

냉각유도젤화에 의한 엽산 함유 분리유청단백 나노담체의 제조

김범근 · 이원재¹ · 오세종² · 김진만³ · 박동준*

한국식품연구원, ¹경상대학교 농생명학부 동물생명과학전공 및 농업생명과학연구원,
²전남대학교 동물자원학부, ³건국대학교 축산식품생물공학과

Preparation of Folic Acid-loaded WPI (Whey Protein Isolate) Nanoparticles by Cold-induced Gelation

Bum-Keun Kim, Won-Jae Lee¹, Sejong Oh², Jin-Man Kim³, and Dong-June Park*

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

¹Division of Applied and Life Science, Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Division of Animal Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

³Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstracts

Folate loaded WPI (whey protein isolate) nanoparticles were prepared using the cold-induced gelation process. The aim of this work was to investigate the effects of process parameters, such as the concentration of the WPI solution, pH, temperature, etc, on the properties of nanoparticles. The results show that the smallest nanoparticles were obtained when a WPI concentration of 1% was used at a pH of 8.0 (<330 nm). In the case of the concentration of CaCO₃, the smallest particles were obtained at a concentration of 5 mM. Alginate produced the smallest mean size with the narrowest particle size distribution, while the largest particles were prepared with *k*-carrageenan. As the w:o ratio increased, the mean particle size also increased. When the release profile was analyzed, the particles were shown to be stable for more than 6 h at a pH of 1.2, where almost all of the folic acid was released within 2 h in the dissolution media of PBS at a pH of 7.4. Thus, the process parameters appear to be important factors that affect the properties of nanoparticles.

Key words: cold-induced gelation, folic acid, whey protein isolate, nanoparticle

서 론

엽산(folic acid)은 체 내의 다양한 생화학적 반응에서 단일탄소 단위를 운반하는 역할을 하는 비타민으로, DNA 합성과 아미노산 대사에 필수적이며, 결핍시 거대적아구성 빈혈, 위장장애 등의 증세가 나타나는 것으로 알려져 있다(Ji *et al.*, 2009). 최근에는 신경관 손상, 심혈관계 질환, 암 등 여러 가지 질병을 예방해 주는 엽산의 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Lucock, 2000; Yon and Hyun, 2005).

유청은 치즈 제조나 케이스ن 생산시 분리되어 나오는 액상 부산물로서 우유의 약 90%를 차지하며 단백질, 유당,

무기질, 비타민, 미량성분 등을 함유하고 있고 물성향상, 향미 증가 등 여러 가지 영양적 가치와 물리적 기능 특성 때문에 식품첨가물 뿐만 아니라 질병 치료제로서도 널리 이용되어 왔다. 최근에는 생리적 기능으로 주목을 받게 되어 새로운 연구 및 이용 방법이 각국에서 진행되고 있다(Kim and Ahn, 2007). 유청에는 β -lactoglobulin, α -lactalbumin, bovine serum albumin, immunoglobulin, lactoferrin, transferrin 및 무기질이 많이 함유되어 있고, 특히 분리유청단백은 분산력, 용해성, 점성, 겔 형성, 유화성, 안정성 등의 여러 기능적 특성을 갖고 있다. 이 중에서 β -lactoglobulin(β -LG)은 유청단백질의 약 50%를 차지하는 주성분으로 우유단백질의 7-12%를 차지하는 단백질이다(Lee and Hong, 2002). β -LG의 기능성들로는 용해성, 유화성, 표면소수성, 점성, 거품성, 겔 형성능력, retinoic acid의 결합 능력 등이 보고되었고(Yoon *et al.*, 2001), 특히

*Corresponding author : Dong-June Park, Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea. Tel: 82-31-780-9132, Fax: 82-31-709-9876, E-mail: djpark@kfri.re.kr

pH 4-6 범위에서는 불투명하고 단단한 겔이 형성되고 pH 4 이하나 pH 6 이상에서는 탄력적인 겔이 형성된다고 보고하였다(Lee *et al.*, 2008).

미세캡슐화 기술(microencapsulation)은 고체, 액체, 기체 상의 물질을 특정 조건하에서 어떤 물질이나 조직 내부에 포집하는 기술이다(Kim *et al.*, 2002, 2005). 미세캡슐화 기술은 불안정한 물질을 외부환경, 즉, 빛, 산소, 수분으로부터 보호하여 손실을 줄이고 반응성이 큰 물질을 격리시키고 독성, 냄새, 맛을 은폐시키며 고형화시켜 취급을 간편하게 하고, 내용물의 용출 속도를 조절하는 등의 목적으로 이용되고 있다(Jiao *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2000; Verger *et al.*, 1998).

냉각유도젤화(cold-induced gelation)는 단백질을 이용한 캡슐화 기술로서, 단백질을 가열하여 실활시킨 후 냉각하고 염을 첨가하게 되면 칼슘 중개 반응(Ca^{2+} -mediated interactions)을 통한 matrix가 형성되게 된다. 상온에서 pre-denatured 유청단백질(whey protein)을 젤화(gelation)시키는데 있어서 카르복실기와 칼슘 이온 간의 cross-linking 기작에 관해 보고된 바에 의하면 이온 결합의 세기가 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Roff and Foegeding, 1996; Remondetto and Subirade, 2003). 따라서 냉각유도젤화 기술을 이용한 나노담체 개발을 통해 엽산과 같은 열에 민감한 기능성 성분(nutraceutical compounds)에 대한 전달체(carrier)로서 뿐만 아니라 기능성 식품소재(functional food ingredients)를 개발하는데 기회를 제공하게 된다. 이의 장점은 단백질이 실활되면서 다양한 기능기들이 노출되어 기능성 물질 및 폴리펩티드 사슬(polypeptide chain) 간의 결합(수소결합, 소수성결합, 이온결합 등)이 발생하여 기능성 물질 전달에 적용될 수 있다는 데 있다. 최근에, cosolvent를 조절함으로써 안정된 β -lactoglobulin-pectin 복합체를 제조한 연구결과도 보고된 바 있다(Chanasattru *et al.*, 2009). 냉각유도젤화를 이용한 분리유청단백 나노담체 제조는 기존 미세 캡슐 제조에 이용되는 열처리 공정이나 가교제로서 글루타르알데히드 등의 유해물질을 사용하지 않아 열처리에 민감한 기능성 물질들의 유제품 내 이용 효용성을 극대화 할 수 있고 환경 친화적이다(Chen *et al.*, 2006). 이 같은 냉각유도젤화의 생성원리를 이용하여 WPI-alginate- CaCO_3 -folate mixture를 제조한 다음 에멀전 형성하고 오일층을 제거하여 엽산 함유 나노담체를 제조하였다. 형성된 나노담체의 평균입도를 측정하여 나노담체가 형성된 정도를 확인하였다.

본 연구논문에서는 냉각유도젤화를 이용하여 엽산 함유 분리유청단백 나노담체(folic acid-loaded WPI nanoparticles)를 제조함에 있어서, 실험적 변수, 즉 CaCO_3 농도, 열처리 온도, pH 등이 나노담체에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

Whey protein isolate(WPI) 나노담체의 제조

나노담체는 Leclerc 등(2005)의 방법을 변형하여 제조하였다. 먼저 0.2 g WPI(Bipro, Davisco, LeSueur, MN, USA)를 19.8 g 증류수에 혼합하여 1%(w/w) WPI수용액을 제조하였다. CaCO_3 (calcium carbonate, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 1%(w/w) WPI 수용액에 첨가한 다음 교반기를 이용하여 5분 간 교반한 후, 0.025 N NaOH(Sigma, St. Louis, MO, USA) 및 0.1 N HCl(Showa, Tokyo, Japan) 용액을 사용하여 pH를 조정하였다. 그 후 WPI 수용액을 항온수조(Shaking water bath JSSB-30T, JS Research INC., Korea)에서 10분간 열처리 한 후, 얼음물을 이용하여 상온으로 급속 냉각시켰다. 실험적 변수로서 CaCO_3 의 농도(5, 10, 20 mM), 열처리 온도(60, 70, 80, 90°C) 및 pH(7, 8, 9, 10) 등의 조건을 변화시킴으로써 입도 변화를 관찰하고자 하였다. pH의 경우 이하에서는 단백질 응고가 발생하여 나노담체 제조가 불가능하였다. 따라서 pH 7 이상의 범위에서만 실험을 수행하였다.

엽산 함유 나노담체의 제조

위에서 언급한 바와 같이 WPI수용액을 제조한 후 적절한 엽산 용액(4-20 $\mu\text{g/g}$), CaCO_3 용액 및 고분자 용액(alginate, *i*-carrageenan, pectin, gelatin, *k*-carrageenan)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 1%를 (w/w) WPI 수용액에 순서대로 첨가한 다음 교반기를 이용하여 각각 5분 간 교반하였으며, 0.025 N NaOH 용액을 사용하여 pH를 조정하였다. 그 후 WPI 수용액을 항온수조에서 온도 별로 10분간 열처리 한 후, 얼음물을 이용하여 상온으로 급속 냉각시켰다. 이때 soybean oil을 첨가하여 교반에 의해 에멀전을 제조한 후 오일층을 제거하여 최종적으로 엽산 함유 나노담체를 제조하였다(Fig. 1).

나노담체의 입도 측정

제조된 나노담체의 크기를 측정하기 위하여 입도 분석기(Microtrac nanotrac 250, Microtrac Inc., USA)를 사용하였으며, 나노담체 제조공정 요인에 따른 입자 크기 및 엽산이 첨가된 나노담체의 크기를 측정하였다.

용출시험

엽산을 함유하는 나노담체의 용출 시험을 위하여 제조된 나노담체를 여과(Nylon 66 syringe filter, Whatman, USA)한 후 약 1g을 채취하여 release media(HCl solution (pH 1.2), PBS(pH 7.4), HCl solution(pH 1.2) + 0.1% pepsin, PBS(pH 7.4) + 1% pancreatin)에 녹여 37°C incubator에서 교반하면서 일정 시간에 따라 용액의 상층액을 취하였다. Akhtar 등(1997)의 방법에 의해 HPLC(JASCO PU-980,

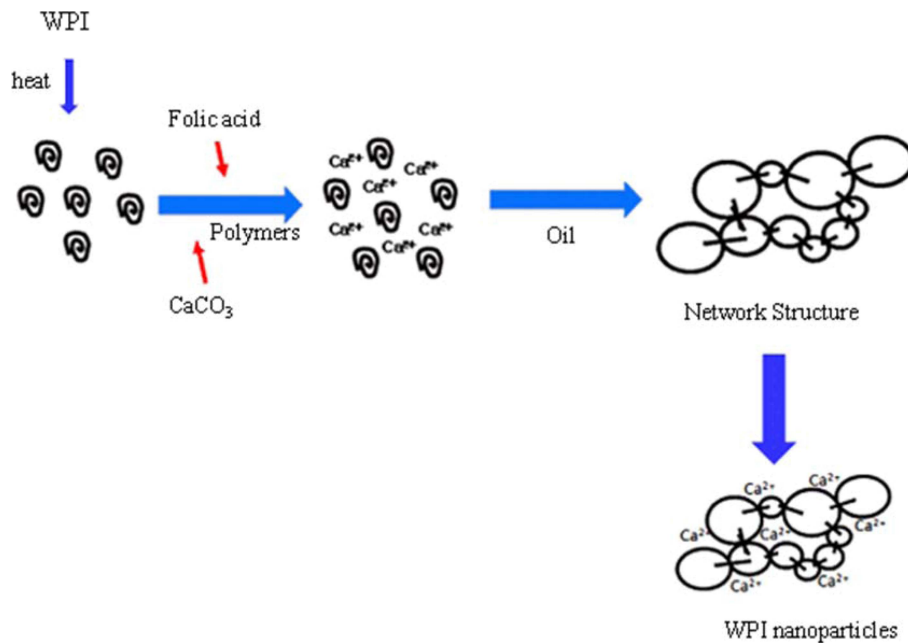


Fig. 1. Preparation of folic acid-loaded WPI nanoparticles.

Table 1. Conditions for analysis of folic acid by HPLC

Parameters	Conditions
Column	μ -Bonda Pak C ₁₈ (300 mm \times 3.9 mm)
Detector	UV/VIS, 254 nm
Mobile phase	0.017M potassium dihydrogen phosphate : tetrabutyl ammonium hydroxide (25%, aqueous) : methanol = 870:12:253 (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 μ L

UV-975 detector, Japan)로 분석하였으며 그 조건을 Table 1에 나타내었다.

결과 및 고찰

pH에 따른 입도의 변화

Fig. 2는 나노담체 제조시 사용된 WPI 용액의 pH에 따른 평균 입도 변화를 나타낸다. 냉각유도젤화를 이용하여 제조된 나노담체에 영향을 주는 요인은 pH에 따른 효과가 우세하였으므로 일차적으로 aqueous phase:organic phase 비율은 1:5로, 고분자는 알긴산으로 고정하였으며, WPI 용액의 농도는 1%, 열처리 조건은 80°C에서 수행하였다.

고분자 전해질 복합체는 이온성 상호작용에 의해 형성되는 결합체로 두 이온 사이의 결합력은 용액의 pH의 영향을 받으며 이온 전하가 최대치가 되는 pH에서 복합체의 결합력은 최대가 되고 팽윤도는 최소가 되는 것이 보고되어 있다(Kim *et al.*, 2007). WPI 용액의 pH가 8일 경우 가장 작은 입도(317 nm)를 나타내었으며 이는 pH 8에

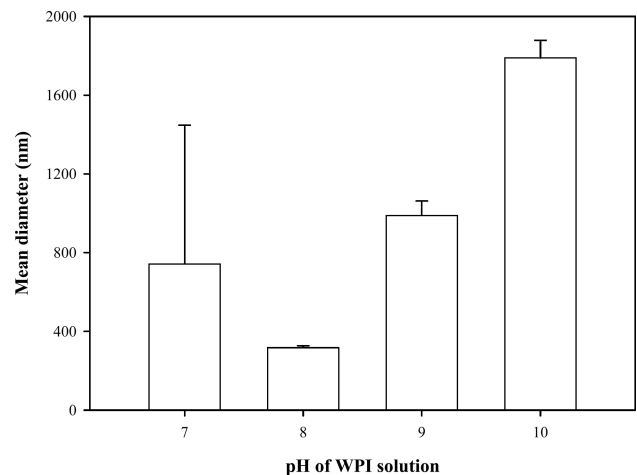


Fig. 2. Mean diameters of folic acid-loaded WPI nanoparticles at different pH of WPI solution.

서 최대의 결합력을 가지는 것을 의미한다.

Polymer 종류 및 aqueous phase:organic phase 비율에 따른 입도의 변화

Fig. 3은 나노담체 제조시 사용된 고분자에 따른 나노담체의 평균입도 변화를 나타낸다. 고분자의 농도는 1%로 고정하였다.

그림에서 보여지는 바와 같이, *k*-carrageenan이 가장 높은 평균입도(1,606 nm)를 나타내었고, 알긴산이 가장 낮은 평균입도(317 nm)를 나타내었다(Fig. 3). 알긴산은 갈조류에서 생산되는 음이온성 고분자전해질인 Ca-이온에 의해 수용액에서 팽윤되는 겔을 형성하는 음이온성 천연 고분자로서, β -D-mannuronic acid(M)와 α -L-guluronic acid

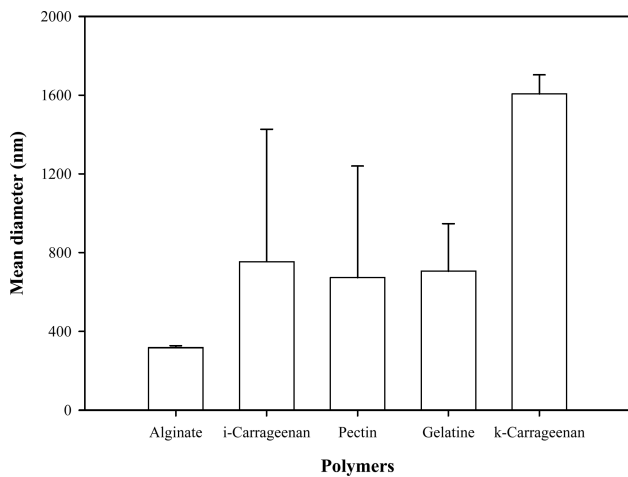


Fig. 3. Mean diameters of folic acid-loaded WPI nanoparticles with different polymers.

(G)가 주요 구성성분이다. Ca-alginate는 분자 중의 guluronic acid가 연속된 부분인 ‘egg-box’의 분율에 따라 겔 형성능이 증가하는 특성을 가지고 있다. 이러한 수용성 겔은 분자그물망 구조에 의해 겔 내부의 수용성 약물의 방출을 제어할 수 있는 성질이 있고 이를 이용한 서방성 약물 전달제제가 응용되고 있다(Kim *et al.*, 2007).

Fig. 4는 수용액상(aqueous phase)와 유기용매상(organic phase)의 비율을 달리하여 제조한 나노담체의 평균입도를 측정된 결과이다. 수용액상과 유기용매상의 비율이 증가할수록 평균입도는 감소하는 경향을 보였으며, 그 비율이 1:5일 경우 가장 낮은 평균입도(317 nm)를 나타내었다.

WPI 제조 온도에 따른 입도의 변화

WPI 용액의 온도를 달리하여 제조된 나노담체의 평균입도를 Fig. 5에 나타내었다.

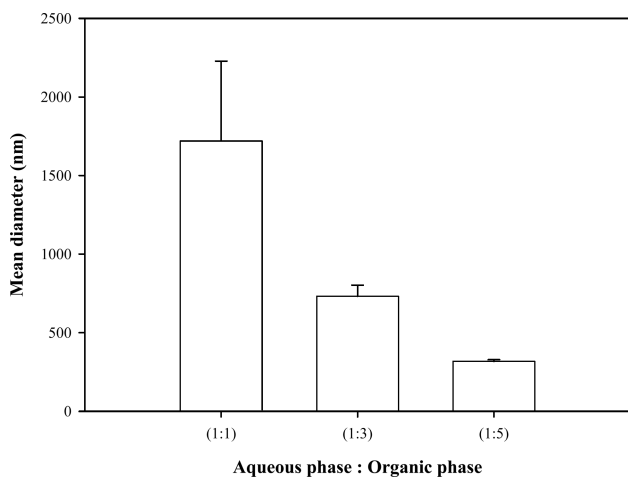


Fig. 4. Mean diameters of folic acid-loaded WPI nanoparticles at different ratio of aqueous phase and organic phase.

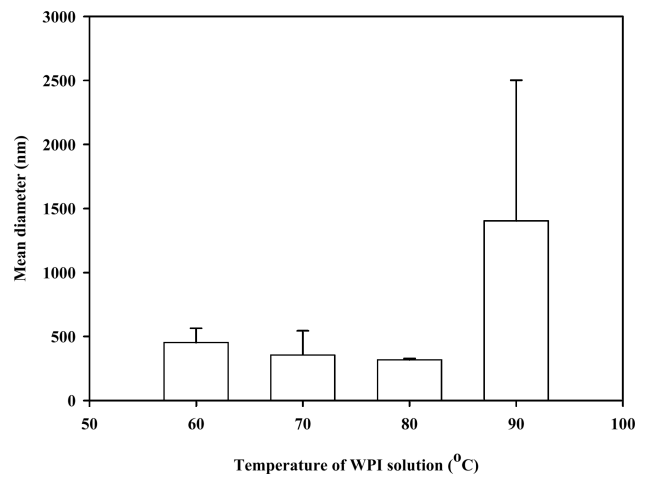


Fig. 5. Mean diameters of folic acid-loaded WPI nanoparticles at different temperature.

결과에서 보여지는 바와 같이, 60°C에서 80°C로 갈수록 점차적으로 감소하는 경향을 나타내다가, 90°C에서 입도가 크게 증가하였다. 열처리시 80°C 이상에서 나노담체의 평균입도가 증가한 원인은 열처리에 의해 단백질의 변성으로 응집이 발생한 것으로 판단된다. 반면, 80°C 이하에서는 안정된 입도분포를 나타내는 것을 확인하였다.

열처리 시 분리유청단백의 열변성(denaturation) 정도는 열처리 온도와 시간에 영향을 받으며, 열처리를 전혀 받지 않은 상태의 분리유청단백은 뚜렷한 형태를 갖고 있으나 어느 범위 수준 이상의 열에 노출될 때에는 이러한 형태가 파괴되면서 단백질의 특성이 변화된다(Renner, 1983).

분리유청단백 내 비활성 상태인 sulfhydryl group(-SH기)은 가열에 의해 3차 구조가 변하면서 활성화된다. 열처리를 할 경우 함황아미노산이 -SH기를 유리하여 휘발성황화물질이 형성되면서 가열취가 발생된다고 한다. 또한 분리유청단백은 열처리에 의해 응집되면서 연결커드가 형성되는데 이 연결커드는 치즈 제조 시에 우유 단백질의 응고력을 저하시키는 원인이 된다. 분리유청단백은 각 종류에 따라서 열처리시의 변성율이 다르다. 가장 먼저 변성이 일어나는 분리유청단백은 immunoglobulin이며 유청 albumin, β-lactoglobulin, α-lactalbumin은 열변성에 대한 안정성이 조금 높아 탈지유를 70°C에서 30분간 가열했을 때 각 분리유청단백의 열변성율은 immunoglobulin이 89%, 유청 albumin이 59%, β-lactoglobulin이 32%, α-lactalbumin이 6%였다고 보고된 바 있다(Larson and Roller, 1955).

수많은 단백질들은 수중유적형 유화상태에서 바람직한 물리화학적 특성을 생산하고 안전성을 향상시키고, 유화형성을 촉진하는 능력 때문에 유화제로서 사용될 수 있는 계면활성 분자이다(McClements, 2004). 그 중, 분

리유청단백은 단백질, 유당, 무기질, 비타민, 미량성분 등을 함유하고 있으며 물성향상, 향미증가 등 여러 가지의 영양적 가치와 물리적 기능 특성 때문에 식품첨가물뿐만 아니라 질병치료제로서도 널리 이용되어 왔다(Ha, 2001).

WPI 및 CaCO₃의 농도에 따른 입도의 변화

WPI 농도를 달리하여 제조한 나노담체의 입도 변화를 Fig. 6에 나타내었다. WPI 농도가 0.2%에서 0.6%로 증가할수록 입도도 증가하는 경향을 보였으며 WPI가 0.8%가 되면서 입도가 다시 낮아지는 경향을 보였다. 1% WPI를 이용하여 나노담체를 제조하였을 경우 317 nm의 입도를 나타내었다. 알긴산의 경우 1%보다 낮은 농도로 사용할 경우 엽산을 모두 포집하지 못하였고 1% 이상일 경우 입자의 크기가 커져 알긴산 농도는 1%로 고정하여 사용하였다.

CaCO₃ 농도와 WPI 농도를 달리하여 제조한 나노담체의 입도 변화를 Fig. 7에 나타내었다.

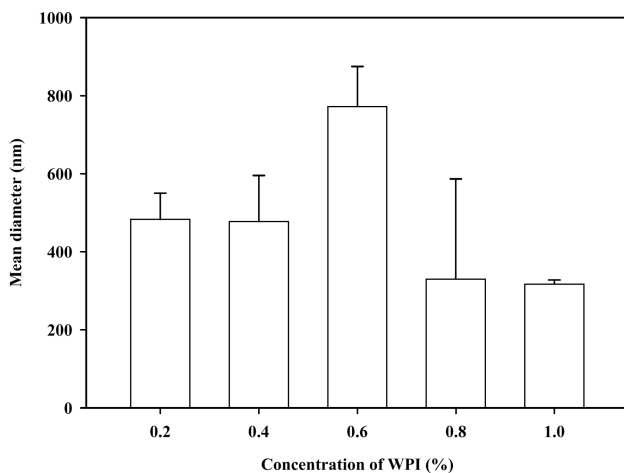


Fig. 6. Mean diameters of folic acid-loaded WPI nanoparticles at different concentrations of WPI.

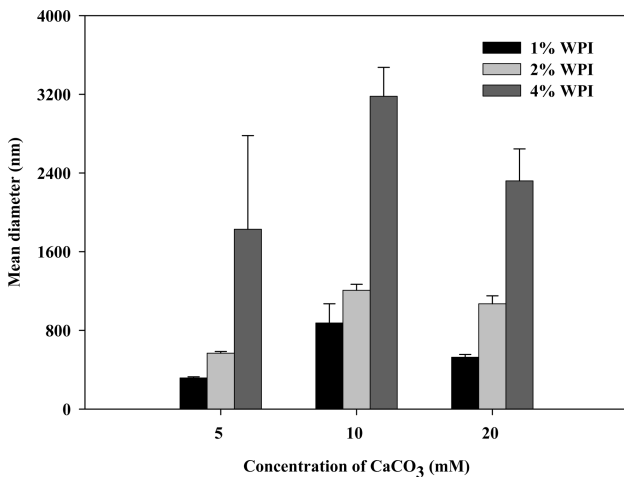


Fig. 7. Mean diameters of folic acid-loaded WPI nanoparticles at different concentrations of CaCO₃.

CaCO₃ 농도가 증가할수록 나노담체의 입도도 증가하는 경향을 보였으며 WPI도 마찬가지로의 경향을 보였다. Ca²⁺ 농도 증가 시, WPI와 가교제 역할을 하는 Ca²⁺ 간의 정전기적 상호작용 증가로 인해 나노담체가 증가하였다고 사료된다(Beaulieu *et al.*, 2002). 또한 WPI 농도와 상관없이 CaCO₃ 농도가 5 mM일 경우 가장 작은 입도를 나타내었으며 WPI 농도가 1%이고 CaCO₃ 농도가 5 mM일 경우 317 nm로 가장 작은 입도를 나타내었다.

용출시험

Madziva 등(2006)의 연구결과에 따르면 고분자 중 알긴산의 캡슐화 효율이 가장 높은 것으로 나타났으며 위의 고분자 종류에 따른 나노담체의 입도 분석 결과에서도 알긴산이 가장 작은 입자 크기를 나타내어 고분자로서 알긴산을 사용하였다. 위의 실험 결과에 따라 1% WPI, 5 mM CaCO₃, 1% 알긴산을 이용하여 나노담체를 제조하였다. 제조된 엽산 함유 나노담체의 용출 시험 결과 HCl 용액(pH 1.2)의 경우 용출 시간이 경과하여도 엽산은 분석되지 않았다. 이는 엽산이 산성 상태보다 염기성 상태에서 더 안정하기 때문이며 또한 용출되는 정도가 용액의 pH에 의해 많은 영향을 받기 때문이다(Arcot and Shrestha, 2005). 그리고 알긴산과 WPI를 이용하여 나노담체를 제조하였을 경우 위에서는 용출을 지연되고 소장에서 완전히 용출이 된다고 알려져 있다(Chen and Subirade, 2006).

PBS 완충용액(pH 7.4)을 이용하여 용출시험한 결과는 Fig. 8에 나타내었다. PBS에 pancreatin을 넣어 사용할 경우 120분 이내에 용출이 거의 완료되었고, PBS만 사용하였을 때에는 180분 이내에 완료되었다.

요 약

냉각유도젤화(cold-induced gelation) 기술을 이용하여 제

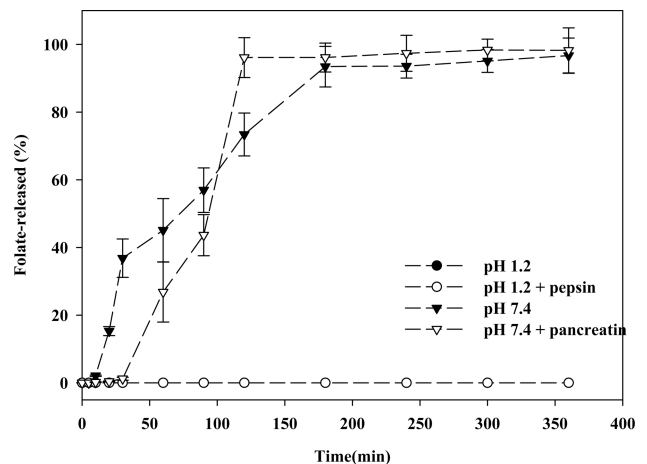


Fig. 8. Release properties of folic acid-loaded WPI nanoparticles.

조한 엽산 함유 유청단백질 나노담체에 대하여 실험적 변수, 즉, 고분자의 종류, 분리유청단백 용액의 농도 및 pH, 수용액층(aqueous phase)과 유기용매층(organic phase)의 비율, 분리유청단백 용액의 열처리 온도 등에 따른 입도 및 용출 양상의 변화를 고찰하였다. 고분자의 경우 알긴산을 이용하였을 때 가장 작은 입도를 나타내었으며, k-carrageenan의 경우 가장 큰 입도를 나타내었다. 수용액층과 유기용매층의 비율의 경우 그 값이 감소할수록 낮은 평균입도를 나타내었다. 분리유청단백 용액의 농도는 1%, pH는 8.0, 열처리 온도는 80°C일 때 가장 작은 입자경(<330 nm)을 나타내었다. 용출시험 결과, pH 7.4에서 2시간 이내에 대부분의 포집된 엽산이 용출된 반면, pH 1.2에서는 6시간 이상 용출이 지연되는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 냉각유도젤화에 의해 나노담체를 제조하는 경우 실험적 변수들이 나노담체의 특성에 큰 영향을 미치는 것을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원(과제번호: 107072-3)에 의해 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Akhtar, M. J., Khan, M. A., and Ahmad, I. (1997) High performance liquid chromatographic determination of folic acid and its photodegradation products in the presence of rifloflavin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**, 95-99.
- Arcot, J. and Shrestha, A. (2005) Folate: Methods of analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 253-266.
- Beaulieu, L., Savoie, L., Paquin, P., and Subirade, M. (2002) Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: application for the protection of retinol. *Biomacromolecules* **3**, 239-248.
- Chanasattru, W., Jones O. G., Decker, E. A., and McClements, D. J. (2009) Impact of cosolvent on formation and properties of biopolymer nanoparticles formed by heat treatment of β -lactoglobulin-pectin complexes. *Food Hydrocolloids* **23**, 2450-2457.
- Chen, L. and Subirade, M. (2006) Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials* **27**, 4646-4654.
- Chen, L., Remondetto, G. E., and Subirade, M. (2006) Food protein-based materials as nutraceutical delivery system. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 272-283.
- Cho, Y., Shin, D., and Park, J. (2000) A study on wall materials for flavor encapsulation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 132-139.
- Ha, Y. W. (2001) Milk, the rich source of bioactive ingredients for functional, nutraceutical and pharmaceutical industry. *Dairy Ind. Technol.* **1**, 93-124.
- Jiao, Y. Y., Ubrich, N., Hoffart, V., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., and Maincent, P. (2002) Preparation and characterization of heparin-loaded polymeric microparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28**, 1033-1041.
- Ji H. J., Kim S. K., Yon, M. Y., and Hyun, T. S. (2009) Folate Content of fast foods and processed foods. *Korean J. Nutr.* **42**, 397-405.
- Kim, B. K., Hwang, S. J., Park, J. B., and Park H. J. (2005) Characteristics of felodipine-located poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *J. Microencapsulation* **22**, 193-203.
- Kim B. K., Hwang, S. J., Park, J. B., and Park, H. J. (2002) Preparation and characterization of drug-loaded polymethacrylate microspheres by an emulsion solvent evaporation method. *J. Microencapsulation* **19**, 811-822.
- Kim, B. K., Lee, J. S., Oh, J. K., and Park, D. J. (2009) Preparation of resveratrol-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles by oil-in-water emulsion solvent evaporation method. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 157-161.
- Kim, C. H. and Ahn, M. S. (2007) A study on the physicochemical properties and antioxidative activity of whey protein isolate. *Korean J. Food Culture* **22**, 97-103.
- Kim, K. S., Choi, H. S., Park, H. J., and Lee, J. K. (2007) Comparison of drug release profile in chitosan-adsorbed alginate bead: silver sulfadiazine and serum albumin. *J. Chitin Chitosan* **12**, 81-87.
- Larson, B. L. and Roller, G. D. (1955) Heat denaturation of the specific serum proteins in milk. *J. Dairy Sci.* **38**, 351-357.
- Leclerc, P. L., Remondetto, G. E., Ramassamy, C., and Subirade, M. (2005). Whey protein nanospheres as drug carriers for oral administration. Conference on bioencapsulation, Kingston, pp. 24-26.
- Lee, S. H., Subirade, M., and Paquin, P. (2008) Effects of ultra-high pressure homogenization on the emulsifying properties of whey protein isolates under various pH. *Food Sci. Biotechnol.* **17**, 324-329.
- Lee, Y. R. and Hong, Y. H. (2002) Heat-induced reaction bovine whey proteins *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **22**, 179-182.
- Lucock M. (2000) Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol. Genet. Metab.* **71**, 121-138.
- Madziva, H. and Kailasapathy, K. (2006) Evaluation of alginate-pectin capsules in cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *LWT* **39**, 146-151.
- McClements, D. J. (2004) Protein-stabilized emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **9**, 305-313.
- Pérez, M. H., Zinutti, C., Lamprecht, A., Ubrich, N., Astier, A., Hoffman, M., Bodmeier, R., and Maincent, P. (2000) The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *J. Control Release* **65**, 429-438.
- Remondetto, G. E. and Subirade, M. (2003). Molecular mechanisms of Fe²⁺-induced β -lactoglobulin cold gelation: An interactions story. *Biopolymer* **69**, 461-469.

-
25. Renner, E. (1983) Milk and dairy products in human nutrition. 4th ed, W-GmbH Volkswirtschaftlicher Verlag, München, pp. 283.
26. Roff, C. F. and Foegeding, E. A. (1996). Dicationic-induced gelation of pre-denatured whey protein isolate. *Food Hydrocolloids* **10**, 193-198.
27. Verger, M. L., Fluckiger, L., Kim, Y. I., Hoffman, M., and Maincent, P. (1998) Preparation and characterization of nanoparticles containing and antihypertensive agent. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **46**, 137-143.
28. Yon, M. Y. and Hyun T. S. (2005) Additional data for folate database for foods common in Korea. *Korean Nutr. Soc.* **38**, 586-604.
29. Yoon, Y. C., Cho, J. K., and Song C. H. (2001) Purification of β -lactoglobulin from cheese whey. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* **19**, 75-82.
-
- (Received 2009.10.27/Revised 2010.1.14/Accepted 2010.1.14)