



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0120847
(43) 공개일자 2022년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/18 (2016.01) A23J 3/10 (2006.01)
A23J 3/32 (2006.01) A23L 33/125 (2016.01)
A23L 33/16 (2016.01) A23L 33/19 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/18 (2016.08)
A23J 3/10 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0024530

(22) 출원일자 2021년02월24일

심사청구일자 2021년02월24일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

이원재

경상남도 진주시 진주대로815번길 11, 110동 120
1호(주약동, 주약현대아파트)

이지홍

경상남도 창원시 의창구 북면 구룡로 133(창북목
장)

(74) 대리인

특허법인태백

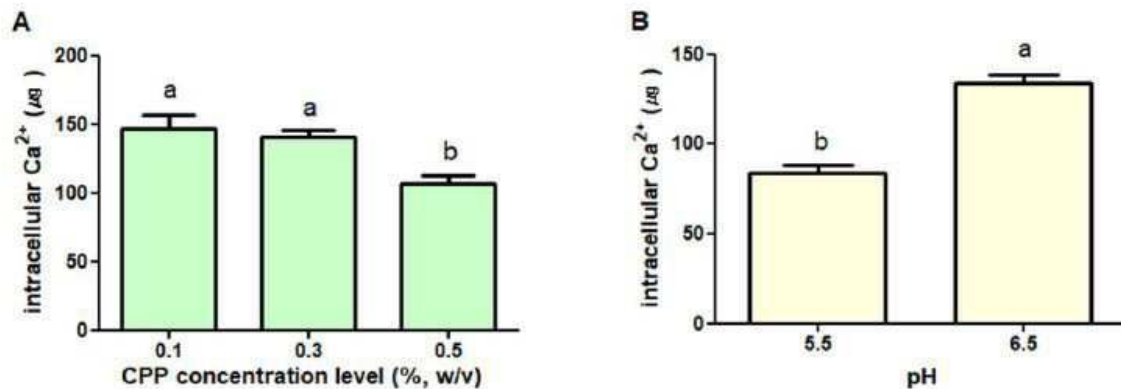
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당으로 이루어지는 나노복합체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당을 포함하는 세포 내 생리물질 흡수 증진용 나노복합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 상기 CPP/CSO 나노복합체는 카제인 포스포펩타이드 (CPP) 농도 및 pH의 조건에 따라, 입자 크기가 조절되며, 상기 입자크기에 조절을 통하여 장 상피 세포로의 칼슘 흡수율을 증가시킬 수 있음이 확인됨에 따라, 본 발명의 CPP/CSO 나노복합체는 세포 독성 없이 장 상피 세포 내로 칼슘 흡수율을 향상시키는 칼슘 흡수 증진용 조성물로 제공될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A23J 3/325 (2013.01)
A23L 33/125 (2020.05)
A23L 33/16 (2016.08)
A23L 33/19 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2250/1578 (2013.01)
A23V 2250/28 (2013.01)
A23V 2250/54246 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345315141
과제번호	2017R1D1A1B03033260
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	칼슘/비타민 D 동시 전달 시스템으로서 카제인 유래 나노 복합체의 장내 칼슘 흡수
증진 효과 연구	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당으로 이루어지며,

상기 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당의 정전기적 상호작용으로 이온화 겔화되는 것을 특징으로 하는 나노복합체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 나노복합체는 카제인 포스포펩티드 97.1 내지 99.4 중량% 및 키토올리고당 0.6 내지 2.9 중량%가 포함되는 것을 특징으로 하는 나노복합체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 나노복합체는 나노복합체 100 중량부에 대하여 생리활성물질 0.7 내지 3.2 중량부를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 나노복합체.

청구항 4

카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당으로 이루어지며, 상기 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당의 정전기적 상호작용으로 이온화 겔화되는 나노복합체 및 칼슘을 유효성분으로 함유하는 칼슘 흡수 증진용 건강식품.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 칼슘 흡수 증진용 건강식품은 조성물 총 100 중량부에 대하여, 나노복합체 96.9 내지 99.3 중량부 및 칼슘 0.7 내지 3.1 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 칼슘 흡수 증진용 건강식품.

청구항 6

카제인 포스포펩티드 용액 및 키토올리고당 용액을 준비하는 단계 (제1단계);

상기 용액을 혼합하는 단계(제2단계);

상기 혼합용액에 칼슘을 첨가하는 단계(제3단계); 및

상기 제3단계 혼합용액의 pH를 조절하는 단계(제4단계)로 이루어지는 것을 특징으로 하는 칼슘 흡수 증진용 나노복합체 제조방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 나노복합체는 카제인 포스포펩티드 97.1 내지 99.4 중량% 및 키토올리고당 0.6 내지 2.9 중량%가 포함되는 것을 특징으로 하는 나노복합체 제조방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 칼슘은 나노복합체 100 중량부에 대하여 0.7 내지 3.2 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 나노복합체 제조방법.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 제4단계 혼합용액의 pH는 5.5 내지 7.0인 것을 특징으로 하는 나노복합체 제조방법.

청구항 10

청구항 6 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 따른 나노복합체를 유효성분으로 함유하는 칼슘 흡수 증진용 건강식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당을 포함하는 세포 내 생리활성물질 흡수 증진용 나노복합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대한민국은 세계에 유례가 없을 정도로 고령화가 빠른 추세로 진행되고 있으며, 2017년 고령화 사회에서 고령사회가 되었으며 2019년 말 현재 65세 이상 인구는 약 800만 명(전체 인구의 15.4%)으로 2025년에는 초고령사회에 2025년(전체 인구 대비 노인 인구 구성비는 20.0%)에 진입할 것으로 예상된다.

[0003] 2014년 대비 연령별 노인성 질환의 진료인원 및 총 진료비의 증가현황을 살펴보면 65세 이상 노인 그룹에서의 증가가 두드러졌으며 특히, 65세 이상에서는 대표적인 뼈건강 질환 중 하나인 골다공증의 증가폭이 두드러졌다. 장기적 칼슘 부족이 골다공증의 증가의 주요 요인으로 알려져 있다. 또한 보건복지부 통계에 따르면 우리나라 만 65세 이상 성인의 전체 칼슘 권장섭취량이 100% 기준 82% 로 부족하다고 보고되었는데 이러한 칼슘 섭취량 부족 문제는 골다공증과 같은 뼈 질환 예방과 건강 유지에 있어 최대 관심사로 대두 되고 있는 실정이다.

[0004] 칼슘은 체내에서 생성되지 않아 식품 및 건강보조제 형태로 섭취하여야 하며 성인의 경우 칼슘흡수율 100% 기준 15~20% 정도 흡수되고 나이가 들수록 칼슘 흡수율은 지속적으로 감소한다. 건강보조 목적으로 이용되어온 대부분의 칼슘 보충제는 이온화 칼슘으로 구성 되어 있는데, 다른 칼슘과 비교했을 때 용해도 저하로 인해 변비와 복부팽창을 유발하며 흡수율에 영향을 미치는 문제점을 가지고 있다.

[0005] 또한 칼슘은 소장에서 세포횡단 경로 (transcellular path-way)와 세포주위경로 (paracellular pathway)에서 흡수가 이루어지는데, 기존 장내 칼슘 흡수 관련 연구는 대부분 소장 상부위에서 세포횡단 경로를 중심으로 수행되어 왔으나 실제 장내 칼슘흡수의 70~80%는 소장 말단부위에서의 세포주위경로를 통해 흡수되는 것으로 알려져 있어, 보다 효과적인 장내 칼슘 흡수를 위해서는 세포주위경로 흡수 (paracellular pathway absorption)를 증진시킬 수 있는 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2015-0111449호 (2015.10.06. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 종래의 이온화 칼슘에서 나타나는 칼슘 흡수율 저하의 문제점을 해결하기 위해 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당으로 이루어지는 나노복합체를 제공하며, 상기 나노복합체의 제조방법 및 상기 나노복합체를 유효성분으로 함유하는 칼슘 흡수 증진용 건강식품을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당으로 이루어지며, 상기 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당의 정전기적 상호작용으로 이온화 겔화되는 것을 특징으로 하는 나노복합체를 제공한다.

[0009] 본 발명은 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당으로 이루어지며, 상기 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당의 정전기적 상호작용으로 이온화 겔화되는 나노복합체 및 칼슘을 유효성분으로 함유하는 칼슘 흡수 증진용 건강식품을 제공한다.

[0010] 본 발명은 카제인 포스포펩티드 용액 및 키토올리고당 용액을 준비하는 단계 (제1단계); 상기 용액을 혼합하는 단계(제2단계); 상기 혼합용액에 칼슘을 첨가하는 단계(제3단계); 및 상기 제3단계 혼합용액의 pH를 조절하는 단계(제4단계)로 이루어지는 세포 내 칼슘 흡수 증진용 나노복합체 제조방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 따른 나노복합체를 유효성분으로 함유하는 갈습 흡수 증진용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, CPP/CSO 나노복합체는 카제인 포스포펩타이드 (CPP) 농도 및 pH의 조건에 따라, 입자 크기가 조절되며, 상기 입자크기에 조절을 통하여 장 상피 세포로의 갈습 흡수율을 증가시킬 수 있음이 확인됨에 따라, 본 발명의 CPP/CSO 나노복합체는 세포 독성 없이 장 상피 세포 내로 갈습 흡수율을 향상시킬 수 있는 갈습 흡수 증진용 조성물로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 카제인 포스포펩타이드 농도에 따른 CPP/CSO 나노복합체의 물리화학적 특성을 확인한 결과로, 도 1A는 카제인 포스포펩타이드 (CPP) 농도 수준에 따른 CPP/CSO 나노복합체의 입자 크기를 확인한 결과이며, 도 1B는 CPP/CSO 나노복합체의 다분산도 (polydispersity index, PDI) 결과이며, 도 1C는 CPP/CSO 나노복합체의 제타 전위를 확인한 결과로, 다양한 농도 수준 (0.1%, 0.3% 및 0.5%, w/v)의 CPP 용액을 0.003%(w/v) CSO 용액과 혼합한 후 pH 6.5로 조절하였으며, 열의 다른 문자는 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타낸다.

도 2는 pH에 따른 CPP/CSO 나노복합체의 물리화학적 특성을 확인한 결과로, 도 1A는 pH에 따른 CPP/CSO 나노복합체 입자 크기를 확인한 결과이며, 도 1B는 CPP/CSO 나노복합체의 다분산도 (polydispersity index, PDI) 결과이며, 도 2C는 CPP/CSO 나노복합체의 제타 전위를 확인한 결과로, pH 5.5 및 6.5 조건에서 0.003%(w/v) CSO 용액과 0.3%(w/v) CPP 용액을 혼합하였으며, 열의 다른 문자는 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타내고 모든 통계적 분석은 SAS software package (2003)를 이용하였다.

도 3은 배양 32일 동안 Caco-2 세포 단층의 TEER (Trans epithelial electrical resistance)을 확인한 결과이다.

도 4는 0.01, 0.025 및 0.05 g/mL 농도의 CPP/CSO 나노복합체가 처리된 Caco-2 세포에서 세포독성을 확인한 결과로, 열의 다른 문자는 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타낸다.

도 5는 장내 갈습 흡수에 대한 CPP 농도 수준 및 pH의 영향을 확인한 결과로, 도 5A는 다양한 농도 수준 (0.1, 0.3, 0.5%, w/v)의 CPP 용액과 CSO 용액 (0.003%, w/v)을 혼합하고, pH 5.5 및 6.5으로 조절하여 확인한 결과이며, 데이터는 ANOVA (one-way analysis of variance)로 분석되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명은 기존의 이온화 갈습에서 나타나는 갈습 흡수율 저하의 문제점을 해결하기 위한 새로운 갈습 전달체를 연구하던 중 카제인 포스포펩티드와 갈습의 세포주위 흡수 촉진제 (paracellular absorption enhancer)로 작용하는 키토올리고당으로 이루어진 나노복합체가 장 상피 세포의 갈습 흡수율을 증가시키는 효과를 확인함에 따라, 본 발명은 완성하였다.

[0018] 본 발명은 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당으로 이루어지며, 상기 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당의 정전기적 상호작용으로 이온화 겔화되는 것을 특징으로 하는 나노복합체를 제공할 수 있다.

[0019] 보다 상세하게는 상기 나노복합체는 카제인 포스포펩티드 (casein phosphopeptide, CPP)의 음전하와 키토올리고당 (chitosan oligosaccharide, CSO)의 양전하 간의 정전기적 상호작용에 의해 이온화 겔화되는 것일 수 있다.

[0020] 상기 나노복합체는 카제인 포스포펩티드 97.1 내지 99.4 중량% 및 키토올리고당 0.6 내지 2.9 중량%가 포함되는 것일 수 있다.

[0021] 상기 나노복합체는 나노복합체 100 중량부에 대하여 생리활성물질 0.7 내지 3.2 중량부를 추가로 더 포함하는 것일 수 있으며, 보다 상세하게는 상기 생리활성물질은 갈습일 수 있다.

[0022] 본 발명은 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당으로 이루어지며, 상기 카제인 포스포펩티드 및 키토올리고당의

정전기적 상호작용으로 이온화 겔화되는 나노복합체 및 칼슘을 유효성분으로 함유하는 칼슘 흡수 증진용 건강식품을 제공할 수 있다.

- [0023] 상기 칼슘 흡수 증진용 건강식품은 조성물 총 100 중량부에 대하여, 나노복합체 96.9 내지 99.3 중량부 및 칼슘 0.7 내지 3.1 중량부를 포함하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 실시예에 따르면, 소장상피세포와 유사한 형태학적 및 기능적 특성을 가지는 Caco-2 세포주를 *in vitro* 모델로 이용하여 각각 0.1, 0.3 및 0.5 % (w/v) CPP로 제조된 CPP/CSO 나노복합체를 처리하여 각 CPP/CSO 나노복합체의 기능성 및 칼슘 흡수율을 확인하였다.
- [0025] 그 결과, 도 5와 같이 CPP 농도가 0.1% (w/v)에서 0.5% (w/v)로 증가함에 따라 Caco-2 세포 내 장내 칼슘 흡수는 147 μ g 에서 107 μ g로 유의적 ($p < 0.05$)으로 감소하였다.
- [0026] 상기 결과로부터 더 작은 입자크기를 나타내는 CPP 농도에서 타겟 세포인 장 상피세포와 머무름 시간 (retention time) 및 상호작용이 증가하여 나노복합체의 칼슘 흡수가 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0027] 또한, 5.5 및 6.5 pH 조건에서 각각 생성된 CPP/CSO 나노복합체를 Caco-2 세포주에 처리한 결과, 도 5B와 같이 pH가 5.5에서 6.5로 높아짐에 따라 Caco-2 내 칼슘의 흡수는 83.5에서 134 μ g 유의적 ($p < 0.05$)으로 증가하였다.
- [0028] 상기 결과로부터 pH가 증가함에 따라 복합체의 입자크기가 작아졌으며, CSO가 장 상피세포 사이의 공간인 밀착연접 (tight junction)을 열어주어 칼슘과 같은 미네랄의 세포간 (paracellular) 흡수가 증가한 것이 확인됨에 따라, 본 발명의 CPP/CSO 나노복합체는 장 상피세포 내로 칼슘 흡수율을 향상시킬 수 있음이 확인되었다.
- [0030] 본 발명은 카제인 포스포펩티드 용액 및 키토올리고당 용액을 준비하는 단계 (제1단계); 상기 용액을 혼합하는 단계 (제2단계); 상기 혼합용액에 칼슘을 첨가하는 단계 (제3단계); 및 상기 제3단계 혼합용액의 pH를 조절하는 단계 (제4단계)로 이루어지는 세포 내 칼슘 흡수 증진용 나노복합체 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0031] 상기 나노복합체는 카제인 포스포펩티드 97.1 내지 99.4 중량% 및 키토올리고당 0.6 내지 2.9 중량%가 포함되는 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 나노복합체에 있어서, 카제인 포스포펩티드가 상기 함량 범위 이상으로 포함될 경우, 복합체의 크기 증가로 인한 침전이 발생하는 문제점이 나타날 수 있으며, 상기 함량범위 이하로 포함될 경우, 나노복합체가 형성되지 않는 문제점이 나타날 수 있다.
- [0033] 상기 칼슘은 나노복합체 100 중량부에 대하여, 0.7 내지 3.2 중량부로 포함되는 것일 수 있다.
- [0034] 상기 제4단계 혼합용액의 pH는 5.5 내지 7.0인 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 나노복합체에 있어서, 상기 pH 범위 이상으로 높아질 경우, 복합체의 크기 증가 (예, > 400 nm) 및 균일하지 못한 입도 분포를 나타내어 나노복합체가 형성되지 않는 문제점이 나타날 수 있으며, 상기 pH 범위 이하로 낮아질 경우 복합체의 크기 증가 (예, > 300 nm) 및 균일하지 못한 입도 분포를 나타내어 나노복합체가 형성되지 않는 문제점이 나타날 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 따른 나노복합체를 유효성분으로 함유하는 칼슘 흡수 증진용 건강식품을 제공할 수 있다.
- [0038] 상기 건강식품은 나노복합체 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적절하게 결정될 수 있다.
- [0039] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0040] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.

[0042] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0044] <실험예>

[0045] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0047] 1. 재료

[0048] 카제인 포스포펩티드(CPP)는 Friesland Campina (Amersfoort, The Netherlands)에서, 키토올리고당(CSO)은 Amicogen Co. (Jinju, Korea)에서 제공 받았으며, 태아소혈청 (Fetal bovine serum, FBS)와 Dulbecco's modified Eagle medium(DEME)는 Hyclone(Logan, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0050] 2. 카제인 포스포펩티드/키토올리고당 나노복합체 제조

[0051] 카제인 포스포펩티드(CPP)와 키토올리고당(CSO)를 사용하여 변형된 이온화 겔화 (ionic gelation) 방법 (Ha et al., Formation and characterization of quercetin-loaded chitosan oligosaccharide/ β -lactoglobulin nanoparticle Food Research International 52(1): 82-90, 2013)으로 나노복합체를 제조하였다.

[0052] 다양한 농도(0.1 내지 0.5%, w/v)의 CPP 용액과 CSO (0.003 내지 0.005%, w/v)를 준비하여 혼합한 CPP/CSO 혼합용액에 CaCl_2 를 0.3 mM 농도로 첨가한 후 0.2 M HCl을 이용하여 pH를 5.5 내지 7.0으로 조절하여 나노복합체를 제조하였다.

[0053] 식품적용성 증진을 위해 제조된 나노복합체 용액을 -80°C 에서 24시간 이상 동결시킨 후 동결건조기(FD-1000, Tokyo Rikakikai Co., LTD, Japan)를 사용하여 분말화하였다.

[0055] 3. 세포 배양

[0056] Caco-2 세포주는 20% FBS와 1% 페니실린-스트렙토마이신 (penicillin-streptomycin, 10,000 U/mL, Gibco, Paisley, Scotland)을 첨가한 DMEM을 배양배지로 사용하여 37°C , 5% CO_2 하에서 계대배양하였으며, passage number 10-26과 30-36의 Caco-2 세포주를 사용하였다.

[0057] 나노 전달체의 세포 내 독성(cytotoxicity)과 세포 내 칼슘 흡수 평가를 위해 Caco-2 세포주를 1×10^5 cells/mL 밀도로 각각 96-well plate(Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Germany)와 24-well cell culture insert(transwell, polycarbonate membrane, 0.4 μm pore size, SPL life science, Seoul, Korea)에 분주한 후 48시간 마다 배지를 교체하며 4-5주간 배양한 후 세포의 증식을 통해 confluent 상태가 된 Caco-2 단 세포층(monolayer)를 실험에 사용하였다.

[0059] 4. 나노복합체의 세포독성(Cytotoxicity) 확인

[0060] CPP/CSO 나노복합체의 Caco-2 세포주에 대한 세포독성은 WST-1 assay 방법(Yeh et al., 2011)을 이용하여 나노 복합체 농도에 따른 세포 생존율을 확인하였다. Caco-2 세포주는 1×10^5 cells/mL 밀도로 96-well plate에 분주한 다음 48시간 후 phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척하고 나노복합체 함유 무혈청 배지(serum free DMEM) 100 μL 를 첨가하였다.

[0061] CPP/CSO 나노복합체의 농도(0.01, 0.025, 0.05 $\mu\text{g/mL}$)별 세포 독성을 확인하기 위해 10 μL 의 EZ-Cytox(Dogen, Seoul, Korea)를 각 well에 첨가한 다음 3시간 후 microplate reader(Multiskan EX, Thermo Electron, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Reference wavelength는 620 nm로 설정하였고,

세포생존율은 아래와 같은 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{흡광도(treatment - blank)}}{\text{흡광도(control - blank)}} \times 100$$

5. In vitro 칼슘 흡수(absorption) 확인

CPP/CSO 나노복합체의 장내 칼슘 흡수는 Caco-2 단세포층의 칼슘 흡수 측정을 통하여 확인하였다. 이를 위해 Caco-2 세포주를 1×10^5 cells/mL 밀도로 24-well cell culture insert에 분주한 후 confluent 상태가 되어 단세포층을 형성할 때까지 매 48시간 마다 배지를 교체하며 배양하였다. Caco-2 단세포층 형성 확인을 위해 transepithelial electrical resistance(TEER) 값을 측정하였으며, $330 \Omega \times \text{cm}^2$ 이상 도달하였을 때 단세포층이 형성되었음을 의미한다(Daengprok et al., 2003). TEER 값은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{TEER} = \text{resistance}(\Omega) (\text{treatment} - \text{blank average}) \times \text{growth area}(\text{cm}^2)$$

그 결과, 도 3과 같이 배양 기간이 증가함에 따라 TEER 값이 증가하였으며, 배양 32일째 TEER 값이 $332 \Omega/\text{cm}^2$ 이상으로 단세포층이 형성되었음을 확인하였다.

TEER 값이 $330 \Omega \times \text{cm}^2$ 이상 도달한 Caco-2 단세포주를 Hank's balanced salt solution without calcium and magnesium(HBSS)로 2회 세척하고 30분 동안 CO_2 배양기(37°C , 5% CO_2)에서 equilibration 한 후 칼슘 흡수 연구를 수행하였다.

Transwell 상단(apical slide)에 칼슘이 결합된 CPP/CSO 나노복합체를 첨가한 다음 60분간 반응시킨 후 Caco-2 단세포층을 통해 transwell 하단(basolateral side)으로 transport 된 칼슘의 농도를 측정하였다. 칼슘 농도는 Inductively Coupled Plasma(PerkinElmer, OPTIMA 4300DV, USA)로 측정하였다.

6. 통계분석

모든 실험결과는 3반복 후 평균 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ SD)로 표시 하였고, CPP농도 및 pH의 제조 공정요인이 나노복합체의 입자크기 등 차이는 one-way analysis of variance(one-way ANOVA)를 이용하여 그 유의차 $p < 0.05$ 를 분석하였다. Pearson's의 상관계수 분석은 종속 변수들 사이의 관계(입자 크기, 다분산 지수, 제타 전위, 흡수)를 결정하는데 사용되었다. 모든 통계 분석은 statistical analysis system(SAS) 프로그램을 사용하였다.

<실시예 1> 나노복합체의 물리화학적 특성 확인

1. 카제인 포스포펩티드(CPP) 농도에 따른 나노 복합체의 물리화학적 특성 확인

카제인 포스포펩티드(CPP)/키토올리고당(CSO) 나노복합체의 제조 공정 요인인 CPP 농도에 따른 나노복합체의 물리화학적 특성을 확인하기 위해, CPP 농도에 따른 나노복합체의 형성 여부와 물리화학적 특성을 입도 분석기 (particle size analyzer, Nano-ZS, Malvern, UK)를 사용하여 입자 크기 (particle size), 다분산 지수 (polydispersity index), 및 표면전하(zeta-potential)를 확인하였다.

그 결과, 도 1A와 같이 CPP 농도가 0.1에서 0.5%(w/v)으로 증가함에 따라 CPP/CSO 나노복합체의 크기가 181.2에서 248.2 nm로 유의적($p < 0.05$)으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. CPP의 등전위점은 ~ 3.1 이고, CSO의 pKa는 ~ 6.3 (Bhattacharai et al., 2010)로 보고됨에 따라, pH 6.5 에서 음전하를 지닌 CPP 농도가 증가함에 따라 양전하를 띠는 CSO와의 정전기적 상호작용(electrostatic interaction)을 통한 intermolecular association이 증가하게 되고 그 결과 나노복합체의 입자 크기가 증가된 것을 확인할 수 있었다.

또한, 도 1B와 같이 다분산 지수(polydispersity index, PDI)의 경우, CPP 농도에 따른 유의적인 차이는 없이 모두 0.3 이하로 입자 크기가 단분산(monodispersed) 형태를 지니고 있어 균일한(homogeneous) 입도 분포를 지

니는 것을 확인할 수 있었다.

[0081] 제타 전위(zeta potential)의 경우, 도 1C와 같이 CPP 농도가 0.1에서 0.5%(w/v)로 증가함에 따라 -18.2에서 -24.2 mV로 유의적($p<0.05$)으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0082] 상기 결과로부터 CPP 농도가 증가함에 따라 나노복합체는 음전하를 많이 지니게 되고 결과적으로 제타 전위가 감소한 것이 확인되었다.

[0084] 2. pH에 따른 나노복합체의 물리화학적 특성 확인

[0085] 카제인 포스포펩티드(CPP)/키토올리고당(CSO) 나노복합체의 제조 공정 요인인 pH (5.5 및 6.5)에 따른 나노복합체의 물리화학적 특성을 확인하기 위해, pH 조건에 따른 나노복합체의 형성 여부와 물리화학적 특성을 입도 분석기(particle size analyzer, Nano-ZS, Malvern, UK)를 사용하여 입자 크기(particle size), 다분산 지수(polydispersity index), 및 표면전하(zeta-potential)를 확인하였다.

[0086] 그 결과, 도 2A와 같이 pH 5.5에서 6.5로 증가함에 따라 CPP/CSO 나노복합체의 입자 크기가 215.9에서 189.3으로 유의적($p<0.05$)으로 감소하였다.

[0087] 다분산 지수의 경우, 도 2B와 같이 pH에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았으며 모두 0.3 이하로 나노복합체가 균일하게 제조된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 제타 전위의 경우, 도 2C와 같이 pH 5.5에서 6.5로 증가함에 따라 -18에서 -20.9 mV로 유의적($p<0.05$)으로 감소하였다.

[0088] 상기 결과로부터 pH의 증가는 CPP가 더 많은 음전하를 띠게 하여, CPP/CSO 나노복합체 입자 전하를 감소시키는 것으로 제안될 수 있다.

[0090] <실시예 2> CPP/CSO 나노복합체의 세포 독성 확인

[0091] 입자가 작은 나노복합체는 높은 세포 독성 문제를 야기할 수 있기 때문에 나노복합체의 안전성에 대한 연구가 증가하고 있다. 나노복합체는 기존의 미세(micro) 전달체에 비해 입자 크기가 작아(<200 nm) target 세포인 장 상피세포와 상호작용할 수 있는 표면적이 증가하기 때문에 생리활성물질의 흡수를 측면에서 큰 장점을 지닌다. 그러나 나노복합체 입자의 크기가 작아지면, 세포막 사이의 상호작용으로 세포막에 일시적 천공(poration)과 세포 내부로 침투 및 부착되어 세포 독성을 야기할 수 있기 때문에 CPP/CSO 나노복합체의 세포 독성을 확인하였다.

[0092] 그 결과, 도 4와 같이 CPP/CSO 나노복합체의 농도가 0.01 에서 0.05($\mu\text{g/mL}$)로 증가함에 따라 24시간 배양시간 동안 세포 생존율에 유의한($p<0.05$) 영향을 미치지 않았다. 또한, 나노복합체 처리 결과 90% 이상의 세포 생존율을 나타내는 것이 확인되었다.

[0093] 상기 결과로부터 CPP/CSO 나노복합체는 170.2에서 245.2 nm로 상대적으로 매우 작은 입자 크기에도 불구하고 세포에 매우 안전한 것이 확인되었다.

[0095] <실시예 3> CPP/CSO 나노복합체의 칼슘 흡수율 확인

[0096] Caco-2 세포주는 소장상피세포와 유사한 형태학적 및 기능적 특성을 가지고 있기 때문에 in vitro 모델로 Caco-2 세포주를 이용하여 CPP/CSO 나노복합체의 기능성 및 칼슘 흡수율을 확인하였다.

[0097] 그 결과, 도 5와 같이 CPP 농도가 0.1%(w/v)에서 0.5%(w/v)로 증가함에 따라 Caco-2 세포 내 장내 칼슘 흡수는 147 μg 에서 107 μg 로 유의적($p<0.05$)으로 감소하였다.

[0098] 상기 결과로부터 더 작은 입자크기를 나타내는 CPP 농도에서 target 세포인 장 상피세포와 머무름 시간(retention time) 및 상호작용이 증가하여 나노복합체의 칼슘 흡수가 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0099] 한편, 도 5B와 같이 pH가 5.5에서 6.5로 높아짐에 따라 Caco-2 내 칼슘의 흡수는 83.5에서 134 μg 유의적($p<0.05$)으로 증가하였다.

[0100] 상기 결과로부터 pH가 증가함에 따라 복합체의 입자크기가 작아졌으며, CSO가 장 상피세포 사이의 공간인 밀착

연접(tight junction)을 열어주어 칼슘과 같은 미네랄의 세포 사이(paracellular) 흡수가 증가한 것이 확인되었으며, Wina 등 (2005); He (2010) 연구에 의하면 Caco-2 세포주의 흡수에 있어 입자의 크기에 의해 영향을 받는다는 연구결과와 유사한 것이 확인되었다.

[0101] 상기 결과로부터 나노 입자의 세포 흡수는 크기 및 표면 전하와 같은 나노 입자의 다양한 형태학적 및 물리화학적 특성에 의해 영향을 받는 것이 확인되었다.

[0102] 이에 따라, CPP/CSO 나노복합체의 입자크기, 다분산 지수, 제타 전위, 장내 칼슘 흡수 간의 상관 관계를 확인하였다.

[0103] 그 결과, 표 1과 같이 나노복합체의 입자 크기와 장 내 칼슘 흡수는 음의 상관관계 [$r = -0.69$ ($p < 0.001$)]를 나타내는 것이 확인되었다.

[0104] 상기 결과들로부터 나노복합체 크기가 작을수록 Caco-2 세포막에 복합체의 uptake 후 체류 시간이 증가하게 되고, 입자 크기 감소에 따른 표면적 증가로 인하여 나노복합체와 Caco-2 세포 간의 상호작용 증가가 칼슘 흡수를 향상시키는 것이 확인되었다.

표 1

	Particle size	PDI	ZETA	Ca Absorption
Particle size	1			
PDI	0.84 **	1		
ZETA	-0.68 ***	-0.63	1	
Ca Absorption	-0.69 ***	-0.41	0.09	1

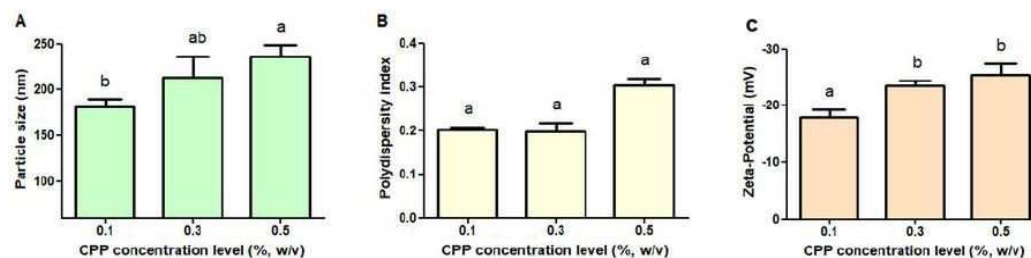
, * Significantly different at $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

[0105]

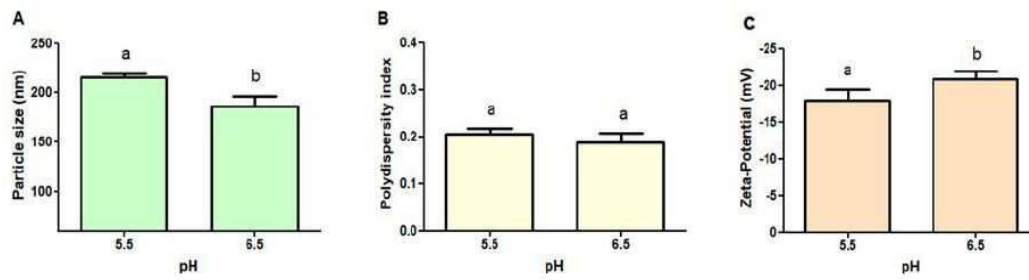
[0107] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

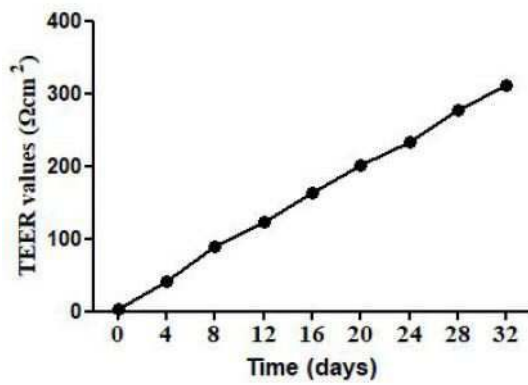
도면1



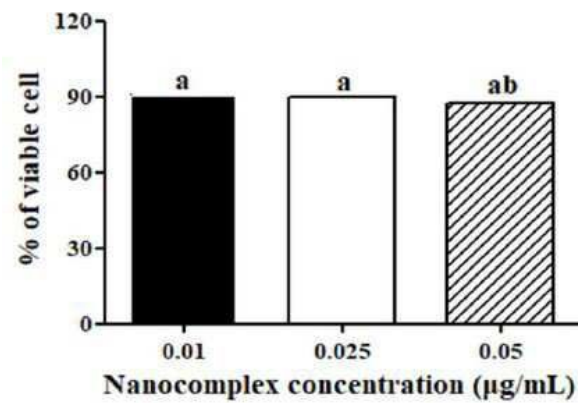
도면2



도면3



도면4



도면5

