 보존 가능한가에 달려 있다. 경구투여 시 극소량만이 이용 가능하게 되는데, 이에 대한 이유로는 위 안에서의 체류시간 부족, 장내 낮은 투과도 및 용해도 등을 비롯하여 식품 가공 중 (온도, 산소, 빛)에서나 gastro-intestinal (GI) tract (pH, 효소, 다른 영양성분의 존재)내에서의 안정성 결여 등을 들 수 있다. 이러한 것들로 인해서 nutraceutical molecules의 활성 혹은 건강적 이점 등을 제한하는 요소가 된다 (Bell, 2001). 따라서 이러한 물질을 delivery 하기 위해서는 조직 내 protective mechanism에 의해서 active molecular form이 생리적인 target 물질을 향해 소비되는 동안 유지되어야 한다. 고분자를 기본으로 한 delivery system에 관해서는 의약품 분야에서 활발하게 연구되어 bioactive compounds를 보호 수송하는데 이용되어 왔다 (Langer & Peppas, 2003; Peppas, Bures, Leobandung, & Ichikawa, 2000). Delivery system에 많은 합성 고분자를 이용하였음에도 불구하고 GRAS (Generally Recognized As Safe)에 적합하지 않으면 식품에 적용하기 어렵다.

식품 생물고분자, 특히 식품 단백질의 경우 영양적 가치가 높고 GRAS에 적합하기 때문에 formulated food에 광범위하게 사용된다. 많은 저명잡지에서는 식품 단백질들의 기능성, 즉 emulsification, gelation, foaming, water binding capacity 등을 비롯하여 식품 산업에 있어서 구성 성분으로의 적용 등에 관해서 강조한다 (Bryant & McClement, 1998; Clark, 1998; Dickinson, 2003; Walstra, 2003). 이러한 기능성 중에서 특히 젤 형성 능력 (gel forming property)은 많은 관심의 대상이 되어 왔다. 젤의 다양한 기계적 미세구조적 성질은 단백질의 molecular chain의 조합을 조절함으로써 형성 가능하기 때문에, 이를 통해서 다양한 종류의 식품 중 sensitive nutraceuticals의 경구 투여를 위한 GRAS biocompatible carrier의 개발 가능성을 제시할 수 있다. Protein hydrogel

이 food application에 있어서 가장 편리하고 광범위하게 사용되는 matrix라고 하는 것에는 의문의 여지가 없다. 그러나, non-solid 및 semi-solid foods의 경우, food sensory quality에 영향을 주지 않고 incorporation 시키기 위해 matrix size를 작게 하는 것이 중요하다 (Augustin, 2003). 더욱 중요한 것은 마이크로 크기에서 나노 크기로 matrix size를 작게 함으로써 개선된 delivery property를 갖는 새로운 protein vehicle이 형성된다는 것이다. 이러한 목표를 달성하기 위해서는 현재 두 가지 전략적 접근방법이 이용되고 있다. 첫 번째는 'top down' approach로서, bulk material을 작게 쪼개는 방법이고, 두 번째는 'bottom up' approach, 즉, self-assembly가 가능한 분자로부터 제조하는 방법이다. 단백질의 물리화학적 성질을 기본으로 하여, 이 review 논문에서는 단백질이 nutraceutical delivery system에서의 기질로 사용되는 것에 관해서 논의하고 (Fig. 1), 이들의 용출 양상에 입자 크기가 미치는 영향에 관해서 강조하고자 하였다.

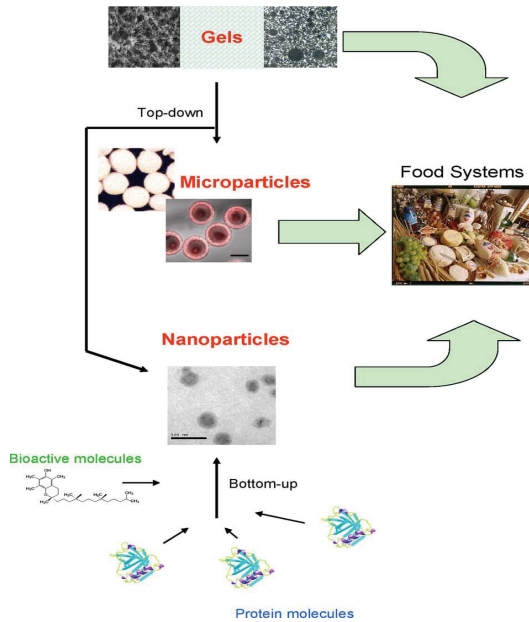


Fig 1. Schematic representation of food-protein-based materials as nutraceutical delivery systems.

## II. Protein hydrogel

Bioactive molecule을 보호하거나 수송하기 위해서 다양한 방법들이 개발되어 왔다. 이러한 다양한 연구들 중의 대표적인 것으로서 hydrogel 안에 중요 물질들을 trapping 하는 것을 들 수 있다. 흔히 hydrogel이라 하면 hydrophilic polymer가 많은 양의 물을 함유하여 network structure는 유지하면서 water-swollen network를 형성한 것을 말한다 (Qiu & Park, 2001). Three-dimensional network는 covalent bonds, hydrogen bonding, van der Waals interaction 등에 의해 발생하는 polymer chain 간의 cross-linking 혹은 이들간의 물리적 혼합 등에 의해 생성된다 (Kamath & Park, 1993). 지난 10년간 의학계 혹은 약학계에서 hydrogel에 관한 많은 연구가 진행되어 왔는데, 이는 비침화적인 환경으로부터 약물을 보호할 뿐만 아니라 원하는 곳으로 수송하는 역할이 가능하기 때문이다 (Qiu & Park, 2001). Drug delivery에 관련하여 hydrogel을 제조하기 위해 많은 방법이 제시되어 왔다 (Qiu & Park, 1996; Phillion, 1997; Qiu & Park, 2001). Drug delivery system에 있어서는 매우 유용하나, 개인이 섭취하였을 때 GRAS로 판단되기 어려운 물질들을 함유하고 있기 때문에 hydrogel을 식품에 사용하는 데는 한계가 있다. 식품 산업에서는, food protein을 nutraceutical delivery system에 사용하였을 경우 food texture를 안정화시킬 수 있어 식품 제조에 있어서 매우 바람직한 특성을 나타낸다. 또한, polypeptide chain 내에 존재하는 산성기(carboxylic 등) 및 알칼리기(ammonium 등) 등은 외부 pH의 변화에 따라 proton을 받을 수도 있고 내놓을 수도 있는데, 이러한 성질을 이용한다면 pH 변화를 통해 용출 속도를 조절할 수 있다 (Qiu & Park, 2001). 식품 단백질 특히 globular protein (egg white, soybean, and whey protein 등)을 gelation 시키게

되면 물리화학적 혹은 산업적 중요성이 높아지기 때문에 지난 수년간 많은 관심의 대상이 되어 왔다 (Bryant and McClement, 1998; Clar, Kavanagh, & Ross-Murphy, 2001; Clark & Ross-Murphy, 1987; Ziegler & Foegeding 1990). 이는 열처리에 의해서 제조가 가능한데, thermal gel은 polypeptide chain을 unfolding하여 속에 있던 hydrophobic amino acid residue를 노출시키고, 또 단백질 분자들간의 self-aggregation을 통해서 생성된 three-dimensional network를 말하는데, 이때 capillary force에 의해 내부에 물이 entrap 된다 (Aguilera, 1995; Twomey, Keogh, Mehra, O'Kennedy, 1997). 이러한 aggregation process에 관련된 force에는 hydrophobic effects, van der Waal, hydrogen bonding 및 covalent interactions 등을 들 수 있다 (Ziegler & Foegeding, 1990). 제조 방법에 따라 gel은 각기 다른 microstructural property를 나타내는데, 이는 aggregate molecular structure와 관련이 있다 (Lefevre & Subirade, 2000). 그러나, 이러한 gel을 제조하는데 열이 필요하기 때문에 heat-sensitive ingredients 등으로의 적용에 약간 어려운 점이 있다.

Globular whey protein (Barbut & Foegeding, 1993)과 최근에는 soybean protein (Maltais, Remondetto, Gonzales, & Subirade, 2005)을 미리 가열하여 단백질 suspension을 제조한 후 칼슘 이온을 첨가함으로써 냉각유도젤화 (cold-induced gelation)가 가능하다는 보고가 있다. 이 방법에는 가열과정이 필요한데, 가열하게 되면 단백질이 실활되고 soluble aggregates로 고분자화된다. 이후 냉각하고 염을 첨가하게 되면 칼슘 중개 반응 ( $Ca^{2+}$ -mediated interactions)을 통한 matrix가 형성되게 된다. 상온에서 pre-denatured whey protein을 gelation시키는데 있어서 Carboxyl group과  $Ca^{2+}$ 간의 cross-linking 기작에 관해서 보고된 바에 의하면 이온결합의 세기가 큰 역할을 하는 것

으로 알려졌다 (Roff & Foegeding, 1996; Remondetto & Subirade, 2003). Cold-set gel을 제조함으로써 식품 단백질이 민감한 nutraceutical compounds에 대한 carrier로서 뿐만 아니라 functional food ingredients를 개발하는데 기회를 제공한 것이 된다. 이의 장점은 단백질이 실활되면서 다양한 기능기들이 노출되어 nutraceutical compounds 및 polypeptide chain간의 interaction (hydrogen bonding, hydrophobic interaction, electrostatic interaction 등)이 발생하여 nutraceutical delivery에 적용될 수 있다는 데 있다. 최근에, 실활된  $\beta$ -lactoglobulin (major whey protein) 용액에 ferrous salt를 첨가함으로써 cold-set gel을 제조하였는데, 이 경우 mineral 결핍되는 수준이라고 한다 (Remondetto, Paquin, & Subirade, 2002). Gel의 기계적 성질 및 미세구조적 분석의 결과 두 가지 형태의 gel이 제조될 수 있으며, iron/protein ratio에 의존적이어서, iron 농도가 낮은 경우에는 'filamentous' gel, 즉, 다소 유동적인 linear strands로 구성되어 elastic behavior 및 rupture에 대한 높은 저항성을 가진 regular network를 가진 gel이 형성되었으며, iron 농도가 높은 경우에는 'particulate' gel, 즉, 크고 대부분 구형의 aggregates로 구성되어 elastic behavior 및 rupture에 대한 저항성이 낮은 gel이 형성된다 (Fig. 2). FTIR 및 물성적 결과 등에서 보여지듯이 미세구조적 성질의 차이는 aggregate molecular structure와 강하게 연관되어 있다 (Remondetto & Subirade, 2003). Filamentous form은 hydrophobic interaction에 의해 유지된 structural unit의 linear aggregation에 의해서 생성되는 반면, aggregate form은 van der Waals force에 의해 제어된 structural unit에 의해서 생성된다. 용출 양상을 연구한 결과, 이러한 미세구조는 환경 조건, 즉, pH 및 소화효소 등에 대한 민감도 차이로 인해서 iron delivery에 주로 영향을 주게 되며, 이러한

filamentous gel은 iron transporting에 좋은 matrix로 사용되어 이의 흡수에 유용하다 (Remondetto, Beyssac, & Subirade, 2004). Cold gelation에 의해 gel의 미세구조 및 기능성을 조절하게 되면 nutraceutical 및 functional food system에 대한 water-soluble delivery device의 제조가 가능하다.

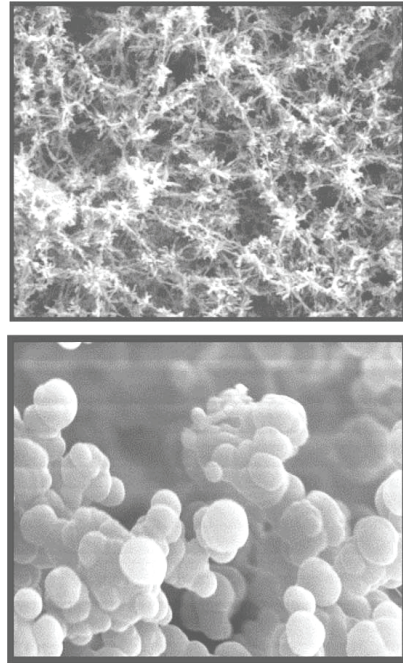


Fig. 2. Scanning electron micrographs of Fe-induced cold gels of lactoglobulin: filamentous gels (top) and particulate gels (bottom).

지난 수년간, 실용적인 식품 제조로의 응용이 가능하기 때문에 emulsion gel과 같은 composite system의 경우에 관해 많은 관심을 가져왔다 (Dickinson & Chen, 1999). Whey protein과 같은 globular protein의 경우 그들이 가진 유동성 및 amphiphilic 성질로 인해 emulsion interface로 빠르게 흡수되는데, 이들은 분자간의  $\beta$ -sheet interaction을 통해서 oil droplet 주위에 연속적이고 균질한 membrane을 형성하게 된다 (Lefevre

& Subirade, 2003). Oil droplet에 전하를 가진 layer로 코팅함으로써, protein film은 electrostatic barrier를 제공하여 flocculation 및 coalescence를 막는다 (Philips, whitehead, & Kinsella, 1994). Whey protein isolate (WPI)에 의해 안정화되어 열처리에 의한 o/w emulsion의 gel 형성 능력에 관해 많은 연구결과가 보고되어 있는데, 이는 새롭게 개선된 organoleptic properties를 가진 식품 제조의 가능성을 제시한다 (Chen & Dickinson, 1998; Dickinson, Hong, & Yamamoto, 1996; Jost, Baechler, & Masson, 1986; Jost, Dannenberg, & Rosset, 1989; McClements, Monahan, & Kinsella, 1993). 최근에,  $\beta$ -globulin emulsion이 상온에서 gel화될 수 있으며, 이 gel의 미세구조, 최종 특성 및 기능성은 oil과 calcium 농도를 통해 조절 가능하다고 보고되었다 (Leung Sok Line, Remondetto, & Subirde, 2005). 본 연구실에서도 열에 민감하고 fat-soluble한 항산화제를 보호하기 위해서 이러한 matrix의 사용이 적합한 지 여부에 관해서 연구 중에 있다. 특히, cold-set emulsion gel 미세구조가  $\alpha$ -tocopherol의 용출 제어에 미치는 영향에 관해서 연구하여 왔다 (Leung, Remondetto, & Subirade, 2005). 따라서 cold-set  $\beta$ -lactoglobulin emulsion gel이 GI condition에서  $\alpha$ -tocopherol을 보호할 수 있으며,  $\alpha$ -tocopherol의 용출이 두 가지 형태의 emulsion gel에 대한 matrix degradation과 관련이 있다는 것을 증명하였는데, 이는 molecule delivery가 gel biodegradation에 의해 조절된다는 것을 나타낸다. 더 나아가, gastric step 중 이러한 gel의 degradation은 20%에 불과한데, 이는 matrix들이 gastro-resistant한 것을 의미한다. 이는 분산상 oil droplet이 gel matrix와의 반응에 관련이 있으며, three dimensional network를 강화하는 것으로 판단된다 (Leung Sok Line et al., 2005). 이에 대한 연구는 아직 미비한 단계이긴 하지만 가능성은 매

우 높다.

Globular protein을 gel화하는 것은 과학적 혹은 상업적 적합성에 있어서, 다양한 review의 주제가 되어 왔다 (Totosaus, Montejano, Salazar, & Guerrero, 2002). 이러한 단백질로 만들어진 hydrogel이 가진 역할, 즉, 높은 fat-soluble 및 water-soluble food components (높은 health impact를 가지고 있음)를 entrap하고, 이러한 components의 활성형태를 유지하는 능력은 혁신적인 functional solid foods를 개발하는데 이용되어야 한다. 그럼에도 불구하고, gel molecular formation에 있어서 nutraceutical ingredients의 역할을 이해하고 단백질 network내에서 그들의 반응을 연구하는 것은 용출 양상을 예상하는데 필수적인 요소이다.

### III. Micro- and nano- particles

Hydrogel 뿐만 아니라 고분자를 기본으로 한 particulate system도 active molecule delivery system에 많은 관심의 대상이 되어 왔다 (Brannon-Peppas, 1995; Kumar, 2000; Varde & Pack, 2004). Micro (sub-micro) particle이란 일반적으로 1000  $\mu\text{m}$ 이하의 물질로서, polymer matrix 안에 solid, liquid 혹은 gaseous materials 등이 encapsulation 되어 있거나, 표면에 부착 혹은 conjugation된 것을 의미한다 (Allemann, Lerous, & Gurny, 1998; Langer, Coester, Weber, Briesenb, & Kreuter, 2000). 예전에는 불쾌한 맛을 내는 특정 ingredient를 masking하거나 liquid를 solid로 전환하기 위해서 사용되었으나 최근 들어서는 이러한 particles를 이용하여 nutraceutical compounds를 delivery 하는데 이용되고 있다 (Gouin, 2000; Shahidi & Han, 1993). 이들을 사용하였을 때 가장 큰 장점은 incorporated materials의 용출 속도를 제어할 수 있으며 적절한 곳으로 적절한 시간에 deliver가 가능하다는 것이다 (Schafer et al., 1992). 이 경우

미세하게 입도를 조절함으로써 가능하다. 따라서 particles는 core materials (한 개 혹은 여러 개의 ingredient로 이루어진)가 wall 혹은 barrier 물질 (균일 혹은 불균일한 single-layer 혹은 multi-layer로 이루어진)로 둘러싸인 형태로 존재한다 (Pothakanury & Barbosa-Gnovas, 1995). Matrix 붕괴, 이어서 core의 용출은 각기 다른 시간에 걸쳐서 나타난다. 최근 기술의 발달로 인해서 다양한 입도를 가진 particle의 제조가 가능하게 되면서, core 물질의 용출 속도, 체내 흡수 및 분포뿐만 아니라 polymer matrix의 붕괴 속도의 제어도 가능하게 되었다 (Amidon, Levy, & Labhassetwar, 2003; Berklund, King, Cox, Kim, & Pack, 2002; Hori, Onishi, Hiraku, Machinda, & Yoshiharu, 2005; Torrado, Illum, & Davis, 1989). 입도가 큰 particles는 일반적으로 오랜 시간 동안 천천히 core 물질을 용출시키는데 반해 입도를 작게 할 경우 생-부착 개선 (bio-adhesive improvement) 관련 인자가 나타날 수 있는데, 예를 들어, adhesive force의 증가 및 지연된 GI transit time 등을 들 수 있으며 이로 인해서 약물의 생체 적합성을 높일 수 있다.

식품 내 필수 영양성분이 될 뿐 아니라, 단백질은 높은 유용한 기능성을 가지고 있다. 이러한 기능성으로 인해 단백질은 bioactive compound를 encapsulation 하는 좋은 코팅 물질로서 사용이 가능하다. 지난 20여 년 간 delivery system으로써 단백질 microparticle에 관해서 많은 관심을 가져왔고, gelatin (Franz, Pokorova, Hample, & Dittrich, 1998; Paynea, Yaszemskib, Yaskoc, & Mikos, 2002), collagen (Alex & Bodmeier, 1990; Rosslar, Kreuter, & Scherer, 1995; Swatcheka, Schattona, Mullerc, & Kreuter, 2002), casein (Latha, Lal, Kumary, Sreekumar, & Jayakrishnan, 2000; Latha, Rathinam, Mohanan, Jayakrishnan, 1995), albumin (Sokoloski & Royer, 1984; Tomlinson & Burger, 1985; Yeo, Lee, Lee, &

Kim 2003) 및 whey protein (Beutieu, Savoie, Paquin, & Subirade, 2002; Picot & Lacroix, 2004; Rosemberg & Young, 1993)을 비롯한 다양한 animal protein 뿐만 아니라 soy glycinin (Lazko, Popineau, & Legrand, 2004), zein (Liu, Sun, Wang, Zhang, & Wang, 2005) 및 wheat gliadin (Ezpeleta et al., 1996) 등의 plant protein이 사용되어 왔다. Protein-polysaccharide (Chen & Subirade, 2005a,b; Guerin, Vuillemand, & Subirade, 2003) 및 protein-synthetic polymer (Arbos, Arangoa, Campanero, & Irache, 2002; Kasper, Kushibiki, Kimura, Mikos, & Tabata, 2005) 등 두 가지 이상의 성분으로 구성된 matrix를 이용한 particle도 제조되었다.

단백질을 기본으로 한 micro (sub-micro) particle 제조를 위한 다양한 공정이 개발되었다. 가장 일반적인 기술은 spray-drying (bruschi, Cardoso, Lucchesi, & Gremiao, 2003), emulsifying- crosslinking (Ishizaka & Koishi, 1981) 혹은 coacervation (Mauguet et al., 2002) 등을 들 수 있다. 하지만 이러한 기술들을 적용하기 위해서는 공정 중에 가열 혹은 유기물을 필요로 하기 때문에 민감한 core material의 경우 파괴가 발생할 뿐 아니라 잔류 유기물로 인한 독성 문제도 야기될 수 있다 (Birbaum, Kosmala, Henthorn, Brannon-Peppas, 2000; Bodmeier & McGinity, 1987). 앞에서 언급한 바와 같이 최근에 cold-gelatin method가 개발되면서 식품 산업에서의 단백질 microparticle 제조에 많은 기여를 하게 되었다. 이 방법을 사용할 경우 유기 용매가 필요하지 않으며, mild한 조건에서 encapsulation이 가능하기 때문에 core 물질인 nutraceutical compound의 파괴도 최소화할 수 있다는 장점이 있다. 더욱 중요한 것은, whey protein과 같은 globular protein의 경우 pH, 이온세기, 및 온도 등의 다양한 조건에 따라 denature, dissociate 및 aggregate되기 쉽기 때문에 40 nm에서 2 mm

까지 다양한 입도를 가지는 particle의 제조가 가능하다. 이러한 성질을 이용하여 특정 입도를 가지는 active molecule-loaded particle의 제조가 가능하다.

#### IV. Microparticles

단백질을 기본으로 하여 제조된 microparticle은 다양한 적용 가능성이 있기 때문에 ingredient가 hydrophobic, hydrophilic, 심지어는 microbial 인지 여부에 관계없이 사용 가능하다. 이어서 나오는 단원에서는 cold-gelation 방법에 의해 제조된 다양한 구조 및 입도를 가진, 단백질을 기본으로 한 microparticle이 얼마나 제대로 target 부위에 전달이 되며 얼마나 보호 능력이 있는지에 관해서 다루고자 한다(Fig. 3).

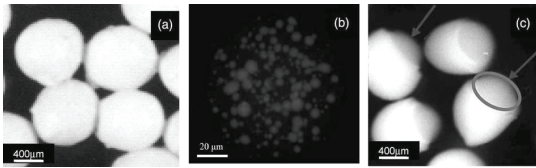


Fig 3. Fluorescent micrographs of food-protein-based microparticles: (a) microbeads (1 --2 mm); (b) protein granules (10 --20 µm); (c) proteinalginate beads.

Fig. 3a는 emulsification/cold gelation process에 의해 제조된 micro-bead를 나타낸다 (Beaulieu et al., 2002). 이 방법은 emulsifying step을 거친 후 pre-denatured whey protein의 칼슘에 의한 gelation을 하는 방법을 기본으로 하고 있다. Bead는 전형적으로 'top down' approach에 의해서, drop-wise extrusion 시킨 후 calcium chloride(CaCl<sub>2</sub>) solution에 떨어뜨림으로써 제조된다. 제조 조건에 의해서 micro-bead의 sphericity 및 homogeneity 등이 달라질 수 있으며, CaCl<sub>2</sub>의 농도가 증가할수록 더 균일한 형태를 갖는다. TEM (Transmission Electron

Microscopy)에 의해서 bead의 내부 미세구조를 관찰한 결과 gel protein network 내부에 균일하게 oil globule이 분포하는 것을 볼 수 있었다. 실제로, CaCl<sub>2</sub> 농도를 높이면 fat globule의 크기도 작아지고 더욱 균일한 network를 갖게 된다. Ca<sup>2+</sup> 양이 증가하게 되면 gelation kinetics가 촉진되어, 빠른 entrapment가 가능하게 되고, protein network 내의 droplet 안정성이 증가된다. Ca<sup>2+</sup> 양이 많아지게 되면 droplet에 흡착된 단백질과 Ca<sup>2+</sup> 간의 attractive electrostatic interaction이 증가하게 되어 표면에서 단백질의 파괴없이 bridge가 형성되어 aggregation이 일어나게 되어 droplet coalescence가 발생하지 않게 되는 것이다. Swelling, elasticity, deformability 및 파괴에 대한 저항성 등의 성질은 pH 및 제조 조건에 영향을 받게 된다. FTIR spectroscopy 분석 결과 bead를 형성할 경우 whey protein의 secondary structure에 영향을 주어 분자간 수소 결합된 β-sheet structure가 형성된다. 최종적으로 효소에 의해 가수분해한 결과 bead는 gastroresistant하고, 지용성 bioactive molecule (retinol 등)을 보호하는 matrix로서 사용 가능할 것으로 판단된다. 그들은 pepsin에 대해 강한 저항성을 나타내어 소수성인 aromatic amino acid에 선택적으로 반응하지만 pancreatin에 의해서는 완전히 분해되지 않고, bioactive compounds의 완전한 용출을 유도한다. 이러한 성질로 인해서 protein microparticle를 제조함으로써 위(intestine)의 pH에 민감한 물질을 보호할 수 있어 위로의 물질 전달이 가능하다. 또한 whey protein의 경우 산화에 민감한 비타민이나 ω-3 지방산 등의 물질 보호에도 사용 가능하다고 한다.

Fig. 3b는 emulsification/cold gelation 방법에 의해 제조된 microspherule를 형광현미경으로 관찰한 것을 나타낸다(Chen & Subirade, 2005b). Alginate matrix 안에 균일하게 whey protein이 분포되어

있는 것을 보여준다. 이 방법은 산용해성 칼슘 염으로부터 칼슘 이온이 단백질 용액에 용출되는 것을 기본으로 하고 있다. 이는 지용성 산으로 산화시킴으로써 발생되는데, 이것이 분산상으로 이동되어 칼슘을 용출시키고 gelation이 시작된다 (Ienck, Neufeld, & Spinney, 1989). 이 방법을 사용함으로써 작은 입도를 갖는 단백질 bead를 대량 생산할 수 있다. 예를 들면, emulsification 조건을 조절하거나, emulsion 생성 반응내의 dispersive force를 조절하거나, 혹은 물과 oil 표면간의 interfacial tension을 낮추기 위해 surfactant를 첨가함으로써 bead size는 조절될 수 있다. 대부분의 microparticle에 대해서 약 80% 이상의 높은 encapsulation efficiency를 얻을 수 있었다.

Fig 3c는 transacylation 반응에 의해 공유결합으로 연결된 protein-alginate composite bead를 보여주는 사진이다 (Guerin et al., 2003; Levy & Edward-Levy, 1996). 이 반응으로 인해서 단백질과 alginate 간의 amide bond가 형성되고 bead 표면에 membrane이 만들어져서 gastric pH 및 pepsin 활성에 저항을 갖게 되는 것이다. 이러한 연구 결과 bifidobacteria를 혼합 gel에 immobilization 시킨 결과 simulated human GI tract 조건에 훨씬 더 저항성이 강한 것을 확인하였다. 이는 membrane-coated gel에 encapsulation 시킬 경우 probiotic bacterial의 생존률도 높일 수 있다는 것을 의미한다. 실제로, 이 matrix는 carrier food에서 뿐만 아니라 인간의 위에서도 세균을 보호할 수 있다.

위에서 보여진 예와 같이, micron 단위까지 세밀하게 particle 제조공정을 조절할 수 있다면 식품 단백질 등을 이용하여 활성 물질의 *in vivo* delivery의 개선에 기여할 수 있다.

## V. Nano-particle

1980년대의 'micro'에서와 같이 'nano' 역시 현

재의 dimension-reducing technology를 나타내는 말이다 (The Royal Society, 2004). Nanotechnology란 100 nm이하의 기능성 물질을 개발하는 것을 말한다(Lan et al., 2005; Vo-Dinh, 2005). 비록 nano-scale particle이 therapeutic system 등에 많이 적용되었으며 이 이외에 다양한 system 들이 개발되어 왔으나, 식품 산업에 있어서 이 nanotechnology는 상대적으로 매우 새로운 분야이다. Subcellular size를 나타내기 때문에 nanoparticle는 nutraceutical compounds, 특히 functional lipids (e.g. carotenoids, phytosterols,  $\omega$ -3 fatty acids), 천연 항산화제 및 다양하게 식품에 사용되는 화합물과 같은 용해도가 낮은 물질들의 생체적합성을 개선하는데 매우 유익하다. 이들은 intestinal clearance mechanisms의 영향을 감소시킴으로써 GI tract 내에서의 residence time을 지연시킬 수 있다 (Kawashim, 2001; Peppas, 1995; Arbos, Arangoa, Campanero, & Irache et al., 2002). 이들은 fine capillaries를 통해서 조직 깊숙한 곳까지 침투할 수 있다.

천연 혹은 합성 고분자를 기본으로 한 nanoparticulate system 중 식품산업에서 이용 가능한 것으로 단백질을 기본으로 한 nanoparticle이 많은 관심의 대상이 되어왔는데, 이들은 제조가 매우 쉽고 입도 분포를 제어할 수 있기 때문이다 (macadam, Shafi, James, Marriot, & Martin, 1997). 이들을 응용하여 polysaccharide, lipids, 혹은 다른 고분자와 함께 composite을 제조할 수 있다 (Weyermann, Lochmanna, Georgensa, 'Zimmer, 2005).

Nutraceutical compounds의 bioavailability를 개선하기 위해서, 최근 식품 산업에서는 기존의 nano carrier를 GI tract에서 순환하는 시간을 증가시키려고 노력하고 있다. 이를 위해서 단백질로 표면을 코팅하는데, 이 경우 nano carriers의 adhesive properties 및 GI tract 내에서의 역할 등이 개선된다. 이 이유는 몇몇 단백질들이 sugar-



residue-bearing sites에 specific 하게 bind하기 때문이다 (Goldstein, Hughes, Monsigny, Osaá & Sharon, 1980).

Nanoparticle에 단백질을 코팅하게 되면 민감한 nutraceutical compounds를 보호하는데 큰 역할을 하게 된다. 본 연구실에서는 chitosan nanoparticle에  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ lg)을 코팅한 바 있다.  $\beta$ lg의 코팅 능력은 pH에 매우 민감한 것을 확인하였다. 단백질의 흡착은 주로  $\beta$ lg와 chitosan 간의 electrostatic, hydrophobic 및 hydrogen bonding interaction 등에 의해 이루어진다. Simulated GI tract를 통해서 이들 nanoparticle의 용출 양상에 관해서 조사하였다. Native  $\beta$ g-coated nanoparticle의 경우 gastric environment 조건에서 용출 저해 효과가 있는 것으로 보고되었다. Pepsin 분해 assay를 통해서 native  $\beta$ g의 경우 denatured  $\beta$ g 혹은 칼슘 이온과 cross-linked된 denatured  $\beta$ g에 비해서 산 혹은 pepsin에 저항성이 높다는 것이 보고되었다. 이러한 성질은 native  $\beta$ g의 내부에 hydrophobic amino acids가 내부 globular structure에 숨겨져 있어서 pepsin의 공격을 받지 못하는데 기인한다 (Morr & Ha, 1993).

최근에 whey protein의 물리화학적인 성상이 알려지면서 bottom-up approach를 통한 protein nanoparticle의 제조가 가능해졌다. Fig. 4는 thermal aggregation process에 영향을 주는 인자들을 조절함으로써 얻어진 whey protein nanosphere를 나타낸다 (Leclerc, Remondetto, Ramassamy, & Subirade, 2005). Submicron 크기의 aggregates는 55°C에서 상대적으로 낮은 칼슘 및 단백질 농도 하에서 얻어질 수 있는데, 이 온도는  $\beta$ -lactoglobulin의 denaturation 온도(약 74°C)보다 낮은 온도이다. Nanosphere를 투석한 경우 zeta potential 값이 -25mV를 나타내었으며, 이 상대적으로 높은 표면 전하로 인해서 4°C에서 적어도 두 달간 안정한

dispersion이 유지된다. 이러한 aggregated structure에 관여하는 결합 인자로는 covalent bonding, hydrogen bonding, hydrophobic interaction, 그리고 van der Waals force 등을 들 수 있는데 (Clark and Ross-Murphy, 1987), 이들의 gel 형성 능력은 turbidity 측정을 통해서 관찰할 수 있다

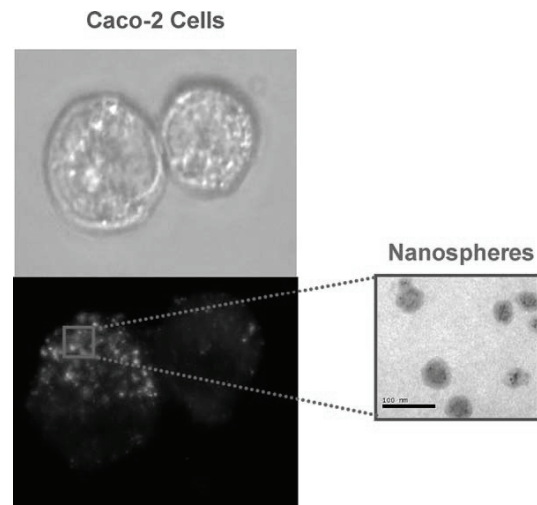


Fig 4. Images of Caco-2 cells after incubation alone (top) or in the presence of FITC-labelled nanospheres (bottom). Picture on the right shows transmission electron micrographs of nanoparticles.

이들 nanospheres들의 경구투여용 carrier로서의 잠재성에 관해서는 fluorochrome-labeled nanospheres 간의 interaction을 관찰함으로써 연구되어 왔다. Fig.4는 FITC-labeled nanosphere가 있거나 (아래) 혹은 없는 상태 (위)에서의 Caco-2 cells를 보여준다. 흥미있게도, nanosphere는 세포의 표면에 흡착하기만 하는 것이 아니고 세포 내부에서도 보여진다. 이러한 실험을 통해서 whey protein nanoparticle이 세포 내부로 들어갈 수 있으며 그 안에서 분해되어 nutraceutical compounds를 용출시킬 수 있

다는 것을 확인하였다. 이는 부적절한 독성 효과를 나타내지 않고 nutraceutical compounds의 생체 이용성을 개선할 수 있는 것을 의미한다.

위의 예에서 언급한 바와 같이, 새로운 기능, 즉, 개선된 용해도 및 targetability, 그리고 조직에 흡착 등은 나노 크기로부터 나온다. 그럼에도 불구하고, 식품에 있어서의 nanotechnology의 잠재성은 높게 평가되지 않는다. 왜냐하면 nanoparticle systems organization의 물리화학적 측면, bioactive 물질과 carrier 물질간의 반응에 관한 지식이 충분치 못하기 때문이다. 물질 수송 체계에 있어서 실용적인 기술로서 개념 정착이 되기 위해서는 조금 더 진보적인 노력이 필요하다.

## VI. Future trends

식품 단백질은 새로운 GRAS 물질로서 개발되기 위해 많은 잠재성을 띠고 있다. 따라서 이는 경구 투여될 nutraceutical compounds를 incorporate 하고 용출 제어를 하는데 매우 유용하다. 식품 단백질의 장점으로는 높은 영양적 가치, 재활용 가능한 source의 다양성, 그리고 소화효소에 의해 분해가 가능함으로 인한 식품 원소로서의 적합성 등을 들 수 있다. 이 논문에서 언급된 바와 같이, 식품 단백질은 hydrogel, micro 혹은 nanoparticle의 형태로 다양하게 matrix로써 응용이 가능하기 때문에, 특정한 응용분야에서 기능성 식품개발을 위해 이용된다. 단백질을 이용한 particle의 입도를 조절하게 되면 맛, 향, 조직, 외향 등에 있어서 식품의 정상 면에서 장점을 나타낼 뿐만 아니라, bioactive compounds를 수성하는데 있어서 용출 제어도 가능하게 된다. Hydrogel이나 microparticle의 경우, nutraceutical compounds는 용출되었을 때 intestinal wall에 흡착이 되어야 하는 반면, nanoparticle의 경우 GI wall에 흡착되게 하여 residence time을 지연시키거나 intestinal epithelium을 통해서 직접 흡수되도록 도와준다(Fig 5).

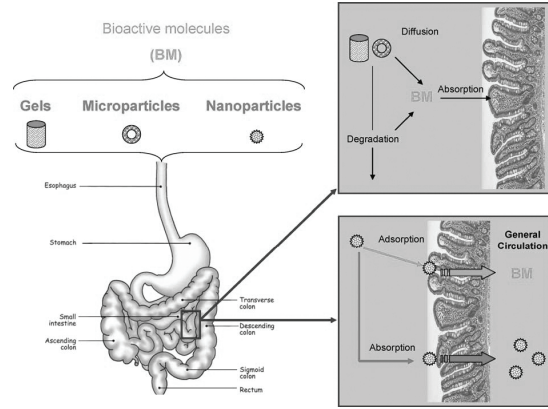


Fig 5. Schematic representation of different absorption mechanisms of bioactive molecules.

부가적으로, 폴리펩티드 내부의 다양한 기능기 및 이로 인해 나타나는 chain folding 구조의 다양성으로 인해서, 식품 단백질은 nutraceutical compound들과 다양한 반응이 가능하고 이들이 내부로 incorporate 되었을 경우 protect하기 위해 matrix로서 이용이 가능할 뿐만 아니라, target 부위로의 전달이 가능하다. 이러한 물질의 제조 기술의 개선되면 파괴되기 쉬운 nutraceuticals의 안정화에도 기여할 수 있으며 부위 적합성 (site-specific) carrier targeting이 가능하기 때문에, 이러한 식품 단백질을 기본으로 한 물질들을 이용하여 기능성 식품의 캡슐 효율을 증대시킬 수 있는 것이다. 하지만, 현 시점에서, 분자적 수준에서의 단백질-단백질 및 단백질-nutraceutical interaction을 이해하는 것과 이들이 단백질의 기능성에 미치는 영향에 관해서 연구하는 것이 필요하다.

## VII. References

1. Aguilera, J. M. (1995). Gelation of whey proteins. *Food Technology*, 49, 83 - 89.
2. Alex, R., & Bodmeier, R. (1990). Encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent

- evaporation method. I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment. *Journal of Microencapsulation*, 7, 347 - 355.
3. Allemann, E., Leroux, J. C., & Gurny, R. (1998). Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34, 171-189.
  4. Amidon, G. L., Levy, R. J., & Labhasetwar, V. (2003). Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly (D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *Journal of Controlled Release*, 92, 173-187.
  5. Arbós, P., Arangoa, M. A., Campanero, M. A., & Irache, J. M. (2002). Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 129-136.
  6. Augustin, M. A. (2003). The role of microencapsulation in the development of functional dairy foods. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(2), 156-160.
  7. Barbut, S., & Foegeding, E. A. (1993). Ca<sup>2+</sup>-induced gelation of pre-heated whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 58(4), 867-871.
  8. Beaulieu, L., Savoie, L., Paquin, P., & Subirade, M. (2002). Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: Application for the protection of retinol. *Biomacromolecules*, 3, 2239-2248.
  9. Bell, L. N. (2001). Stability testing of nutraceuticals and functional foods. In R. E. C. Wildman (Ed.), *Handbook of nutraceuticals and functional foods* (pp. 501-516). New York: CRC Press.
  10. Berkland, C., King, M., Cox, A., Kim, K., & Pack, D.W. (2002). Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. *Journal of Controlled Release*, 82, 137-147.
  11. Birnbaum, D., Kosmala, J., Henthorn, D., & Brannon-Peppas, L. (2000). Controlled release of beta-estradiol from PLGA microparticles: The effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *Journal of Controlled Release*, 65, 375-387.
  12. Bodmeier, R., & McGinity, J. W. (1987). Polylactic acid microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by the solvent evaporation technique. *Journal of Microencapsulation*, 4, 279-297.
  13. Brannon-Peppas, L. (1993). Controlled release in the food and cosmetics industries. In M. A. El-Nokaky, D. M. Piatt, & B. A. Charpentier, *Polymeric delivery systems* (Vol. 520) (pp. 42-52). Washington, DC: American Chemical Society.
  14. Brannon-Peppas, L. (1995). Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 116, 1-9.
  15. Bruschi, M. L., Cardoso, M. L. C., Lucchesi, M. B., & Gremião, M. P. D. (2003). Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: Preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 264, 45-55.
  16. Bryant, C.M., & McClement, D. J. (1998). *Molecular basis of protein functionality*

- with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 143-151.
17. Chen, J., & Dickinson, E. (1998). Viscoelastic properties of heat-set whey protein emulsion gels. *Journal of Texture Studies*, 29, 285-304.
  18. Chen, L., & Subirade, M. (2005a). Chitosan/b-lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. *Biomaterials*, 26, 6041-6953.
  19. Chen, L., & Subirade, M. (2005). Preparation of alginate-whey protein microspheres by emulsification/internal gelation and their application in healthy food. In *Conference on bioencapsulation*, Kingston, (pp. 24-26), June 2005.
  20. Clark, A. H. (1998). Gelation of globular proteins. In S. E. Hill, D. A. Leward, & J. R. Mitchell (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 77-142). Gaithersburg, MD: Aspen.
  21. Clark, A. H., Kavanagh, G. M., & Ross-Murphy, S. B. (2001). Globular protein gelation-theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, 15, 383-400.
  22. Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 57-192.
  23. Desai, M. P., Labhasetwar, V., Amidon, G. L., & Levy, R. J. (1996). Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. *Pharmaceutical Research*, 13, 1838-1845.
  24. Desai, M. P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R. J., & Amidon, G. L. (1997). The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharmaceutical Research*, 14, 1568-1573.
  25. Dickinson, E. (2003). Colloidal aggregation: Mechanism and implications. In E. Dickinson, & T. van Vlie (Eds.), *Food colloids, biopolymers and materials* (pp. 68-83). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
  26. Dickinson, E., & Chen, J. (1999). Heat-set whey protein emulsion gels: Role of active and inactive filler particles. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 20, 197-213.
  27. Dickinson, E., Hong, S.-T., & Yamamoto, Y. (1996). Rheology of heat-set emulsion gels containing b-lactoglobulin and smallmolecule surfactants. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 199-207.
  28. Elliott, R., & Ong, T. J. (2002). Science, medicine, and the future nutritional genomics. *British Medical Journal*, 324, 1438-1442.
  29. Ezpeleta, I., Irache, J. M., Stainmesse, S., Chabenat, C., Gueguen, J., Popineau, Y., et al. (1996). Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 131, 191-200.
  30. Franz, J., Pokorova, D., Hampl, J., & Dittrich, M. (1998). Adjuvant efficacy of gelatin particles and microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 168, 153-161.
  31. Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M,

- Osawa, T., & Sharon, N. (1980). What should be called lectin? *Nature*, 285, 66-69.
32. Göppert, T. M., & Müller, R. H. (2005). Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 302, 172-186.
33. Gouin, S. (2000). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330-347.
34. Guérin, D., Vuilleumard, J. C., & Subirade, M. (2003). Protection bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. *Journal of Food Protection*, 66(11), 2076-2084.
35. Hoffman, M. A. M., & van Mil, P. J. J. M. (1999). Heat-induced aggregation of b-lactoglobulin as function of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1898-1905.
36. Hori, M., Onishi, Hiraku, & Machida, Yoshiharu (2005). Evaluation of Eudragit-coated chitosan microparticles as an oral immune delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 297, 223-234.
37. Ishizaka, T., & Koishi, M. (1981). Preparation of egg albumin microcapsules and microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70, 358-361.
38. Jost, R., Baechler, R., & Masson, G. (1986). Heat gelation of oil-in-water emulsions stabilized by whey protein. *Journal of Food Science*, 51, 440-444 (see also 449).
39. Jost, R., Dannenberg, F., & Rosset, J. (1989). Heat-set gels based on oil/water emulsions: An application of whey protein functionality. *Food Microstructure*, 8, 23-28.
40. Kamath, K. R., & Park, K. (1993). Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11, 59-84.
41. Kasper, F. K., Kushibiki, T., Kimura Y., Mikos, A. G., & Tabata, Y. (2005). In vivo release of plasmid DNA from composites of oligo(poly(ethylene glycol)fumarate) and cationized gelatin microspheres. *Journal of the Controlled Release*, proof.
42. Kawashim, Y. (2001). Nanoparticulate systems for improved drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 1-2.
43. Kumar, M. N. V. R. (2000). Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 234-258.
44. Lamprecht, A., Saumet, J.-L., Roux, J., & Benoit, J.-P. (2004). Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 407-414.
45. Lan, E. H., Dunn, B., & Zink, J. I. (2005). Nanostructure systems for biological materials. In T. Vo-Dinh (Ed.), *Protein nanotechnology* (pp. 53-80). New Jersey: Humana Press Inc.
46. Langer, R., & Peppas, N. A. (2003). Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. *AIChE Journal*, 49, 2990-3006.
47. Langera, K., Coester, C., Weber, C., Briesenb, H., & Kreuter, J. (2000). Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid.

- European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 49, 303-307.
48. Latha, M. S., Lal, A. V., Kumary, T. V., Sreekumar, R., & Jayakrishnan, A. (2000). Progesterone release from glutaraldehyde cross-linked casein microspheres: In vitro studies and in vivo response in rabbits. *Contraception*, 61, 329-334.
49. Latha, M. S., Rathinam, K., Mohanan, P. V., & Jayakrishnan, A. (1995). Bioavailability of theophylline from glutaraldehyde cross-linked casein microspheres in rabbits following oral administration. *Journal of Controlled Release*, 34, 1-7.
50. Lavoie, C., Remondetto, G. E., Angers, P., & Subirade, M. (2005). Encapsulation of omega-3 fatty acids in a protein matrix: Characterization and protective effect study. In Conference on bioencapsulation, Kingston, (pp. 24-26), June 2005.
51. Lazko, J., Popineau, Y., & Legrand, J. (2004). Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 37, 1-8.
52. Leclerc, P. L., Remondetto, G. E., Ramassamy, C., & Subirade, M. (2005). Whey protein nanospheres as drug carriers for oral administration. In Conference on bioencapsulation, Kingston, (pp. 24-26), June 2005.
53. Lefèvre, T., & Subirade, M. (2000). Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate b-lactoglobulin gels. *Biopolymers*, 54, 578-586.
54. Lefèvre, T., & Subirade, M. (2003). Formation of intermolecular b-sheet structures: A phenomenon relevant to protein film structure at oil-water interfaces of emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 263, 59-67.
55. Lencki, R. W. J., Neufeld, R. J., & Spinney, T. (1989). Microspheres and method of producing same. US patent 4.822.534.
56. Leung Sok Line, V., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2005a). Cold gelation of b-lactoglobulin oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19, 269-278.
57. Leung, V., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2005). Controlled release of a-tocopherol from cold-set b-lactoglobulin emulsion gels. In Conference on bioencapsulation, Kingston, (24-26), June 2005.
58. Levy, M. C., & Edwards-Levy, F. (1996). Coating alginate beads with cross-linked biopolymers: A novel method based on a transacylation reaction. *Journal of Microencapsulation*, 13, 169-183.
59. Li, H., Hardin, C. C., & Foegeding, E. A. (1994). NMR studies of thermal denaturation and cation-mediated aggregation of b-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2411-2420.
60. Liu, X., Sun, Q., Wang, H., Zhang, L., & Wang, J. (2005). Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. *Biomaterials*, 26, 109-115.
61. MacAdam, A. B., Shafi, Z. B., James, S. L., Marriott, C., & Martin, G. P. (1997). Preparation of hydrophobic and hydrophilic albumin microspheres and determination of surface carboxylic acid and amino residues.

- International Journal of Pharmaceutics, 151, 47-55.
62. Maltais, A., Remondetto, G. E., Gonzales, R., & Subirade, M. (2005). Formation of soy protein isolate cold-set gels: Protein and salt effects. *Journal of Food Science*, 70, 67-73.
  63. Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., & Huis In't Veld, J. H. J. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, 80, 1031-1037.
  64. Mauguet, M. C., Legrand, J., Brujes, L., Carnelle, G., Larre', C., & Popineau, Y. J. (2002). Gliadin matrices for microencapsulation processes by simple coacervation method. *Journal of Microencapsulation*, 19, 377-384.
  65. McClements, D. J., Monahan, F. J., & Kinsella, J. E. (1993). Effect of emulsion droplets on the rheology of whey protein isolate gels. *Journal of Texture Studies*, 24, 411-422.
  66. Morr, C. V., & Ha, E. Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 431-476.
  67. Park, H., & Park, K. (1996). Hydrogels in bioapplications. In R. M. Ottenbrite, S. J. Huang, & K. Park (Eds.), *Hydrogels and biodegradable polymers for bioapplications* (pp. 2-9). Washington, DC: American Chemical Society.
  68. Paynea, R. G., Yaszemskib, M. J., Yaskoc, A. W., & Mikos, A. G. (2002). Development of an injectable, in situ crosslinkable, degradable polymeric carrier for osteogenic cell populations. Part 1. Encapsulation of marrow stromal osteoblasts in surface crosslinked gelatin microparticles. *Biomaterials*, 23, 4359-4371.
  69. Peppas, L. B. (1995). Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 116, 1-9.
  70. Peppas, N. A. (1997). Hydrogels and drug delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2, 531-537.
  71. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., & Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 27-46.
  72. Philipon, P. (1997). Des me'dicaments libe're's sur commande. *Biofutur*, 171, 25-27.
  73. Phillips, L. G., Whitehead, D. M., & Kinsella, J. E. (1994). *Structure-function properties of food proteins*. San Diego, CA: Academic Press.
  74. Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14, 505-515.
  75. Pothakamury, U. R., & Barbosa-Gnovas, G. V. (1995). Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 61, 397-406.
  76. Qiu, Y., & Park, K. (2001). Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53,

- 321-339.
77. Remondetto, G. E., Beyssac, E., & Subirade, M. (2004). Influence of the microstructure of biodegradable whey protein hydrogels on iron release: An in vitro study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8137-8143.
78. Remondetto, G. E., Paquin, P., & Subirade, M. (2002). Cold gelation of b-lactoglobulin in the presence of iron. *Journal of Food Science*, 67(2), 586-595.
79. Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2003). Molecular mechanisms of Fe<sup>2+</sup>-induced b-lactoglobulin cold gelation: An interactions story. *Biopolymers*, 69, 461-469.
80. Roff, C. F., & Foegeding, E. A. (1996). Dicationic-induced gelation of pre-denatured whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 10(2), 193-198.
81. Rosenberg, M., & Young, S. L. (1993). Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat-structure evaluation. *Food Structure*, 12, 31-41.
82. Rössler, B., Kreuter, J., & Scherer, D. (1995). Collagen microparticles: Preparation and properties. *Journal of Microencapsulation*, 12, 49-57.
83. Schäfer, V., von Briesen, H., Andreesen, R., Steffan, A.M., Royer, C., Tröster, S., et al. (1992). Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: A possibility for antiviral drug targeting. *Pharmaceutical Research*, 9, 541-546.
84. Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 501-547.
85. Sokolowski, T. D., & Royer, G. P. (1984). Drug entrapment within native albumin beads. In S. S. Davis, L. Illum, J. G. McVie, & E. Tomlinson (Eds.), *Microspheres and drug therapy, pharmaceutical, immunological and medical aspects* (pp. 295-307).
86. Amsterdam: Elsevier. Swatscheka, D., Schattona, W., Müller, W. E. G., & Kreuter, J. (2002). Microparticles derived from marine sponge collagen (SCMPs): Preparation, characterization and suitability for dermal delivery of all-trans retinol. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54, 125-133.
87. The Royal Society. (2004). *Nanomanufacturing and the industrial application of nanotechnologies*. In The Royal Society, & The Royal Academy of Engineering, *Nanoscience and nanotechnologies, opportunities and uncertainties* (pp. 25-34). London: The Royal Society & The Royal Academy of Engineering.
88. Tomlinson, E., & Burger, J. J. (1985). Incorporation of water soluble drugs in albumin microspheres. In J. Widder, & R. Green, *Methods in enzymology* (Vol. 112) (pp. 27-43). New York: Academic (part A).
89. Torrado, J. J., Illum, L., & Davis, S. S. (1989). Particle size and size distribution of albumin microspheres produced by heat and chemical stabilization. *International Journal of Pharmaceutics*, 51, 85-93.



90. Totosaus, A., Montejano, J., Salazar, J., & Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein gel induction. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 589-601.
91. Twomey, M., Keogh, M. K., Mehra, R., & O'Kennedy, T. (1997). Gel characteristics of b-lactoglobulin, whey protein concentrate and whey protein isolate. *Journal of Texture Studies*, 28, 387-403.
92. Varde, N. K., & Pack, D. (2004). Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4(1), 35-51.
93. Vo-Dinh, T. (2005). Protein nanotechnology: The new frontier in biosciences. In T. Vo-Dinh (Ed.), *Protein nanotechnology* (pp. 1-14). New Jersey: Humana Press Inc.
94. Walstra, P. (2003). Studying food colloids: Past, present and future. In E. Dickinson, & T. van Vlie (Eds.), *Food colloids, biopolymers and materials* (pp. 391-400). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
95. Weyermann, J., Lochmanna, D., Georgensa, C., & Zimmer, A. (2005). Albumin-protamine-oligonucleotide-nanoparticles as a new antisense delivery system. Part 2: Cellular uptake and effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59, 431-438.
96. Wildman, R. E. C. (2001). In R. E. C. Wildman (Ed.), *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. New York: CRC Press.
97. Yeo, J. H., Lee, K. G., Lee, Y. W., & Kim, S. Y. (2003). Simple preparation and characteristics of silk fibroin microsphere. *European Polymer Journal*, 39, 1195-1199.
98. Ziegler, G. R., & Foegeding, E. A. (1990). The gelation of proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 34, 203-298.
- <출처 : Trends in Food Sci. Technol. 17, 272-283, 2006>

