

커들란을 이용한 β -cyclodextrin에 포접된 DHA의 캡슐화

이 창문·†이 기영·²최창남·³김동운·⁴이인영
전남대학교 의공학협동과정, ¹화학공학부 및 촉매연구소, ²전남대학교 응용화학부, ³광양보건대학 환경학과, ⁴더멋진바이오텍(주)
(접수 : 2001. 12. 12., 게재승인 : 2002. 2. 20.)

Encapsulation of β -cyclodextrin including DHA using Curdlan

Chang-Moon Lee, Ki-Young Lee^{†1}, Chang-Nam Choi², Dong-Woon Kim³, In-Young Lee⁴
Department of Biomedical Engineering, ¹Faculty of Chemical Engineering & The Research Institute for Catalysis
²Faculty of Applied Chemistry, Chonnam National University, Gwangju, 500-757
³Department of Environmental Science, Kwangyang Health College, Kwangyang, 545-703
⁴DMJ Biotech Corp., Yusong, Taejon, 305-600, Korea
(Received : 2001. 12. 12., Accepted : 2002. 2. 20.)

Curdlan gel containing various hydrophobic materials was prepared. The homogenized suspension of curdlan and hydrophobic materials was heated at 100°C. The curdlan gel can contain hydrophobic material up to 27%(v/v). When gel was compressed, only water in the gel was removed. When immersed in water, the dried gel absorbed water and became the original wet gel. The syneresis of gel decreased with the concentration of hydrophobic material added. DHA content of dried gel was about 90%. β -cyclodextrin inclusion complexes containing DHA were prepared with addition of water and ethanol. X-ray diffractograms of complexes showed a specific peak at 7-8° and FT-IR spectrum of complex showed a specific C=O peak at 1745cm⁻¹. Inclusion complex containing DHA was microcapsulated with curdlan and pullulan.

Key Words : Curdlan, β -cyclodextrin, DHA, Gel.

서론

커들란은 β -1,3-glucan으로 가열 용고성 다당류이다(1,2). 커들란은 20종에 미치는 독성실험 결과 독성이 매우 낮고 안정성이 높은 것이 확인되었다(3). 커들란을 가열하면 단단한 탄력성이 있는 겔을 형성하는데, 80°C이상의 높은 온도에서는 소수결합이 관여하고 있다(4). 커들란 겔의 형성에 관여하는 소수결합은 다른 지용성 식품과 잘 결합하는 특성이 있을 것으로 예상된다. 또한 β -cyclodextrin(β -CD)은 전분 가수분해 효소인 cyclodextrin glucosyl transferase로 처리하여 얻어지는 여러 가지의 cyclodextrin(CD) 중에서 가장 많이 만들어지며, 글루코스 단위 7개가 환상으로 연결된 물질이다. 2, 3, 6 위치의 하이드록실기가 외부로 배향되어 있어 겔으로는 친수성을 띠고 있으나, C-H 기와 에테르 결합은 내부로 배향되어 내부는 소수성을 띠는 캡슐 형태의 모양을 하고 있다(5). 이러한 CD의 공동 구조는 화장품, 식품, 의약품, 및 농약 등 많은 분야에서 이용되고 있다(6-8).

그리고, DHA(Docosahexaenoic acid)는 자연계 담수, 해수 중에 서식하는 식물 플랑크톤 및 해조류가 생산하는 불포화 지방산 중 필수 지방산의 하나이다. 알려지고 있는 DHA는 학습기능 향상(기억 개선), 암증식 억제(유방암, 대장암, 폐암 등), 중지방질(콜레스테롤, 중성지방)저하, 혈압저하, 항알러지, 항염증, 항당뇨(혈당치 저하), 시력저하 억제 작용 등이 있다. 사람은 DHA를 생합성 하는 필요한 효소가 체내에 존재하지 않으므로 필요로 하는 DHA는 섭취에 의존하여야 한다. 그래서, 여러 기능을 갖고 있는 DHA를 식품에 응용하여 기능성 식품 소재로 이용하려는 연구가 시도되고 있다. 그러나, DHA의 냄새는 복용을 어렵게 하기 때문에 DHA가 포함된 젤라틴 캡슐이 시판되고 있으나 다른 천연고분자를 이용한 마이크로캡슐이 개발되면 용도가 더욱 넓어질 것으로 기대된다.

본 연구에서는 소수결합을 가지는 커들란 겔을 이용하여 지용성물질을 포함하는 특성에 대한 조사와 β -CD에 포접된 DHA를 비롯한 기능성 식품을 포함한 커들란 캡슐에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

시약

커들란은 Takeda chemical Co.(Japan)에서 구입하여 사용하

†Corresponding Author : Faculty of Chemical Engineering,
Chonnam Nat'l Univ., Gwang-ju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1843, Fax : +82-62-530-1849
E-mail : kilee@chonnam.ac.kr

였고, DHA(Docosahexaenoic acid), Olive oil, Sunflower oil과 Rape seed oil은 국내에서 시판되는 물질을 구입하여 사용하였다. β -cyclodextrin은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였으며 모든 실험 재료는 정제 공정 없이 사용하였다.

커들란 젤의 제조

커들란 3%(w/v)와 지용성물질(DHA, olive oil, Sunflower oil, Rape seed oil과 Sesame oil)을 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27% (v/v)로 각각 혼합하여 균질기 (T-25 Basic)로 균일화한 후 시험관(22×200 mm/mm)에 부어 Dry oven(Vision, Korea)을 이용하여 100℃에서 각각 30분간 가열한 다음 상온에서 냉각하여 겔을 제조하였다.

이수율을 측정하기 위해 제조된 커들란 겔을 일정한 크기(높이 15mm)로 자른 후 처음 무게를 잰 다음, 밀폐된 용기에 담아 30℃에서 24시간 보관하여 무게를 측정하고 다음 식에 따라 이수율(syneresis)을 계산하였다.

$$\text{이수율}(\%) = \{(\text{처음 겔 무게} - \text{나중 겔 무게}) / \text{처음 겔 무게}\} \times 100$$

겔에 포함된 수분을 제거하기 위해 일정한 크기로 자른 겔의 처음 무게를 잰 후 페트리 접시에 놓고 500g의 중량으로 누른 후 24시간 후에 빼내어 무게를 측정하고, 30℃의 건조기에서 건조한다. 탈수정도는 다음 식에 의해 나타내었다.

$$\text{탈수도}(\%) = \{(\text{처음 겔 무게} - \text{나중 겔 무게}) / \text{처음 겔 무게}\} \times 100$$

겔 속에 포함된 오일의 양을 측정하기 위해 건조된 겔을 칼로 잘게 자른 후 5ml의 n-hexane에 24시간 동안 담지 시킨 다음 TLC판 (Silica gel 60)을 이용하여 오일량을 측정하였다. 추출한 용액 중 5 μ L를 점적한 후 전개 용매 hexane/ethyl acetate/ acetic acid (90 : 10 : 1, v/v)에 전개시킨 다음 건조하고 황산과 메탄올 (1 : 18, v/v)로 발색하였다. 발색된 TLC 판을 TLC scanning method에 의하여 분석하였다.

또한, 건조된 겔을 30℃의 물에 24시간 담그면 물을 흡수하여 겔이 재생된다. 재생된 겔의 무게를 측정하여 흡수된 수분함량을 백분율로 나타내었다.

$$\text{흡수된 수분비율}(\%) = \{(\text{재생 겔의 무게} - \text{건조 겔의 무게}) / \text{건조 겔의 무게}\} \times 100$$

β -cyclodextrin(β -CD)을 이용한 DHA의 포접

β -CD(0.5 g)과 DHA(0.5 mL)를 혼합한 다음 소량의 물을 첨가하여 10분 동안 교반하여 포접체를 형성하였다. 포접체 표면에 잔존하는 DHA를 제거하기 위해 n-hexane 5 mL을 첨가하여 교반한 후 상등액을 제거한 다음 filter paper(Advantec, Toyo)에 캐스팅하여 30℃에서 3시간 건조하였다.

포접에 대한 물의 효과를 알아보기 위해 β -CD(0.5 g)과 DHA(0.5 mL)를 혼합한 다음 물 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL을 각각 첨가하여 10분 동안 교반하여 포접체를 형성하여 물의 효과를 알아보았다. 또한 포접에 대한 에탄올의 영향을 알아

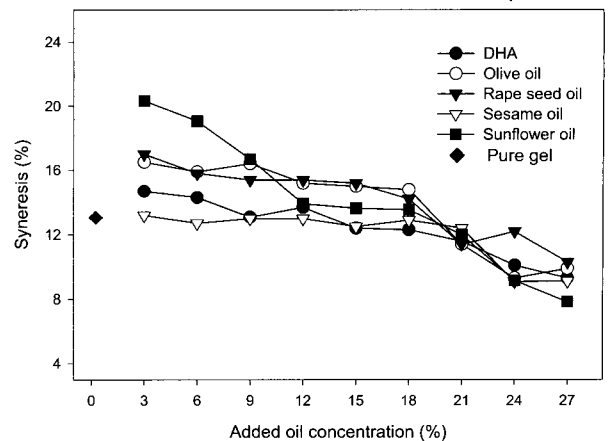


Figure 1. The syneresis of curdlan gel.

보기 위해 β -CD(0.5 g)과 DHA(0.5 mL)를 혼합한 다음 물 1.0 mL과 에탄올 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL을 각각 첨가하여 10분 동안 교반하여 포접체를 형성하여 에탄올의 효과를 알아보았다.

포접된 DHA의 양을 측정하기 위해 건조된 포접체의 분말을 0.05 g 취하여 DMSO (Dimethyl sulfonyl oxide) 1 mL에 녹이고 TLC판에 1 μ L를 점적하여 분석하였다. 분석법은 겔의 오일 함량 측정과 동일한 방법을 사용하였다.

DHA의 포접을 확인하기 위해 포접체와 KBr 분말을 혼합하여 원판상으로 제조한 뒤, Nicolet 520 FT-IR spectrophotometer(U.S.A)를 사용하여 분석하였다. 또한, 제조된 포접체를 X-ray diffractometer(D/MAX-1200, Rigaku, Japan)에서 분석하였으며, 분석 조건은 target; Cu α , scanning speed; 0.01°/min, fitter; Cu/Ni, voltage; 40Kv, current; 20 mA, 그리고 time constant; 1sec, 2 θ ; 4~70°였다.

커들란과 플루란을 이용한 포접체의 캡슐화

제조된 포접체 1 g을 500 mL 증류수에 K₃PO₃ 2 g, 커들란 4g과 플루란 1 g을 혼합하고, Spray dryer(Eyela SD-1000, Japan)를 이용하여 분무건조를 거쳐 캡슐화하였다. 시료의 공급속도는 10 mL/min 공기압력은 100 kPa로 고정하였다. 입구온도는 120℃로 하였으며, 출구는 60-70℃였다.

SEM을 통한 DHA를 포함한 포접체와 캡슐의 관찰

포접체와 캡슐의 형태는 SEM(JEOL, JSM 5400, Japan)을 통해 관찰하였다.

결과 및 고찰

지용성물질을 포함한 겔의 이수 및 탈수

겔 속에 포함된 지용성물질(DHA, olive oil, Sunflower oil, Rape seed oil과 Sesame oil)의 농도가 높아질수록 이수율은 감소하고, 겔과 수분사이에 오일이 들어가므로 21%이하까지는 순수한 겔보다 이수율이 높다는 것을 알 수 있었다. 21% 이상의 지용성물질을 포함한 겔에서는 순수한 겔보다 포함하고 있는 수분의 양이 많이 적어 이수율이 감소하는 것으로 생각된다(Figure 1). 또한 겔을 500 g의 중량으로 압착하면

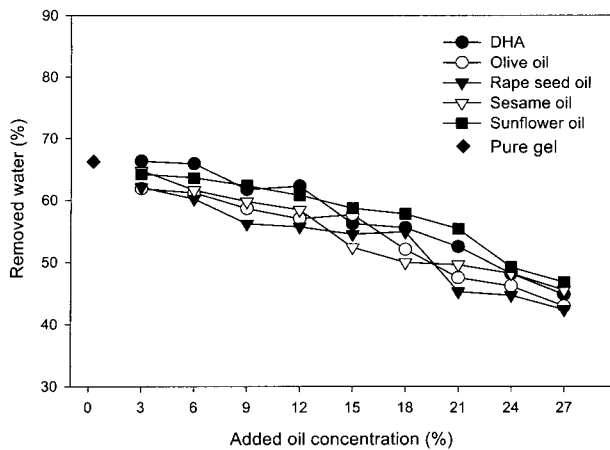


Figure 2. The removing of water from curdlan gel.

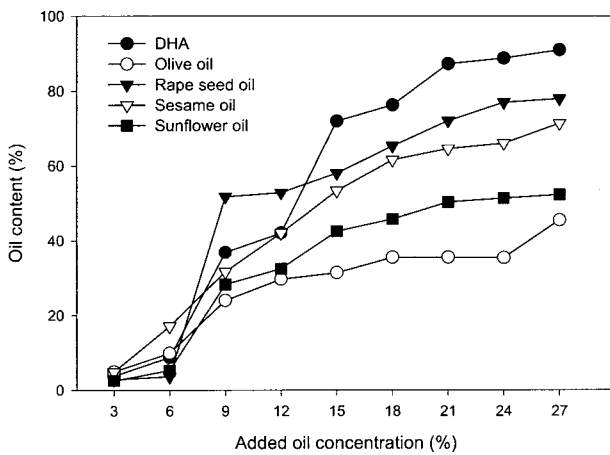


Figure 3. Oil content of curdlan dried gel.

수분만이 겔 밖으로 빠져나오고, 오일은 겔 속에 남게된다. 커들란 겔이 가지는 소수결합 때문에 물보다 지용성물질과 강한 결합을 한다는 것을 알 수 있었다(Figure 2).

건조된 겔 속에 함유된 오일량

Figure 3에서는 겔 속에 포함시킨 오일의 양이 증가할수록 건조 후에 함유된 오일의 양이 증가하는 것을 보여준다. DHA는 건조 중량의 90% 정도가 포함되었고, olive oil은 측정된 오일 중에 가장 적은 양인 건조 중량의 40% 정도가 포함되었으며 오일의 종류에 따라 포함되는 양의 차이가 있음을 알 수 있었다. 또한, 포함시킨 오일의 농도가 20%이상인 겔에서는 건조과정을 거치면서 겔의 형태가 변형하고, 오일이 겔 밖으로 빠져나왔다. 오일의 손실을 줄이고, 겔 속에 오일을 함유시키기 위한 최적 농도는 20%가 적당하다는 것을 알 수 있었다.

건조된 겔의 재생

건조된 겔을 다시 증류수에 담가두면 다시 건조전의 형태로 되돌아오게 되는데 이것을 재생겔이라고 부른다. DHA, sunflower oil, sesame oil은 rape seed oil, olive oil보다 많은 양의 물을 흡수하였고, 첨가된 오일의 양이 많아질수록 흡수된 물의 양은 감소하였다(Figure 4).

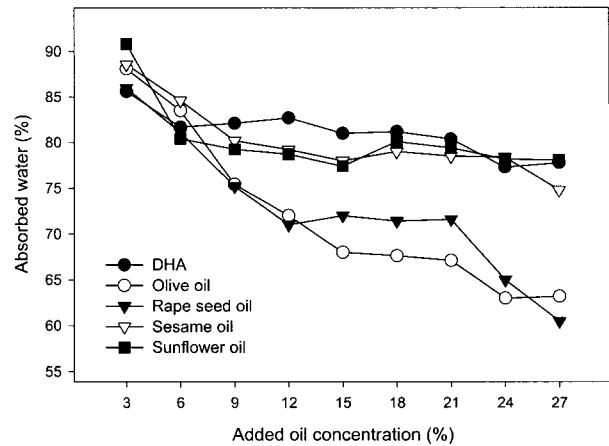


Figure 4. Absorbed water(%) after regeneration of dried curdlan gel.

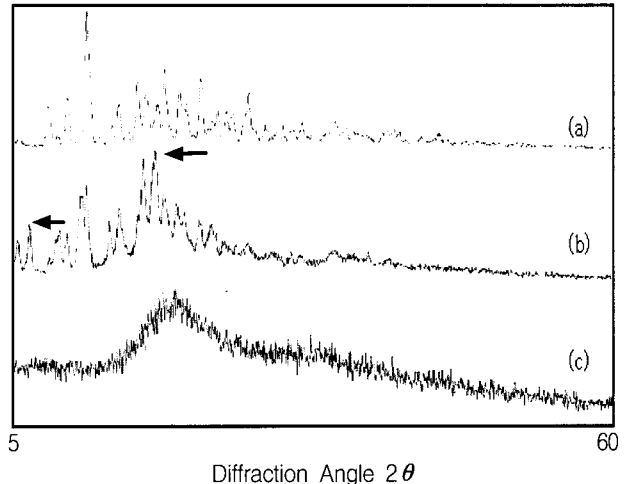


Figure 5. X-Ray Diffraction of (a) β -CD (b) inclusion complex with DHA (c) curdlan and pullulan capsule containing inclusion complex.

DHA를 포함한 포접체와 캡슐의 XRD

Figure 5은 포접체와 캡슐의 형성을 알아보기 위해 분석한 X-Ray diffraction (XRD)이다. 포접체는 7-8°에서 β -CD에 존재하지 않는 peak가 형성되었고, 17-19°에서 peak 강도가 증가되는 것을 관찰하였다. 이를 통해 DHA가 포함된 포접체가 형성되었음을 알 수 있었다. 캡슐에서는 DHA와 β -CD의 결정성이 관찰되지 않았다. 이는 포접체를 완전히 포괄한 캡슐이 형성되었음을 나타낸다.

DHA를 포함한 포접체의 FT-IR

포접체의 형성을 확인하기 위해 FT-IR분석을 행하였다. IR spectrum에서 β -CD에 존재하지 않는 1745 cm^{-1} 의 C=O peak가 관찰되었고, methyl기의 흡수파장인 2900 cm^{-1} 에서도 강도가 증가하는 특징을 보였다. 이와 같은 변화는 β -CD내로 DHA가 포접되었음을 보여준다(Figure 6).

DHA를 포함한 β -CD 포접체

β -CD와 DHA를 혼합하고 물을 첨가하면 하얀 paste 상태가 된다. 포접에 영향을 미치는 중요한 인자는 물과 에탄올이다(9). DHA를 포함시키기 위해 알맞은 물과 에탄올의 양

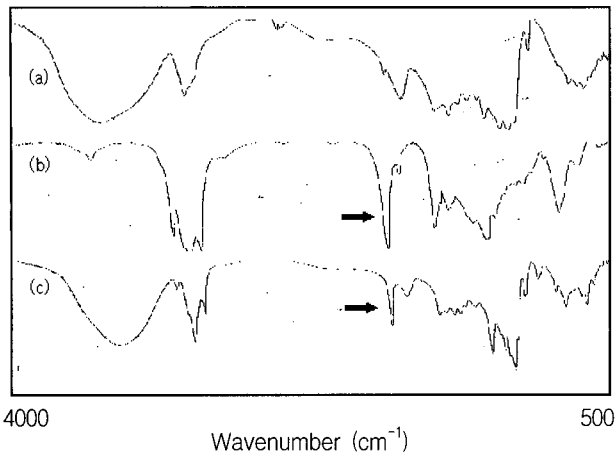


Figure 6. FT-IR spectra of (a) β -CD (b) DHA (c) inclusion complex with DHA.

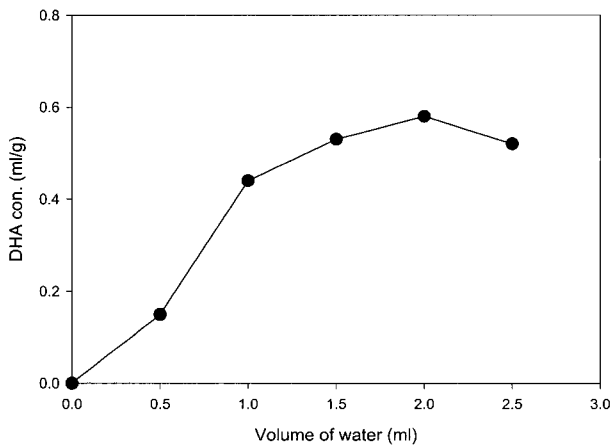


Figure 7. The effect of water on inclusion complex with DHA.

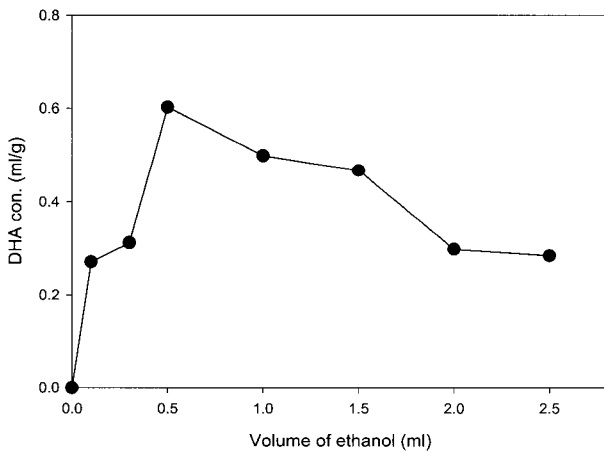
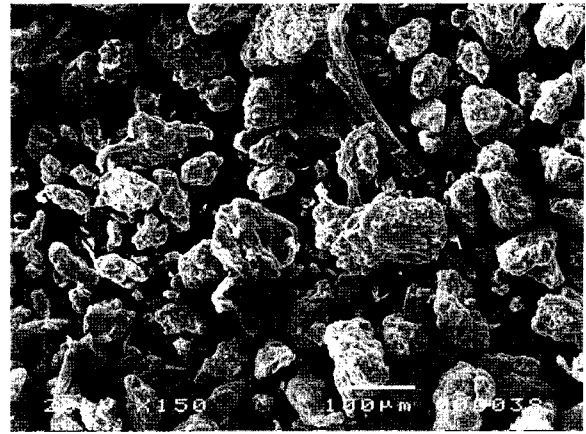


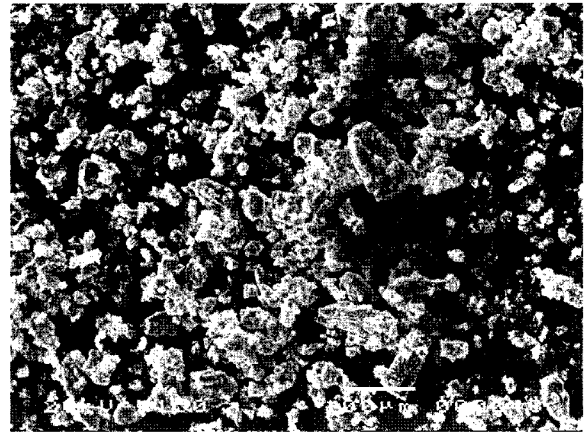
Figure 8. The effect of ethanol on inclusion complex with DHA.

은 2.0 mL과 0.5mL이었다(Figure 7, 8). 이때 포함되는 DHA의 양은 β -CD 1 g당 0.6 mL이었다. 에탄올의 양이 증가할수록 포함되는 DHA의 양이 감소하였음을 알 수 있었다.

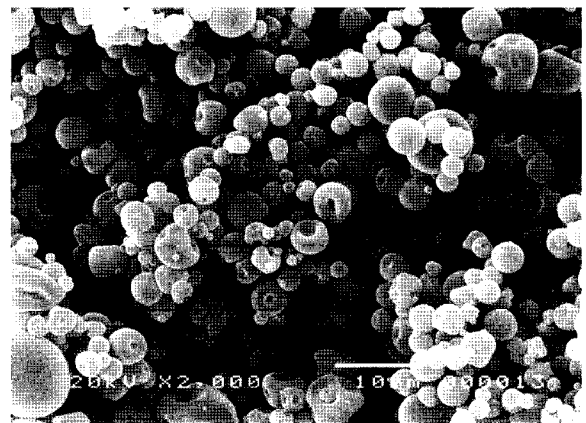
Figure 9는 β -CD, DHA를 포함한 포접체와 포접체를 포함한 마이크로캡슐을 SEM으로 관찰한 결과이다. β -CD에 물과 에탄올이 첨가되어 DHA가 포접되면 입자의 크기는 작아지



(a)



(b)



(c)

Figure 9. SEM of (a) β -CD (b) inclusion complex containing DHA (c) micro-capsule of curdlan and pullulan containing inclusion complex with DHA.

며, 마이크로캡슐의 크기는 5-8 μ m이고 원형을 이루고 있다.

요약

소수성 결합을 가지는 커들란 겔의 특성을 이용하여 지용성물질을 포함한 겔을 제조할 수 있었고, 지용성물질의 종류

에 따라 건조시킨 겔 속에 상당한 양이 포함되는데, DHA는 건조중량의 90%까지 포함될 수 있었다. 또한, β -CD의 포접 특성을 이용하여 DHA를 포함시킬 때 포접체 형성에 대한 물과 에탄올의 영향을 살펴본 결과 물 2.0 mL과 에탄올 0.5 mL이 DHA 포접에 효과적이었다. FT-IR과 XRD로 포접체를 분석해 본 결과 DHA를 포함한 포접체가 형성되었고, SEM을 통하여 포접체와 커들란, 플루란을 이용하여 마이크로 캡슐의 형태를 살펴볼 수 있었다.

감 사

이 논문은 2000년도 전남대학교 연구년 교수 연구비 지원에 의하여 연구되었기에 연구비 지원에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Harada, T., Masada, M., Fusimori, K. and Maeda, I. (1996), Production of a Firm, Resilient Gel-forming Polysaccharide by a Mutant of *Alcaligenes faecalis* var *myxogenes* 10C 3, *Agri. and Biochem.*, **30**, 196-198.
2. Harada, T. and Yoshimura T., (1964), *J. Ferment. Technol.*, **42**, 615.
3. Harada, T., Misaki, A., and Saito, H., (1968), "Curdlan : A Bacterial Gel-forming β -1.3 glucan", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **124**, 292-298.
4. Kanzawa, Y., Takahashi, F., Harada, T. and Harada, A., (1987), Ability of curdlan gel to hold hydrophobic substance, *Japan J. Society of Home Economics*, **38**, 363-368.
5. Young-Hyun Lee, Seung-Hwan Jeoung, Dong-Chan Park, (1995), Comparison of inclusion complex formation capacity of cyclodextrins with various molecules and characterization of cyclodextrin-fatty acid complex, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 149-158.
6. Lach, J. L. and Chin, T. F., (1964), *J. Pharm. Sci.*, **53**, 69.
7. Ikeda, K. and Uekama, K., (1975), *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 201.
8. Uekama, K. and Hirayama, F., (1979), *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1059.
9. Hidefumi, Y., Takeshi, F. and Kenichi, K., (1995), Quantitative analysis of α -cyclo-dextrin inclusion complexes with fatty acid methyl/ethyl esters by X-ray diffractometry, *Oyo Toshitsu Kagaku*, **42**, 243-249.