

유청단백질 나노전달체의 기능적 특성

Functional Properties of Whey Protein-based Nano Delivery Systems

하호경 (Ho-Kyung Ha)

순천대학교 동물자원과학과

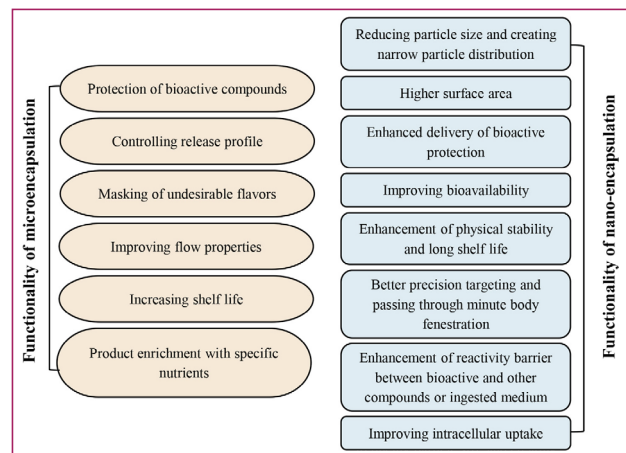
Department of Animal Science and Technology, Suncheon National University

I. 서론

1950년대 처음으로 제시된 나노 기술(nano technology)은 물질의 특성을 10억 분의 1 m인 나노미터 (nm) 수준에서 밝히고 제어하는 기술로 국가의 전폭적인 지원과 함께 약학, 공학 등 이공계 분야에서 비약적인 발전을 해왔다. 특히 약학 분야에서는 약물의 효과적 전달을 위한 수단으로써 다양한 합성 및 천연 고분자 활용 나노 전달체(nano delivery system)에 관한 연구가 광범위하게 수행되고 있다. 식품 분야에서도 나노 전달체의 기능적 특성(예, 생리활성물질의 용해도, 안정성, 흡수율을 향상 등)을 활용하여 식품 적용성증진 연구가 활발하게 진행되고 있다.

나노 전달체란 약 1-200 nm 크기를 지니는 운반체(carrier)로써 생리활성물질의 포집(entrapment)을 통해 외부 환경 요인(예, 위장관 내 낮은 pH, 식품 공정 중의 빛, 산소, 온도 등)으로부터 보호할 수 있다(Ron 등, 2010; Fathi 등, 2012). 그림 1은 나노 전달체의 대표적인 특성을 나타낸다. 나노 전달체는 기존의 미세 전달체(>1 μm)에 비해 입자크기가 작아 표면적이 넓기 때문에 위장관 내에서 머무르는 시간이 길고 소장 상피세포와 상호작용이 향상된다. 이를 통해 나노 전달체는 포집된 생리활성물질의 장 점막 부착능 및 생체이용률(bioavailability)을 증가시킬 수 있는 효과적인 수단으로 여겨지고 있다 (Acos-

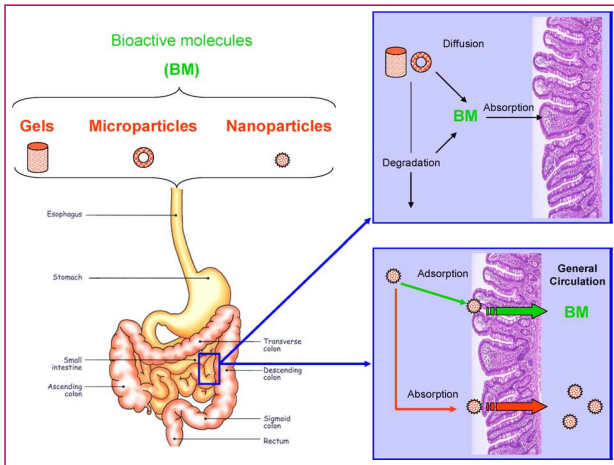
그림 1. 미세 및 나노 전달체의 기능적 특성



(Shishir 등, 2018)

*Corresponding author: Ho-Kyung Ha
 Department of Animal Science and Technology,
 Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea
 Tel: +82-61-750-3233
 Fax: +82-61-750-3230
 Email: hkha@scnu.ac.kr

그림 2. 전달시스템 내 포집된 생리활성물질의 소장 내 흡수



(Chen 등, 2006)

ta, 2009; Shishir 등, 2018) (그림 2).

현재까지 약물 전달을 위해 합성 고분자를 활용하여 다양한 기능을 지닌 나노 전달체가 성공적으로 제조되었으나, 식품 적용을 위해서는 안전성 확보가 가장 중요하다. 따라서, 나노 전달체 제조를 위해 합성 고분자가 아닌 generally recognized as safe(GRAS)한 원료(예, 식품유래 단백질 및 다당류)에 관한 관심이 증가되고 있다(Chen 등, 2006).

다양한 식품 원료 중 치즈 제조 부산물인 유청(whey)으로부터 얻어지는 유청단백질은 GRAS하고, 생체적합성(biocompatibility) 및 생체분해성(biodegradable)을 지닐 뿐만 아니라, 높은 영양학적 가치와 다양한 기능적 특성을 지니고 있어 나노 전달체 제조 원료로서 큰 장점을 지닌다. 본 원고에서는 나노 전달체로서 유청단백질의 기능적 특성에 대해 논하고자 한다.

II. 본론

1. 유청단백질

젖소유 내에는 약 30-35 g/L의 단백질이 함유되어 있으며, 유단백질은 케이스인(casein)과 유청단백질(whey protein)이 각각 약 80%와 20%로 이루어져 있

표 1. 유청단백질의 물리화학적 특성

유청단백질	우유 내 함량(g/L)	분자량(kDa)
베타락토글로불린 (β -lactoglobulin)	2-4	18.3
알파락트알부민(α -lactalbumin)	1-1.5	14.2
소혈청 알부민 (bovine serum albumin)	0.1-0.4	66
면역글로불린(immunoglobulins)	0.6-1.0	146-1,030
락토페린(lactoferrin)	~ 0.1	80

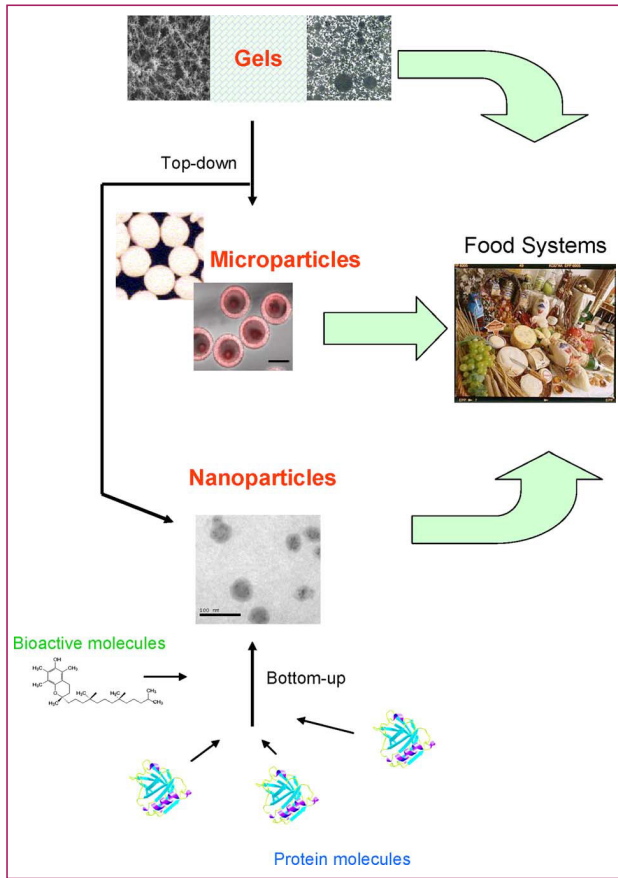
(Livney, 2010; Tavares 등, 2014)

다(Fox와 McSweeney, 2003; Kimpel과 Schmitt, 2015). 이 중 치즈 제조 시 부산물인 유청으로부터 얻어지는 유청단백질은 높은 영양학적 가치와 기능적인 특성으로 인해 가치 높은 원료로 활용될 수 있다. 유청단백질은 구형의 단백질인 알파락트알부민, 베타락토글로불린, 소혈청 알부민, 면역글로불린, 락토페린으로 구성되어 있다(표 1). 유청단백질의 약 50%를 차지하는 베타락토글로불린은 구형의 단백질로, 162개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 단량체로서의 분자량은 약 18.3 kDa을 지니고, 하나의 유리 sulfhydryl기와 두 개의 이산화황 결합(disulfide bond)을 지닌다(Gnunasekaran 등, 2006). 대표적으로 판매되고 있는 유청단백질 제품으로는 유청을 한외여과(ultrafiltration)시켜 단백질 함량이 50%-70%인 농축 유청단백질(whey protein concentrate, WPC)과 이를 다시 diafiltration이나 이온교환(ion exchange)과 같은 추가 공정을 통해 단백질 함량을 90% 이상 농축시킨 분리 유청단백질(whey protein isolate, WPI)이 있다(Bryant와 McClements, 1998).

2. 유청단백질 나노 전달체

단백질을 이용한 일반적인 전달체의 제조 방법은 크게 Top-down 방식과 Bottom-up 방식이 있다(그림 3). Top-down 방식은 주로 기계적인 수단을 활용하여 큰 구조(예, 겔)를 breaking-up하여 나노 크기로 만드

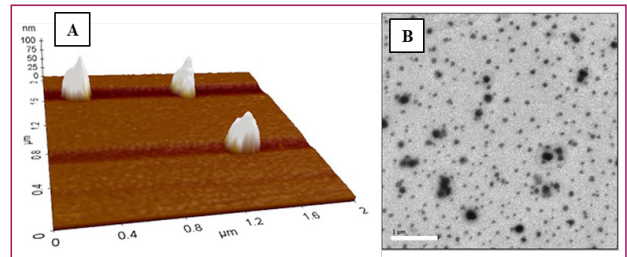
그림 3. 생리활성물질 함유 식품 단백질 전달체 제조 방법



(Chen 등, 2006)

는 방법을 의미하는 반면, bottom-up 방식은 주로 화학적인 반응을 통해 단백질들의 자기 조립(self-assembly)을 유도하여 미세 및 나노 크기로 build-up하는 방식을 말한다(Chen 등, 2006). 특히 유청단백질 나노 전달체 제조를 위한 자기 조립은 pH 및 온도 조절, 가교제(cross-linking agent) 첨가 등 비교적 간단한 방법을 통한 화학 반응만으로 유도할 수 있는 장점을 지닌다. 유청단백질은 자기 조립을 통해 나노입자, 나노에멀전 등과 같은 형태의 나노 전달체 제조에 활용될 수 있다. 유청단백질을 사용하여 제조한 나노 전달체 예는 그림 4에 나타내었다. 유청단백질 나노전달체는 원자현미경(그림 4A, 유청단백질 나노입자)과 투과전자현미경(그림 4B, 유청단백질 나노에멀전)를 이용하여 관찰하였으며, 약 100-200 nm 크기의 구형의 형태

그림 4. 유청단백질 나노 전달체의 형태학적 특성



(A) 베타락토글로불린 나노입자의 원자현미경 사진(Ha 등, 2017)
(B) 베타락토글로불린/알긴산 나노에멀전의 투과전자현미경 사진(Lee 등, 2013). Scale bar=1 μ m

로 제조되었다(Lee 등, 2013; Ha 등, 2017).

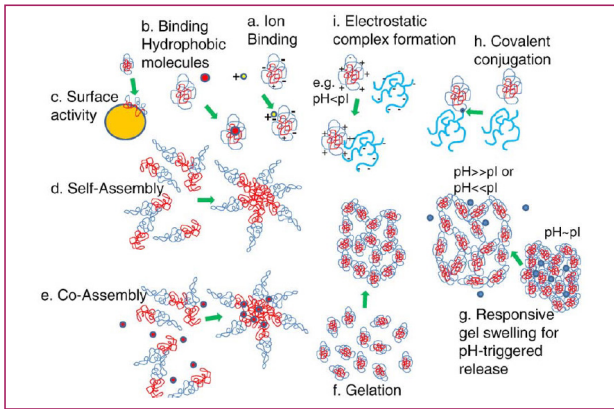
3. 나노 전달체로서 유청단백질의 기능적 특성

그림 5에서 나타내는 바와 같이 유단백질은 나노 전달체 제조에 활용되는 원료로, 다양한 기능적 특성을 지니고 있다. 본 기고문에서는 나노 전달체로서 활용 시 큰 장점이 될 수 있는 유청단백질의 소수성 생리활성물질과의 결합(binding) 능력, 겔화(gelation), 유화 특성(emulsifying property), 보호능(shelding property), 다른 고분자와의 상호작용능력과 같은 기능적 특성과 유청단백질 나노 전달체의 생리활성물질 생체이용률 증진, 이취 저감(off-flavor reduction)과 같은 기능적 특성에 대해 알아보하고자 한다.

(1) 소수성 생리활성물질 결합 능력

주요 유청단백질인 베타락토글로불린은 lipocalin-protein family에 속하며, 비타민 D, 레티놀, 엽산, 폴리페놀, 지방산 등 다양한 소수성 생리활성물질과 결합할 수 있는 능력을 지니고 있다(Liang 등, 2008; Livney, 2010; Ha 등, 2018). 단백질과 생리활성물질 간 화학적 상호작용에는 소수성 결합, 정전기적 상호작용, 수소결합, 반데르발스 힘이 중요하게 작용한다(Livney, 2010). 베타락토글로불린은 β -barrel의 inner hollow, α -helix와 β -barrel 사이의 surface

그림 5. 나노 전달체 원료로서 유단백질의 기능적 특성



(Livney, 2010)

cavity, Trp19-Arg124 부근의 external surface 총 3곳의 소수성 생리활성물질 결합 부위를 지니고 있다 (Liang 등, 2008). 생리활성물질의 결합 능력은 베타락토글로불린의 구조를 변화시킬 수 있는 열처리 및 pH에 영향을 받는다. 열처리에 의한 베타락토글로불린의 변성은 내부의 소수성 부위의 외부 노출을 유도하여 소수성 생리활성물질과의 소수성 결합을 증진시켜 이들과의 결합력이 향상된다고 보고되었다. Shpigelman 등(2010)의 연구에 따르면 베타락토글로불린을 75℃와 85℃에서 각각 20분간 열처리시켰을 경우, 열처리 온도 증가에 따라 베타락토글로불린의 변성 증가로 인해 내부의 소수성 잔기들이 외부로 노출되어 녹차 카테킨 성분인 (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)와의 소수성 결합 증가로 인해 EGCG 결합력이 증가되었다. 한편, pH 변화는 베타락토글로불린의 구조 변화 및 표면전하(surface charge)에 영향을 미쳐 생리활성물질과의 상호작용에 영향을 미친다. 대표적으로 β-ionone ring을 지니고 있어 베타락토글로불린의 트립토판 잔기에 소수성 결합을 통해 결합할 수 있는 레티놀(retinol)의 경우 베타락토글로불린과의 결합 능력은 pH에 따라 달라진다고 보고되었다. pH가 7.0에서 베타락토글로불린의 등전위점 (~5.3) 부근인 5.1(Wang 등, 1997)과 5.5(Dufour, 1990)로 감소함에 따라 레티놀의 베타락토글로불린 결합능력이 감소하였다.

(2) 겔화

식품산업에서 유청단백질은 gelling agents로 널리 사용되어 왔다. 전통적인 겔화 방법인 열처리를 통한 겔화(heat-induced gelation)는 유청단백질 용액 또는 유청 함유 식품을 65℃ 이상에서 열처리하여 유도할 수 있다(Bryant와 McClements, 1998). 열처리를 통한 겔화는 열변성(heat-induced denaturation)을 통해 유청단백질 내부의 소수성 잔기와 유리 sulfhydryl기를 노출시켜 유청단백질 간 소수성 결합 및 이황화 결합(disulfide bond)을 증가시키는 방법으로 열에 민감한 생리활성물질의 활성이 저하되는 단점을 지니고 있다(Kimpel과 Schmitt, 2015). 저온 겔화(cold-set gelation) 방법은 열에 의한 생리활성물질의 활성 저하를 최소화할 수 있는 방법으로, 두 가지 단계에 걸쳐 유도할 수 있다(Bryant와 McClements, 1998). 첫 번째는 유청단백질 용액의 pH를 등전위점 이상(~5.3)으로 조절하여 음의 표면전하를 지니게 한 후 pre-heating(일반적으로 70-90℃에서 50-60분간)하는 방법으로 열처리 후 냉각(예, 실온)한 다음 생리활성물질과 혼합한다. 두 번째로 칼슘과 같은 양전하를 띠는 이온을 첨가하여 유청단백질 간 상호작용을 증가시켜 겔화시킨다. 저온 겔화 방법은 리보플라빈과 같은 열에 민감한 생리활성물질을 포집하기 위해 사용되고 있다(Chen과 Subirade, 2006).

(3) 유화 특성

유청단백질은 물/기름의 계면에 흡착하고 두꺼운 층(thick layer)을 형성하여 에멀전 입자를 안정화시킬 수 있어 뛰어난 유화제로 이용될 수 있다(Euston 등, 2000). 베타락토글로불린은 케이신에 비해 낮은 계면활성(surface activity)을 지니고 있으나, 열처리를 통해 유화능을 향상시킬 수 있다. 60℃ 이상의 열처리는 베타락토글로불린의 부분변성(partial unfolding)을 유도하여 소수성 잔기와 유리 sulfhydryl기의 노출

을 통해 물/기름 계면의 흡착 능력을 향상시켜 에멀전을 안정화 시킬 수 있다(Lee 등, 2013). 유청단백질은 단일(예, oil-in-water) 및 다중(예, water-in-oil-in-water) 에멀전 제조에 이용되고 있다(Hwang 등, 2017).

(4) 보호 특성

유청단백질의 다양한 기능적 특성(예, 생리활성물질 결합 능력, 물/기름 계면 흡착 및 두꺼운 층 형성 능력, 겔화 특성, 메탈 킬레이팅 능력, 항산화 능력 등)을 지니고 있어 생리활성물질을 보호할 수 있고, 이로 인해 나노 전달체 원료로서 큰 장점을 지닌다(Livney, 2010). 베타락토글로불린은 유리 sulfhydryl기와 방향족 아미노산을 함유하고 있어 항산화 능력을 지니고 있을 뿐만 아니라, 메탈킬레이팅 능력을 보유하고 있어 생리활성물질의 산화 안정성(Oxidative stability)을 향상시킬 수 있다(Hu 등, 2003). 베타락토글로불린과의 결합은 오메가-3 지방산 docosahexaenoic acid(DHA)(Ha 등, 2018), 비타민 D(Ron 등, 2010) 등과 같은 생리활성물질의 안정성을 향상시킨다. 또한, 천연 항산화제인 레스베라트롤의 빛 노출에 의한 광안정성(photo-stability)을 향상시킬 수 있다고 보고되었다(Shpigelman 등, 2010).

(5) 다른 폴리머와의 상호작용

유청단백질의 또 다른 주요한 기능적 특성은 다른 폴리머(예, 다당류 등)와 상호작용할 수 있는 능력이다. 단백질-다당류 간 상호작용은 단백질의 겔화, 유화 특성, 용해도, 구조적 안정성 등 다양한 기능적 특성을 향상시킬 수 있다(Ye, 2008). 또한, 유청단백질을 이용한 나노 전달체 제조 시 다당류(예, 키토산, 펙틴 등)와 함께 사용할 경우, 내부에 포집된 생리활성물질의 단백질-다당류 매트릭스 내 immobilization 향상과 diffusion 속도를 감소할 통해 포집된 생리활성물

질(예, DHA, 비타민 D) 보호 능력을 증가시킬 수 있다(Ron 등, 2010). 단백질-다당류 간 상호작용에는 정전기적 상호작용이 중요하게 작용한다. 유청단백질은 등전위점 이하의 pH에서 양(positive)의 표면전하를 지녀 음전하를 띠는 다당류(예, 펙틴, Ron 등, 2010)와 복합체(complex)를 형성하고, 등전위점 이상의 pH에서는 음(negative)의 표면전하를 지녀 양전하를 띠는 다당류(예, 키토산, Chen과 Subirade, 2005)와 복합체를 형성할 수 있다. 유청단백질과 다당류가 같은 표면전하를 지닐 경우, 반대전하를 지닌 가교제를 이용하여 이온결합을 통해 복합체를 형성할 수 있다. 예를 들면, 양전하를 지니는 유청단백질과 키토산에 음전하를 지니는 가교제인 삼인산나트륨(sodium tripolyphosphate)을 첨가하여 복합체를 형성할 수 있으며(Ha 등, 2018), 음전하를 지니는 유청단백질과 알긴산에 양전하를 지니는 가교제인 칼슘을 첨가하여 복합체를 형성할 수 있다(Chen과 Subirade, 2006).

(6) 생체이용률 증진

생체이용률이란 섭취된 생리활성물질이 인체 내에서 얼마나 효율적으로 작용하는지를 나타내는 것으로, 좁은 의미에서 구강 섭취 후 소장 내에서 흡수되는 정도를 나타내는 흡수(uptake)와 같은 의미로 사용되기도 한다(Acosta, 2009). 유사한 용어로 주로 *in vitro* 소화 모델을 통해 분석하는 위장관 내 소화과정을 통해 식품 매트릭스로부터 방출되어 소장에서 흡수 가능한 형태의 생리활성물질의 함량을 나타내는 생체접근성(bioaccessibility)이 있다(Ercan과 El, 2012).

일반적으로 나노 전달체의 크기(particle size), 다분산지수(polydispersity index), 표면전하(surface charge)와 같은 물리화학적 특성은 포집된 생리활성물질의 생체이용률에 영향을 미치는 중요한 요인이다. 입자 크기가 줄어들게 되면 소장 상피세포와 상호작용할 수 있는 표면적이 넓어지고, 표면전하가 양(positive)에 가까울수록 음전하를 띠는 소장 상피세포 표면과의 결

표 2. 유청단백질 나노입자의 물리화학적 특성과 세포 내 흡수의 상관 관계

	입자 크기	표면전하	세포 내 흡수
입자 크기 (particle size)		-0.83***	-0.76**
표면전하 (zeta-potential value)	-0.83***		0.75**
세포 내 흡수 (cellular uptake)	-0.76***	0.75**	

** , *** Significantly different at $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively (Ha 등, 2015)

합에 유리하기 때문에, 일반적으로 입자크기가 작고 표면전하가 양에 가까울수록 흡수율 측면에서 유리하다. 표 2는 유청단백질 나노 전달체의 입자 크기 및 표면전하와 장 상피세포 내 흡수율의 상관관계를 나타낸 것으로, 입자크기(약 100에서 200 nm 범위)와 표면전하(약 -15에서 -18 mV 범위)는 세포 내 흡수율과 각각 음과 양의 상관관계를 지님을 보여준다(Ha 등, 2015). 즉, 유청단백질 나노 전달체의 크기가 작을수록, 표면전하가 양에 가까울수록 소장 상피세포 내 흡수율이 증진되어 포집된 생리활성물질의 생체이용률을 향상시킬 수 있을 것으로 예상된다.

(7) 이취 저감

유청단백질 나노 전달체를 이용한 산화에 민감한 생리활성물질(예, 항산화제, 오메가-3 지방산 등)의 포집은 이들의 산화 안정성을 증진시킬 수 있다고 보고되었다. 특히 식품 제조 및 저장 과정 중 쉽게 산화되어 산화적 산패로 인한 이취(예, 생선비린내)가 발생하는 문제점을 지닌 오메가-3 지방산 및 이를 다량 함유한 어유(fish oil)를 유청단백질 나노 전달체로 포집할 경우, 이들의 산화 안정성을 향상시켜 이취를 저감하여 식품 적용성을 증진시킬 수 있었다(Hwang 등, 2017; Ha 등, 2018).

III. 결론

전달체는 약물전달을 위해 약학분야에서 광범위하게 연구되어 왔으며, 최근 생리활성물질의 식품 적용성 및 생체이용률 향상을 위해 식품 분야에도 접목되고 있다. 특히 기존 미세 전달체에 비해 흡수율 측면에서 장점을 지닌 나노 전달체는 식품 원료인 단백질, 다당류 등을 원료로 하여 비교적 간단한 공정을 통한 화학 반응으로 자기 조립을 유도하여 제조할 수 있으며, 이에 따라 다양한 식품 소재와 공정을 활용한 나노 전달체 제조 연구 결과들이 발표되고 있다. 그러나 현재까지의 연구는 *in vitro* model에서 머무는 수준으로 실제 식품 매트릭스에서의 안정성 및 적용성 연구와 동물 및 임상 실험을 통한 건강증진 효과 등 신뢰할 수 있는 체계적인 연구가 필요한 시점이다. 유청단백질은 GRAS할 뿐만 아니라, pH 조절, 열처리, 가교제 첨가 등 간단한 방법으로 제조될 수 있으며, 나노 전달체 원료로 이용 시 기존의 생리활성물질을 효과적으로 전달할 수 있다. 또한, 유청단백질은 다양한 기능적 특성을 지니고 있어 생리활성물질의 생체이용률 증진뿐만 아니라, 이취 저감, flavor masking, 식품 물성 증진 등 다양한 분야로 확장될 수 있는 뛰어난 잠재력을 지니고 있다.

참고문헌

1. Acosta E. 2009. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 14:3-15.
2. Bernard C, Regnault S, Gendreau S, Charbonneau S, Relkin P. 2011. Enhancement of emulsifying properties of whey proteins by controlling spray-drying parameters. *Food Hydrocoll* 25:758-763.
3. Bryant CM, McClements DJ. 1998. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trend Food Sci Technol* 9:143-151.
4. Chen L, Subirade M. 2006. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials* 27:4646-4654.
5. Chen L, Subirade M. 2005. Chitosan/ β -lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. *Biomaterials* 26:6041-6053.
6. Chen L, Remondetto GE, Subirade M. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trend Food Sci Tech* 17:272-283.
7. Dufour EMC, Marden MC, Haertle T. 1990. β -Lactoglobulin binds retinol and protoporphyrin IX at two different binding sites. *FEBS Lett* 277:223-236.
8. Ercan P, El SN. 2012. *In vitro* bioaccessibility of coenzyme Q10 in enriched yoghurts. *Int J Food Sci Tech* 47:1986-1992.
9. Euston SR, Finnigan SR, Hirst RL. 2000. Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocoll* 14:155-161.
10. Fathi M, Mozafari MR, Mohebbi M. 2012. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci Tech* 23:13-27.
11. Fox PF, McSweeney PLH. 2003. *Advanced dairy chemistry, proteins part A*, vol. 1. 3 edn. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
12. Gnunasekaran S, Xiao L, Eleya MMO. 2006. Whey protein concentrate hydrogels as bioactive carriers. *J Applied Polym Sci* 99:2470-2476.
13. Ha HK, Lee MR, Lee WJ. 2018. Oxidative stability of DHA in β -lactoglobulin/oleic acid-modified chitosan oligosaccharide nanoparticles during storage in skim milk. *LWT-Food Sci Technol* 90:440-447.
14. Hu MH, McClements DJ, Decker EA. 2003. Impact of whey protein emulsifiers on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem* 51:1435-1439.
15. Hwang JY, Ha HK, Lee MR, Kim JW, Kim HJ, Lee WJ. 2017. Physicochemical property and oxidative stability of whey protein concentrate multiple nanoemulsion containing fish oil. *J Food Sci* 82:437-444.
16. Kimpel F, Schmitt JJ. 2015. Review: Milk proteins as nanocarrier systems for hydrophobic nutraceuticals. *J Food Sci* 80:2361-2366.
17. Lee MR, Choi HN, Ha HK, Lee WJ. 2013. Production and characterization of beta-lactoglobulin/alginate nanoemulsion containing coenzyme Q10: Impact of heat treatment and alginate concentrate. *Korean J Food Sci*

An 33:67-74.

18. Liang L, Tajmir-Riahi HA, Subirade M. 2008. Interaction of beta-lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. *Biomacromolecules* 9:50-56.
19. Livney YD. 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 15:73-83.
20. Ron N, Zimet P, Bargarum J, Livney YD. 2010. Beta-lactoglobulin-polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. *Int Dairy J* 20:686-693.
21. Ron N, Zimet P, Bargarum J, Livney YD. 2010. Beta-lactoglobulin-polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. *Int Dairy J* 20:686-693.
22. Shishir MRI, Xie L, Sun C, Zheng X, Chen W. 2018. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trend Food Sci Technol* 78:34-60.
23. Shpigelman A, Israeli G, Livney YD. 2010. Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta-lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocoll* 24:735-743.
24. Wang Q, Allen JC, Swaisgood HE. 1997. Binding of retinoids to β -lactoglobulin isolated by bioselective adsorption. *J Dairy Sci* 80:1047-1053.
25. Ye A. 2008. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: Principles and applications – A review. *Int J Food Sci Technol* 43:406-415.