

초임계 이산화탄소를 이용한 Zein 미립자 제조

유종훈*, 임교빈

Preparation of Zein Microparticles Using Supercritical Carbon Dioxide

Jong-Hoon Ryu* and Giobin Lim

접수: 2012년 8월 16일 / 게재승인: 2012년 8월 27일
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, zein microparticles and drug-loaded zein microparticles were prepared using supercritical ASES technique. The effects of operating parameters on particle size and morphology were investigated. ASES-processed zein microparticles consisted of agglomerates of very fine unit particles. As temperature increased, the size of unit particles increased and their morphology became more spherical. The addition of water to the solvents for zein resulted in the formation of more spherical microparticles. The release characteristics of drug-loaded zein microparticles were also studied.

Keywords: supercritical carbon dioxide, zein, fine particles, antisolvent, leuprolide acetate

1. 서론

약물의 방출 조절 시스템 (controlled release system)은 약물에 의한 부작용을 최소화하기 위한 방법의 하나로 하나 또는 그 이상의 약물이 특정 시간, 특정 부위에 원하는 속도로 약물이 방출되어 목표 부위에서 작용할 수 있도록 하는 기술이다. 이러한 약물의 방출 조절 시스템은 일반적으로 생분해성 고분자 내 약물을 봉입하여 고분자의 분해와 약물의 확산을 통해 약물이 방출되도록 설계된 것이다.

약물 함유 고분자 미립자의 제조에 오랫동안 합성 생분해

성 고분자인 polylactic acid (PLA), polylactic-co-glycolic acid (PLGA)가 가장 널리 이용되어져 왔다. 그러나 이러한 생분해성 고분자에 단백질 의약품을 사용한 경우 고분자가 분해되면서 주위 환경을 산성화시켜 단백질 의약품의 활성을 억제시키는 단점이 있어 왔다 [1]. 이러한 단점을 보완하기 위한 방법으로 최근에는 천연 단백질 고분자를 약물 전달체로 이용하는 연구들이 진행되고 있으며, 천연 단백질 고분자 중 대표적인 고분자로 옥수수 단백질 저장원 중 하나인 zein 미립자를 이용한 약물 전달체 제조에 대한 연구가 진행되고 있다 [2-4].

식물의 종자 중 곡물은 가장 중요한 단백질 저장원 중 하나이며 식물의 저장 단백질 중 하나인 prolamin은 여러 가지 생리활성 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 옥수수로부터 추출되는 저장 단백질인 zein은 prolamin의 일종으로 천연 단백질이며 소수성으로 합성플라스틱 등과 같은 성질을 가지고 있다. 그러한 특성으로 인해 최근 식품과 제약 산업을 중심으로 zein의 물리적 특성을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. Zein은 오랫동안 식용으로 사용되어온 옥수수의 성분으로 분자량이 약 21,000-25,000의 폴리펩티드 (polypeptide)로 식품 첨가물로서 사용에 제한이 없고 미국에서는 GRAS (Generally Recognized as Safe) 등급으로 지정되어 있어 안정성이 높은 물질이다 [5].

Zein이 가지는 특성으로는 소수성으로 물에 용해되지 않지만 수용성 에탄올 (60-95%)에 용해되며, 프로필렌글리콜 (propylene glycol)이나 초산 등의 극성 유기 용매에도 용해되는 특성을 가지고 있다. 또한, pH 11 이상의 알칼리 수용액, 양이온 계면활성제나 고농도 요소가 포함된 용액에 용해되는 특성을 가진다. 이러한 zein은 식품 이외의 용도로 접착제, 코팅제, 생분해성 플라스틱, chewing gum, fiber, cosmetic powder, 잉크나 염료의 microencapsulation 등에 폭넓게 사용되어져 오고 있다 [5]. 특히 zein은 lysozyme과 같은 펩티

수원대학교 화학공학과
Department of Chemical Engineering, The University of Suwon,
Hwaseong, Gyeonggi 445-743, Korea
Tel: +82-31-220-2599/+82-31-220-2243, Fax: +82-31-220-2528
e-mail: jhryu@suwon.ac.kr

드 (peptide) 약물의 방출 속도 조절을 위한 미립자 제조 연구에도 이용되고 있다 [6].

일반적인 약물함유 미립자 제조 방법으로는 용매 추출/증발법 (solvent extraction/evaporation)과 phase separation/coacervation법이 주로 이용되고 있다 [7]. 그러나 이들 방법의 경우 낮은 수율, 열민감성 약물의 효능 저하, 펩타이드/단백질 약물의 변성, 약물 내 유기용매의 잔존 등의 문제점이 있다. 이와 같이 미립자 제조 공정에서 발생하는 여러 문제점들의 해결할 수 있는 대체기술로서 초임계 유체 (supercritical fluid)를 이용한 입자 제조 기술이 현재 활발히 연구되어 지고 있다 [8-11].

초임계 유체란 어떤 물질의 임계 온도와 압력 이상에서 존재하는 유체로 미립자 제조에 적합한 열역학적 특성 (높은 용해도, 선택도, 압축성, 감압에 따른 자발적 분리성)과 이동특성 (낮은 표면장력, 점도, 높은 확산계수)을 갖고 있다. 초임계 유체가 가지는 용해도는 좁은 범위의 온도와 압력 조절을 통해 초임계 유체의 밀도를 조절하여 쉽게 변화시킬 수 있다. 특히, 이산화탄소는 비교적 낮은 임계압력 (7.38 MPa)과 상온 근처의 임계온도 (31.1°C)를 가지고 있으며, 인체에 무해하고 가격이 저렴할 뿐만 아니라 폭발성 및 발화성이 없으며 상온에서 감압에 의해 쉽게 회수할 수 있는 특징을 가지고 있어 초임계 유체로 미립자의 제조에 가장 널리 이용되고 있다 [10].

초임계 유체를 이용한 미립자 제조 기술의 장점으로서는 기존

미립자 제조 방법에 비해 적은 양의 유기용매 사용과 제품 내 잔류 용매가 거의 없고 입자의 제조 및 건조 공정이 단일 공정으로 가능하다는 것이다. 초임계 유체를 대상 용질에 대한 역용매 (antisolvent)로 이용하여 미립자를 제조하는 대표적인 방법으로는 aerosol solvent extraction system (ASES) 공정이 있다. 초임계 유체를 역용매로 이용하여 zein의 미립자 제조에 대한 앞선 연구에서 Zhong 등 [12]은 zein의 미립자 제조에 있어서 ASES 공정 변수가 입자의 형태 및 크기에 미치는 영향에 대한 연구를 수행하였으며, 또한, Zhong 등 [13]은 lysozyme이 함유된 zein 미립자 제조에 대한 연구를 수행한 바 있다.

본 연구에서는 초임계 ASES 공정을 이용하여 온도, 압력, 유량, 농도 및 용매 등의 공정 변수가 zein의 미립자 제조에 미치는 영향과 모델약물로 leuprolide acetate가 봉입된 약물 함유 미립자를 제조하여 zein 미립자의 약물 방출 특성에 대해 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

Corn zein은 Sigma-Aldrich (USA)사에서 구입하여 더 이상 정제 없이 사용하였다. 초임계 유체로는 99.95%의 순도를 지니는 이산화탄소를 사용하였으며, zein 미립자 제조

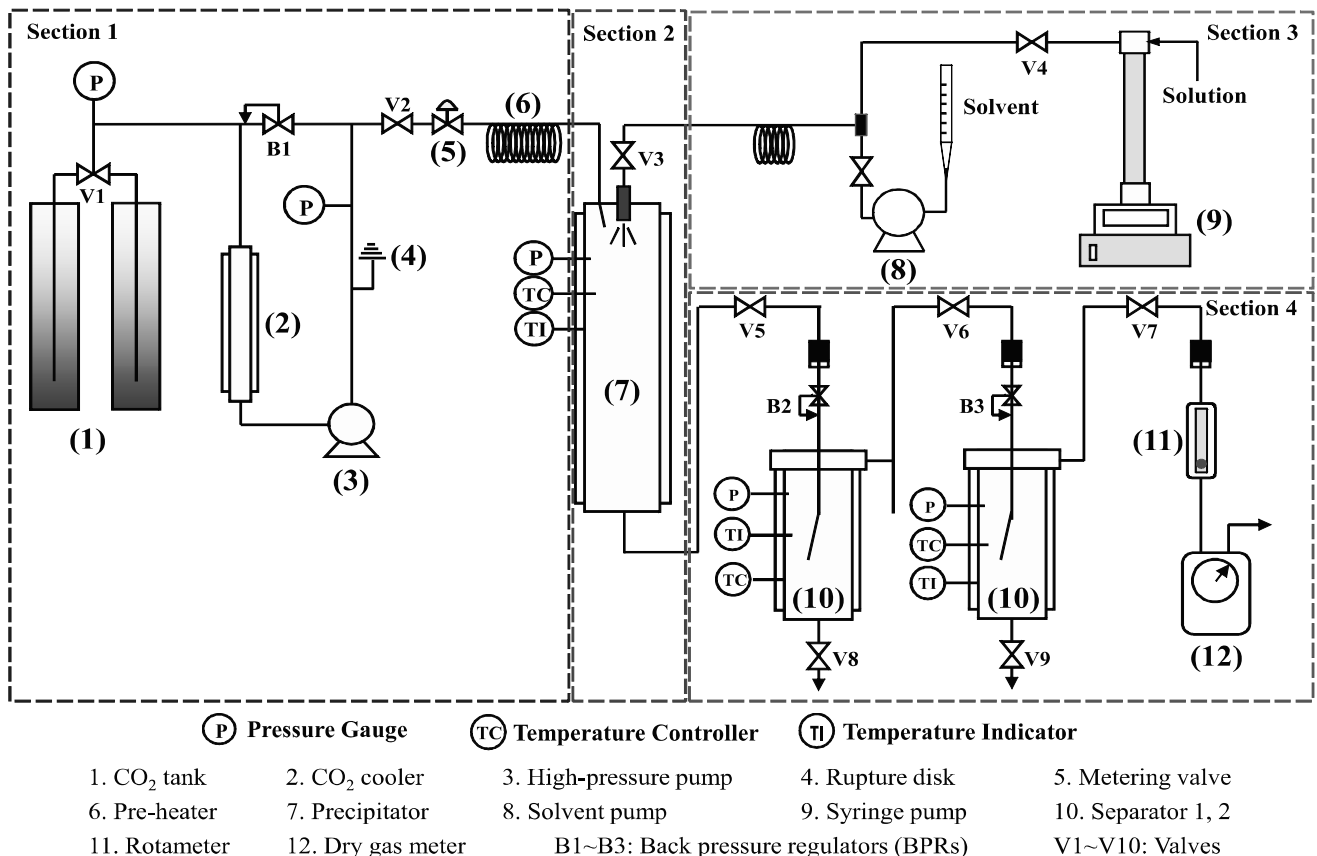


Fig. 1. Schematic diagram of the supercritical ASES apparatus used in this study.

에 사용된 용매로 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (USA)로부터, dichloromethane (DCM)과 methanol (MeOH)은 Fisher Scientific (USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 다른 모든 용매와 시약은 분석급을 구입하여 더 이상의 정제 없이 사용하였다.

2.2. 미립자 제조

본 연구에서 사용된 미세입자 제조 장치의 개략도를 Fig. 1에 나타내었다. ASES 장치는 액체 상태의 이산화탄소를 공급하기 위한 고압 펌프, 용액의 주입 및 분사를 위한 고압 정량 펌프 및 노즐, 입자 형성이 일어나는 고압 침전기, 입자 형성 후 이산화탄소와 용매를 분리하기 위한 분리조 등으로 구성되어 있다. 액체 상태의 이산화탄소는 액체 고압 펌프 (EL-1, Lewa, Germany)에 의해 가압되고 가압된 이산화탄소는 후방 압력조절기 (back-pressure regulator, 26-1700, Tescom, USA)에 의해 요구되는 공정 압력으로 조절되고 공정 온도로 예열된 후 고압 침전기의 상단으로 연속적으로 공급되어졌다.

Zein이 용해된 용액은 주사형 고압 정량펌프 (syringe pump, 100D, ISCO, USA)에 의해 침전기의 상단에 장착된 내경 127 μm 의 노즐을 통해 초임계 이산화탄소가 채워진 침전기 내부로 연속적으로 분사되었다. 분사된 용액은 초임계 이산화탄소상에서 액적을 형성하고, 형성된 액적내 용질은 초임계 이산화탄소와 용매의 상호 물질전달에 의한 과포화 발생에 의해 입자화되었다. 용매 분사 후 고압 침전기 및 생성된 입자 내에 잔류하는 용매를 제거하기 위해 30분 동안 순수한 초임계 이산화탄소를 연속적으로 공급하여 입자를 건조하였다. 침전기 하단에는 5 μm 의 공극을 지니는 금속 필터를 장착하여 형성된 입자들의 수집이 이루어지도록 하였다. 이때, 사용되어진 용매는 초임계 이산화탄소와 함께 침전기 이후에 구성되어진 용매 회수부에서 이산화탄소의 감압에 따라 자발적인 분리와 회수가 이루어지도록 하였다.

2.3. SEM 분석

제조된 입자의 크기 및 형상은 전계방출 전자현미경 (field-emission scanning electron microscope, FE-SEM, JSM6700F, JEOL, Japan)을 통하여 관찰하였다. SEM 분석은 소량의 입자를 채취하여 카본 테이프가 부착된 금속 스텐드 (metal stub)에 고정시키고, 금/팔라듐 (Au/Pd) 코팅한 후 15 kV에서 수행하였다.

2.4. 입도 분석

온도에 따른 입자의 크기 및 크기 분포도는 입도분석기 (particle size analyzer, Mastersizer 2000 S, Malvern Instrument, UK)를 통해 분석하였다. 응집된 zein 미립자를 분산시키기 위해 0.05 wt% Pluronic F68/H₂O 용액에 넣고 약 2분간 초음파 처리하여 입자를 분산시킨 후 측정하였다 [14].

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 초임계 ASES 공정에서 온도, 압력, 용액

유속, 용액 농도 및 용매 조성 등의 공정 변수가 zein 입자의 크기 및 형태에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 초임계 ASES 공정을 이용한 zein 미립자 제조 실험은 이산화탄소 유속을 34-36 g/min로 고정하고, 25-55°C의 온도와 8.5-18 MPa의 압력 조건에서 수행하였다. 용매로는 zein에 대한 용해도를 고려하여 DCM과 DMSO를 동일 부피비로 혼합하여 사용하였다.

3.1. 온도의 영향

동일 압력 (13 MPa) 조건에서 zein의 미립자 제조에 온도 변화가 미치는 영향을 알아보기 위해 25-55°C의 온도 범위에서 실험을 수행하였다. 온도 변화에 따라 제조된 입자의 SEM 사진을 Fig. 2에 나타내었다. 초임계 ASES 공정에 의해 제조된 zein 입자들은 나노 크기의 단위 입자들이 서로 연결된 구형 또는 불규칙한 입자 형태를 보였다.

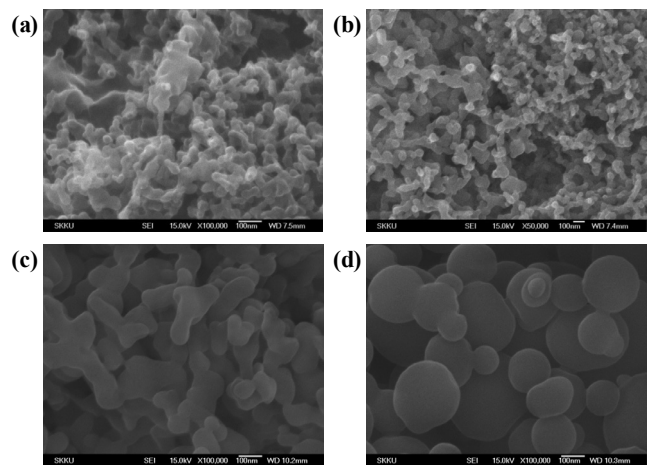


Fig. 2. SEM micrographs of various ASES-processed zein particles prepared at 13 MPa and different temperatures: (a) 25°C, (b) 35°C, (c) 45°C, and (d) 55°C.

SEM 사진을 보면 온도가 증가하면서 서로 연결된 단위 입자의 크기는 증가하였으며 55°C의 경우 구형 형태의 입자가 제조되는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 온도가 증가함에 따라 초임계 이산화탄소의 밀도 감소로 상대적으로 용매의 비율이 증가하고 이산화탄소의 확산에 의한 유기 용매의 부피팽창성이 감소하게 되어 액적내 용질에 대한 과포화가 더 느리게 진행되기 때문이다. 또한, 온도증가로 인해 분자의 운동성이 증가하여 액적이 서로 충돌하여 합쳐지거나 깨지기 때문에 더 큰 입자를 형성하게 된다 [15].

동일 압력 조건에서 온도 증가에 따른 입자 크기 및 크기 분포의 입도분석 결과를 Fig. 3에 나타내었다. SEM 사진과 달리 입도 분석 결과 온도가 증가함에 따라 입자의 크기는 감소하는 결과를 보였다. 이는 낮은 온도 조건에서는 작은 단위 입자들이 서로 응집되어 큰 덩어리의 입자가 제조되기 때문에 큰 입자 크기를 가지며, 반면 온도가 증가함에 따라 단위 입자의 크기는 증가하지만 응집 정도가 감소하기 때문에 더 작은 크기의 입자 크기를 가지는 것으로 생각되어 진다.

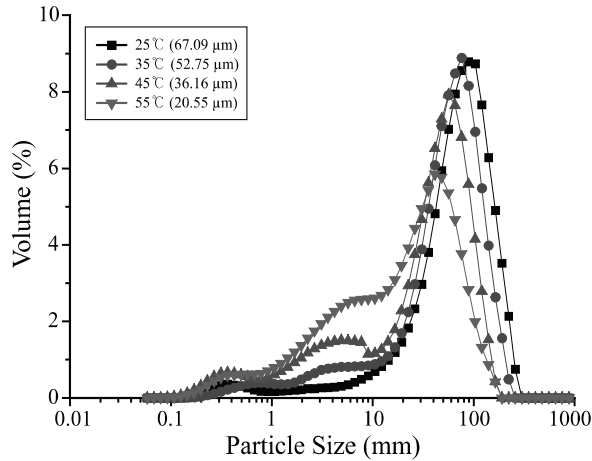


Fig. 3. Particle size distribution of various ASES-processed zein particles prepared at 13 MPa and different temperatures.

3.2. 압력의 영향

동일 온도 (35°C) 조건에서 압력 (8.5-18.0 MPa) 변화가 zein 입자 형태에 미치는 영향에 대해 실험을 수행하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4의 SEM 사진에 나타난 바와 같이 압력이 증가함에 따라 엉겨 붙어 있는 단위 입자 크기는 증가 후 감소하는 경향을 보여주고 있다. 이는 노즐을 통해 분사되는 액적의 크기는 계면 장력 (interfacial tension)과 초임계 이산화탄소의 밀도에 의해 영향을 받는다. 초임계 이산화탄소의 압력 증가에 따른 밀도 증가는 용매의 분산성을 향상시키기 때문에 노즐을 통해 분사되는 용액은 더 작은 액적이 형성된다. 그로 인해 압력 증가에 따라 더 작은 입자를 형성하게 된다. 반면, 압력이 증가함에 따라 유기 용매의 부피 팽창성은 증가하게 된다. 이산화탄소와 용매의 상호 물질전달 속도 증가로 액적내 용질은 빠르게 과포화되기 때문에 액적내에서 입자들이 개별적으로 침전되지 못하고 크고 덩어리진 입자들을 형성하게 된다 [14]. 그러므로 압력이 일정한 값 이상으로 증가할 경우 오히려 입자의 크기는 더 증가하는 경향을 보이게 된다. 온도와 압력의 영향에 대한 실험 결과 중 zein의 단위 입자의 크기가 가장 작아 약물이 봉입되었을 때 충분한 표면적을 제공할 수 있는 35°C의 온도와 13 MPa의 압력을 최적 조건으로 선정하여 이 조건에서 다른 공정 변수의 영향을 조사하였다.

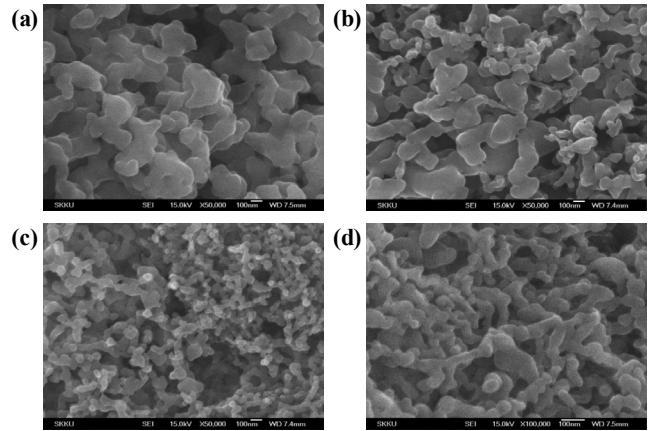


Fig. 4. SEM micrographs of various ASES-processed zein particles prepared at 35°C and different pressures: (a) 8.5 MPa, (b) 10 MPa, (c) 13 MPa, and (d) 18 MPa.

3.3. 용액 유량의 영향

용액이 노즐을 통해 초임계 이산화탄소 상으로 분무될 때 용액 유량이 입자 형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 35°C, 13 MPa의 온도와 압력 조건에서 용액 주입 속도를 0.5-2.0 mL/min 범위에서 변화하여 실험을 수행하였으며, 제조된 입자의 SEM 사진을 Fig. 5에 나타내었다. 용액 주입속도가 낮은 경우 상대적으로 더 구형에 가까운 형태의 입자들이 제조되었으며, 용액 주입 속도가 증가함에 따라 길고 늘려진 입자들이 제조되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 용액 주입 속도 증가에 따라 상대적으로 용매의 양이 증가하여 용질의 과포화속도 감소에 기인하는 것으로 생각되어 진다.

3.4. 농도의 영향

용액 중 zein의 농도 변화에 따른 입자 형성의 변화를 관찰하기 위해, 35°C, 13 MPa의 온도와 압력 조건에서 용액 유량을 0.5 mL/min으로 고정하고, zein의 농도를 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mg/mL로 변화시켜 실험을 수행하였으며, 제조된 zein 미립자의 SEM 사진을 Fig. 6에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 0.5 mg/mL의 낮은 농도에서 제조된 zein 입자의 경우 불규칙한 형태로 서로 뭉쳐있는 것을 확인할 수 있었으며, 농도가 증가함에 따라 길고 늘려진 형태의 단위입자들이 구형에 가까운 입자를 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 낮은 농도의 경우 용질에 비해 상대적으로

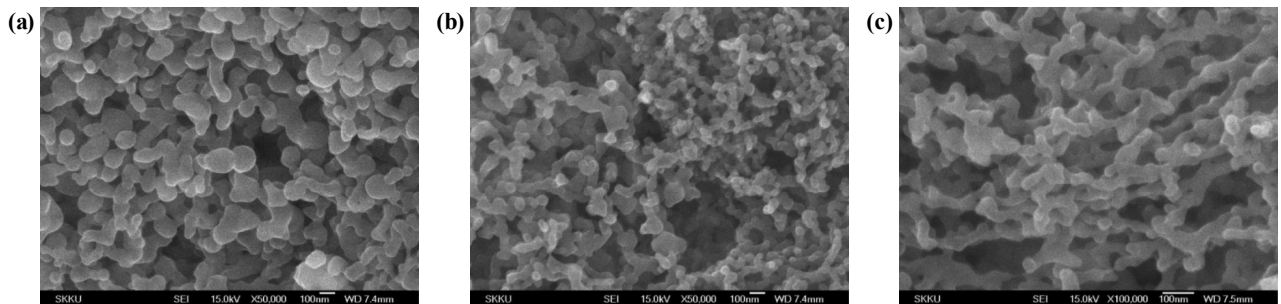


Fig. 5. Effect of solution flow rate on the size and morphology of ASES-processed zein particles prepared at 35°C and 13 MPa: (a) 0.5 mL/min, (b) 1.0 mL/min, and (c) 2.0 mL/min.

용매의 양이 많기 때문에 빠르게 과포화되어 입자를 형성하지 못하고 초임계 이산화탄소와 용매에 의해 가소화되기 때문에 불규칙한 형태의 뭉쳐진 입자를 형성하기 때문이다. 반면 용질의 농도가 증가함에 따라 용질이 더 빠르게 과포화되기 때문에 더 크고 서로 뭉쳐진 정도가 덜한 입자를 형성하게 된다.

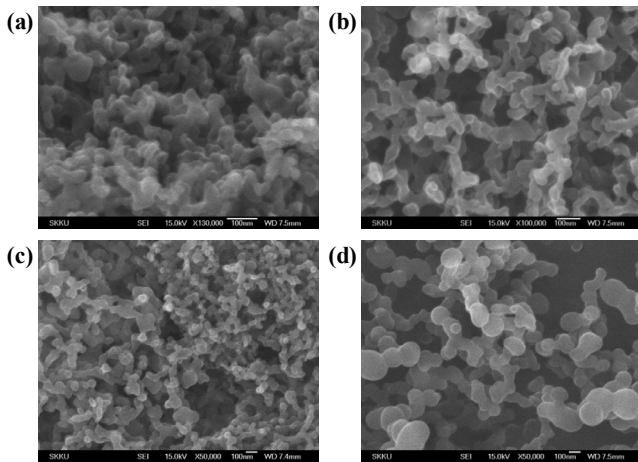


Fig. 6. Effect of solution concentration on the size and morphology of ASES-processed zein particles prepared at 35°C and 13 MPa: (a) 0.5%, (b) 1.0%, (c) 2.0%, and (d) 5.0%.

3.5. 물 첨가의 영향

초임계 ASES 공정을 이용한 zein 입자 제조시 물 첨가가 입자 제조에 미치는 영향을 알아보기 위해 DCM/DMSO와 MeOH/DMSO의 혼합용매에 5와 10% (v/v)의 물을 첨가하여 35°C, 13 MPa의 온도, 압력 조건에서 실험을 수행하였다. 10%의 물이 첨가된 경우 두 혼합용매 모두 입자들이 제조되지 않았으며, 이는 물이 이산화탄소와의 상호 친화력이 좋지 않고 또한 물의 양이 증가함에 따라 zein에 대한 용해도가 증가하기 때문에 물이 일정 함량 이상으로 첨가될 경우 이산화탄소내로 증발되지 않고 용질의 과포화가 빠르게 이루어지지 않기 때문이다. Fig. 7은 5%의 물이 첨가된 용매를 이용하여 제조된 입자의 SEM 사진을 보여주고 있으며, 그림에서 보는 바와 같이 물이 첨가된 경우 구형 입자가 제조되는 것을 확인할 수 있었다. Zhong 등 [12]의 선행연구에서도 용매에 물이 첨가된 경우 더 큰 구형의 입자들이 제조되는 결과를 나타내었다.

용매에 물이 첨가된 경우 더 크고 구형인 입자들이 제조되는 것은 물의 첨가에 의해 용매의 zein에 대한 용해도와 용액의 계면 장력이 증가하기 때문이다. 앞서 설명한 바와 같이 zein의 경우 물에는 용해되지 않으나 수용성 알코올에 용해되기 때문에 물의 첨가에 의해 용해도가 더 증가하게 된다. 즉, 초임계 이산화탄소와 친화력이 좋지 않은 물의 첨가에 의해 계면장력이 증가하여 크기가 큰 구형의 액적이 형성된다. 초임계 이산화탄소와의 친화력 감소로 액적내 용매의 팽창성이 감소하게 되고, 결과적으로 액적내 핵생성 비율이 감소하기 때문에 더 큰 입자들이 형성되는 것으로 판단된다.

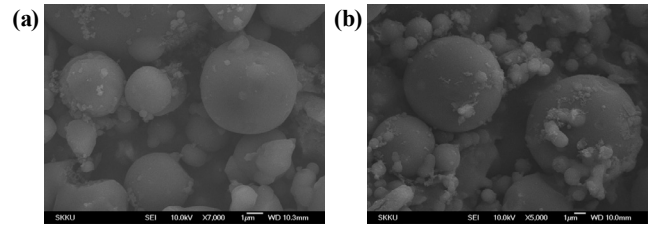


Fig. 7. Effect of solvent composition on the size and morphology of ASES-processed zein particles prepared at 35°C and 13 MPa: (a) DCM/DMSO/H₂O (9.5 : 9.5 : 1) and MeOH/DMSO/H₂O (9.5 : 9.5 : 1).

3.6. 약물 함유 미립자 특성

앞서 수행된 연구 결과 DCM/DMSO의 혼합용매를 이용한 경우 zein 입자들이 효과적으로 제조되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 약물의 방출 속도 제어를 위한 전달체로서 사용 가능성을 확인하기 위해 모델 약물로 leuprolide acetate를 함께 첨가하여 leuprolide acetate가 함유 zein 미립자의 제조에 대한 실험을 35°C, 13.0 MPa의 조건에서 수행하였다. 이때 leuprolide acetate는 zein 대비 10 wt%로 첨가하였다. Leuprolide acetate가 함유된 zein 미립자는 작은 단위 입자들이 서로 연결된 불규칙한 형태로 형성되었으며, 제조된 미립자내 포함된 약물의 방출 특성을 살펴본 결과 Fig. 8에서 보여주는 바와 같이 초기 30분 동안 약물 방출이 매우 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 zein과 함께 침전되는 leuprolide acetate가 zein 내부에 봉입되지 않고 밖에 주로 침전되기 때문이다. 봉입된 약물의 경우 초기 방출 후 약 33일까지 지속적으로 방출이 이루어졌으며 전체 약물 중 약 92%의 약물이 방출되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 zein 미립자를 약물의 방출 속도 제어를 위한 전달체로 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 초기 방출량이 높은 경우에는 입자를 제조한 후 건조과정 동안 MeOH이 혼합된 초임계 이산화탄소를 이용하여 적당한 시간동안 입자 내부에 봉입되지 않은 leuprolide acetate를 제거함으로써 초기 방출량을 조절할 수 있으며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

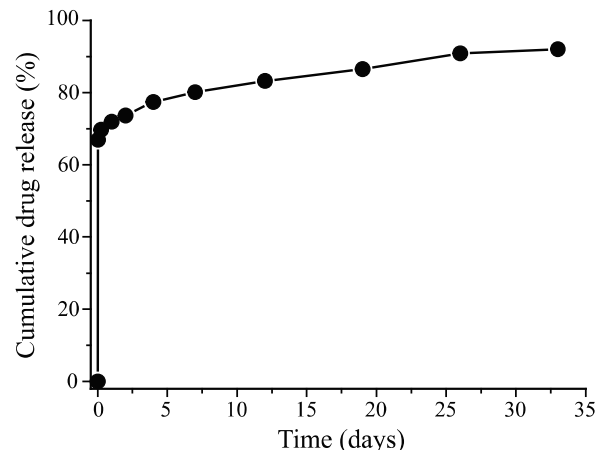


Fig. 8. *In vitro* drug release profile of zein particles loaded with leuprolide acetate.

4. 결론

본 연구에서는 초임계 ASES 공정을 이용하여 약물의 용해도와 안정성을 향상시키기 위해 사용되고 있는 zein의 입자 제조에 공정 변수가 미치는 영향과 약물 함유 zein 입자 제조를 통해 약물 전달체로서의 사용 가능성에 대해 고찰하였다. DCM/DMSO를 용매로 사용하여 입자를 제조한 경우 작은 단위입자들이 서로 연결되어 뭉쳐진 큰 입자가 형성되는 것을 확인할 수 있었으며, 온도 증가에 따라 제조된 입자의 형태가 구형에 가까워지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 물이 소량 포함된 용매를 이용하여 구형의 zein 미립자를 제조할 수 있었다. Zein 입자 제조 시 약물을 함께 침전시켜 약물의 방출 특성을 평가한 결과 다소 초기 방출이 높은 결과가 나타났으나, 일정 기간동안 약물이 지속적으로 방출되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 실험 결과 초임계 ASES 공정을 이용하여 zein 미립자를 효과적으로 제조할 수 있었으며, zein의 약물 전달체로서 가능성을 확인할 수 있었다.

References

1. Estey, T., J. KANG, S. P. Schwendeman, and J. F. Carpenter (2006) BSA degradation under acidic conditions: a model for protein instability during release from PLGA delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 95: 1626-1639.
2. Liu, X., Q. Sun, H. Wang, L. Zhang, and J.-Y. Wang (2005) Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. *Biomaterials* 26: 109-115.
3. Hurtado-López, P. and S. Murdan (2005) Formulation and characterisation of zein microspheres as delivery vehicles. *J. Drug Del. Sci. Tech.* 15: 267-272.
4. Lin, T., C. Lu, L. Zhu, and T. Lu (2011) The biodegradation of zein *in vitro* and *in vivo* and its application in implants. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 12: 172-176.
5. Shukla, R. and M. Cheryan (2001) Zein: the industrial protein from corn. *Ind. Crops Prod.* 13: 171-192.
6. Zhong, Q. and M. Jin (2009) Nanoscale structures of spray-dried zein microcapsules and *in vitro* release kinetics of the encapsulated lysozyme as affected by formulations. *J. Agric Food Chem.* 57: 3886-3894.
7. Yeo, Y., N. Baek, and K. Park (2001) Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6: 213-230.
8. Yeo, S. D. and E. Kiran (2005) Formation of polymer particles with supercritical fluids: a review. *J. Supercrit. Fluid* 34: 287-308.
9. Kompella, U. B. and K. Koushik (2001) Preparation of drug delivery systems using supercritical fluid technology. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 18: 173-199.
10. Martin, A. and M. J. Cocero (2008) Micronization processes with supercritical fluids: fundamentals and mechanisms. *Adv. Drug Del. Rev.* 60: 339-350.
11. Joo, H.-J., I.-I. Jung, G. Lim, and J.-H. Ryu (2011) Production of gemcitabine-loaded poly (L-lactic acid) microparticles using supercritical carbon dioxide: effect of process parameters. *KSBB J.* 26: 69-77.
12. Zhong, Q., M. Jin, D. Xiao, H. Tian, and W. Zhang (2008) Application of supercritical anti-solvent technologies for the synthesis of delivery systems of bioactive food components. *Food Biophys.* 3: 186-190.
13. Zhong, Q., M. Jin, P. M. Davidson, and S. Zivanovic (2009) Sustained release of lysozyme from zein microcapsules produced by a supercritical anti-solvent process. *Food Chem.* 115: 697-700.
14. Jacobson, G. B., R. Shinde, C. H. Contag, and R. N. Zare (2008) Sustained release of drugs dispersed in polymer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47: 7880-7882.
15. Chen, A.-Z., X.-M. Pu, and Y.-Q. Kang (2007) Study of poly (L-lactide) microparticles based on supercritical CO₂. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18: 2339-2345.