(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월02일
(11) 등록번호 10-1902846
(24) 등록일자 2018년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) *A01N 25/28* (2006.01)
A01N 43/16 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61K 36/236 (2006.01) *A61K 8/49* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5169 (2013.01)
A01N 25/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0098224
(22) 출원일자 2017년08월02일
심사청구일자 2017년08월02일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130045358 A*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 13 항

(73) 특허권자
명지대학교 산학협력단
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)
(72) 발명자
최신식
서울특별시 강남구 도산대로19길 24 301호 (신사동)
라작
경기도 용인시 처인구 명지로 116, 차세대과학관 23435호
(74) 대리인
임상엽, 권정기

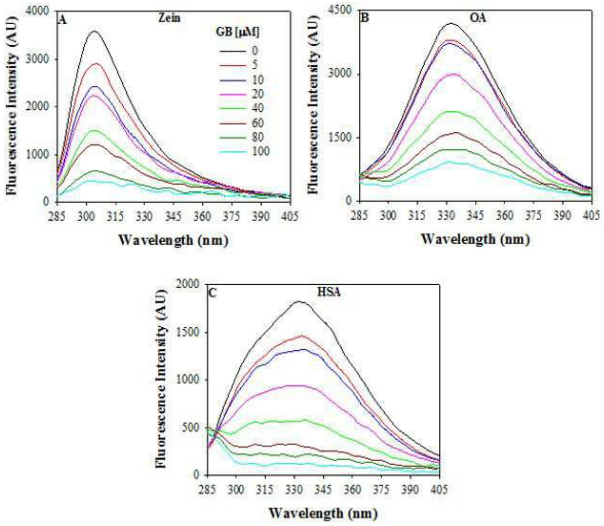
심사관 : 박범용

(54) 발명의 명칭 **글라브리딘-제인 복합체 나노입자, 이의 제조방법 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명의 일 예는 글라브리딘(Glabridin)이 제인 단백질(Zein protein)에 의해 캡슐화된 형태를 갖는, 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 수 용해도가 우수하고 미립의 균일한 입도 분포를 가지며 수계 매질 상에서 응집하지 않고 복합체 나노입자 형태를 장시간 유지할 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 수계 환경에서 글라브리딘의 생리활성을 극대화시킬 수 있으므로 항산화, 항균 용도의 식품, 의약품, 화장품 소재로 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A01N 43/16 (2013.01)
A61K 31/352 (2013.01)
A61K 36/236 (2013.01)
A61K 8/498 (2013.01)
A61K 9/5192 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR101142834 B1*
EP2587940 B1
KR1020140014854 A
Current Opinion in Colloid and Interface Science, 19, 2014, pp.450-458
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20150356
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농기평, 다인소재
연구사업명 고부가가치식품기술
연구과제명 단백질,지질기반 식품나노소재 제형화기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 명지대학교 산학협력단
연구기간 2016.10.12 ~ 2017.10.11

명 세 서

청구범위

청구항 1

글라브리딘(Glabridin)이 제인 단백질(Zein protein)에 의해 캡슐화된 형태를 갖는글라브리딘-제인 복합체 나노입자로서,

상기 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 내의 글라브리딘(Glabridin) 대 제인 단백질(Zein protein)의 중량비는 1:0.5 내지 1:20이고,

상기 글라브리딘(Glabridin)은 수용액 상태에서 제인 단백질(Zein protein)과의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의한 결합 또는 수소결합에 의해 캡슐화되고,

상기 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 평균 입경은 20~250 ㎚이고,

상기 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제타 전위(Zeta potential)는 6.5~7.5의 pH에서 40~80 ㎷인 것을 특징으로 하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 소수성 상호작용에 의한 결합은 글라브리딘(Glabridin)에 존재하는 프레닐기와 제인 단백질(Zein protein)에 존재하는 소수성 아미노산 잔기 사이에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제인 단백질(Zein protein)에 존재하는 소수성 아미노산 잔기는 트립토판 또는 티로신인 것을 특징으로 하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 수소결합은 글라브리딘(Glabridin)에 존재하는 하이드록실기와 제인 단백질(Zein protein)에 존재하는 카르복실기 또는 아미노기 사이에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제인 단백질(Zein protein) 및 글라브리딘(Glabridin)이 함수 저급 알코올에 용해되어 있거나 제인 단백질(Zein protein) 및 글라브리딘(Glabridin)을 주성분으로 포함하는 식물 추출물이 함수 저급 알코올에 용해되어 있는 반응 원료 용액을 준비하는 단계; 및

상기 반응 원료 용액을 교반한 후 반응 원료 용액에서 저급 알코올을 제거하여 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드를 형성하는 단계를 포함하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조방법으로서,

상기 반응 원료 용액 내의 글라브리딘 대 제인 단백질(Zein protein)의 중량비는 1:0.5 내지 1:20이고,

상기 글라브리딘은 저급 알코올이 제거될 때 제인 단백질(Zein protein)과의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의한 결합 또는 수소결합에 의해 캡슐화되고,

상기 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 평균 입경은 20~250 ㎚이고,

상기 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제타 전위(Zeta potential)는 6.5~7.5의 pH에서 40~80 ㎷인 것을 특징으로 하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드에 물을 첨가하여 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 형태를 안정화시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 글라브리딘(Glabridin)을 주성분으로 포함하는 식물 추출물은 감초 뿌리 추출물인 것을 특징으로 하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조방법

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 함수 저급 알코올은 70~95%(v/v) 농도의 함수 에탄올인 것을 특징으로 하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조방법

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 반응 원료 용액 내의 글라브리딘 농도는 반응 원료 용액 전체 부피를 기준으로 0.1~2%(w/v)인 것을 특징으로 하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 반응 원료 용액 내의 제인 단백질(Zein protein) 농도는 반응 원료 용액 전체 부피를 기준으로 0.5~4%(w/v)인 것을 특징으로 하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 저급 알코올의 제거는 증발을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 또는 제9항 내지 제15항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 유효성분으로 포함하는 항산화용 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 또는 제9항 내지 제15항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물.

발명의 설명

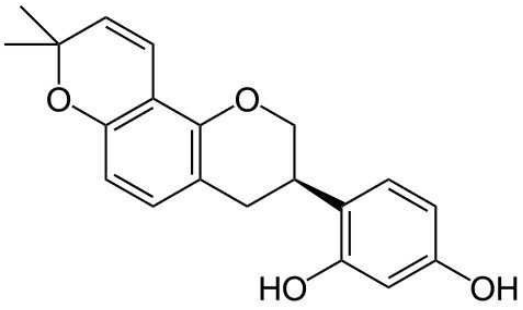
기 술 분 야

[0001] 본 발명은 글라브리딘(Glabridin)의 물(water)에 대한 용해도 또는 안정성이 향상된 글라브리딘-제인 복합체 나노입자, 이의 제조방법 및 이의 다양한 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 글라브리딘(Glabridin, GB)은 감초(*Glycyrrhiza glabra*) 뿌리로부터 유래되는 이노플라보노이드로서 하기 화학식 1의 구조를 가지며, 화장품, 식품 및 식이 보충제(dietary supplements)의 소재로 널리 사용된다. 글라브리딘의 다양한 생물학적 특성으로 항산화, 항염증, 신경보호, 항죽상경화, 에너지 대사 조절, 항종양, 피부 미백 활성 등이 보고되었다(Simmler, Pauli, & Chen, 2013). 글라브리딘의 B-ring 내 C-2' 및 C-4' 위치에 존재하는 자유 하이드록실기는 항산화 효과, 에스트로겐 수용체로의 결합, 시토크롬 P450 효소와의 상호작용 또는 티로시나제 활성 억제 등에 기여하는 것으로 알려져 있다. 또한, 글라브리딘의 A-ring 내에 존재하는 프레닐기(prenyl moiety)는 소수성 상호작용, 세포막이나 저밀도 리포단백질 입자와의 결합에 기여하는 것으로 알려져 있다.

[0003] [화학식 1]

[0004] 

[0005] 글라브리딘의 화학적 구조는 일 측면으로는 다양한 생리활성에 필수적인 역할을 담당하지만, 다른 측면으로는 낮은 극성 및 낮은 수용해도를 부여하기 때문에 글라브리딘의 in vivo 흡수를 떨어뜨린다(Wei et al., 2017). 또한, 글라브리딘의 안정성은 pH, 온도, 광, 열 및 산소 등과 같은 다양한 환경적 요소에 크게 영향을 받으며 이로 인해 글라브리딘을 상업적으로 적용하는데에 한계가 있다(Park, Park, & Lee, 2012).

[0006] 글라브리딘의 수 용해도 및 안정성을 향상시키기 위한 방법으로 글라브리딘을 마이크로스폰지(microsponge)나 키토산(chitosan) 나노입자에 캡슐화하는 방법이 제안되었다(Deshmukh & Poddar, 2012; Park et al., 2012). 글라브리딘은 특정한 물리적인 상호작용 없이 마이크로스폰지의 기공속에 소극적으로 결합되는 것이 관찰되었다. 반면, 글라브리딘의 하이드록실기와 키토산의 아미노기 사이에는 정전기 상호작용이 나노입자 안에서 발생하는 것이 확인되었다. 최근에 글라브리딘을 HP-β-CD(hydroxypropyl-β-cyclodextrin)에 포접하여 복합체를 형성하는 기술이 제안되었다(Wei et al., 2017).

[0007] 한편, 단백질은 생리활성 화합물과 단백질-리간드 복합체를 형성할 수 있고 이를 통해 생리활성 화합물의 산화, 분해 등을 억제하고 방출 거동을 제어할 수 있기 때문에 최근에 생리활성 화합물을 전달하기 위한 운반체로 관심을 받고 있다(de Wolf & Brett, 2000). 특히, β-락토글로불린(β-lactoglobulin), 유청단백질(whey

protein), 카제인염(caseinate), 오브알부민(ovalbumin) 등과 같은 식품 등급의 단백질과 다양한 타입의 생리활성 화합물 사이에 발생하는 상호작용에 대해 연구가 활발하게 진행되고 있다(Arroyo-Maya, Campos-Teran, Hernandez-Arana, & McClements, 2016; He, Zhu, et al., 2016; He, Xu, Zeng, Qin, & Chen, 2016; Kanakis et al., 2011; Yan, Hu, & Yao, 2009; Zorilla, Liang, Remondetto, & Subirade, 2011).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 글라브리딘(Glabridin)의 물(water)에 대한 용해도 또는 안정성이 향상된 글라브리딘-제인 복합체 나노입자, 이의 제조방법 및 이의 다양한 용도를 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 발명자들은 글라브리딘(Glabridin)의 물(water)에 대한 용해도 또는 안정성을 향상시키기 위해 글라브리딘(Glabridin)을 다양한 단백질에 캡슐화하여 복합체 나노입자를 제조하였고, 이중 글라브리딘(Glabridin)을 제인 단백질(Zein protein)에 캡슐화하여 복합체 나노입자를 형성하는 경우 물(water)에 대한 용해도가 향상될 뿐만 아니라 상호 간의 결합력이 우수하여 복합체 나노입자 형태를 안정적으로 유지할 수 있고 나아가 캡슐화되는 글라브리딘의 양이 증가하여도 복합체 나노입자의 평균 크기, 복합체 나노입자의 평균 입도 분포 및 복합체 나노입자의 제타 전위(Zeta potential)가 크게 변하지 않고 일정하게 유지되는 점을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 상기 목적을 해결하기 위하여 본 발명의 일 예는 글라브리딘(Glabridin)이 제인 단백질(Zein protein)에 의해 캡슐화된 형태를 갖는, 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 제공한다.

[0011] 상기 목적을 해결하기 위하여 본 발명의 일 예는 제인 단백질(Zein protein) 및 글라브리딘(Glabridin)이 함수 저급 알코올에 용해되어 있거나 제인 단백질(Zein protein) 및 글라브리딘(Glabridin)을 주성분으로 포함하는 식물 추출물이 함수 저급 알코올에 용해되어 있는 반응 원료 용액을 준비하는 단계; 및 상기 반응 원료 용액을 교반한 후 반응 원료 용액에서 저급 알코올을 제거하여 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드를 형성하는 단계를 포함하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조방법을 제공한다.

[0012] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 전술한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 또는 전술한 방법으로 제조된 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 유효성분으로 포함하는 항산화용 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 전술한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 또는 전술한 방법으로 제조된 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 수 용해도가 우수하고 미립의 균일한 입도 분포를 가지며 수계 매질 상에서 응집하지 않고 복합체 나노입자 형태를 장시간 유지할 수 있다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 수계 환경에서 글라브리딘의 생리활성을 극대화시킬 수 있으므로 항산화, 항균 용도의 식품, 의약품, 화장품 소재로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 1차 실험에서 사용한 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 제조방법을 도식화한 것이다.

도 2는 본 발명의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 형광 소광(fluorescence quenching) 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 크기 변화를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 단백질 내 티로신 잔기의 고유 파장 감소 및 최대 방출 파장 이동을 나타낸 것이고, 도 5는 본 발명

의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 단백질 내 트립토판 잔기의 고유 파장 감소 및 최대 방출 파장 이동을 나타낸 것이다.

도 6은 글라브리딘 자체의 물에 대한 용해도를 UV/Vis 스펙트로미터 측정 결과로 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 물에 대한 용해도 변화를 UV/Vis 스펙트로미터 측정 결과로 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 항산화 효능을 ABTS assay에서의 라디칼 소거능력으로 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 2차 실험에서 사용한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법을 도식화한 것이고 도 10은 본 발명의 2차 실험에서 사용한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법 과정에서 글라브리딘-제인 복합체 나노입자가 형성되는 단계를 도식화한 것이다.

도 11은 본 발명의 2차 실험에서 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 크기 및 PDI(Polydispersity index)를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 2차 실험에서 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제타 전위(Zeta potential)를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 2차 실험에서 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 형태를 주사전자현미경(SEM)으로 촬영한 사진이다.

도 14는 글라브리딘, 제인 단백질 나노입자 및 본 발명의 2차 실험에서 1%(w/v)의 글라브리딘 농도로 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 FTIR 스펙트럼 결과이다.

도 15는 글라브리딘, 제인 단백질 나노입자 및 본 발명의 2차 실험에서 1%(w/v)의 글라브리딘 농도로 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 XRD 스펙트럼 결과이다.

도 16은 글라브리딘, 제인 단백질 나노입자 및 본 발명의 2차 실험에서 1%(w/v)의 글라브리딘 농도로 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 DSC 스펙트럼 결과이다.

도 17은 글라브리딘 및 본 발명의 2차 실험에서 1%(w/v)의 글라브리딘 농도로 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 균에 대한 항균 활성을 MIC(minimum inhibitory concentration) 값으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0017] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용가능한" 및 "식품학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소 또는 완화시키는 모든 행위를 의미한다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 특정 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한

민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어 "조성물"은 2가지 이상의 성분이 균일하게 혼합되어 있는 상태의 물질을 의미하며, 완제품뿐만 아니라 완제품 제조를 위한 중간 소재를 포함하는 개념이다.

[0025] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0026] 본 발명의 일 측면은 물(water)에 대한 용해도 또는 안정성이 향상된 글라브리딘-제인 복합체 나노입자에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 글라브리딘(Glabridin)이 제인 단백질(Zein protein), 더 구체적으로는 제인 단백질(Zein protein) 나노입자에 의해 캡슐화된 형태를 갖는다. 상기 글라브리딘은 감초 뿌리 추출물에서 주로 발견되는 생리활성 화합물로서, 항산화, 항균, 피부 미백 등의 다양한 생리활성을 보인다. 상기 글라브리딘은 물에 대해서는 불용성이며 주로 프로필렌글리콜과 같은 유기용매에 용해된다. 상기 제인 단백질(Zein protein)은 옥수수에서 추출한 프롤라민(prolamine)에 속하는 식물성 단백질이다.

[0027] 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자에서, 상기 글라브리딘(Glabridin)은 바람직하게는 수용액 상태에서 제인 단백질(Zein protein)과의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의한 결합 또는 수소결합에 의해 캡슐화된다. 상기 소수성 상호작용은 무극성 물질이 물, 저급 알코올 등의 극성 용액 중에서 서로 집합하는 상호작용이다. 상기 소수성 상호작용에 의한 결합은 바람직하게는 글라브리딘(Glabridin)에 존재하는 프레닐기와 제인 단백질(Zein protein)에 존재하는 소수성 아미노산 잔기 사이에서 이루어진다. 상기 제인 단백질(Zein protein)에 존재하는 소수성 아미노산 잔기는 바람직하게는 트립토판 또는 티로신이다. 상기 수소결합은 바람직하게는 글라브리딘(Glabridin)에 존재하는 하이드록실기와 제인 단백질(Zein protein)에 존재하는 카르복실기 또는 아미노기 사이에서 이루어진다.

[0028] 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 내의 글라브리딘(Glabridin) 대 제인 단백질(Zein protein)의 중량비는 크게 제한되지 않으며 바람직하게는 1:0.5 내지 1:20의 범위를 갖고 더 바람직하게는 1:1 내지 1:10의 범위를 갖는다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 평균 입경은 20~250 ㎚이고, 더 바람직하게는 30~220 ㎚ 이다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제타 전위(Zeta potential)는 6.5~7.5의 pH에서 바람직하게는 40~80 ㎷이고, 더 바람직하게는 40~60 ㎷이다.

[0030] 본 발명의 일 측면은 물(water)에 대한 용해도 또는 안정성이 향상된 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법은 제인 단백질(Zein protein) 및 글라브리딘(Glabridin)이 함수 저급 알코올에 용해되어 있거나 제인 단백질(Zein protein) 및 글라브리딘(Glabridin)을 주성분으로 포함하는 식물 추출물이 함수 저급 알코올에 용해되어 있는 반응 원료 용액을 준비하는 단계; 및 상기 반응 원료 용액을 교반한 후 반응 원료 용액에서 저급 알코올을 제거하여 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드를 형성하는 단계를 포함하는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조방법을 제공한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법은 바람직하게는 상기 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드에 물을 첨가하여 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 형태를 안정화시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법에서 반응 원료 용액 내의 저급 알코올을 제거하는 경우 글라브리딘과 제인 단백질(Zein protein)은 소수성 상호작용에 의한 결합 또는 수소결합에 의해 나노입자 형태로 자가조립(self-assembly) 또는 자가응집(self-aggregation)되고 글라브리딘(Glabridin)이 제인 단백질(Zein protein), 구체적으로 제인 단백질(Zein protein) 나노입자에 캡슐화된다.

[0031] 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법에서 상기 글라브리딘(Glabridin)을 주성분으로 포함하는 식물 추출물은 그 종류가 크게 제한되지 않으며 바람직하게는 감초 뿌리 추출물이다. 감초 뿌리 추출물 내에서 글라브리딘 함량은 고형분 전체 중량을 기준으로 약 35~45 중량%인 것으로 보고되고 있다. 예를 들어, 대한민국 등록특허공보 제10-0570803호 또는 제10-0947920호에는 감초로부터 글라브리딘을 추출하는 방법이 개시되어 있고, 대한민국 공개특허공보 제10-2006-0098480호에는 글라브리딘 함량이 35% 이상인 감초 추출물을 제조하는 방법이 개시되어 있다. 본 발명은 글라브리딘을 주성분으로 포함하는 감초 추출물 또는 이의 제조방법에 관한 공지된 모든 기술을 포함한다. 글라브리딘을 주성분으로 포함하는 감초 뿌리 추출물을 얻기 위해 당업계에 공지된 통상의 추출 방법, 예를 들어 용매 추출법을 사용할 수 있다. 용매 추출법을 이용하여 감초 뿌리 추출물을 제조할 때 사용될 수 있는 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올(예를 들면, 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올) 또는 이들의 혼합물인 함수 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜,

글리세린, 아세톤, 디에틸에테르, 에틸 아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 이중 물, 알코올 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 것이 바람직하다. 추출 용매로 물을 사용하는 경우 물은 열수인 것이 바람직하다. 또한, 추출 용매로 알코올을 사용하는 경우 알코올은 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올인 것이 바람직하고, 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올에서 선택되는 것이 더 바람직하다. 또한, 추출 용매로 함수 알코올을 사용하는 경우 알코올 함량은 50~90%인 것이 바람직하다. 한편, 감초 뿌리 추출물은 상기 추출 용매뿐만 아니라, 다른 추출 용매를 이용하여도 실질적으로 동일한 효과를 나타내는 추출물이 얻어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다. 예컨대, 이산화탄소에 의한 감압, 고온에 의한 초임계 추출법에 의한 추출, 초음파를 이용한 추출법에 의한 추출, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 이용한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 및 추출방법을 통해 얻어진 활성 분획도 본 발명의 추출물에 포함된다. 상기 이산화탄소에 의한 감압, 고온에 의한 초임계 추출법에 의한 추출법은 초임계 유체 추출법(supercritical fluid extraction)을 의미하는 것으로, 일반적으로 초임계 유체는 기체가 고온 고압 조건에서 임계점에 도달하였을 때 갖는 액체 및 기체의 성질을 지니고 있으며, 화학적으로 비극성 용매와 유사한 극성을 지니고 있으며 이러한 특성으로 인해 초임계 유체는 지용성 물질의 추출에 사용되고 있다(J. Chromatogr. A. 1998;479:200-205). 이산화탄소는 초임계 유체기기의 작동으로 압력 및 온도가 임계점까지 이르는 과정을 거치면서 액체 및 기체 성질을 동시에 지닌 초임계 유체가 되고 그 결과 지용성 용질에 대한 용해도가 증가한다. 초임계 이산화탄소가 일정량의 시료를 함유한 추출 용기를 통과하게 되면 시료에 함유된 지용성 물질은 초임계 이산화탄소에 추출되어 나온다. 지용성 물질을 추출한 후 추출 용기에 남아있는 시료에 다시 소량의 공용매가 함유된 초임계 이산화탄소를 흘려 통과시키면 순수한 초임계 이산화탄소만으로는 추출되지 않았던 성분들이 추출되어 나오게 할 수 있다. 본 발명의 초임계추출법에 사용되는 초임계 유체는 초임계 이산화탄소 또는 이산화탄소에 추가적으로 공용매를 혼합한 혼합유체를 사용함으로써 효과적으로 유효 성분을 추출할 수 있다. 이러한 공용매는 클로로포름, 에탄올, 메탄올, 물, 에틸아세테이트, 헥산 및 디에틸에테르로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 추출된 시료는 대부분 이산화탄소를 함유하고 있는데 이산화탄소는 실온에서 공기 중으로 휘발되므로 상기 방법으로 얻은 추출물을 화장료 조성물로서 사용할 수 있으며, 공용매는 감압증발기로 제거할 수 있다. 또한, 상기 초음파 추출법은 초음파 진동에 의해 발생되는 에너지를 이용하는 추출방법으로, 초음파가 수용성 용매 속에서 시료에 포함된 불용성인 용매를 파괴시킬 수 있으며, 이때 발생되는 높은 국부온도로 인하여 주위에 위치하는 반응물 입자들의 운동에너지를 크게 하기 때문에 반응에 필요한 충분한 에너지를 얻게 되고, 초음파 에너지의 충격효과로 높은 압력을 유도하여 시료에 함유된 물질과 용매의 혼합 효과를 높여주어 추출효율을 증가시키게 된다. 초음파 추출법에 사용할 수 있는 추출용매는 클로로포름, 에탄올, 메탄올, 물, 에틸아세테이트, 헥산 및 디에틸 에테르로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 추출된 시료는 진공 여과하여 여과액을 회수한 후 감압증발기로 제거하고, 동결 건조하는 통상의 추출물 제조방법을 통해 추출물을 얻을 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법에서 상기 함수 저급 알코올은 탄소수가 1 내지 5인 함수 메탄올, 함수 에탄올, 함수 프로판올, 함수 부탄올, 함수 펜탄올 등에서 선택될 수 있으며 함수 저급 알코올에서 알코올 농도는 70~95%(v/v)인 것이 바람직하고 75~90%(v/v)인 것이 더 바람직하고 80~90%(v/v)인 것이 가장 바람직하다. 상기 함수 저급 알코올은 복합체 나노입자의 형성 용이성 및 제거 용이성 등을 고려할 때 70~95%(v/v) 농도의 함수 에탄올인 것이 바람직하다.

[0033] 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법에서 상기 반응 원료 용액 내의 글라브리딘 농도는 반응 원료 용액 전체 부피를 기준으로 0.1~2%(w/v)인 것이 바람직하고 0.2~1.0%(w/v)인 것이 더 바람직하다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법에서 상기 반응 원료 용액 내의 제인 단백질(Zein protein) 농도는 반응 원료 용액 전체 부피를 기준으로 0.5~4%(w/v)인 것이 바람직하고 0.6~2%(w/v)인 것이 더 바람직하다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법에서 상기 반응 원료 용액 내의 글라브리딘 대 제인 단백질(Zein protein)의 중량비는 1:0.5 내지 1:20의 범위를 갖는 것이 바람직하고, 1:1 내지 1:10의 범위를 갖는 것이 더 바람직하다.

[0034] 본 발명의 일 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법에서 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 형태를 안정화시키는 단계는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드에 물을 첨가하여 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 농도를 0.6~6%(w/v), 바람직하게는 0.8~4%(w/v), 더 바람직하게는 1~2.5%(w/v)로 조정하는 것으로 구성된다.

[0035] 본 발명에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 전술한 제조방법 이외의 다른 방법으로도 제조될 수 있다.

본 발명의 다른 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법은 제인 단백질(Zein protein)을 물에 첨가하고 교반하여 나노입자를 함유하는 콜로이드를 형성하는 단계; 상기 나노입자를 함유하는 콜로이드에 탄소수 1 내지 5의 함수 저급 알코올 또는 탄소수 1 내지 5의 무수 저급 알코올을 첨가하여 나노입자를 함유하는 희석 콜로이드를 준비하는 단계; 상기 나노입자를 함유하는 희석 콜로이드에 글라브리딘(Glabridin)의 함수 저급 알코올 용액 글라브리딘(Glabridin)의 무수 저급 알코올 용액, 글라브리딘(Glabridin)을 주성분으로 포함하는 식물 추출물의 함수 저급 알코올 용액 또는 글라브리딘(Glabridin)을 주성분으로 포함하는 식물 추출물의 무수 저급 알코올 용액을 첨가하고 교반하여 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드를 형성하는 단계를 포함한다. 본 발명의 다른 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법에서 상기 나노입자를 함유하는 희석 콜로이드 내의 제인 단백질(Zein protein) 농도는 희석 콜로이드 전체 부피를 기준으로 0.01~0.5%(w/v)인 것이 바람직하고 0.02~0.2%(w/v)인 것이 더 바람직하다. 또한, 본 발명의 다른 예에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법에서 나노입자를 함유하는 희석 콜로이드에 첨가된 후의 글라브리딘(Glabridin) 농도는 1~200 μM(몰농도)인 것이 바람직하고 5~100 μM(몰농도)인 것이 더 바람직하다.

[0037] 본 발명의 일 측면은 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 다양한 용도에 관한 것이다.

[0038] 본 발명의 일 예는 전술한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 또는 전술한 방법으로 제조된 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 유효성분으로 포함하는 항산화용 조성물을 제공한다. 본 발명의 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 글라브리딘 자체에 비해 우수한 물에 대한 용해도 및 향상된 안정성을 가지기 때문에 수계 환경에서 농도 의존적으로 증가하는 라디칼 소거 능력을 보인다. 본 발명의 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 글라브리딘 자체에 비해 약 10~30% 높은 라디칼 소거 능력을 가진다. 띠라서. 본 발명의 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 노화 등과 같이 인체의 산화 반응에 의해 발생하는 질환 또는 증상을 예방, 개선 또는 치료하는데에 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 예는 전술한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 또는 전술한 방법으로 제조된 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다. 본 발명의 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 수계 환경에서 글라블리딘보다 약 2배 높은 항균 활성을 가진다. 또한, 본 발명의 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 다양한 병원균의 증식을 억제하거나 다양한 병원균을 사멸시킬 수 있으며, 상기 병원균의 구체적인 예로는 바실러스 세레우스(Bacillus cereus) 등이 있다. 따라서, 본 발명의 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 식중독 등 병원균의 감염에 의해 발생하는 질환 또는 증상을 예방, 개선 또는 치료하는데에 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 조성물은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물, 식품 첨가제, 식품 조성물(특히 건강기능식품), 사료 첨가제, 화장료 조성물 등으로 구체화될 수 있다. 또한, 유효성분인 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 약학 조성물에서 유효성분의 함량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~99 중량%, 바람직하게는 0.5~50 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 같은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 항산화 활성 또는 항균 활성을 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's

Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강내 주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 약학적으로 유효한 양이라면 크게 제한되지 않으며, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으나 바람직하게는 유효성분을 기준으로 할 때 0.1 내지 3000 ㎎/㎏이고, 더 바람직하게는 1 내지 2000 ㎎/㎏이며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명에 따른 식품 조성물에서 유효성분의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~99 중량%, 바람직하게는 0.1~50 중량%, 더 바람직하게는 0.5~25 중량%이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 구체적인 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다. 본 발명의 식품 조성물은 유효성분 외에 식품학적으로 허용 가능한 담체, 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분들은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 향미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0043] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다. 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 화장료 조성물은 사용되는 양태를 고려할 때 피부 토닉, 피부 컨디셔너, 피부 에센스, 피부 로션, 피부 영양로션, 피부 크림, 피부 영양크 림, 피부 모이스처크림, 피부 맛사지크림, 피부팩, 피부 영양팩, 비누, 보디클렌저(Body cleanser) 등의 제형으로 제조되는 것이 바람직하다.

[0045] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0047] **Ⅰ. 1차 실험**

[0048] 1차 실험에서는 글라브리딘을 다양한 단백질에 캡슐화하여 복합체 나노입자를 형성하고, 형성된 복합체 나노입자의 다양한 특성을 분석한 후 글라브리딘의 캡슐화에 적합한 단백질로 제인 단백질(Zein protein)을 선택하였다.

[0050] **1. 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 제조**

[0051] 도 1은 1차 실험에서 사용한 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 제조방법을 도식화한 것이다.

[0052] (1) 글라브리딘-오브알부민(GB-OA) 복합체 나노입자의 제조

[0053] 3㎖의 에탄올에 0.0375g의 감초 뿌리 추출물(글라브리딘 함량은 약 40 중량%임)을 용해시켜 글라브리딘 스톡 용액을 제조하였다. 0.04g의 오브알부민(Ovalbumin, OA)을 16㎖의 증류수에 첨가하고 25℃에서 약 2hr 동안 교반하여 자가조립을 유도하고 오브알부민(Ovalbumin, OA) 나노입자를 함유하는 콜로이드를 형성하였다. 이후, 오브알부민(Ovalbumin, OA) 나노입자를 함유하는 콜로이드에 85%(v/v) 농도의 함수 에탄올을 첨가하여 오브알부민(Ovalbumin, OA) 나노입자의 농도를 0.05%(w/v)로 희석하고 여기에 미리 제조한 글라브리딘 스톡 용액을 첨가하여 글라브리딘의 농도를 0~100 μM의 다양한 범위로 조정하고 25℃에서 약 1hr 동안 교반하여 글라브리딘을 오브알부민(Ovalbumin, OA) 나노입자에 캡슐화하고 최종적으로 글라브리딘-오브알부민 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드를 수득하였다.

[0055] (2) 글라브리딘-인간혈청알부민(GB-HSA) 복합체 나노입자의 제조

[0056] 3㎖의 에탄올에 0.0375g의 감초 뿌리 추출물(글라브리딘 함량은 약 40 중량%임)을 용해시켜 글라브리딘 스톡 용액을 제조하였다. 0.04g의 인간혈청알부민(Human serum albumin, HSA)을 16㎖의 증류수에 첨가하고 25℃에서 약 2hr 동안 교반하여 자가조립을 유도하고 인간혈청알부민(Human serum albumin, HSA) 나노입자를 함유하는 콜로이드를 형성하였다. 이후, 인간혈청알부민(Human serum albumin, HSA) 나노입자를 함유하는 콜로이드에 85%(v/v) 농도의 함수 에탄올을 첨가하여 인간혈청알부민(Human serum albumin, HSA) 나노입자의 농도를 0.05%(w/v)로 희석하고 여기에 미리 제조한 글라브리딘 스톡 용액을 첨가하여 글라브리딘의 농도를 0~100 μM의 다양한 범위로 조정하고 25℃에서 약 1hr 동안 교반하여 글라브리딘을 인간혈청알부민(Human serum albumin, HSA) 나노입자에 캡슐화하고 최종적으로 글라브리딘-인간혈청알부민 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드를 수득하였다.

[0058] (3) 글라브리딘-제인(GB-Zein) 복합체 나노입자의 제조

[0059] 3㎖의 에탄올에 0.0375g의 감초 뿌리 추출물(글라브리딘 함량은 약 40 중량%임)을 용해시켜 글라브리딘 스톡 용액을 제조하였다. 0.04g의 제인(Zein) 단백질을 16㎖의 증류수에 첨가하고 25℃에서 약 2hr 동안 교반하여 자가조립을 유도하고 제인(Zein) 나노입자를 함유하는 콜로이드를 형성하였다. 이후, 제인(Zein) 나노입자를 함유하는 콜로이드에 85%(v/v) 농도의 함수 에탄올을 첨가하여 제인(Zein) 나노입자의 농도를 0.05%(w/v)로 희석하고 여기에 미리 제조한 글라브리딘 스톡 용액을 첨가하여 글라브리딘의 농도를 0~100 μM의 다양한 범위로 조정하고 25℃에서 약 1hr 동안 교반하여 글라브리딘을 제인(Zein) 나노입자에 캡슐화하고 최종적으로 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드를 수득하였다.

[0061] **2. 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 특성 분석**

[0062] (1) 글라브리딘과 단백질의 결합 특성 분석

[0063] 글라브리딘과 단백질 간의 결합 성능은 형광 스펙트로포토미터(SCINCO FluoroMate FS-2)를 이용하여 분석하였다. 구체적으로, 상기 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 형광 소광(fluorescence quenching)을 측정하고 이를 통해 글라브리딘과 단백질 간의 결합 성능을 평가하였다.

[0064] 도 2는 본 발명의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 형광 소광(fluorescence quenching) 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 2에서 "Zein"은 단백질로 제인(Zein) 단백질을 사용한 경우를 나타내고, "OA"는 단백질로 오브알부민을 사용한 경우를 나타내고 "HSA"는 인간혈청알부민을 사용한 경우를 나타내며, "GB"는 글라브리딘을 나타낸다.

[0065] 단백질에 존재하는 트립토판(tryptophan) 및 티로신(tyrosine) 잔기는 약 280 ㎚에서 여기하고, 상기 여기된 아미노산 잔기는 제인(Zein) 단백질의 경우 약 303 ㎚에서, 오브알부민의 경우 약 330 ㎚에서, 인간혈청알부민의 경우 약 333 ㎚에서 방사한다. 도 2에서 보이는 바와 같이 모든 단백질에서 제조과정 중 사용한 글라브리딘의

농도가 증가할수록 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 방사 강도는 점진적으로 감소하였으며, 이는 글라브리딘과 단백질 간의 결합이 증가하는 것에 기인한 것으로 볼 수 있다.

[0066] 도 2의 결과 및 Stern-Volmer 상관관계를 이용하여 글라브리딘과 단백질 간의 결합 상수를 계산하였고, 그 결과는 하기의 표 1과 같다. 하기 표 1에서 보이는 글라브리딘은 오브알부민 및 인간혈청알부민보다 제인 단백질과 더 효과적으로 결합하였다. 글라브리딘과 제인 단백질의 높은 결합 성능은 제인 단백질을 구성하는 아미노산 중 소수성 아미노산의 비율이 절단 이상인 점에서 기인한다. 소수성 아미노산의 양이 증가할수록 글라브리딘과 같은 소수성 화합물과의 결합 특성이 증가하기 때문이다.

표 1

[0067]

글라브리딘과 결합되는 단백질의 종류	Binding constant $(K)M^{-1}$
Zein	5.67×10^{4}
OA	1.78×10^{4}
HSA	4.55×10^{4}

[0069] (2) 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 크기 분석

[0070] 상기 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 수력학적 크기(hydrodynamic size; Volume-avrage size라고도 함) 변화를 동적빛산란(dynamic light scattering, DLS) 방법을 이용하여 분석하였다.

[0071] 도 3은 본 발명의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 크기 변화를 나타낸 것이다. 도 3에서 "Zein"은 단백질로 제인(Zein) 단백질을 사용한 경우를 나타내고, "OA"는 단백질로 오브알부민을 사용한 경우를 나타내고 "HSA"는 인간혈청알부민을 사용한 경우를 나타내며, "GB"는 글라브리딘을 나타낸다.

[0072] 도 3에서 보이는 바와 같이 오브알부민 및 인간혈청알부민은 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도가 증가할수록 최종 생성물인 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 크기가 현저하게 변하는 반면, 제인 단백질은 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도가 증가하여도 최종 생성물인 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 크기가 거의 변하지 않고 안정적으로 유지되었다. 특히, 글라브리딘을 산업적으로 이용하기 위해서는 글라브리딘을 고농도로 캡슐화하는 것이 필요한데, 제인 단백질은 고농도의 글라브리딘이 캡슐화되어도 복합체 나노입자의 크기가 일정하게 유지되므로 산업화 관점에서 매우 유리한 것으로 판단된다.

[0074] (3) 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 구조적 전이 분석

[0075] 상기 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 구조적 전이를 SFS(Synchronous fluorescence spectroscopy) 강도를 이용하여 분석하였다.

[0076] 도 4는 본 발명의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 단백질 내 티로신 잔기의 고유 파장 감소 및 최대 방출 파장 이동을 나타낸 것이고, 도 5는 본 발명의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 단백질 내 트립토판 잔기의 고유 파장 감소 및 최대 방출 파장 이동을 나타낸 것이다. 도 4 및 도 5에서 "Zein"은 단백질로 제인(Zein) 단백질을 사용한 경우를 나타내고, "OA"는 단백질로 오브알부민을 사용한 경우를 나타내고 "HSA"는 인간혈청알부민을 사용한 경우를 나타내며, "GB"는 글라브리딘을 나타낸다.

[0077] 도 4 및 도 5에서 보이는 바와 같이 제인 단백질에 존재하는 티로신 잔기와 트립토판 잔기는 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도가 증가할수록 고유 여기 파장이 감소하고 최대 방출 파장이 더 오른쪽으로 이동하였다. 따라서, 제인 단백질에 존재하는 티로신 잔기와 트립토판 잔기는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 형성 과정에서 글라브리딘과 결합하고, 특히 트립토판 잔기의 최대 방출 파장 이동이 티로신 잔기의 최대 방출 파장 이동보다 심하므로 글라브리딘과의 결합에 더 관여할 것으로 예상된다.

[0079] (4) 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 물에 대한 용해도 분석

[0080] 상기 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 물에 대한 용해도 변화를 UV/Vis 스펙트로미터를 이용하여 분석하였다.

[0081] 도 6은 글라브리딘 자체의 물에 대한 용해도를 UV/Vis 스펙트로미터 측정 결과로 나타낸 것이다. 도 6에서 글라브리딘의 몰 농도는 글라브리딘 첨가량을 기준으로 환산한 값이다. 도 7은 본 발명의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 물에 대한 용해도 변화를 UV/Vis 스펙트로미터 측정 결과로 나타낸 것이다. 도 7에서 "Zein"은 단백질로 제인(Zein) 단백질을 사용한 경우를 나타내고, "OA"는 단백질로 오브알부민을 사용한 경우를 나타내고 "HSA"는 인간혈청알부민을 사용한 경우를 나타내며, "GB"는 글라브리딘을 나타낸다. 도 7에서 보이는 바와 같이 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도가 증가할수록 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 흡광도 값이 크게 증가하였다. 도 6 및 도 7로부터 글라브리딘-제안 복합체 나노입자는 글라브리딘 자체에 비해 물에 대한 용해도가 약 16배 이상 증가하였다는 것을 확인하였다.

[0083] (5) 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 항산화 효능 분석

[0084] 상기 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 항산화 효능을 라디칼 소거능력을 확인하는 방법 중 하나인 ABTS[2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] assay를 이용하여 분석하였다. 상기 ABTS assay는 수계 매질 환경에서 수행된다.

[0085] 도 8은 본 발명의 1차 실험에서 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 증가에 따른 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 항산화 효능을 ABTS assay에서의 라디칼 소거능력으로 나타낸 것이다. 도 8에서 "Zein"은 단백질로 제인(Zein) 단백질을 사용한 경우를 나타내고, "OA"는 단백질로 오브알부민을 사용한 경우를 나타내고 "HSA"는 인간혈청알부민을 사용한 경우를 나타내며, "GB"는 글라브리딘을 나타낸다. 도 8에서 보이는 바와 같이 글라브리딘 자체는 물에 대한 용해도가 매우 낮기 때문에 첨가량으로 환산한 농도가 증가하여도 라디칼 소거능력이 거의 없는 것으로 나타났다. 반면, 글라브리딘-단백질 복합체 나노입자의 경우 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도가 증가할수록 라디칼 소거능력이 증가하였다.

[0087] 상기 1차 실험 결과, 글라브리딘의 캡슐화에 적합한 단백질로 제인 단백질(Zein protein)을 선택하였다. 제인 단백질은 옥수수 유래의 식물성 단백질이기 때문에 안전성 문제가 없고 글라브리딘과 효과적으로 결합할 수 있으며, 후술하는 2차 실험에서와 같이 오브알부민 또는 인간혈청알부민에 비해 가혹한 반응 조건을 사용하지 않아도 쉽게 글라브리딘이 캡슐화된 나노입자를 사용할 수 있고 식품 가공 중에 열, 광, pH, 효소, 이온, pH 등의 자극으로부터 글라브리딘을 보호할 수 있다.

[0089] **Ⅱ. 2차 실험**

[0090] 2차 실험에서는 1차 실험에서 사용한 방법보다 간단한 방법으로 제인 단백질에 글라브리딘을 캡슐화하여 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 제조하고, 제조된 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 다양한 특성을 분석하였다.

[0092] **1. 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조**

[0093] 도 9는 본 발명의 2차 실험에서 사용한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법을 도식화한 것이고 도 10은 본 발명의 2차 실험에서 사용한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제조방법 과정에서 글라브리딘-제인 복합체 나노입자가 형성되는 단계를 도식화한 것이다.

[0094] 제인(Zein) 단백질 및 감초 뿌리 추출물(글라브리딘 함량은 약 40 중량%임)을 85%(v/v) 농도의 함수 에탄올 40㎖에 용해시켜 반응 원료 용액을 준비하였다. 반응 원료 용액을 준비하는 과정에서 반응 원료 용액 내의 제인(Zein) 단백질 농도는 반응 원료 용액 전체 부피를 기준으로 1%(w/v)로 고정되었고, 글라브리딘 농도는 반응 원료 용액 전체 부피를 기준으로 0~1%(w/v)의 다양한 범위로 조정되었다. 이후, 반응 원료 용액을 25℃에서 약 2hr 동안 교반하고 약 40℃에서 10분 동안 반응 원료 용액 내의 에탄올을 증발시켜 제거하고 글라브리딘dl 제인(Zein) 나노입자에 캡슐화된 형태의 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드를 수득하였다. 이후, 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드에 증류수를 첨가하여 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 함유하는 콜로이드의 부피를 40㎖로 조정하고 최종적인 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 수득하였다.

[0096] **2. 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 다양한 특성 분석**

[0097] (1) 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 크기, PDI(Polydispersity index) 및 제타 전위(Zeta potential)

[0098] 상기 2차 실험에서 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 크기, PDI(Polydispersity index) 및 제타 전위(Zeta potential)를 동적빛산란(dynamic light scattering, DLS) 방법을 이용하여 분석하였다. 구체적으로 시료의 나노입자 농도를 Tris-HCl 버퍼 용액을 이용하여 0.1%(w/v)가 되도록 희석하였다. 이후, 173° 의 고정된 산란각, 25℃의 온도에서 He-Ne 레이저(λ=633 nm)가 구비된 Zetasizer Nano-ZS (Malvern, UK)를 이용하여 희석된 시료를 분석하였다.

[0099] 도 11은 본 발명의 2차 실험에서 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 크기 및 PDI(Polydispersity index)를 나타낸 것이다. 본 발명에서 PDI(Polydispersity index)는 나노입자 크기의 균일 수준을 나타내며, PDI(Polydispersity index) 값이 0에 가까울수록 형성된 나노입자들의 크기가 매우 균일함을 의미하고 PDI(Polydispersity index) 값이 1에 가까울수록 형성된 나노입자들의 크기가 매우 불균일함을 의미한다. 도 11에서 보이는 바와 같이 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도가 증가할수록 약 210~242 nm의 매우 좁은 수치 범위 내에서 입자 크기가 커지는 경향을 보였다. 또한, 도 11에서 보이는 바와 같이 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도 수준에 관계없이 0.2 미만, 구체적으로 0.13~0.18의 PDI(Polydispersity index) 값을 보였다.

[0100] 도 12는 본 발명의 2차 실험에서 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 제타 전위(Zeta potential)를 나타낸 것이다. 도 12에서 보이는 바와 같이 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도가 증가함에 따라 제타 전위(Zeta potential) 값이 약 45㎷ 에서 약 52 ㎷로 다소 감소하였으며, 이러한 결과는 제인 단백질과 글라브리딘 사이에 이온 상호작용(ionic interaction)이 존재함을 나타낸다. 한편, 글라브리딘-제인 복합체 나노입자들은 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도와 관계없이 높은 양전하의 제타 전위(Zeta potential) 값을 가지며, 이러한 결과는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자들 간에 척력이 작용하여 응집이 억제되고 글라브리딘-제인 복합체 나노입자들이 안정한 상태를 유지함을 보여준다.

[0102] (2) 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 형태학적 특성

[0103] 상기 2차 실험에서 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 형태학적 특성을 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 분석하였다. 구체적으로 상기 2차 실험에서 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 함유 콜로이드를 동결건조하여 시료를 준비하고, FESEM(Field Emission Scanning Electron Microscope)을 이용하여 시료의 형태를 이미지화하였다. 또한, 대조군으로 1%(w/v) 농도의 제인 단백질 나노입자 함유 콜로이드를 동결건조하여 시료를 준비하고, 이를 대조군(도 13의 Free zein에 해당함) 시료로 사용하였다.

[0104] 도 13은 본 발명의 2차 실험에서 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도에 따른 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 형태를 주사전자현미경(SEM)으로 촬영한 사진이다. 도 13에서 "Free Zein"은 제인 단백질 나노입자를 나타내고, "GB-Zein (0.1%)"는 2차 실험에서 0.1%(w/v)의 글라브리딘 농도로 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 나타내고, "GB-Zein (0.6%)"는 2차 실험에서 0.6%(w/v)의 글라브리딘 농도로 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 나타내고, "GB-Zein (1.0%)"는 2차 실험에서 1.0%(w/v)의 글라브리딘 농도로 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 나타낸다. 도 13에서 보이는 바와 같이 대조군에 해당하는 제인 단백질 나노입자는 구형에 가깝고 약 124 nm의 입자 크기를 보였다. 또한, 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자 제조과정 중 사용한 글라브리딘의 농도가 증가함에 따라 입자 크기가 약간 증가하였으나 구형을 형태를 유지하였다. 또한, 주사전자현미경(SEM)으로 촬영한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 입자 크기는 시료 준비 과정 중 사용한 동결건조 등의 영향으로 동적빛산란(dynamic light scattering, DLS) 방법으로 측정한 입자 크기보다 약간 낮은 값을 보였다.

[0106] (3) 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 FTIR(Fourier transform infrared spectroscopy) 스펙트럼

[0107] 도 14는 글라브리딘, 제인 단백질 나노입자 및 본 발명의 2차 실험에서 1%(w/v)의 글라브리딘 농도로 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 FTIR 스펙트럼 결과이다. 도 14에서 "GB"는 글라브리딘을 나타내고, "Zein"은 제인 단백질 나노입자를 나타내고, "GB-Zein complexes"는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 나타낸다.

[0108] 순수한 글라브리딘의 경우, 도 14에서 보이는 3341㎝$^{-1}$에서의 피크는 O-H 신축 진동(stretching vibration)에 해당하고, 1591 ㎝$^{-1}$, 1517 ㎝$^{-1}$, 및 1449 ㎝$^{-1}$에서의 피크들은 방향족 링 내의 C=C 신축 진동(stretching vibration)에 해당하고, 2966 ㎝$^{-1}$ 및 2922 ㎝$^{-1}$에서의 피크들은 메틸기(CH_3)에 해당하고, 1263 ㎝$^{-1}$에서의 피크는 C-O-C 신축 진동(stretching vibration)에 해당한다. 또한, 제인 단백질 나노입자의 경우, 도 14에서 보이는 3288 ㎝$^{-1}$, 2958 ㎝$^{-1}$, 1641 ㎝$^{-1}$, 및 1531 ㎝$^{-1}$에서의 피크들은 각각 하이드록실기(-OH), CH_2의 신장, 아마이드(amide) Ⅰ 및 아마이드 Ⅱ에 해당한다.

[0109] 도 14에서 보이는 바와 같이, 글라브리딘-제인 복합체 나노입자에서는 글라브리딘의 고유 피크들이 나타나지 않았고, 이러한 결과는 글라브리딘이 제인 단백질 나노입자 내부로 캡슐화되었다는 것을 시사한다. 특히 글라브리딘-제인 복합체 나노입자에서는 글라브리딘의 고유 피크 중 O-H 신축 진동(stretching vibration)에 해당하는 3341㎝$^{-1}$에서의 피크가 나타나지 않았고, 이러한 결과는 글라브리딘에 존재하는 하이드록실기와 글라브리딘을 둘러싸는 물질 사이에서 수소결합이 발생함을 시사한다.

[0110] 또한, 도 14에서 보이는 바와 같이, 글라브리딘-제인 복합체 나노입자에서는 제인 단백질 나노입자에서 보이는 2958 ㎝$^{-1}$, 1641 ㎝$^{-1}$, 및 1531 ㎝$^{-1}$에서의 피크들이 각각 2928 ㎝$^{-1}$, 1650 ㎝$^{-1}$, 및 1539 ㎝$^{-1}$로 이동하였는데, 이러한 결과는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 형성에 소수성 상호작용이 발생하고 제인 단백질 나노입자에 존재하는 CH_2, 아마이드(amide) Ⅰ 및 아마이드 Ⅱ가 글라브리딘과의 소수성 상호작용에 관련되어 있음을 시사한다.

[0112] (4) 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 XRD(X-ray Diffraction Spectroscopy) 스펙트럼 및 DSC(differential scanning calorimetry) 스펙트럼

[0113] 도 15는 글라브리딘, 제인 단백질 나노입자 및 본 발명의 2차 실험에서 1%(w/v)의 글라브리딘 농도로 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 XRD 스펙트럼 결과이다. 도 15에서 "GB"는 글라브리딘을 나타내고, "Zein"은 제인 단백질 나노입자를 나타내고, "GB-Zein complexes"는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 나타낸다.

[0114] 도 15에서 보이는 바와 같이 글라브리딘은 5 내지 50° 의 2Θ 내에서 일련의 결정 피크들을 보였다. 반면, 글라브리딘이 제인 단백질 나노입자에 캡슐화되는 경우 글라브리딘의 결정 피크들이 사라졌고, 이러한 결과는 제인 단백질 나노입자에 캡슐화된 글라브리딘이 결정형이 아닌 무정형의 성질을 가진다는 것을 나타낸다.

[0115] 도 16은 글라브리딘, 제인 단백질 나노입자 및 본 발명의 2차 실험에서 1%(w/v)의 글라브리딘 농도로 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 DSC 스펙트럼 결과이다. 도 16에서 "GB"는 글라브리딘을 나타내고, "Zein"은 제인 단백질 나노입자를 나타내고, "GB-Zein complexes"는 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 나타낸다. 도 16에서 보이는 바와 같이 글라브리딘이 제인 단백질 나노입자에 캡슐화되는 경우 열 안정성이 크게 향상되었다.

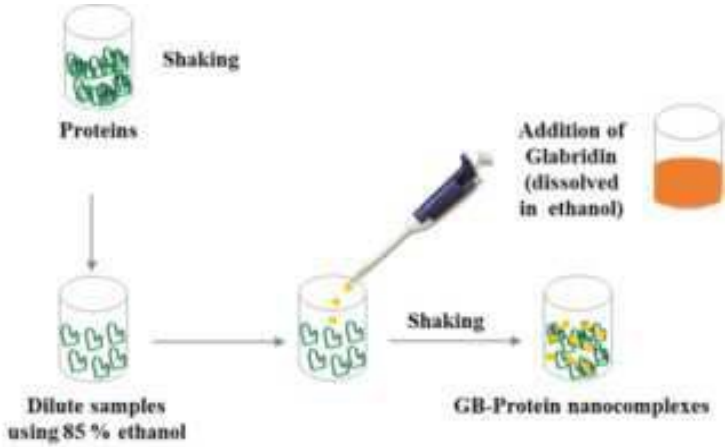
[0117] (5) 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 항균 활성

[0118] 상기 2차 실험에서 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 항균 활성을 다양한 매질 환경에서 측정하였다. 구체적으로, 메탄올 매질 환경 및 물(water) 매질 환경에서 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 균을 50% 사멸시키는 글라브리딘의 농도 및 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 농도를 측정하였다. 도 17은 글라브리딘 및 본 발명의 2차 실험에서 1%(w/v)의 글라브리딘 농도로 제조한 글라브리딘-제인 복합체 나노입자의 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 균에 대한 항균 활성을 MIC(minimum inhibitory concentration) 값으로 나타낸 것이다. 도 17에서 "Methanol"은 매질로 메탄올을 사용한 경우를 나타내고, "Water"는 매질로 물을 사용한 경우을 나타내고, "GB"는 글라브리딘을 나타내고, "GB-Zein"은 글라브리딘-제인 복합체 나노입자를 나타낸다. 도 17에서 보이는 바와 같이 글라브리딘-제인 복합체 나노입자는 물(water) 매질 환경에서 글라브리딘보다 약 2배 정도의 우수한 항균 활성을 갖는 것으로 확인되었다.

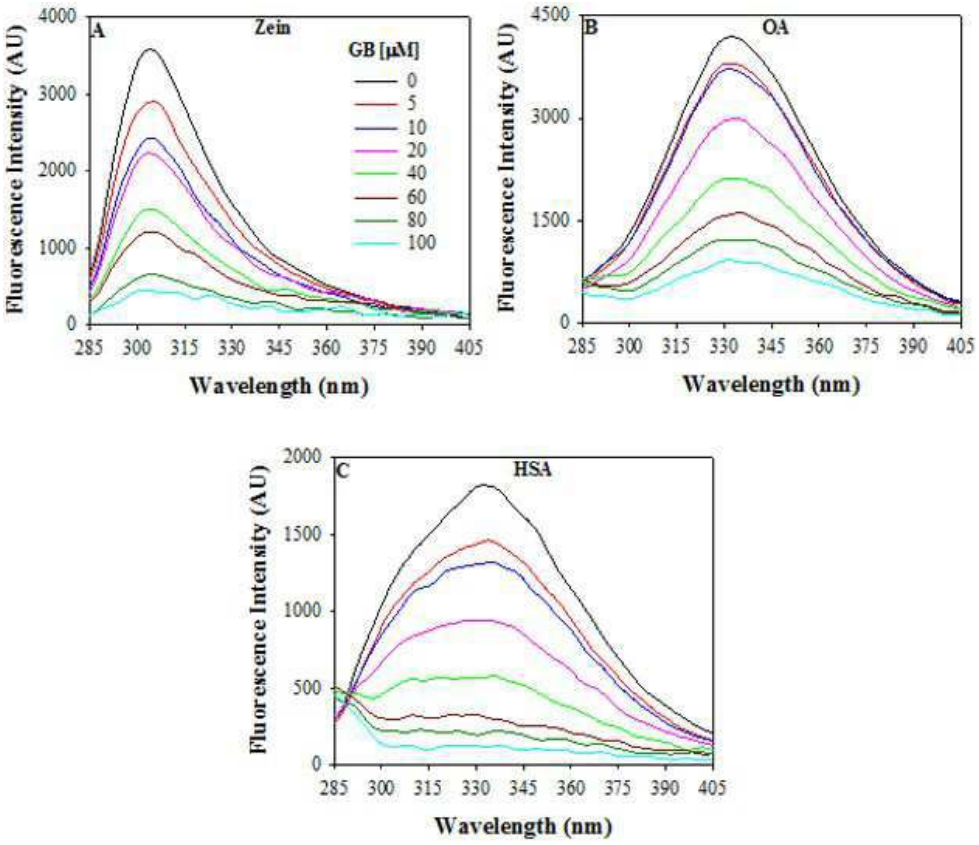
[0120] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

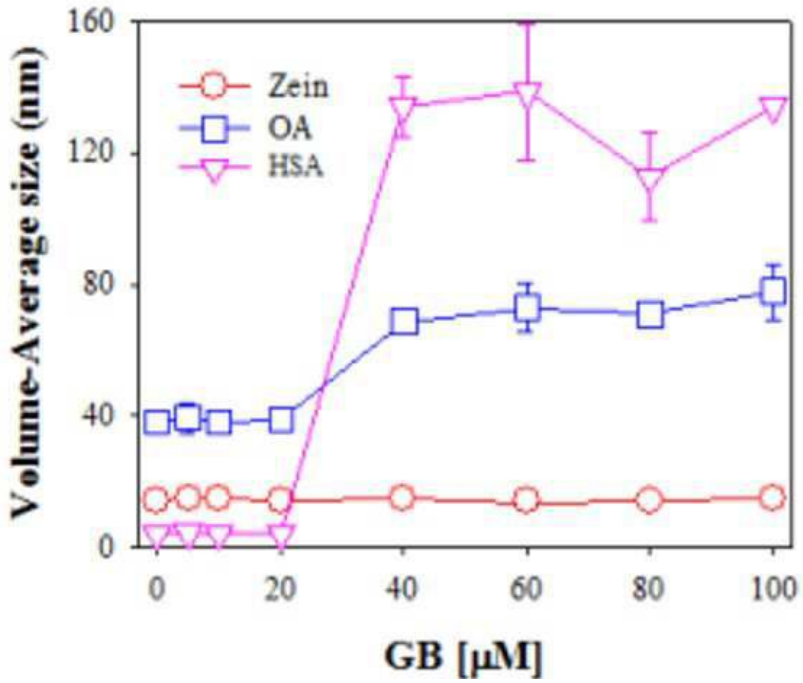
도면1


Shaking
Proteins
Addition of
Glabridin
(dissolved
in ethanol)
Shaking
Dilute samples
using 85 % ethanol
GB-Protein nanocomplexes

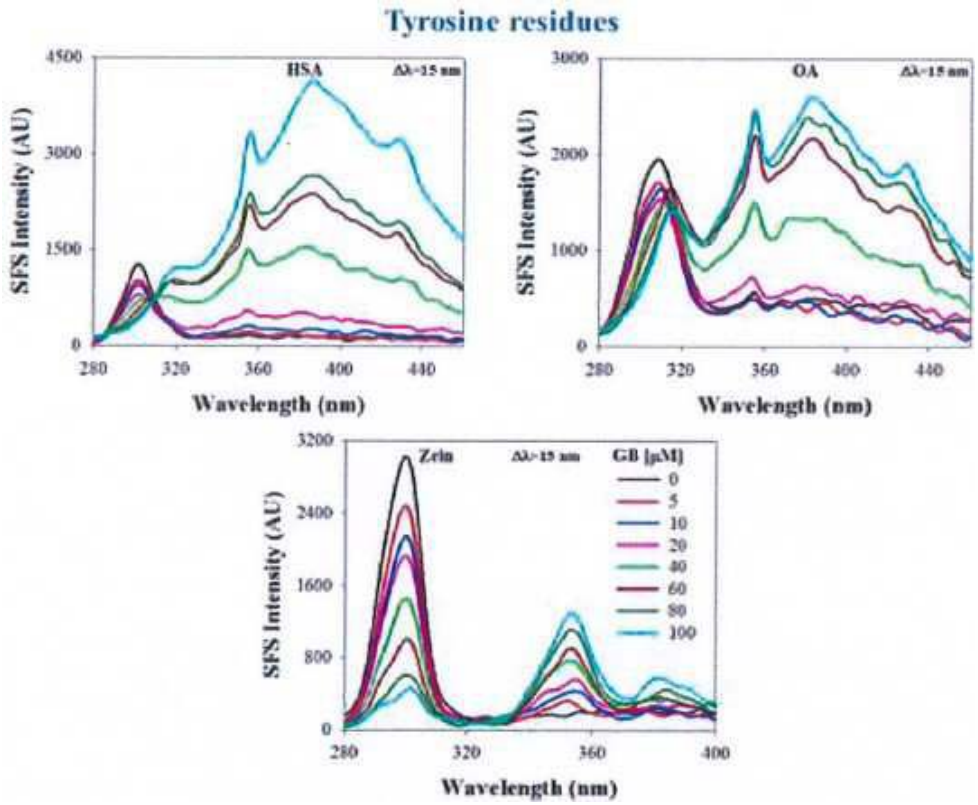
도면2


A
Zein
GB [μM]
0
5
10
20
40
60
80
100
Fluorescence Intensity (AU)
Wavelength (nm)
B
OA
Fluorescence Intensity (AU)
Wavelength (nm)
C
HSA
Fluorescence Intensity (AU)
Wavelength (nm)

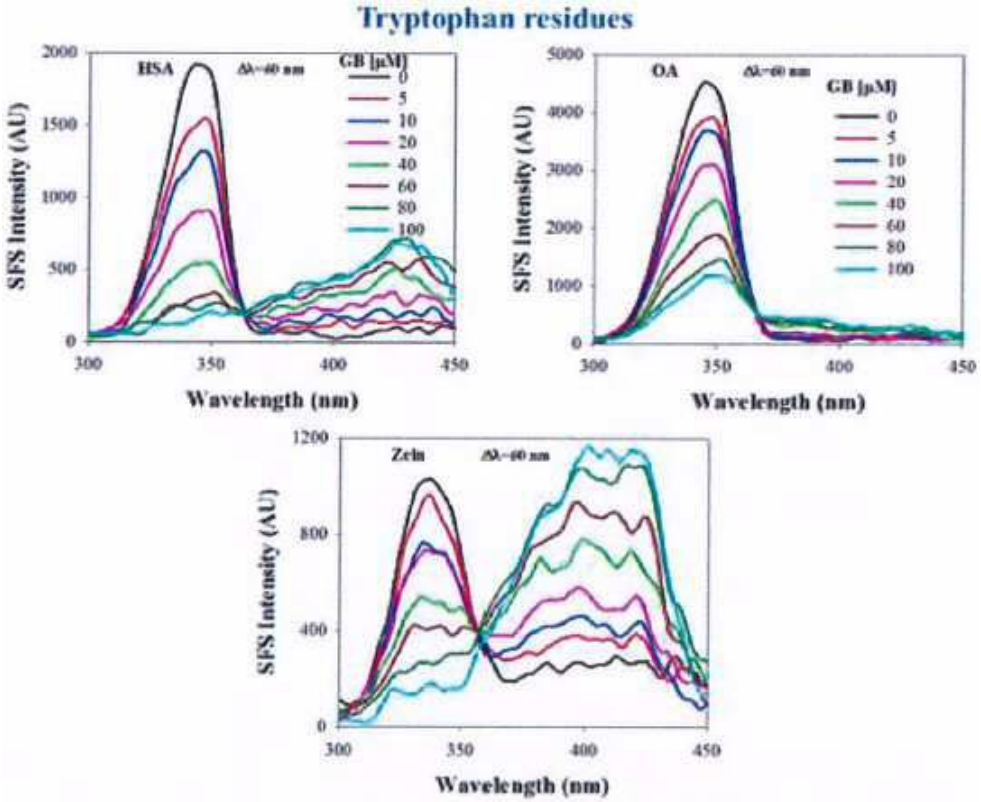
도면3


Volume-Average size (nm)
160
120
80
40
0
Zein
OA
HSA
0
20
40
60
80
100
GB [μM]

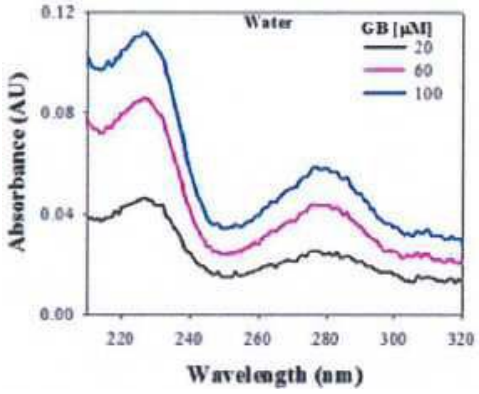
도면4


Tyrosine residues
BSA
Δλ=15 nm
SFS Intensity (AU)
Wavelength (nm)
OA
Δλ=15 nm
SFS Intensity (AU)
Wavelength (nm)
Zein
Δλ=15 nm
GB [μM]
0
5
10
20
40
60
80
100
SFS Intensity (AU)
Wavelength (nm)

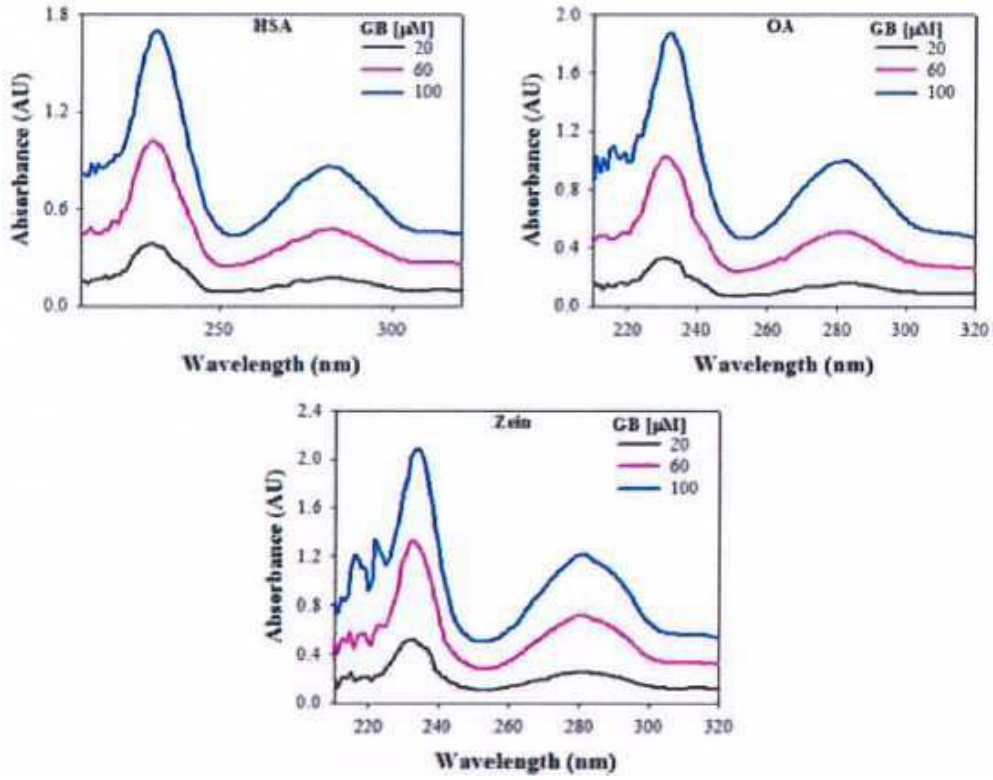
도면5


Tryptophan residues
HSA
Δλ=60 nm
GB [μM]
0
5
10
20
40
60
80
100
SFS Intensity (AU)
Wavelength (nm)
OA
Δλ=60 nm
GB [μM]
Zein
Δλ=60 nm

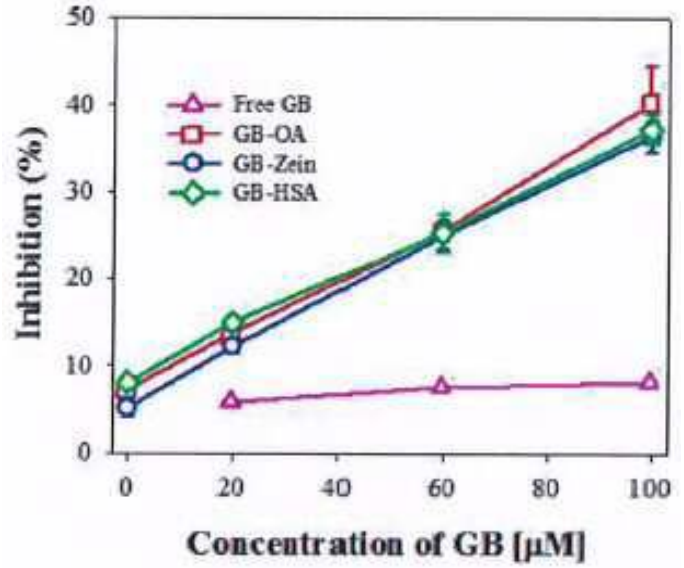
도면6


Water
GB [μM]
20
60
100
Absorbance (AU)
Wavelength (nm)

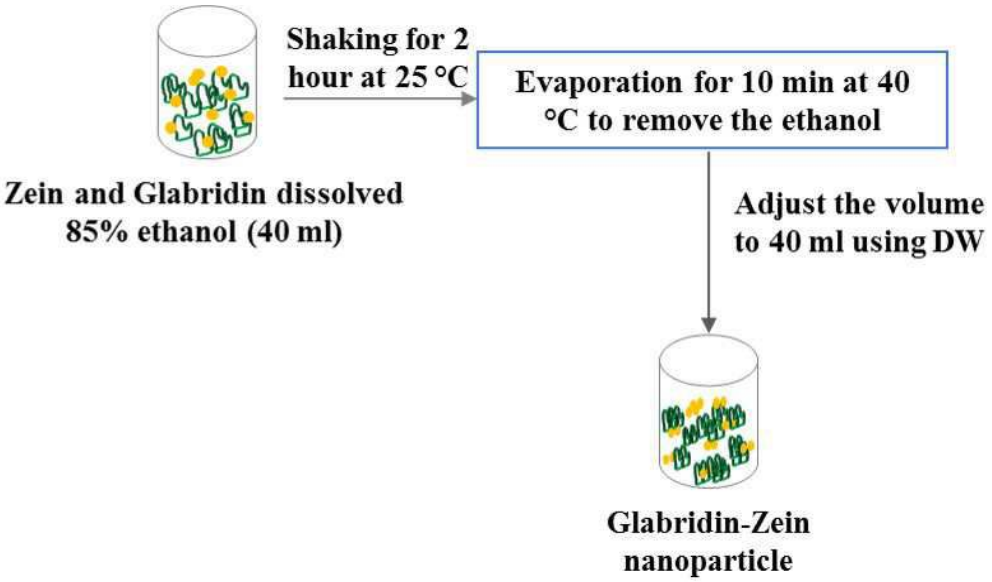
도면7


HSA
GB [μM]
20
60
100
Absorbance (AU)
Wavelength (nm)
OA
GB [μM]
20
60
100
Absorbance (AU)
Wavelength (nm)
Zein
GB [μM]
20
60
100
Absorbance (AU)
Wavelength (nm)

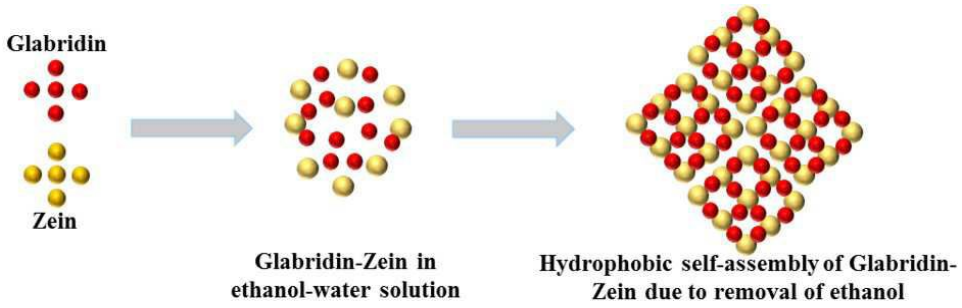
도면8


Free GB
GB-OA
GB-Zein
GB-HSA
Inhibition (%)
Concentration of GB [μM]

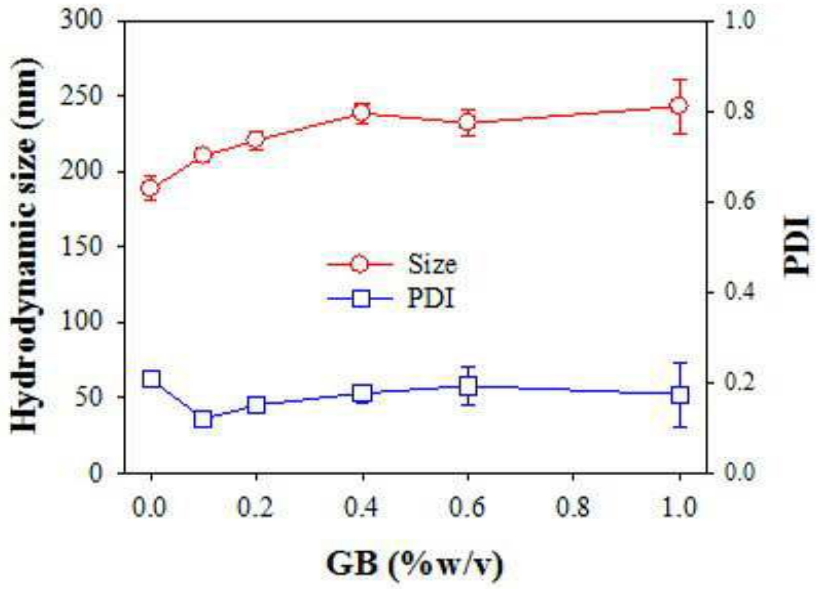
도면9



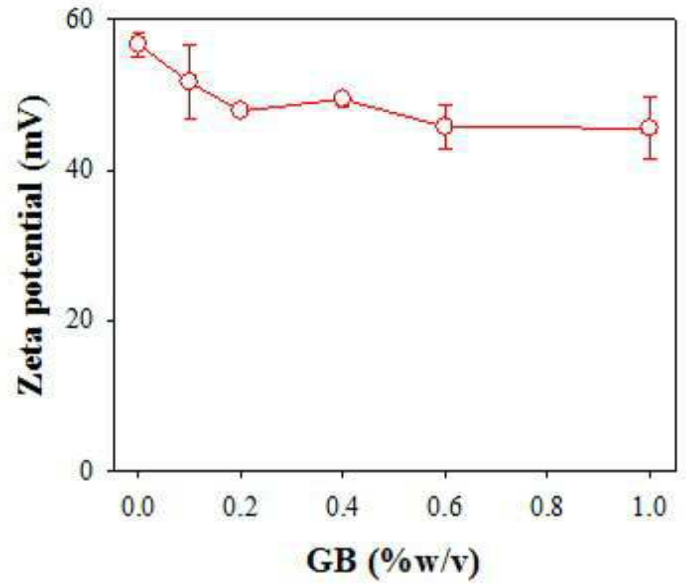
도면10



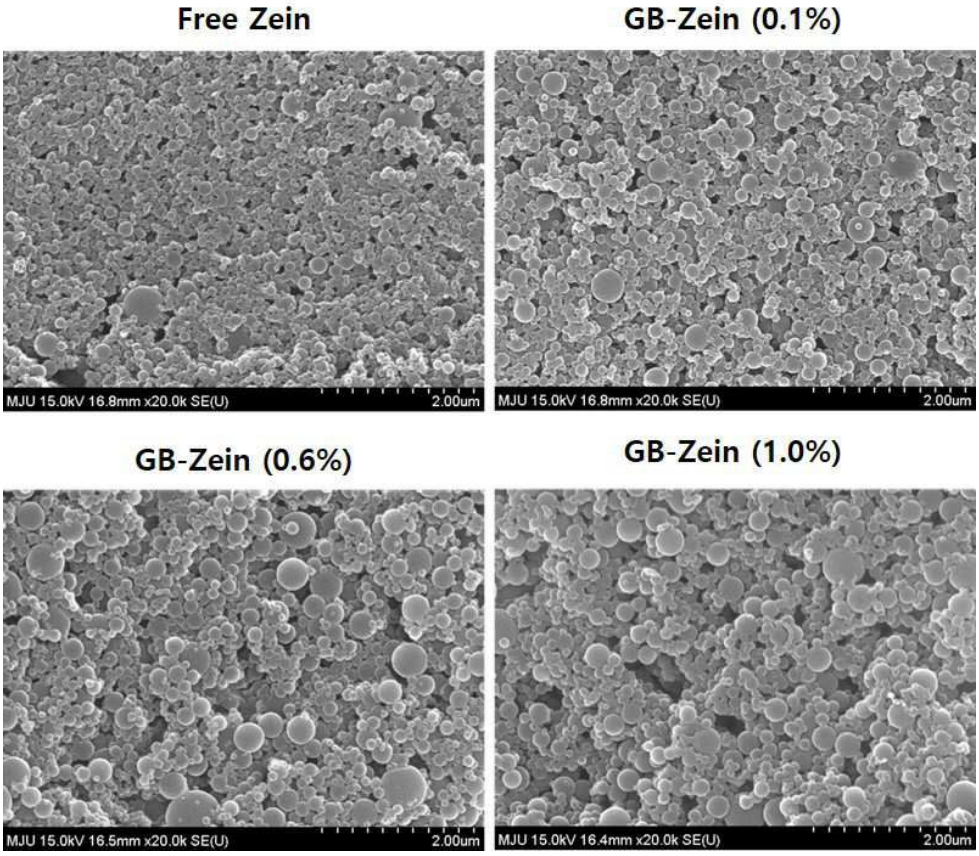
도면11



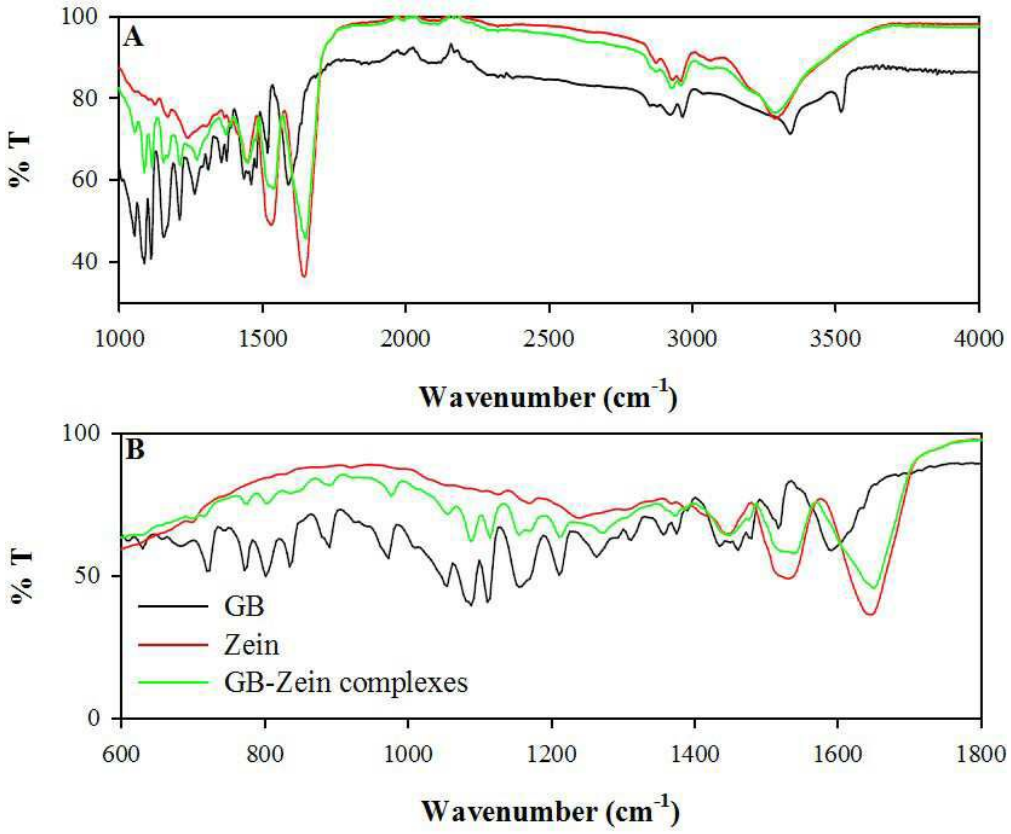
도면12


Zeta potential (mV)
60
40
20
0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
GB (%w/v)

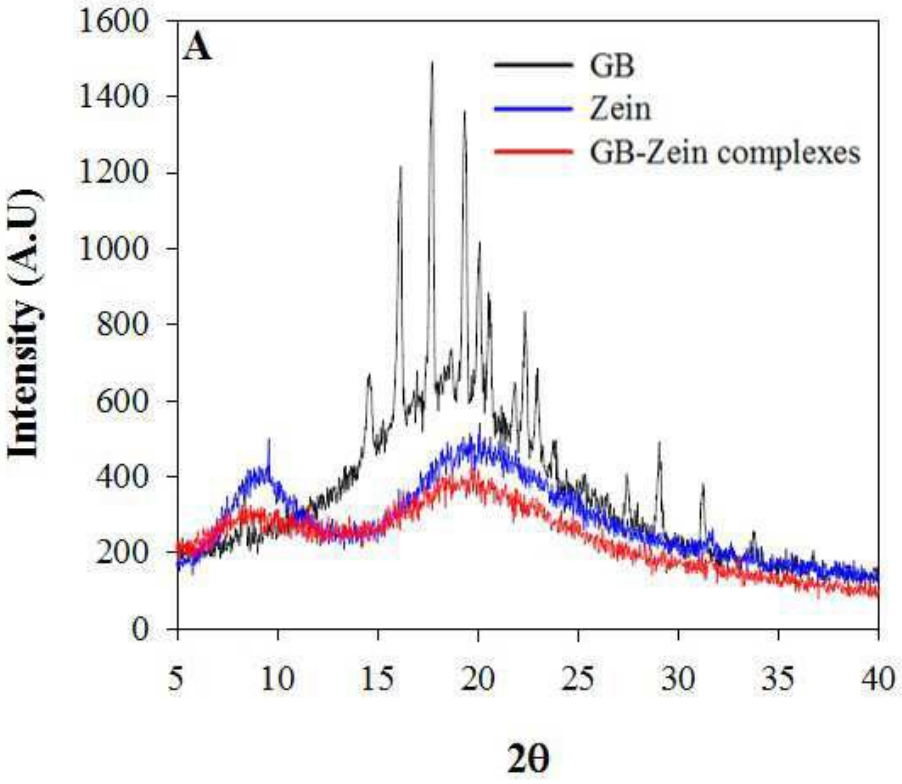
도면13


Free Zein
GB-Zein (0.1%)
GB-Zein (0.6%)
GB-Zein (1.0%)
MJU 15.0kV 16.8mm x20.0k SE(U)
2.00um
MJU 15.0kV 16.8mm x20.0k SE(U)
2.00um
MJU 15.0kV 16.5mm x20.0k SE(U)
2.00um
MJU 15.0kV 16.4mm x20.0k SE(U)
2.00um

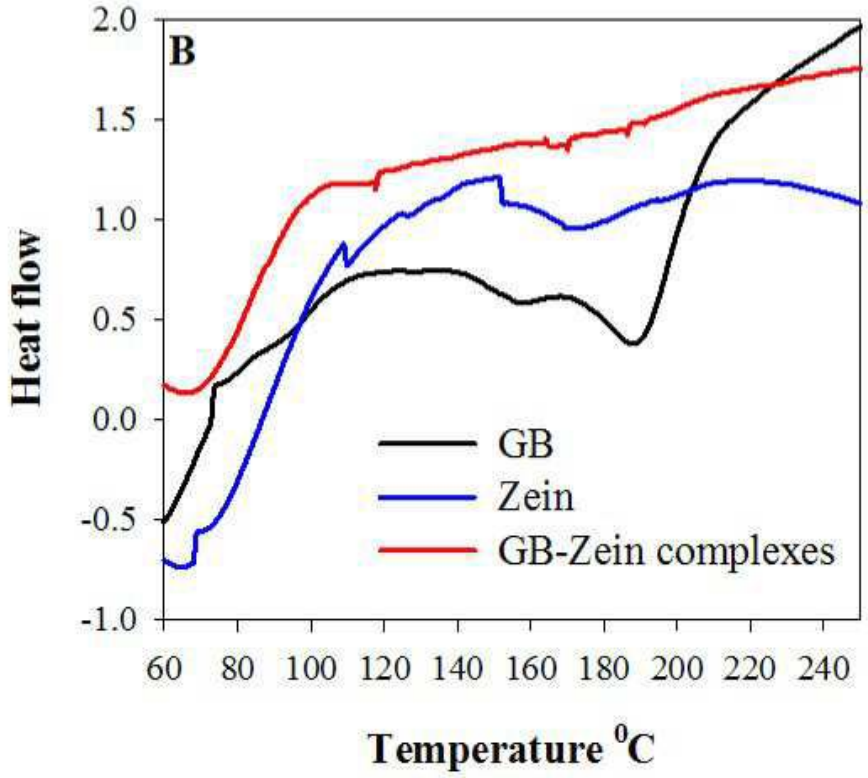
도면14


A
% T
100
80
60
40
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
Wavenumber (cm-1)
B
% T
100
50
0
GB
Zein
GB-Zein complexes
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
Wavenumber (cm-1)

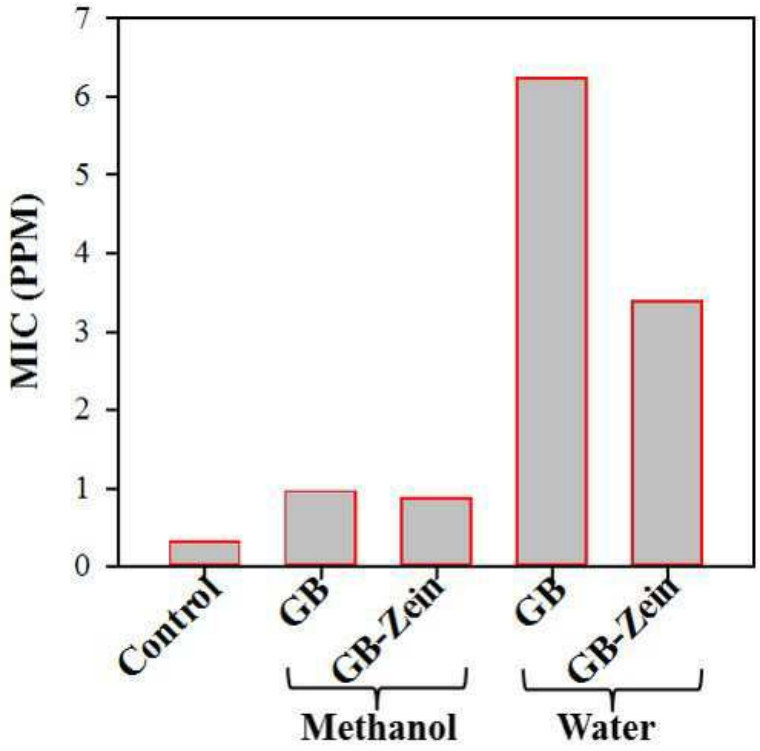
도면15


A
Intensity (A.U)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
GB
Zein
GB-Zein complexes
5
10
15
20
25
30
35
40
2θ

도면16


B
Heat flow
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
Temperature ^{0}C
GB
Zein
GB-Zein complexes

도면17


MIC (PPM)
7
6
5
4
3
2
1
0
Control
GB
GB-Zein
GB
GB-Zein
Methanol
Water