

ARTICLE

케이스인 포스포펩티드/키토올리고당 나노 복합체 형성과 특성 연구

백윤서^{1†} · 하호경^{2†} · 이지홍¹ · 이미령³ · 이원재^{1*}¹경상대학교 동물생명과학과(농업생명과학연구원), ²순천대학교 동물자원과학과, ³대구대학교 식품영양학과

Formation and Characterization of Casein Phosphopeptide/Chitosan Oligosaccharide NanoComplex

Yun-Seo Baek^{1†}, Ho-Kyung Ha^{2†}, Ji-Hong Lee¹,
Mee-Ryung Lee³, and Won-Jae Lee^{1*}¹Department of Animal Bioscience and Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Korea²Department of Animal Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon, Korea³Department of Food and Nutrition, Daegu University, Gyeongsan, KoreaReceived: September 17, 2018
Revised: September 18, 2018
Accepted: September 18, 2018

†These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author :
Won-Jae Lee
Department of Animal Bioscience
and Institute of Agriculture and Life
Science, Gyeongsang National
University, Jinju, Korea
Tel : +82-55-772-1884
Fax : +82-55-772-1889
E-mail : wjleewisc@gnu.ac.krCopyright © 2018 Korean Society of Milk
Science and Biotechnology.
This is an Open Access article distributed
under the terms of the Creative Commons
Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>)
which permits unrestricted non-commercial
use, distribution, and reproduction in any
medium, provided the original work is
properly cited.

ORCID

Yun-Seo Baek
0000-0002-3188-8095
Ho-Kyung Ha
0000-0002-0773-6585
Ji-Hong Lee
0000-0003-1211-9888
Mee-Ryung Lee
0000-0003-4688-7316
Won-Jae Lee
0000-0001-8391-6863

Abstract

The objectives of this study were to manufacture casein phosphopeptide (CPP)/chitosan oligosaccharide (CSO) nanocomplexes and to investigate the impacts of manufacturing variables, such as CPP concentration and pH, on their morphological and physicochemical characteristics. Transmission electron microscopy (TEM) and particle size analysis were used to assess the morphological and physicochemical properties of the CPP/CSO nanocomplexes, respectively. Based on the images obtained by TEM, the spherical shapes of the CPP/CSO nanocomplexes ranged from 50 to 150 nm. As the concentration of CPP was increased and the pH was decreased, the average particle size of the nanocomplexes significantly ($p < 0.05$) increased. The CPP/CSO nanocomplexes had a highly uniform distribution with a polydispersity index value of less than 0.3. In addition, they had a negative surface charge with a zeta-potential value between -17 and -26 mV. The CPP/CSO nanocomplexes showed good stability during the freeze-drying process. In conclusion, CPP/CSO nanocomplexes were successfully manufactured, and the CPP concentration and pH were found to be key factors that affected their morphological and physicochemical properties.

Keywords

casein phosphopeptide, chitosan oligosaccharide, nanocomplex

서 론

우리나라는 출산율 저하와 평균 수명 증가로 인해 고령화가 빠르게 진행됨에 따라 시니어들의 노년기 질환 문제가 크게 대두되고 있다. 당뇨병, 암, 우울증, 치매 등 다양한 노인성 질환 중 작은 충격에 의해서도 쉽게 골절로 이어질 수 있는 골다공증과 같은 뼈 질환 문제는 더욱더 심각하게 인식되고 있다. 사람의 몸에 존재하는 가장 많은 무기질 중 하나인 칼슘은 뼈의 주요 구성 요소로 체중의 약 2%를 차지하고 있는데, 칼슘이 체내에 부족하게 되면 구루병이나 골절, 골다공증과 같은 뼈 질환 문제의 발생 위험이 커지게 된다(Cilla *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2017). 국민건강영양조사의 통계에 따르면 우리나라 만 65세 이상 성인의 골관절염 유병률은 32.7%이며, 연간 전체 뼈 무게의 약 0.3%가 소실되는 것으로 알려져 있다(KCDC, 2015). 또한 칼슘을 부족하게 섭취하는 사람의 비율은 74%인데, 특히 65세 이상 성인 83%가 칼슘 섭취가 부족하다고 보고되었다(KCDC, 2016). 따라서 뼈 질환 문제를 예방하고 이를 통한 노년기 삶의 질 향상을 위해서는 충분한 칼슘 섭취가 반드시 이루어

저야 한다.

현재 칼슘 섭취를 위해 이용되어지는 칼슘 보충제로는 calcium carbonate, calcium gluconate, calcium lactate와 같은 이온화 칼슘(ionized calcium)이 있다. 칼슘이 장 내에서 흡수되기 위해서는 용해된 상태로 존재해야 하는데, 이온화 칼슘은 소장에서의 용해도 저하로 인한 침전 생성으로 인해 칼슘 흡수가 저하되고, 결과적으로 생체이용률이 낮은 문제점이 있으며, 또한 변비나 복부 팽창 등과 같은 부작용이 발생할 수 있다(Sun *et al.*, 2016). 본 연구에서는 기존의 이온화 칼슘 이용 시 나타나는 문제점들을 개선하기 위해 새로운 칼슘 이용률 향상을 위한 식품 소재로 케이신포스포펩티드, casein phosphopeptide(CPP)와 키토올리고당, chitosan oligosaccharide(CSO)가 선택되었다. CPP는 우유 단백질인 케이신이 분해되어 만들어진 펩티드로 음전하를 띠는 아미노산인 3개의 인산화 세린과 2개의 글루탐산으로 구성되어 있어 칼슘과 효율적으로 결합할 수 있다(Ferraretto *et al.*, 2001). 또한 CSO는 분자량이 커서 물에 잘 녹지 않는 키토산을 분해한(<20 kDa) 물질로 수용해성이 높아 식품 적용성이 뛰어나며(Bharathiraja *et al.*, 2018), paracellular pathway를 통해 이루어지는 칼슘의 장내 흡수 과정에서 세포 사이 공간인 tight junction을 열어 paracellular uptake를 증진시켜 칼슘의 흡수를 향상시킬 수 있다(Ranaldi *et al.*, 2002).

본 연구에서 CPP와 CSO를 이용하여 제조할 나노 복합체는 입자 크기가 ~200 nm 이하로 표면적이 상대적으로 넓어 장 상피세포와 같은 target 세포와 상호작용할 수 있는 가능성이 높으며, 이로 인해 칼슘을 포함한 여러 생리활성물질들의 흡수율 및 생체이용률을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다(Ha *et al.*, 2015). 또한 칼슘 결합 부위를 지닌 CPP와 paracellular enhancer인 CSO를 이용하여 제조한 나노 복합체가 칼슘의 용해도뿐만 아니라, 칼슘의 흡수를 증진시킬 수 있을 것으로 가정하였다. 본 연구의 목적은 칼슘 흡수를 향상시키기 위한 CPP/CSO 나노 복합체를 제조하고, 나노 복합체 제조 공정 요인인 CPP 농도와 pH가 나노 복합체의 형태학적, 물리화학적 특성에 미치는 효과를 연구하는 것이다.

재료 및 방법

1. 시약

케이신포스포펩티드는 FrieslandCampina에서, 키토올리고당은 Amicogen Inc.에서 제공 받아 사용하였다. Hydrochloric acid(HCL)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

2. 나노 복합체 제조

Casein phosphopeptide(CPP)/chitosan oligosaccharide(CSO) 나노 복합체는 modified ionic gelation 방법(Ha *et al.*, 2013)을 사용하여 제조하였다. 우선 케이신포스포펩티드와 키토올리고당을 증류수에 용해시켜 0.4%, 0.6%, 0.8%(w/v) 농도의 케이신포스포펩티드 수용액과 0.006%(w/v) 농도의 키토올리고당 수용액을 준비하였다. 케이신포스포펩티드 수용액과 키토올리고당 수용액을 혼합하여 다양한 농도의 케이신포스포펩티드(최종농도: 0.2, 0.3, 0.4%(w/v))/키토올리고당(최종농도: 0.003%(w/v)) 혼합용액을 준비한 후, 0.2M HCl을 이용하여 CPP/CSO 혼합액의 pH를 조절하였다(최종 pH: 5.5, 6.0, 6.5).

3. 나노 복합체의 물리화학적 특성 분석

CPP/CSO 나노 복합체의 입자 크기(particle size), 다분산지수(polydispersity index), 제타 전위(zeta-potential)는 입도 분석기(particle size analyzer, Nano-ZS, Malvern, UK)를 이용하여 측정하였다. 나노 복합체를 증류수를 이용하여 20배 희석한 후 173°의 scattering angle에서 입자

크기와 다분산지수를 측정하였다. 또한 제타 전위는 나노 복합체를 증류수를 이용하여 10배 희석한 후 측정하였다.

4. 나노 전달체의 형태학적 특성 평가

나노 복합체의 형태학적 특성은 투과전자현미경(transmission electron microscopy, TEM, Phillips Tecnai 12, Phillips, Netherlands)을 이용하여 측정하였다. 제조된 나노 전달체를 탄소-코팅된 200-mesh copper grid 위에 올린 다음 2% uranyl acetate를 이용하여 45초간 염색하였다. 그런 다음 염색된 그리드를 투과전자현미경에 삽입하여 120 kV에서 나노 복합체의 형성 유무와 형태를 관찰하였다.

5. 나노 복합체의 동결 건조

동결건조기(FD-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Japan)를 이용하여 나노 복합체의 식품 적용성 향상을 위한 분말화를 수행하였다. 제조된 나노 복합체 현탁액을 -80°C 에서 12시간 동결시킨 후 동결건조기를 이용하여 분말화 된 나노 복합체를 1 mg/mL 농도로 증류수에 분산시킨 후, 투과전자현미경을 이용하여 입자의 형태학적 특성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. Casein phosphopeptide(CPP) 농도에 따른 나노 복합체의 형태학적, 물리화학적 특성

CPP/CSO를 이용한 나노 복합체의 제조 공정 확립을 위해 제조 공정 요인(CPP 농도, pH)에 따른 나노 복합체의 물리화학적, 형태학적 특성을 평가하였다. 투과전자현미경을 사용하여 CPP 농도에 따른 나노 복합체의 형성 유무와 형태학적 특성을 측정된 결과, CPP 농도가 0.2%에서 0.4%(w/v)로 증가함에 따라 좀 더 큰 응집체가 형성됨을 확인하였고, 약 50~100 nm 크기의 구형의 입자가 형성되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). CPP 농도에 따른 나노 복합체의 물리화학적 특성 평가 결과, 우선 CPP 농도가 0.2에서 0.4%(w/v)로 증가 함에 따라 CPP/CSO 나노 복합체의 크기가 187에서 280 nm로 유의적($p < 0.05$)으로 증가하였다(Fig. 2A). 그러나 CPP 농도가 0.6%(w/v) 이상이었을 경우 침전이 발생하였다(data not shown). Hu 등(2012)의 연구에 따르면 단백질과 탄수화물을 이용하여 복합체를 제조할 경우, 단백질의 농도가 증가할수록 형성되는 복합체의 입자 크기가 증가한다고 보고되었다. 본 실험 조건인 pH 6.5에서는 유단백질인 CPP가 음의 전하를 지니며, CSO는 양의 전하를 지녀 정전기적 상호작용(electrostatic attraction)에 의해 나노 복합체가 형성되었다. CPP

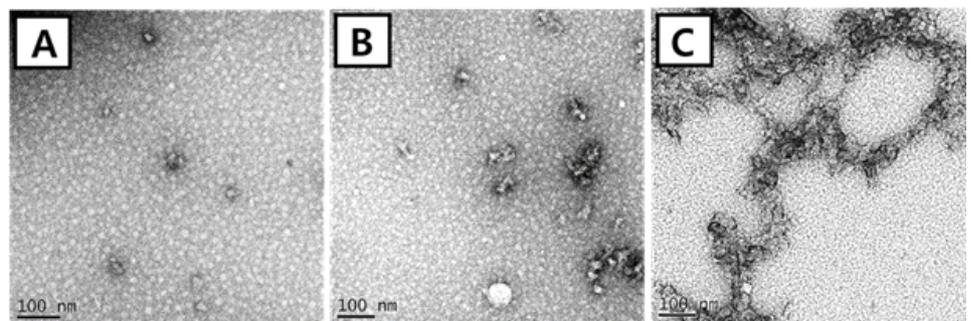


Fig. 1. TEM images of CPP/CSO nano complexes. Nano complexes were prepared with 0.2% (A), 0.3% (B), and 0.4% (C) (w/v) CPP concentration levels at pH 6.5 (CSO concentration: 0.003%, w/v). Scale bar=100 nm.

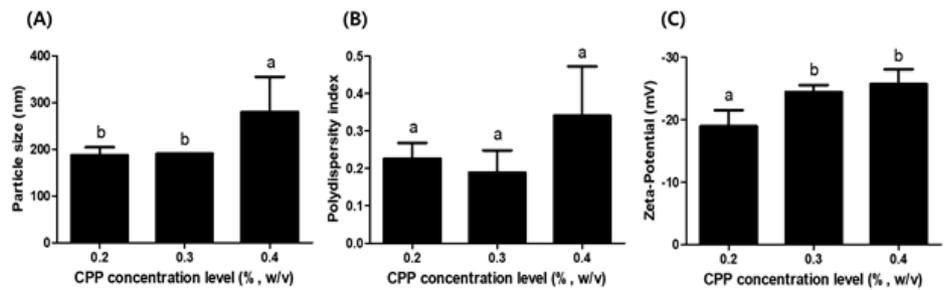


Fig. 2. Effects of casein phosphopeptide (CPP) concentration level on the particle size (A), polydispersity index (B), and zeta-potential (C) of CPP/CSO nano complex. CPP solutions with various concentration levels (0.2%, 0.3%, and 0.4%, w/v) was mixed with 0.003% (w/v) CSO solution and then adjusted to pH 6.5. Different letters on a column indicate significant differences ($p < 0.05$).

의 농도가 증가할수록 더 많은 CPP가 CSO와의 정전기적 상호작용에 관여하여 결과적으로 더 큰 복합체를 형성하였다고 사료된다.

다분산지수(PDI)의 경우, CPP 농도가 0.2에서 0.4%(w/v)로 증가함에 따라 유의적인 차이는 없었다 (Fig. 2B). 그러나 0.2%, 0.3%(w/v) CPP 농도로 제조된 CPP/CSO 나노 복합체는 0.3 이하의 PDI 값을 가진 반면, 0.4%(w/v) CPP 농도로 제조된 나노 복합체의 PDI 값은 0.3 이상이였다. 결과적으로 PDI 값이 0.3 이하인 0.2와 0.3%(w/v) CPP 농도 조건에서는 상대적으로 균일한 나노 복합체가 생성되었음을 알 수 있었다(Lippacher *et al.*, 2001). CPP 농도에 따른 제타 전위 실험의 경우, CPP 농도가 0.2에서 0.4%(w/v)로 증가함에 따라 나노 복합체의 제타 전위가 -19.0에서 -25.7 mV로 유의적($p < 0.05$)으로 감소함을 알 수 있었다(Fig. 2C). 본 연구를 위한 예비 실험에서 CPP의 pI(등전 위점)는 pH ~3.1이었고(data not shown) 따라서 pH 6.5에서 CPP는 음의 전하를 가지게 된다. 즉, CPP의 농도가 증가할수록 나노 복합체는 더 많은 음전하를 띠게 되어 결과적으로 나노 복합체의 표면 전하 역시 감소된다고 사료된다.

2. pH에 따른 나노 복합체의 형태학적, 물리화학적 특성

나노 복합체 제조 공정 요인 중 하나인 pH(5.5, 6.0, 6.5)에 따른 나노 복합체의 형태학적 특성 평가 결과, pH가 5.5에서 6.5로 증가함에 따라 좀 더 작은 응집체가 형성됨을 확인하였고, 약 50~150 nm 크기의 구형의 입자가 형성되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 나노 복합체의 물리 화학적 특성에 대한 pH의 영향 평가의 경우, pH가 5.5에서 6.5로 증가함에 따라 CPP/CSO 나노 복합체의 입자

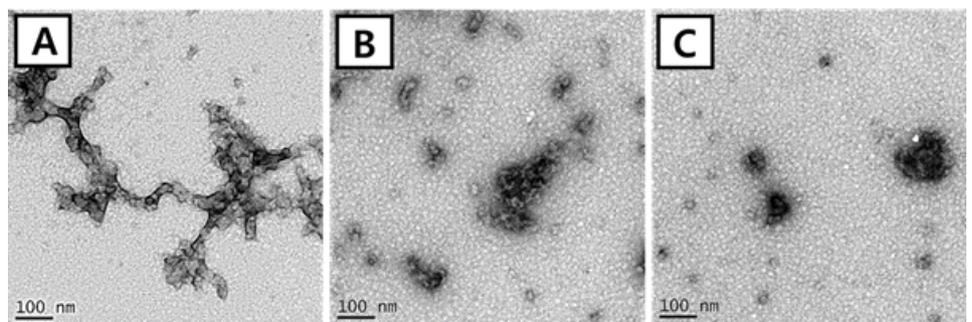


Fig. 3. TEM images of CPP/CSO nano complexes. Nano complexes were prepared with 0.3% (w/v) CPP concentration and 0.003% (w/v) CSO concentration at 5.5 (A), 6.0 (B), and 6.5 (C) pH levels, Scale bar=100 nm.

크기가 246 nm에서 191 nm로 유의적($p < 0.05$)으로 감소함을 확인하였다(Fig. 4A). CPP의 pI가 ~ 3.1 (data not shown)이고, CSO의 pKa는 ~ 6.3 (Bhattarai *et al.*, 2010)이기 때문에 pH가 5.5에서 6.5로 증가함에 따라 CPP는 더 많은 음전하를 지니게 되고, 이에 따라 양전하를 지닌 CSO와의 정전기적 인력작용(electrostatic attraction)이 증가되어 결과적으로 더 작은 크기의 나노 복합체를 형성하였다고 사료된다. pH에 따른 다분산지수 값은 pH 5.5일 때 0.200, pH 6.0일 때 0.156, pH 6.5일 때 0.189로 유의적인 차이 없이 세 조건 모두에서 0.3 이하 값을 지니고 있었다(Fig. 4B). 따라서 본 연구에서 5.5~6.5의 pH 조건에서 형성되는 CPP/CSO 나노 복합체의 입도 분포는 매우 균일함을 확인하였다. 또한 pH가 5.5에서 6.5로 증가함에 따라 CPP/CSO 나노 복합체의 제타 전위 값은 -16.8 mV에서 -24.5 mV로 유의적($p < 0.05$)으로 감소함을 알 수 있었다(Fig. 4C). pH가 5.5에서 6.5로 증가함에 따라 CPP가 지니는 음전하가 증가하게 되고, 결과적으로 제조된 CPP/CSO 나노 복합체의 표면 전하는 감소했다고 사료된다.

3. 동결건조 과정 중 나노 복합체의 물리적 안정성

제조된 CPP/CSO 나노 복합체를 다양한 종류의 식품에 적용하기 위해 동결건조기를 이용하여 분말화를 수행하였다. 투과전자현미경을 사용하여 동결건조 전 후의 나노 복합체의 물리적 안정성을 평가한 결과, 동결건조 후에도 매우 균일한 분포의 구형의 나노 복합체가 형성되었음을 확인하였다(Fig. 5). 결과적으로 동결 건조 과정을 통해 생성된 나노 복합체 분말은 향후 다양한 종류의 식품에 적용

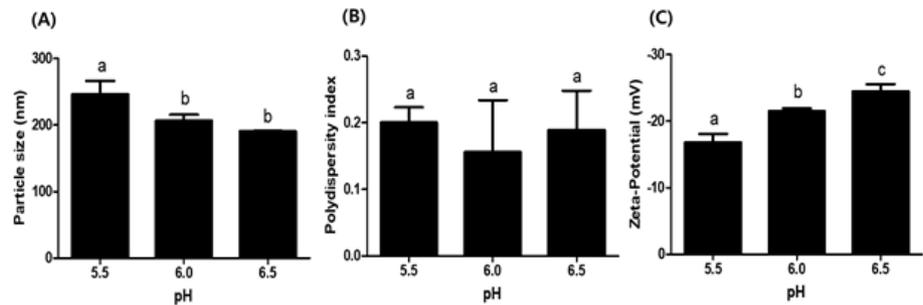


Fig. 4. Effects of pH on the particle size (A), polydispersity index (B), and zeta-potential (C) of CPP/CSO nano complex. 0.3% (w/v) CPP solution was mixed with 0.003% (w/v) CSO solution and then adjusted to pH 5.5, 6.0, and 6.5. Different letters on a column indicate significant differences ($p < 0.05$).

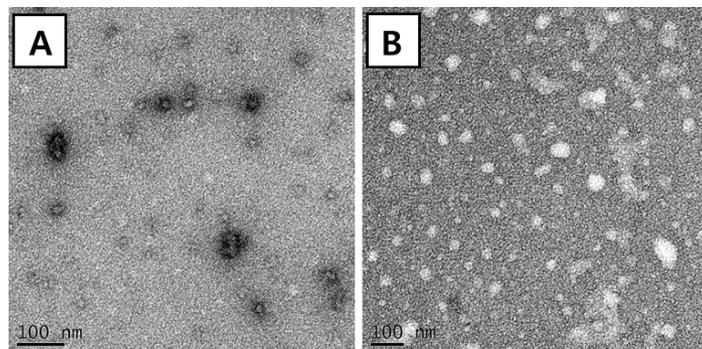


Fig. 5. Morphological properties of CPP/CSO nano complex before (A) and after (B) freeze drying process. 0.3% (w/v) CPP solution was mixed with 0.003% (w/v) CSO solution and then adjusted to pH 6.5. Scale bar=100 nm.



가능한 잠재력이 높음을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 CPP와 CSO를 사용하여 약 187~282 nm 크기의 균일한 구형의 나노 복합체를 성공적으로 제조하였다. 나노 복합체는 제조 공정 요인인 CPP 농도와 pH 조절을 통해 입자 크기, 다분산 지수, 그리고 표면 전하와 같은 나노 복합체의 물리화학적 특성을 조절할 수 있음을 확인하였다. 또한 CPP/CSO 나노 복합체의 분말화 공정을 통해 분말화 된 나노 복합체의 식품 적용성을 증진시킬 수 있음을 알 수 있었으며, food-grade 물질인 CPP와 CSO를 사용하여 제조한 나노 복합체는 향후 잠재적인 칼슘 전달체로써 식품 산업에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

This work was supported by Basic Science Research Program(NRF-2017R1D1A1B03033260) through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Education, Republic of Korea.

References

- Bharathiraja, S., Bui, N. Q., Manivasagan, P., Moorthy, M. S., Mondal, S., Seo, H., Phouc, N. T., Vy Phan, T. T., Kim, H., Lee, K. D. and Oh, J. 2018. Multimodal tumor-homing chitosan oligosaccharide-coated biocompatible palladium nanoparticles for photo-based imaging and therapy. *Sci. Rep.* 8:500.
- Bhattacharai, N., Gunn, J. and Zhang, M. 2010. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62:83-99.
- Cao, Y., Miao, J., Liu, G., Luo, Z., Xia, Z., Liu, F., Yao, M., Cao, X., Sun, S., Lin, Y., Lan, Y. and Xiao, H. 2017. Bioactive peptides isolated from casein phosphopeptides enhance calcium and magnesium uptake in caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* 65:2307-2314.
- Cilla, A., Lagarda, M. J., Alegría, A., Ancos, B., Cano, M. P., Sánchez-Moreno, C., Plaza, L. and Barberá, R. 2011. Effect of processing and food matrix on calcium and phosphorous bioavailability from milk-based beverages in caco-2 cells. *Food Res. Int.* 44:3030-3038.
- Ferraretto, A., Signorile, A., Gravaghi, C., Fiorilli, A. and Tettamanti, G. 2001. Casein phosphopeptides influence calcium uptake by cultured human intestinal ht-29 tumor cells. *J. Nutr.* 131:1655-1661.
- Ha, H. K., Kim, J. W., Lee, M. R. and Lee, W. J. 2013. Formation and characterization of quercetin-loaded chitosan oligosaccharide/ β -lactoglobulin nanoparticle. *Food Res. Int.* 52:82-90.
- Ha, H. K., Kim, J. W., Lee, M. R., Jun, W. and Lee, W. J. 2015. Cellular uptake and cytotoxicity of β -lactoglobulin nanoparticles: The effects of particle size and surface charge. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 28:420-427.



- Hu, B., Ting, Y., Zeng, W. and Huang, Q. 2012. Cellular uptake and cytotoxicity of chitosan-caseinophosphopeptides nanocomplexes loaded with epigallocatechin gallate. *Carbohydr. Polym.* 89:362-370.
- Korea Centers for Disease Control & Prevention(KCDC). 2015~2016. 질병관리본부 https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04_03.do?classType=7
- Lippacher, A., Müller, R. H., and Mäder, K. 2001. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 214:9-12.
- Ranaldi, G., Marigliano, I., Vespignani, I., Perozzi, G. and Sambuy, Y. 2002. The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal caco-2 cell line. *J. Nutr. Biochem.* 13:157-167.
- Sun, N., Wu, H., Du, M., Tang, Yue., Liu, H., Fu, Y. and Zhu, B. 2016. Food protein-derived calcium chelating peptides: A review. *Trends. Food Sci. Technol.* 58:140-148.