KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 54, No. 1, pp. 66~74 (2022)
https://doi.org/10.9721/KJFST.2022.54.1.66

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

©The Korean Society of Food Science and Technology

베타카로틴 함유 키토산/하이알루론산 나노캡슐의 용해도 및 재분산성 특성

안은정[1] · 이지수[1] · 이현규[1,*]
[1]한양대학교 식품영양학과

Properties of β-carotene-loaded chitosan/hyaluronic acid nanocapsules: solubility and redispersibility

Eun Jung An[1], Ji-Soo Lee[1], and Hyeon Gyu Lee[1,*]
[1]*Department of Food and Nutrition, Hanyang University*

Abstract To improve the solubility of β-carotene, three types of β-carotene-loaded nanocapsules were prepared using chitosan (CS) and two cross-linkers, sodium tripolyphosphate (TPP) and hyaluronic acid (HA), alone or in combination (CS-TPP, CS-TPP-HA, and CS-HA). The entrapment efficiency of all nanocapsules significantly increased with an increase in TPP and HA, with the efficiency ranging from 95% to 99%. The solubility of β-carotene was significantly improved by CS nanoencapsulation before and after lyophilization and during storage. CS/HA nanoencapsulation significantly improved (by 11-fold) the water solubility of β-carotene. In particular, CS/HA nanoencapsulation was the most effective in terms of not only the solubility of β-carotene, but also the redispersibility ratio. Therefore, CS/HA encapsulation could be useful for improving the solubility of poorly soluble active ingredients, such as β-carotene.

Keywords: β-carotene, solubility, nanoencapsulation, hyaluronic acid, redispersibility

서 론

일반적으로 난용성 성분들은 체내 흡수율과 생체이용효율이 낮기 때문에 섭취 후 본연의 생리활성을 충분히 발현하기 어렵다는 문제점이 지적되어 왔다(Mauludin 등, 2009). 난용성 성분들은 특성상 음료 등의 수용액 환경에 적용하기 어렵기 때문에 산업적 측면에서도 많은 제한점을 가지고 있다. 따라서 난용성 성분의 용해도 개선을 위한 연구는 식품 및 의약산업에서 매우 중요한 과제로 여겨지고 있다(Bushrab와 Muller, 2003). 용해도를 증진 시키기 위해서 β-cyclodextrin으로의 포집, 입자크기 감소(particle size reduction), 고체분산(solid dispersion), 나노 분산액, 초임계 유체화 기술(supercritical fluid technology), 유기용매 사용 등 다양한 방법들이 이용되어 왔다(Kumar 등, 2011). 특히, 급속한 나노기술의 발달로 나노캡슐을 이용한 난용성 성분의 용해도 증진을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Pinto 등, 2006).

본래 식품분야에서 캡슐화(encapsulation)는 불안정한 물질을 빛, 산소, 수분, 온도 등의 외부 환경으로부터 보호하여 저장 안전성을 향상시키고, 불필요한 냄새와 맛의 은폐를 위해 주로 이용되어왔다(Dziezak, 1988). 또한 캡슐화는 섭취 후 체내에서 방출 조절 및 점막부착(mucoadhesive) 특성을 나타내며, 나노단위의 캡슐화를 통해서 포집된 유효성분의 체내 체류시간과 세포투과능을 증진(Dubal 등, 2006)시켜서 생체이용효율을 향상시킬 수 있다고 보고되어 왔다. 더욱이 나노캡슐은 작은 입자크기로 인해 표면적이 증가되기 때문에 난용성 성분의 용해도를 향상시킬 수 있다(Mauludin 등, 2009). 나노캡슐에 의한 용해도 연구는 주로 의약품을 위주로 진행되면서 화학적으로 합성된 중합체들을 피복물질로 이용해왔기 때문에, 식품 분야에서 이용 가능한 천연 다당류만을 소재로 한 캡슐화를 통한 용해도 연구는 아직까지 제한적이다. 그러므로 식품학적 안전성이 확보된 피복물질인 다양한 천연 다당류를 통한 용해도 향상 연구가 필요하다.

β-Carotene은 비타민 A의 전구체이며 녹황색 채소나 과일에 다량 함유되어 있는 카로티노이드계 색소의 일종으로 식품의 착색료로서 이용되어왔다(Mangles 등, 1993). β-Carotene은 항산화제로서 망막을 비롯한 여러 조직의 상피세포 분화 및 증식을 정상적으로 유지· 재생시키고(Desobry 등, 1998), 항암작용, 심장병과 시력감퇴, 백내장에 예방 효과를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Omenn 등, 1996). 그러나 β-carotene은 지용성 물질로서 난용성 특성을 나타낼 뿐만 아니라 구조적으로 불안정하여 공기와 산소, 빛, 고온 등의 조건에 의해 쉽게 산화되기 때문에(Liu 등, 2000), 식품 산업적용에 제한적으로 적용되고 있다. 따라서 식품산업에 β-carotene의 적용범위를 확대시키기 위해서는 β-carotene의 용해도 및 안정성 확보를 위한 연구가 요구된다(Orset 등, 1999).

지금까지 β-carotene의 용해도를 증진시키기 위해서 주로 미셀과 에멀젼 등의 형태로 연구되어 왔다(Canfield 등, 1990; Mcclements 등, 2007). Giorgio(1992)에 따르면, 미셀과 에멀젼은 용해도 향상 효과는 뛰어나지만 에멀젼의 경우 8시간 이내에 50%가 산화되었으며, 미셀과 에멀젼은 건조 상태로 저장이 불가능하기 때문에 저장안정성의 측면에서 문제가 지적되어왔다. Chen 등

*Corresponding author: Hyeon Gyu Lee, Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 04763, Korea
Tel.: +82-2-2220-1202
Fax: +82-2-2281-8285;
E-mail: hyeonlee@hanyang.ac.kr
Received November 4, 2021; revised December 31, 2021; accepted December 31, 2021

(2017)은 cold-sonication과 동결건조 방식을 활용한 캡슐화를 통해서 안정성과 재분산성, 유화안정성을 나타낸다고 보고하였으나 용해도에 대해서는 검토하지 하지 않았다. β-Cyclodextrin을 이용한 포집으로 β-carotene 용해도를 약 10배정도 증가시켰다는 연구 결과도 있었으나 이 연구에서는 epiclon과 hexamethylene diisocyanate를 cross linker로 사용하였기 때문에 식품으로의 사용에 제한적 일수 밖에 없다(Yazdani 등, 2021). 이러한 이유로 식품에 활용할 수 있으며 저장 안정성의 측면에서 유리한 다당체를 이용한 캡슐화 연구가 요구된다.

본 연구에서 나노캡슐 제조의 피복물질로 쓰인 키토산(chitosan)은 게, 가재, 새우 등의 갑각류로부터 얻어지는 천연 고분자인 키틴(chitin)을 탈 아세틸화하여 생성된 다당류로, β-1,4-linked *N*-acetyl-D-glucosamine으로 구성되어 있다(Du 등, 2005). 키토산은 중성이나 염기성에서는 불용성이지만, 산성용액에 용해시켰을 때는 아미노 그룹이 양전하를 띠게 되어(Dyer 등, 2002) tripolyphosphate (TPP)와 hyaluronic acid (HA) 같은 음전하 물질과 결합할 수 있게 된다. 이러한 키토산의 ionic gelation 특성을 이용하여 다양한 전달시스템(delivery system)으로 개발되어 왔다. 특히 키토산은 무독성이며 우수한 생체적합성과 생분해적 특성을 나타내기 때문에 다양한 약물 및 생리활성 물질의 캡슐화를 위한 피복물질로 널리 활용되어왔다(Agnihotri 등, 2004).

HA는 생체 내 구성물질이므로 면역성을 유발하지 않을 뿐만 아니라 생체적합성과 생분해성의 특징을 나타내기 때문에, 조직공학이나 체내 전달시스템에 적합한 물질이다(Fang 등, 2008; Goa와 Benfield, 1994). HA는 DNA-hyaluronan matrix로부터 DNA의 방출을 유지하고(Kim 등, 2003) DNA/polymer 복합체의 전사활성을 증진시킬 수 있음을 확인하는(Oh 등, 2008) 등 주로 의약품 분야에서 다양한 유전자와 약물체의 전달 및 방출 조절, 생체적합성 향상을 위해서 연구되어 왔다(Fang 등, 2008). 또한 키토산과 HA와의 ionic gelation 특성을 이용하여 항암치료제인 doxorubicin과 dinitrosyl iron complex를 함유한 나노캡슐을 제조하여 안정성이 유의적으로 증가되며 doxorubicin이 세포의 핵 내부로 유입됨이 확인되었다(Akentieva 등, 2020). 더욱이 HA는 암세포에서 과발현되는 CD44 수용체를 특이적으로 인식하기 때문에, HA를 키토산/TPP 나노캡슐의 코팅물질로 활용하기 위한 연구도 활발하게 진행되고 있다(Almalik 등, 2018; Chiesa 등, 2018; Pereira 등, 2021).

HA의 주성분인 프로테오 글라이칸은 다량의 글리코스 아미노 글라이칸들과 결합된 구조를 가지고 있기 때문에 매우 강한 친수성(Luo 등, 2000) 특성을 나타낸다. 이러한 강력한 친수성 특성을 나타내는 HA가 나노캡슐의 표면에 존재할 때 나노캡슐의 용해도 향상에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 수 있다고 예측할 수 있다. 그러나 아직까지 난용성 활성성분의 용해도를 향상시키기 위하여 키토산과 HA의 나노 캡슐화를 적극적으로 연구했던 사례는 보고된 바 없다. HA는 천연 다당체 기반의 나노캡슐화에 이용 가능하므로 β-carotene과 같은 난용성 활성성분의 용해도와 안정성을 모두 향상시킬 수 있는 피복성분으로써 활용 가능성이 매우 높다고 판단된다.

따라서 본 연구의 목적은 식품학적 안전성과 저장안정성을 확보하면서 β-carotene의 용해도를 향상 시킬 수 있는 나노캡슐을 개발하는 것이다. 이를 위하여 (1) 키토산을 주요 피복물질로 이용하면서 TPP와 HA를 단독 또는 복합적으로 사용하여 β-carotene 함유 키토산 나노캡슐을 제조한 후 입자특성과 포집 효율을 측정하였고 (2) 나노 캡슐화에 따른 β-carotene의 용해도 변화를 대조군과 비교하였으며 (3) 저장기간에 따른 나노캡슐의 입자특성 및 용해도를 분석하였다. 또한 (4) 건조 후 재분산된 나노캡슐의 물리적 특성과 β-carotene의 용해도를 측정하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험의 내부물질로 사용된 β-carotene, 피복물질에 사용된 키토산(chitosan, low molecular weight)과 sodium triphosphate (TPP), butylated hydroxytolune (BHT)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 hyaluronic acid (HA)는 순도 90% 이상으로 (주)바이오랜드(Cheonan, Korea) 제품을 이용하였다. 이외에 실험에 사용된 모든 시약은 1등급 혹은 특급을 사용하였다.

β-Carotene 함유 나노캡슐 제조

β-Carotene 함유 나노캡슐을 제조하기 위하여 키토산을 기본 피복물질로 사용하면서 TPP와 HA, 2종류의 겔화제를 단독 또는 복합적으로 사용하여 세 종류(CS/TPP, CS/TPP/HA, CS/HA)의 나노캡슐을 제조하였다. β-Carotene 함유 CS/TPP 나노캡슐은 Calvo 등(1997)에 의해 보고된 ionic gelation 방법에 의해 제조하였다. 즉, 1% acetic acid에 완전히 용해시킨 1.75 mg/mL 키토산 용액(2 mL)에 8.4 mg/mL β-carotene (0.5 mL)을 첨가한 후, 계속 1,000 rpm으로 교반(SMHS 3, Daihan Scientific Co., Ltd., Seoul, Korea)하면서 0.23-0.39 mg/mL의 TPP 용액 4.5 mL을 peristaltic pump (Master flex 77200-60, Cole Parmer Inc., Vernon. Hills, IL, USA)를 이용하여 1 mL/min의 일정한 속도로 떨어뜨려 나노캡슐을 제조하였다. CS-TPP-HA 나노캡슐 제조방법은 CS-TPP 나노캡슐 제조방법과 동일하며 키토산과 β-carotene 혼합액에 각각의 0.18과 0.35 mg/mL TPP 용액 2 mL과 0.56-1.68 mg/mL HA 용액 2.5 mL을 순차적으로 떨어뜨려 나노캡슐을 제조하였다. CS-HA 나노캡슐 역시 TPP 용액 대신 1.4-1.7 mg/mL HA 용액 4.5 mL만을 떨어뜨려 β-carotene 함유 CS-HA 나노캡슐을 제조하였다. 제조조건에 따른 나노캡슐의 특성연구를 위해서 제조된 다양한 제조조건에서의 나노캡슐 종류 별 각 성분의 최종 농도는 Table 1과 같다. 모든 나노캡슐 제조과정 중 β-carotene의 산화방지를 위해서 BHT를 1 mM 농도가 되도록 첨가해주었다(Milne과 Boten, 1986). 다양한 조건에서 제조된 β-carotene 함유 나노분산액은 4°C, 30,000×*g*에서 30분간 초원심분리(Optima TL Ultra-centrifuge, Beckman, Fullerton, CA, USA)하여 나노캡슐을 수거하여 이후 실험에 사용하였다.

나노캡슐의 물리적 특성

다양한 조건에서 제조된 나노캡슐을 수거한 후 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK)를 이용하여 분산액 1 mL을 disposable cuvette에 넣은 후 나노캡슐의 크기, PDI, derived count rate를 측정하였다. 제타 전위(zeta potential)는 DTS 1060C clear disposable zeta cell에 넣은 후 측정하였다. 측정조건은 여러 peak를 동시에 나타낼 수 있는 multiple narrow mode에서 수행하였으며, 나노캡슐의 크기는 25±1°C에서 intensity distribution을 통하여 비교 분석하였다. 모든 시료는 3번 이상 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

나노캡슐의 포집효율(encapsulation efficiency, EE) 측정

β-Carotene 함유 키토산 나노캡슐의 포집 효율을 측정하기 위하여 초원심분리(4°C, 30,000×*g*, 30분)에 의해 나노캡슐 분산액으

Table 1. Particle properties of β-carotene-loaded chitosan nanocapsules with different TPP and HA concentrations

Nanocapsule type	TPP (mg/mL)	HA (mg/mL)	Size (nm)	Zeta potential (mV)	PDI
CS/TPP	0.15	-	276±35[a]	38.2±2.3[a]	0.38±0.03[a]
	0.20	-	225±32[b]	30.5±1.5[b]	0.39±0.04[a]
	0.25	-	201±23[b]	17.8±0.6[c]	0.33±0.03[b]
CS/TPP/HA	0.05	0	678±64[a]	45.1±3.7[a]	0.46±0.14[a]
		0.2	577±81[bc]	33.8±6.2[de]	0.42±0.13[ab]
		0.4	557±43[b]	33.0±2.9[e]	0.41±0.06[ab]
		0.6	478±54[cd]	26.8±4.5[e]	0.33±0.07[cd]
	0.10	0	377±90[e]	45.5±2.6[a]	0.46±0.04[a]
		0.2	378±35[e]	37.6±2.0[b]	0.40±0.05[abc]
		0.4	424±46[de]	31.4±1.8[cd]	0.36±0.04[bc]
		0.6	409±47[e]	24.1±0.5[e]	0.28±0.03[d]
CS/HA	-	0.9	603±78[a]	30.5±1.5[a]	0.32±0.04[a]
	-	1.0	488±53[b]	26.6±1.1[b]	0.30±0.05[a]
	-	1.1	298±41[c]	21.2±1.6[c]	0.25±0.02[b]

The final concentration of β-carotene and chitosan in all nanocapsule dispersions were 0.6 and 0.5 mg/mL, respectively.
[a-e]Different letters in the same column indicate significant differences (p<0.05).

로부터 나노캡슐을 분리시켰다. 분리된 상층액 1 mL에 chloroform 1 mL을 추출한 후 5분 동안 5,000×g 조건으로 원심분리(Hanil Science Industrial Co., Ltd., Gimpo, Korea)하였다. 나노캡슐에 포집되지 않고 유리된 β-carotene의 함유량을 계산하기 위하여 분리된 하층액을 취하여 UV 분광광도계(DU 650, Beckman Coulter Inc.)를 통해 479 nm의 흡광도에서 측정하였다(Jang과 Lee, 2008). 나노캡슐의 β-carotene 포집효율은 다음의 식(1)에 따라 산출하였다(Trela와 Waterhouse, 1996).

$$EE\ (\%) = \frac{\text{Actual amount of β-carotene entrapped in nanocapsules}}{\text{The theoretical amount of β-carotene entrapped in nanocapsules}} \times 100 \quad (1)$$

나노캡슐의 용해도 측정

나노캡슐화됨에 따른 β-carotene의 용해도 변화를 관측하기 위하여, 나노캡슐 분산액 또는 나노캡슐화 되지 않은 β-carotene 분산액, 건조된 나노캡슐의 재수화 분산액의 β-carotene 용해도는 Karathanos 등(2007)의 방법에 따라 측정하였다. 각 분산액 1 mL을 0.45 μm syringe filter (Advantec, Tokyo, Japan)를 통하여 여과한 후, UV 분광광도계를 이용하여 479 nm 흡광도에서 측정하여 β-carotene 농도(mg/mL)로 나타내었다(Silva 등, 2011).

나노캡슐의 재분산성 측정

β-Carotene 함유 키토산 나노캡슐의 재분산성을 측정하기 위하여 나노캡슐 분산액을 초저온 냉동고에서 동결 후 동결 건조기를 이용하여 시료를 분말 상태로 건조시켰다. 건조된 분말은 증류수에 분산 시킨 후 교반하여 입자크기와 PDI, 용해도를 측정하였다. 재분산성 비율(redispersibility ratio)은 Gryparis 등(2007)의 방법에 따라 아래의 식 (2)과 같이 동결 전과 후의 입자크기 비율로 나타낼 수 있다.

$$\text{Redispersity ratio} = \frac{\text{Average size of nanocapsules after lyophilization}}{\text{Average size of nanocapsules before lyophilization}} \quad (2)$$

나노캡슐의 안정성 측정

저장 기간별 pH 조건에 따른 β-carotene 함유 키토산 나노캡슐의 안정성을 측정하기 위하여 나노 분산액 1 mL에 5배 용량인 0.05 mM phosphate buffer (pH 2.0, 2.5, 3.0)를 각각 넣어주었다. 각 나노캡슐분산액은 4°C에서 8일 동안 저장하면서 저장기간에 따른 입자크기와 PDI, 용해도를 측정하였다(Tsai 등, 2011).

통계 처리

모든 실험은 3회 이상 반복 수행하였으며, 실험결과는 SPSS 12.0.1 (Statistical Package for the Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)으로 비교 분석하였으며 모든 결과는 평균±표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

β-Carotene 함유 나노캡슐의 물리적 특성

키토산을 주요 피복물질로 이용하면서 TPP와 HA를 단독 또는 복합적으로 사용하여 β-carotene 함유한 나노캡슐을 제조하기 위하여 Table 1에서와 같이 다양한 제조조건에서 세 종류(CS/TPP, CS/TPP/HA, CS/HA)의 나노캡슐을 제조한 후 입자크기와 제타전위, PDI를 측정하였다.

CS-TPP 나노캡슐의 경우 TPP 농도가 0.15에서 0.25 mg/mL로 증가함에 따라 입자크기가 276에서 201 nm로 유의적으로 감소하였으며 제타전위 또한 38.2에서 17.8 mV로 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 피복물질인 키토산과 TPP의 이온결합에 의한

것으로 추정된다. 키토산과 이온결합을 형성하는 음이온인 TPP 농도가 증가됨에 따라 결합력이 강해지기 때문에 입자크기는 작아졌으며 TPP와 결합한 키토산이 많아지면서 입자 표면에 분포하는 양이온의 잔존량이 감소되어 제타전위가 감소되는 것으로 판단되며 이러한 경향은 Gan 등(2005)의 연구결과와 일치하는 것이다. 또한 TPP 농도 증가에 의해 PDI 값은 0.38에서 0.33으로 유의적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 일반적으로 PDI 값이 작을수록, 특히 0.3 이하의 PDI일 때, 입자가 균일하게 형성되었다고 판단하는데 CS/TPP 나노캡슐의 경우는 TPP 농도가 증가될 때 더 균일한 입자크기 분포를 보인다고 판단된다.

키토산과 결합하는 겔화제로 TPP의 일부가 HA로 대체되었을 때의 입자특성을 관측하기 위하여 HA 농도를 증가시키면서 HA의 효과를 분석하고자 하였다. 예비실험을 통해서 CS/TPP 나노캡슐의 기존 조건인 TPP 0.15-0.25 mg/mL에서 HA를 첨가하였을 때 aggregation이 발생되는 것을 확인하였다. 따라서 HA을 첨가했을 때에도 aggregation이 발생하지 않는 TPP의 농도를 확인하여 0.05와 0.10 mg/mL의 두 농도 조건에서 HA 농도가 증가함에 따라 변화되는 CS/TPP/HA 나노캡슐의 특성을 관측하였다. TPP 0.05 mg/mL 조건에서 CS/TPP/HA 나노캡슐을 제조하였을 때 HA 농도가 증가할수록 입자크기가 678에서 478 nm로 유의적으로 감소하였고 제타전위 또한 45.1에서 26.8 mV로 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 CS/TPP 나노캡슐에서 TPP와 마찬가지로 키토산과 이온결합을 이루는 음이온인 HA 농도가 증가 됨에 따라 결합력이 강해지기 때문에 입자크기는 작아지며 HA와 결합한 키토산이 상대적으로 많아지면서 양이온의 잔존량이 감소되면서 제타전위 또한 감소되는 것으로 판단된다. PDI 값은 0.46에서 0.33으로 유의적으로 감소하였다. 이는 HA 농도가 증가함에 따라 안정적인 분포를 나타냄을 의미한다. TPP 0.10 mg/mL 조건에서는 CS/TPP/HA 나노캡슐을 제조하였을 때 HA의 농도가 증가됨에 따라 입자크기의 유의적 차이는 관측되지 않았으나 제타전위와 PDI는 유의적으로 감소되는 동일한 경향이 관측되었다.

CS/HA 나노캡슐의 경우는 TPP는 포함되지 않은 상태에서 키토산에 HA 첨가량을 증가시키면서 입자특성을 관찰하였다. 예비실험을 통하여 나노캡슐이 형성되는 HA 농도를 결정하였으며 HA 1.1 mg/mL 이상 HA가 첨가되면 나노캡슐 형성 시에 aggregation 현상이 관측되어 HA는 0.9-1.1 mg/mL 조건으로 결정하였다. HA 농도가 증가 됨에 따라 입자크기는 603에서 298 nm로 50% 이상 유의적으로 감소하였고 제타전위 또한 30.5에서 21.2 mV로 유의적으로 감소하였다. 이는 앞서 전술한 바와 같이 음전하를 나타내는 HA 양이 증가되면서 나타나는 일반적인 현상으로 판단된다. PDI값 역시 0.32에서 0.25으로 유의적으로 감소하여 HA의 농도가 증가함에 따라 균일한 입자분포를 나타낸다고 판단된다.

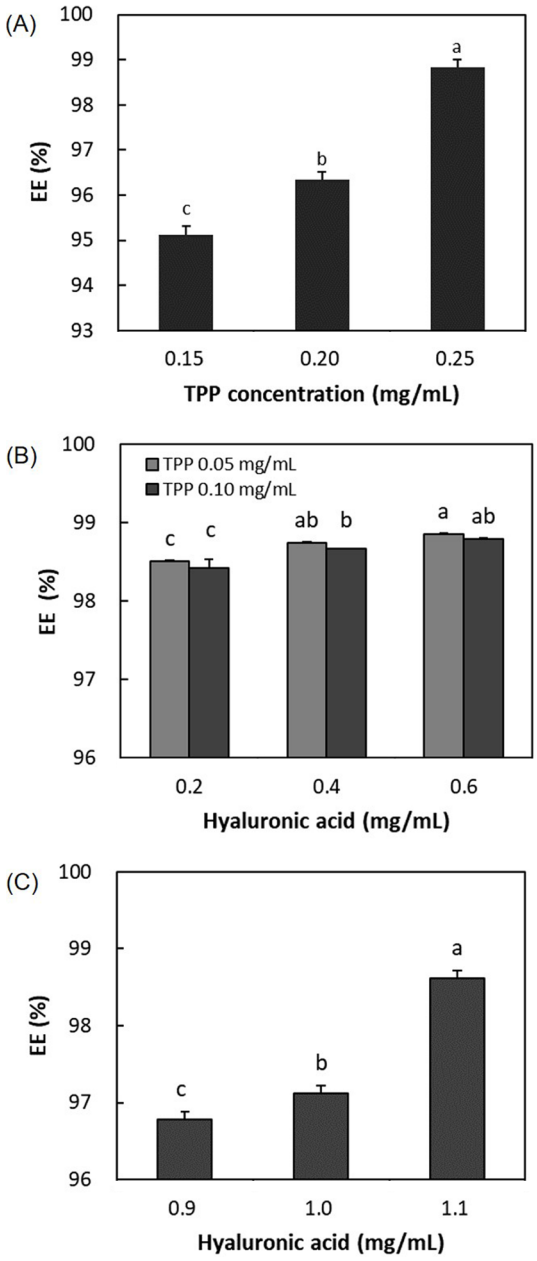

Fig. 1. Encapsulation efficiency (EE) of CS/TPP (A), CS/TPP/HA (B), and CS/HA nanocapsules (C). Different letters on bars indicate a significant difference (p<0.05).

β-Carotene 함유 나노캡슐의 포집 효율

CS/TPP, CS/TPP/HA, CS/HA 나노캡슐에서 TPP와 HA 농도변화에 따른 포집효율을 측정한 결과(Fig. 1), 모든 종류의 나노캡슐에서 TPP와 HA 농도가 증가함에 따라 포집효율이 유의적으로 증가되는 경향이 관측되었다. 이러한 현상은 키토산과 결합할 수 있는 음이온의 양이 증가되기 때문에 강화된 결합력에 의해서 나타나는 일반적인 경향으로 판단된다. 모든 종류의 나노캡슐에서 95%가 넘는 높은 포집효율이 관측되었으며 이는 β-cyclodextrin으로 β-carotene을 포집했을 때의 포집효율인 44-61% (Yazdani 등, 2021)와 비교해봤을 때에도 월등히 높은 수치임을 확인 할 수 있다. 특히 키토산과 HA를 이용한 나노캡슐화는 포집효율의 측면에서 식품학적 안전성에 우려가 있는 유기용매나 활성성분의 안정성에 문제가 될 수 있는 가열 등의 가혹조건를 사용하지 않으면서 β-carotene을 효율적으로 포집할 수 있는 나노 캡슐화 방법이라고 판단된다.

β-Carotene의 나노캡슐화에 따른 용해도 변화

나노캡슐화 여부가 β-carotene의 용해도에 미치는 영향을 분석하기 위하여 나노캡슐화 되지 않은 유리 β-carotene (control)과 세 종류의 β-carotene 함유 나노캡슐(CS/TPP, CS/TPP/HA, CS/HA)의 용해도를 비교하였다(Fig. 2). 모든 실험조건에서 β-carotene의 농도는 0.6 mg/mL로 일정하게 하였으며, 나노캡슐 제조 시에 에탄올에 용해시킨 β-carotene을 이용하기 때문에 에탄올에 의한 β-carotene 용해도 간섭을 보정하기 위하여 대조군 β-carotene 용액

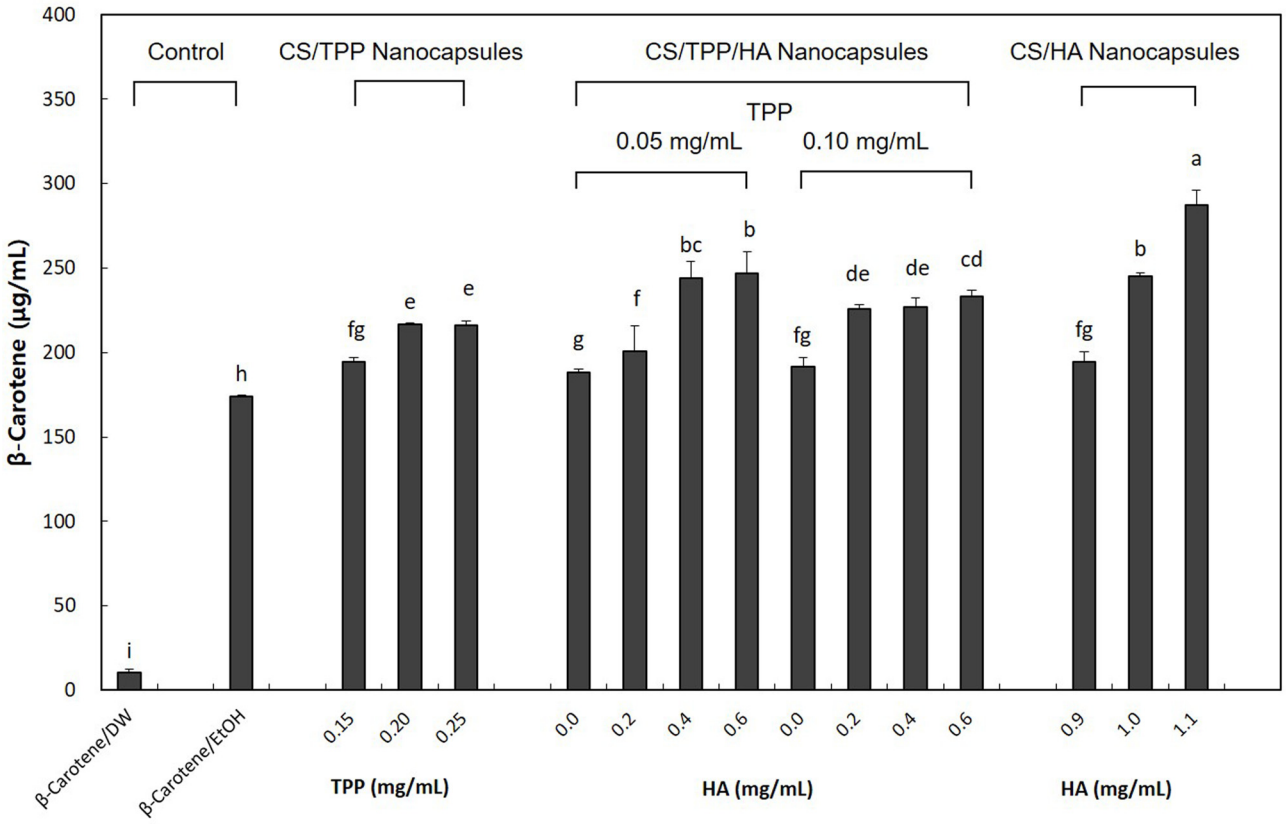

Fig. 2. Solubility of nanoencapsulated and non-nanoencapsulated β-carotene before lyophilization. Different letters on bars indicate a significant difference (p<0.05).

을 β-carotene/증류수와 β-carotene/에탄올 두 종류로 설정하였으며, 이때 에탄올의 농도는 약 7%이다.

β-Carotene/증류수와 β-carotene/에탄올 대조군의 용해도는 각각 10과 174 μg/mL로 측정되어 에탄올 혼입에 의해 용해도가 증가되었음을 확인할 수 있었다. 나노캡슐에 함유된 β-carotene 용해도를 살펴보면, CS/TPP, CS/TPP/HA와 CS/HA 나노캡슐 모두 TPP와 HA 농도가 증가함에 따라 유의적으로 용해도가 증가하는 동일한 경향이 관측되었다. 세가지 나노캡슐의 β-carotene 용해도를 비교해보면 CS/TPP 나노캡슐은 195에서 217 μg/mL까지, CS/TPP/HA 나노캡슐은 188에서 247 μg/mL까지 증가되었으며, CS/HA 나노캡슐은 194에서 287 μg/mL로 가장 많이 증가되었다. 즉, TPP 보다는 HA가 첨가됨에 따라서 β-carotene의 용해도가 증가되었음을 확인할 수 있다. 이러한 각 나노캡슐들의 용해도 증가 경향은 나노캡슐 크기와 피복물질의 특성과 연관된 것으로 추정된다. 즉, 각 나노캡슐들 모두 TPP와 HA의 농도가 증가함에 따라 입자크기가 감소되었으며, 감소된 입자크기로 인해 물과 접촉하는 표면적이 증가되면서 용해도가 증가(Hecq 등, 2005) 되었을 것으로 판단된다. 그러나 세가지 나노캡슐을 비교 하면, CS-TPP 나노캡슐의 크기가 다른 두 종류보다 가장 작은 경향을 나타냈음에도 불구하고 전반적인 용해도는 가장 낮은 경향을 나타냈다. 이는 상기 전술한 바와 같이 친수성 특성이 강한 HA가 나노캡슐의 표면에 존재하면서 용해도가 향상되었기 때문인 것으로 추정된다. 이상의 결과와 같이, β-carotene은 키토산 나노캡슐화를 통해서 용해도가 향상되었으며 키토산 나노캡슐 중에서는 HA의 농도가 가장 높은 HA 1.1 mg/mL 조건에서 가장 높은 β-carotene 용해도가 관측되었다. 지금까지의 결과에서 상대적으로 용해도가 높았던 TPP 0.05, HA 0.6 mg/mL 조건의 CS/TPP/HA 나노캡슐과 HA 1.1 mg/mL 조건의 CS/HA 나노캡슐, 두 종류의 나노캡슐만을 이용하여 이후 실험을 진행하였다.

저장기간에 따른 나노캡슐의 물리적 특성

저장기간에 따른 나노캡슐의 안정성을 관측하기 위하여 CS/HA와 CS/TPP/HA 나노캡슐을 pH 2.0-3.0에서 8일까지 저장하면서 입자크기와 PDI의 변화를 관측하였다(Table 2). 여러 β-carotene 에멀젼 연구에서 pH가 낮을수록 안정성이 저하된다고 보고되고 있기 때문에 본 연구에서는 pH 2.0-3.0 범위에서 실험을 진행하였다(Qian 등, 2012; Xu 등, 2013; Shao 등, 2017). CS/TPP/HA와 CS/HA 나노캡슐 모두 pH 2.0-3.0 모든 구간에서 다소간의 입자크기의 변화를 보이기는 하지만 유의적 차이를 나타내지 않았으며 PDI의 측면에서도 유의적 변화를 보이지 않았다. 키토산 나노캡슐의 경우는 입자제조 조건이 적합하지 않은 경우, pH 2.5 이하에서 입자표면에 결합하지 않은 키토산이 증가하여 키토산 구조가 얽혀서 입자크기가 증가하고 균일하지 못한 특성이 관측되기도 한다(Zheng 등, 2007). 또한 나노캡슐의 결합이 불안정하면 캡슐 내부와 외부의 삼투압으로 인해 팽윤과 수축이 일어나 입자크기가 증가 또는 감소되는 현상이 관측되기도 한다(López-León 등, 2005). 그러나 CS/TPP/HA와 CS/HA 나노캡슐 모두 8일의 저장기간 동안 입자크기와 PDI 값의 유의적인 변화없이 안정적인 입자특성을 유지하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 설정된 CS/TPP/HA와 CS/HA 나노캡슐 제조 조건이 입자의 물리적 특성의 측면에서 적합하며 CS와 TPP, HA간의 결합이 안정적이었음을 반영하는 것으로 추정된다. CS/HA 미세캡슐에 포집된 catalase

Table 2. Particle size and PDI of β-carotene-loaded CS/TPP/HA and CS/HA nanocapsules during storage

Time (day)	CS-TPP-HA nanocapsules					
	pH 2.0		pH 2.5		pH 3.0	
	Particle size (nm)	PDI	Particle size (nm)	PDI	Particle size (nm)	PDI
0	328±81[a]	0.41±0.08[b]	326±39[a]	0.33±0.07[a]	300±54[a]	0.27±0.05[a]
1	286±50[a]	0.46±0.11[ab]	309±48[a]	0.35±0.06[a]	282±36[a]	0.29±0.06[a]
2	317±73[a]	0.47±0.11[ab]	299±41[a]	0.39±0.09[a]	276±33[a]	0.32±0.06[a]
5	292±39[a]	0.46±0.05[ab]	298±41[a]	0.38±0.07[a]	288±45[a]	0.30±0.07[a]
7	265±72[ab]	0.53±0.15[a]	282±46[a]	0.40±0.09[a]	283±40[a]	0.31±0.04[a]
8	325±121[a]	0.49±0.11[ab]	310±40[a]	0.35±0.07[a]	327±80[a]	0.34±0.06[a]
	CS-HA nanocapsules					
Time (day)	pH 2.0		pH 2.5		pH 3.0	
	Particle size (nm)	PDI	Particle size (nm)	PDI	Particle size (nm)	PDI
0	341±90[a]	0.42±0.09[a]	329±31[a]	0.33±0.07[a]	290±55[a]	0.29±0.05[a]
1	274±17[ab]	0.46±0.09[a]	308±25[a]	0.40±0.06[a]	289±19[a]	0.27±0.07[a]
2	300±59[a]	0.47±0.11[a]	304±16[a]	0.40±0.06[a]	295±16[a]	0.25±0.08[a]
5	291±46[a]	0.44±0.08[a]	320±43[a]	0.37±0.08[a]	314±42[a]	0.25±0.06[a]
7	252±22[ab]	0.49±0.12[a]	286±56[a]	0.40±0.14[a]	301±20[a]	0.24±0.09[ab]
8	258±30[ab]	0.31±0.12[a]	314±52[a]	0.37±0.10[a]	318±33[a]	0.17±0.06[b]

[a-b]Different letters in the same column indicate significant differences (p<0.05).

역시 pH 2.0과 pH 6.0-8.0 조건에서 안정적으로 활성이 유지되는 것을 확인하였다(Tang 등, 2014).

저장기간에 따른 나노캡슐의 용해도 변화

나노캡슐의 저장 기간 동안 용해도의 안정성을 비교하기 위하여 8일의 저장기간 동안 β-carotene/에탄올 대조군, CS-TPP-HA와 CS-HA 나노캡슐의 용해도를 측정하였다(Fig. 3). β-carotene/에탄올 대조군은 모든 pH에서 저장 직후부터 용해도의 급격한 저하가 관측되었다. 반면, CS/TPP/HA와 CS/HA 두 종류의 나노캡슐의 용해도 간에는 유의적인 차이를 보이지는 않지만, β-carotene/에탄올 대조군과는 유의적으로 뚜렷한 용해도 차이를 나타냈다. 저장 8일동안 CS-TPP-HA와 CS-HA 나노캡슐은 초기 용해도의 약 6-15% 감소된데 비해서, β-carotene/에탄올 대조군은 약 60-87%가 감소되었으며, 이는 CS-TPP-HA와 CS-HA 나노캡슐의 용해도 감소율의 약 7배에 해당한다. 이러한 결과는 Table 2의 결과와 같이 저장 기간 동안 나노캡슐의 물리적 특징이 안정적으로 유지되었기 때문에 내부에 포집되었던 β-carotene 또한 외부의 산화적 조건으로 β-carotene을 보호할 수 있었기 때문인 것으로 보고되고 있다(Chung 등, 2020; Kittikaiwan 등, 2007).

재분산된 나노캡슐의 재분산성 특성

CS/TPP/HA와 CS/HA 나노캡슐을 동결건조 시킨 후 재분산 상태의 나노캡슐의 물리적 특성을 관측하기 위하여 입자크기와 PDI를 측정하였다(Fig. 4). 두 종류의 나노캡슐 모두 재분산후 입자크기와 PDI가 증가되었고, 이러한 결과는 건조되고 재분산되는 과정에서 나노캡슐들 간에 aggregation되면서 발생되는 자연스러운 현상으로 추정된다(Gryparis 등, 2007). CS/TPP/HA 나노캡슐은 CS/HA 나노캡슐과 비교했을 때 입자크기가 상대적으로 불균일할 뿐만 아니라 편차 또한 큰 것을 볼 수 있다(PDI=0.94). 이는 CS/HA 나노캡슐의 표면에 상대적으로 높은 농도로 존재하는 HA가 재수화과정에서 물분산성을 높이기 때문인 것으로 추정된다. 더욱이 재분산 전후의 나노캡슐의 크기를 비교한 재분산성 비율(Grysparis 등, 2007)을 이용하여 비교해보면, CS/HA와 CS/TPP/HA 나노캡슐의 재분산성 비율은 각각 1.53과 2.46으로 산출되었다. 재분산성 비율은 1에 가까울수록 재분산성이 좋음을 나타내므로 재분산성의 측면에서도 CS-HA 나노캡슐이 더 효과적이라고 판단된다.

재분산된 나노캡슐의 용해도 변화

나노캡슐을 건조 후 재분산되었을때 β-carotene 용해도를 측정했으며 β-carotene 농도는 이전의 용해도 실험과 동일한 조건인 0.6 mg/mL로 고정하였다(Fig. 5). 건조과정에서 에탄올은 모두 휘발되었으므로 β-carotene/증류수 대조군을 이용하여 용해도를 비교하였다. β-carotene/증류수 대조군의 용해도는 10 μg/mL인데 반해서, CS/TPP/HA와 CS/HA 나노캡슐의 용해도는 약 89와 112 μg/mL로 측정되어 나노캡슐화에 의해서 용해도가 유의적으로 증가된 것을 확인할 수 있다. 특히 CS/HA 나노캡슐화에 의해서 용해도가 가장 효과적으로 향상되었는데 대조군에 비해서 약 11배 가량 향상된 것이다. 이러한 결과는 이전의 용해도 실험결과와 일치하는 것으로, 건조 전에도 CS/HA 나노캡슐화에 의해서 용해도가 가장 많이 증가되는 결과가 관측되었다. 또한 재분산성의 결과도 용해도에 반영된 것으로 추정된다. 즉, 재분산후의 입자크기와 PDI, 재분산성 비율의 결과, CS/HA 나노캡슐의 물리적 특성이 CS/TPP/HA 나노캡슐에 비해서 우수하기 때문에 재분산되었을 때 입자가 상대적으로 aggregation 되지 않고 물분산성이 더 좋을 것이므로 용해도 또한 높게 측정되는 것으로 예상할 수 있다. 실질적으로

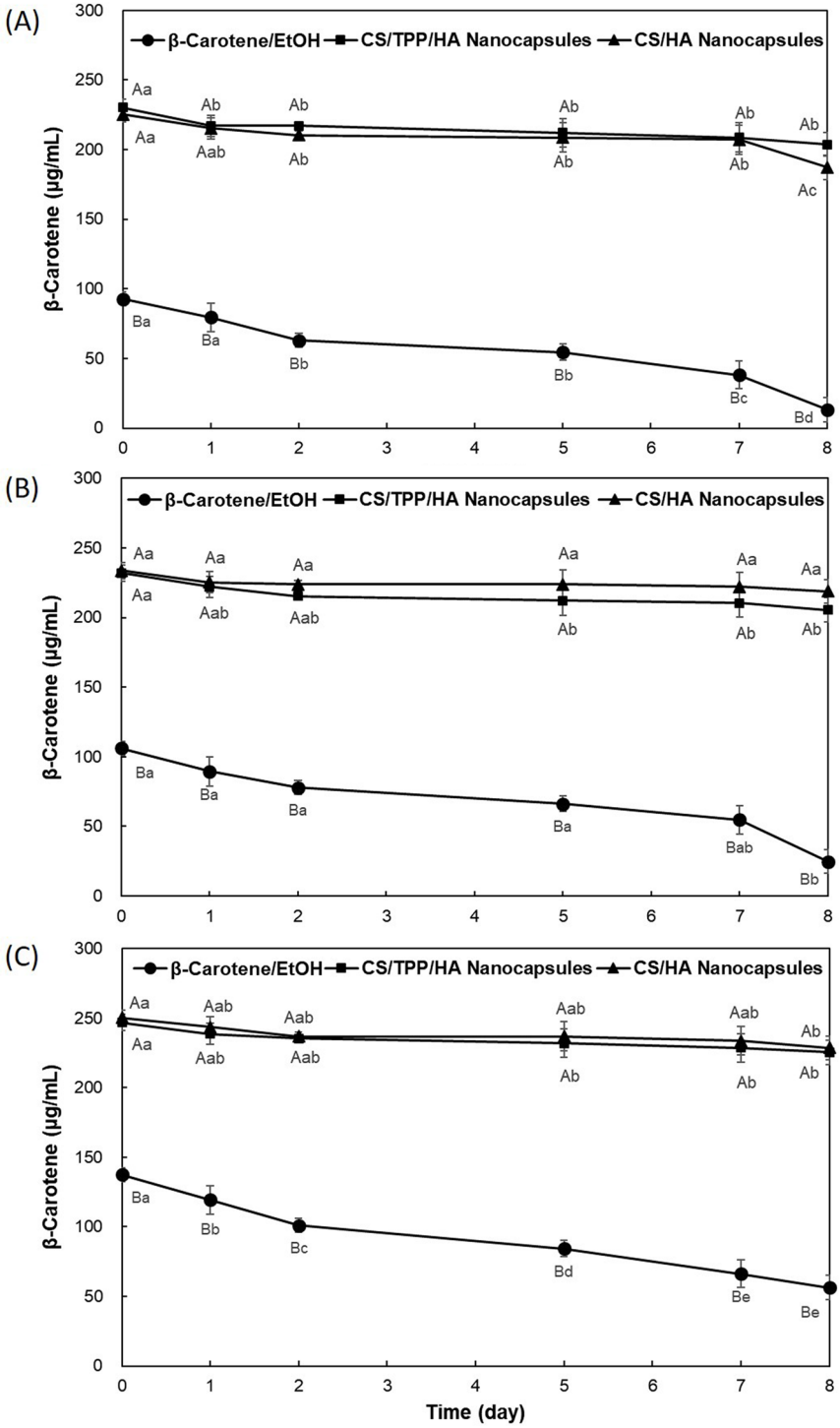

Fig. 3. Solubility of CS/TPP/HA and CS/HA nanocapsules during storage in pH 2.0 (A), pH 2.5 (B), and pH 3.0 (C). Different capital and lowercase letters on bars indicate a significant difference within samples and storage time, respectively (p<0.05).

활용되는 나노캡슐은 건조 후 재분산되었을 때의 형태이므로 재분산되었을 때의 나노캡슐의 재분산성 특성과 용해도는 실질적인 활용의 측면에서 보다 중요한 의미를 가진다고 판단된다.

요 약

β-Carotene의 용해도를 증진시키기 키토산을 기본 피복물질로 사용하면서 TPP와 HA를 단독 또는 복합적으로 사용하여 세 종류(CS/TPP, CS/TPP/HA와 CS/HA)의 나노캡슐을 제조하였다. 모든 종류의 나노캡슐에서 95%가 넘는 높은 포집효율이 관측되었다. β-Carotene 에멀젼의 저장안정성이 취약한 pH 2-3 조건에서 8일동안 저장하였을 때 CS/TPP/HA와 CS/HA 나노캡슐의 물리적 특성뿐만 아니라 β-carotene의 용해도 또한 안정적으로 유지되는 경향을 나타냈다. β-Carotene의 용해도를 나노캡슐의 건조 전과

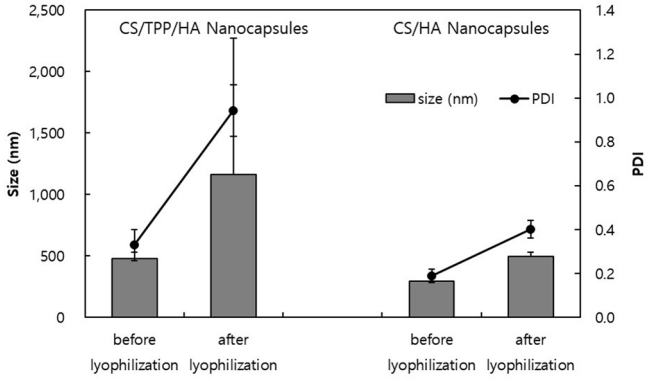

Fig. 4. Physical properties of CS/TPP/HA and CS/HA nanocapsules before and after lyophilization.

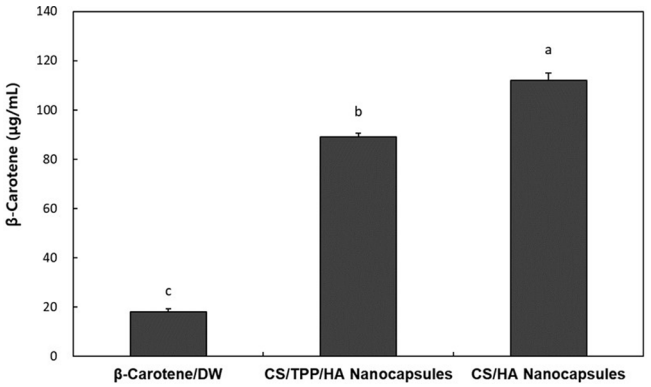

Fig. 5. Solubility of nanoencapsulated and non-nanoencapsulated β-carotene after lyophilization. Different letters on bars indicate a significant difference (p<0.05).

후 관측한 결과, 대조군에 비해서 나노캡슐화에 의해서 유의적으로 향상된 것을 확인할 수 있었다. 특히 CS/HA 나노캡슐은 용해도와 재분산성의 측면에서 모두 우수한 특성을 나타냈다. 본 연구를 통해서 CS/HA 나노캡슐은 β-carotene과 같은 난용성 활성성분의 용해도를 증진시킬 수 있는 식품산업에 활용가능한 전달체로서 이용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2021년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2021R1A2C2013460).

References

Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. J. Control Release 100: 5-28 (2004)

Akentieva N, Gizatullin A, Silvestre O, Savchuk O, Shkondina N, Prichodchenko T, Mitschenko D, Zhilenkov A, Troshin P, Sanina N, "IOP Conference Series: Materials Science and Engineering," ed. eds. IOP Publishing, pp. 012002 (2020).

Almalik A, Alradwan I, Majrashi MA, Alsaffar BA, Algarni AT, Alsuabeyl MS, Alrabiah H, Tirelli N, Alhasan AH. Cellular responses of hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles. Toxicol. Res. 7: 942-950 (2018)

Bushrab N, Müller R. Nanocrystals of poorly soluble drugs for oral administration. J. New Drugs 5: 20-22 (2003)

Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. J. Appl. Polym. Sci. 63: 125-132 (1997)

Canfield LM, Fritz TA, Tarara TE. Incorporation of β-carotene into mixed micelles. Method. Enzymol. 189: 418-422 (1990)

Chen J, Li F, Li Z, McClements DJ, Xiao H. Encapsulation of carotenoids in emulsion-based delivery systems: Enhancement of β-carotene water-dispersibility and chemical stability. Food Hydrocoll. 69: 49-55 (2017)

Chiesa E, Dorati R, Conti B, Modena T, Cova E, Meloni F, Genta I. Hyaluronic acid-decorated chitosan nanoparticles for CD44-targeted delivery of everolimus. Int. J. Mol. Sci. 19: 2310 (2018)

Chung JH, Lee J-S, Lee HG. Resveratrol-loaded chitosan-γ-poly (glutamic acid) nanoparticles: Optimization, solubility, UV stability, and cellular antioxidant activity. Colloid Surf. B. 186: 110702 (2020)

Desobry SA, Netto FM, Labuza TP. Preservation of β-carotene from carrots. Crit. Rev. Food Sci. 38: 381-396 (1998)

Du J, Zhang S, Sun R, Zhang LF, Xiong CD, Peng YX. Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles for drug delivery. II. Release of albumin in vitro. J. Biomed. Mater. Res. B 72: 299-304 (2005)

Dubal DB, Rau SW, Shughrue PJ, Zhu H, Yu J, Cashion AB, Suzuki S, Gerhold LM, Bottner MB, Dubal SB. Differential modulation of estrogen receptors (ERs) in ischemic brain injury: a role for ERα in estradiol-mediated protection against delayed cell death. Endocrinology 147: 3076 (2006)

Dyer A, Hinchcliffe M, Watts P, Castile J, Jabbal-Gill I, Nankervis R, Smith A, Illum L. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: a comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. Pharm. Res. 19: 998-1008 (2002)

Dziezak JD. Microencapsulation and encapsulated ingredients. Food Technol. 42: 136-153 (1988)

Fang JY, Chen JP, Leu YL, Hu JW. Temperature-sensitive hydrogels composed of chitosan and hyaluronic acid as injectable carriers for drug delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. 68: 626-636 (2008)

Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. Colloid Surf. B. 44: 65-73 (2005)

Giorgio S. The stability of β-carotene under different laboratory conditions. J. Nutr. Biochem. 3: 124-128 (1992)

Goa KL, Benfield P. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. Drugs 47: 536 (1994)

Gryparis E, Mattheolabakis G, Bikiaris D, Avgoustakis K. Effect of conditions of preparation on the size and encapsulation properties of PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin. Drug Deliv. 14: 371-380 (2007)

Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H, Amighi K. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. Int. J. Pharm. 299: 167-177 (2005)

Jang KI, Lee HG. Stability of chitosan nanoparticles for l-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. J. Agr. Food Chem. 56: 1936-1941 (2008)

Karathanos VT, Mourtzinos I, Yannakopoulou K, Andrikopoulos NK. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β-cyclodextrin. Food Chem. 101: 652-658 (2007)

Kim A, Checkla DM, Dehazya P, Chen W. Characterization of DNA-hyaluronan matrix for sustained gene transfer. J. Control Release 90: 81-95 (2003)

Kittikaiwan P, Powthongsook S, Pavasant P, Shotipruk A. Encapsulation of Haematococcus pluvialis using chitosan for astaxanthin stability enhancement. Carbohyd. Polym. 70: 378-385 (2007)

Kumar A, Sahoo SK, Padhee K, Kochar PPS, Satapathy A, Pathak N. Review on solubility enhancement techniques for hydrophobic

drugs. Int. J. Compr. Pharm. 3 (2011)
Liu D, Gao Y, Kispert LD. Electrochemical properties of natural carotenoids. J. Electroanal. Chem. 488: 140-150 (2000)
López-León T, Carvalho E, Seijo B, Ortega-Vinuesa J, Bastos-González D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. J. Colloid Interf. Sci. 283: 344-351 (2005)
Luo Y, Kirker KR, Prestwich GD. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. J. Control Release 69: 169-184 (2000)
Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E. Carotenoid content of fruits and vegetables: An evaluation of analytic data. J. Am. Diet. Assoc. 93: 284-296 (1993)
Mauludin R, Müller RH, Keck CM. Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals. Eur. J. Pharm. Sci. 36: 502-510 (2009)
McClements D, Decker E, Weiss J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. J. Food Sci. 72: R109-R124 (2007)
Milne DB, Botnen J. Retinol, alpha-tocopherol, lycopene, and alpha- and beta-carotene simultaneously determined in plasma by isocratic liquid chromatography. Clin. Chem. 32: 874 (1986)
Oh EJ, Kim J-W, Kong J-H, Ryu SH, Hahn SK. Signal transduction of hyaluronic acid-peptide conjugate for formyl peptide receptor like 1 receptor. Bioconjugate Chem. 19: 2401-2408 (2008)
Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens Jr FL, Valanis B, Williams Jr JH. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. New Engl. J. Med. 334: 1150-1155 (1996)
Orset S, Leach GC, Morais R, Young AJ. Spray-drying of the micro alga Dunaliella salina: Effects on β-carotene content and isomer composition. J. Agr. Food Chem. 47: 4782-4790 (1999)
Pereira FM, Melo MN, Santos ÁKM, Oliveira KV, Diz FM, Ligabue RA, Morrone FB, Severino P, Fricks AT. Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles as carrier for the enzyme/prodrug complex based on horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid: Characterization and potential therapeutic for bladder cancer cells. Enzyme Microb. Tech. 150: 109889 (2021)
Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. Nanomed. Nanotechnol. 2: 53-65 (2006)
Qian C, Decker EA, Xiao H, McClements DJ. Physical and chemical stability of β-carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. Food Chem. 132: 1221-1229 (2012)
Shao P, Qiu Q, Xiao J, Zhu Y, Sun P. Chemical stability and in vitro release properties of β-carotene in emulsions stabilized by Ulva fasciata polysaccharide. Int. J. Biol. Macromol. 102: 225-231 (2017)
Silva HD, Cerqueira MA, Souza BWS, Ribeiro C, Avides MC, Quintas MAC, Coimbra JSR, Carneiro-Da-Cunha MG, Vicente AA. Nanoemulsions of β-carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique. J. Food Eng. 102: 130-135 (2011)
Tang D-W, Yu S-H, Wu W-S, Hsieh H-Y, Tsai Y-C, Mi F-L. Hydrogel microspheres for stabilization of an antioxidant enzyme: effect of emulsion cross-linking of a dual polysaccharide system on the protection of enzyme activity. Colloid Surf. B. 113: 59-68 (2014)
Trela BC, Waterhouse AL. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. J. Agr. Food Chem. 44: 1253-1257 (1996)
Tsai ML, Chen RH, Bai SW, Chen WY. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. Carbohyd. Polym. 84: 756-761 (2011)
Xu D, Wang X, Jiang J, Yuan F, Decker EA, Gao Y. Influence of pH, EDTA, α-tocopherol, and WPI oxidation on the degradation of β-carotene in WPI-stabilized oil-in-water emulsions. LWT-Food Sci. Technol. 54: 236-241 (2013)
Yazdani M, Tavakoli O, Khoobi M, Wu YS, Faramarzi MA, Gholibegloo E, Farkhondeh S. Beta-carotene/cyclodextrin-based inclusion complex: improved loading, solubility, stability, and cytotoxicity. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 102: 1-10 (2021)
Zheng Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S, Dong L, Wu L, Shen X. Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. 67: 621-631 (2007)