

발 송 일 자 : 2017. 07. 10

수 신 : 서울대학교산학협력단/ 서울대학교


참 조 : 김 용 노 교수님/ 문 세 훈 연구원님

제 목 : 특허출원 제2015-0046282호의 특허증 송부의 건

귀단/귀교의 무궁한 발전을 기원합니다.

| Your Ref.         | 출원번호<br>(출원일)                   | 등록번호<br>(등록일)              | 등록권리자      | 발명의 명칭                                    |
|-------------------|---------------------------------|----------------------------|------------|---|
| SNU-<br>2014-0999 | 10-2015-0046282<br>(2015.04.01) | 10-1756188<br>(2017.07.04) | 서울대학교산학협력단 | 단백질-형광물질 결합체를 포함하는 지방입자<br>형광확인 키트 및 그 방법 |

1. 귀단/귀교에서 위임하신 위의 출원 건에 대하여 특허증을 교부받아 이를 보내드립니다.
2. 귀단/귀교는 상기 특허의 권리자로서 존속기간동안 독점배타적인 권리를 가지게 됩니다.
3. 귀단/귀교는 상기 특허권에 대한 1~3년차분의 특허료를 납부하셨으며, 4년차분 이후의 연차등록은 특허청에서 따로 납부고지서(지로)가 발송되오니, 그에 따라 납부하시면 됩니다. 다만, 주소변동, 외유, 출장, 장기부재 등으로 납부고지서를 수신하지 못하면 권리가 소멸될 우려가 있사오니 변동사항이 있을 시 필히 당소로 연락주시기 바랍니다.

  
**특허법인 태동**  
 (담당변리사 : 오용주)

※첨부서류 : 1. 특허증 및 등록특허공보 및 등록원부 각 1 부.



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2017년07월10일  
 (11) 등록번호 10-1756188  
 (24) 등록일자 2017년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*G01N 33/92* (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)  
*G02B 21/00* (2006.01)  
 (52) CPC특허분류  
*G01N 33/92* (2013.01)  
*G01N 21/64* (2013.01)  
 (21) 출원번호 10-2015-0046282  
 (22) 출원일자 2015년04월01일  
 심사청구일자 2015년04월01일  
 (65) 공개번호 10-2016-0118038  
 (43) 공개일자 2016년10월11일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020130025709 A\*  
 JP4865268 B2\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 서울대학교 산학협력단  
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)  
 (72) 발명자  
 김용노  
 경기도 안양시 동안구 귀인로 157, 709동 402호  
 (호계동, 목련우성아파트)  
 문세훈  
 경기도 고양시 일산서구 후곡로 60, 303동 1206호  
 (일산동, 후곡마을3단지아파트)  
 (74) 대리인  
 특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 7 항

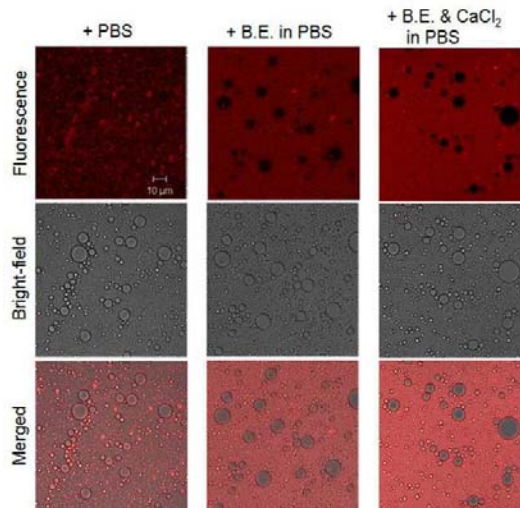
심사관 : 김도현

(54) 발명의 명칭 **단백질-형광물질 결합체를 포함하는 지방입자 형광확인 키트 및 그 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 지방 분해과정 중 지방입자 표면에서 일어나는 변화 즉 유화제의 재배열 과정이나 소화액과의 상호작용에 대한 변화를 가시화하여 보여줄 수 있는 키트 및 그 방법에 관한 것으로, 지방의 소화과정 중 지방입자의 표면에서 일어나는 변화를 '가시적'으로 명확히 관찰할 수 있어, 유화제인 계면활성제의 재배열 과정이나, '지방과 소화액'의 상호작용에 대한 변화를 시각적으로 정확히 확인할 수 있는 효과를 발휘한다.

**대표도 - 도2**



(52) CPC특허분류

*G02B 21/0024* (2013.01)

*G01N 2800/044* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A2A01014594

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 열가역적 전분젤을 이용한 고안정성 식품용 다중에멀전 개발

기여율 1/2

주관기관 서울대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A3014907

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 In vitro 모델에서 다양한 지방소화율을 나타내는 다중에멀전의 제조

기여율 1/2

주관기관 서울대학교

연구기간 2012.12.01 ~ 2015.04.30

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

유화능이 있는 단백질과 형광물질이 결합된 단백질-형광물질 결합체를 포함하되,

상기 유화능이 있는 단백질은 분리유청단백 (Whey protein isolate, WPI), 젤라틴 (Gelatin), 카제인 (Casein), 베타-락토글로불린 (beta-lactoglobulin), 달걀 단백질 및 콩 단백질 중 하나 이상이며,

상기 형광물질은 단백질의 아미노 그룹과 반응하여 공유결합을 형성할 수 있는 것을 특징으로 하는 지방입자 형광확인 키트.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 형광물질은,

RBITC(Rhodamine B isothiocyanate)인 것을 특징으로 하는 지방입자 형광확인 키트.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 키트는,

지질 또는 지방산, 담즙 추출물 또는 이를 함유하는 용액, CaCl<sub>2</sub> 또는 이를 함유하는 용액, 리파아제(lipase) 또는 이를 함유하는 용액, 수용성 용액 중 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 지방입자 형광확인 키트.

#### 청구항 5

'지질 또는 지방산', '수용성 용액', '유화능이 있는 단백질과 형광물질이 결합된 단백질-형광물질 결합체'를 혼합하여 수중 유적형 (O/W) 에멀전을 제조하는 단계 (a);

상기 에멀전 제조 후, 상기 형광물질로부터 발산하는 형광을 확인함으로써 상기 수중유적형 에멀전에 존재하는 지방입자를 관찰하는 단계 (b); 를 포함하되,

상기 유화능이 있는 단백질은 분리유청단백(Whey protein isolate, WPI), 젤라틴 (Gelatin), 카제인 (Casein), 베타-락토글로불린 (beta-lactoglobulin), 달걀 단백질 및 콩 단백질 중 하나 이상이며,

상기 형광물질은 단백질의 아미노 그룹과 반응하여 공유결합을 형성할 수 있는 것을 특징으로 하는 형광을 통한 지방입자의 시각적 관찰방법.

#### 청구항 6

삭제

**청구항 7**

제5항에 있어서,  
 상기 형광물질은,  
 RBITC(Rhodamine B isothiocyanate)인 것을 특징으로 하는 형광을 통한 지방입자의 시각적 관찰방법.

**청구항 8**

제5항에 있어서,  
 상기 단계 (a)의 에멀전 제조시,  
 담즙 추출물 또는 이를 함유하는 용액, CaCl<sub>2</sub> 또는 이를 함유하는 용액, 리파아제(lipase) 또는 이를 함유하는 용액 중 선택되는 어느 하나 이상을 추가로 첨가하여 사용하는 것을 특징으로 하는 지방입자의 시각적 관찰방법.

**청구항 9**

제5항에 있어서,  
 상기 단계 (b)의 형광 확인은,  
 공초점레이저주사현미경(Confocal laser scanning microscopy; CLSM)을 통해 확인하는 것을 특징으로 하는 지방입자의 시각적 관찰방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 단백질-형광물질 결합체를 포함하는 지방입자 형광확인 키트 및 그 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 지방 분해과정 중 지방입자 표면에서 일어나는 변화 즉 유화제의 재배열 과정이나 소화액과의 상호작용에 대한 변화를 가시화하여 보여줄 수 있는 키트 및 그 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 최근 비만 및 비만 관련 만성질환에 대한 우려가 높아감에 따라, 식사로 섭취하는 지방의 소화와 흡수에 영향을 주는 요인의 연구에 대해 관심이 증가하고 있다.

[0003] 지방은 섭취되는 형태와 무관하게, 일단 섭취되면 입, 위, 소장을 거치는 동안 인체 내에 존재하는 다양한 계면활성물질(surface-active components)들과 물리적 힘 (mechanical stress)에 의해 수중유적형 에멀전 상태로 구조가 변화한다.

[0004] 따라서, 지방 소화과정 중 소화관 내에서 지방분해효소(lipase)의 기질이 되는 것은, 다양한 식품으로부터 또는 인체 내에 존재하던 계면활성물질에 의해 코팅된 지방입자라고 할 수 있다. 그러므로, 지방소화 과정 중, 지방입자의 표면에서 일어나는 변화에 대해 이해하는 것이, 지방 소화를 조절하기 위한 선결적 필수조건이라 할 수 있을 것이다.

[0005] 지금까지 지방의 소화과정 중 지방입자의 표면에서 일어나는 변화를 관찰했던 연구들은, 주로 지방입자 표면의 전하를 측정한다든지 ( $\zeta$ -potential 측정), 계면장력(Interfacial tension)이나 계면레올로지(Interfacial rheology), 다양한 현미경(Atomic force microscopy 등)에 의한 관찰방법이 일반적이었다.

[0006] 하지만, 상기 방법들은 지방입자 표면에 계면활성물질(유화제)이 어떻게 배열되어 있는지 또는 지방이 소화과정

중 어떠한 형태로 변화가 이뤄지는지에 대해 직접적으로 설명하지 못하며, 간접적으로 그 변화를 유추해야 한다는 한계점을 갖고 있었다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록번호 제10-1334793호 (등록일자 2013년 11월 25일)에는, 지방방울(lipid droplet) 선택적 염색용 형광 화합물 및 이를 포함하는 지방방울 스크리닝 장치, 이를 이용한 지방방울 스크리닝 방법 및 지방 대사 관련 질병 치료 또는 예방용 약물의 검색방법이 기재되어 있다.

#### 비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) "A Simple and Rapid Protocol for Measuring Neutral Lipids in Algal Cells Using Fluorescence" 2014 May 30;(87). doi: 10.3791/51441"에는, 나일 레드 염색 절차를 사용하여 조류 세포 (alga cell)의 중성 지질 함량을 결정하기 위한 간단한 프로토콜이 기재되어 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 지방 소화과정 중 지방입자 표면에서 일어나는 변화 즉 계면활성물질(유화제)의 재배열 과정이나 소화액과의 상호작용에 대한 변화를 가시화할 수 있는 방법의 확립을 목표로 하였으며, 그 방법 중의 하나로 형광물질(형광다이; fluorescent dye)를 사용하여 형광이미징을 얻는 방법에 대해 개발하고자 하였다.

#### 과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 유화능이 있는 단백질과 형광물질이 결합된 단백질-형광물질 결합체를 포함하는 지방입자 형광확인 키트를 제공한다. 또한, 본 발명은 '지질 또는 지방산', '수용성 용액', '유화능이 있는 단백질과 형광물질이 결합된 단백질-형광물질 결합체'를 혼합하여 수중 유적형 (O/W) 에멀전을 제조하는 단계 (a); 상기 에멀전 제조 후, 상기 형광물질로부터 발산하는 형광을 확인함으로써 상기 수중 유적형 에멀전에 존재하는 지방입자를 관찰하는 단계 (b); 를 포함하는 것을 특징으로 하는 형광을 통한 지방입자의 시각적 관찰방법을 제공한다.

- [0011] 본 발명에서와 같이 유화능이 있는 단백질과 형광물질이 결합된 단백질-형광물질 결합체를 유화제로 이용할 경우, 에멀전 내 존재하는 지방입자를 형광물질을 통해 시각적으로 명확하게 확인할 수 있다. 즉, 새롭게 개발된 지질 소재의 소화(분해) 패턴이나, 새롭게 발군된 지방분해효소의 가수분해능을 확인하기 위해서 종래에는 효소 역가 측정이나, 수율 측정 등 정량적 방법에 의존할 수밖에 없었는데, 본 발명에 의할 경우, 이를 '시각적'으로 명확히 확인할 수 있는 것이다.

- [0012] 본 발명에서는 유화능이 있는 단백질과 형광물질이 결합된 단백질-형광물질 결합체를 사용하는데, 단백질과 형광물질의 결합은 다양한 방법에 의해 형성될 수 있고, 일 예로 컨쥬게이션(conjugation)을 통해 결합될 수 있다.

- [0013] 본 발명의 '유화능이 있는 단백질'은 식품공전에 유화제로 사용할 수 있는 것으로 언급된 단백질은 어느 것이든 사용할 수 있다. 일 예로는 젤라틴 (Gelatin), 카제인(Casein), 유유 단백질 {분리유청단백(whey protein isolate), 베타-락토글로불린(beta-lactoglobulin) 등}, 달걀 단백질, 콩 단백질 등이 있다. 더욱 바람직하게는 분리유청단백을 사용할 수 있다.

- [0014] 또한, 본 발명의 형광물질은 단백질의 아미노 그룹 (amino group)과 반응하여 공유결합을 형성할 수 있는 형광 염료는 모두 사용 가능하다. 일 예로, PCT/US2007/007289호의 17페이지 17번째 줄부터 19페이지 27번째 줄에 나열된 형광염료들을 사용할 수 있다. 더욱 바람직하게는 RBITC(Rhodamine B isothiocyanate)을 사용할 수 있다.

- [0015] 한편, 본 발명의 지방입자 형광확인 키트는, 지질 또는 지방산, 담즙 추출물 또는 이를 함유하는 용액,  $\text{CaCl}_2$  또는 이를 함유하는 용액, 리파아제(lipase) 또는 이를 함유하는 용액, 수용성 용액 중 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있고, 본 발명의 형광을 통한 지방입자의 시각적 관찰방법 중 단계 (a)의 에멀전에는, 담즙 추출물 또는 이를 함유하는 용액,  $\text{CaCl}_2$  또는 이를 함유하는 용액, 리파아제(lipase) 또는 이를 함유하는 용액 중 선택되는 어느 하나 이상이 추가될 수 있다.
- [0016] 리파아제(lipase) 또는 이를 함유하는 용액이 본 발명에 첨가되어 사용될 경우, 지방구의 분해에 따른 지방입자의 패턴 변화를 관찰할 수 있다. 즉, 새롭게 발굴한 리파아제를 사용할 경우, 지방구 분해 패턴 및 회합 정도를 확인함으로써, 새롭게 발굴한 리파아제의 역가 등을 수치가 아닌, '시각적'으로 명확히 확인할 수 있는 것이다.
- [0017] 본 발명에서 담즙 추출물 또는 이를 함유하는 용액을 사용할 경우, 에멀전 중 '수용액 상'의 형광신호를 뚜렷이 얻을 수 있고,  $\text{CaCl}_2$  또는 이를 함유하는 용액을 사용할 경우, '수용액 상'의 형광신호를 더욱 뚜렷이 얻을 수 있다 (도 2 참조 요망).
- [0018] 한편, 본 발명의 지방입자의 시각적 관찰방법에 있어서, 단계 (b)의 형광 확인은, 일 예로 공초점레이저주사현미경(Confocal laser scanning microscopy; CLSM)을 통해 확인할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0019] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 형광이미징 방법은, 지방의 소화과정 중 지방입자의 표면에서 일어나는 변화를 '가시적'으로 명확히 관찰할 수 있어, 유화제인 계면활성제의 재배열 과정이나, '지방과 소화액'의 상호작용에 대한 변화를 시각적으로 정확히 확인할 수 있는 효과를 발휘한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1에서 (A)는 UV/Vis로 측정된 WPI 및 RBITC의 흡수스펙트럼을 나타낸다. 도 1에서 (B)는 UV/Vis로 측정된 WPI-RBITC 컨쥬게이트(0.72 mg 컨쥬게이트 / mL 물)의 흡수스펙트럼을 나타낸다. 도 1에서 (C)는 WPI-RBITC 컨쥬게이트 (여기: 500 nm, 0.72 mg 컨쥬게이트 / mL 물)의 형광방출스펙트럼을 나타낸다.
- 도 2는 공초점레이저주사현미경으로 관찰한 WPI-RBITC로 안정화된 에멀전의 이미지이다.
- 도 3은 공초점레이저주사현미경으로 관찰한 리파아제의 처리시간 경과에 따른, WPI-RBITC 안정화 에멀전의 이미지이다.
- 도 4는 본 발명의 에멀전 용액을 리파아제(lipase)로 24시간 동안 처리한 후 사진이다.
- 도 5는 리파아제로 처리된 RBITC, WPI-RBITC 컨쥬게이트를 함유하는 물 또는 핵산 혼합물의 사진이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명의 내용에 대해 하기 실시예 또는 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하기로 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

#### [0022] <실시예 1: WPI-RBITC 컨쥬게이트의 합성 및 특성 분석>

- [0023] DMSO(dimethyl sulfoxide)와 물 혼합액(1:4 v/v)에 RBITC(Rhodamine B isothiocyanate)를 98.8 mg/ml 농도로 용해시켰으며, WPI(whey protein isolate) 2g은 100 mL 소듐 바이카르보네이트 (sodium bicarbonate) 완충용액 (0.1 M, pH 9.0)에 분산시켰다.

- [0024] RBITC 용액 (210  $\mu\text{L}$ )을 WPI 용액에 교반하면서 천천히 첨가한 후 1시간 동안 실온에서 교반하면서 반응을 진행시켰다. 반응 후, 남아있는 RBITC와 부산물을 증류수에서 7일간 투석하여 제거하였고, 합성된 컨쥬게이트(conjugate)는 동결 건조하였다.



- [0025] WPI, RBITC, 상기에서 제조된 WPI-RBITC의 UV/Visible 스펙트라(spectra)를 UV/Vis 스펙트로미터 (DU730, Beckman Coulter, Brea, CA)를 이용하여 측정하였다.
- [0026] 측정된 유청단백(Whey protein isolate, WPI), 로다민 B 아이소싸이오사이아네이트(Rhodamine B isothiocyanate, RBITC), WPI-RBITC의 흡수 스펙트라 (absorption spectra)를 도 1에 나타내었다.
- [0027] 도 1에서 (A)는 UV/Vis로 측정된 WPI, RBITC의 흡수스펙트럼을 나타낸다. 도 1에서 (B)는 UV/Vis로 측정된 WPI-RBITC 컨쥬게이트(0.72 mg 컨쥬게이트 / mL 물)의 흡수스펙트럼을 나타낸다. UV/Vis로 측정된 WPI-RBITC의 스펙트럼에서 275nm 와 560nm에서 관찰되는 흡광피크는 각각 WPI와 로다민(Rhodamine)에서 초래되는 것으로, 이 결과는 WPI가 다이(dye)인 로다민과 잘 컨쥬게이션(conjugation) 되었음을 나타내는 결과이다. UV/Vis로 측정된 WPI-RBITC의 스펙트럼 흡광 피크에 기초하여 계산한 결과, 1g의 WPI-RBITC 컨쥬게이트(conjugate)에 1.12mg의 RBITC가 포함되었고, 이는 WPI 분자당 0.4 RBITC 분자 비율과 일치하는데, 545nm에서 RBITC의 몰랄 소광계수 (molar extinction coefficient)는  $106,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 인 것으로 알려져 있다.
- [0028] 도 1에서 (C)는 WPI-RBITC 컨쥬게이트 (여기: 500 nm, 0.72 mg 컨쥬게이트 / mL 물)의 형광방출스펙트럼을 나타낸다. 도 1의 (C)에서 보는 바와 같이, WPI-RBITC의 형광방출스펙트럼(fluorescence emission spectrum)은 RBITC의 형광방출스펙트럼(fluorescence emission spectrum)과 같았다.
- [0029] 한편, 컨쥬게이트의 순도를 분석하기 위하여 TLC(Thin layer chromatography)를 실시하였다. TLC 분석의 용리제 (eluent)로써, 에틸 아세테이트/메탄올 (Ethyl acetate/methanol) 조용매(cosolvent) (1:1 v/v)가 사용되었다. WPI-RBITC 컨쥬게이트를 TLC로 분석한 결과, 하나의 형광스팟(fluorescent spot)이 관찰되었으며, 7일 동안의 투석(dialysis) 동안 컨쥬게이션 되지 않은 RBITC가 완전히 제거되었음을 확인할 수 있었다.
- [0030] <실시예 2: 수중유적형 에멀전 제조 및 체외 소화 동안 WPI 위치의 형광 이미징(Fluorescence imaging of WPI location during *In vitro* Digestion)>
- [0031] WPI-RBITC를 유화제로 사용하여, 수중유적형(O/W) 에멀전(emulsion)을 제조하고, 공초점레이저주사현미경(CLSM)을 이용하여 형태를 확인한 후, 체외 소화 동안 WPI-RBITC의 위치를 알아보려고 하였다. 이때, 공초점레이저 주사현미경(Confocal laser scanning microscopy; CSLM)으로, "ZEISS LSM 510 META" 모델을 이용하여, 형광 이미지 (fluorescence images;  $\lambda_{ex} = 545 \text{ nm}, \lambda_{em} = 550 \text{ to } 647 \text{ nm}$ )를 얻었다.
- [0032] 수중유적형 에멀전 (oil-in water emulsion)의 제조를 위해 하기와 같은 과정을 수행하였다. 먼저, 건조한 WPI-RBITC를 인산완충액(phosphate buffer, 0.5mM, pH 7.0)에 분산시켜 WPI-RBITC 용액 (0.8 wt%)을 제조한 후, WPI-RBITC 용액과 콩기름 (soybean oil)를 혼합한 다음, 고속 블렌더 (high-speed blender)로 1분간 교반한 후, 소니케이터 (sonicator; VCX 750; Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT)를 이용하여 수중유적형 에멀전을 제조하였다. 소니케이션 조건은 'Frequency : 20 kHz, Amplitude : 40%, Duty cycle : 0.5s'이었다. 이때, 지방 소화과정 중 지방입자의 계면에서 일어나는 변화를 가시화하기 위하여, 에멀전 제조시 계면활성제로, 실시예 1에서 제조한 WPI-RBITC를 사용한 것이다.
- [0033] 한편, WPI-RBITC로 안정화된 에멀전을 소장을 모방한 시험관 내 소화 (*in vitro* digestion) 모델을 이용하여 소화시켰다. 이때, 하기와 같은 4가지 시료를 준비하고 실험에 사용하였다.
- [0034] 1) 에멀전 1ml와 인산완충용액(PBS) 3ml를 혼합하여 준비한 시료 (최종농도 : 지방 100 mg).
- [0035] 2) 에멀전 1ml, 인산완충용액(PBS) 2ml와 담즙 추출물 용액 (20 mg/ml) 1ml를 혼합하여 준비한 시료 (최종농도 : 지방 100 mg, 5mg/ml bile extract).
- [0036] 3) 에멀전 1ml, 인산완충용액(PBS) 1ml, 담즙 추출물 용액 (20 mg/ml) 1ml와  $\text{CaCl}_2$  용액 (20mM/mL) 1ml을 혼합하여 준비한 시료 (최종농도 : 지방 100 mg, 5mg/ml 담즙 추출물, 5mM/mL  $\text{CaCl}_2$ ).
- [0037] 4) 에멀전 1ml, 담즙 추출물 용액 (20 mg/ml) 1ml,  $\text{CaCl}_2$  용액 (20mM/mL) 1 ml, 리파아제 용액 (10mg/ml) 1 ml을 혼합하여 준비한 시료 (최종농도 : 지방 100 mg, 5mg/ml 담즙 추출물, 1.6 mg/mL 리파아제, 5mM/mL  $\text{CaCl}_2$ ).
- [0038] 실험 결과는 도 2와 같이 나타났다. 도 2는 공초점레이저주사현미경으로 관찰한 WPI-RBITC로 안정화된 에멀전의 이미지이다. 도 2에서 'PBS'는 포스페이트 버퍼 용액을 의미하는데, 결국 담즙 추출물 (bile extract) 및  $\text{CaCl}_2$



가 없는 에멀전을 의미하고, 'B.E.inPBS'은 담즙 추출물을 함유하는 에멀전을 의미하며, 'B.E.&CaCl<sub>2</sub>'는 담즙 추출물 (bile extract) 및 CaCl<sub>2</sub>가 모두 있는 에멀전을 의미한다. 완충용액으로 희석하여 브라이트-필드 이미징(bright-field imaging)을 분석한 결과, 에멀전이 구형의 오일입자로 구성되어 있음을 확인할 수 있었고, 공초점레이저주사현미경으로 관찰했을 때, 오일입자표면 주위로 빨간 라인이 둘러 있었다.

[0039] 이와 같은 결과는 상대적으로 높은 농도의 WPI-RBITC가 오일과 물의 계면 (oil-water interface)에 흡착되었음을 나타내는 것이며, 수용액 상에서도 약간의 붉은 색이 관찰되는 것으로 보아 약간의 WPI-RBITC가 수용액에도 존재하는 것으로 판단되었다. 하지만, 오일입자 내부에서는 빨간 색이 나타나지 않아, 적어도 수용성의 WPI-RBITC가 소수성의 입자 내부로 침투하지는 못했음을 알 수 있었다.

[0040] 한편, 담즙 추출물 (Bile extract)이 WPI-RBITC로 안정화된 에멀전에 첨가되었을 때는 담즙 추출물이 첨가되지 않았을 때와 비교하여 '수용액 상'의 형광신호가 더 강해짐을 관찰할 수 있었다. 지금까지 보고된 연구들에 의하면 담즙산염은 오일입자 표면에 존재하는 단백질 대신 표면에 흡착하여 단백질을 대체할 수 있는 성질이 있고, 원자력현미경(atomic force microscopy)로 분석했을 때, 오일입자 표면을 둘러싸고 있는 단백질 필름이 담즙산염에 의해 대체되었다고 보고된 바가 있다.

[0041] 따라서, 본 실험에서 담즙 추출물이 첨가되었을 때, '수용액 상'에서 형광신호가 강해지는 것은, 담즙 추출물이 오일입자에 흡착되어 있는 WPI-RBITC를 표면에서 분리하고 대신 흡착했기 때문이라고 생각된다. 하지만, 상대적으로 강한 형광이 여전히 오일입자 표면에서 관찰되는 것으로 보아, WPI-RBITC가 여전히 오일입자 표면에 남아 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0042] 한편, 리파아제가 담즙 추출물, CaCl<sub>2</sub>와 함께 첨가되었을 때, 오일입자가 커지고 회합(coalescence)이 일어남을 확인하였다. 이와 관련된 연구들의 보고에 의하면, 리파아제에 의해 유도되는 회합(coalescence)은 리파아제의 오일 분해에 의해 생성되는 유리지방산 (free fatty acid, FFA)과 모노아실글리세롤 (monoacylglycerol, MAG)이 지방입자 표면에 결합하여 발생한 것이라고 하였다.

[0043] 여기서 주목할 것은 리파아제에 의한 지방분해 후, WPI-RBITC의 위치와 재배열에 관한 것으로, 도 3에서 보는 것과 같이 오일입자 내부가 붉게 변함을 알 수 있었다. 이는 리파아제에 의한 지방분해 후, 오일 표면과 수용액 상에 존재하던 WPI-RBITC가 지방 내부로 유입되었음을 의미하는 것이다. 도 3은 리파아제 처리시간의 경과에 따른 WPI-RBITC 안정화 에멀전의 공초점레이저주사현미경 이미지이다.

[0044] 또한, WPI-RBITC가 지방구 내부로 유입되는 것 외에, 지방구가 회합을 통해 점점 커지는 것을 확인할 수 있었는데 (도 3), 지방구가 커짐에 따라 용액의 층분리가 생겨, 지방구가 용액의 표면에 위치하는 것도 확인할 수 있었다. 도 4는 이와 같은 결과를 보여주는데, 층분리가 일어나 'WPI-RBITC가 내포된 지방구'가 위치한 용액의 표면이 아주 붉게 보이고, 그 밑의 용액은 맑게 보이는 것을 확인할 수 있다. 도 4는 에멀전 용액을 리파아제로 24시간 동안 처리한 후 사진이다.

[0045] 한편, 위와 같은 현상이 일어난 이유를 알아보기 위하여, 하기의 실험을 추가적으로 실시하였다. 증류수에 RBITC를 18 μM 농도로 녹인 후, 이를 핵산과 혼합하여 3시간 동안 교반하였고, WPI-RBITC를 담즙 추출물, CaCl<sub>2</sub>, 리파아제와 섞고 4시간 동안 교반하였다.

[0046] 실험 결과, 도 5에서 보는 바와 같이 RBITC와 WPI-RBITC 컨주게이트는 각각 물 층에 머물렀으며, 핵산층으로 이동하지 않았다. 이들 통해 WPI-RBITC 컨주게이트가 핵산과 같은 소수성 용매에 섞일 수 없음을 확인할 수 있었다. 도 5는 리파아제로 처리된 RBITC, WPI-RBITC 컨주게이트를 함유하는 물, 핵산 혼합물의 사진이다.

[0047] 상기와 같은 결과는, 리파아제에 의해 오일이 분해되는 과정 중 생성되는 유리지방산이, WPI-RBITC가 오일 내부로 유입되는 것의 한가지 이유가 될 수 있는 것에 대한 방증일 수 있다.

[0048] 한편, 함께 첨가된 CaCl<sub>2</sub>의 칼슘이온은 장쇄유리지방산 (free long-chain-fatty acids, FFA) 함께 침전함으로써 지방분해를 촉진시키는 것으로 알려졌는데, 칼슘(Ca<sup>2+</sup>) 이온은 두 개의 결합 부위를 가져, 음이온 카르복시산 (anionic carboxylic acids)과 결합할 수 있다. 따라서, CaCl<sub>2</sub>이 장쇄유리지방산(FFA)과 WPI의 가교결합을 형성시켜 소수성의 WPI-RBITC가 오일 내부로 유입되었을 것으로 추론할 수도 있었다.

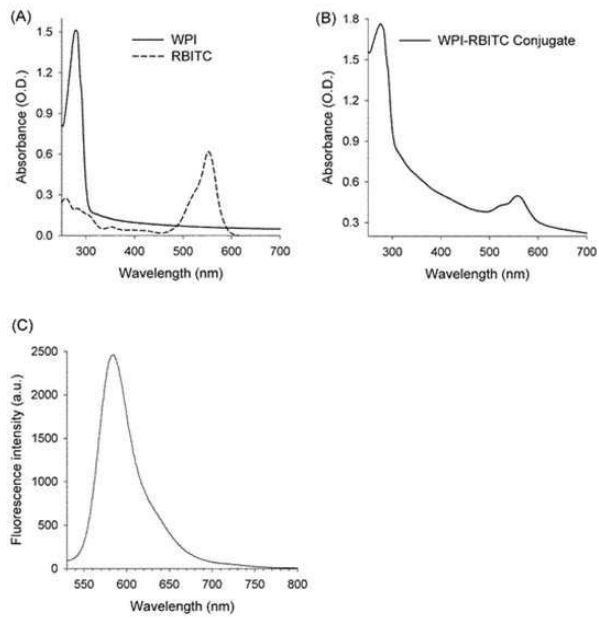
**산업상 이용가능성**

[0049]

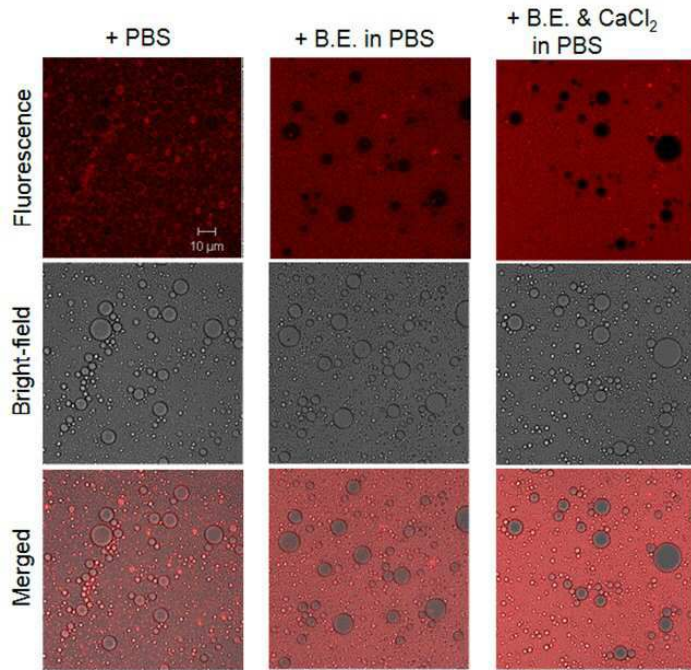
본 발명은 지방소화 또는 지방대사 관련 치료제를 개발하는 제약산업과 지방대사 관련 예방 및 개선용의 건강기능식품을 개발하는 식품산업에 응용이 가능하다. 특히, 새로운 소재의 지질이 개발되었을 경우, 효소에 의한 소재의 분해 패턴을 시각적으로 관찰하거나, 새로운 지방분해 소화효소가 개발된 경우, 이의 작용 여부를 시각적으로 관찰하고자 할 때 유용하게 활용될 수 있다.

**도면**

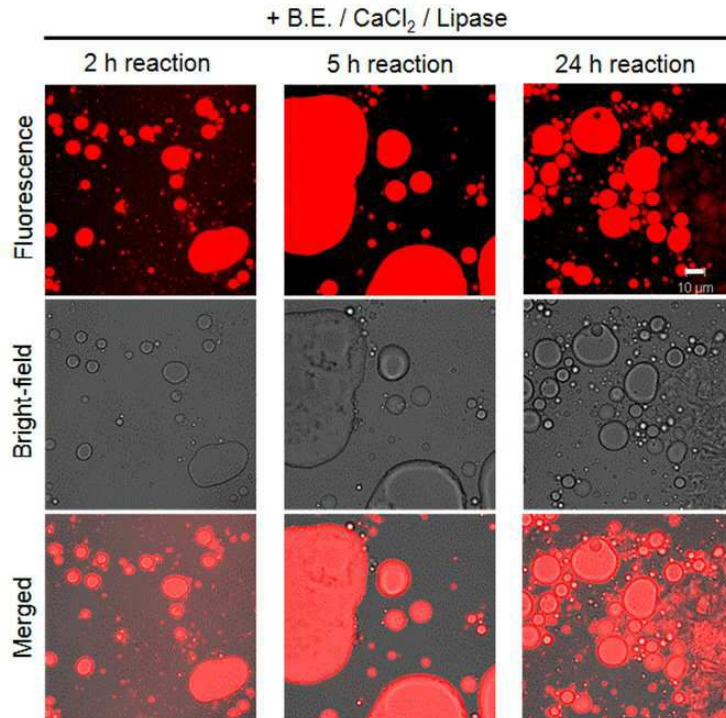
**도면1**



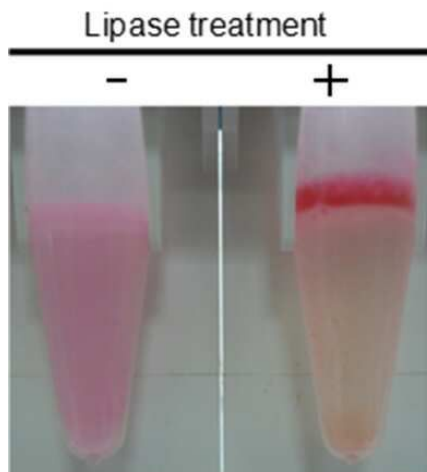
도면2



도면3



도면4



도면5

