

미세유동화법으로 제조한 캡사이신 함유 나노에멀션의 안정성

김민지 · 이수정* · †김종태**

한국농식품직업전문학교 농식품스쿨, *부천대학교 식품영양과,
**한국식품연구원 바이오공정연구단

Preparation and Stability of Capsaicin-loaded Nanoemulsions by Microfluidization

Min-Ji Kim, Soo-Jeong Lee* and †Chong-Tai Kim**

Korea Vocational College of Food and Agriculture, Agriculture & Food, Seoul 06734, Korea

**Dept. of Food & Nutrition, Bucheon University, Bucheon 14632, Korea*

***Research Group of Bioprocess Engineering, Korea Food Research Institute, Seongnam 13539, Korea*

Abstract

The objectives of this study, which filled gaps in previous studies, were: (1) to find the optimal mixing condition of nanoemulsions containing oleoresin capsicum (OC), Tween 80, propylene glycol (PG), and sucrose monostearate (SES) by microfluidization; (2) to investigate their properties and stability depending on such factors as pH, temperature, and heating time; (3) to measure the effect of adding ascorbic acid. In order to test these objectives, the following three experiments were conducted: Firstly, in order to find the optimal mixing ratio, nanoemulsions containing OC - the mean diameter of which is smaller than 100 nm - were prepared through the process of microfluidization; and their mean particle size, zeta potential, and capsaicinoids were measured. The test results indicated that the mixing ratio at OC : Tween 80 : PG + water(1:2) = 1 : 0.2 : 5 was optimal. Secondly, the properties and stability of nanoemulsions were investigated with varying parameters. The test results illustrated that single-layer nanoemulsions and double-layer nanoemulsions coated with alginate were stable, irrespective of all the parameters other than/except for pH 3. Thirdly, the properties of nanoemulsions were then analyzed according to the addition of ascorbic acid. The results demonstrated that the properties of single-layer nanoemulsions were not affected by addition of ascorbic acid. In case of alginate double-layer nanoemulsions, the particle size was reduced, and zeta potential increased with the addition of ascorbic acid. In conclusion, the demonstrated stability of various nanoemulsions under the different conditions in the present study suggests that these findings may constitute a basis in manufacturing various food-grade products which use nanoemulsions-and indicate that food nanoemulsions, if adopted in the food industry, have the potential to satisfy both the functionality and acceptability requirements necessary to produce commercially marketable food-grade products.

Key words: nanoemulsion, capsaicin, biopolymer, microfluidization, stability

서론

나노기술(Nano Technology)이란 물질을 나노미터 크기의 범주에서 조작·분석하고 이를 제어함으로써 새롭거나 개선된 물리적·화학적·생물학적 특성을 나타내는 소재·소자

(素子) 또는 시스템을 만들어 내는 과학기술로 정의되어 있다(The Korea Nanotechnology Development Promotion Act 2013).

현재 식품나노기술에서 응용되고 있는 분야 중의 하나인 나노에멀션은 유화제의 계면막에 의해 수상과 오일상이 안정한 100 nm 이하의 입자상을 가지며 비평형계임에도 불구하고

† Corresponding author: Chong-Tai Kim, Research Group of Bioprocess Engineering, Korea Food Research Institute, Seongnam 13539, Korea. Tel: +82-31-780-9138, Fax: +82-31-780-9257, E-mail: ctkim@kfri.re.kr

하고 마이크로에멀션과 비교하여 상대적으로 높은 운동안정성(kinetic stability)을 갖게 되어 생리활성성분 포집을 위한 유용한 구조체로 알려져 있다(Choi SJ 2014). 나노에멀션은 “bottom-up” 방식과 “top-down” 방식에 의하여 조제할 수 있는데 “bottom-up” 방식은 별도의 기체가 필요치 않고 저에너지에 의해 조제가 가능하며 넓은 농도범위에서 나노에멀션의 안정성이 유지되는 장점을 가지고 있는 반면, 에멀션 형성의 평형상태에 도달하는 시간이 오래 걸리며 다량의 계면활성제를 사용하여야 하므로, 대량으로 조제해야 하는 산업 분야에서는 적용이 어렵다(Komaiko & McClements 2015; Charpentier JC 2005). 반면, “top-down” 방식인 고에너지 에멀션화법은 많은 기계적 에너지가 요구되나 산업적 적용이 쉬워 현재 의학, 약학, 화장품 등 많은 산업분야에서 나노구조체 조제에 광범위하게 이용되고 있는데(Lim 등 2012; Mitri 등 2011), 이 중 미세유동화법(microfluidization)은 고압균질기에 비하여 균일한 입도분포를 갖는 물질 조제가 가능하므로 다른 유화 공정들보다 소립자 생성 효율이 높고 나노에멀션을 산업적으로 대량 생산하기에 적합하며, 소량의 계면활성제만으로도 작은 입자 범위의 O/W 에멀션을 생산할 수 있기 때문에 다른 방법에 비하여 더 간편하고 효율적인 방법으로 알려져 있다(Park & Kim 2008; Charpentier JC 2005).

나노에멀션은 포집된 지용성 생리 활성 성분의 저장안정성과 휘발성분의 잔류시간을 증가시킬 수 있고(Becher P 1991), 조제가 간편하고 저비용의 경제적인 가공기술이라는 특징으로 인하여 미래 식품산업에서의 활용 가능성이 크며(Kim 등 2008), 적절한 조제법에 의해 만들어진 나노에멀션은 기능성 식품 성분의 용해도와 체내 흡수율 향상, 지용성 생리 활성 성분 보호, 식품 또는 생체 내에서 기능성 물질의 방출과 표적 조절과 유도가 가능하여(Ko SH 2008) 기존의 기술로는 해결하기 어려웠던 경우 투여에 의한 지용성 생리 활성 성분의 체내 이용률의 극대화를 가능하게 한다. 또한 섭취 중 발생하는 자극적 향미의 순화와 이에 따른 관능 기호도 증가, 외부 환경에 불안정한 기능 성분의 보호와 열역학적 안정성에 의한 장기 저장효과 등이 연구되고 있어 효과적인 기능성 생리 활성 성분의 전달체로서의 활용 가능성 또한 높다(Pradhan 등 2015; Choi SJ 2014; Lovelyn & Attama 2011).

매운맛은 음식의 풍미와 식욕을 촉진시켜 생화학적 또는 신경 생리학적으로 다양한 효과를 낸다(Park 등 1999). 대표적인 매운맛 성분인 capsaicinoids는 가짓과에 속하는 고추(*Capsicum annum* L. 또는 *Capsicum frutescens* L.)의 건조열매를 유기용제(향신료 올레오레진류의 추출용매)로 추출하여 얻어지는 oleoresin capsicum의 주성분이며 대표적인 지용성 생리 활성 성분이다(Korea Food and Drug Administration 2010). Capsaicinoids는 과량 섭취 시 압 유발 가능성 등의 부

작용도 보고되어 있으나(Bode & Dong 2015), 적당량을 섭취하면 지방 연소 작용에 의한 체중 조절(Ann 등 2011), 혈중 지질 조성 개선과 콜레스테롤 저하(Seo 등 2008), 항산화 효과(Luqman & Rizvi 2006), 면역세포 활성 조절(Park 등 2010; Yamaguchi 등 2010), 암세포 증식 억제(Clark 등 2015), 장점막 보호(Kim 등 2002), 일차 감각계의 통증 전달 메커니즘 연구를 기반으로 진통제와 항염증제로서의 효과(Lee 등 2007)는 물론 최근에는 치매 개선(Liu 등 2016) 등과 같은 다양한 연구와 응용이 활발히 이루어지고 있다.

우리나라 사람들의 매운맛에 대한 선호도는 세계적인 수준으로 알려져 있다(Park 등 2014). 그러나 어린이, 노인, 외국인 집단과 같이 매운맛에 익숙지 않은 집단의 경우에는 일차적인 자극취와 강한 작열감 등으로 인해 섭취 시 어려움을 느끼는 것으로 알려져 있다(Park 등 2012). 그러므로 캡사이신과 같은 지용성 생리활성성분을 나노에멀션 형태로 가공함으로써 외부 환경으로부터 기능성 성분의 생리 활성과 안정성을 향상시키고, 이미와 이취 등을 순화시키는 등 음료나 식품 형태의 가공 및 적용이 용이할 것으로 기대할 수 있다.

또한 대부분의 기능성 물질은 외부 환경으로부터 보호하고 안정성을 유지하기 위하여 천연 생체고분자물질 소재의 입자 및 캡슐 등의 전달체(delivery system)와 결합하여 이용되며 전달체용 검류(gums)로는 키토산(chitosan), 알긴산(alginate), 히알루론산(hyaluronic acid), 카라기난(carrageenan) 등이다. 이 중 키토산은 항균작용, 항암작용, 장내세균 성장 촉진, 콜레스테롤 저하, 유화 안정성과 생리적 기능성, 약물 방출 속도 조절과 연장, 약물 체류 시간 연장 등의 기능에 대한 연구 외에도 식품 산업에서 생분해성 가식 필름, 유화제, 식품의 저장성 연장에 이용되고 있다(Rekha & Sharma 2010; Wittaya-areekul 등 2006; Shu & Zhu 2002). 또 하나의 대표적 생체고분자 다당류인 알긴산은 만누론산과 글루론산의 비율, 분자량, 결합 순서에 따른 구조의 다양성에 따라 겔 형성 능력, 수분 흡수력, 결합력, 윤활력, 필름 형성 능력 등의 광범위한 특성을 가져 식품, 화장품, 제지 및 의약품 등 여러 분야의 산업적 응용이 검토돼 왔다. 수용성 매질에서는 칼슘염과 반응하여 겔을 형성하는 능력을 가져 중합체 시스템의 물리화학적 성질과 약물 방출에 대한 알긴산 칼슘 겔의 다양한 연구가 보고되어 있으며(Wittaya-areekul 등 2006; Shu & Zhu 2002; Inukai & Yonese 1999), 생리적 작용에 있어서도 혈중 콜레스테롤, 포도당, 인슐린 함량 저하 작용이 알려져 있다(Idota 등 2016; Back 등 2014; Kim 등 2000).

현재 식품산업에서 실제 섭취 가능한 식품 형태의 기능성 음료, 개인 맞춤형 음료와 식품, 식용유, 비타민 보조제, 식의약품제 등을 생산하는 기술 개발에 이용하려는 시도가 국내외 식품업체를 중심으로 시도되고 있기는 하지만, 식품에 딸

선 조성에 관한 많은 연구와 노력에 비하여 식품 제품으로 사용하기에 적합한 나노에멀션의 조제에 관한 보고는 한정적이다(Dasgupta 등 2015; Flanagan & Singh 2006; Sangunsri & Augustina 2006).

따라서 본 연구에서는 지용성 생리 활성 성분인 캡사이신을 최적화된 미세유동화법에 의하여 단일층, 이중층 나노에멀션을 제조하고 다양한 조리환경에서의 안정성을 검토하여 나노에멀션의 식품산업에서의 실제적인 응용 가능성과 다양한 제형의 제품에 활용할 수 있는 기초자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

Oleoresin capsicum(OC, Capsicum Oleoresin from *Capsicum frutescens* L., SHU 100,000, India)은 2010년 2월 (주)G&F에서 구매하여 4°C 냉장고에 보관하면서 사용하였다. Tween 80(P8074, polyoxyethylenesorbitan monooleate)과 알긴산(A2158, from brown algae, viscosity of 2% solution at 25°C: ~250 cps)은 Sigma (USA), propylene glycol(PG)은 Junsei(Japan)의 특급 시약을, 아스코르브산과 sucrose monostearate(SES, F-160, (주)일신엘스)는 식품첨가물 등급을 사용하였다.

2. 미세유동화법의 변수 결정

미세유동화장치를 이용하여 나노에멀션을 조제하는 공정에서 평균 입자 크기에 영향을 미치는 변수인 계면활성제 배합비율, 수상의 배합비율, 압력, 그리고 통과 횟수를 달리 하여 100 nm 이하의 평균 입자 크기를 갖는 나노에멀션 형성에 적합한 최적 변수를 결정하기로 하였다. 예비실험과 문헌조사를 통하여 일차적으로 계면활성제는 Tween 80을, 수상은 증류수를, 압력과 통과 횟수는 각각 140 MPa와 3회로 고정하여 실험하였다(Choi 등 2009). 계면활성제의 배합비율은 OC : Tween 80 : water = 1 : 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 : 3으로, 물 배합비율은 OC : Tween 80 : water = 1 : 0.5 : 2, 3, 4, 5, 10으로 하였다. OC와 Tween 80을 15분 동안 교반한 혼합액에 천천히 물을 가하며 1시간 교반하여 pre-emulsion을 조제하였다. Pre-emulsion은 미세유동화장치(Microfluidizer Processor, M-110EH, USA)를 이용하여 압력(69, 103, 140, 172 MPa)과 통과 횟수(1, 3, 5회)를 달리하여 조제하였다. 조제된 나노에멀션은 primary emulsion으로서 실온에서 24시간 안정화시킨 후, 0.5%(w/v) 농도로 증류수에 희석하여 평균 입자 크기와 제타 전위를 측정하여 최적 압력과 통과 횟수를 결정하였다.

3. 미세유동화에 의한 나노에멀션 조제의 최적화

1) 단일층 나노에멀션 조제

단일층 나노에멀션은 선정된 최적 조건인 140 MPa의 압력으로 5회 미세유동화 장치를 통과시켜 조제하였고 이때 최적 조건 배합비율로 선정된 OC : Tween 80 : water = 1 : 0.2 : 5를 포함한 각 상의 배합비율은 Table 1에 나타내었다. 또한 OC : Tween 80 : water를 pseudo ternary phase diagram을 작성하여 100 nm 이하의 크기를 갖는 단일상 나노에멀션이 형성되는 영역을 표시하여 O/W 나노에멀션의 구성 성분인 OC, Tween 80, water의 최적 배합 조건을 선정하였다.

보조 계면활성제 종류와 배합비율에 따른 나노에멀션 조제는 문헌과 예비실험을 통하여 최종적으로 PG와 SES를 선택하여 증류수에 혼합하였다(Choi 등 2009). PG는 PG + water = 1 : 2(w/v)의 비율로 혼합하였고, SES는 SES + water = 3 : 100(w/v)의 비율로 혼합하여 40°C에서 24시간 교반하여 완전히 균질화 하였다. 예비실험을 통한 나노에멀션 형성이 가능한 수상의 최저 배합비율 한계는 1 : 15 이상이었다. Table 2 및 Table 3과 같이 배합한 각각의 pre-emulsion은 140 MPa, 5회 반복 통과하여 primary emulsion을 조제하였다. 완성된 primary emulsion은 상온에서 24시간 안정화시키고, 0.5%(w/v) 농도로

Table 1. Composition of CLN by microfluidization on the system OC/Tween 80/water^{a)}

Ratio			Normalization		
OC	Tween 80	Water	(%)		
1	0.1	0.5	62.50	6.25	31.25
		1	47.61	4.77	47.62
		2	32.25	3.24	64.51
		3	24.38	2.45	73.16
		4	19.61	1.96	78.43
1	0.2	5	16.39	1.63	81.97
		5	19.44	3.87	97.18
		1	43.47	13.07	43.47
		2	30.30	9.09	60.61
		3	23.26	6.98	69.77
1	0.3	4	18.87	5.66	75.47
		5	15.87	4.77	79.36
		1.5	35.90	17.96	46.14
		2	28.57	14.28	57.15
		3	22.22	11.12	66.66
1	0.5	4	18.18	9.10	72.72
		5	15.38	7.70	76.91

CLN, capsaicin-loaded nanoemulsion; OC, oleoresin capsicum.

^{a)} The emulsions were prepared at the pressure of 140 MPa and 5 cycles, respectively.

Table 2. Composition of CLN by microfluidization on the system OC/Tween 80/PG + water^{a)}

Ratio			Normalization (%)				Pre-emulsion
OC	Tween 80	PG : water (1:2)	OC	Tween 80	PG	Water	
1	0.1	1	47.59	4.75	15.89	31.77	○
		2.5	27.75	2.78	23.16	46.31	○
		5	16.40	1.64	27.32	54.64	△
		7.5	11.55	1.15	29.10	58.20	△
		10	9.00	0.90	30.03	60.07	△
1	0.2	1	45.41	9.08	15.17	30.34	○
		2.5	26.95	5.39	22.55	45.10	○
		5	16.11	3.22	26.89	53.78	△
		7.5	11.47	2.29	28.75	57.50	△
		10	8.92	1.78	29.76	59.53	△

CLN, capsaicin-loaded nanoemulsion; OC, oleoresin capsicum; PG, propylene glycol.

^{a)} The emulsions were prepared at the pressure of 140 MPa and 5 cycles, respectively.

Table 3. Composition of CLN by microfluidization on the system OC/(Tween 80)/SES + water^{a)}

Ratio			Normalization (%)				Pre-emulsion
OC	Tween 80	SES : water (3:100)	OC	Tween 80	SES	Water	
1	0	15	6.25	0	2.73	91.02	○
		50	1.96	0	2.86	95.18	○
		100	0.99	0	2.88	96.13	○
		150	0.66	0	2.89	96.44	○
1	0.1	50	1.96	0.20	2.85	95.00	○
		100	0.99	0.10	2.88	96.03	○
		150	0.66	0.07	2.89	96.38	○
1	0.2	15	6.17	1.23	2.70	89.90	○
		50	1.95	0.39	2.84	94.81	○
		100	0.99	0.20	2.88	95.94	○
		150	0.66	0.13	2.89	96.32	○

CLN, capsaicin-loaded nanoemulsion; OC, oleoresin capsicum; SES, sucrose monostearate.

^{a)} The emulsions were prepared at the pressure of 140 MPa and 5 cycles, respectively.

증류수에 희석하여 저장온도와 저장 기간에 따른 평균 입자 크기와 제타 전위를 측정하여 최적의 계면활성제와 배합비율을 결정하였으며, 이를 이중층 나노에멀션 조제에 적용하였다.

2) 이중층 나노에멀션 조제

알긴산과 키토산을 이용한 이중층 나노에멀션의 조제는 미세유동화법에 의하여 primary emulsion을 조제하고 수상에 서 상온에서 저속으로 2시간 교반하여 조제하였다. 먼저, 수

상은 알긴산과 키토산을 각각 0.05%(w/v) 농도로 하여 100℃에서 5분 가열, 0.45 μm nylon filter(Whatman, England)에 여과하고 실온으로 냉각하여 조제하였다. Primary emulsion은 단일층 나노에멀션 조제에서 최적 조건으로 결정한 OC : Tween 80 : PG + water = 1 : 0.2 : 5의 배합비율로 pre-emulsion를 만들고 140 MPa에서 5회 통과시켜 조제하였다. 이 primary emulsion을 24시간 동안 실온에서 안정화시킨 후, 미리 조제한 알긴산과 키토산 용액에 각각 0.5%(w/v) 농도로 2시간 동안 교반하여 이중층 나노에멀션을 조제하고 그 안정성을 측

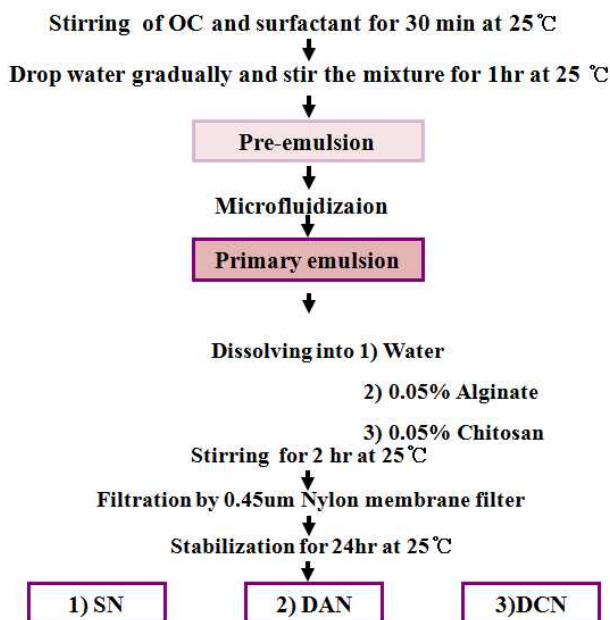


Fig. 1. Preparation of CLN by microfluidization^{a)}. CLN, capsaicin-loaded nanoemulsion; OC, oleoresin capsicum; SN, single-layer nanoemulsion; DAN, double-layer (alginate) nanoemulsion; DCN, double-layer (chitosan) nanoemulsion.
^{a)} The emulsions were prepared at the pressure of 140 MPa and 5 cycles, respectively.

정하였다. 미세유동화법에 의한 나노에멀션 조제 공정의 모식도는 Fig. 1에 나타내었다.

3) 평균 입자 크기

나노에멀션의 입자 크기 측정은 동적광산란(Dynamic Light Scattering, DLS) 원리에 의한 광자상관법(photon correlation spectroscopy, PCS)을 바탕으로 한 나노입자 측정기(Nanotracs TM250, Microtrac Inc., USA)을 이용하여 5회 이상 반복 측정하였다.

4) 제타 전위

액체 속에 부유하는 콜로이드 입자들의 표면 대전량 정도를 나타내는 제타 전위는 25 °C에서 전위차 측정기(NanoBrook ZetaPlus, Brookhaven Inc., USA)를 이용하여 측정하였다. 나노에멀션 약 3 mL를 disposable cuvette(1 cm × 1 cm × 4 cm)에 취하여 기포를 제거하고 전극이 안정화될 때까지 2분 동안 유지한 후 5회 이상 측정하여 retention 70% 이상의 값을 선택하였다.

5) Capsaicinoids 함량

원료인 oleoresin capsicum(OC)과 나노에멀션의 capsaicinoids

Table 4. Conditions of HPLC for capsaicinoids analysis

Pump	PU980 (Jasco, Japan)
Detector	LC-NET II/ADC (Jasco, Japan)
Auto-sampler	AS-2059 (Jasco, Japan)
Solvent	Methanol : Water = 70 : 30 (v/v)
Flow rate	0.8 mL/min
Wavelength	280 nm (UV975, Jasco, Japan)
Oven temperature	35 °C
Column	XDB-C ₁₈ (Agilent Technologies, USA) 250 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size
Injection volume	20 μL
Run time	25 min

는 Ha 등(2010)의 방법을 변형하여 HPLC를 이용하여 분석하였다.

OC 100 mg을 95%(v/v) ethanol 100 mL에 정용하고 0.2 μm PVDF syringe filter(Whatman, UK)로 여과한 후 HPLC(LC-NET II/ADC, Jasco, Japan)을 이용하여 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 함으로 정량하였다. 표준물질은 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 혼합물(65 : 35, Fluka, Switzerland)을 사용하여 0, 20, 40, 60, 100 μg/mL($R^2=0.999$)의 표준곡선식에 의하여 정량하였으며, HPLC의 분석조건은 Table 4에 나타내었다. 제조한 나노에멀션은 0.2 μm PVDF syringe filter(Whatman, UK)로 여과하여 OC와 같은 조건으로 분석하였다.

6) 통계처리

실험결과와 통계처리는 SAS system(Ver. 9.4, Cary NC, USA)을 이용하였다. 다시로 분산분석(ANOVA)는 Duncan's multiple range test를, 두 처리구 간의 유의성은 *T*-test를 통하여 검증하였다.

결과 및 고찰

1. Oleoresin capsicum 특성 분석

Pruthi JS(2003)은 인도산 *Capsicum frutescens*에서 추출한 상업용 OC 추출물은 대략 3.9~14%의 capsaicin을 함유하며, 500,000~1,800,000 SHU로 약학용 또는 식품과 음료 등에 공급되는 것으로 보고하였는데 HPLC를 이용한 분석 결과 실험에 사용한 oleoresin capsicum(OC, from *Capsicum frutescens* L., SHU 100,000, India)의 capsaicinoids 함량이 원료 g 당 19.19 ± 0.92 mg이었다. Maillard 등(1997)은 파프리카 등이 속해 있는 *Capsicum annum*은 0.01~0.70% capsaicinoids를 가지며, cayenne 과 tabasco 고추를 포함하는 *Capsicum frutescens*는 0.26~1.21%의 capsaicinoids를 함유한다고 보고하였는데 본 연구에 사용

한 OC의 capsaicinoids는 Pruthi와 Maillard가 보고한 결과의 중간인 1.91%로 분석되었다.

2. 미세유동화법의 변수 결정

계면활성제 배합비율, 수상 배합비율, 압력, 그리고 통과 횟수를 변수로 하여 미세유동화장치를 통과하여 조제한 나노에멀션의 평균 입자 크기와 제타 전위는 Table 5와 같다. 계면활성제의 배합비율은 OC : Tween 80 = 1 : 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 에서, 물의 배합비율은 OC : Tween 80 : water = 1 : 0.5 : 2, 3, 4, 5, 10에서, 압력은 103~172 MPa에서, 통과 횟수는 1, 3, 5회 통과 후 100 nm 이하의 나노에멀션 형성이 가능하였다. 또한, 100 nm로 측정된 평균 입자 크기의 제타 전위는 -20.75±1.85~ -23.99±1.81 mV였다. 결과적으로, 계면활성제의 배합비율, 압력, 통과 횟수가 증가할수록 평균 입자 크기는 유의적으로 감소하였고, 수상의 배합비율이 증가할수록 평균 입자 크기는 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 그러므로 100 nm 영역의 나노에멀션 형성을 위한 미세유동화법의 최적 압력은 140 MPa, 통과 횟수는 5회로 결정하였다(Fig. 2).

Tseng & Teng(2001)은 계면활성제의 농도가 클 경우, 표면

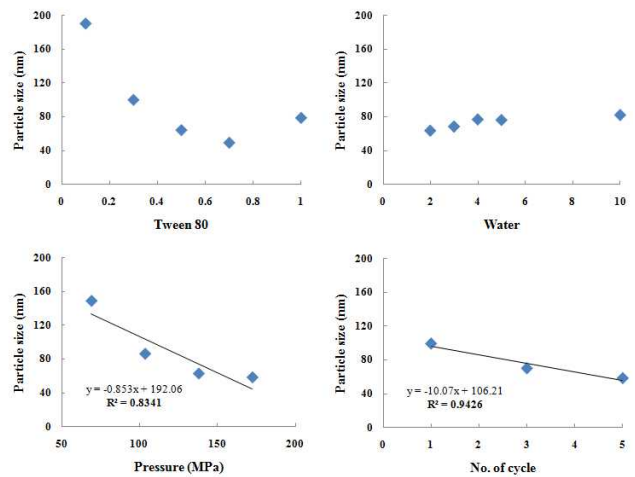


Fig. 2. Effect of surfactant, water, pressure, and number of cycle on particle size of CLN by microfluidization. CLN, capsaicin-loaded nanoemulsions.

에 계면활성제가 과도하게 흡착되어 에멀션의 안정성을 저하시킨다고 보고하였는데 본 결과에 따르면 OC : Tween 80 = 1 : 0.7로 혼합하였을 때는 49.32±4.20 nm였으나, 1 : 1.0으

Table 5. Effect of surfactant, water, pressure, and number of cycle on particle size and zeta potential of CLN by microfluidization¹⁾

OC	Ratio		Pressure (MPa)	Cycle (No.)	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
	Tween 80	Water				
1	0.1	3	140	3	190.44±17.34 ^{a,2)}	-25.78±2.41 ^b
	0.3				100.06±25.02 ^b	-23.04±2.36 ^a
	0.5				64.26± 2.83 ^{cd}	-22.16±1.57 ^a
	0.7				49.32± 4.20 ^d	-21.41±1.66 ^a
	1.0				78.78±13.77 ^c	-21.98±2.14 ^a
1	0.5	2	140	3	63.89±14.34 ^b	-23.99±1.81 ^b
		3			68.62± 7.15 ^b	-21.94±1.69 ^a
		4			76.88± 6.49 ^a	-21.07±2.23 ^a
		5			76.16± 6.35 ^a	-21.53±1.32 ^a
		10			81.99±10.31 ^a	-22.56±3.00 ^{ab}
1	0.5	3	69	3	148.75±96.39 ^a	-19.88±2.18 ^a
			103		86.33±24.98 ^b	-21.14±1.97 ^a
			140		63.00± 6.82 ^b	-21.65±2.76 ^{ab}
			172		58.51± 6.71 ^b	-23.09±2.17 ^b
1	0.5	3	140	1	99.01±20.01 ^a	-20.75±1.85 ^a
				3	70.26± 8.61 ^b	-21.76±0.96 ^a
				5	58.73± 4.86 ^c	-21.07±1.55 ^a

CLN, capsaicin-loaded nanoemulsions; OC, oleoresin capsicum.

¹⁾ Mean ± standard deviation (SD) of three replications (n=5).

²⁾ Data with different small letters (^{a-d}) in a column are significantly different ($p < 0.05$).

로 혼합하였을 때는 78.78±13.77 nm로 증가하여 계면활성제의 과도한 흡착을 방지하는 OC : Tween 80의 배합비율은 1: 0.7 이하로 선정하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

3. 미세유동화법에 의한 나노에멀션 조제의 최적화

1) OC/Tween 80/water

OC : Tween 80 : water를 일정 비율로 배합하여 미세유동화장치를 140 MPa로 5회 통과한 에멀션의 평균 입자 크기와 제타 전위는 Table 6에 나타내었다. 또한, 각 성분의 배합비에 따른 나노에멀션 형성 영역을 삼상도(pseudo-ternary phase diagram) 상에 작성하여, 100 nm 이하의 크기를 갖는 단일상 나노에멀션이 형성되는 영역을 Fig. 3에 표기하였다.

OC : Tween 80 = 1 : 0.1과 0.2의 배합비율에서는 평균 입자 크기 740.95±100.99~139.00±3.46 nm, 제타 전위는 -15.17± 4.53~ -26.57±1.56 mV 사이에서 마이크로에멀션이 형성되었다. 100 nm 이하의 나노에멀션은 OC : Tween 80 : water = 15.3~

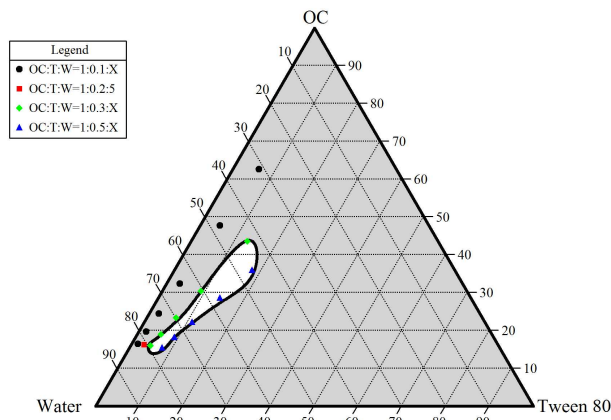


Fig. 3. Pseudo-ternary phase diagram of CLN by microfluidization on the system OC/Tween 80/water. CLN, capsaicin-loaded nanoemulsions; OC, oleoresin capsicum.

43.47% : 4.77~17.96% : 43.47~79.36% 사이에서 형성되었고, 제타 전위는 -16.46±1.50~ -31.29±3.39 mV를 나타내었다.

결과적으로 OC : Tween 80 : water = 1 : 0.3 : 1, 1 : 0.3 : 2, 1 : 0.5 : 1.5의 배합비율에서 100 nm 이하의 나노에멀션을 형성하였다. 그러므로 초음파파괴법과 비교하였을 때 미세유동화법은 소량의 계면활성제를 사용하여 나노에멀션 형성이 가능한 효율적인 제조법으로 판단되었다. 또한 미세유동화법으로 조제한 나노에멀션은 O/W 에멀션에 함유될 수 있는 일반적인 oil phase 최대 농도인 33.3%를 초과하고도 43.47%, 30.30%, 그리고 35.90%에서도 100 nm 이하의 나노에멀션 형성이 가능하여 소량의 계면활성제를 사용하여 고농축 생리활성 나노에멀션을 제조할 수 있는 효율적인 제조 방법으로 생각되었다. 한편, Jafari 등(2007)은 초음파파괴법을 이용하여 “over-processing”이 발생하지 않고 미세유동화법으로 조제한 것과 비슷한 입자 크기의 나노에멀션을 조제하였으나, 이 경우 pre-emulsion 제조 방법에 의존적이며, 나노에멀션의 입자 분포도가 더 넓게 형성된다고 보고하였다.

2) OC/Tween 80/PG+water

Tween 80을 계면활성제로 PG를 보조계면활성제로 첨가하여 수상에 PG + water = 1 : 2(w/v)로 혼합하여 미세유동화장치를 통과시켜 조제한 나노에멀션의 평균 입자 크기와 제타 전위는 Table 7에 나타내었다.

OC : Tween 80 : PG + water = 1 : 0.1 : 1, 2.5, 5, 7.5, 10 과 1 : 0.2 : 1의 배합비율 범위에서 110.41±19.04~200.75±10.45 nm의 마이크로에멀션이 형성되었다. 100 nm 이하의 나노에멀션은 OC : Tween 80 : PG + water = 1 : 0.2 : 2.5, 5, 7.5, 10 (8.92~26.95% : 1.78~26.95% : 67.66~89.29%) 범위에서 형성되었고, 나노에멀션의 제타 전위는 -20.36±2.50~ -32.72±8.16

Table 6. Particle size and zeta potential of CLN by microfluidization on the system OC/Tween 80/water^{1),2)}

Ratio			Particle size (nm)	Zeta potential (mV)		
OC	Tween 80	Water				
1	0.1	0.5	740.95±100.99 ^{a,3)}	-16.27±4.57 ^{ab}		
		1	262.60±21.88 ^b	-18.17±1.46 ^{abc}		
		2	209.49±15.23 ^c	-21.09±2.94 ^{bcd}		
		3	195.66±15.87 ^c	-15.17±4.53 ^a		
		4	196.81±10.83 ^c	-26.57±1.56 ^{efgh}		
1	0.2	5	189.57±13.62 ^c	-16.99±3.82 ^{ab}		
1	0.2	5	139.00±3.46 ^d	-20.65±13.76 ^{bcd}		
		1	80.27±3.75 ^{efg}	-16.46±1.50 ^{ab}		
		2	84.21±10.04 ^{ef}	-31.29±3.39 ^h		
		1	0.3	3	88.50±9.26 ^e	-27.77±1.73 ^{figh}
				4	86.99±9.32 ^e	-28.16±2.68 ^{gh}
1	0.3	5	92.98±7.34 ^e	-24.64±1.47 ^{defg}		
		1	0.5	1.5	48.23±3.39 ^h	-20.29±1.56 ^{abcd}
				2	50.37±4.74 ^h	-22.74±1.71 ^{cdef}
		1	0.5	3	56.21±6.05 ^{gh}	-22.15±1.19 ^{edc}
				4	59.35±7.08 ^{fgh}	-22.82±1.69 ^{cdef}
5	67.41±7.04 ^{efgh}			-23.82±2.21 ^{cdef}		

CLN, capsaicin-loaded nanoemulsion; OC, oleoresin capsicum.
¹⁾ Mean ± standard deviation (SD) of three replications (n=5).
²⁾ The emulsions were prepared at the pressure of 140 MPa and 5 cycles, respectively.
³⁾ Data with different small letters (^{a-h}) in a column are significantly different (p<0.05).

Table 7. Particle size and zeta potential of CLN by microfluidization on the system OC/Tween 80/PG + water^{1),2)}

Ratio			Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
OC	Tween 80	PG : water (1:2)		
1	0.1	1	200.75±10.45 ^{a,3)}	-24.68±2.79 ^b
		2.5	134.70±5.16 ^b	-26.39±1.53 ^c
		5	127.79±8.03 ^c	-26.48±2.63 ^c
		7.5	122.06±7.57 ^d	-29.48±2.04 ^{de}
		10	120.35±8.39 ^d	-30.80±4.26 ^e
1	0.2	1	110.41±19.04 ^e	-19.30±3.74 ^a
		2.5	84.33±4.74 ^{fg}	-20.36±2.50 ^a
		5	83.27±8.42 ^g	-32.72±8.16 ^c
		7.5	89.45±6.96 ^f	-29.05±1.48 ^d
		10	87.37±12.48 ^{fg}	-26.83±2.08 ^c

CLN, capsaicin-loaded nanoemulsion; OC, oleoresin capsicum; PG, propylene glycol.

¹⁾ Mean ± standard deviation (SD) of three replications (n=5).

²⁾ The emulsions were prepared at the pressure of 140 MPa and 5 cycles, respectively.

³⁾ Data with different small letters (^{a-g}) in a column are significantly different ($p<0.05$).

mV로 측정되었다. 또한, OC : Tween 80 : 수상의 배합비율이 1 : 0.2 : 5인 경우 사용한 수상의 종류가 증류수 단독이었을 때는 평균 입자 크기가 139.00±3.46 nm, 제타 전위는 -20.65±13.76 mV였으나(Table 6), PG를 보조계면활성제로 하여 조제한 경우 평균 입자 크기가 83.27±8.42 nm, 제타 전위 -32.72±8.16 mV로 측정되어 PG를 보조계면활성제로 하여 조제한 나노에멀션의 평균 입자 크기가 더 작고 안정적임을 확인하였다. 혼합계면활성제나 보조계면활성제를 사용하면 단일계면활성제를 사용하였을 때에 비하여 에멀션의 안정성이 더욱 향상되는 것으로 알려져 있다(Lee & Hahm 2010).

3) OC/Tween 80/SES+water

SES를 보조계면활성제로 첨가하여 수상에 SES + water = 3 : 100(w/v)으로 혼합하여 미세유동화장치를 통과시킨 나노에멀션의 평균 입자 크기와 제타 전위는 Table 8과 같다. 계면활성제인 Tween 80 첨가 없이도 균질한 pre-emulsion 형성이 가능하였으나 수상을 OC 대비 15배 이상 혼합하여야 균질한 pre-emulsion이 형성되었다. Pre-emulsion을 미세유동화장치에 통과시켜 조제한 나노에멀션의 평균 입자 크기는 129.05±15.15~106.39±16.72 nm 였다. OC : Tween 80 : SES + water = 1 : 0.1 : 50, 100, 150과 1 : 0.2 : 15, 50, 100, 150의 배합비율에서는 54.06~104.92 nm의 나노에멀션이 형성되었

Table 8. Particle size and zeta potential of CLN by microfluidization on the system OC/(Tween 80)/SES + water^{1),2)}

Ratio			Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
OC	Tween 80	SES : water (3:100)		
1	0	15	129.05±15.15 ^{a,3)}	-36.60±3.02 ^{bc}
		50	111.60±36.34 ^b	-34.19±2.83 ^a
		100	112.57±54.75 ^b	-36.88±2.95 ^{bc}
		150	106.39±16.72 ^b	-33.91±3.07 ^a
		50	100.88±13.67 ^b	-35.83±3.05 ^{abc}
1	0.1	100	104.92±8.77 ^b	-37.75±2.68 ^{bcd}
		150	102.35±23.18 ^b	-35.65±2.56 ^{ab}
		15	60.33±10.41 ^c	-39.15±3.61 ^{de}
1	0.2	50	63.62±29.99 ^c	-37.99±2.29 ^{cd}
		100	66.36±26.84 ^c	-39.23±5.08 ^{de}
		150	54.06±14.90 ^c	-40.20±4.83 ^e

CLN, capsaicin-loaded nanoemulsion; OC, oleoresin capsicum; SES, sucrose monostearate.

¹⁾ Mean ± standard deviation (SD) of three replications (n=5).

²⁾ The emulsions were prepared at the pressure of 140 MPa and 5 cycles, respectively.

³⁾ Data with different small letters (^{a-e}) in a column are significantly different ($p<0.05$).

다. 결과적으로, 100 nm 이하의 나노에멀션은 OC : Tween 80 : SES + water = 0.66~6.17% : 0.07~0.39% : 92.59~99.21%의 배합비율에서 형성되었다. 또한, 100 nm 이하 나노에멀션 형성 영역에서 보조계면활성제인 SES가 차지하는 농도는 PG를 보조계면활성제로 하여 사용한 농도의 10% 수준인 2.70~2.89% 범위로 나타났다. 그러나 소량의 SES를 사용하여도 100 nm 이하 나노에멀션 형성에는 효과적이었지만 계면활성제 농도의 감소와 함께 생리 활성 core ingredient인 OC의 함량도 감소하는 결과를 나타내었다.

4. 환경변수에 따른 나노에멀션 제조 최적화

1) 단일층 나노에멀션 특성

환경변수에 따른 나노에멀션 형성 조건을 확인하기 위하여, 미세유동화법으로 조제한 단일층 나노에멀션의 pH(3, 5, 7, 9), 가열온도(60°C, 80°C, 100°C), 가열시간 (15 min, 30 min)에 따른 평균 입자 크기, 제타 전위, capsaicinoids 함량은 Table 9와 같다. 25°C 조건하에서 pH 3에서 pH 9까지 변화시킨 단일층 나노에멀션의 평균 입자 크기는 79.85±5.92~84.86±12.01 nm 범위였고, pH에 따른 시료 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p<0.001$).

Table 9. Effect of pH, temperature, and heating time on particle size of SN by microfluidization^{1),2)}

pH	Temperature (°C)	Heating time (min)	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Capsaicinoids (µg/mL)
3	25	-	84.86±12.01 ^{c,3)}	-9.86±11.19 ^{ab}	10.10±0.22 ^{bcd}
	60	15	109.39±5.43 ^c	-6.57±2.04 ^a	9.73±0.58 ^{cd}
	80	15	1,145.22±251.66 ^b	-22.04±3.21 ^c	9.68±0.19 ^d
	100	15	1,489.85±653.86 ^a	-15.31±6.16 ^c	10.82±0.19 ^{abcd}
5	25	-	82.63±12.16 ^c	-49.98±12.58 ^e	11.17±0.50 ^{abc}
	25	-	79.85±5.92 ^c	-42.09±7.09 ^{efg}	11.35±1.15 ^{ab}
7	60	15	80.09±6.03 ^c	-45.39±8.61 ^{ef}	11.39±0.81 ^{ab}
	80	15	81.40±6.11 ^c	-40.11±6.75 ^{def}	11.00±0.28 ^{abcd}
	100	15	81.28±8.92 ^c	-39.79±5.92 ^{def}	10.78±0.46 ^{abcd}
	100	30	80.97±6.03 ^c	-43.53±2.54 ^{efg}	10.30±0.68 ^{abcd}
9	25	-	83.13±5.45 ^c	-46.02±14.24 ^{fg}	11.01±1.26 ^{abcd}
	60	15	79.65±4.31 ^c	-36.15±3.34 ^{de}	11.68±0.27 ^a
	80	15	83.82±6.89 ^c	-36.05±1.75 ^{de}	10.86±0.00 ^{abcd}
	100	15	79.63±4.90 ^c	-36.34±2.87 ^{de}	10.76±0.07 ^{abcd}

SN, capsaicin-loaded single-layer nanoemulsions.

¹⁾ Mean ± standard deviation (SD) of three replications (n=5).

²⁾ The emulsions were prepared for the system OC/Tween 80/PG + water at the pressure of 140 MPa and 5 cycles, respectively.

³⁾ Data with different small letters (^{a-e}) in a column are significantly different ($p < 0.001$).

pH 3 환경에서는 가열온도가 25°C에서 100°C로 높아지면 서 평균 입자 크기도 84.86±12.01 nm에서 1,489.85±653.86 nm로 급격히 증가하였으나 pH 7과 pH 9에서는 가열온도와 가열시간에 따른 평균 입자 크기의 유의적 차이가 나타나지 않았다($p < 0.001$). 결과적으로 단일층 나노에멀션의 평균 입자 크기는 pH 3을 제외하고 pH 5에서 pH 9까지 일정한 평균 입자 크기를 유지하였고, 가열온도와 가열시간에 안정하였다. 단일층 나노에멀션의 제타 전위는 pH 3에서 -6.57±2.04 mV에서 -22.04±3.21 mV 사이로 측정되어 불안정한 시료 특성을 나타내었다. 그러나 pH 5에서 pH 9까지, 가열온도와 가열시간에 따른 단일층 나노에멀션의 제타 전위는 -36.05±1.75~ -49.98±12.58 mV로 측정되었으며 pH, 가열시간, 가열온도에 따라 유의적 차이는 있었으나 일정한 경향은 찾지 못하였다($p < 0.001$). 이상의 결과로 미루어 단일층 나노에멀션은 pH 3과 같은 강한 산성 환경을 제외한 일반적인 조리환경에서는 안정성을 유지한다는 것을 확인하였다. Capsaicinoids 함량은 가열온도와 시간에 따라 유의적 차이는 있었으나 일정한 경향은 찾지 못하였으며 가열시간 30분 이내에서는 비교적 열에 안정한 상태인 것으로 판단되었다. 이는 100°C와 150°C에서 5시간 가열 조리 후에도 잔존율은 73.3~84.7%로 비교적 열에 안정하여 15~30분 동안 가열 조리하여도 비교적 안정하였다는 Choi & Ha(1994a)는 2시간 가열 후 capsaicin 잔존율이

87%였고, 100~120°C에서 30분 가열 후 capsaicin의 잔존율이 86~93%라고 하여 본 연구의 결과와 유사한 경향을 보고하였다(Choi & Ha 1994b).

2) 이중층 나노에멀션 특성

미세유동화법으로 조제한 이중층 나노에멀션의 pH(3, 5, 7, 9), 가열온도(60°C, 80°C, 100°C), 가열시간(15 min, 30 min)에 따른 평균 입자 크기, 제타 전위, capsaicinoids 함량은 Table 10과 같다.

알긴산 이중층 나노에멀션은 단일층 나노에멀션이나 키토산 이중층 나노에멀션과 비교하여 넓은 pH 영역에서 안정한 형태의 나노에멀션을 형성하였다. 평균 입자 크기는 pH 3에서 pH 9까지 95.27±6.13~154.77±23.47 nm 범위였고, pH와의 유의성은 있었으나 일정 경향은 확인하지 못하였다($p < 0.05$). pH 7 환경에서 가열온도를 15분과 30분으로 달리하였을 때의 평균 입자 크기는 가열 30분 후에 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 또한 제타 전위는 pH 3에서 pH 9까지 변화함에 따라 -20.13±0.70~ -73.90±3.25 mV로 유의적으로 증가하여($p < 0.05$) pH가 높아질수록 안정된 형태의 에멀션을 형성 가능한 것으로 판단되었다. 가열 조리온도와 시간에 따른 capsaicinoids의 변화는 가열온도에 따라 뚜렷한 유의적 차이를 보이지 않아 가열시간 30분 이내에서는 비교적 열에 안정

Table 10. Effect of pH, temperature, and heating time on particle size of DAN by microfluidization^{1),2)}

pH	Temperature (°C)	Heating time (min)	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Capsaicinoids (µg/mL)
3	25	-	95.27±6.13 ^{de,3)}	-20.13±0.70 ^a	10.33±0.89 ^a
5	25	-	131.59±16.33 ^{bc}	-48.85±5.48 ^c	10.68±0.51 ^a
	25	-	154.77±23.47 ^a	-61.46±2.94 ^d	10.32±0.90 ^a
	60	15	129.06±54.29 ^{bc}	-64.73±5.77 ^{de}	10.57±0.24 ^a
7	80	15	112.47±64.02 ^{cd}	-70.67±5.85 ^{ef}	10.30±1.08 ^a
	100	15	117.22±43.35 ^c	-73.90±5.50 ^f	10.77±0.64 ^a
	100	30	134.22±28.65 ^{abc}	-70.37±4.61 ^{ef}	10.49±0.35 ^a
9	25	-	140.82±22.16 ^{ab}	-73.58±3.25 ^f	10.50±0.73 ^a

DAN, capsaicin-loaded double-layer (alginate) nanoemulsions.

¹⁾ Mean ± standard deviation (SD) of three replications (n=5).

²⁾ The emulsions were prepared for the system OC/Tween 80/PG + water at the pressure of 140 MPa and 5 cycles, respectively.

³⁾ Data with different small letters (^{a-f}) in a column are significantly different ($p<0.05$).

Table 11. Effect of pH, temperature, and heating time on particle size of DCN by microfluidization^{1),2)}

pH	Temperature (°C)	Heating time (min)	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Capsaicinoids (µg/mL)
3	25	-	111.84±38.30 ^{*,3)}	37.79±31.63 ^{N.S.}	10.01±0.86 ^{N.S.}
5	25	-	246.98±89.32	54.84±2.54	7.69±0.04

DCN, capsaicin-loaded double-layer (chitosan) nanoemulsions.

¹⁾ Mean ± standard deviation (SD) of three replications (n=5).

²⁾ The emulsions were prepared for the system OC/Tween 80/PG + water at the pressure of 140 MPa and 5 cycles, respectively.

³⁾ N.S. not significant. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, significantly different from nanoemulsions.

한 상태인 것으로 판단되었다. Table 11에서 제시된 바와 같이 키토산 이중층 나노에멀션은 pH 3에서부터 100 nm 이상의 입자를 형성하여 본 실험에는 적합하지 않은 것을 판단되었다. Lim 등(2010)은 pH 2 용액에 희석한 coenzyme Q₁₀ 나노에멀션은 열처리 후 평균 입자가 증가하였고, 투과도가 낮아졌으며, 제타 전위가 -20 mV 이하로 불안정하여 측정이 불가능하였고, 또한 Hong ST(2008)는 지방입자 크기가 증가하였을 때 유화액의 안정도는 감소한다고 하였다. 이는 pH 3에서 유화액의 에너지장벽이 파괴되어 입자간의 응집 속도가 빨라져 결국 입자의 크기가 증가하게 되어 본 연구와 같은 결과로 판단되었다.

결과적으로 최적화 조건을 적용하여 미세유동화법으로 조제한 단일층 나노에멀션과 알긴산 이중층 나노에멀션은 극산, 극알칼리성을 제외한 일반적 조리 환경에서 안정한 구조체로서 식품산업분야에서 실제 적용 시에도 안정한 제품화 소재로 다양하게 이용 가능할 것으로 판단되었다.

5. 아스코르브산 첨가 후 나노에멀션 특성

대표적인 천연 항산화제로 알려져 있는 비타민 C는 그 한계 사용량이 정해져 있지 않고 독성이 없으며 무엇보다도 다른 천연 산화방지제와 비교하여 매우 저렴하여 식품산업에서 제품에 적용한다면 항산화 효과와 동시에 경제적인 응용을 기대할 수 있을 것이다. 그러므로, 미세유동화법으로 조제한 단일층 나노에멀션과 이중층 나노에멀션에 아스코르브산을 첨가하여 평균 입자 크기, 제타 전위, capsaicinoids 함량 변화를 측정함으로써 지용성 생리 활성 성분의 항산화제로써 아스코르브산의 역할과 그 산업적 적용가능성을 알아보고자 하였다.

단일층 나노에멀션과 이중층 나노에멀션의 아스코르브산 첨가에 따른 평균 입자 크기, 제타 전위, capsaicinoids 함량은 Fig. 4에 나타내었다. 단일층 나노에멀션은 아스코르브산 첨가 전, 후 평균 입자 크기에 유의적인 변화가 없었으나 알긴산, 키토산 이중층 나노에멀션은 아스코르브산 첨가에 의하여 평균 입자 크기가 모두 유의적으로 감소하였다($p<0.001$). 이는 pH가 낮아지면서 이중층 나노에멀션의 평균 입자 크기도 같이 작아졌던 본 실험 결과와 일치하는 것이다. 아스코르

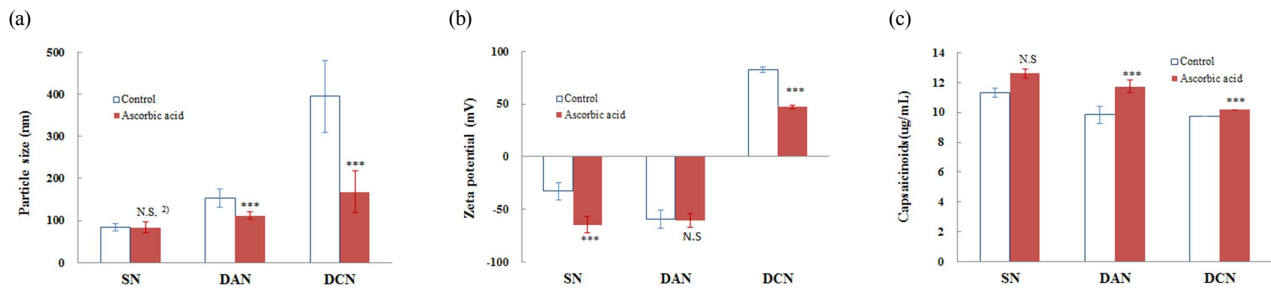


Fig. 4. Effect of ascorbic acid on particle size (a), zeta potential (b) and capsaicinoids (c) CLN by microfluidization on the system OC/Tween 80/PG + water¹⁾. CLN, capsaicin- loaded nanoemulsions. SN, single-layer nanoemulsion; DAN, double-layer (alginate) nanoemulsion; DCN, double-layer (chitosan) nanoemulsion. ¹⁾ Mean \pm standard deviation (SD) of three replications (n=5). ²⁾ N.S., not significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from nanoemulsions.

브산 첨가에 따른 단일층 나노에멀션의 제타 전위는 아스코르브산 첨가 전 -32.72 ± 8.16 mV에서 첨가 후 -64.94 ± 7.79 mV로 변화하여 안정성이 유의적으로 증가하였다. 알긴산 이중층 나노에멀션의 아스코르브산 첨가에 따른 제타 전위의 유의적 차이는 나타나지 않았고 키토산 이중층 나노에멀션은 82.93 ± 2.52 mV에서 47.18 ± 1.99 mV로 35.75 mV가 감소하였다. 아스코르브산 첨가에 의하여 단일층 나노에멀션, 알긴산 이중층 나노에멀션, 키토산 이중층 나노에멀션의 capsaicinoids 함량은 첨가 전 각각 11.33 ± 0.30 $\mu\text{g/mL}$, 9.83 ± 0.59 $\mu\text{g/mL}$, 9.72 ± 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 이었으나 첨가 후에는 12.6 ± 0.29 $\mu\text{g/mL}$, 11.73 ± 0.41 $\mu\text{g/mL}$, 10.18 ± 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 로 첨가 전과 비교하여 $0.46 \sim 1.90$ $\mu\text{g/mL}$ 가 증가한 결과를 나타내었다. Choi AJ(2006)은 나노에멀션의 산화 안정성을 carotenoid계 색소 성분의 변화량으로 측정하여, 알긴산과 키토산 이중층 나노에멀션은 단일층 나노에멀션에 비해 OC를 감싸는 compact한 구조 형성에 있어서 불안정하여 이로 인하여 내부의 carotenoids 색소 성분이 쉽게 산화되기 때문에 단일층 나노에멀션의 carotenoid 함량이 57.89%로 가장 높았다고 하여 아스코르브산을 첨가하지 않은 경우 단일층 나노에멀션이 가장 손실률이 적었던 본 연구와 일치한 결과를 제시하였다. 그러므로 아스코르브산의 첨가는 capsaicinoids 파괴를 지연시키는 역할을 하며, 이중층 나노에멀션의 기능성 생리활성 성분에 작용하여 산화를 지연시키며 동시에 생리활성 성분의 보호와 전달체로서의 역할에 더 효율적이므로, 식품이나 음료 제품에서 산업적 응용에 고려될 수 있을 것으로 생각되었다.

요약 및 결론

본 연구에서는, 미세유동화법에 의한 나노에멀션 조제 시 최종 입자 크기에 영향을 미치는 변수인 계면활성제와 수상의 배합비율, 압력, 그리고 통과 횟수 등을 달리하여 100 nm

이하의 나노에멀션 형성이 가능한 최적 조건을 선정하고 최적 조건에서 미세유동화법으로 조제한 단일층 나노에멀션과 이중층 나노에멀션의 pH, 가열온도, 가열시간, 아스코르브산 첨가에 따른 평균 입자 크기, 제타 전위, capsaicinoids 함량과 조리 안정성을 측정하였다. 그 결과, 배합비율 OC : Tween 80 : propylene glycol + water = 1 : 0.2 : 5, 140 MPa로 미세유동화장치를 5회 반복 통과하여 최적화된 나노에멀션을 조제하였으며 소량의 계면활성제를 사용하여 100 nm 이하 범위의 에멀션 형성이 가능하였다. 보조계면활성제의 종류와 첨가량을 달리 한 나노에멀션은 배합비율을 OC : Tween 80 : PG+water = 1 : 0.2 : 5로 결정하였다. 단일층 나노에멀션, 알긴산 이중층 나노에멀션, 키토산 이중층 나노에멀션의 조리 환경에 따른 안정성을 측정한 결과, 단일층 나노에멀션의 평균 입자크기, 제타 전위, capsaicinoids 함량은 pH 5~9 범위에서 가열온도와 시간에 안정하였다. 알긴산 이중층 나노에멀션은 단일층 나노에멀션이나 키토산 이중층 나노에멀션과 비교하여 pH 3에서도 안정한 형태의 나노에멀션을 형성하였고 가열 조리온도와 시간에 따른 capsaicinoids의 변화도 가열시간 30분 이내에서는 비교적 열에 안정한 상태인 것으로 판단되었다. 결과적으로 최적 조건에 의하여 미세유동화법으로 조제한 단일층 나노에멀션과 알긴산 이중층 나노에멀션은 극산, 극알칼리성을 제외한 일반적 조리 환경(pH 5~9, 가열온도 60~100°C, 가열시간 0~30분) 처리 후에도 안정성을 유지하는 것으로 생각되었다. 또한 단일층 나노에멀션은 아스코르브산 첨가 전, 후 평균 입자 크기에 유의적인 변화가 없었으나 알긴산, 키토산 이중층 나노에멀션은 아스코르브산 첨가에 의하여 평균 입자 크기가 모두 유의적으로 감소하였고($p < 0.001$), capsaicinoids 함량은 증가한 결과를 나타내어 식품이나 음료 제품에서 효율적으로 이용 가능할 것으로 기대되었다.

References

- Act 2, Section 1 of the Korea nanotechnology development promotion act. 2013. Available from <http://www.law.go.kr>
- Ann JY, Lee MS, Kim CT, Kim YH. 2011. Reduction of body weight by capsaicin is associated with inhibition of glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity and stimulation of uncoupling protein 2 mRNA expression in diet-induced obese rats. *J Food Sci Nutr* 16:210-216
- Back SY, Kim HK, Jung SK, Do JR. 2014. Effects of alginate oligosaccharide on lipid metabolism in mice fed a high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sic Nutr* 43:491-497
- Becher P. 1991. Food emulsion and introduction. pp.1-6. ACS Symposium Series 448, Washington, DC, USA
- Bode AM, Dong Z. 2015. Toxic phytochemicals and their potential risks for human cancer. *Cancer Prev Res* 8:1-8
- Charpentier JC. 2005. Four main objectives for the future of chemical and process engineering mainly concerned by the science and technologies of new materials production. *Chem Eng J* 107:3-17
- Choi AJ, Kim CH, Cho YJ, Hwang JK, Kim CT. 2009. Effects of surfactants on the formation and stability of capsaicin loaded nanoemulsions. *Food Sci Biotechnol* 18:1161-1172
- Choi AJ. 2006. Preparation and characterization of alginate/chitosan-based nanoemulsions as nutraceutical delivery system of bioactive ingredients. Ph. D. Thesis, Yonsei Univ. Korea.
- Choi OS, Ha BS. 1994a. Changes in carotenoid pigments of oleoresin red pepper during cooking. *J Korean Soc Food Nutr* 23:225-231
- Choi OS, Ha BS. 1994b. Quality in volatile components and capsaicin of oleoresin red pepper during cooking. *J Korean Soc Food Nutr* 23:232-237
- Choi SJ. 2014. Nanoemulsion: A novel type of food emulsions. *Food Sci Ind* 47:12-20
- Clark R, Lee J, Lee SH. 2015. Synergistic anticancer activity of capsaicin and 3,3'-diindolylmethane in human colorectal cancer. 2015. *J Agric Food Chem* 63:4297-4304
- Dasgupta N, Ranjana S, Mundekkada D, Ramalingama C, Shankerb R, Kumarb A. 2015. Nanotechnology in agro-food: From field to plate. *Food Res Int* 69:381-400
- Flanagan J, Singh H. 2006. Microemulsions: A potential delivery system for bioactives in food. *Crit Rev in Food Sci Nutr* 46:221-237
- Ha JH, Seo HY, Shim YS, Seo DW, Soeg HM, Ito M, Nakagawa H. 2010. Determination of capsaicinoid in foods using ultra high performance liquid chromatography. *Food Sci Biotechnol* 19:1005-1009
- Hong ST. 2008. Changes in the stability properties of methylcellulose emulsions as affected by competitive adsorption between methylcellulose and Tween 20. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:1278-1286
- Idota Y, Kogure Y, Kato T, Oagwa M, Kobayashi S, Kakinuma C, Yano K, Arakawa H, Miyajima C, Kasahara F, Orihara T. 2016. Cholesterol-lowering effect of calcium alginate in rats. *Biol Pharm Bull* 39:62-67
- Inukai M, Yonese M. 1999. Effects of change density on drug permeability through alginate gel membrane. *Chem Pharm Bull* 47:1059-1063
- Jafari SM, He Y, Bhandari B. 2007. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *J Food Eng* 83:478-488
- Kim CT, Kim CJ, Cho YJ, Kim YH, Kim IW, Choi AJ. 2008. Novel fabrication technology of food nanoemulsions. *Food Sci Ind* 41:33-45
- Kim WY, Lim KS, Park HS. 2002. Protective effect of capsaicin on the ischemia-reperfusion injury of the intestine in rats. *J Korean Soc Emerg Med* 14:155-162
- Kim YY, Lee KW, Kim GB, Cho YJ. 2000. Studies on physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *Laminaria japonicus* by thermal decomposition: 3. Excretion effects of cholesterol, glucose and cadmium(cd) in rats. *J Korean Fish Soc* 33:393-398
- Ko SH. 2008. Nanodispersion and nanoparticle using food-grade materials. *Food Sci Ind* 41:25-31
- Komaiko J, McClements DJ. 2015. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: factors influencing particle size. *J Food Eng* 146:122-128
- Korea Food and Drug Administration. 2010. from: <http://www.mfds.go.kr>
- Lee IO, Lee KH, Pyo JH, Kim JH, Choi YJ, Lee YC. 2007. Anti-inflammatory effect of capsaicin in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Helicobacter* 12:510-517
- Lee Y, Hahm M. 2010. Evaluation on the possibility of preparation of nanosized alumina powder under W/O emulsion method using homogenizer. *Appl Chem Eng* 21:488-494
- Lim JS, Gang HJ, Yoon SW, Kim HM, Suck JW, Kim DU, Lim JK. 2010. Preparation and its stability of a coenzyme Q₁₀ nanoemulsion by high pressure homogenization with different value type conditions. *Korean J Food Technol* 42:565-570
- Lim MS, Park MA, Park SN. 2012. Preparation of nano-emulsion

- containing polygonum aviculare extract for enhanced transdermal delivery. *Appl Chem Eng* 23:222-227
- Liu CH, Bu XL, Wang J, Zhang T, Xiang Y, Shen LL, Wang QH, Deng B, Wang X, Zhu C, Yao XQ, Zhang M, Zhou HD, Wang YJ. 2016. The associations between a capsaicin-rich diet and blood amyloid- β levels and cognitive function. *J Alzheimers Dis* 52:1081-1088
- Lovelyn C, Attama AA. 2011. Current state of nanoemulsions in drug delivery. *J Biomater & Nanobiotechnol* 2:626-639
- Luqman S, Rizvi SI. 2006. Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Phytotherapy Res* 20:303-306
- Maillard MN, Giampaoli P, Richard HMJ. 1997. Analysis of eleven capsaicinoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Flavour Fragr J* 12:409-413
- Mitri K, Shegokar R, Gohla S, Anselmi C, Muller RH. 2011. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *Int J Pharm* 414: 267-275
- Park DJ, Kim BK. 2008. Food nanoparticles. *Food Sci Ind* 41: 17-24
- Park JH, Kim SG, Kin JH, Jung WY, Lee JS, Byun WT. 2014. Spicy food preference and the HPA axis reactivity to stress in Korean social drinkers. *J Korean Soc Biol Ther Pshchiatry* 20:127-133
- Park JS, Kim MH, Yu R. 1999. Approximate amounts of capsaicin intakes determined from capsaicin contents in powdered soups of Korean instant noodles and hot peppers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28:501-504
- Park MY, Kim DH, Jin M. 2010. Immunomodulatory effects of orally administrated capsaicin extract on Peyer's patches. *Korean J Orient Physiol Pathol* 24:446-451
- Park S, Kim D, Shin WS. 2012. Adaptability and preference to Korean food with foreigners who reside in Seoul, Korea. *Korean J Community Nutr* 17:782-794
- Pradhan N, Singh S, Ojha N, Shrivastava A, Barla A, Rai V, Bose S. 2015. Facets of nanotechnology as seen in food processing, packaging, and preservation industry. *BioMed Res Int* 365672:1-17
- Pruthi JS. 2003. Advanced in post-harvest processing technologies of capsicum. pp.175-213. Capsicum. Amit Krishna De (ed). Taylor & Francis Inc., NY, USA.
- Rekha MR, Sharma CP. 2010. pH sensitive succinyl chitosan microparticles: A preliminary investigation towards oral insulin delivery. *Trends Biomater Aat Organs* 21:107-115
- Sanguansri P, Augustina MA. 2006. Nanoscale materials development - a food industry perspective. *Trends Food Sci Technol* 17:547-556
- Seo DY, Ko JR, Baek YH. 2008. The effects of short-term exercise and capsaicin supplementation on serum lipids, antioxidants and Akt contents in STZ-induced diabetic rat. *J Life Sci* 18:1739-1744
- Shu XZ, Zhu KJ. 2002. The release behavior of brilliant blue from calcium-alginate gel beads coated by chitosan: The preparation method effect. *Eur J Pharm Biopharm* 53:193-201
- Tseng WJ, Teng KH. 2001. The effect of surfactant adsorption on sedimentation behaviors of Al_2O_3 - toluene suspensions. *Mater Sci Eng* 318:102-110
- Wittaya-areekul S, Kruenate J, Prahsam C. 2006. Preparation and *in vitro* evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. *Int J Pharm* 312:113-118
- Yamaguchi M, Yahagi N, Kato H, Takano F. 2010. Capsicum extract and its constituents modulated the production of immunoglobulines in Peyer's patch cells *ex vivo*. *J Funct Foods* 2:255-262

Received 11 November, 2016

Revised 05 December, 2016

Accepted 12 December, 2016