

산 · 학 · 연 논문

키토산 기반의 전달시스템을 이용한 식품성분의 나노캡슐화

이지수 · 김은서 · 이현규*

한양대학교 식품영양학과

Nanoencapsulation of Food Ingredients Using Chitosan Based Delivery Systems

Ji-Soo Lee, Eun Suh Kim, and Hyeon Gyu Lee*

Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 04763, Korea

서 론

식품분야에서의 캡슐화(encapsulation)는 활성성분이나 식품첨가물을 빛이나 산소, 온도, 수분 등의 외부 환경으로부터 보호하고 저장 및 체내조건에서 안전성을 향상시키며, 바람직하지 않은 냄새나 맛의 은폐를 위한 목적으로 주로 이용되어왔다. 또한 활성성분의 체내 활성 발현을 증진시키기 위하여 섭취 후 체내 방출조절(controlled release)의 목적으로 캡슐화 기술을 이용하고자 하는 연구도 활발하게 진행되고 있다. 방출조절은 내부에 포집한 활성성분을 특정 자극에 의해 원하는 속도로 방출되도록 하여 인체 내의 특정 부위에 선택적으로 작용하도록 함으로써 활성성분의 효능을 극대화시키기 위하여 체내에서의 방출속도를 제어하는 기술이다(1).

식품분야에서 주로 이용되고 있는 캡슐은 대부분 macro에서 micro 단위로 pellet이나 bead, 리포솜(liposomes), 미세캡슐 등의 다양한 형태로 개발되어왔으며, 최근에는 나노기술의 발달로 식품에서의 나노캡슐 분야도 활발히 연구되고 있다. 나노캡슐은 다양한 특성의 내부물질에 적용되어 왔는데, 수용성인 단백질이나 펩타이드뿐만 아니라(2), polyphenol, phytosterol, 지용성 비타민, 다가 불포화 지방산 등의 난용성 및 불용성 성분에도 적용되어 안정성 및 생체이용효율을 증진시켰다고 보고되었다(3). 또한 나노캡슐은 나노 단위의 매우 작은 크기로 인한 넓은 표면적으로 인하여 수용액에서의 분산성 및 용해도가 향상되는 동시에 세포 내 흡수가 용이해지며 체내 체류시간 또한 증가시킬 수 있다는 장점이 보고되고 있다(4).

키토산(chitosan)은 무독성이며, 높은 생체적합성(bio-compatibility)과 생분해성(biodegradability)을 가지고 있어서 식품분야에서 나노입자의 피복물질로 사용되고 있는 대표적인 천연 다당류이다(5,6). 키토산은 게나 새

우와 같은 갑각류로부터 얻어지는 천연 고분자인 키틴(chitin)의 아세틸기를 제거(deacetylation)함으로써 제조될 수 있으며, N-acetylglucosamine과 glucosamine이 β -1,4-glycosidic 결합으로 연결된 반복단위로 구성된다. 또한, 키토산은 중성이나 염기성 pH에서는 불용성이지만 산성용액에 용해시켰을 때는 키토산 구조 내의 아미노 그룹이 양전하를 띠게 되어 sodium tripolyphosphate(TPP)와 같은 음이온물질과 정전기적 상호작용에 의해서 cross-linking 하게 된다(Fig. 1). 이러한 ionic gelation 특성으로 인하여, 키토산은 유독한 유기용매나 고온, 고압 등의 처리없이 비교적 완만한 조건에서도 균일한 입자특성의 키토산 나노캡슐의 제조가 가능하였다(6). 또한 최근에는 TPP 이외에도 poly- γ -glutamic acid (PGA), fucoidan, dextran sulfate, gum arabic 등의 다양한 crosslinker를 사용하여 키토산 나노입자의 특성을 변화하고자 하는 연구가 수행되고 있다(7-10).

키토산 나노입자의 물리적 특성

전술한 바와 같이 키토산 나노입자는 양전하를 띠는 키토산 구조 내의 아미노 그룹과 음전하를 나타내는 cross-linker와의 ionic gelation에 의해 형성되기 때문에, 키토산과 crosslinker의 농도는 키토산 나노입자의 물리적 특성에 영향을 미치는 주요 인자이다(7,8). 일반적으로 키토산의 농도가 증가하면 키토산 나노입자의 형성에 참여하는 키토산이 증가하면서 나노입자의 크기가 증가하는 경향을 나타낸다(7). 또한 동일한 분자량과 농도의 키토산이 사용되었다 하더라도 이온결합에 참여하는 cross-linker의 종류에 따라 키토산 나노입자의 크기는 영향을 받았다(Fig. 2). 키토산의 농도를 2 mg/mL로 고정하고 다양한 농도의 PGA와 fucoidan을 crosslinker로 이용하여 홍삼 추출물을 함유한 키토산 나노캡슐을 각각 제조한 결과, 일반적으로 균일한 입자분포를 나타낸다고 판단되는 입자분포도(polydispersity index) 0.3 이하를 기준으로

*Corresponding author

E-mail: hyeonlee@hanyang.ac.kr, Phone: 02-2220-1202

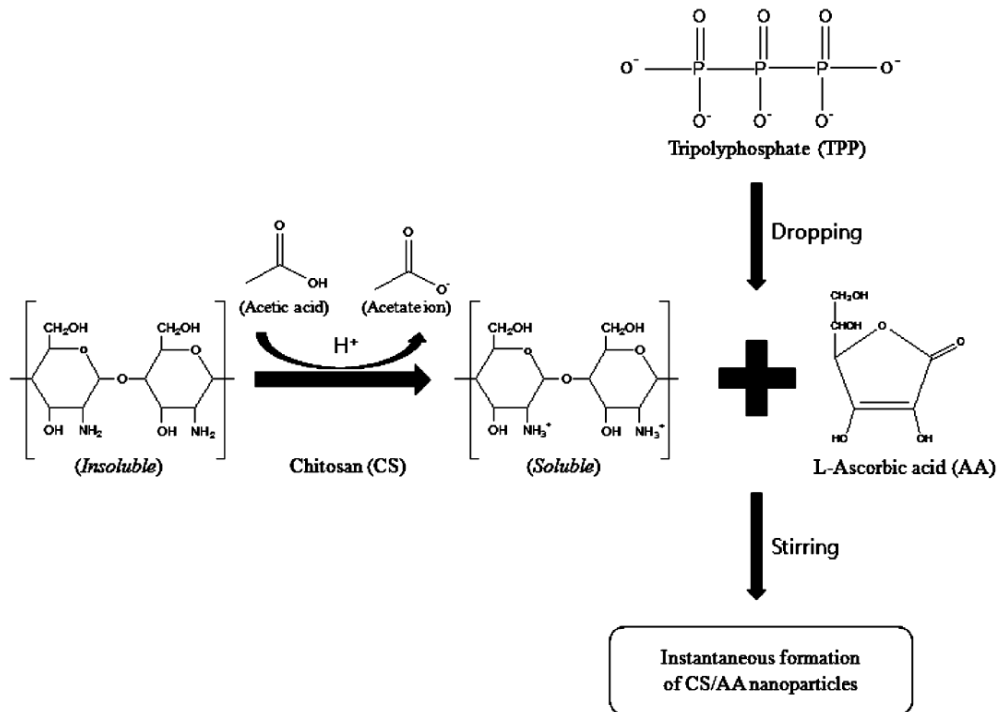


Fig. 1. Scheme of the preparation of ascorbic acid-loaded chitosan nanoparticles (6).

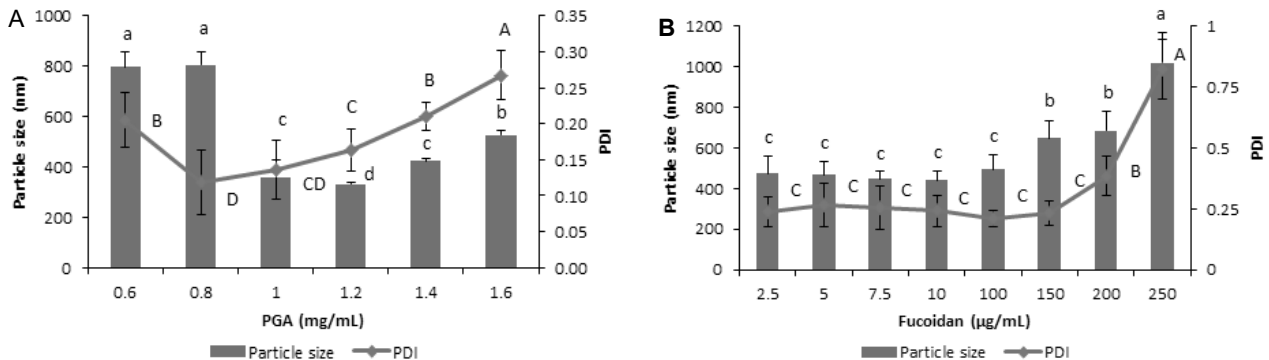


Fig. 2. Physical properties red ginseng extract-loaded chitosan/PGA (A) and chitosan/fucoidan nanoparticles (B). Different letters above the bars indicate a significant difference ($P < 0.05$) (8).

로 했을 때 330~800 nm와 440~700 nm 범위의 각기 다른 입자크기가 관측되었다. Crosslinker인 PGA와 fucoidan의 농도가 낮을 때에는 입자크기가 비교적 크게 관측되었으나, 농도가 증가함에 따라 나노입자의 크기가 감소하여 PGA 1.2 mg/mL와 fucoidan 10 μg/mL일 때가 가장 작은 입자크기를 나타냈다. Crosslinker의 농도가 그 이상 계속 증가하면 나노입자의 크기는 다시 유의적으로 증가하여 전체적으로 U자형의 패턴을 나타내었다. 이러한 현상은 키토산과 crosslinker 간의 이온결합력에 기인된 것으로 추정된다. 키토산의 농도가 고정된 상태에서 crosslinker의 농도가 증가하면, 초기에는 키토산과 crosslinker 간의 이온결합 강도가 증가함에 따라 구조적으로 치밀한 나노입자가 형성되어 입자크기가 감소하였다가, 일정 수준 이상으로 crosslinker의 농도가 증가하

게 되면, 키토산 농도는 고정되어 있기 때문에 이온결합력의 차이 없이 나노입자 형성에 관여되는 crosslinker의 농도가 증가하여 입자크기가 증가하기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 이러한 키토산과 crosslinker의 농도를 조절함으로써 원하는 입자크기의 키토산 나노캡슐의 제조가 가능하며, 입자크기에 따른 나노입자의 특성분석 연구에 활용될 수 있다(11).

키토산 나노캡슐화에 의한 용해도 향상

기능성 식품분야에서 많은 관심을 받고 있는 생리활성 성분 중에는 curcumin, resveratrol, γ-oryzanol, astaxanthin 등과 같은 다양한 난용성 성분들이 있다. 이들 난용성 활성성분들은 *in vitro* 및 *in vivo*의 다각적인 생

리활성 연구를 통해서 강력한 항산화와 항암 활성 등 여러 기능성이 입증되었으나, 특유의 소수성 특성으로 인하여 용해도가 매우 낮다. 따라서 이들 성분은 가공학적으로도 문제가 될 뿐만 아니라 섭취 후 생체이용효율이 낮다는 단점이 제기되어왔다. 이러한 이유로 난용성 성분의 용해도를 증진시키기 위하여 많은 연구가 행해져 왔으며, 유기용매나 계면활성제를 사용하거나 사이클로덱스트린을 이용한 복합체 형성, 고체 분산화, 나노캡슐화 등의 다양한 방법을 통해 용해도를 증진시키고자 하였다(12, 13). 이들 방법 중 특히 나노캡슐화는 용해도를 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라 안정성을 향상시키고 체내에서의 방출조절 또한 가능하여 생체이용효율을 증진시키는 데 효과적이라고 판단된다.

키토산 나노캡슐화에 의한 용해도 변화를 관측하기 위하여, 대표적인 난용성 성분인 resveratrol의 용해도를 캡슐의 건조 전과 후에 모두 관측하였다(14). 캡슐화 제조 직후의 resveratrol 나노분산액에는 8.3%의 에탄올이 함유되어 있기 때문에, 에탄올에 의한 용해도의 간섭효과를 배제하기 위하여 캡슐화하지 않은 resveratrol도 8.3

%의 에탄올에 분산시킨 후 용해도를 관측하였다(Fig. 3). 캡슐화하지 않은 resveratrol의 용해도는 약 60~70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었으나 캡슐화된 resveratrol의 용해도는 약 190~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 증가하여 나노캡슐화에 의해 약 3.2배 정도 용해도가 증가하였다. 이러한 현상은 육안으로도 관측되었는데 캡슐화되지 않은 resveratrol 분산액은 농도가 증가할수록 뿌옇게 탁해지는 모습을 보인 반면 캡슐화된 resveratrol 분산액은 상대적으로 투명한 성상이었다. 이러한 현상은 나노캡슐을 건조한 후 증류수에 재분산시켰을 때에도 동일하게 관측되었다(Fig. 4). 저장 안정성의 측면에서는 액상보다는 건조상태가 선호되기 때문에, 건조 후에 재분산되었을 때의 특성은 매우 중요하다고 할 수 있다. 재분산되었을 때 캡슐화되지 않은 resveratrol의 용해도는 19~22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 반면, 재분산된 resveratrol 캡슐의 용해도는 약 85~90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되어 4.2배 용해도가 캡슐화에 의해 증가한 것을 확인할 수 있었다. 난용성 성분의 용해도 향상은 가공학적 특성을 개선시킬 뿐만 아니라 섭취 후 체내환경에서의 생체이용효율을 증진시킬 수 있을 것으로 기대된다.

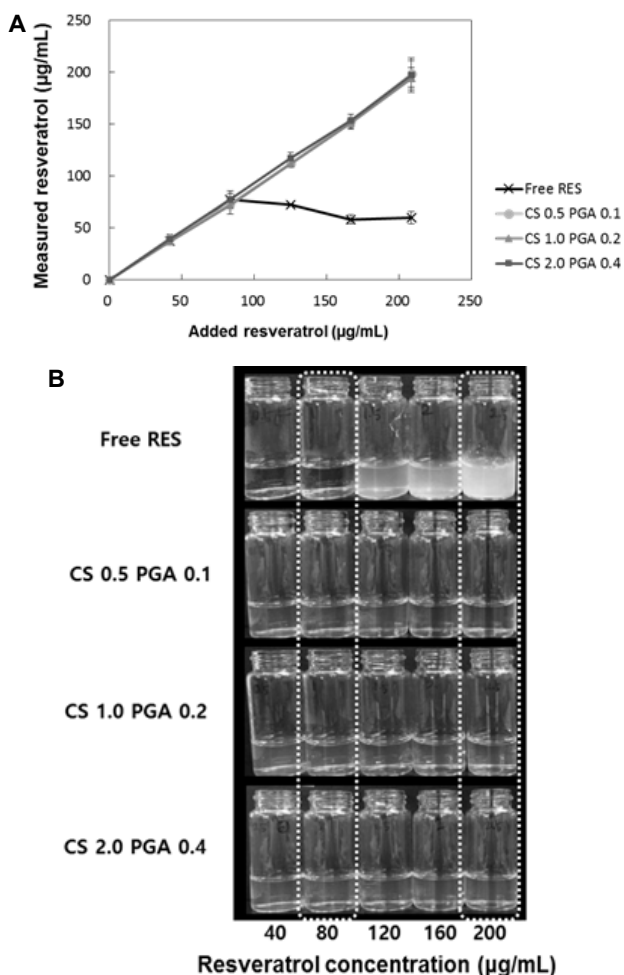


Fig. 3. Solubility (A) and image (B) of nanoencapsulated and non-nanoencapsulated resveratrol before lyophilization in 8.3% ethanol (7).

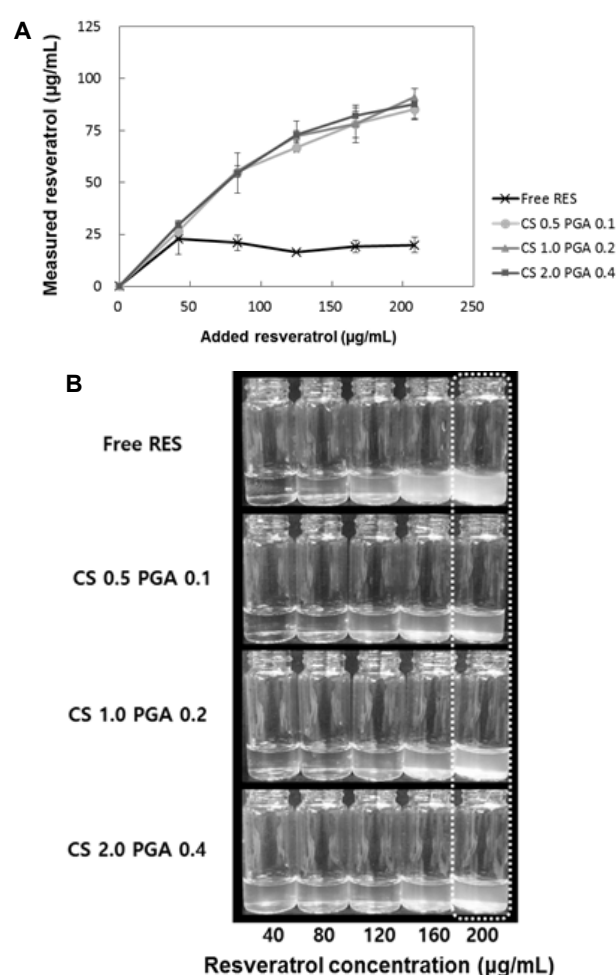


Fig. 4. Solubility (A) and image (B) of nanoencapsulated and non-nanoencapsulated resveratrol reconstituted after lyophilization in water (7).

점막부착성 다당체를 이용한 키토산 나노캡슐

영양전달시스템의 점막부착성은 일반적으로 위장관의 점막에 부착되는 특성으로 주로 피복물질의 특성에 기인한다. 캡슐에 포집된 활성성분은 섭취 후 캡슐 내부에서 안정성이 증진된 상태로 보호되면서 점막에 부착되어 세포투과율과 체내 체류시간을 증가시키기 때문에 영양전달시스템의 점막부착능은 생체이용효율을 증진할 수 있는 긍정적인 특성으로 간주한다. 키토산과 알지네이트, 펙틴, dextran sulfate 등 점막부착능을 가지는 다양한 천연 및 합성 다당류들이 보고되고 있는데 특히 키토산은 일반적으로 음전하로 하전된 점막 표면과 정전기적 상호작용에 의해 결합력을 가지게 되기 때문에 점막부착능을 나타낸다. 또한 dextran sulfate의 구조 중 sulfate 그룹은 점막의 주성분인 뮤신과 강력한 수소결합을 이루기 때문에 점막부착능을 가진다고 알려져 왔다(9).

키토산과 dextran sulfate를 이용하여 나노캡슐을 제조한 후 점막부착능을 측정한 결과, 나노캡슐 제조 시의 dextran sulfate 농도가 증가할수록 나노캡슐의 점막부착능이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 5A). 이러한 키토산/dextran sulfate 나노캡슐에 coenzyme Q 10(CoQ 10)을 포집시킨 후 캡슐화에 따른 점막부착능

을 비교하면(Fig. 5B), 제조조건에 따라 상이하긴 하지만 키토산과 dextran sulfate의 나노캡슐에 의해 CoQ 10의 부착능이 약 2.5배 이상 증진되었음을 확인할 수 있었고 특히 키토산과 TPP 나노캡슐보다 월등히 높은 점막부착능을 보여 나노캡슐의 피복물질이 점막부착능과 밀접한 관련이 있음을 나타내었다.

키토산 나노캡슐화에 의한 안정성 증진

전술한 바와 같이 캡슐화의 주요 목적은 외부환경에 민감한 내부물질의 안정성 증진이다. 특히 키토산은 다양한 pH 환경에서 물리적으로 비교적 안정된 특성을 나타내기 때문에 안정성 증진을 위한 나노캡슐화의 소재로 적절하다고 판단된다. 키토산 나노캡슐화가 resveratrol의 안정성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 UV 조사 환경에서 resveratrol의 정량적 안정성을 측정하였다(14). Resveratrol은 *trans* 형과 *cis* 형의 이성질체를 가지는데 *trans*-resveratrol은 생리활성의 측면에서 뛰어나지만 산화적 환경에서 쉽게 *cis*-resveratrol로 전환되어 생리활성이 감소한다. 따라서 캡슐화에 의한 UV 안정성을 분석하기 위하여, UV 조사하에서 시간별로 *trans* 형과 *cis* 형의 resveratrol을 각각 정량 분석하였다(Fig. 6). 캡슐

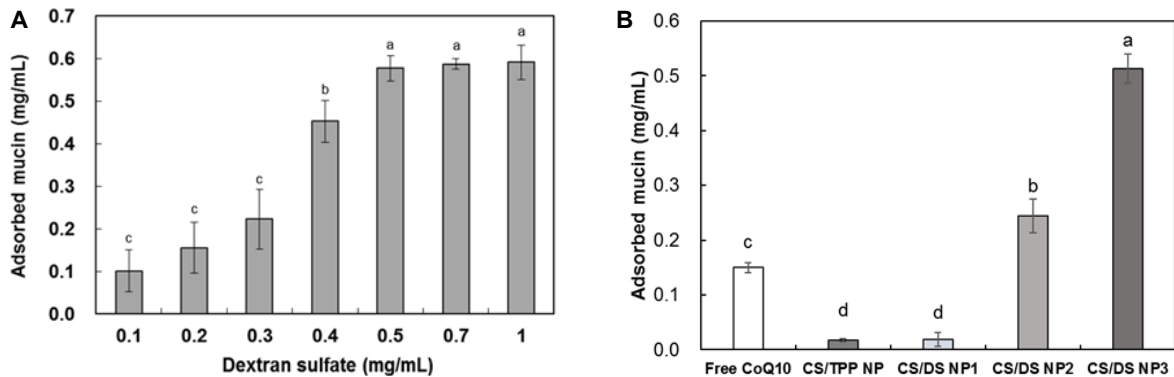


Fig. 5. Mucoadhesiveness of the chitosan/dextran sulfate nanoparticles (A) and CoQ10-loaded chitosan/dextran sulfate nanoparticles (B). Different letters on the bars indicate significant differences between the samples ($P<0.05$) (9).

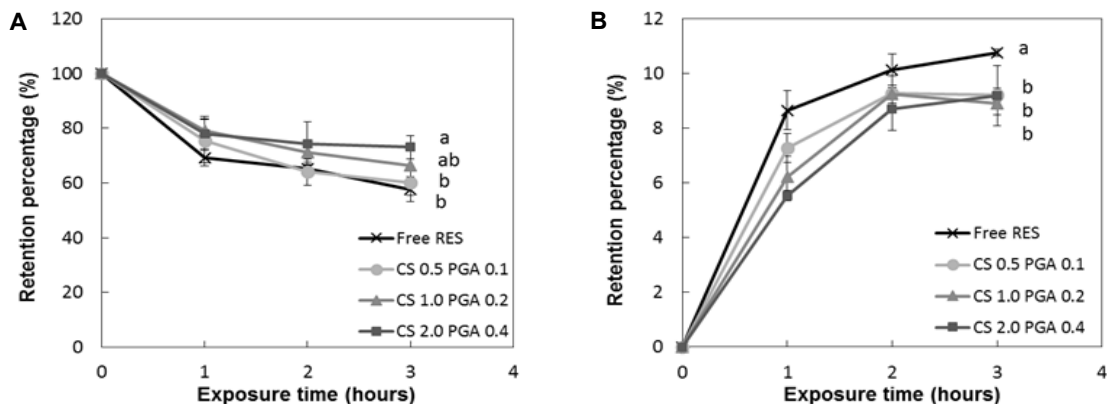


Fig. 6. Retention percentage of *trans*-resveratrol (A) and *cis*-resveratrol yield (B) under UV light irradiation. Different letters indicate significant differences between the samples ($P<0.05$) (7).

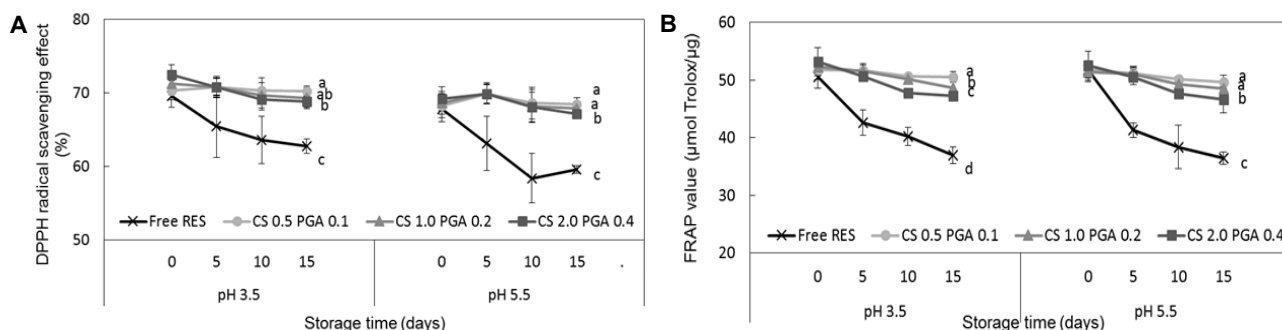


Fig. 7. The DPPH radical scavenging activity (A) and FRAP values (B) of nanoencapsulated and non-nanoencapsulated resveratrol during storage with different pH values (3.5 and 5.5). Different letters indicate significant differences between the samples ($P < 0.05$) (7).

화 유무와 상관없이 모든 resveratrol은 UV 조사하에서 *trans* 형은 감소하고, *cis* 형은 뚜렷하게 증가하였다. 이러한 경향은 캡슐화되지 않은 resveratrol에서 가장 뚜렷하게 관측되었다. 캡슐화되지 않은 *trans*-resveratrol은 UV 조사 3시간 동안 급격히 감소하여 60% 이하의 잔존율을 나타냈다. 반면, 캡슐화된 *trans*-resveratrol은 캡슐 제조조건에 따라 차이가 있으나 상대적으로 높은 잔존율을 보였다. 특히 키토산과 PGA의 농도가 2.0 mg/mL와 0.4 mg/mL로 가장 높을 때 가장 높은 안정성을 나타내었는데, UV 조사 1시간까지는 다소 감소하여 78%의 잔존율을 나타냈으나, 이후에는 꾸준히 유지하여 3시간 후에 약 73%의 잔존율을 나타냈다. *Cis*-resveratrol의 경우는 모든 실험군에서 UV 조사에 의해 급격히 증가하였는데, 특히 캡슐화되지 않은 resveratrol에서 *cis*-resveratrol의 생성률이 유의적으로 가장 높았으며 캡슐화된 resveratrol은 상대적으로 낮은 *cis*-resveratrol 생성률을 나타냈다.

캡슐화에 의한 안정성을 생리활성의 측면에서 관측하기 위하여, pH 3.5와 pH 5.5 조건에서 15일 동안 저장하면서 resveratrol의 항산화활성을 DPPH 라디칼 소거능과 ferric reducing antioxidant power(FRAP) value를 측정함으로써 관측하였다(Fig. 7). 모든 조건에서 캡슐화되지 않은 resveratrol의 항산화활성은 급격히 저하된 반면 캡슐화된 resveratrol의 항산화활성은 상대적으로 꾸준히 유지되는 경향을 나타냈다. 이러한 결과는 resveratrol이 키토산 캡슐의 내부에 포집됨으로써 정량적으로도 안정성이 증가하면서 resveratrol에 의해 발현되는 DPPH 라디칼 소거능과 FRAP value 또한 안정적으로 유지되었던 것으로 판단된다.

결론

키토산 나노캡슐은 지금까지 다양한 내부물질을 포집하며 내부물질의 물리화학적 특성 개선을 위하여 활발하게 연구되어왔다. 기존에는 가장 일반적인 키토산 나노캡슐의 형태였던 키토산/TPP 나노입자를 중심으로 연구가 진

행되어 왔으나 최근에는 다양한 crosslinker를 이용하여 키토산 나노캡슐의 물리화학적 특성을 증진시키고자 시도되고 있다. 키토산 나노캡슐은 난용성 활성성분의 용해도와 체내·외에서의 안정성을 증진시키며 crosslinker의 선별을 통해서 점막부착능과 세포투과능 등의 다양한 기능성을 증가시키기 위해 활발하게 연구되어왔다. 이러한 연구들을 토대로 하여, 키토산 나노캡슐은 식의약분야에서 내부물질의 가공학적 특성뿐만 아니라 생체내 이용효율을 증진시킬 수 있는 효과적인 영양전달시스템으로 실질적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다(315065-3).

참고문헌

- Pothakamury UR, Barbosa-Cánovas GV. 1995. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends Food Sci Technol* 6: 397-406.
- Rojanarata T, Petchsangsa M, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Ruktanonchai U, Sajomsang W, Tantayanon S. 2008. Methylated *N*-(4-*N,N*-dimethylaminobenzyl) chitosan for novel effective gene carriers. *Eur J Pharm Biopharm* 70: 207-214.
- Ribeiro HS, Chu BS, Ichikawa S, Nakajima M. 2008. Preparation of nanodispersions containing β -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids* 22: 12-17.
- Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. 2006. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine* 2: 53-65.
- Alonso MJ, Sánchez A. 2003. The potential of chitosan in ocular drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 55: 1451-1463.
- Jang KI, Lee HG. 2008. Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. *J Agric Food Chem* 56: 1936-1941.
- Hong DY, Lee JS, Lee HG. 2016. Chitosan/poly- γ -glutamic

- acid nanoparticles improve the solubility of lutein. *Int J Biol Macromol* 85: 9-15.
8. Kim ES, Lee JS, Lee HG. 2016. Nanoencapsulation of red ginseng extracts using chitosan with polyglutamic acid or fucoidan for improving antithrombotic activities. *J Agric Food Chem* 64: 4765-4771.
9. Lee JS, Suh JW, Kim ES, Lee HG. 2017. Preparation and characterization of mucoadhesive nanoparticles for enhancing cellular uptake of coenzyme Q10. *J Agric Food Chem* 65: 8930-8937.
10. Shim HR, Lee JS, Nam HS, Lee HG. 2016. Nanoencapsulation of synergistic combinations of acai berry concentrate to improve antioxidant stability. *Food Sci Biotechnol* 25: 1597-1603.
11. Je HJ, Kim ES, Lee JS, Lee HG. 2017. Release properties and cellular uptake in Caco-2 cells of size-controlled chitosan nanoparticles. *J Agric Food Chem* 65: 10899-10906.
12. Leuner C, Dressman J. 2000. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm* 50: 47-60.
13. Ravichandran R. 2009. Nanoparticles in drug delivery: potential green nanobiomedicine applications. *Int J Green Nanotechnol Biomedicine* 1: B108-B130.
14. Jeon YO, Lee JS, Lee HG. 2016. Improving solubility, stability, and cellular uptake of resveratrol by nanoencapsulation with chitosan and γ -poly (glutamic acid). *Colloids Surf B* 147: 224-233.