



공개특허 10-2022-0049745

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0049745
(43) 공개일자 2022년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 15/08 (2006.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61K 47/38 (2006.01) *C08B 1/00* (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C08B 15/08 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0133226

(22) 출원일자 2020년10월15일
심사청구일자 2020년10월15일

(71) 출원인
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
(72) 발명자
임기택
강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트
112동 2308호
(74) 대리인
구현서

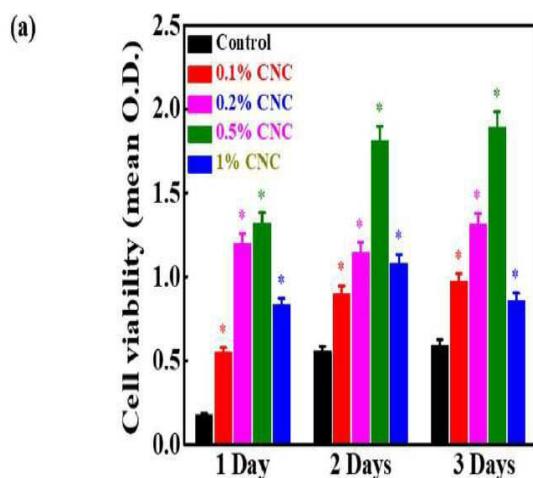
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 커피 부산물로부터 추출된 셀룰로오스 나노크리스탈 및 그 용도

(57) 요 약

본 발명은 커피 부산물을 화학적으로 처리하여 커피 부산물로부터 셀룰로오스 나노크리스탈을 얻는 방법 및 그 방법으로 얻어진 셀룰로오스 나노크리스탈을 조직 공학에 유용한 생체 물질로 적용할 수 있는 것이다.

대 표 도 - 도3a



(52) CPC특허분류

A61K 47/38 (2013.01)

C08B 1/003 (2013.01)

C12N 5/0662 (2013.01)

C12N 2533/78 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

커피 부산물을 화학적으로 처리하여 커피 부산물로부터 셀룰로오스 나노크리스탈을 얻는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 방법은 커피 부산물을 수산화칼륨 용액을 처리하고 산을 처리하여 중화한 후, 아염소 산나트륨(sodium chlorite) 및 초산을 첨가하여 반응시켜서 리그닌을 제거하는 과정을 포함하는 것을 특징으로 하는 커피 부산물로부터 셀룰로오스 나노크리스탈을 얻는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 방법에 의하여 얻어진 커피 부산물로부터 유래한 셀룰로오스 나노크리스탈.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 셀룰로오스 나노크리스탈의 평균 셀룰로오스 나노크리스탈 길이는 120 nm인 것을 특징으로 하는 커피 부산물로부터 유래한 셀룰로오스 나노크리스탈.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 셀룰로오스 나노크리스탈은 황산염 기를 가지는 것을 특징으로 하는 커피 부산물로부터 유래한 셀룰로오스 나노크리스탈.

청구항 6

제3항의 커피 부산물로부터 유래한 셀룰로오스 나노크리스탈을 인 비트로에서 세포에 처리하여 세포의 증식을 증가시키는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 세포는 인간 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 셀룰로오스 나노크리스탈을 세포에 처리하는 농도는 0.5%(w/v)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제3항의 커피 부산물로부터 유래한 셀룰로오스 나노크리스탈을 인 비트로에서 세포에 처리하여 세포의 광물화를 증가시키는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 셀룰로오스 나노크리스탈을 세포에 처리하는 농도는 0.5%(w/v)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제3항의 커피 부산물로부터 유래한 셀룰로오스 나노크리스탈을 인 비트로에서 세포에 처리하여 골형성 관련 유전자의 발현을 증가시키는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 골형성 관련 유전자는 BSP(bone sialoprotein)인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 커피 부산물로부터 추출된 셀룰로오스 나노크리스탈 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

커피는 전 세계적으로 가장 인기있는 음료 중 하나이며, 전 세계적으로 연간 1 억 5 천만 톤의 생산으로 추정되는 산업으로 확산되었으며, 많은 커피 부산물이 커피 펄프, 커피 찌꺼기 등의 형태로 생산된다. 이러한 부산물에 대한 이용이 제한되고, 직접 폐기는 카페인, 탄닌 및 폴리 폐놀과 같은 독성 성분으로 인해 환경에 악영향을 미칠 수 있다. 따라서 이들 부산물을 유용한 재료로 변환에 활용할 수 있는 적절하고 경제적인 방법의 개발이 필요하다.

[0003]

셀룰로오스는 지구상에서 가장 풍부한 바이오 폴리머이며 식품, 바이오 연료 및 제약 분야에서 널리 연구되고 있다. 그것은 구조에 비정질 및 결정질 영역이 있다. 셀룰로오스의 산 가수 분해는 셀룰로오스 나노 결정 (CN C)으로 알려진 나노 미터 고도로 결정질 구조를 생성한다. CNC는 매크로 아날로그 구조가 아닌 우수한 물리 화학적 특성으로 인해 다양한 응용 분야에서 많은 주목을 받았다.

[0004]

[선행특허 문헌]

[0005]

대한민국 특허공개번호 제1999-0063952호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 커피 부산물로부터 유용한 재료를 얻는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007]

상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 커피 부산물을 화학적으로 처리하여 커피 부산물로부터 셀룰로오스 나노크리스탈을 얻는 방법을 제공한다.

[0008]

본 발명의 일 구현예에 있어서,

[0009]

상기 방법은 커피 부산물을 수산화칼륨 용액을 처리하고 산을 처리하여 중화한 후, 아염소 산나트륨(sodium chlorite) 및 초산을 첨가하여 반응시켜서 리그닌을 제거하는 과정을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0010]

또 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의하여 얻어진 커피 부산물로부터 유래한 셀룰로오스 나노크리스탈을 제공한다.

[0011]

본 발명의 일 구현예에 있어서,

[0012]

상기 셀룰로오스 나노크리스탈의 평균 셀룰로오스 나노크리스탈 길이는 120 nm인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013]

본 발명의 다른 구현예에 있어서,

- [0014] 상기 셀룰로오스 나노크리스탈은 황산염 기를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0015] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 커피 부산물로부터 유래한 셀룰로오스 나노크리스탈을 인 비트로에서 세포에 처리하여 세포의 증식을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서,
- [0017] 상기 세포는 인간 중간엽 줄기세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서,
- [0019] 상기 셀룰로오스 나노크리스탈을 세포에 처리하는 농도는 0.5%(w/v)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0020] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 커피 부산물로부터 유래한 셀룰로오스 나노크리스탈을 인 비트로에서 세포에 처리하여 세포의 광물화를 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서,
- [0022] 상기 셀룰로오스 나노크리스탈을 세포에 처리하는 농도는 0.5%(w/v)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0023] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 커피 부산물로부터 유래한 셀룰로오스 나노크리스탈을 인 비트로에서 세포에 처리하여 골형성 관련 유전자의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서,
- [0025] 상기 골형성 관련 유전자는 BSP(bone sialoprotein)인 것이 바람직하나 ○ld에 한정되지 아니한다.
- [0026] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0027] 본 발명에서 우리는 화학적 처리를 통해 커피 찌꺼기에서 CNC를 추출하고 골수 유래 줄기 세포 (BMSCs) 존재 하에서 골 형성 가능성 평가했다. 수득된 물질은 FTIR, XRD 및 TGA 측정으로 특성화되었다. 커피에서 추출한 CNC의 존재에서 골 형성이 크게 향상되었다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에서 알 수 있는 바와 같이, CNC는 커피 찌꺼기에서 성공적으로 추출되었으며 다양한 분광 기술로 특성을 살펴 보았다.
- [0029] 추출된 CNC는 열 안정성이 감소 된 바늘 모양의 결정 형태를 나타냈다. BMSC의 존재 하에서 CNC의 부작용이 관찰되지 않아 생체 적합성을 나타내었고, 세포 생존력은 배지에서 CNC 내용물에 의해 크게 영향을 받았다.
- [0030] 향상된 광물화 및 골 형성 발생이 대조군과 비교하여 CNC 처리된 배지에서 나타났고, 이것은 그들의 우수한 골 형성 잠재력을 나타낸다.
- [0031] 따라서 화학적 처리는 폐 커피박을 조직 공학에 유용한 생체 물질로 성공적으로 전환시킨다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1 (a)는 커피 찌꺼기에서 CNC 추출에 대한 개략도이고,
- (b)는 추출된 CNC의 TEM 이미지이며,
- (c)는 추출된 셀룰로오스 및 CNC의 FTIR 스펙트럼.
- 도 2는 추출된 셀룰로오스와 CNC의 (a) XRD 패턴 및 (b) TGA 곡선,
- 도 3(a)는 추출된 CNC의 존재 하의 BMSC의 세포 생존력이고, (b)는 CNC를 사용하거나 CNC를 사용하지 않은 BMSC의 현미경 형광 이미지이며,
- 도 4(a)는 추출된 CNC의 광물화 능력이고, (b)는 기재된 기간에서 CNC를 사용하거나 CNC 없이 골 형성 유전자 발현을 나타낸 그림.

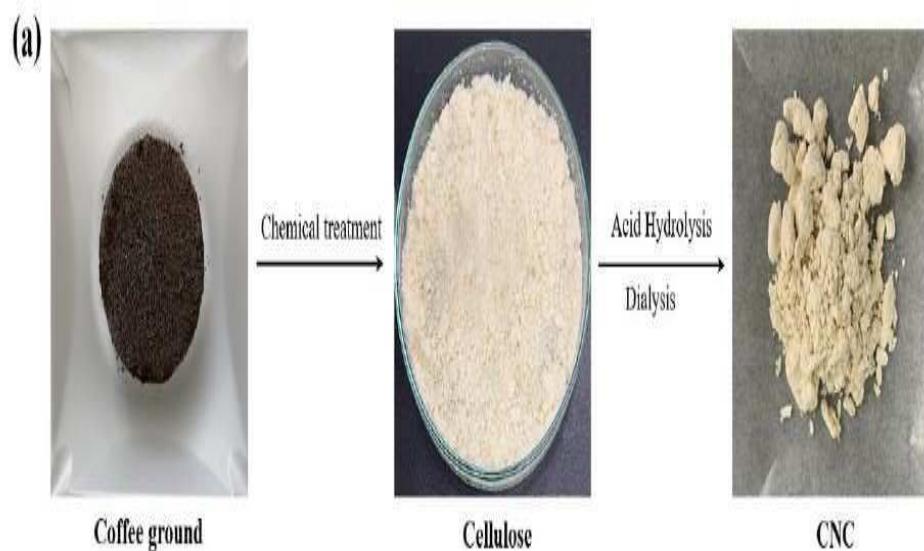
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0034] 실시예 1: 커피 부산물로부터 CNC 추출 및 특성화
- [0035] CNC 추출
- [0036] 커피 찌꺼기에서 CNC 추출은 이전에 보고된 것을 약간 수정하여 수행되었다 [S. Sung, Y. Chang, J. Han, Carbohydr. Polym. 169 (2017) 495-503. doi:10.1016/j.carbpol.2017.04.0375].
- [0037] 요약하면, 건조된 커피 부산물 분말 (30g)을 연속 기계적인 교반과 함께 90 ° C에서 2 시간 동안 1:12의 중량비로 3%(w/v) 수산화 칼륨(KOH; Sigma-Aldrich, USA)으로 처리했다. KOH 처리된 커피 부산물 분말을 중류수 (D I)로 세척한 후 10 % (v/v) 염산(HCl; Wako Pure Chemicals Co., Japan)으로 중화했다. 중화된 샘플을 여과하고 60 ° C에서 48 시간 동안 건조시켰다.
- [0038] 건조된 물질(14.26g)을 아염소산 나트륨 (대한민국, 대중 화학)과 아세트산을 용액에 존재하는 고형분 1.2g 대 240 μL의 비율로 처리하여 리그닌을 제거하였다.
- [0039] 이 과정을 6 회 반복한 후 잔류물을 탈 이온수로 세척하고 동결 건조 (Freeze Dryer, EYELA Freeze Drying Unit 2200, Tokyo Rikakikai Co., Japan)를 24 시간 동안 진행하였다.
- [0040] 잔류 물질 (3.14g)을 수산화 나트륨(NaOH; Sigma-Aldrich, USA) 및 10 % 아세트산 (v/v)으로 50 분 동안 연속 교반하면서 처리하여 헤미셀룰로오스를 제거하였다.
- [0041] 그 후, 그 물질을 탈 이온수로 세척하고 여과하여 순수한 셀룰로오스를 얻었다.
- [0042] 얻어진 셀룰로오스 (1.25g)를 64 % 황산(H₂SO₄; 대중 화학, 대한민국)으로 45 ° C에서 60 분간 처리한 후 10 배의 냉장 탈이온수를 첨가하여 반응을 급냉시켰다. 그 얻어진 물질을 셀룰로오스 튜브(12-14 kDa)로 3-4 일 동안 투석하였다.
- [0043] Perkin Elmer FTIR 분석기(Frontier, Perkin Elmer, UK)를 적용하여 4cm⁻¹의 해상도로 500-4000cm⁻¹ 범위의 기능기를 관찰하였다.
- [0044] 구조적 특성은 X' Pert PRO X 선 회절계(X' Pert PRO MPD, Philips, Eindhoven, Netherlands)에 의해 확인하였다. 크기와 형태는 투과 전자 현미경 (TEM) (JEM 2100F, Jeol, Japan)에 의해 결정되었다. 수득된 물질의 열 안정성은 열 중량 분석기(TGA) (SDT Q600, TA Instruments, USA)를 통해 평가되었다.
- [0045] 실시예 2: 세포 배양 및 골 형성
- [0046] 골수 유래 중간엽 줄기 세포(BMSC)는 대한민국 서울에 있는 서울대학교 소재 한국 세포주 은행 (KCLB)에서 받아 이전에 다른 곳에서 보고된 바와 같이 배양하였다[D. Patel, S. Dutta, J. Hexiu, K. Ganguly, K. Lim, Int. J. Biol. Macromol. 162 (2020) 1429-1441. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.2468].
- [0047] CNC 존재 하에서 BMSC 유래 광물화 및 골 형성 관련 유전자 발현은 본 발명자들의 기존 논문[H. Kim, B. Jin, D. Patel, J. Kim, J. Kim, H. Seonwoo et al., IEEE Trans. Nanobioscience. 18 (2019) 463-468. doi:10.1109/tnb.2019.2914127]과 같이 수행되었다.
- [0048] 상기 실시예의 결과는 하기에서 서술한다.
- [0049] 커피 찌꺼기에서 CNC 추출에 대한 개략도는 그림 1 (a)에 나와 있다. 수득된 샘플은 화학적 처리로 대부분의 비(non)-셀룰로오스 성분이 제거되었음을 나타내는 상당히 흰색이었다.
- [0050] 산 가수 분해된 CNC의 TEM 이미지는 그림 1(b)에 나와 있다.
- [0051] 산 가수 분해는 매우 결정적이고 바늘과 같은 구조를 생성하고 이것은 무정형 셀룰로오스 영역의 제거를 시사한다.
- [0052] 얻은 CNC의 평균 길이는 약 120nm이다. FTIR 분광기는 작용기와 관련된 정보를 가능하게하는 강력한 분석 기술이다. 커피 찌꺼기에서 추출한 셀룰로오스와 CNC의 FTIR 스펙트럼은 그림 1 (c)에 나타내었다.

- [0053] 1700cm^{-1} 에서 FTIR 흡수 피크의 출현은 해미셀룰로오스의 아세틸 그룹이 존재함을 나타내는 반면, 이 피크의 강도는 CNC에서 약화되었다.
- [0054] CNC에서 813 cm^{-1} 에 추가 피크의 존재는 구조에 황산염 기가 존재함을 시사한다.
- [0055] CNC의 FTIR 스펙트럼은 셀룰로오스와 유사한 패턴을 나타내며, 이는 산 가수분해에 의해 일어난 셀룰로오스의 분자 구조에 큰 변화가 없음을 보여준다. 추출 된 셀룰로오스와 CNC의 XRD 패턴은 그림 2 (a)와 같다.
- [0056] 셀룰로오스의 XRD 패턴은 ~ 11.9 , 21.5 및 22.4° 에서 3 개의 두드러진 회절 피크를 나타내어 셀룰로오스 I 및 셀룰로오스 II 구조를 시사한다.
- [0057] 11.9° 에서 회절 피크는 CNC에서 관찰되지 않는 무정형 셀룰로오스 영역의 존재로 인해 나타나며 산 가수 분해 동안 무정형 영역의 제거를 더욱 확인한다.
- [0058] 22.4° 에서 뚜렷한 결정질 피크가 관찰되었으며 강도가 강화되어 결정질 CNC가 있음을 나타낸다.
- [0059] TGA는 추출한 물질의 열 안정성을 결정하고 그 결과는 그림 2 (b)에 나와 있다.
- [0060] 셀룰로오스에 비해 그 구조에 황산염 기가 존재하기 때문에 CNC의 열 안정성이 감소하는 것이 관찰되었고 이것은 열 전도성이 높고 열 전달과 빠른 열 분해를 촉진한다.
- [0061] 셀룰로오스 및 CNC의 10 % 중량 손실은 각각 204 및 162°C 에서 발생했다. $\sim 100^\circ\text{C}$ 아래 지역의 열 분해는 결합된 물 분자의 손실로 인한 것이다.
- [0062] 셀룰로오스 구조의 손실은 $\sim 200^\circ\text{C}$ 이후 발생했으며, 이것은 각각 CNC에서 $\sim 320^\circ\text{C}$ 및 380°C 후에서 탄소 잔기의 빠른 해중합(depolymerization)이 수반되었다.
- [0063] 추출된 CNC의 세포 독성은 WST-1 assay를 통해 평가하였으며 그 결과는 도 3 (a)와 같다.
- [0064] 특히, 대조군보다 CNC 처리 그룹에서 더 나은 세포 생존력이 관찰되어 생체 적합성을 나타낸다.
- [0065] 세포 생존력은 CNC의 함량에 크게 영향을 받았으며, 처리된 그룹 중 0.5 % CNC는 우수한 세포 생존력을 나타냈다. BMSC의 현미경 형광 이미지는 그림 3 (b)에 나와 있다.
- [0066] 현미경 이미지는 길쭉한 세포 구조를 보여 주며 세포는 건강했다. 추출된 CNC 광물화 잠재력은 처리 7 일 및 14 일 후에 BMSC를 사용하여 ARS 프로세스를 통해 모니터링되었다.
- [0067] 그 결과는 그림 4 (a)에 제시되어 있다. 샘플이 없는 배지는 대조군으로 취급되었다.
- [0068] CNC 처리 그룹은 대조군에 비해 더 우수한 광물화 잠재력을 보여주는 더 현저한 광물화를 나타냈다. 이것은 향상된 세포 활동을 촉진하는 CNC의 더 나은 생체 적합성에 기인한다.
- [0069] 추출된 CNC에서 BMSC의 골 형성 관련 유전자 발현은 실시간 PCR로 평가되었으며 데이터는 그림 4(b)에 나와 있다. 이 경우 더 나은 광물화 활성으로 인해 0.5 % CNC를 사용했다.
- [0070] 7 일 배양 후 대조군과 비교하여 CNC 처리 배지에서 골 형성 관련 유전자 (Runx2, Osx, ALP, BSP, OCN, COL1 및 OPN)의 발현 향상이 발생했으며, 이는 처리 시간에 따라 더욱 증가하였고 이것은 그들의 뛰어난 골 형성 능력을 나타낸다.

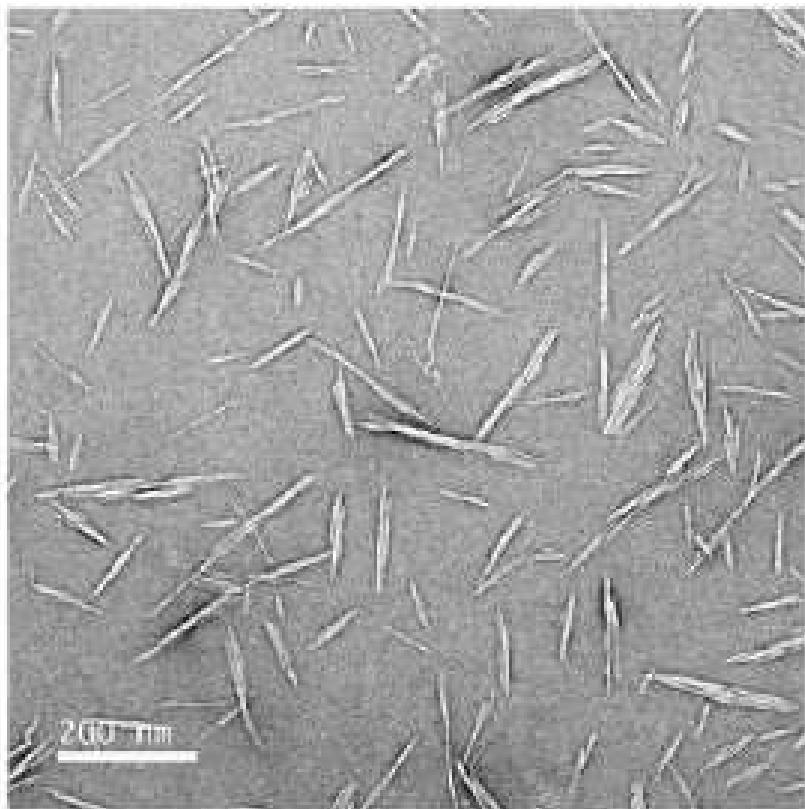
도면

도면 1a

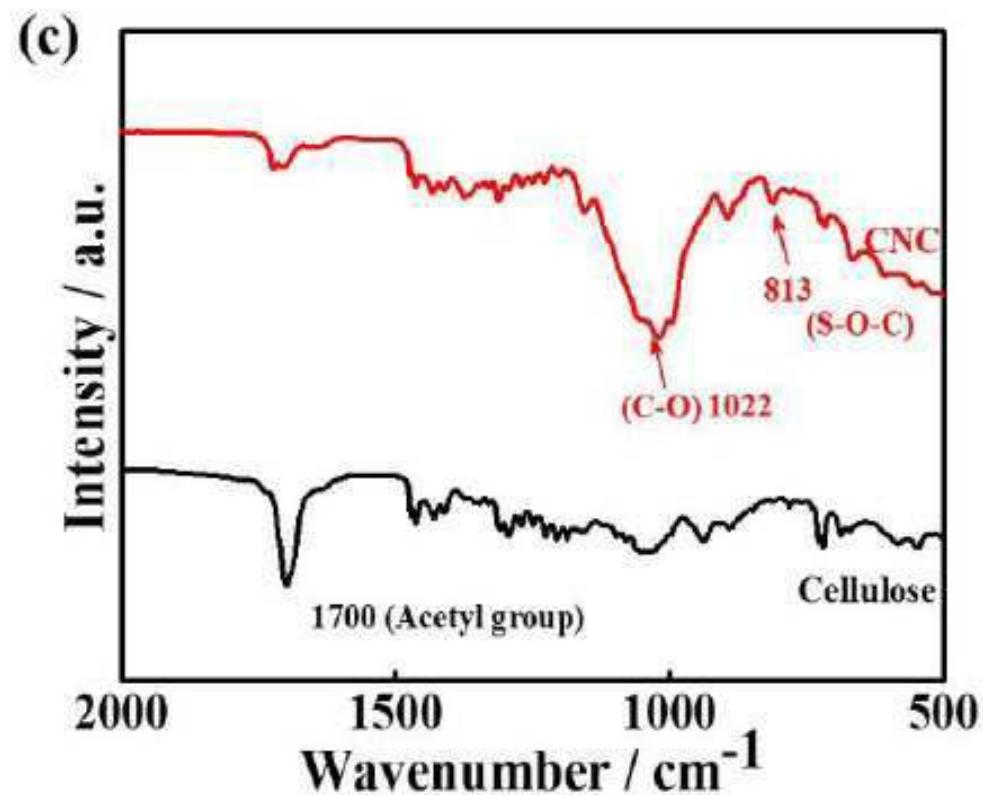


도면 1b

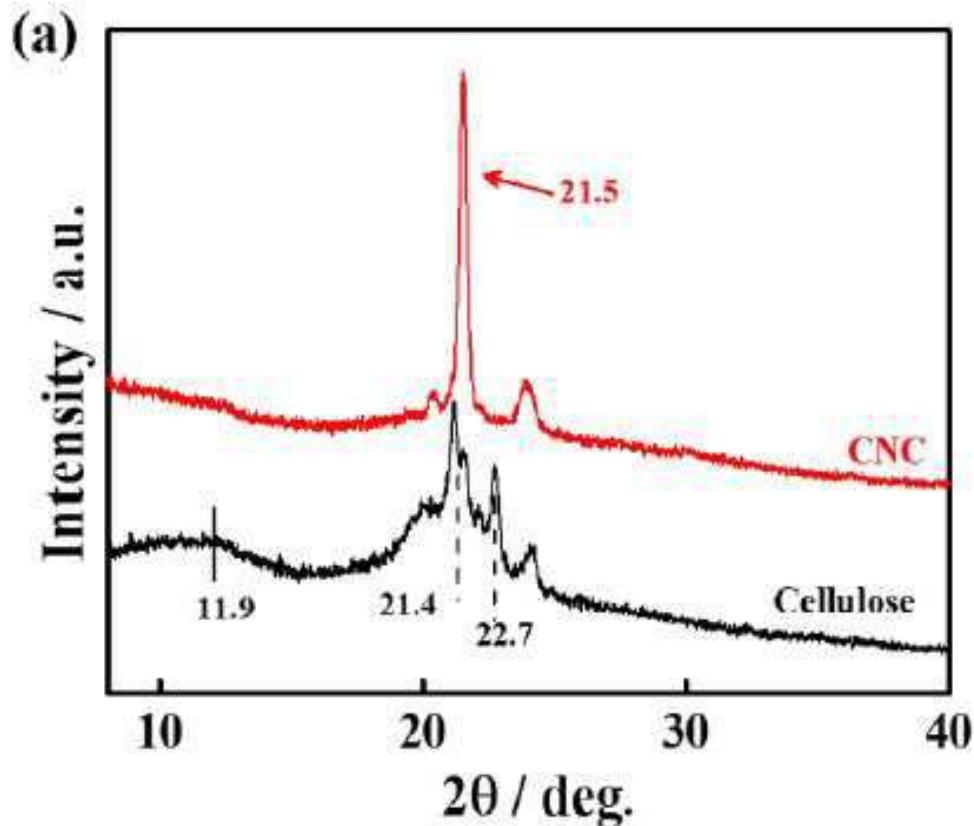
(b)



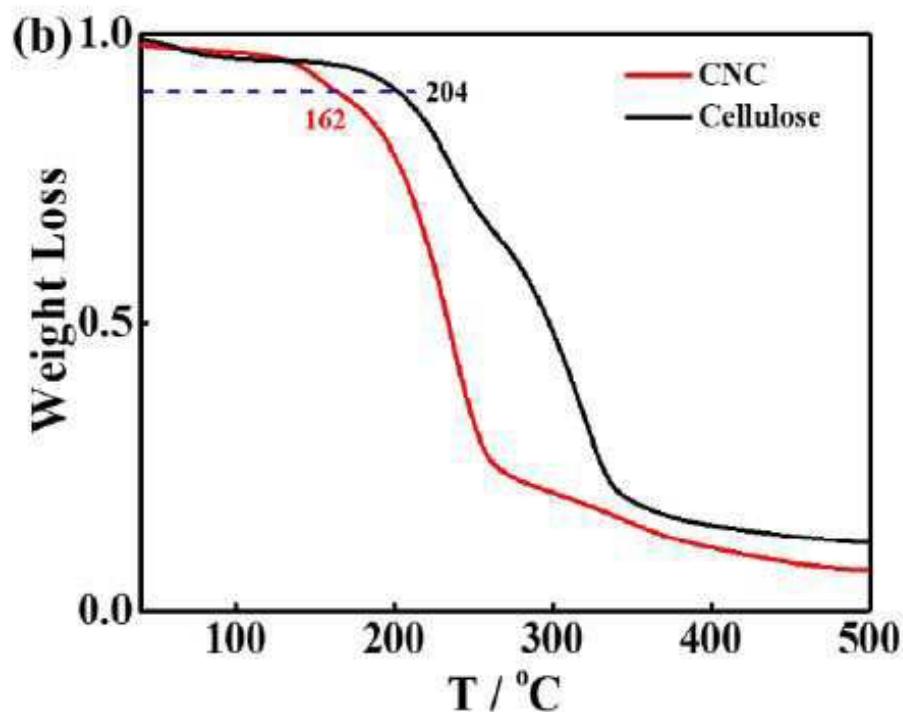
도면 1c



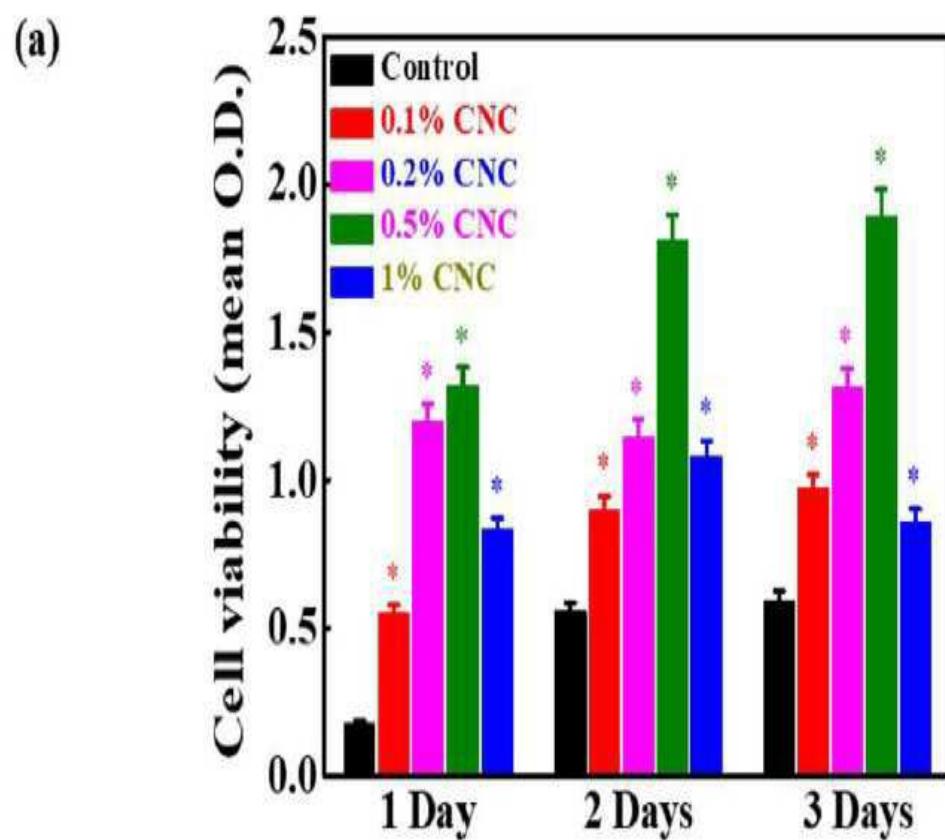
도면 2a



도면2b

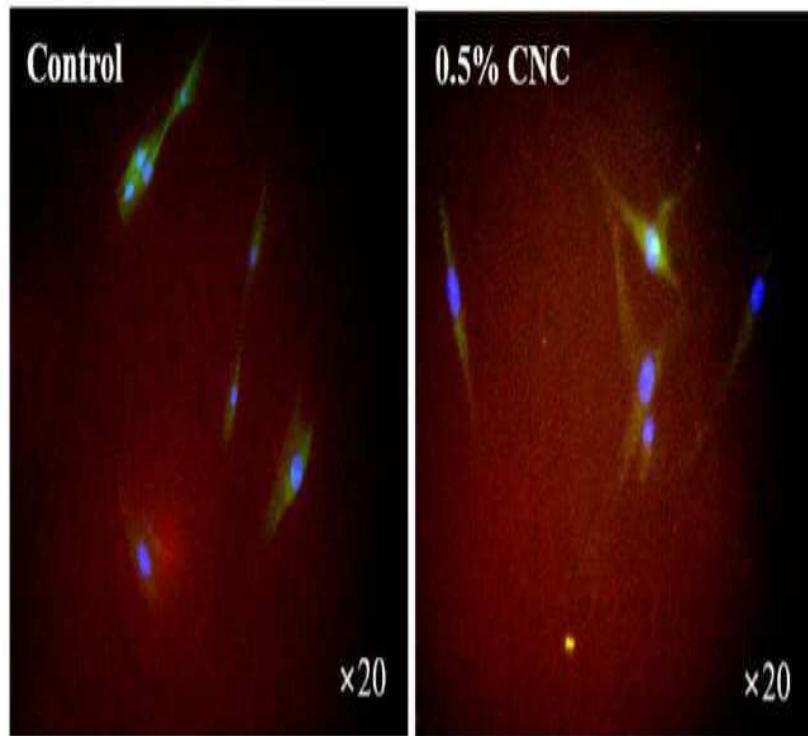


도면3a



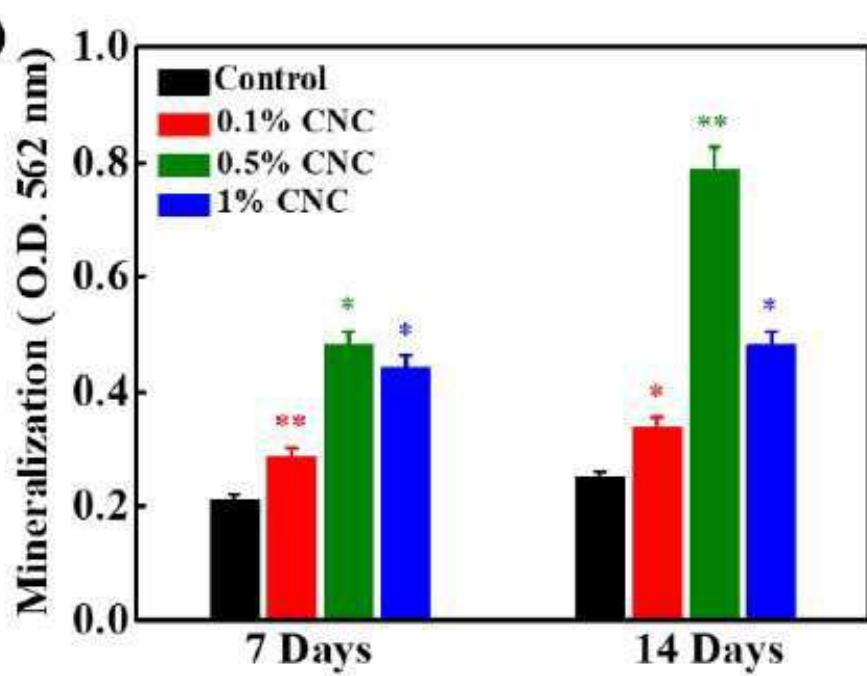
도면3b

(b)



도면4a

(a)



도면4b

