Appl. Chem. Eng., Vol. 34, No. 2, April 2023, 121-125
https://doi.org/10.14478/ace.2023.1004

Article

다양한 금속 이온을 이용한 카세인 단백질 나노입자 형성 및 약물 전달체 특성 연구

김민주 · 이슬기 · 최준식†

충남대학교 생화학과
(2023년 1월 5일 접수, 2023년 1월 30일 수정, 2023년 2월 4일 채택)

Preparation and Characterization of Casein Nanoparticles with Various Metal Ions as Drug Delivery Systems

Minju Kim, Seulgi Lee and Joon Sig Choi†

Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea
(Received January 5, 2023; Revised January 30, 2023; Accepted February 4, 2023)

초 록

카세인(casein)은 포유류의 우유에서 발견되는 단백질로 우유에서는 80% 이상 함유되어 있다. 사람의 모유에는 약 20~45%가 포함되어 있으며 생체 적합성이 높아 의료 및 산업 소재로 사용되고 있다. 카세인은 양친매성 구조로 내부는 소수성이기 때문에 수용액에서 마이셀로 자가 조립이 가능하여 난용성 약물을 봉입할 수 있다. 또한, 단백질 고분자 소재로 생분해성을 갖고 있어 약물의 전달체로서 적합한 특징을 가진다. 본 연구에서는 칼슘 이온 외에 마그네슘, 아연, 철 등 생체 내 존재하는 다양한 금속 이온들을 사용하여 각각 효과적인 카세인 나노입자 형성 조건을 규명하였다. 동적 광산란 측정기와 제타 전위 측정을 통해 150 nm 이하의 균일한 사이즈를 유지하고 음전하를 띠는 나노입자가 형성됨을 확인하였다. 또한, 각각의 카세인 나노입자가 HeLa 세포주에서 80% 이상의 생존율을 나타내 낮은 세포 독성을 확인하였고, 카세인 나노입자 내부에 시험 약물로서 나일 레드를 봉입하여 세포 내부로 효과적으로 유입됨을 공초점 현미경으로 입증하였다. 본 실험들을 통해 제조된 카세인 나노입자의 약물 전달체로서의 가능성을 확인하였다.

Abstract

Casein is a milk protein and one of the most important nutrients in milk. The composition is over 80% in cow's milk and about 20~45% in human's milk. Casein is highly biocompatible and biodegradable, so it has been studied for various biomedical materials applications as well as drug delivery systems. It is widely known that casein can be prepared as nanoparticles in the presence of the Ca^{2+} metal ion. Because casein is amphiphilic, hydrophobic drugs could be loaded inside to form a protein-based drug delivery system. In this study, we studied the optimum conditions for casein nanoparticle formation using natural metal ions present in the body, such as calcium, magnesium, zinc, and iron. It was confirmed that nanoparticles have a uniform size of around 150 nm and negative zeta potential values. In addition, it was demonstrated that casein nanoparticles have a cell viability of more than 80% and efficient intracellular uptake properties using confocal microscopy. From the results, it was also shown that the casein nanoparticles prepared using various metal ions have the potential to be biocompatible drug delivery carriers.

***Keywords**: Casein, Metal ion, Nanoparticle, Drug delivery*

1. 서 론

인구의 증가에 따른 사회적 환경은 암, 박테리아 감염, 유전병 등의 여러 질병을 발생시켰고, 이를 치료하기 위한 약물의 개발도 활발히 이루어졌다. 천연물에서 유래된 약물부터 합성 의약품까지 다양한 약물들이 개발되었으며, 약물들의 물에 대한 난용성, 비특이적인 전달에 의한 정상 세포의 손상 등의 문제점을 극복하기 위해 약물 전달 시스템(drug delivery system, DDS)이 연구되었다. 그 중 나노입자를 이용한 약물 전달 시스템은 고분자(polymer), 단백질(protein), 마이셀(micelle), 리포좀(liposome) 등이 있다. 각각의 구성 물질의 특성에 따라 물리 · 화학적 성질이 다르기 때문에 약물의 특성을 고려하여 선택적으로 디자인이 가능하다는 장점을 갖고 있다[1,2]. 특히, 단백질을 이용한 나노입자는 생체 적합성 물질로서 독성이 낮고 인체 내 면역반응을 거의 일으키지 않는다. 약물 전달체로 쓰이는 단백질은 젤라틴(gelatin), 콜라겐(collagen), 알부민(albumin), 카세인(casein) 등이 존재하는데, 카세인은 포유류의 우유에 함유되어 있는 단백질로 생체적합성과 생분해성이 우수하고 식이 단백질이기 때문에 제약, 의료산업,

† Corresponding Author: Chungnam National University
Department of Biochemistry, Daejeon 34134, Republic of Korea
Tel: +82-42-821-5489 e-mail: joonsig@cnu.ac.kr

pISSN: 1225-0112 eISSN: 2288-4505 @ 2023 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. All rights reserved.

기능성 식품 등 다양한 분야에서 적용될 수 있다[3]. 카세인은 αS1, αS2, β, κ와 같이 4개의 펩타이드 구성 성분이 있으며, 양친매성으로 물에서 마이셀을 형성할 때 α, β는 상대적으로 소수성으로 내부에 존재하고 κ는 글리코실화된 친수성 부분으로 표면에 존재한다. 입자 표면이 인산화되어 음전하를 가지기 때문에 칼슘, 프롤린(proline)과 글루탐산(glutamate) 잔기와의 이온 결합을 통해서 50~300 nm 크기의 마이셀을 형성할 수 있다. 또한 여러 개의 금속 결합 부위를 가지고 있어 칼슘과 같은 금속 이온과 결합하여 자가 조립을 통해 열역학적으로 안정한 마이셀을 형성하면서 구조가 안정화된다. 이러한 성질을 이용하여 카세인의 내부에 소수성 약물을 봉입하여 암세포를 수동적 표적 지향하여 전달할 수 있다[4-7].

카세인의 특성을 이용한 약물 전달은 세레콕시브(celecoxib), 독소루비신(doxorubicin), 파클리탁셀(paclitaxel), 커큐민(curcumin)과 같은 항염・항암제를 봉입한 카세인 나노입자와 금・은 나노입자의 표면에 카세인을 코팅한 나노입자, pH 특이적인 특성을 이용한 약물 전달 시스템 등이 보고되었고[8-14], 나아가 경구용 전달(oral delivery) 시스템이나[15,16] 필름화, 바이오센서로의 응용 가능성도 보고되었다[17,18].

카세인 단백질 입자는 약물 전달체로써의 응용 가능성을 가지며, 인체 내 적합한 물질로써의 높은 가능성을 지니고 있다. 본 연구에서는 기존 연구에서 사용된 칼슘 이온 외에 마그네슘, 아연, 철 등 생체 내 존재하는 다양한 금속 이온들을 사용하여 균일한 카세인 나노입자의 형성이 가능함을 확인하였고, 수용액의 조건 변화에 따른 입자의 물성변화와 안정성을 동적 광산란 측정기(dynamic light scattering, DLS)를 이용하여 측정하였다. 또한, 세포독성을 통해 카세인 입자의 인체 내 안정성을 확인하였고, 카세인 나노입자 내부에 소수성 형광염료인 나일 레드를 모델 약물로서 봉입하여 세포 내부로의 침투성을 공초점 현미경을 통해 확인하였다. 본 연구를 통해 카세인과 다양한 금속 이온 사이 상호작용을 조사하고 카세인 나노입자의 약물 전달체로서의 입자 안정성과 생체 적합성, 세포 내 약물 전달 기능성에 관한 가능성을 평가하였다.

2. 실 험

2.1. 실험재료

본 연구에서 사용된 sodium caseinate (NaCas), calcium chloride dihydrate ($CaCl_2$), iron(Ⅱ) chloride ($FeCl_2$), zinc chloride ($ZnCl_2$), nile red, methanol (MeOH), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. Magnesium chloride hexahydrate ($MgCl_2$)는 Duksan (Ansan, Korea)에서 구매했다. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), fetal bovine serum (FBS)는 Welgene (Gyeongsan, Korea)에서 구매하였다. Trypsin-ethylenediamine- tetraacetic acid (EDTA) solution과 antibiotic-antimycotic (100×)는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA) 사에서 구입하였다. WST-8 assay cell viability kit는 Biomax (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)사에서 구매하였다.

2.2. Casein 나노입자 형성

NaCas를 증류수에 녹여 2% 용액을 준비하였다[10]. 카세인 2% 용액 3 mL와 금속 이온 수용액을 최종 농도가 각각 5 mM, 7.5 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM, 20 mM이 되도록 첨가하고 15분 동안 교반하였다. 교반 후, 2,000 rpm에서 2분 동안 원심 분리하여 상층액만 수득하였다. 카세인 나노입자의 크기는 동적광산란 측정기 ELSZ-2000S (Photal, Otsuka Electronics, Otsuka, Japan)를 이용하여 측정하였고, 표면 전하는 Zetasizer Nano ZS (Malvern, London, UK)로 측정하였다.

2.3. Cell media, DPBS 내 안정성

DPBS, serum-free DMEM, full DMEM 용액에 각각 카세인 나노입자를 24시간 동안 노출시켰다. DLS로 입자의 크기 변화를 측정하였다.

2.4. 카세인 나노입자 독성 평가

세포주는 HeLa (human epithelial ovary carcinoma)를 사용하였다. FBS 10%와 1% antibiotics를 포함한 DMEM으로 37 °C, 5% CO_2에서 배양시켰다. 세포 내 독성을 평가하기 위해 WST-8 assay방법을 수행했다. 96 well plate에 10,000 cells/well의 세포를 37 °C, 5% CO_2에서 24시간 배양 후에 casein/$CaCl_2$, casein/$MgCl_2$, casein/$ZnCl_2$, casein/$FeCl_2$를 0.125, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 mg/mL의 농도로 준비하여 10 μL씩 처리하였다. 대조군으로는 PEI 25kDa을 처리하고 24시간 후에 WST-8 시약을 각 well에 10 μL씩 처리 후에 ELIZA VERSAmax microplate reader (Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 카세인 나노입자에 나일 레드 봉입

나일 레드(nile red)를 메탄올에 1 mg/mL농도로 녹이고, 유리 바이알에 100 μL를 정량하였다. 이후, 질소 가스로 용매를 증발시켜 필름 상태로 만든 후 카세인 2% 용액 3 mL 및 금속이온 용액을 넣고 1시간 동안 초음파에서 균질화하였다($CaCl_2$와 $MgCl_2$는 10 mM, $ZnCl_2$는 3.5 mM, $FeCl_2$는 3 mM). 처리 후, 18시간 동안 4 °C에서 교반하였다. 18시간 후, 3,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액만 수득하였다. UV-Vis spectrophotometer (Optizen POP, K Lab, Daejeon, Korea)로 555 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 나일 레드의 캡슐화 효율(encapsulation efficiency)을 계산하였다.

2.6. 세포 내 유입 공초점 현미경 관찰

HeLa 세포주를 8 well plate에 20,000 cell/well로 분주하고, 24시간 배양하였다. 나일레드가 봉입된 카세인 나노입자들을 처리하였고, casein/$CaCl_2$, casein/$MgCl_2$, casein/$ZnCl_2$, casein/$FeCl_2$의 나일 레드 최종 농도가 1 μg/mL가 되도록 처리하였다. 대조군으로는 나일레드를 DMSO 0.1%에 녹여 동일한 농도로 처리하였다. 24시간 후 Hoechst 33258로 핵을 염색하고 공초점 현미경 Zeiss LSM 880 (Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 카세인 나노입자 형성 확인

카세인의 금속 이온의 유무와 농도 변화에 따른 나노입자 형성을 확인하기 위해 DLS 측정을 진행하였다. 금속 이온을 첨가하지 않은 카세인의 평균 크기는 350~400 nm임을 확인하였고, 카세인 용액에 금속이온 $CaCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $FeCl_2$, KCl를 각각 첨가하였다. 금속 이온을 첨가한 카세인 나노입자는 150 nm 이하의 더 조밀한 입자가 만들어지는 것을 DLS로 확인할 수 있었다(Figure 1). casein/$CaCl_2$와 casein/$MgCl_2$는 금속 이온 최종 농도가 10 mM일 때 각각 105.7 ± 2.7 nm와 129.3 ± 1.6 nm로 크기가 가장 작은 것을 확인할 수 있었다

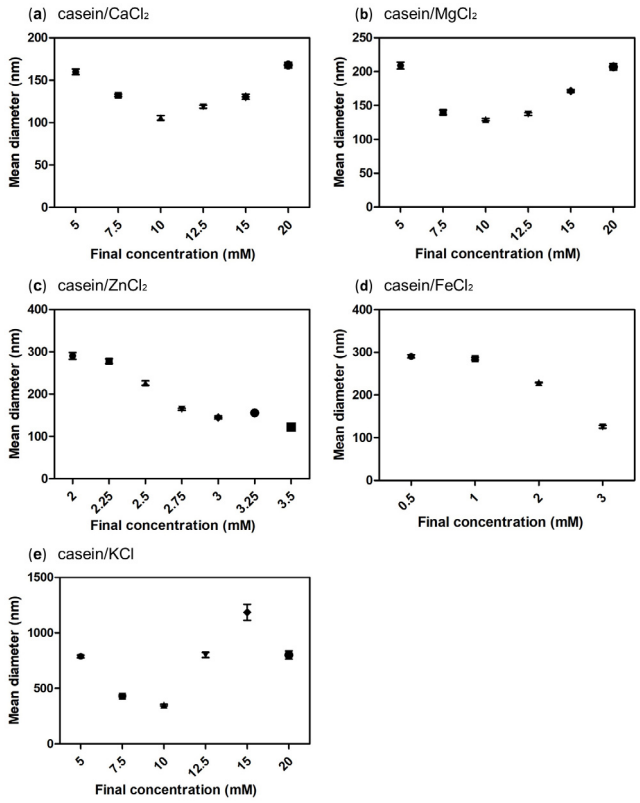

Figure 1. Mean diameter of casein nanoparticles at different ion concentrations (a) casein/$CaCl_2$, (b) casein/$MgCl_2$, (c) casein/$ZnCl_2$, (d) casein/$FeCl_2$, (e)casein/KCl.

Table 1. Characterization of Casein Nanoparticles

Sample	Mean Diameter (nm)	Polydispersity index (PDI)	Zeta potential (mV)
casein only	356.4 ± 6.9	0.25	-13.60 ± 2.33
casein/$CaCl_2$ 10 mM	105.7 ± 2.7	0.17	-7.71 ± 0.88
casein/$MgCl_2$ 10 mM	129.3 ± 1.6	0.22	-6.75 ± 0.81
casein/$ZnCl_2$ 3.5 mM	120.1 ± 2.6	0.29	-9.25 ± 0.97
casein/$FeCl_2$ 3 mM	125.6 ± 3.1	0.35	-15.53 ± 0.35
casein/KCl 10 mM	351.3 ± 8.6	0.29	-0.31 ± 0.15

(Table 1). casein/$ZnCl_2$와 casein/$FeCl_2$은 금속 이온 최종 농도가 4 mM 이상이 되면 응집되어 마이크로 이상의 불규칙한 사이즈가 관찰되었다. 따라서, 기존 금속 이온 농도보다 낮은 농도로 나노입자 형성을 시도하였고, 그 결과 아연은 3.5 mM에서 철은 3 mM에서 각각 120.1 ± 2.6 nm와 125.6 ± 3.1 nm로 가장 작은 사이즈로 만들어지는 것을 확인할 수 있었다. 1가 양이온인 KCl을 첨가했을 때는 금속이온을 첨가하지 않은 카세인 용액과 큰 차이가 없는 크기를 나타내는 것을 알 수 있었다. 위의 결과들을 종합하면 Ca, Mg, Zn, Fe 이온은 안정적으로 카세인과 상호작용하여 나노입자를 형성함을 확인하였고, K 이온의 경우 나노입자 형성이 어렵고 응집되는 현상을 확인할 수 있었다. 이는 카세인의 포스포세릴 잔기와 양이온 간 결합 친화도 차이로 인한 것으로 보인다. 1가 양이온은 2가 양이온보다 이온 결합력이 상대적으로 약하기 때문에 1가 양이온을 첨가했을 때 카세인과의 이온상호작용이 2가 양이온에 비해 느슨하게 형성되는 것으로 예상된다[4,19]. 이후의 실험에서 2가 양이온과 결합하여 안정적으로 형성된 카세인 나노입자 내에 나일레드를 함께 봉입하였고, UV-Vis 측정을 통해 캡슐화 효율을 계산한 결과, casein/$CaCl_2$는 35%, casein/$MgCl_2$는 28%, casein/$ZnCl_2$ 36%, casein/$FeCl_2$ 23%임을 확인하였다(Table 2). 또한 DLS로 크기를 측정한 결과 모든 입자가 100~150 nm로 균일한 나노 사이즈임을 확인할 수 있었다.

Table 2. Characterization of Nile red-encapsulated Casein NP

Sample	Loading Amount (μg/mL)	Encapsulation Efficiency (%)	Mean Diameter (nm)	Polydispersity index (PDI)
casein/$CaCl_2$	11.58	35.9	148.1	0.16
casein/$MgCl_2$	9.28	28.8	169.2	0.17
casein/$ZnCl_2$	11.91	36.9	101.7	0.18
casein/$FeCl_2$	7.64	23.7	127.1	0.30

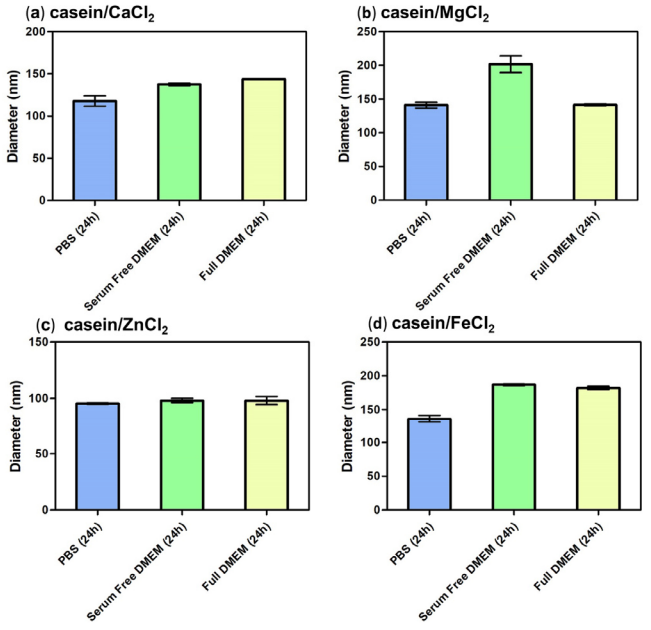

Figure 2. Stability test of casein NP in PBS, serum free DMEM and full DMEM media. Samples were incubated for 24 h and measured using DLS.

3.2. 카세인 나노입자의 안정성 평가

카세인 나노입자의 환경 변화에 따른 입자의 안정성을 평가하기 위해 각각 DPBS와 배양액의 FBS를 포함한 미디어 및 제외한(serum free) 미디어에 카세인 나노입자를 24시간 노출시킨 후 DLS로 입자의 크기를 측정하였다(Figure 2). 그 결과, $CaCl_2$는 DPBS의 조건에서 약 20 nm가 증가된 크기를 나타냈으며, 각각 FBS를 제외하거나 첨가한 배양액에 넣었을 때 약 20~50 nm의 증가된 크기 변화가 있었지만 150 nm 이하의 균일한 사이즈를 유지하는 것을 확인할 수 있었다. $MgCl_2$는 DPBS와 FBS 첨가 배양액에서 약 10 nm가 증가된 크기를 나타냈으며, FBS제외 된 배양액에서 50 nm 이상의 크기 증가를 나타

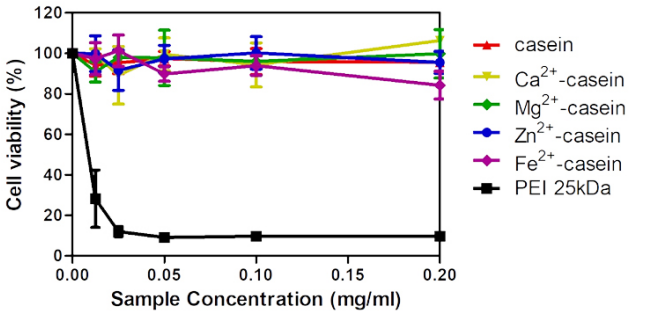

Figure 3. Evaluation of cell cytotoxicity using WST-8 assay in HeLa cells.

내었고, $FeCl_2$는 FBS가 제외된 배양액과 첨가된 배양액 모두에서 50 nm 이상 증가되는 사이즈 변화를 보였다. 특히, $ZnCl_2$의 경우 사이즈의 변화가 거의 없음을 확인하였다. 각각의 이온 조건에 따라 작게는 약 10 nm, 크게는 50 nm 이상의 크기 변화가 있었지만 이는 금속 이온 종류마다 카세인과의 결합 친화도 차이와 중금속, 경금속의 차이에 따라 카세인과의 결합 위치가 다를 것으로 예상되며, 이는 나노입자의 안정성에 영향을 주는 것으로 보인다[20]. 조건에 따라서 크기 변화가 조금씩 있었지만 모두 200 nm 이하의 크기를 나타내었고, 카세인 나노입자가 세포배양액 및 FBS 존재 하에서 응집되지 않고 매우 안정하게 유지되는 것을 확인하였다.

3.3. 카세인 나노입자의 세포 독성 분석

합성된 카세인 나노입자 독성을 확인하기 위해서 HeLa 세포주에서 WST-8 assay를 수행하였다. 대조군으로는 PEI 25kDa을 사용하였고 모든 샘플은 최종 농도가 각각 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL가 되도록 세포에 처리하였다. 그 결과 금속이온을 넣지 않은 카세인과 금속이온을 넣은 카세인 나노입자들이 모든 농도에서 80% 이상의 높은 생존율을 나타내었다(Figure 3). 이를 통하여 Ca, Mg, Zn, Fe을 이용한 casein 나노입자가 인체 내 독성이 없는 안전한 약물 전달체로 사용될 수 있다는 가능성을 확인하였다.

3.4. 나일 레드를 봉입한 카세인 나노입자의 세포 내 유입 효율 분석

카세인 나노입자의 세포 내 약물전달 효율을 확인하기 위해 HeLa 세포주에서 나일 레드를 봉입한 카세인 나노입자를 처리하고 공초점 현미경으로 관찰하였다(Figure 4). 대조군인 나일 레드의 경우, 대부분이 세포막과 세포질 가장자리에 적색 형광이 나타남을 관찰하였으며, 이는 나일 레드가 세포 내부까지 효율적으로 전달되지 못한다는 것을 확인할 수 있었다. casein/$CaCl_2$ 와 casein/$MgCl_2$ 나노입자의 경우, 대조군과 비교하였을 때, 세포 바깥 부분 및 세포 내부에도 높은 형광 신호가 확인되었다. casein/$ZnCl_2$ 와 casein/$FeCl_2$는 또한 대조군과 비교하였을 때 세포내의 분포도가 더 높은 것을 확인하였다. 위의 결과를 통하여 소수성 모델 약물로 사용한 나일 레드를 함유한 카세인 나노입자가 효과적으로 세포 내로 유입될 수 있다는 것을 확인하였으며, 특히 casein/$MgCl_2$와 casein/$FeCl_2$ 나노입자가 세포 내부로 효율적으로 전달되며 세포질에 보다 더 고르게 형광 나노입자들이 분포하며 더욱 효과적인 전달 효율을 보임을 확인하였다. 따라서, 카세인 나노입자를 여러 전이금속을 이용하여 다양한 물성의 단백질 나노입자를 구성할 수 있으며, 이는 소수성 약물을 봉입하는 약물 전달체로도 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

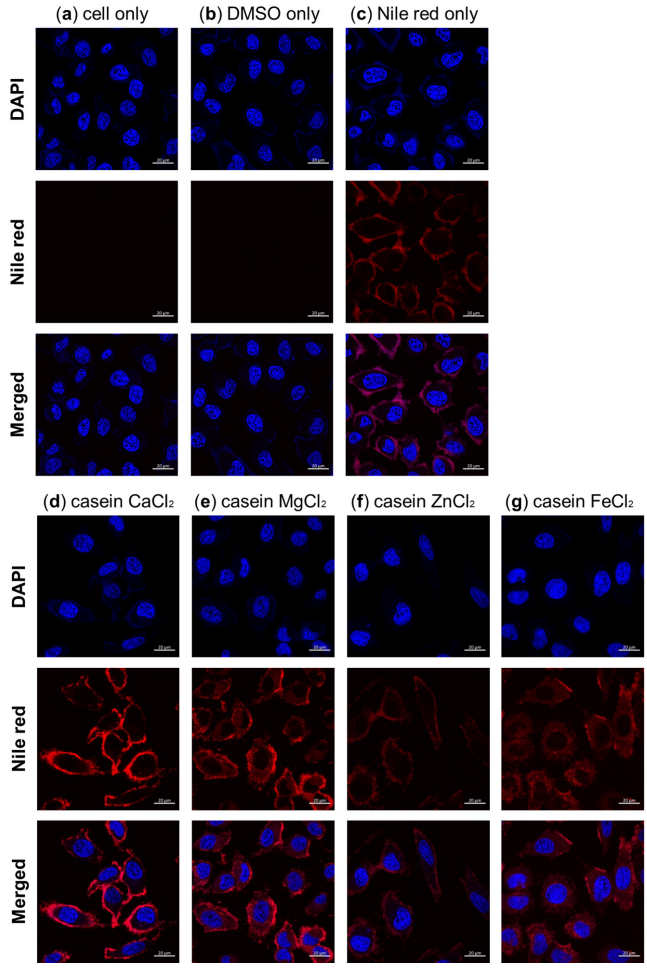

Figure 4. Confocal microscopy images of HeLa cells incubated with casein NP/Nile red (a) cell only, (b) DMSO only (final 0.1%), (c) Nile red only (DMSO 0.1%), (d) casein/$CaCl_2$, (e) casein/$MgCl_2$, (f) casein/$ZnCl_2$, (g) casein/$FeCl_2$. Nile red = 1 ug/mL each. Scale bar = 20 μm.

4. 결 론

기존에 보고된 카세인의 나노입자화 연구에서는 주로 칼슘 이온을 첨가하여 조밀한 입자를 합성하였다. 본 연구에서는 칼슘 이온뿐 만 아니라 마그네슘, 아연 및 철 등을 이용하여 효율적으로 카세인 나노입자의 형성을 확인하였고, 세포 배양액 조건에서도 매우 안정한 200 nm 이하의 균일한 사이즈를 유지하는 것을 확인하였다. 카세인 나노입자들은 세포 내에서 낮은 독성을 보였으며 나일 레드를 봉입한 카세인 나노입자의 세포 유입을 공초점 현미경을 통해 확인하였다. 본 실험을 통해 카세인 나노입자의 다양한 금속이온 환경에 따른 균일한 입자 형성의 조건을 확립하였으며, 이는 카세인 나노입자가 안정적으로 난용성 약물을 전달할 수 있는 생체 친화적인 약물 전달체로서의 가능성을 보여주는 결과라고 사료된다.

감 사

이 연구는 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

References

1. D. Verma, N. Gulati, S. Kaul, S. Mukherjee, and U. Nagaich, Protein based nanostructures for drug delivery, *J. Pharm.*, **2018**, 1-18 (2018).
2. A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz, and H. Car, Nanoparticles as drug delivery systems, *Pharmacol. Rep.*, **64**, 1020-1037 (2012).
3. A. O. Elzoghby, W. M. Samy, and N. A. Elgindy, Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems, *J. Control. Rel.*, **161**, 38-49 (2012).
4. M. L. Picchio, J. C. Cuggino, G. Nagel, S. Wedepohl, R. J. Minari, C. I. A. Igarzabal, L. Gugliotta, and M. Calderon, Crosslinked casein-based micelles as a dually responsive drug delivery system, *Polym. Chem.*, **9**, 3499-3510 (2018).
5. T. Huppertz, A. L. Kelly, and C. G. de Kruif, Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure, *J. Dairy Res.*, **73**, 294-298 (2006).
6. T. K. Glab, and J. Boratynski, Potential of casein as a carrier for biologically active agents, *Top. Curr. Chem.,* **375**, 1-20 (2017).
7. J. S. Garcia, C. S. de Magalhães, and M. A. Z. Arruda, Trends in metal-binding and metalloprotein analysis, *Talanta*, 69, 1-15 (2006).
8. J. R. Madan, I. N. Ansari, K. Dua, and R. Awasthi, Formulation and In Vitro Evaluation of Casein Nanoparticles as Carrier for Celecoxib, *Adv. Pharm. Bull.*, **10**, 408-417 (2020).
9. A. Shapira, I. Davidson, N. Avni, Y. G. Assaraf, and Y. D. Livney, β-Casein nanoparticle-based oral drug delivery system for potential treatment of gastric carcinoma: stability, target-activated release and cytotoxicity, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **80**, 298-305 (2012).
10. N. Ghayour, S. M. H. Hosseini, M. H. Eskandari, S. Esteghlal, A. R. Nekoei, H. H. Gahruie, M. Tatar, and F. Naghibalhossaini, Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems, *Food Hydrocoll.*, **87**, 394-403 (2019).
11. S. Gandhi and I. Roy, Doxorubicin-loaded casein nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and in vitro evaluation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **121**, 6-12 (2019).
12. L. Xv, X. Qian, Y. Wang, C. Yu, D. Qin, Y. Zhang, P. Jin, and Q. Du, Structural modification of nanomicelles through phosphatidylcholine: The enhanced drug-loading capacity and anticancer activity of celecoxib-casein nanoparticles for the intravenous delivery of celecoxib, *Nanomaterials*, **10**, 451 (2020).
13. K. Pan, Y. Luo, Y. Gan, S. J. Baek, and Q. Zhong, pH-driven encapsulation of curcumin in self-assembled casein nanoparticles for enhanced dispersibility and bioactivity, *Soft Mater.*, **10**, 6820-6830 (2014).
14. S. W. El-Far, M. W. Helmy, S. N. Khattab, A. A. Bekhit, A. A. Hussein, and A. O. Elzoghby, Folate conjugated vs PEGylated phytosomal casein nanocarriers for codelivery of fungal- and herbal-derived anticancer drugs, *Nanomedicine*, **13**, 1463-1480 (2018).
15. H. Perlstein, Y. Bavli, T. Turovsky, A. Rubinstein, D. Danino, D. Stepensky, and Y. Barenholz, Beta-casein nanocarriers of celecoxib for improved oral bioavailability, *Eur. J. Nanomed.*, **6**, 217- 226 (2014).
16. R. Penalva, I. Esparza, M. Agüeros, C. J. G. Navarro, C. G. Ferrero, and J. M. Irache, Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid, *Food Hydrocoll.*, **44**, 399-406 (2015).
17. M. F. Diouani, O. Ouerghi, K. Belgacem, M. Sayhi, R. Ionescu, and D. Laouini, Casein-conjugated gold nanoparticles for amperometric detection of *Leishmania infantum*, *Biosensors*, **9**, 68 (2019).
18. Y. Yao, H. Wang, R. Wang, and Y. Chai, Preparation and characterization of homogeneous and enhanced casein protein-based composite films via incorporating cellulose microgel, *Sci. Rep.*, **9**, 1221 (2019).
19. M. J. Kronman and G. D. Fasman, Metal-ion binding and the molecular conformational properties of α lactalbumi, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*., **24**, 565 (1989).
20. M. Yamada and M. Tsuruzumi, Utilization of milk protein as an environmental material: Accumulation of metal ions using a protein–inorganic hybrid material, *Polym. J.*, **48**, 295-300 (2016).

Authors

Minju Kim; B.Sc., Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea; mandoo1122@naver.com

Seulgi Lee; Ph.D., Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea; smileleesg@gmail.com

Joon Sig Choi; Ph.D., Professor, Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea; joonsig@cnu.ac.kr