

11-15430
00-00246
8-01

발간등록번호

11-1543000-002468-01

식천
품연

산보
업존

현소
장재

의 및

나
노제

기술
개발

적
용최

종
확대

보고
서를

위
한

2018

농림축산식품부

고부가가치 식품기술개발사업 R&D Report

식품 산업 현장의 나노기술 적용확대를
위한 천연 보존 소재 및 제품 개발
최종보고서

2018. 10. 11.

주관연구기관 / (주)다인소재
협동연구기관 / 서울대학교
협동연구기관 / 명지대학교
위탁연구기관 / 한양대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “식품 산업 현장의 나노기술 적용확대를 위한 천연 보존 소재 및 제품 개발”(개발기간 : 2015.10.12 ~ 2018.10.11)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 10. 11.

주관연구기관명 : 주식회사 다인소재 (대표자)



제1협동연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (대표자)



제2협동연구기관명 : 명지대학교 산학협력단 (대표자)



위탁연구기관명 : 한양대학교 산학협력단 (대표자)



주관연구책임자 : 윤태



제1협동연구책임자 : 김용노



제2협동연구책임자 : 최신성



위탁연구책임자 : 김현숙



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	315065-3	해 당 단 계 연 구 기 간	3년 (2015.10.12- 2018-10.11)	단 계 구 분	3차년도/ 3차년도
연구사업명	단 위 사 업	식품품질관리			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	식품 산업 현장의 나노기술 적용확대를 위한 천연 보존 소재 및 제품개발			
	세 부 과 제 명	[세부] 고순도 코어소재 확보 및 나노소재의 식품응용연구와 유전독성평가 [1협동] 천연 향균/항산화소재의 기능성 증진을 위한 나노소재화 기술 개발 [2협동] 단백질, 지질기반 식품나노소재 제형화 기술개발 [위탁] 식품나노소재에 대한 안전성평가 및 효능검증			
연구책임자	[세부] 윤태미 [1협동] 김용노 [2협동] 최신식 [위탁] 김현숙	해당단계 참여연구원 수	총: 31명 내부: 31명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간:100,000천원 계:400,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 47명 내부: 47명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:900,000천원 민간:300,000천원 계:1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	주식회사 다인소재 향균소재연구소			참여기업명 주식회사 다인소재	
국제공동연구	상대국명: -			상대국 연구기관명: -	
위탁연구	연구기관명: 한양대학교			연구책임자: 김현숙	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	9	3	2								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

<p>요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 나노화 위한 고순도 천연소재 제조공정 확립 및 규격화 완료 - 천연 향균/항산화소재의 기능성 증진을 위한 나노소재 제조 기술 개발 - 나노소재 제조기술 기반 pilot 생산공정 확립 - 나노소재 향균/항산화 효능 개선 확인 - 나노소재 식품 및 화장품 적용 효능 검증 완료 - GLP 유전독성시험 및 독성 평가 통한 나노소재 안전성 검증 완료 - 나노소재 제품 2건 개발완료 (업체제안 계획 중) 	<p>보고서 면수</p> <p>332</p>
--	--------------------------

<요약문>

<p style="text-align: center;">연구의 목적 및 내용</p>	<p>[연구목적] 합성에 비해 효능과 제형이 불안정한 향균 및 항산화 활성을 지닌 천연 식물추출물(천연 향균/항산화소재)의 제품 차별화 및 기능 증진을 위한 나노 소재 제조 공정 개발과 안정성 평가 및 효능을 검증하고 이를 이용하여 제형별 고부가가치 제품개발을 목적으로 함.</p> <p>[연구내용] ○ 나노화를 위한 고순도 천연 향균/항산화소재 (감초, 로즈마리, 토복령, 섬기린초 추출물)의 제조공정 확립 및 유용성분 규격화 ○ 천연 향균/항산화소재의 기능성 증진을 위한 나노복합체 제조 기술 개발 ○ 천연 향균/항산화소재의 기능성 증진을 위한 나노에멀전 제조 기술 개발 ○ 나노복합체와 나노에멀전 기술을 접목한 멀티 나노소재 제조 공정 개발 ○ 식품 성분의 나노소재화 위한 보조제(탁백질, 지질 기반) 개발 ○ 천연 향균/항산화소재의 나노소재화 최적화 공정 개발 (Desolvation, Biopolymer-Gel 등) ○ 나노소재 제형화 (분말, 페이스트, 나노화이버 등) 공정 기술 개발 및 최적화 ○ 나노 소재의 식품(음료, 소스, 장류 등) 보존 효능 및 화장품(방부, 미백) 적용 효능 검증 ○ 향균/항산화 소재의 나노소재화 pilot 생산공정 확립 및 제품화 ○ 천연 향균/항산화소재의 혼합 및 나노제형화에 따른 효능 평가법 표준화 ○ 개발 나노소재의 제형별, 저장조건별 효능 평가 및 향상법 확립 ○ 개발 나노소재 산업화 적용 효능 검증 및 안전성 평가</p>																																		
<p style="text-align: center;">연구개발성과</p>	<p>[연구성과] ○ 식물추출물의 융합기술(BT, NT) 적용 통한 고부가가치 기능성 제품개발 완료(식품산업 및 화장품 산업에서 보존 및 기능성 원료로 활용가능 -> 업체 제안 중)</p> <p>[정량성과]</p> <table border="1" data-bbox="437 981 1114 1272"> <thead> <tr> <th>항목</th> <th>목표</th> <th>달성</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>특허</td> <td>출원4/등록3</td> <td>출원10/등록3</td> </tr> <tr> <td>기술실시(이전)</td> <td>1</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>사업화</td> <td>제품2/고용2</td> <td>제품2/고용2</td> </tr> <tr> <td>기술인증</td> <td>2</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>학술성과</td> <td>SCI 4/비SCI 1</td> <td>SCI 6/비SCI 3</td> </tr> <tr> <td>교육지도</td> <td>2</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>인력양성</td> <td>2</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>정책활용홍보</td> <td>정책3/홍보1</td> <td>정책3/홍보1</td> </tr> <tr> <td>기타</td> <td>1</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>					항목	목표	달성	특허	출원4/등록3	출원10/등록3	기술실시(이전)	1	2	사업화	제품2/고용2	제품2/고용2	기술인증	2	2	학술성과	SCI 4/비SCI 1	SCI 6/비SCI 3	교육지도	2	2	인력양성	2	6	정책활용홍보	정책3/홍보1	정책3/홍보1	기타	1	2
항목	목표	달성																																	
특허	출원4/등록3	출원10/등록3																																	
기술실시(이전)	1	2																																	
사업화	제품2/고용2	제품2/고용2																																	
기술인증	2	2																																	
학술성과	SCI 4/비SCI 1	SCI 6/비SCI 3																																	
교육지도	2	2																																	
인력양성	2	6																																	
정책활용홍보	정책3/홍보1	정책3/홍보1																																	
기타	1	2																																	
<p style="text-align: center;">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 식물추출물을 이용한 고부가가치의 천연 향균/항산화 기능성 식품 소재 개발 ○ 합성보존제를 대체하여 식품 수준의 안전하고 효능과 지속성이 우수한 천연보존제 개발 ○ 생명공학(BT)와 나노기술(NT)의 융합기술개발에 의한 효능과 관능이 우수한 식품안전소재 개발 및 핵심기술력 선점 효과 ○ 적용 효능이 우수한 천연보존제 개발로 식품 안전 및 국민 건강 기여 ○ 국내 연구에 의한 우수한 원료의 수출이 기대됨 ○ 현재의 국내기술 수준을 본 과제 수행으로 선진국 대비 80-90% 수준으로 올릴 수 있을 것임 ○ 과제를 완료하여 제품화가 달성되면 (주)다인소재의 350여개의 식품 회사와 연결된 영업망을 이용하여 각 식품의 보존 솔루션을 제공함으로써 판매 시장을 확대하며, 매년 KINTEX 식품전시회를 통한 마케팅으로 판매를 촉진할 계획임 ○ 효능과 안정성이 우수한 나노화 천연보존제 개발로 식품용 천연보존제 수출 117억 증대 가능(0.1% 세계시장점유율 산정시) ○ 국내식품용 천연보존제 시장규모 427억원/년, 세계시장규모 11.6조원/년 (0.1% 시장점유율 경우 117억원/년) ○ 국내화장품용 천연보존제 시장규모 75억원/년, 세계시장규모 1313억원/년 (1% 시장점유율 경우 131억원/년)</p>																																		
<p style="text-align: center;">국문핵심어 (5개 이내)</p>	천연보존료	천연 향균/항산화소재	식품나노소재	식품안전성	생체이용률																														
<p style="text-align: center;">영문핵심어 (5개 이내)</p>	Natural preservative	Natural antimicrobial/antioxidant material	Food nanomaterial	Food safety	Bioavailability																														

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

〈 목 차 〉

제 1 장. 연구개발과제의 개요	1
제 1 절. 연구개발 목적	1
제 2 절. 연구개발 필요성	1
제 3 절. 국내·외 기술개발 현황	12
제 4 절. 연구개발 범위	21
제 2 장. 연구수행 내용 및 결과	22
제 1 절. 연구개발의 추진전략, 추진체계 및 추진일정	22
1. 연구개발의 추진전략	22
2. 연구개발의 추진체계	24
3. 연구개발의 추진일정	25
제 2 절. 세부과제별 연구수행 내용	30
I. 주관기관 ((주)다인소재)	30
1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과	30
가. 1차년도 연구수행방법	30
(1) 고순도 코어소재 제조공정 확립	30
(2) 고순도 코어소재 유효성분 및 항균력 규격화	30
(3) 나노화 소재 안전성 평가	32
(4) 토복령추출물의 항효모활성 물질 분리정제 및 구조규명	33
나. 1차년도 연구결과	34
(1) 고순도 코어소재 제조공정 확립	34
가) 고순도 감초추출물 제조	34
나) 고순도 로즈마리추출물 제조	36
다) 고순도 토복령추출물 제조	37
라) 고순도 섬기린초추출물 제조	38
(2) 고순도 코어소재 유효성분 및 항균력 규격화	40
가) 원물 및 코어소재 유효성분 규격화	40
나) 원물 및 코어소재 항균력 규격화	43
(3) 나노화 소재 안전성 평가	44
가) 복귀돌연변이시험	44
나) 체외염색체이상시험	44
다) 체내소핵시험	45
(4) 토복령추출물의 항효모 활성물질 분리정제 및 구조규명	50
가) 유효성분 분리정제	50

나) 유효성분 구조동정	51
2. 2차년도 연구수행 내용 및 결과	53
가. 2차년도 연구수행방법	54
(1) 나노소재 완성도 평가	54
(2) 나노소재 제품적용 가능성 평가	55
(3) 나노소재 식품 보존효능 평가	55
(4) 나노소재 화장품 보존효능 평가	56
(5) 나노소재 여성호르몬 유사효능 평가	57
(6) 나노소재 안전성 평가	57
나. 2차년도 연구결과	58
(1) 나노소재 완성도 평가	58
가) 감초 나노소재 완성도평가	58
나) 로즈마리 나노소재 완성도평가	60
다) 토복령 나노소재 완성도평가	63
라) 섬기린초 나노소재 완성도평가	65
마) 종합결과	66
(2) 나노소재 제품적용 가능성 평가	67
가) 나노소재 물분산성 평가	67
나) 나노소재 열안정성 평가	68
(3) 나노소재 식품 보존효능 평가	71
가) 소스류 보존 효능 평가	71
나) 고추장 보존 효능 평가	71
다) 간장 보존 효능 평가	72
라) 중성차 보존 효능 평가	73
(4) 나노소재 화장품 보존효능 평가	74
가) 화장품 방부효능 평가	74
나) 미백 효능 평가	75
(5) 나노소재 여성호르몬 유사효능 평가	75
가) 에스트로젠 수용체 결합활성 평가	75
나) 에스트로젠 수용체 발현세포 증식효능 평가	76
(6) 나노소재 안전성 평가	76
가) 복귀돌연변이시험	76
나) 체외염색체이상시험	77
다) 체내소핵시험	77
3. 3차년도 연구수행 내용 및 결과	82
가. 3차년도 연구수행방법	82

(1) 나노소재 pilot scale 생산공정 세팅	82
(2) 나노소재 제품 규격안 세팅	82
(3) 식품적용 나노소재 유통기한 설정	83
(4) 로즈마리 나노소재 안전성 평가	83
(5) 섬기린초 나노소재 안전성 평가	84
(6) 추가 효능 평가	85
나. 3차년도 연구결과	87
(1) 제품화 나노소재 결정	87
가) 코어소재	87
나) 피복소재 및 나노소재	87
다) 제품타입	87
(2) 나노소재 pilot scale 생산공정 세팅	87
가) 로즈마리 나노소재 생산공정 확립	87
나) 섬기린초 나노소재 생산공정 확립	90
(3) 나노소재 제품 규격안 세팅	93
가) 로즈마리 나노소재 COA 세팅	93
나) 섬기린초 나노소재 COA 세팅	94
(4) 식품적용 나노소재 유통기한 설정	94
가) 저장온도별 저장기간에 따른 품질지표변화 분석	94
나) 품질지표별 반응속도상수(K) 산출	96
다) 온도영향에 따른 품질지표별 활성화에너지 산출	97
라) 유통기한 산출	97
(5) 로즈마리 나노소재 안전성 평가	98
가) 복귀돌연변이시험	98
나) 체외염색체이상시험	98
다) 체내소핵시험	98
(6) 섬기린초 나노소재 안전성 평가	104
가) 섬기린초 원물 잔류농약, 중금속 분석	104
나) 섬기린초 나노소재 피부자극시험	104
(7) 추가 효능 평가	105
가) 섬기린초 나노소재 주름억제 효능평가	105
나) 토복령 코어소재 골대사 효능평가	106
II. 제1협동기관 (서울대학교)	108
1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과	108
가. 1차년도 연구수행방법	108
(1) 환형아밀로스 제조조건 최적화	108

(2) 환형아밀로스 이화학적 특성 분석	109
(3) 환형아밀로스와 천연소재와의 나노복합체 제조조건 최적화	109
(4) 천연 항균/항산화 소재의 나노복합체에서의 기능성 분석	111
(5) 천연 항균/항산화 물질의 나노복합체에서의 안정성 분석	111
(6) 나노에멀전 제조	112
나. 1차년도 연구결과	113
(1) 환형아밀로스 제조조건 최적화	113
가) Isoamylase 처리조건 최적화	113
나) TAgTase 처리조건 최적화	114
다) Glucoamylase 처리조건 최적화	115
(2) 환형아밀로스 이화학적 특성 분석	115
가) HPSEC 이용한 cycloamylose 생산수율 측정	115
나) HPAEC 이용한 cycloamylose 중합도 분석	116
다) MALDI-TOF 이용한 cycloamylose 분자량 측정	117
(3) 환형아밀로스와 천연소재와의 나노복합체 제조조건 최적화	119
가) 나노복합체 내 코어소재 정량화	119
나) 나노복합체 제조조건 최적화	119
다) 나노복합체 용해도 측정	120
라) 나노복합체 형성능 규명	121
(4) 천연 항균/항산화 소재의 나노복합체에서의 기능성 분석	123
가) 나노복합체 항균력 분석	123
나) 나노복합체 항산화력 분석	125
(5) 천연 항균/항산화 물질의 나노복합체에서의 안정성 분석	125
가) 나노복합체 열안정성 분석	125
나) 나노복합체 광분해 안정성 분석	127
(6) 나노에멀전 물리화학적 특성 및 안정성 분석	129
가) 나노에멀전 물리화학적 특성 분석	129
나) 나노에멀전 저장안정성 분석	130
2. 2차년도 연구수행 내용 및 결과	132
가. 2차년도 연구수행방법	132
(1) 코어소재 용해도 측정	132
(2) O/W 나노에멀전 제조	132
(3) 나노에멀전 물리화학적 특성 및 안정성 분석	133
(4) 로즈마리 추출물과 Cycloamylose(CA) 복합체의 안정성	135
나. 2차년도 연구결과	136
(1) 코어소재 용해도 측정	136

가) 감초/로즈마리 추출물의 standard curve	136
나) 감초/로즈마리 추출물의 물, 기름에 대한 용해도	136
(2) O/W 나노에멀전 제조	137
가) 유화제 선택	137
나) 에멀전 제조 및 조건 최적화	138
(3) 나노에멀전 물리화학적 특성 및 안정성 분석	138
가) 광학현미경 통한 O/W 나노에멀전 생성여부 관찰	138
나) O/W 나노에멀전 저장안정성 분석	139
다) 코어소재 첨가 나노에멀전의 항산화력 측정	140
라) 코어소재 첨가 나노에멀전의 광안정성 측정	142
마) 코어소재 첨가 나노에멀전의 항균력 측정	142
바) 섬기린초 코어소재 첨가 나노에멀전의 항균력 시너지	143
(4) 로즈마리추출물과 CA 복합체 안정성	145
가) 로즈마리추출물의 용매에 따른 안정성 및 분해산물 분석	145
나) 로즈마리추출물과 CA 복합체의 안정성 분석	147
다) 로즈마리추출물과 CA 복합체의 저장기간 따른 항산화력 분석	149
3. 3차년도 연구수행 내용 및 결과	152
가. 3차년도 연구수행방법	152
(1) 감초 나노복합체 제조	152
(2) 로즈마리 나노에멀전 제조	152
(3) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 제조	153
(4) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 형성능 및 이화학적 특성조사	154
(5) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 효능 평가	154
(6) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 안정성 평가	155
나. 3차년도 연구결과	155
(1) 감초 나노복합체 제조	155
가) 감초 나노복합체 용해도 평가	155
나) 감초 나노복합체 저장안정성 평가	155
다) 감초 나노복합체 형성능 확인	158
(2) 멀티나노소재 제조 및 안정성 평가	160
가) 멀티나노소재 이화학적 특성	160
나) 멀티나노소재 효능평가	161
(3) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 제조 및 용해도 평가	166
가) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 제조조건 확립	166
나) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 용해도 비교	167
(4) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 형성능 및 이화학적 특성조사	167

가) 결정학적 특성(XRD)	167
나) 표면특성(FESEM)	168
다) 입도분석	168
(5) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 효능평가	169
가) 항산화 활성평가	169
나) 항균 활성평가	169
(6) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 안정성 평가	170
가) 나노복합체 열안정성 평가	170
나) 나노복합체 저장안정성 평가	171
III. 제2협동기관 (명지대학교)	172
1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과	172
가. 연구수행방법	172
(1) 난백, 식물유래 단백질 계열의 나노소재화 보조제 개발	172
(2) Fluorescence, UV-Vis spectroscopy 통한 나노소재 특성평가	174
(3) DLS(Dynamic light scattering)분석 통한 이화학적 특성분석	175
(4) 고순도 추출물의 나노소재화에 따른 항산화효과 및 결합도분석	175
나. 1차년도 연구결과	176
(1) 난백, 식물유래 단백질 계열의 나노소재 광학특성 및 포집도평가	176
가) 난백 유래 단백질의 나노소재화 보조제 개발	176
나) 식물(콩)유래 단백질의 나노소재화 보조제 개발	177
다) 식물(옥수수)유래 단백질의 나노소재화 보조제 개발	179
라) 고순도 감초추출물 이용한 단백질별 나노소재화 정도비교	180
(2) DLS(Dynamic light scattering)분석 통한 이화학적 특성분석	183
가) 난백유래 단백질 보조제와 코어소재의 나노소재화	183
나) 식물(콩)유래 단백질 보조제와 코어소재의 나노소재화	184
다) 식물(옥수수)유래 단백질 보조제와 코어소재의 나노소재화	185
라) 고순도 감초추출물 이용한 단백질별 나노소재화 정도비교	186
(3) 고순도 추출물의 나노소재화에 따른 항산화효과 분석	187
가) RE-OA 나노소재화 보조제의 항산화 효과	187
나) GB-Zein 나노소재화 보조제의 항산화 효과	188
(4) 고순도 추출물의 나노소재화에 따른 결합상수 및 결합도 분석	188
2. 2차년도 연구수행 내용 및 결과	189
가. 2차년도 연구수행방법	189
(1) Desolvation 기반 나노소재화 공정 개발	189
(2) 항용매 공동침전법 기반 나노소재화 공정 개발	190
(3) 나노복합소재 물리화학적 특성 분석	191

(4) 나노복합소재 안정성 평가	192
나. 2차년도 연구결과	192
(1) Desolvation 기반 나노소재 제조 및 이화학적 특성분석	192
가) 토복령 나노복합소재	192
나) 섬기린초 나노복합소재	194
(2) 항용매 공동침전법 기반 나노소재 제조 및 이화학적 특성분석	194
가) 감초 나노복합소재	194
나) 토복령 나노복합소재 및 섬기린초 나노복합소재	198
(3) 나노복합소재 안정성 평가	201
가) 나노복합소재별 pH 안정성 평가	201
나) 나노복합소재별 장시간 보관안정성 평가	204
다) 나노복합소재별 염(NaCl) 안정성 평가	206
3. 3차년도 연구수행 내용 및 결과	208
가. 3차년도 연구수행방법	208
(1) 로즈마리추출물-L7D-덱스트린 나노복합체 제조	208
(2) 덱스트린-카노식산/로즈마린산 나노복합체 제조	208
(3) 로즈마리추출물-M7D-카제인 나노복합체 제조	209
(4) 로즈마리추출물-소혈청알부민 나노복합체 제조	210
(5) 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체 제조	210
(6) 마이크로 유체를 이용한 나노에멀전 제조	211
(7) 나노복합체 이화학적 특성 분석	211
나. 3차년도 연구결과	212
(1) 로즈마리추출물(CA)-L7D-덱스트린 나노복합체 제조	212
가) CA함유 덱스트린-L7D 나노복합입자 형성	212
나) CA함유 덱스트린-L7D 나노복합입자 형태	212
다) CA함유 덱스트린-L7D 나노복합입자 형성 메커니즘	213
라) CA함유 덱스트린-L7D 나노복합입자의 pH안정성	214
마) CA함유 덱스트린-L7D 나노복합입자의 염안정성	215
(2) 덱스트린-카노식산(CA)/로즈마린산(RA) 나노복합체 제조	215
가) CA/RA 함유 덱스트린 나노입자 형성	215
나) CA/RA 함유 덱스트린 나노입자 FR-IR과 XRD 스펙트럼분석	216
다) CA/RA 함유 덱스트린 나노입자 DSC와 TGA 스펙트럼분석	218
(3) 로즈마리추출물(CA)-M7D-카제인 나노복합체 제조	218
가) 카제인-M7D 복합체 특성	218
나) CA-카제인 복합체 특성	220
다) CA함유 카제인-M7D 나노복합체 특성	221

(4) 로즈마리추출물(CA)-소혈청알부민(BSA) 나노복합체 제조	221
가) CA에 의한 BSA 형광의 변화	221
나) 단백질-리간드 도킹 시뮬레이션에 의한 CA-BSA 결합부위결정	222
다) CA에 의한 BSA 구조의 변화	223
라) CA-BSA 나노입자 크기 및 제타전위	223
(5) 섬기린추출물-HPBCD 나노복합체 제조	224
가) 섬기린추출물-HPBCD 나노복합체 특성	224
나) 섬기린추출물-HPBCD 나노복합체 pH 안정성	225
다) 섬기린추출물-HPBCD 나노복합체 염 안정성	225
라) 섬기린추출물-HPBCD 나노복합체 효능평가	226
(6) 마이크로 유체를 이용한 나노에멀전 제조	227
가) 오브알부민-펙틴 나노에멀전 입자크기, PDI, 제타전위	227
나) 오브알부민-펙틴 나노에멀전의 형상	228
IV. 위탁기관 (한양대학교)	229
1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과	229
가. 1차년도 연구수행방법	229
(1) 유용물질의 효능 분석법 확립	229
(2) 유용물질 혼합에 따른 활성증진조건 탐색	230
(3) 나노 제형화에 따른 항균/항산화 효능 평가법 표준화	231
(4) 나노소재의 입자크기에 따른 항균/항산화 활성분석	232
(5) 나노소재의 피복소재에 따른 항균/항산화 활성분석	233
나. 1차년도 연구결과	234
(1) 유용물질의 효능 분석법 확립	234
가) 유용물질 항균효능 분석법 확립	234
나) 유용물질 항산화 효능분석법 확립	234
(2) 유용물질 혼합에 따른 활성증진조건 탐색	236
가) 유용물질 혼합에 따른 항균활성	236
나) 원물 및 코어소재 항균력 규격화	236
(3) 나노 제형화에 따른 항균/항산화 효능 평가법 표준화	237
가) 나노소재 항균효능 평가법 표준화	237
나) 나노소재 항산화효능 평가법 표준화	237
다) 나노제형화에 따른 항균/항산화 효능 평가시 유의점	241
(4) 나노소재의 입자크기에 따른 항균/항산화 활성분석	241
가) 입자크기별 나노소재 제조 및 입자특성 분석	241
나) 입자크기별 나노소재의 항균 활성분석	242
다) 입자크기별 나노소재의 항산화 활성분석	242

(5) 나노소재의 피복소재에 따른 항균/항산화 활성분석	243
가) 나노소재의 피복소재별 항균 활성분석	243
나) 나노소재의 피복소재별 항산화 활성분석	243
2. 2차년도 연구수행 내용 및 결과	244
가. 2차년도 연구수행방법	244
(1) 효능평가위한 천연항균소재 함유 나노소재 대상선정	244
(2) 개발 나노소재에 대한 항균/항산화활성 분석	246
(3) 개발 나노소재 안정성 평가	247
(4) 개발 나노소재 <i>ex vivo</i> 흡수율 평가	247
(5) 개발 나노소재의 항균/항산화 효능 향상조건 확립	248
나. 2차년도 연구결과	248
(1) 개발 나노소재에 대한 항균/항산화활성 분석	248
가) 개발 나노소재의 항균활성 분석	248
나) 개발 나노소재의 항산화활성 분석	250
(2) 개발 나노소재 안정성 평가	252
(3) 개발 나노소재의 <i>ex vivo</i> 흡수율 평가	252
(4) 개발 나노소재의 항균/항산화 효능 향상조건 확립	254
가) 나노소재 제형의 적용형태에 따른 항균활성	254
나) 나노소재 내 천연항균성분 농도에 따른 항균활성	256
다) 나노소재 입자크기/피복소재에 따른 항균활성	257
3. 3차년도 연구수행 내용 및 결과	259
가. 3차년도 연구수행방법	259
(1) 산업화 적용에 따른 개발나노소재의 항산화효능 평가	259
(2) 개발 나노소재의 세포독성 평가	260
(3) 동물실험을 통한 개발나노소재의 독성평가	260
(4) 안전성 평가 보고서	262
나. 3차년도 연구결과	262
(1) 산업화 적용에 따른 개발나노소재의 항산화 효능	262
(2) 개발 나노소재의 세포독성 평가	263
(3) 동물실험을 통한 개발나노소재의 독성평가	264
가) 단회투여 독성평가	264
나) 반복투여 독성평가	265
(4) 안전성 평가 보고서	280
제 3 절. 연구개발성과	285
1. 요약표	285
2. 항목별 세부 연구개발성과	286

제 4 절. 연구결과	291
1. 기술적 성과	291
2. 사업화 성과	291
제 5 절. 세부과제별 연구결과 요약 및 고찰	293
1. 주관기관	293
2. 제1협동기관	294
3. 제2협동기관	296
4. 위탁기관	297
5. 고찰	298
제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	302
제 1 절. 연구목표대비 달성도	302
제 2 절. 목표 미달성시 원인 및 차후대책	303
제 4 장. 연구결과의 활용 계획	304
붙임. 참고문헌	306
부록. 특허기술 가치평가	307
1. 특허 제10-1902846호	307
2. 특허 제10-1796677호	311
3. 특허 제10-1749497호	315

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 목적

합성에 비해 효능과 제형이 불안정한 향균 및 항산화 활성을 지닌 천연 식물추출물(천연 향균/항산화 소재)의 제품 차별화 및 기능 증진을 위한 나노 소재 제조 공정 개발과 안정성 평가 및 효능을 검증하고 이를 이용하여 제형별 고부가가치 제품개발을 목적으로 함.

- 고순도로 추출된 유용성분(천연 향균/항산화소재)이 함유된 나노소재의 제형별(nanoemulsion, nanocomplex 등) 제조 조건 최적화 및 물리화학적 특성 규명
- 나노 소재의 안정성 및 외부 조건에 의한 유용성분의 안정성 검증
- *In vitro*와 *in vivo*를 통한 나노소재의 안정성 평가 및 유용성분의 생체이용률, 흡수율, 향균 및 항산화 기능성, 용해도 향상도 검증
- 다양한 제품 형태로 적용 가능한 천연 향균/항산화소재가 함유된 나노소재 제품의 제조 공정 개발
- 실현 가능한 나노식품 기술 기업체 상용화 및 현장 보급

제 2 절. 연구개발 필요성

1. 나노식품소재의 연구배경 및 활용분야

- 나노기술이란 10억 분의 1 m인 나노(nano) 단위까지 조작하는 첨단기술로 식품분야의 다양한 기술에도 응용할 수 있어 미래 인간의 건강 및 삶의 질 향상 및 기존의 식품산업의 문제들을 해결할 수 있는 차세대 핵심기술로 각광을 받고 있음(그림 1).

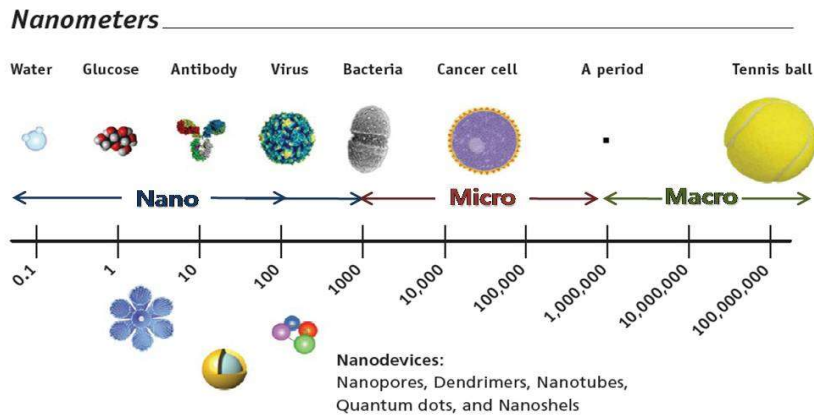


그림 1. 나노/마이크로/마크로 크기 비교 (출처: National Cancer Institute)

- 물질의 입자 크기가 나노미터 수준으로 작아지면 물질 자체의 전반적인 특성과 입자 각각의 상호작용을 조절할 수 있게 되기 때문에 나노소재 또는 나노기술을 이용한 식품 소재는 기존의 식품소재와 비교하여 새롭고 향상된 물리적, 화학적, 생물학적 특성을 나타낼 수 있음.
- 식품에서 나노기술은 건강기능성분의 생체이용률 증대, 가공적성 개선 및 포장소재 부문 등 식품산업 전반에 걸쳐 다양하게 활용할 수 있으며, 식품포장 소재 등의 간접적인 나노기술 활용에서는 식품자체의 품질과 안정성의 향상효과가 뛰어날 뿐 아니라 식품에 간접적으로 접촉한다는 관대한 안전성 인식으로 인해 관련 연구개발 및 제품화가 상당히 활발하게

진행되고 있음 (그림 2).

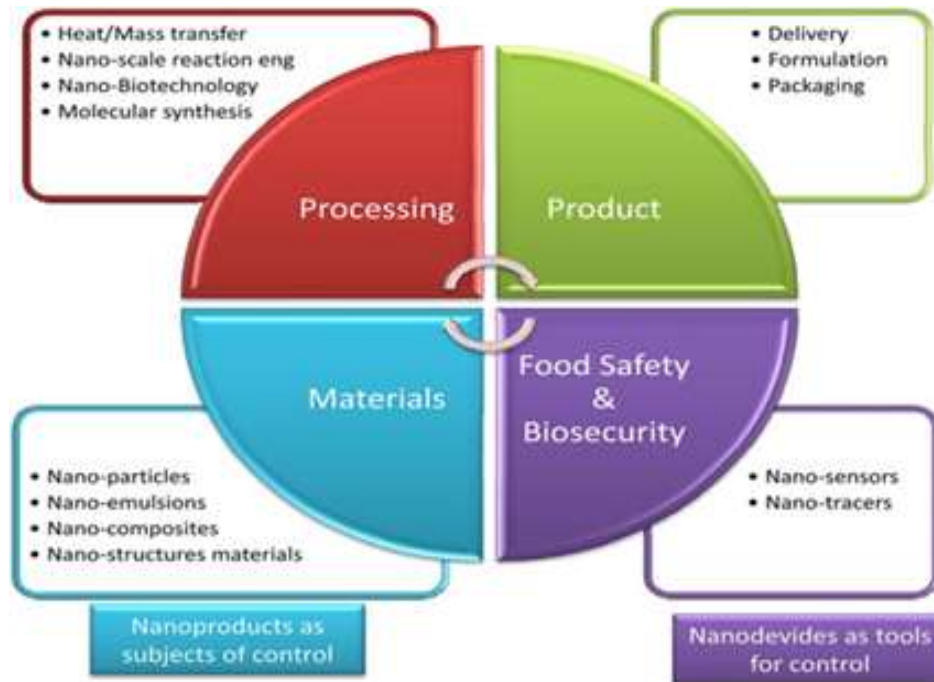


그림 2. 식품분야에서 나노기술의 응용 분야

(출처 : J. Weiss *et al.*, J. Food Sci. 2006; Blasco and Pico, TrAC Trends Anal. Chem., 2011)

- 반면, 식품자체에 나노소재를 직접 적용하는 기능성식품 산업 및 식품가공 기술 분야에서는 경구섭취로 인한 체내에서의 안전성에 대한 우려가 대두되고 있으며, 특히 나노식품소재 관련 독성연구의 미흡 및 평가시스템의 표준안 부재로 인해 더욱더 연구개발 및 산업화에 제약이 되고 있음.
- 이러한 이유로, 나노식품소재 관련 연구는 제조기술 개발과 더불어 생물학적/식품학적 효용성 검증 및 독성평가 시스템 개발이 병행되는 것은 필수이며, 또한 관련 정책기준 및 표준안 마련이 시급한 실정임.
- 한편, 생리적 안전성이 검증된 나노식품소재가 식품에 직접적으로 활용될 수 있는 분야는 크게 두가지로 분류될 수 있으며, 각 용도목적에 적합한 이화학적 특성/생물학적 효능/식품학적 가공적성이 요구됨.
 - **식품 생리활성 성분의 생체이용률 제고:** 다양한 생리활성 성분 중 다수는 경구섭취 시 매우 적은 양만이 생체에서 이용되는데, 이는 난용성에 의한 낮은 흡수율, 소화기계 내에서 안정성 저하 및 낮은 장점막 투과도 등에 기인함. 이러한 난용성 생리활성성분은 나노식품소재에 합입하여 섭취함으로써 생체이용률을 증대할 수 있음.
 - **식품 저장성/안정성/가공적성 개선:** 가공식품의 저장성/안정성 등을 개선하기 위해 항산화성/항균성 등의 성분을 첨가해야하는 경우, 성분을 단독으로 넣었을 때 보다 서방성(sustained release)의 나노식품소재를 활용하면 목적하는 효과를 장기간 지속할 수 있으며, 또한 나노크기의 균일한 분산성으로 인해 식품학적 품질 및 경제적 가치를 향상할 수 있음.

ii] 나노식품소재 (nano-encapsulation)

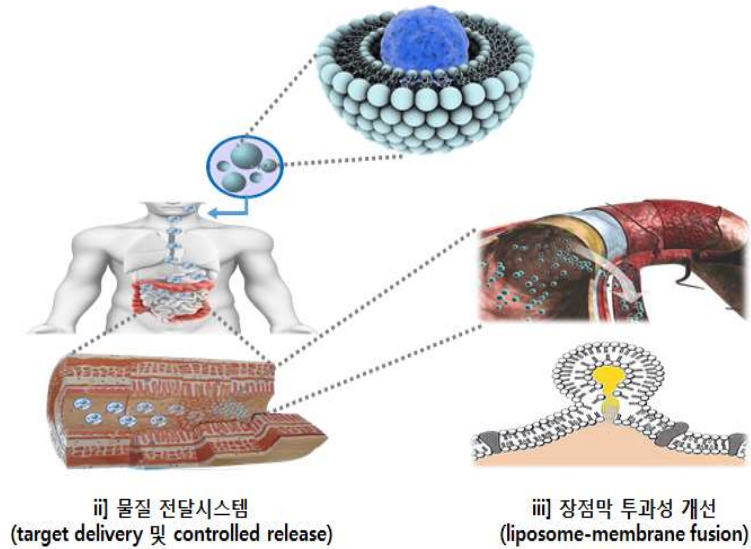


그림 3. 나노식품소재 기술에 의한 식품 생리활성성분의 생체이용률 증대효과 개념

- 나노기술의 급속한 발전과 함께 ‘나노기술 적용 식품 개발’이 실생활의 영역으로 다가오고 있으나, 아직까지 이를 대량생산하고 현장에서 쉽게 적용할 수 있는 현장 적용 기술에 대한 연구는 거의 없다고 할 수 있음. 따라서 ‘나노기술 적용 식품’이 현실화 되기 위해서는 이들 식품의 생물학적 효능이나 안정성이 유지될 수 있는 공장 시스템 적용 기술 확립이 필요함.
- 나노소재는 입자크기에 의해 미세캡슐과는 다른 기전에 의해 체내로 흡수되기 때문에(그림 4), 활성성분의 생체이용효율 증가를 비롯하여 표적방출, 방출조절 및 관능특성의 향상 등이 보고됨. 특히 나노입자의 생체이용률은 입자크기에 영향을 받아 나노입자가 작을수록 활성성분의 생체이용효율을 증가되는 경향을 보임(그림 5). 또한 인체에 쉽게 침투하여 흡수율을 증가시키고 혈액 내에서의 긴 순환시간과 생리활성 성분의 방출 패턴을 조절하는 수송체로서의 기능을 가지고 있어 생체이용률이 증가된다고 보고됨.

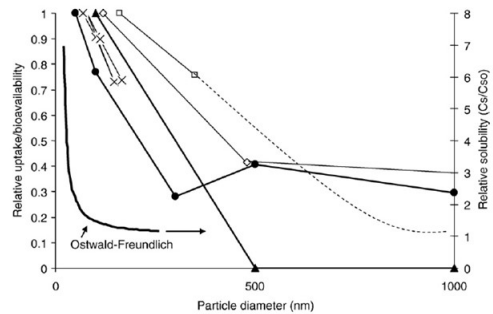
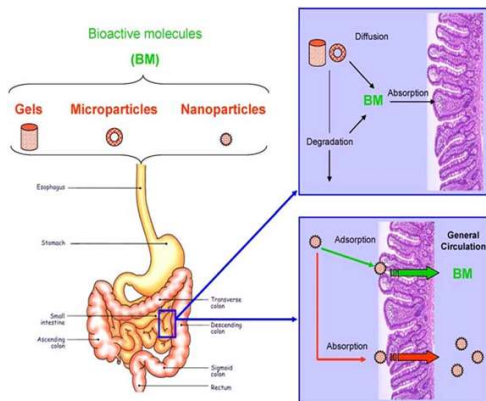


그림 4. 입자 크기(macro~nano)에 따른 체내 흡수 양상 (출처: Trends in food science & technology 17 (2006) 272-283)

그림 5. 나노입자크기와 생체이용효율과의 관련성 (출처: Current Opinion in Colloid & Interface Science 14:3-15, 2009)

- 식품분야에 있어서 나노기술의 발달은 기능성 성분들의 생체이용률 증진을 기반으로 발달되고 있으며, 생체이용률 증진을 위해 단순히 크기만 나노사이즈로 조절된 식품과, 외부환경(pH, 빛, 금속이온 등)에 의해 쉽게 산화되거나, 난용성 혹은 불용성 성분으로 제형이 만들어지지 않아 제품 개발이 불가능하거나 제형이 나오더라도 체내 흡수율이 현저히 떨어져서 대부분 방출되는 생리활성 물질을 나노코팅(nanoencapsulation) 기술을 활용하여 한계점을 극복한 기술이 주로 개발되고 있는 실정임.
- 이렇듯 나노기술이 가진 다양한 발전가능성의 영향으로, 나노기술응용식품의 세계시장 규모는 2015년까지 20.4 billion 달러까지 급격히 상승할 것으로 예측되고 있으며, 또한 2025년까지 나노기술 및 나노-바이오 융합기술이 식품산업의 40% 이상 파급될 것으로 예상되고 있음(그림 6).

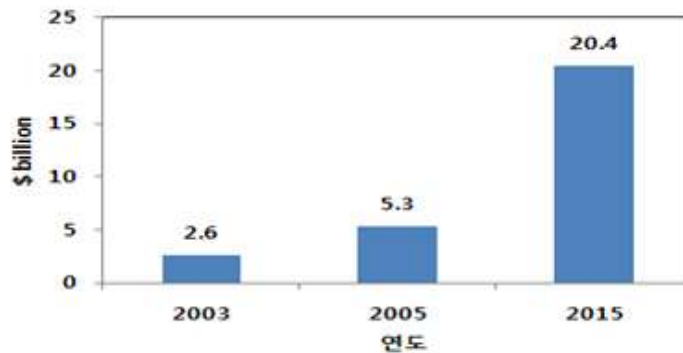


그림 6. 나노기술응용식품의 세계시장 규모 전망(출처 : Helmut Kaiser Consultancy, 2007)

- 최근 식품산업에서는 건강기능성 물질을 전달체(delivery system)에 담아 생리활성 및 효능을 극대화하기 위하여 나노크기의 전달체를 만들려는 연구가 활발히 진행 중임. 그러나 식품 전반에 있어서 나노기술응용식품의 상용화는 아직까지는 초기 단계에 머물러 있음.

2. 나노기술 적용 대상 유용성분의 선정 및 필요성

가. 천연 항균/항산화소재 개발의 중요성

- 천연보존제 (천연 항균/항산화소재)의 정의
 - **보존제** : 식품의 보존 기능을 하는 소재로서, 미생물에 의한 식품의 변질 및 부패 등의 작용을 억제하는 항균 효능을 갖는 '보존료'와 유지류가 산소와의 접촉에 의한 산패 및 변패 등을 방지하기 위해 사용되는 '산화방지제(항산화제)'로 나뉨
 - **천연보존제** : 식품의 보존 기능을 하는 보존제 중에서도 유기합성이 아닌 생물 유래 소재로 만들어진 제품은 '천연보존제'라고 하며, 항균 효능을 갖는 '천연보존료'와 산화방지 효능을 갖는 '천연항산화제'를 모두 포함함
 - **방부제** : 식품 화장품, 농업생산물, 생활용품, 임산물 등의 장기보존 및 유통기한 연장을 위해 사용되는 첨가물로서, 미생물에 의한 부패를 방지하고자 사용되는 물질을 통칭하며, 국내에서는 식품용 방부제를 주로 보존료(식품첨가물공전)라고 명함
- 농림수산식품기술기획평가원이 농생명자원을 활용한 고부가가치 소재를 개발하고 산업화를 통한 농생명소재 산업 육성을 목적으로, 국가전략적으로 집중 투자하는 성장동력개발 사업으로 미래 유망 '10대 농생명소재'를 선정하였으며, 그 중 첫 번째 항목이 '천연방부제(천연보존료)개발임. 본 연구에서는 천연보존제인 천연 항균/항산화소재로 감초추출분말(glabridin), 로즈마리추출물 (carnosic acid), 토복령추출물 (steroidal saponin),

삼기린초추출물 (galloylarbutin, galloylglucose)을 사용할 예정이다.

- 천연보존제는 매우 중요한 생명자원소재이며, 미국, 일본, EU 등 선진국들은 생명자원 R&D 국가전략을 수립하여 생명자원소재 개발을 국가최우선기술개발과제의 하나로 추진하고 있으며, OECD에서는 향후 바이오기술이 농업과 산업 분야에서 75% 이상의 경제적 기여를 할 것으로 예상함
- 건강한 삶에 대한 관심 급증으로 안전하고 건강한 식품에 대한 수요가 높아지면서, 식품 산업에서 사용되는 화학 색소, 향료, 보존제, 안정제, 유화제 등의 천연 소재로의 대체가 필요하며, 특히 현대화에 따른 가공식품 생산량이 증가하면서 안전한 천연보존제의 필요성이 더욱 높아짐
- 글로벌 유통 시장의 확대로 방부용 첨가물의 사용은 지속적으로 증가할 것으로 예상되며, 수출 가능한 합성보존제 대체제 개발이 필요함
- 2011년 세계 방부제 시장은 44억 달러 규모이며, 이 중에서 10%인 4.4억 달러가 천연보존료 시장이며, 연평균 8.2%의 시장성장율을 보이므로 2017년에는 7.06억 달러에 육박할 것으로 예상됨 (그림7).



그림 7. 세계 방부제 시장 현황(Icon international. Inc. 2010)

- 가공식품에는 안전성, 안정성확보를 위하여 식품첨가물이 필수적으로 사용 되므로, 식품산업의 발달과 더불어 식품첨가물 시장 또한 지속적으로 성장, 확대되고 있음
- 국내외의 경우 보존료 및 산화방지제 등 식품안전소재에 대한 시장은 지속적으로 성장추세이며 (표 1), 현재까지는 글로벌기업인 DSM, BASF 등의 메이저 회사들의 시장점유율이 높으나, 최근 중국 등 아시아기업들이 가격경쟁력을 내세워 점차 시장에 진입하고 있음(표 2).

표 1. 글로벌 항산화제 업체 및 제품현황

	주도 시장 부문
BASF, DSM	비타민E와 비타민C(ascorbyl palmitate)
ADM	천연토코페롤 혼합제제
Kalsec, Naturex, Danisco	로즈마리 추출물
Camlin Fine Chemicals, Eastman Chemical Company, Danisco	합성산화방지제(BHA, BHT, TBHQ, propyl gallates)
그 외	Zhejiang NHU Company LTD, Maoyuan Chemical Industries, Zhangjiajie, CSPC Weisheng Pharma (Shijiazhuang) Co., Ltd., Zhengzhou Tuoyang Industrial Co., Ltd. 및 중국기업과 같은 몇몇 아시아 기업들이 보존료 시장을 차지하고 있음

표 2. 식품안전소재 국내의 현황 및 전망 (Frost and Sullivan, 2012)

(단위: 억원/백만달러)

구분		년도	시장규모					성장률 CAGR(%)
			2012	2013	2014	2015	2016	
국내시장	천연첨가물		1,464	1,584	1,713	1,853	2,004	8.2
	살균소독제		254	322	410	520	664	27.0
	합계		1,718	1,907	2,123	2,374	2,665	9.2
국외시장	보존료 (항산화제)	Asia-Pacific	78.7	84.3	90.9	98.5	107.3	8.2
		Europe	114.9	128	144	163	186	13.2
		America	113.9	123.3	134.5	147	161.7	9.3
		합계	307.5	336	370	409	455	8.2
국내외 합계(억원)			5,100	5,600	6,188	6,869	7,672	8.5

* 식품유동연감(식품저널) 2008-2010년 출하액기준 3개년 성장률을 바탕으로 예측

나. 합성보존제 현황 및 문제점

- 국내에서 사용되고 있는 합성방부제는 미생물의 번식을 억제하는 방식으로 안전도 검사를 통해 사용되고 있으나, 과량이 사용되거나 다른 화학물질과 함께 사용될 경우 인체에 해를 끼칠 수 있음
 - 현재, 국내 식품첨가물공정에 사용이 허용되어 있는 품목은 총 27개 품목이며, 이중 소르빈산칼륨과 안식향산나트륨이 주로 사용되고 있음
 - 치즈, 식육가공품, 젓갈류, 된장 등 광범위하게 사용되고 있는 소르빈산칼륨은 자체로는 발암성이 없으나 아질산염과 함께 사용하면 DNA를 손상시키는 물질이 생성되어 발암의 원인이 되거나 중추신경마비, 출혈성 위염, 염색체 이상 등의 증상이 나타날 수 있음
 - 안식향산나트륨은 세계보건기구에서 눈의 점막을 자극하거나 기형아를 유발하는 가능성을 경고하는 물질로서 음료, 잼, 마가린 등 사용할 수 있는 식품이 한정되어 있음
- 정균 기능을 갖는 유기산으로는 식초산, 젖산, 구연산, 아디핀산, 사과산 등이 있으나, 이들은 식품 변패 미생물의 생육저해능이 약하며, 식품 보존을 위해 과량 첨가 시 식품 고유의 맛과 물성을 변화시키는 단점이 있음
- 항산화제 연구는 현재 의약, 식품, 발효공업 및 농업분야 등 다방면의 분야에서 이용되고 있음. 특히 식품산업의 경우, 식품의 질과 보존성을 향상시키기 위해 다양한 항산화제들이 사용되고 있음. 그러나 **현재 식품에 사용 중인 대부분의 항산화제들은 약한 활성, 독성 및 사용상의 한계로 많은 문제점을 내포하고 있어 보다 안전한 천연 항산화제 개발의 필요성이 여전히 대두되고 있음.** 또한 소비자와 생산자의 전문지식이 향상됨과 함께 웰빙과 힐링의 트렌드를 타고 안전 식품에 대한 사회문화적인 수요가 급증하고 있어 천연 항산화제의 개발이 시급한 상황임
- 주요 합성 항산화제로는 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene),

PG(propyl gallate), NDGA(nordihydroguaiaretic acid), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), hydroquinone, catechol 및 DPPD(N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine) 등이 있음. 항산화제는 화학 구조상에 따라, 페놀류의 유도체인 페놀계 항산화제와 아민류의 유도체인 아민계 항산화제, 그리고 유허계 항산화제로 구분되는데, 현재 페놀계 항산화제인 BHA, BHT와 아민계 항산화제인 EDTA가 가장 많이 사용되고 있는 합성 항산화제임(그림 8).

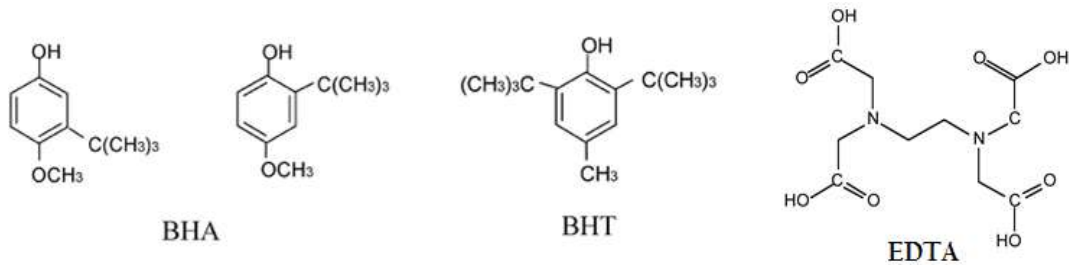


그림 8. 주요 사용되고 있는 합성 항산화제

- 합성 항산화제들은 항산화활성은 뛰어나고 가격이 상대적으로 저렴하여 상업용 식품에 많이 사용되고 있으나, 규격이 엄격하고 변이원성과 독성으로 인한 발암성이 지적되면서 안전성에 대한 우려로 천연의 항산화제를 식품가공에 적극적으로 이용하기 위한 시도가 지속되고 있음. 그러나 기존의 천연 항산화제는 합성 항산화제보다 가격이 비싸며 항산화 효율이 낮기 때문에 이를 보강하기 위한 연구가 계속되고 있음.
- 특히, 유지함유식품 중 유화형 드레싱/소스류에는 합성 항산화제인 EDTA가 가장 많이 사용되고 있음. 그러나 EDTA는 섭취 시 체내 칼슘의 결핍을 야기하고 위장 장애를 일으키며 만일 임산부가 섭취했을 경우, 뇌 기형아가 발생할 수 있다는 많은 연구결과가 발표되는 등 안전성 측면에서 많은 문제점을 가지고 있음. 또한 화학적 합성품이라는 좋지 않은 이미지가 소비자와 생산자 모두에게 거부감을 안겨주고 있음.
- 현재 가장 많이 사용되고 있는 합성 항산화제 중, BHA와 BHT는 천연 항산화제인 토코페롤류나 로즈마리류로 대체될 수 있는 반면, 현재까지 EDTA만은 적합한 대체 천연항산화소제가 개발되지 않았고 있는 상황임. EDTA는 마요네즈와 샐러드 드레싱과 같이 국내에서 많은 소비량이 발생하는 제품에 첨가된다는 점을 감안해 보았을 때, 실제 제품에 대한 위험성 극복과 이미지 개선을 위해 EDTA의 천연 항산화제 대체를 위한 연구가 필요함.

다. 천연 항균/항산화소제 현황 및 연구개발 필요성

- 천연보존료(천연방부제) 개발이 다양한 기관에서 지속적으로 이루어지고 있으나, 합성방부제에 비해 1) 경제성이 부족할 뿐만 아니라, 2) 안전성이 높은 식품 원료를 이용할수록 항균활성이 낮으며, 2) 항균 활성 스펙트럼이 좁고 적용 효능이 낮으며, 3) 주로 항균 유효성분이 난용성이므로 용해도가 낮으며, 4) 특히 항균활성이 있는 식물추출물이 진한 색상과 허브향이 강하므로 이를 제거하는 비용 발생이 높기 때문에, 많은 연구에도 불구하고 실용화가 제한적이며 광범위한 식품에 적용하기 매우 어려운 단점이 있음
- 위의 천연보존료의 단점을 극복하기 위해서는 좁은 항균스펙트럼을 갖는 여러 종류의 천연 항균소제를 조합함으로써 광범위한 항균스펙트럼을 갖는 천연보존료 개발이 가능하며, 난용성 항균성분을 나노화하여 용해도를 높임으로써 식품 적용 효능을 높이며, 식물추출물의 진

한 색상과 강한 허브향을 나노 코팅으로 마스킹 함으로써 식품 적용 범위를 넓힐 수 있음. 따라서, 본 연구에서는 천연보존료의 단점을 극복할 수 있는 방안으로 나노소재 기술을 접목하여 효능 및 안정성을 증진시키고자 함.

- 국외 천연보존료 제품으로는 자몽종자추출물(쓴맛과 합성보존료 이슈), 폴리리신(알러지 이슈, 고가, 좁은 항균스펙트럼), 유카추출물(거품 형성, 흑갈색의 강한 쓴맛, 식품보존 효능 약함), 용균 효소(특정 그람음성균에만 효능, 식품 성분인 펙틴과 탄닌등에 의한 항균력 감소 현상) 등이 있으나 각각 사용상의 제한점이 있어서 다양한 식품에 광범위하게 적용되기 어려운 단점이 있으며, 미생물 유래의 natamycin과 Nicin은 국내에서 일부 유제품에만 제한적으로 적용되는 규정이 있음
- 국내 천연보존료 제품으로는 키토산, 프로폴리스, 복합황금추출물, 유산균발효분말, 복합허브추출물, 녹차추출물, 연잎추출물, 과실발효액 등이 있으나, 단독 제품으로 다양한 식품에서 보존력을 발휘하기는 어려우며, 식품의 종류에 따라 변패 미생물의 종류에 맞는 적절한 천연보존료의 조합이 요구된다. 또한, 항균력이 약한 천연항균소재의 항균력을 보완할 수 있는 추가적인 천연보존료 개발이 요구됨
- 천연 항산화제 탐색을 위한 재료는 매우 다양하여, 미생물 대사산물을 비롯하여 버섯류, 조류 등의 해양생물, 식물, 동물, 식품 가수분해산물 등이 있으며, 발견되는 항산화물질의 종류 또한 급원의 종류에 따라 다양함. 토코페롤(tocopherol), 고시폴(gossypol), 세사몰(sesamol), 레시틴(lecithin), 세파린(cephalin), sulfhydryl(SRH), 구연산, 아스코르빈산과 고추의 에테르 추출성분, 소맥배아, 대두, 후추, 토마토에서 얻은 추출물들, 또 주로 플로보노이드계 색소들의 추출액, 감자, 버섯, 옥과의 노란껍질 등에서의 추출물 등의 다양한 항산화성분들이 보고되었음
- 체내에서 높은 생리활성을 나타내는 유용물질의 경우 물에 대한 낮은 용해도를 나타내는 경우가 많은데, 이는 물질의 낮은 흡수율과 이에 따른 생리활성의 저하로 이어지고 있어 활용하기가 어려울 뿐만 아니라 가공적성에서 또한 제약이 많아 기능성 식품 또는 수용성 식품으로서의 활용성이 매우 낮은 상황임
- 천연보존제를 가용화 함으로써 소비자가 쉽게 섭취할 수 있는 형태의 식품으로의 적용이 다양해진다면 이들 소재의 원료 소비 또한 증대되고 소득발생으로 연결됨
- 우수한 생리활성과 시장성에도 불구하고 천연보존제 소재들의 용해도가 낮은 생체이용률 문제로 인해 식품소재로서의 제형 전환이 쉽지 않아 제품화 응용 또한 제한을 받을 수 밖에 없기에 이들의 기능성 및 활용성을 증진시키는 핵심 기술개발이 필요함

3. 나노소재 제조기술 연구의 필요성

다양한 나노식품소재의 후보물질을 종합적으로 고려한 결과 높은 생체이용률 개선 효과가 있는 나노복합체(nanocomplex), 나노에멀전(nanoemulsion), 나노구조체를 가진 식품소재를 나노식품의 산업체 상용화 후보로 예상함.

가. 나노캐리어 (cycloamylose) 제조를 위한 신규 탄수화물 소재 이용

- 현재 다양한 식품나노소재는 주로 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질을 이용한 다양한 제조방법이 이용되고 있음. 탄수화물소재로는 전분, 텍스트린, 환형텍스트린, 말토텍스트린 등을 주로 사용하며, albumin, whey protein isolate 등의 단백질과 동 식물성 지방, monoglyceride 등의

지질과 복합적으로 사용하여 나노에멀전, 나노입자, 나노캡슐 등에 제조가 가능함.

- 우리 연구팀에서는 신규탄수화물 소재로써 환형아밀로스(cycloamylose)를 제조하는 기술을 보유하고 있음. 환형아밀로스는 신규탄수화물 소재로 전분이나 아밀로스로부터 탄수화물 반응효소 (4- α -glucanotransferase, isoamylase, β -amylase 등)의 효소를 복합적으로 처리하여 생산 가능한 소재로, 환형덱스트린(cyclodextrin) 보다 상대적으로 높은 중합도를 갖는 환상의 α -1,4 glucan임.
- 환형아밀로스는 기존에 보고된 환형덱스트린의 구조와 유사하게 cavity 안쪽은 소수성을 띄고 외부는 친수성을 띄어 기능성 물질을 cavity에 포접하여 복합체(inclusion complex, host-guest complex)를 형성 할 수 있어, 그 자체가 나노운반체(nanocarrier)가 됨 (그림 9).

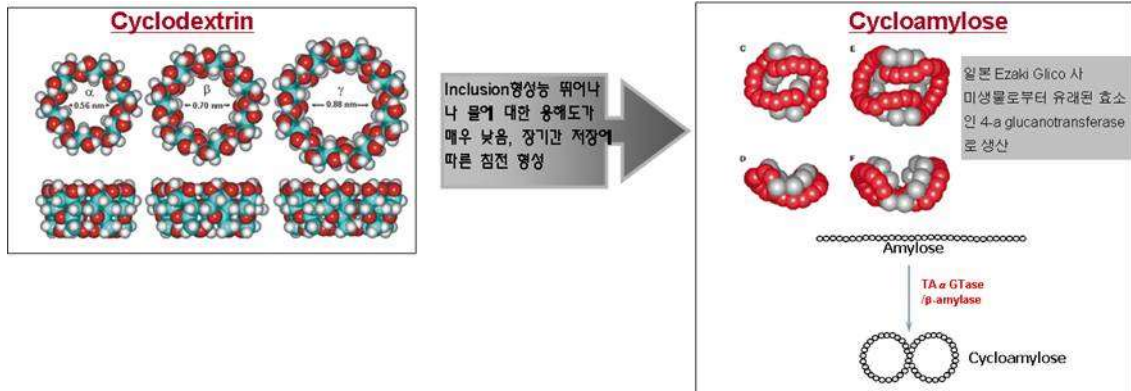


그림 9. 탄수화물 소재를 이용한 나노캐리어 제조

- 환형아밀로스는 환형덱스트린의 cavity와 형태적으로 다르다고 보고되어 보다 다양한 포접복합체를 형성할 수 있는 능력을 지니며, 기능성 물질과 비공유결합을 통하여 안정한 나노복합체를 형성하여 기능성 물질의 물리적, 화학적 성질을 변화 시키므로 식품산업에 다양하게 이용 가능함.
- 따라서 본 연구를 통해 저단가인 전분으로부터 저가의 환형아밀로스의 대량 생산 및 규격화를 진행할 예정이며 제조한 환형아밀로스와 유용성분의 복합체를 제조하여 식품나노소재로 활용하고자 함. 특히 천연 항균/항산화소재를 나노캐리어에 포접시킨 나노복합체 (nanocomplex)를 제조함으로써 천연 항균/항산화소재의 용해도와 항균/항산화 활성 향상 및 안정성 향상을 시키는데 활용하고자 함.

나. 나노복합체 (nanocomplex)

- 환형아밀로스는 기존 환형덱스트린에 비해 용해도가 월등히 높다는 장점이 있으며, 수용액 중에서 분자들 간의 회합으로 인한 침전 (coprecipitation)이 환형아밀로스보다 훨씬 적어 안정적인 colloid를 형성할 수 있다는 장점이 있어 식품과 제약분야에의 활용에 그 역할이 기대됨.
- 환형아밀로스는 환형덱스트린에 비해 cavity의 크기가 다양하고 크기 때문에 큰 분자량을 지닌 기능성 성분도 포집가능하다는 장점을 지니고 있으나 지금까지의 연구 수준은 모델 물질(surfactant, iodine 등)을 대상으로 한 연구가 대부분이며, 포접복합체 형성 가능성만을 제시함. 따라서 식품소재 기능성물질을 포접한 나노복합체를 제조하고 최적화 한다면 이 분야 기술의 세계적인 우위를 선점 할 수 있을 것임.
- 현재 1협동 연구기관에서는 환형아밀로스를 이용하여 지용성 비타민과 페놀컴파운드를 포접한

포집복합체 제조에 관한 실험을 성공적으로 수행함. 본 연구를 통해 천연 향균/항산화소재의 용해도와 기능성을 향상시킬 수 있는 나노복합체를 제조하여 식품나노소재로 활용하고자 함.

다. 나노에멀전 (nanoemulsion)

- 식품 나노에멀전은 입자의 크기가 1 μm 이내에 속하는 에멀전을 말하며, 제조에 사용되는 계면활성제 분자의 친수성 및 친유성 부위가 계면에 배열하여 에멀전을 형성함.
- 나노에멀전은 일반 에멀전과 다르게 **열역학적으로 안정하며 투명한 상태를 유지할 수 있어** 음료, 시럽, 화장품 등 제조에 응용가능하며, 입자가 상대적으로 매우 작기 때문에 중력가속도와 브라운 운동이 현저하게 감소하여 저장기간 중 응결, 크리밍, 응집 등의 현상에 의한 층분리가 일어나지 않음.
- 나노에멀전은 기존의 에멀전 가공 방법을 통해 기존의 식품제조에 사용되는 안전한 성분으로 간단히 제조될 수 있으며, **작은 크기의 지방구로 이루어져 있어 지용성 생리활성물질의 생체이용률을 증대시킬 수 있음.** 따라서 나노에멀전 기술을 이용한다면 기능성 물질의 활성도 등을 향상시킬 수 있으며 기능성 식품이나 화장품, 제약 등 산업에서 형태에 매우 큰 수요를 충족하며 활용할 수 있을 것임.
- 최근들어 전분의 구조분석기술이 발전되고 전분 분해 및 합성효소 연구가 활발해지면서 인체에 위해한 화학적 첨가제의 사용 없이 전분 자체의 구조를 효소를 이용하여 특이적으로 수식하는 연구가 진행되고 있으며 이 분야의 학문적 발전이 가속화되고 있는데, 우리 연구진에서도 *Thermus acuaticus* 및 *Thermus scotoductus*에서 분리한 4- α -glucanotransferase (4aGTase)를 이용하여 변형시킨 전분의 분자구조를 규명하였으며, 이를 이용하여 고농도에서도 낮은 점도를 보이면서도 열가역적인 특성을 갖는 전분젤을 제조할 수 있음을 확인한 바 있음. 그러므로 **계면활성제의 양을 줄이고 효소적 변형 탄수화물 소재 보강제로 사용하여 안정성이 향상된 나노에멀전을 제조하고자 함.**
- **본 연구에서는 제조조건을 달리하여 유효성분을 함유한 나노에멀전을 제조하여, 각 유효성분에 가장 적합한 나노에멀전 제조조건을 제시하고자 하며,** 우리 연구진에서 탄수화물 효소를 이용하여 제조한 변형전분을 이용하여 안정성이 향상된 나노에멀전을 제조, 유효성분의 안정성과 효능을 다른 나노소재와 비교 분석하고자 함.
- 또한 나노복합체와 나노에멀전 기술을 접목하여 새로운 멀티나노소재를 제조하고 반응표면분석을 통해 제조공정을 최적화하고자 함.
- **현재 신규탄수화물 소재를 이용한 나노에멀전 연구 뿐 아니라 나노에멀전에 나노복합체를 접목시킨 멀티나노소재에 관한 연구는 국내외에서 누구도 시도된 바가 없으며, 새로운 시도를 통해 얻은 연구 결과는 제품 개발 뿐 아니라 식품 산업에 새로운 기술을 제공할 수 있을 것이며, 성공적으로 수행될 경우 이 분야 기술의 세계적인 우위를 선점할 수 있음.**
- 멀티나노소재는 다른 나노기술에 비해 훨씬 더 유용물질의 기능성을 향상시킬 수 있는 기술이 될 것이며 다양한 제형으로 의 제품개발에 활용 가능할 것임.

라. 나노구조체를 가진 식품소재 개발 필요성

- 글로벌 다국적 식품, 화학 회사들은 나노에멀전(Nestle 스위스, Unilever 네덜란드), 미셀(Aquaznova 독일), 나노캡슐(George Weston Foods 호주) 기반의 나노식품소재를 개발하고 있기에 이들과 차별화된 나노구조체를 가지는 식품소재를 개발할 필요가 있음.

- 나노식품소재의 안전성과 관련하여 결국 미국(FDA), 유럽(EU), 국제기구(FAO, WHO) 등이 성분, 구조에 초점을 맞추고 있는 바, 식품으로 사용되어온 바 없으나, 나노입자화에 필요한 성분들(예, 리포솜, 캡슐 고분자, 계면활성제 등)이 필수 불가결하게 사용되어야 함.
- 이러한 성분에 초점을 맞추었을 때, 가급적 그동안 식품(GRAS)으로 간주되어 온(이질감이 없는) 재료들이 나노소재화에 동원되는 것이 타당하고, 이러한 타당성에 가장 잘 부합하는 것이 식품의 단백질, 탄수화물, 지질이며, 이러한 보조제를 첨가하여 전체 나노소재 중 본 단백질, 지질, 탄수화물 등이 중량 대부분을 차지하고 핵심 기능 성분은 극소 비율로 특정 기능을 담당하는 방식이 절실히 필요.
- 식품은 의약품과 달리, 대량 생산이 필요한 산업으로서, 대량 생산으로 진입할 수 있는 기반 기술을 개발하는 것이 무엇보다 중요하며, 나노소재를 만드는 과정에 다량의 단백질 식품, 지질 식품 등이 투입이 되어야 기존 식품 산업과 연계가 자연스럽게 되면서 대량 생산 공정으로 진입이 가능하기에 보조제 개발이 절실히 필요.

4. 나노소재의 체계적 효능평가 및 안정성 평가의 필요성

가. 나노소재의 체계적 효능 평가의 필요성

- 식품분야에서 나노크기에 의한 효능 관련 연구는 아직까지도 주로 *in vitro* 세포배양 수준에서 평가되고 있으며, 그러나 이러한 시험관 수준에서의 효능은 생체 시스템에서의 소화효소, pH, 면역작용, 생체 매트릭스와의 상호작용을 반영하지 않고 있으므로 결과의 해석에 제한점이 있음.
- 경구로 섭취한 생리활성성분은 위에서 용해과정 및 주로 소장에서 흡수과정을 통하여 혈액에 도달하므로, 생체이용률이 증가되는 나노 소재의 전달시스템을 효율적으로 개발 및 효능 검증하기 위해서는, 이러한 과정들의 단계적인 평가가 요구됨.
- 이를 위하여 *in vitro*에서는 위산 (pH) 조건하에서 용해도 및 용출률, *ex vivo*로 소장세포 (Caco-2 cell)를 통한 투과율을 평가함. 이를 통해서 물리적 특성인 용해도의 증진이 생체이용률을 향상시키고, 생리활성이 향상됨을 보다 체계적으로 입증할 수 있을 것으로 판단됨.
- 특히, 생체이용률(bioavailability)을 높이고 이것을 객관적으로 평가할 수 있는 기술은 나노 기술 응용식품의 효능을 직접적으로 예측할 수 있는 기본적인 연구로 안전성, 효능증진 및 물질의 인체 내 대사를 예측해 볼 수 있는 중요 핵심 기술이 될 것임.

나. 실제 개발 제품에 대한 효능 평가의 필요성

- 나노기술 응용식품은 나노에멀전 형태로 만들어진 마요네즈나 아이스크림 등과 같은 나노기술이 제조, 가공 단계에서 직접 식품에 사용되는 경우와 나노칼슘을 만들어 나노칼슘소재를 첨가한 우유와 같이 나노소재를 제조, 가공 단계에서 식품에 첨가하는 경우로 구분할 수 있음.
- 실험실 단위에서 고순도 정제원료를 이용한 제조와 달리 대량 생산 공정에서는 다양한 요소가 복합된 소재를 사용함. 또한, 실험실 단위의 제조과정을 대량 생산 공정에 그대로 적용하는데 한계가 있어, 세부적인 공정 차이로 인해 결과물의 특성 및 효능에 차이가 있을 것으로 판단됨.
- 또한 제품 적용 후 물리적 또는 화학적 결합으로 인해 나노범주를 벗어난 응집체(aggregate)가

되어 나노물질로서의 특성을 잃을 수도 있음. 이처럼 소재의 효과에 직접적 영향을 미치는 제품 적용 후의 나노소재 안정성은 검증이 필요한 요인임.

- 이러한 소재 및 공정상의 차이로 인해 실험실 단위의 나노소재 특성 및 효능이 최종 개발 제품에 그대로 적용하기에는 한계가 있음. 따라서, 최종 개발 나노소재에서도 기대 수준의 효능이 유지 및 발현되는지에 대한 검증이 필요함.

다. 나노소재에 대한 안전성 평가의 필요성

- 식품용 나노물질은 균일한 크기의 물질로 생성되기보다는 넓은 분포의 크기를 갖는 물질들로 구성되는 경우가 대부분임. 나노소재는 활성이나 안전성 측면에서 많은 변수를 보이며, 구성입자의 평균 크기가 100 nm - 1 μm 사이의 물질이라도 나노물질과 동일한 물리화학적, 또는 생물학적 특성을 갖는 경우 이를 나노소재로 보아야 함.
- 나노기술 응용식품은 생체이용률(bioavailability)과 효능을 증대시키지만, 소재의 입자 특성에 따른 신체 내부로의 비의도적 유입과 그로 인한 나노물질의 체내 축적 및 독성발현 등의 잠재적 위해성 문제가 꾸준히 제기되어 왔음. 그러므로 상용화를 위해 안전성 연구의 선행이 필수적임.
- 또한 나노식품은 특정 질환자를 대상으로 의사의 처방 하에 일정량 투약하게 되는 의약품과는 달리 일상적으로 섭취하는 일반인이 적용대상이므로 적용된 나노기술의 안전성 및 효능에 대한 구별된 검증이 반드시 필요함.

라. 식약처 권고 규정에 부합하는 안전성 평가의 필요성

- 나노기술의 식품 적용에 따른 위험 발생 가능성은 높은 것으로 의심되나, 그 위험성에 대한 과학적이고 표준화된 안전성 판단 기준은 미비함. 나노기술의 안전한 식품적용을 위해서는 인체 적용 시 발생할 수 있는 문제점에 대한 객관적이고 과학적인 판단 근거가 반드시 동반되어야 함.
- 나노소재에 대한 안전관리가 국제사회의 이슈로 부상, 규제 움직임이 가시화 되고 있으며, OECD, ISO 등 국제기구에서 나노 안전성 평가 및 국제표준화 작업을 진행하고 있음. 국내에서는 식약처에서 “나노기술응용식품 업체자율 안전성평가 가이드라인”을 만들어 나노식품소재에 대한 기업들의 자율적 평가를 실시할 것을 권고하고 있음.
- 안전성 평가안전성 확보를 위한 최소한의 기준으로 판단됨이는 나노소재가 적용된 제품의 안전성에 대한 과학적 근거를 확보하여, 소비자들이 갖고 있는 나노식품의 부정적 인식을 제거하고, 효과적이고 효율적인 미래지향적 식품 나노소재 개발에 필수적인 것으로 판단됨.

제 3 절. 국내외 기술개발 현황

(1) 세계적 수준

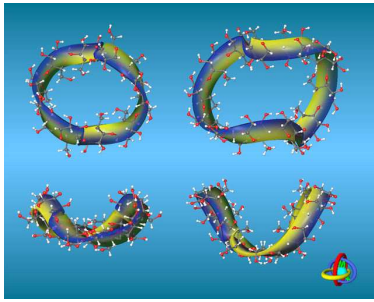
- 세계적인 천연보존료(천연방부제) 제품으로는 연구의 필요성에서 천연보존제 현황에서 밝힌바와 같이, 자몽종자추출물, 폴리리신, 유카추출물, 라이소자임, nisin, natamycin, 로즈마리추출물 등이

있으나, 제품 물성개선을 위해서 나노화 기술을 접목한 제품은 현재 없음

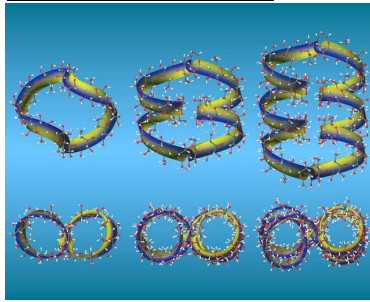
- 일본 미쯔비시화학식품회사에서 겨자추출물을 마이크로캡슐화하여 (WasaOuro) 첨가한 향균성 필름, 포장재, 야채소독제를 개발하여 판매하고 있으며, 필름은 도시락과 같은 신선편의식품의 보존 및 양산빵 보존에 유용하게 활용되고 있으나, 직접 식품에 첨가하는 첨가제는 아님.
- 세계적으로 개발 초기 단계로써 현재 많이 사용되고 있는 파라옥시안식향산에스텔 등에 대한 대체 소재 개발의 부재
- 화장품, 의약부외품 메이커인 일본 사티스 제약은 식물에서 추출한 향균성 성분을 조합해 향후, 화장품의 천연방부제 개발('09년). 향균 활성이나 항염 작용이 있다고 알려진 72종의 식물에서 스크리닝하여 “잇꽃” 과 “자리 열매”의 추출물을 조합하면 향균성이 크게 향상된다는 것을 발견하고 제품화함.
- 환형아밀로스에 관한 지금까지의 연구는 분자구조나 제한된 물질(cholesterol, perdonisolone, digitoxin, digoxin, nitroglycerin)을 대상으로 한 안정성 연구가 주로 이루어져있으나 포접복합체 형성 가능성만을 제시하는 수준이었고 기능성 식품 물질과 복합체 형성이 관한 연구는 아직 활발하지 못한 실정임. 따라서 본 연구에서 여러 유용물질과 환형아밀로스의 나노포접복합체의 제조공정을 설계하여 기능성 및 안정성 여부를 증명하고자 함.
- 환형아밀로스의 포접 복합체 형성능과 그로인한 물질의 물리화학적 특성의 개선에 관한 연구가 보고되고 있어 환형아밀로스의 기능성 복합체 형성에 관한 성공 가능성을 시사해주고 있음. 1930 년대 오스트리아 Freudenberg 박사가 최초로 전분 또는 덱스트린 용액으로부터 효소작용에 의하여 환형아밀로스가 생성됨을 발견하였고 이에 대한 생성 메커니즘, 분자구조는 1980년대에 스코틀랜드 연구팀이 밝혀냄. 이후 Takaha 등은 일본의 Ezaki glico사에서 환형아밀로스 혼합물을 생산하여 단백질 refolding에 이용할 수 있음을 보고하였음.
- 그러나 아직까지 환형아밀로스의 기능성 식품 소재의 개발에 활용한 연구는 미비한 실정이며, 여러 기능성 물질과 환형아밀로스와의 나노포접 복합체나 나노캡슐 분말 제조에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서는 복합체 형성 성공 가능성을 식품나노소재 제조에 이를 이용하고자 함.
- 식품나노소재로서 환형아밀로스에 관한 연구는 시작단계에 있으며 약물전달체나 화장품 소재화에 관련된 연구는 제한적으로 보고되고 있음.
- 식품 소재의 나노캡슐에 사용되는 피복물질은 가식성이어야 하고 이미, 이취가 없어 식품의 품질에 영향을 주지 않아야 하는 제약이 있으므로 상대적으로 제한적인 소재에 의해 연구가 진행되고 있으며, 주로 gum arabic, mesquite gum 등의 천연 검류, 천연 전분 및 말토덱스트린, 콘시럽솔리드 등의 가수분해 전분, 유청단백질, 우유카제인, 젤라틴 등의 단백질, 환형덱스트린, 유화전분 (n-octenylsuccinylated starch) 등의 변성전분과 이들을 선택적, 복합적으로 사용한 연구가 주를 이루고 있음.
- 환형아밀로스의 특성에 관한 지금까지의 연구는 중합도 10, 14, 21, 26, 38개를 갖는 일부 환형아밀로스의 구조에 관한 결과가 보고된 바 있으나, 여전히 환형아밀로스를 각각의 중합도 별로 분리하는 방법이나 구체적인 구조 분석은 거의 이루어지지 않은 실정이다. 중합도 26을 갖는 환형아밀로스(CA 26)는 숫자 8과 같은 모양으로 antiparallel V-amylose helices가 1% turn한 구조로 이뤄졌다고 보고된 바 있음 (그림 10). 각각의 α , β , γ 환형덱스트린이 5-8 Å 범위 동일한 크기의 공간 (cavity)을 갖고 있는 것에 비해 환형아밀로스는 중합도에 따라 공간의 외형과 구조가 다르고, 환형덱스트린에 비해 더 큰 소수성 공간을 갖을 수 있으므로 다양한 종류의 물질들과 포접복합체를 형

성할 수 있음.

CA10과 CA14의 구조 비교



CA14, 26, 38의 구조 비교



CA21의 모든 가능한 구조

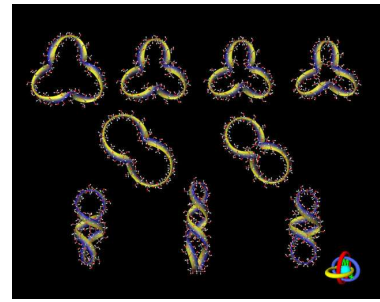


그림 10. 여러 환형 아밀로스의 X-ray or neutron-diffraction crystal structures

- 식품회사 BASF사에서는 나노에멀전인 합성라이코펜을 200-400nm크기로 생산하여 판매하고 있으며 키토산 및 알나이트로 이루어진 이중층 및 삼중층 나노에멀전을 제조하였으며 *in vitro* 세포 생장을 연구 결과 나노에멀전은 독성을 나타내지 않았고 세포증식 또한 보이지 않았다는 연구결과가 있음 (Kim et al., 2007).
- 단백질에 기능성 유용 식품 성분을 포집하여 나노소재화 한 세계적 수준의 기술은 주로 혈청 단백질(serum albumin)을 중심으로 이루어져 왔으며, hydrodynamic size가 보통 100 ~ 300 nm를 초과하는 비교적 큰 나노크기의 소재를 제조.
- 불포화지방산을 이용한 유용 식품 성분의 나노소재화는 아직 이루어지지 않았으나, 유용성분에 지방산을 의약 성분 등에 기능화하여 유화제를 이용하여 분산시키는 기술은 초보적으로 시행된 바 있음.
- 곤충유래 단백질의 활용은 주로 실크 단백질을 이용한 화장품이나 수술용 단백질과 같은 의료용으로 시도되었으나, 아직 식품 나노소재에 적용된 사례는 없음.
- 식품분야에서 위장관 섭취에 의해 생체이용률이 낮은 항산화 기능성 물질 (폴리페놀류, probiotics, coenzyme Q10)의 흡수율을 증진시키기 위해 나노 및 마이크로 물질로 캡슐화하여 동물실험한 결과 암세포 성장 효과가 향상됨을 확인하였고 생체이용률이 증진되었다는 연구결과가 있음 (Li et al., 2005; Tsai et al., 2012).
- 그러나, 아직까지 대부분의 연구는 *in vivo* 생체 수준에서의 생물학적 효능 연구보다는 시험관 및 세포 수준의 연구에 지나지 않고 있음.

(2) 국내수준

- 국내 천연보존료(천연방부제) 제품으로는 연구의 필요성에서 천연보존제 현화에서 밝힌바와 같이, 키토산, 프로폴리스, 복합황금추출물, 유산균발효분말, 복합허브추출물, 녹차추출물, 연잎추출물, 과실발효액 등이 있으나, 제품 물성개선을 위해서 나노화 기술을 접목한 제품은 국외와 마찬가지로 국내도 없음
- 일부 연구 수준에서 ‘고추냉이 추출물의 복합 나노 입자화’, ‘측백나무, 후박나무추출물이 함유된 여성청결제’, 화장품용 ‘담쟁이덩굴 줄기 추출물 함유 나노에멀전’ 에 대한 특허 및 논문이 발표되었으나, 실용화되지 않음
- 강원대학교 산학협력단에서 특허등록(특허제10-1259475호)한 ‘고추냉이 추출물의 복합 나노 입자화’

에서 나노화 고추냉이추출물의 항균활성이 나노화 전 추출물보다 2배 상승된 것을 확인하였다. 제품에 함유된 고추냉이추출물의 함량을 고려한다면 나노화로 인한 항균활성이 4배 가량 상승됨

<Listeria에 대한 고추냉이 유체(Crude)와 레시틴 나노 입자의 MIC test>

투입농도	Listeria			
	유체(Crude) 1/10 희석 시 흡광도	유체(Crude) 1/100 희석 시 흡광도	레시틴 1/10 희석 시 흡광도	레시틴 1/100 희석 시 흡광도
8.00%	0.073	0.073	0.075	0.076
4.00%	0.073	0.075	0.072	0.074
2.00%	0.122	0.16	0.071	0.073
1.00%	0.404	0.488	0.09	0.179
0.50%	0.555	0.546	0.343	0.49
0.25%	0.585	0.572	0.557	0.548
0.00%	0.599	0.634	0.565	0.603
MIC	4%	4%	2%	2%

- 식품 및 화장품 등에 사용되는 방부제의 약 80%를 수입에 의존하고 있음. 천연물 이용한 화학적 기술수준은 선진국과 동일하나, 방부제 관련 기술 경험은 몇 개의 중소기업에서만 이루어지고 있음
- 화장품업계에서는 화학적 방부제의 부작용을 극복하기 위해 천연항균물질을 방부제로 사용하기 위한 연구가 진행됨. 알카로이드, 후라보노이드, 피토알렉신, 항균펩타이드에 대한 연구보고와 유기산 등의 항균성에 대한 보고가 있음. 또한 여러 천연물로부터 이러한 방부효과를 나타내는 물질들에 대한 보고가 발표되고 있음
- 국내에서는 새로운 4- α -GTase를 클로닝하여 환형아밀로스를 생산하고 debranching 효소의 이용 및 disproportionation 반응조건에의 개선 등으로 환형아밀로스의 수율을 제고하는 연구가 수행되고 있음. 하지만 저가의 전분으로부터 성공적으로 환형아밀로스 제조에 관한 연구는 미비한 실정임.
- 우리 연구진에서는 *Thermus acuaticus* 및 *Thermus scotoductus*에서 분리한 4- α -glucanotransferase (4 α GTase)를 이용하여 변형시킨 전분의 분자구조를 구명하였고, 이를 이용하여 고농도에서도 낮은 점도를 보이면서도 열가역적인 특성을 갖는 전분젤을 제조할 수 있음을 확인한 바 있으며, 또한 matogenic amylase와 debranching enzyme등의 복합효소 처리와 선형 glucan 등의 복합기질 첨가에 의한 전분의 구조 변형에 따라 다양한 특성의 열가역적 전분젤을 제조할 수 있음을 확인하였음.
- 현재 본 연구실에서는 환형아밀로스의 물리화학적 특성 구명과 이를 이용한 다양한 기능성 물질 전달 시스템 개발에 대한 연구를 국내에서 유일하게 수행하고 있으며, 포접복합체 및 나노캡슐 제조 및 특성 분석에 관한 기술을 보유하고 있음.
- 우리 연구팀에서는 4 α GTase 처리 전분을 이용하여 W/O 및 W/O/W 에멀전을 제조한 바 있고, 효소처리 전분이 유화안정성 및 캡슐화 효율을 증대시켜 결과적으로 화학적인 유화제 첨가량을 감소시킬 수 있음을 확인함.
- 현재 과학기술부는 나노소재 산업적 응용분야에 식품나노기술을 포함시켜 국가적 차원의 지원체계가 확립되어 추진되고 있음. 특히 나노바이오 안정성, 영향평가 및 표분하 분야에서는 나노 구조의 안전성, 독성 등 나노기술이 인체나 환경에 미치는 영향을 평가하고 나노기술을 표준화하기 위하여 성능 안전성 평가 기술, 환경 및 인체 영향 평가 기술, 표준화 기술 등이 포함되어 이 분야의 체계

적인 연구개발과 기술확보가 가능할 것이라 판단됨.

- 식품나노소재의 생물학적 효능에 대한 연구는 시험관 수준에서 항산화 효과 및 기능성 물질의 위장관 조건에서의 방출 특성을 분석하는 연구가 주를 이루고 있음 .
- 식품나노소재를 이용하여 기능성 물질의 생리활성 효능을 세포수준에서 암세포 성장 저해 및 항산화 효과, 항염 효과 등의 관점에서 연구 보고가 있음. 그러나 *in vivo* 수준에서 식품나노소재를 이용한 기능성 물질의 항염, 항산화 효과 및 생체 내 흡수율에 관한 연구는 매우 미흡한 실정임.

(3) 국내외 연구 현황

1) 천연보존료 국내외 현황

○ Chisso

방선균의 일종인 *Streptomyces albulus*가 생산하는 항균성물질로서 염기성아미노산인 폴리리신은 일본 Chisso사에서 개발되었으며, 식중독 원인균, 내열성균 등의 증식 억제 효과가 있으며, 쌀밥, 절임류, 면류, 부식 등에 사용됨

○ 데저트킹

남미에서 자생하는 식물인 유카 사포닌을 다량 함유하며, 항효모활성이 우수하며, pH 및 열안정성이 우수한 반면 항세균활성이 없으므로 다른 소재와 병용하여 제제로 사용된다. 부식, 절임류, 김치 음료의 효모 제어에 적용되며, 김치의 가스발생 억제효과로도 사용됨

○ 미쯔비시화학식품회사

겨자의 알릴 겨자유를 주성분으로 한 항균제 'WasaOuro'가 있으며, 휘발되어 항균효과를 발휘하는 시트, 라벨 타입은 도시락, 부식, 제과, 제빵 등에 사용되며, 겨자유 자체의 향이 강하므로 식품에 직접 첨가하는 타입은 절임류, 수산가공품, 드레싱이나 야채소독제로 일부만 사용됨



○ MC food specialties Inc.

제품명이 '메이올썩킹'으로 구성성분으로는 인디언구스베리, 호프추출물, 자당지방산에스테르, 에탄올, 구연산을 포함하며, 항효모활성이 우수하며, 만두피, 김치, 장국의 효모 발생을 억제하는 제품임

○ 우에노제약

이리단백추출물은 주로 연어나 청어의 이리로부터 얻어지는 항균물질로서 염기성 폴리펩타이드로 구성되며 구성아미노산의 70%를 알긴산이 차지하고 있다. 연어로부터 얻어지는 항균물질은 살민(연어프로타민), 청어로부터 얻어지는 항균물질은 클루페인(clupeine)이며, 세균과 곰팡이, 효모에 광범위한 항균활성을 가지나, 생선 특유의 비린 관능으로 광범위하게 사용되지 못함. pH7이상의 알칼리에서 항균력이 강하며, 칼슘과 같은 2가 양이온, 인산, 단백질에 의해 활성이 저해되기도 함. 단백질 식품보다는 주로 면류, 떡, 쌀밥 등의 전분계식품의 보존성 향상에 이용됨.

○ 천연 항산화제 탐색을 위한 재료는 매우 다양하여, 미생물 대사산물을 비롯하여 버섯류, 조류 등의

해양생물, 식물, 동물, 식품 가수분해산물 등이 있으며, 발견되는 항산화물질의 종류 또한 급원의 종류에 따라 다양함. 토코페롤(tocopherol), 고시폴(gossypol), 세사몰(sesamol), 레시틴(lecithin), 세파린(cephalin), sulfhydryl(SRH), 구연산, 아스코르빈산과 고추의 에테르 추출성분, 소맥배아, 대두, 후추, 토마토에서 얻은 추출물들, 또 주로 플로보노이드계 색소들의 추출액, 감자, 버섯, 옥파의 노란껍질 등에서의 추출물 등의 다양한 항산화성분들이 보고되었음

2) 나노에멀전/캡슐화 기술을 이용한 식품

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Nestle and Unilever (스위스, 네덜란드)	지방감축과 향미를 유지하면서도 지방 함량이 적은 나노에멀전 개발	나노에멀전을 기반으로 한 아이스크림을 개발
Biodelivery Science International (미국)	콩과 칼슘으로부터 코일형 나노입자로 의약품이나 영양성분(비타민, 리코펜, ω -3 지방산 등)을 직접 세포로 보낼수 있는 nanocochleate를 개발	Nanocochleate를 통해 ω -3 지방산을 제품의 향이나 맛을 변화시키지 않고 케익, 머핀, 파스타, 수프, 쿠키 등에 혼합 가능. nanocochleate에 관한 특허 출원
George Weston Foods (호주)	ω -3 지방산이 함유된 30-40nm의 나노캡슐 제조	Tim Top-up 이라는 빵 개발하여 판매, 요구르트와 영유아 식품에도 적용
Aquaznova사 (독일)	비타민C, E, coenzymeQ10, isoflavone, flavonoid, carotenoid, phyto-extract, essential oil, 방부제, 색소, 기타 생물활성 성분을 캡슐화하여 10nm micelle을 이용하여 나노기술기반의 carrier system 개발	이중 CoQ10 제품에 사용하고 있으며 미셀형태의 제품은 NovaSol이란 상표로 판매되고 있음
Salvona Technology (미국)	직경 약 10-500 nm의 소수성 나노구(nanosphere)를 제조하여 마이크로구조체에 캡슐화 하는 Multisal이라는 다성분전달시스템 개발	다양한 성분을 소수성 나노매트릭스나 수분민감성 마이크로구조체 매트릭스의 한쪽이나 양쪽 모두에 탑재되어 생체에 전달되고, 이들성분의 방출 특성을 제어하여 입안에서의 미감을 연장시킴.
BASF (독일)	나노크기의 합성 카로티노이드(carotenoid)를 제조	현재 나노카로티노이드를 제조하여 판매중이며, 레모네이드 과일주스, 마가린 등에 사용하기 위해 식품, 음료 회사에 판매되고 있음
파일약품주식회사 (대한민국)	기능성물질(CoQ10, CLA, ω -3, vitamin E, 유산균, 비타민, 아미노산, 효소분해글루코사민, 콜라겐, 빌베리추출물 등)을 함유하는 나노에멀전 수용화 기술 개발	수용성 나노에멀전 조성물 관련 특허 다수. 수용성 CLA 나노에멀전 함유된 다이어트 음료 중국 특허

3) 나노기술응용 식품 포장재

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Honeywell (미국)	Aegis OX는 층간박리(delamination)에 대해 우수	Aegis OX, HFX, CSD 3등급의

	한 내성이 있으며, 쉽게 가공될 수 있고, 탁월한 투명도, 재활용가능성, 가격경쟁력을 갖고 있음. Aegis HFX는 고온 충전병에 있어 충전박리 저항을 향상시켜 식품에 산소 저항을 증대하는 소극적-적극적 시스템임. Ageis CDS는 충전 박리저항성을 부여하여, 탄산음료용의 단일 층 PET에 비해 고도의 소극적 이산화탄소 차단재를 제공	나노점토/나일론 6수지를 공급하고 있음
Nanocor (미국)	MXD6는 식품 및 음료의 유해성 가스 차단에 탁월한 특징이 있으며, 가공이 용이하고 고 투명 포장 가능해 다른 차단성 플라스틱에 비해 우수함. M9는 표준 MXD6의 CO2 및 O2차단성을 각각 50%, 75% 향상시키며, 또 MXD6와 동등한 고 투명도와 충전박리 저항을 갖고 있음.	Mitsubishi Gas chemical Company Inc.와 제휴를 통해 동사의 나노점토 첨가제와 Mitsubishi의 MXD6 나일론을 응용 혼합하여, 차단성 PET병과 M9라는 필름을 생산 현재 3중층 16온스 비 살균 PET 맥주병의 코어재료로 사용되고 있음
Bayer (독일)	나노입자를 함유하는 이 새로운 필름은 EVOH와 폴리 아마이드6장의 장점을 합하고 있어 가스가 필름내로 침투하는 것을 막으며, 습기가 새어나가는 것을 방지. Bayer의 Durethan UK 2-2601은 주스 용기의 플라스틱 코팅에 이상적인 후보 재료로, 저렴한 비용으로 산소 민감성 포장 내용물 보호 가능	Nanocor의 점토를 사용하여 하이브리드 시스템인 나일론6 나노 복합재를 개발
Voridan Co. (미국, Estman Chemical의 자회사)	나노복합재 구조는 맥주로부터 이산화탄소의 손실과 병속으로 산소의 진입을 최소화 하고 있으며, 맥주를 보다 신선하게 유지해 최장 6개월의 유통기한을 보장함	Nanocar, Inc 와 제휴해 점토 나노입자를 함유하는 나노복합재 (상품명, Imperm)를 개발 Miller Brewing Co. 등 일부 회사가 이 기술을 채용
Honeywell Specialty Polymer (미국)	유통기한을 최장 26주로 연장해주는 나노 복합재를 혼입한 플라스틱 맥주병을 성공적으로 제조. 플라스틱에 나노 결정을 혼입함으로써 산소가 빠져나가는 것을 막는 분자 차단층을 형성함.	Aegis 나일론 6가 3중층 구조의 가스 차단층이며, 2003년 후반부터 1.6 리터 Hite Pitcher 맥주병(한국 Hite Brewery Co.)에 사용되어 오고 있음.

4) Unilever, Kraft Foods (nanotak consortium), Nestle, Heinz 등의 글로벌 기업에서 상용화된 (단계에 있는) 식품나노소재 기술, 제품산업화를 위한 식품안전(safety issues), 규정적(regulations) 타당성 분석

- 유럽연합 (EU) 산하의 식량농업기구 (FAO)와 세계보건기구 (WHO)는 나노 식품을 전체 식품공급사슬 (Food Supply chain)인 생산, 제조가공, 포장 및 유통 과정 중 나노 기술을 적용하여 생산한 식품이나 유관 제품으로 정의 (FAO 2010).
- 식품산업의 나노 기술 응용에 따른 우려 점
 - 나노 식품의 경구 섭취 시 체내 ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) 데이터가 제한적
 - 나노 식품에 인체가 장기노출 될 경우 독성 데이터 부족
 - 나노 물질이 포함된 식품군에 대한 정보 부족과 표시기준의 부재
 - 식품 중 나노 물질의 다른 성분들과의 반응성, 분해여부 등에 대한 정보 부족

- 나노 물질의 분리유출 시 체내 유해성에 대한 우려
 - 나노 식품의 실제 섭취 데이터 부재
 - 나노 물질의 식품과 체내, 특히 소화기관 등에서의 측정과 특성연구에 대한 분석법의 필요성이 증가하고 있으나 비싼 분석비용과 고도의 분석기술, 표준화된 분석법의 부재로 나노 식품의 검출과 안전성 연구가 어려움
- 위와 같은 이유로 일부 국가에서는 식품으로의 나노 기술의 적용을 금지하기도 하며 유기농 식품에는 나노 기술을 허용하지 않는 캐나다와 같이 부분적으로 식품으로의 나노 기술의 적용을 규제하기도 하지만 일반적으로 그 기준이 모호함.
- 미국의 경우 2010년부터 나노 기술의 상용화를 촉진하기 위해 Nanotechnology Signature Initiatives (NSI) 라는 프로그램을 추진하고 있으며 유럽연합에서는 2011년 유럽 식품 안전처에서 “식품과 사료의 공급사슬에서 나노 과학과 나노 기술의 응용에 대한 위해 평가 가이드”를 발표하고 이에 대한 과학자 네트워크를 구축하여 운영 중.
- 중국의 농림부, 보건부에서 식품안전성평가를 하고 있으며 식품분야 나노 기술 응용에 대한 안전성 평가를 지속적으로 검토 중.
- 나노 첨가물유출 컨소시엄 과제에는 미국, 캐나다, 유럽, 호주, 일본, 대한민국 등 15개국의 정부기관 및 출연기관, 학계, 산업체, NGOs 등 의 전문가들로 구성된 연구진으로 나노 물질의 경구 노출평가를 위한 방법을 개발 중.
- 나노 기술의 역사가 짧은 만큼 나노 물질의 안전성 연구에 관한 데이터베이스가 부족하기 때문에 현재까지 식품으로의 나노 기술의 상용화가 활발하지는 않으나 세계 각 국의 나라에서 나노 식품의 산업화를 위한 준비작업이 활발함.
- 그러나 한국의 경우 나노 식품산업 분야의 연구 및 지원이 상대적으로 미미한 수준이기 때문에 멀지 않은 미래에 열리게 될 나노 식품산업에서 경쟁력을 갖추기 위해서는 활발한 연구와 개발이 절실함.
- 글로벌 식품 기업들에서 또한 새로운 시장에 대한 준비로 생산, 제조가공, 포장, 유통 등 다양한 측면으로의 나노 기술을 이용한 제품 개발에 사력을 다하고 있음.
- BASF, Kraft : 식품 유통기한 연장 및 식품부패 시 포장재 색상변화 보이는 새로운 포장재 개발
 - 이스라엘의 Nutralease : 나노크기의 액상제품을 이용하여 영양소를 세포로 전달하는 기술 개발 (라이코펜, 케타카로틴, 루테인, 피토스테롤, 코엔자임 Q10, DHA/EPA)
 - Shemen : 카놀라 기능성오일 인체 전달 시스템, 체내 섭취율 약 14% 증가, 콜레스테롤 저하
 - Nestle : 로레알과 공동으로 비타민 E를 직접 피부에 제공, 천천히 유출되도록 하여 자외선 보호가 지속되도록 하는 투명 선크림 연구 추진.
 - NovaSOL (Aquanova Germany) : 30 nm 사이즈로 용해되지 않는 영양성분을 친매성 물질을 이용해 캡슐화하여 micelles 형태로 만들어 생체이용률을 높임. 세포에서의 흡수율이 4배 증가.
 - Unilever : 지방을 나노 사이즈의 에멀전 입자로 만들어 아이스크림에 16% 들어가는 지방함유량을 1%까지 낮추면서도 조직감을 유지시킴. 마요네즈에도 같은 기술을 도입 중.
 - Tip Top UP bread : 생선 유래 오메가-3를 나노캡슐화하여 산화방지를 유도하면 빵에 주입.
- 나노 기술 시장을 주도하고 있는 미국의 경우 나노 기술의 산업화를 위한 정책 수립에 힘쓰고 있으며 2011년 6월 FDA (United States Food and Drug Administration) 에서 나노 물질을 포함하거나

나노 기술의 이용에 관한 규제 지침 초안을 발표하였으나 어떤 정확한 규정을 제시하지는 않음. 그 이후 2014년 6월 나노 기술을 포함한 식품 생산 과정의 경우 제품의 특성과 안전성에 영향을 미칠 수 있으므로 안전성 평가가 고려되어야 함을 표기하였으나 나노 기술이 이용된 제품을 모두 유해하다 판단하지는 않으며 오직 최종 제품의 안전성을 고려하겠다고 명시함을 통해 나노 기술의 산업화에 적극적인 태도를 취함. 따라서 현재 나노 기술의 적용 유무에 관련 없이 이전의 식품 규제와 동일하게 규정함 (FDA 2014)

- EPA (United States Environmental Protection Agency)를 중심으로 나노 물질의 안전성 평가가 이루어지고 있으나 가장 많이 쓰이는 탄소유도 나노 물질, 산화 세륨, 산화 티타늄, 은, 철, 이 다섯 가지 범주 내에서 안전성 평가가 이루어짐 (FAO and WHO 2013).
- EU의 경우 미국보다는 나노 물질의 안전성에 좀 더 신중한 태도를 보이고 있으나 정부주도보다는 개인 연구진이나 비정부 단체에 의해 나노 물질의 안전성 평가가 이루어짐. 2011년 나노 물질의 형태로 존재하는 모든 성분이 명확하게 성분 목록에 표시되어야 하며 성분의 이름 뒤에 'nano'라는 표기를 하도록 법안 채택 (FAO and WHO 2013).
- 식품 산업으로의 나노 기술의 응용에 대한 우려가 분명 존재하지만 법적으로 규제할 만한 규정은 아직 미흡한 상태이기 때문에 일반 식품 수준의 안전성 평가로도 충분히 제품의 상용화가 허가됨.
- 식품나노소재의 산업화에서 가장 고려되어야 할 사항은 법적 규정 보다는 신규물질에 대한 소비자들의 안전성 측면의 우려를 어떻게 극복할 것인가에 있음. 따라서 Unilever나 Kraft 등의 글로벌 기업에서도 이러한 소비자의 우려를 극복하기 위해 대학이나 연구 단체 등과의 협업을 통해 나노 소재의 우수성과 안전성을 자체적으로 증명하고 있으며 이를 통해 소비자 인식의 개선을 유도함.

제 4 절. 연구개발 범위

구분	연구기관	연구개발범위	세부연구범위
1차년도 목표		천연 항균/항산화소재 성분의 환형아밀로스, 단백질, 지질 캐리어 통한 나노크기 식품소재 제조 기술 개발 및 이화학적 특성, 포집도, 안전성 검증	
1차년도	주관	나노화 위한 천연 항균/항산화소재 제조공정 확립 및 유효성분 규격화	<ul style="list-style-type: none"> - 고순도 코어소재 제조공정 확립 - 원물 및 코어소재 유효성분 규격화 - 원물 및 코어소재 항균력 규격화
	제1협동	천연 항균/항산화소재의 기능성 증진 위한 나노복합체 제조 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 나노복합체 캐리어인 환형아밀로스 대량생산 - 코어소재 포함한 나노복합체 제조조건 최적화 - 기능성물질 포함한 나노복합체 안정성 분석
	제2협동	나노소재화를 위한 보조제 개발 (단백질, 지질 기반)	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질, 지질 기반 보조제 개발 - DLS 분석의한 나노소재 물리화학적 특성확립 - 나노소재 광학적 특성, 포집도 평가
	위탁	유용물질 혼합 및 나노제형화에 따른 효능 평가법 표준화	<ul style="list-style-type: none"> - 유용물질 혼합에 따른 활성조건 탐색 - 나노제형화에 따른 효능분석법 확립 - 나노소재 입자크기 따른 효능연구 - 피복소재 종류따른 나노소재 효능연구
2차년도 목표		천연 항균/항산화소재가 함유된 나노소재의 포집도, 수율, 안정성 기반 제조공정 최적화 및 나노소재화에 따른 효능평가, 체내흡수율 분석	
2차년도	주관	나노 소재의 식품 보존 효능 및 화장품 적용 효능 검증, 유전독성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 나노소재 완성도 평가 - 나노소재 식품 보존 효능평가 - 나노소재 화장품 적용 효능평가 - 나노소재 여성호르몬 유사효능 평가
	제1협동	천연 항균/항산화소재 기능성 증진을 위한 나노에멀전 제조 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 고압균질기 이용한 나노에멀전 제조조건 확립 - 나노에멀전 저장안정성 및 소재안정성 확립 - 나노에멀전 항균/항산화 효능평가 - 나노복합체 수용액내 저장안정성 평가
	제2협동	나노소재화 공정기술개발 (Desolvation, Biopolymer-Gel, 실린더장치등)	<ul style="list-style-type: none"> - Desolvation 기반 나노소재화 공정개발 - 생분분자겔 기반 나노소재화 공정개발 - 나노소재 수율 및 코어소재 포집효율 검증
	위탁	개발 나노소재의 효능 평가 및 향상법 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 나노소재 항균/항산화 활성 평가 및 표준화 - 나노소재 안정성 평가 - 나노소재 ex vivo 흡수율 평가 - 나노소재 항균/항산화 효능하상조건 확립
3차년도 목표		천연 항균/항산화소재의 개량(멀티소재), 최적화공정 기술 개발 및 세포, 동물실험 통한 식약처 가이드라인 안전성 평가	
3차년도	주관	나노 소재 pilot 생산공정 확립 및 제품화 및 유전독성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 나노소재 pilot 생산공정 확립 - 나노소재 제품 규격안 세팅 - 나노소재 안전성평가 - 추가 효능평가(섬기린초, 토복령)
	제1협동	나노복합체와 나노에멀전기술을 이용한 멀티나노소재 제조공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - 코어물질-나노복합체-나노에멀전 멀티나노소재 제조 - 멀티나노소재 안정성 분석 - 멀티나노소재 특성 및 항균/항산화력 측정
	제2협동	나노소재화공정 최적화 및 제형화	<ul style="list-style-type: none"> - 드랍, 미세유체체널칩, 시린지펌프 등의 방법 이용한 나노소재 대량, 연속제조공정 개발 - 나노소재 안정성 검증(pH, 염, 저장안정성) - 나노소재 용해도 향상 검증(분광, 현광분석)
	위탁	개발 나노소재 산업화 적용 효능 검증 및 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 개발 나노소재 항산화활성 변화 측정 - 개발 나노소재 세포독성평가 - 개발나노소재 안전성검증(단회투여, 반복투여) - KFDA가이드라인 기반 안전평가보고서 작성

제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발의 추진전략, 추진체계 및 추진일정

1. 연구개발의 추진전략

본 연구에서는 나노기술을 응용한 식품을 제조하고 이를 공장 시스템에 현장 적용하기 위한 기술을 개발하기 위하여 제1세부 및 제1, 제2협동 기관이 상호 보완적으로 연계하여 효율적인 목표 달성 전략을 추진하고자 함.

제1세부 (주관)

- 기존에 제품화된 천연 향균/항산화소재 제조기술을 바탕으로, 보다 고농도의 유효성분을 포함하는 천연 향균/항산화소재 제조방법 확립이 용이하며 천연 향균/항산화소재를 나노화의 core로 제공함으로써 연구 효율과 성공가능성을 높임.
- 수년간에 걸친 식품적용효능 검정 경험을 바탕으로 나노화된 소재의 식품/화장품 보존효능을 신속히 검증할 수 있음.
- 나노화 최적공정에 필요한 생산설비를 1세부에서 확보하고 있으며, 추가 필요한 설비 구축이 가능함.
- 나노소재화는 생산원가가 높은 천연소재의 농도대비 효능을 극대화시킬 수 있어, 천연소재 상품의 가격 경쟁력을 가질 수 있게 하는 기술임.
- 나노화 core 소재인 감초(우즈베키스탄), 로즈마리(중국)에서 원료를 공급받고 있으므로 원료수급 및 경제성에 문제가 없으나, 국내에서 한약재로 유통되는 토복령과 (주)다인소재에서 경북지방에 식재한 섬기린초에 대해서 원료 확보 및 경제성 충족을 위한 국내외 원료 소싱 전담팀 운영 예정임.

제 1세부 (위탁)

- 식품 나노소재의 향균/항산화 활성 평가 표준화를 위해 다양한 조건에서 나노소재의 활성 평가를 진행할 것임.
- 유용물질 혼합 및 나노제형화에 따른 효능 평가법을 표준화하고자 함.
- 표준화된 효능 평가법을 바탕으로 개발된 나노소재의 효능 평가 및 향상법을 확립하고자 함.
- 1, 2차 년도에 확립된 효능 평가 및 향상법을 바탕으로 개발된 나노소재의 산업화 적용 효능 검증하고 안전성 평가를 진행하고자 함.

제 1협동

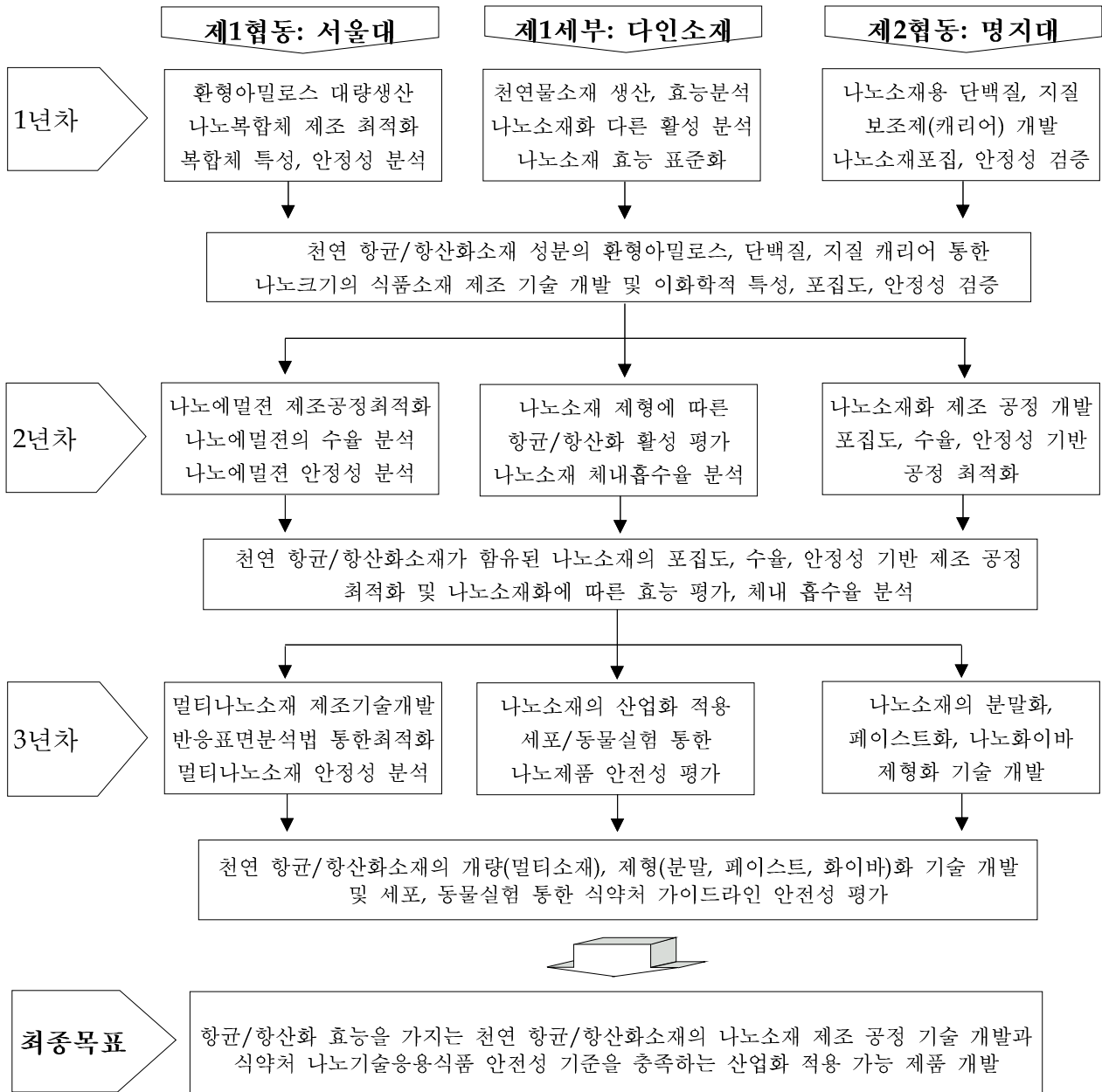
- 제1세부 기관에서 제공하는 유효성분(천연 향균/항산화소재)의 효능과 안정성 결과를 제공받아 식품나노소재를 제조 공정 개발을 진행할 것이며, 체계적이고 효율적인 연구 성과를 얻을 수 있을 것으로 기대함.

- 식품나노기술로서 나노복합체, 나노에멀전을 제조하고, 이를 대량생산 할 수 있는 공정 확립을 위한 연구를 진행할 것임.
- 1, 2차년도에 개발된 소재와 기술을 접목한 멀티 나노소재 제조 공정 확립을 바탕으로 식품 나노소재 적용할 수 있는 기술을 개발하고자 함.
- 제조한 식품나노소재의 물리화학적 특성 및 안정성을 평가하여 제형별 제품 개발에 활용하고자 함.

제 2협동

- 제1세부 기관에서 제공하는 천연 향균/항산화소재의 효능과 안정성 결과를 제공받아 나노소재화를 위한 단백질, 지질, 생고분자 계열의 보조제를 개발할 것이며, 체계적이고 효율적인 연구 성과를 얻을 수 있을 것으로 기대함.
- 식품나노기술로서 자가조립(self-assembly), solvent-displacement, desolvation 방법을 동원하여 1세부의 천연물 유용성분을 포집하는 나노복합소재 제조하고, 이를 대량생산 할 수 있는 공정 개발을 위한 연구를 진행할 것임.
- 나노소재의 흡광도, 형광세기, 크기, 제타전위를 바탕으로 특성을 규명하고, 반응상수식을 동원하여 결합상수, 결합도를 계산하고 이를 포집도, 안정도 지표로 개발하는 연구를 진행할 것임.
- 1, 2차년도에 개발된 보조제 소재와 제조 기술을 바탕으로 식품나노소재의 산업화에 적용하기 위한 분말, 페이스트, 나노화이버 형태의 제형과 공정 기술을 개발하고자 함.
- 코어 물질이 천연소재이고 이를 나노소재화하는 과정에서는 비천연물질이 첨가될 수 있으나, 제조공정에서 제거되는 성분을 사용함.
- 나노소재화 과정에서 비천연물질이 첨가될 수 있으나, 비록 비천연 성분이지만 식품에 사용할 수 있는 성분을 사용함. 나노에멀전과 나노캐리어 제조 시 사용되는 부형제는 tween20과 WPI(whey protein isolate), 효소변형전분 등을 사용하고 있으며 이 성분들은 식품에 사용가능한 원료임.

2. 연구개발의 추진체계



3. 연구개발의 추진일정

가) 1차년도

1차년도														연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
일련 번호	연구내용	추진 일정													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	고순도 천연 항균/항산화 추출물 제조공정 확립	■	■	■										10,000	윤태미 (다인소재)
2	원물 및 고순도 코어소재 유효성분 함량 표준화			■	■	■	■							10,000	윤태미 (다인소재)
3	원물 및 고순도 코어소재 항균력 표준화					■	■	■	■					30,000	윤태미 (다인소재)
4	생산원가 절감을 위한 원료수급 및 제조공정 최적화							■	■	■	■			22,000	윤태미 (다인소재)
5	나노화소재 안전성평가									■	■	■	■	25,000	윤태미 (다인소재)
6	나노제형화에 따른 항균/항산화 효능평가법 표준화	■	■	■	■									10,000	김현숙 (한양대)
7	유용물질 혼합에 따른 항균/항산화 활성분석					■	■	■	■					10,000	김현숙 (한양대)
8	나노소재 입자크기에 따른 항균/항산화 활성분석						■	■	■	■				30,000	김현숙 (한양대)
9	나노소재 피복소재에 따른 항균/항산화 활성분석									■	■	■	■	13,000	김현숙 (한양대)
10	전분으로부터 나노캐리어 대량생산	■	■	■										20,000	김용노 (서울대)
11	천연 항균/항산화 소재를			■	■	■	■	■	■					20,000	김용노 (서울대)

	포함하는 나노복합체 제조조건 최적화														
12	나노복합체 이화학특성 및 안정성 분석													30,000	김용노 (서울대)
13	단백질, 지질 기반 나노화 보조제 개발													15,000	최신식 (명지대)
14	나노복합체 물리화학적 특성 분석													15,000	최신식 (명지대)
15	나노복합체 포집능 및 결합메커니즘 규명													20,000	최신식 (명지대)

나) 2차년도

		2차년도												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
일련 번호	연구내용	추진 일정													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	나노화 감초추출물의 식품 보존효능 검증													10,000	윤태미 (다인소재)
2	나노화 로즈마리 추출물의 식품 보존효능 검증													10,000	윤태미 (다인소재)
3	나노화 토복령 추출물의 식품 보존효능 및 유효물질의 생리활성 검증													30,000	윤태미 (다인소재)
4	나노화 섬기린초 추출물과 복합 추출물의 화장품 적용 방부 효능 및 미백 효능 검증													22,000	윤태미 (다인소재)
5	나노화소재 안전성평가													25,000	윤태미 (다인소재)
6	개발된 나노소재의 제형 별 항균/항산화 활성 평가 및													10,000	김현숙 (한양대)

	표준화																	
7	개발된 나노소재의 저장조건 별 안정성 평가																10,000	김현숙 (한양대)
8	개발된 나노소재의 ex vivo 흡수율 평가																30,000	김현숙 (한양대)
9	개발된 나노소재의 항균/항산화 효능 향상 조건 확립																13,000	김현숙 (한양대)
10	나노에멀전 제조조건 최적화																20,000	김용노 (서울대)
11	천연 항균/항산화 소재-나노에멀 전의 물리화학적 특성 분석																20,000	김용노 (서울대)
12	천연 항균/항산화소 재를포함한 나노에멀전의 안정성 분석																30,000	김용노 (서울대)
13	Desolvation 방법에 의한 나노소재화 공정 개발																15,000	최신식 (명지대)
14	생고분자-겔(Bio polymer-Gel) 법에 의한 나노소재화 공정 개발																15,000	최신식 (명지대)
15	유용 핵심 식품 성분의 포집(Encapsulat ion) 효율, 나노소재 수율 검증																20,000	최신식 (명지대)
16	나노소재 생산공정 최적화에 의한 생산단가 최적화																20,000	최신식 (명지대)

다) 3차년도

3차년도																
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	나노소재 pilot 생산공정 확립	■	■	■	■	■	■	■	■						30,000	윤태미 (다인소재)
2	나노소재 제조공정 세팅에 의한 제품화			■	■	■	■	■	■	■					10,000	윤태미 (다인소재)
3	제품 규격안 세팅							■	■	■	■				10,000	윤태미 (다인소재)
4	나노소재 기반 제품의 품질공인인증 획득							■	■	■	■				22,000	윤태미 (다인소재)
5	나노화소재 안전성평가										■	■	■	■	25,000	윤태미 (다인소재)
6	개발 나노소재의 효능검증 (항균/항산화)	■	■	■	■	■									10,000	김현숙 (한양대)
7	개발 나노소재의 세포독성시험			■	■	■	■	■							10,000	김현숙 (한양대)
8	개발 나노소재의 단회/반복투여 독성평가			■	■	■	■	■	■	■	■	■			43,000	김현숙 (한양대)
9	식약처 가이드라인 기반 보고서 작성											■	■	■	10,000	김현숙 (한양대)
10	산업화를 위한 천연 항균/항산화 소재를 포함한 나노복합체 제조 및 대량생산	■	■	■	■	■	■	■	■						10	김용노 (서울대)
11	나노복합체-나노 에멀션이 포함된 멀티나노소재 제조 및 최적화	■	■	■	■	■	■	■	■							김용노 (서울대)
12	최적화 된 멀티나노소재의 안정성 증대효과 규명				■	■	■	■	■	■					25,000	김용노 (서울대)

13	멀티나노소재의 물리화학적 특성 분석												25,000	김용노 (서울대)
14	제조 조건별 향산화효과 및 항균력 실험												20,000	김용노 (서울대)
15	분말화 공정 기술 개발 및 최적화												15,000	최신식 (명지대)
16	페이스트 공정 기술 개발 및 최적화												15,000	최신식 (명지대)
17	나노화이버 공정 기술 개발 및 최적화												20,000	최신식 (명지대)
18	나노소재 생산공정 최적화에 의한 생산단가 최적화												20,000	최신식 (명지대)

제 2 절. 세부과제별 연구수행 내용

I. 주관기관 ((주) 다인소재)

1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) 고순도 코어소재 제조공정 확립

가) 추출용매

최적의 고순도 코어소재를 제조하기 위하여 원물 10g에 6단계의 용매조건(열수~95% 주정)을 각각 첨가하여 24시간 동안 추출 후, Whatman No.2 여과지로 필터한 다음, 감압농축기로 용매와 물을 완전히 건조한 추출물에 대하여 회수율, 유효성분 함량을 확인하였다.

나) 추출온도

최적의 고순도 코어소재를 제조하기 위하여 원물 10g에 상기조건에서 결정된 추출용매를 첨가한 다음 5단계의 온도조건(30℃~70℃)을 각각 적용하여 24시간 추출 후, Whatman No.2 여과지로 필터한 다음, 감압농축기로 용매와 물을 완전히 건조한 추출물에 대하여 회수율, 유효성분의 함량을 확인하였다.

다) 추출시간

최적의 고순도 코어소재를 제조하기 위하여 원물 10g 상기조건에서 결정된 추출용매를 첨가한 다음 4단계의 시간조건(5시간 ~ 24시간)을 각각 적용하여 추출 후, Whatman No.2 여과지로 필터한 다음, 감압농축기로 용매와 물을 완전히 건조한 추출물에 대하여 회수율, 유효성분의 함량을 확인하였다.

라) 기타조건

상기의 추출조건을 반영하여 제조한 추출물에 대하여 유효성분의 함량을 높이기 위한 방법으로 활성탄 처리, MPLC 정제, 산염기침전 등과 같은 추가적인 방안을 검토하여 제조공정에 반영하였다.

(2) 고순도 코어소재 유효성분 및 항균력 규격화

가) 원물 및 코어소재 유효성분 규격화

① 감초 유효성분 분석

감초 유래 항균성분으로 항균력이 우수하면서 가장 많은 함량으로 포함되어 있는 glabridin을 표준화 지표 물질로 정하였으며, 감초 원물과 코어소재의 glabridin 함량을 HPLC 분석을 통하여 확인하였다. glabridin 분석은 Cronus Triple-E C18(150×4.6mm, 3

micron, Cronus) 칼럼을 사용하였으며, UV검출기는 230nm를 적용하였고, Solvent A(Acetonitrile)와 Solvent B(Water)를 isocratic 조건(A:B = 50:50)으로 1ml/min 유속으로 흘려주었다.

② 로즈마리 유효성분 분석

로즈마리 유래 대표적인 항균/항산화성분으로 carnosic acid를 지표물질로 정하였으며, 로즈마리 원물과 코어소재의 carnosic acid 함량을 HPLC 분석을 통하여 확인하였다. 분석 조건으로 Cronus Triple-E C18(150×4.6mm, 3 micron, Cronus) 칼럼을 사용하였으며, UV 검출기는 230nm를 적용하였고, Solvent A(Acetonitrile)와 Solvent B(Water + 0.1% phosphoric acid)를 isocratic 조건(A:B = 65:35)으로 1ml/min 유속으로 흘려주었다.

③ 토복령 유효성분 분석

토복령 40% 주정 추출물에 대하여 활성추적 분리법(Bioassay-guided isolation)을 적용한 유효성분 분리정제 결과, Steroidal saponin 계열의 물질을 분리하였다. 물질의 구조는 질량분석 및 1D & 2D-NMR분석을 통하여 확인하였으며, 항진균활성 물질은 dioscin으로 구조결정하였다.

토복령 원물 및 고순도 코어소재에 함유된 유효성분을 규격화하기 위하여 표준물질인 dioscin을 HPLC 분석법으로 함량을 확인하였다. 분석조건으로, 칼럼은 YMC-Pack ODS-A(150×4.6mm, 3 micron, YMC)을 사용하였으며, UV검출기는 210nm를 적용하였고, Solvent A(30% Acetonitrile)와 Solvent B(Acetonitrile)를 아래 표와 같이 gradient 조건으로 1ml/min 유속으로 흘려주었다.

표 3. Dioscin 분석용 HPLC 용매 조건

Time (min)	A(%)	B(%)
0	100	0
30	40	60
35	40	60
40	100	0
45	100	0

④ 섬기린초 유효성분 분석

섬기린초의 항균성분으로는 8가지가 보고되어 있으며(Plant Disease, V.97, No.12, 1593~1598, 2013, Effect of gallotannins derived from *Sedum takesimense* on tomato bacterial wilt), 그 중에서 항균력이 우수하면서 양이 많은 ST-7번 물질(1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-glucose)을 지표물질로 정하였다. 섬기린초 원물 및 고순도 코어 소재에 함유된 유효성분을 규격화하기 위하여 지표물질인 ST-7을 HPLC 분석법으로 함

량을 확인하였다. 분석조건으로 칼럼은 YMC-Pack ODS-A(150×4.6mm, 3 micron, YMC)을 사용하였으며, UV검출기는 270nm를 적용하였고, Solvent A(Water +0.05% TFA)와 Solvent B(Methanol)를 아래 표의 gradient 조건으로 1ml/min 유속으로 흘려주었다.

표 4. 섬기린초 유효성분 ST-7의 HPLC 용매 조건

Time (min)	A(%)	B(%)
0	70	30
40	50	50
42	0	100
47	0	100
50	70	30
54	70	30

나) 원물 및 코어소재 항균력 규격화

확립된 제조공정에 의해 제조된 고순도 코어소재 4종은 CLSI방법(The Clinical and Laboratory Standards Institute guideline)에 따라 microdilution법으로 항균력을 평가하였으며, 그 값은 최소생육저해농도(MIC, Minimal Inhibitory Concentration)로 나타내었다.

고순도 코어소재는 DMSO(dimethyl sulfoxide) 및 ethanol이 포함된 증류수에 녹이고, 양성 대조균인 streptomycin sulfate는 증류수로 녹였으며, amphotericin B는 DMSO에 용해하여 테스트하였다. 시료를 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지가 포함된 96 well plate에서 two-fold dilution method으로 희석하였다. 또한, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 21768, 그리고 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 균주를 TSB 배지로 30°C 및 37°C에서 20~24 시간 동안 각각 전배양하였으며, *Candida albicans* ATCC10231 균주는 YMA(Yeast extract-Malt extract Agar) 배지에서 25°C, 20~24 시간 동안 전배양한 다음 MIC 테스트에 사용하였다. 그 다음, 상기 테스트 세균은 10^{5-6} CFU/ml(Colony forming unit), 진균은 10^{4-5} CFU/ml에 상기 화합물을 처리하고 각각의 배양 온도에서 세균은 24시간 동안, 진균은 48시간 배양 후 분광광도계로 600 nm 흡광도를 측정하여 최소생육저해농도를 확인하였다. 상기 최저생육저해농도값(MIC)은 세균의 생육을 완벽히 저해하는 가장 낮은 농도로 결정하였다.

(3) 나노화 소재 안전성 평가

제2협동기관(명지대)에서 제조한 Zein 기반 나노화 감초추출물에 대한 안전성검증을 위하여 GLP 시험기관인 '바이오톡스텍'에 위탁하여 유전독성시험 3종을 진행하였다.

가) 복귀돌연변이시험

나노화 감초추출물에 대한 돌연변이 유발성 여부를 판단하기 위하여 히스티딘 요구성 균주인 살모넬라균 4종(*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537), 트립토판 요구성 균주인 대장균 1종(*Escherichia coli* WP2uvrA)을 이용하여 복귀돌연변이시험을

진행하였다. 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 최고용량으로 하고, 공비4(1250, 313, 78.1, 및 19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$)를 해당 균주용 agar 배지에 균주와 함께 처리하여 48시간 배양한 후, 복귀변이 콜로니에 대한 육안계측을 하여 돌연변이 여부를 판단하였다.

나) 체외염색체이상시험

나노화 감초추출물에 대한 염색체이상 유발여부를 판단하기 위하여 검출강도가 높은 Chinese hamster lung(CHL/IU) 세포주를 이용하여 염색체이상시험을 진행하였다. 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 최고용량으로 하고, 이하 8농도(2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 및 19.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 용량설정시험을 실시하여 세포증식을 50% 이상 억제하는 용량을 본시험의 최고농도로 설정하였다. 설정된 최고농도를 바탕으로 공비2 - 3용량의 시험물질군을 세포주에 처리하여 18-24시간 배양한 후, 200개 세포주에 대한 염색체 구조이상 및 수적이상 여부를 관측하여 염색체 이상여부를 판단하였다.

다) 체내소핵시험

나노화 감초추출물에 대한 소핵유발여부를 판단하기 위하여 소핵유발에 감수성이 우수한 ICR 마우스를 이용하여 소핵시험을 진행하였다. 2000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 공비2 - 2용량(1000, 500 mg/kg)의 시험물질군을 단회경구투여후 24, 48, 및 72시간에 골수를 채취하여 소핵다염성적혈구의 출현빈도를 육안관측하여 소핵유발여부를 판단하였다.

(4) 토복령추출물의 항효모활성 물질 분리정제 및 구조규명

가) 유효성분 분리정제

토복령 40%주정추출물에 활성추적분리법(Bioassay-guided isolation)을 적용하여 유효성분 분리정제를 실시하였다. 토복령추출물을 50%에탄올에 녹여 10%용액으로 제조한 다음, 헥산(Hexane; Hex), 다이클로로메테인(Dichloromethane; DCM), 에틸아세테이트(Ethyl acetate; EA) 및 부탄올(Butanol; *n*-BuOH) 4종류의 용매를 차례로 가하여 분획을 실시한 다음, 항균력이 가장 높은 DCM 분획으로 open column chromatography를 수행하였다.

토복령 DCM 분획으로부터 ODS-A resin을 사용한 칼럼크로마토그래피(Flash column chromatography; FC)를 실시하여 소분획을 나누었으며, 전개 용매는 메탄올과 물 혼합용매를 사용하여 점차적으로 극성을 낮추며 분리하였다. 총 6개의 소분획을 분리하였다.

토복령 FC90 소분획에 대하여 YMC-Triart C18 칼럼, UV 검출기(210nm) 및 Isocratic 용매조건(Acetonitrile : Water = 45 : 55)을 이용한 prep-HPLC를 실시하여 1종의 유효성분을 순수분리 하였다.⁴⁴

나) 유효성분 구조규명

액체크로마토그래피 질량분석법(LC-MS), 1차원 핵자기공명분광법(^1H & ^{13}C -NMR), 2차원 핵자기공명분광법(COSY, HSQC, 및 HMBC) 등 분광학적 분석법을 적용하여 토복령 추출물로부터 순수분리된 유효성분의 구조를 규명하였다. LC-MS는 Waters Alliance

HPLC 및 Quattro quadrupole MS 시스템을 사용하였으며, YMC ODS-A(3 μ m, 150 x 3 mm)를 사용 하였다. 유속은 분당 0.3ml로 용매 A(초순수물+0.1% 개미산) 및 용매 B(아세토니트릴+0.1% 개미산)로 이루어진 2가지 이동상으로 용매 B를 30%에서 72%까지 20분 간 농도구배 하여 용리하면서, 음이온 및 양이온모드로 분자량을 검출하였다. 또한, 유효 성분은 MeOH-d4에 용해하여 상온에서 400 MHz NMR(Avnace III HD, Bruker, German) 장비로 NMR 분석을 수행하였다.

나. 연구 결과

(1) 고순도 코어소재 제조공정 확립

가) 고순도 감초추출물 제조

① 원물

감초추출물 제조를 위한 원물은 *Glycyrrhiza glabra* 학명을 가진 식물의 뿌리를 말린 것을 사용하였다. 본 원료는 식품의약품안전처에서 식품 및 생약원료로 활용이 가능하다고 고된바 있다.

② 추출용매

20% 주정 농도 간격으로 추출한 실험에서 주정 농도가 높아질수록 glabridin 추출 총량이 증가하지만, 60% 이상의 주정농도에서는 추출되는 glabridin 총량의 차이가 크지 않으며, 경제성 및 원물 상태를 고려하여 60~80% 주정으로 추출함이 적절하다고 판단하였다 (표 5). 또한, 70% 주정을 1:4(W/V)와 1:9(W/V) 비율로 첨가하여 추출하였을 때, 원물양 대비 추출 용매 비율이 높을수록 추출된 glabridin 총량이 약 24% 더 많았다 (표 6).

표 5. 감초 최적 추출 주정 함량 결정 (감초 원물 10g 단위 추출)

추출 용매	추출 비율	추출물	glabridin 함량	glabridin 총량
열수	1:9(W/V)	3.75 g	0.01%	0.0003 g
20% 주정	1:9(W/V)	3.10 g	0.36%	0.0111 g
40% 주정	1:9(W/V)	3.72 g	0.42%	0.0156 g
60% 주정	1:9(W/V)	3.24 g	0.52%	0.0168 g
80% 주정	1:9(W/V)	2.83 g	0.56%	0.0158 g
95% 주정	1:9(W/V)	1.51 g	1.16%	0.0175 g

표 6. 감초 최적 추출 용매량 결정

추출 용매	추출 비율	추출물	glabridin 함량	glabridin 총량
70% 주정	1:4(W/V)	6.4 g	1.06%	0.068 g
70% 주정	1:9(W/V)	7.2 g	1.10%	0.089 g

③ 추출온도

60℃ 이상의 온도에서는 추출되는 glabridin 총량이 유사하므로, 최종 추출 온도는 작업 안전성을 고려하여 60℃가 적절하다고 판단된다.

표 7의 최적 추출 온도별 실험에서 50℃ 이상의 온도에서 추출할 때, 실온에서 용매량을 1:9(W/V)로 추출하는 효과를 나타내므로, 제조공정에서는 추출 용매 비율을 1:4(W/V)로 하고, 50℃ 이상 온도에서 추출할 때 가장 경제적인 것으로 판단된다.

표 7. 감초 최적 추출 온도 결정

추출 용매	추출 온도	추출물	glabridin 함량	glabridin 총량
70% 주정	30℃	6.4 g	1.06%	0.068 g
70% 주정	40℃	7.1 g	0.97%	0.068 g
70% 주정	50℃	8.6 g	0.94%	0.080 g
70% 주정	60℃	10.0 g	0.89%	0.089 g
70% 주정	70℃	11.4 g	0.79%	0.090 g

④ 추출시간

70% 주정(1:4, W/V)로 추출하는 조건에서는 5~16시간 동안 추출 시, 추출 시간에 관계 없이 회수된 glabridin 총량은 큰 차이가 없었다 (표 8). 따라서, 일반적인 추출 시간 단위가 8시간이므로, 추출 공정비를 고려한다면, 8시간 추출이 가장 적절한 것으로 판단된다.

표 8. 감초 최적 추출 시간 결정

추출 용매	추출 시간	추출물	glabridin 함량	glabridin 총량
70% 주정	5h	5.67 g	3.80%	0.215 g
70% 주정	8h	6.54 g	4.06%	0.265 g
70% 주정	12h	7.50 g	2.91%	0.218 g
70% 주정	16h	7.33 g	2.94%	0.216 g

⑤ 기타조건

유효성분의 함량을 높이기 위한 방법으로 2가지 방법(활성탄처리 및 MPLC 정제법)을 추가적으로 검토하였다. 첫 번째로, 감초추출물에 활성탄처리를 한 경우 탈색효과는 있지만, 유효성분인 glabridin이 일부 소실되기 때문에 부적절하다 판단하였다. 두 번째로, 감초추출물에 MPLC 정제를 진행한 경우 glabridin 함량을 40.8%까지 높힐수 있었다. 하여, 상기에 결정된 추출조건에 MPLC 정제법을 적용한 제조공정을 확립하였다 (그림 11).

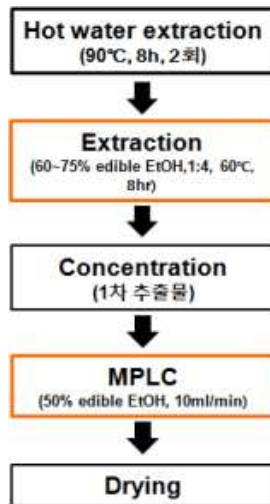


그림 11. 고순도 감초추출물 제조공정

나) 고순도 로즈마리추출물 제조

① 원물

로즈마리추출물 제조를 위한 원물은 *Rosmarinus officinalis* 학명을 가진 식물의 지상부를 말린 것을 사용하였다. 본 원료는 식품의약품안전처에서 식품원료로 활용이 가능하다 보고된바 있다.

② 추출용매, 추출온도, 추출시간

(주)다인소재에서 로즈마리추출물에 대한 선행연구가 일부 되어있기 때문에 추가적인 추출법 검토는 진행하지 않았다. 선행연구 결과 확립된 최적 추출조건은 다음과 같다. 로즈마리 전초에 80% 주정을 첨가한 다음, 실온에서 24시간동안 추출 및 여과 후 농축한 추출건조물을 80% 주정으로 재 용해한 액에 Norit 사의 활성탄 KB-G를 4~6%(W/W) 처리한 후 1시간 동안 교반한 다음, 활성탄을 여과하여 제거하고 농축건조하여 획득한 추출물의 경우 유효성분인 Carnosic acid 함량이 3.6%인 것을 확인하였다.

③ 기타조건

유효성분의 함량을 높이기 위한 방법으로 2가지 방법(MPLC 정제법 및 산염기침전법)을 추가적으로 검토하였다. 첫 번째로, 로즈마리추출물에 MPLC 정제를 진행한 경우 유효성분인 Carnosic acid 함량이 53.5%로 높은 것을 확인하였다. 두 번째로, 로즈마리추출물에 산염기침전법을 적용한 경우 Carnosic acid 함량이 52.1%로 MPLC 정제법과 유사하나, 비용측면에서 적게 드는 산염기침전법이 적절하다고 판단하였다. 하여, 선행연구로 결정된 추출조건에 산염기침전법을 적용한 제조공정을 확립하였다 (그림 12).

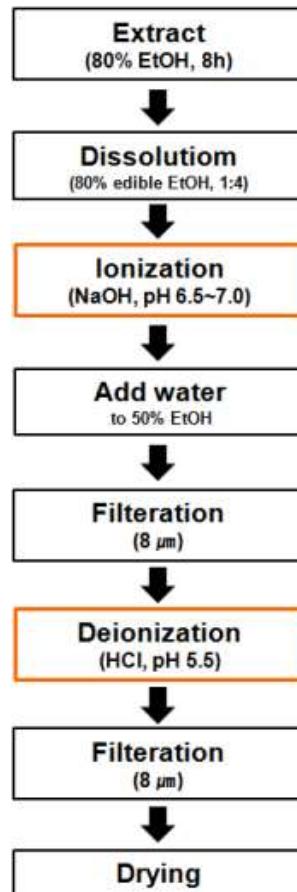


그림 12. 코어용 고순도 로즈마리추출물 제조 공정

다) 고순도 토복령추출물 제조

① 원물

토복령추출물 제조를 위한 원물은 국내에서 유통되는 약재 중 *Smilax china* 학명을 가진 식물의 뿌리를 말린 것을 사용하였다. 본 원료는 식품의약품안전처에서 식품원료로 제한적 활용이 가능하다 보고된바 있다. 하지만, 생약재로서 토복령은 *S. china*와 *S. glabra*를 혼용하여 사용하고 있으며, 이는 육안으로 구분이 어렵다. 그렇기 때문에 *S. china*가 사용되었음을 검증하기 위하여 분자유전학적 중 분석을 실시하였다.

(주)다인소재에서 확보한 토복령 원물 및 국립생물자원관에서 분양받은 청미래덩굴 유전자원에 대하여 *trnC-ycf6* 프라이머를 이용한 chloroplast DNA(cpDNA)분석을 실시하였으며, 그 결과 주관기관에서 확보한 토복령 원물의 cpDNA는 국립생물자원관에서 분양받은 유전자원과 99% 동일한 것을 확인하였으며, 고순도 토복령추출물 제조를 위해 사용된 원물이 *S. china*임을 확인하였다.

② 추출용매, 추출온도, 추출시간

(주)다인소재에서 토복령 추출물에 대한 선행연구가 일부 되어있기 때문에 추가적인 추출법 검토는 진행하지 않았다. 선행연구 결과 확립된 최적 추출조건은 다음과 같다. 토복

령 전초에 40% 주정을 1:7(W/V) 첨가한 다음, 30°C이하의 실온에서 24시간동안 추출 및 여과 후 농축 건조하였다. 토복령 추출물을 40% 주정으로 재 용해한 액에 Norit 사의 활성탄 KB-G를 2~3%(W/V) 처리한 후 1시간 동안 교반한 다음, 활성탄을 여과하여 제거하고 농축건조하여 획득한 추출물의 경우 유효성분인 dioscin 함량이 0.32%인 것을 확인하였다.

③ 기타조건

유효성분의 함량을 높이기 위한 방법으로 MPLC 정제법을 추가적으로 검토하였다. 토복령추출물에 MPLC 정제를 진행한 경우 유효성분인 dioscin 함량이 5.75%로 높아진 것을 확인하였다. dioscin과 같은 steroidal saponin은 제조비용이 저렴한 산업기 침전을 할 수 없으므로, 주정을 이용한 MPLC 정제법이 가장 적절하다고 판단하였다. 하여, 선행연구로 결정된 추출조건에 MPLC 정제법을 적용한 제조공정을 확립하였다 (그림 13).

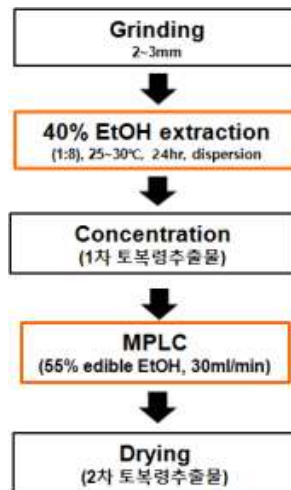


그림 13. 코어용 고순도 토복령추출물 제조 공정

라) 고순도 섬기린초추출물 제조

① 원물

섬기린초는 울릉도 및 독도에서 자생하는 식물로서 식품의약품안전처에서 식품원료로 등록되지 않은 소재이기에 식품산업 적용을 위한 제품개발은 불가능하다. 하지만, 자생식물로서 비식품분야 제품개발 가능성이 높기에 선발한 소재로서 *Sedum takesimense* 학명을 가진 식물의 뿌리를 말린 것을 사용하였다. 본 소재는 기린초와 유사하기 때문에 *S. takesimense*가 사용되었음을 검증하기 위하여 분자유전학적 종 분석을 실시하였다.

(주)다인소재에서 보유한 섬기린초 원물 및 국립생물자원관에서 분양받은 섬기린초 유전자원에 대하여 *matK* 프라이머를 이용한 cpDNA분석을 실시하였으며, 그 결과 주관기관에서 확보한 섬기린초 원물의 cpDNA는 국립생물자원관에서 분양받은 유전자원과 99% 동일한 것을 확인하였으며, 고순도 섬기린초추출물 제조를 위해 사용된 원물이 *S. takesimens*

e임을 확인하였다.

② 추출용매, 추출온도, 추출시간

(주)다인소재에서 섬기린초 추출물에 대한 선행연구가 일부 되어있기 때문에 추출용매에 대한 검토만 진행하였다. 주정 농도에 상관없이 전체적인 항균력이 MIC 2,000ppm, MBC 1,000ppm으로 동일하였으나, 40~60% 주정 추출 시에 수율이 약 20%로 높았으며, 50% 이하의 주정 농도로 추출 시, 수용액의 pH가 5이상이 되었다. 따라서, 추출 수율이 95% 주정 추출에 비해서 4배 높으면서 최종 제품이 pH5.2이상이 되는 40% 주정이 가장 적절한 추출 용매로 판단하였다(표 9).

표 9. 섬기린초 최적 추출 주정 함량 결정

추출 용매	추출물	추출 수율	MIC	MBC	pH(1%수용액)
20% ethanol	1.83 g	18.3%	2000 ppm	4000 ppm	5.2
40% ethanol	1.90 g	19.0%	2000 ppm	4000 ppm	5.2
50% ethanol	2.22 g	22.2%	2000 ppm	4000 ppm	5.0
60% ethanol	2.15 g	21.5%	2000 ppm	4000 ppm	4.8
80% ethanol	1.57 g	15.7%	2000 ppm	4000 ppm	4.0
95% ethanol	0.62 g	6.2%	2000 ppm	4000 ppm	3.6

③ 기타조건

섬기린초추출물의 탈색을 위한 방법으로 활성탄 처리를, 유효성분의 함량을 높이기 위한 방법으로 MPLC 정제법을 추가적으로 검토하였다. 섬기린초추출물에 활성탄처리를 진행한 결과 활성탄 처리농도가 높아질수록 탈색효과가 우수한 것을 확인하였으며, 생산공정을 고려하였을 때 5% KB-G 처리가 적절하다 판단하였다. 또한, 섬기린초추출물에 MPLC 정제법을 적용하였을 때, 유효성분인 ST-7(1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-glucose) 함량은 기존추출물의 0.25% 대비 5배 상승한 1.22%인 것을 확인하였다. 하여, 상기에 결정된 추출조건에 탈색과정 및 MPLC 정제법을 적용한 제조공정을 확립하였다 (그림 14).

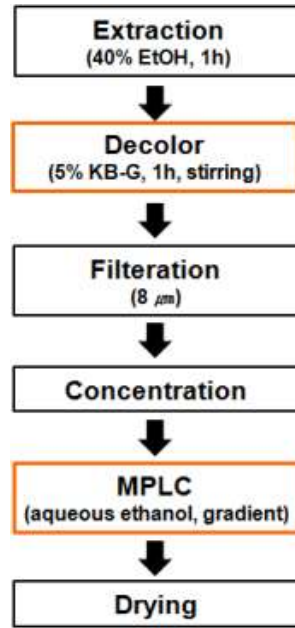


그림 14. 고순도 섬기린초추출물 제조공정

(2) 고순도 코어소재 유효성분 및 항균력 규격화

가) 원물 및 코어소재 유효성분 규격화

① 감초

- 감초 원물의 glabridin 함량 : 감초 원물로 우즈베키스탄산, 중국산, 인도산 감초를 각각 75% 에탄올로 1:9(W/V)로 실온에서 24시간동안 추출한 다음, 여과 후 건조한 후 glabridin 함량을 측정하였다.

표 10. 원산지별 감초 원물 및 추출물의 glabridin 함량

원산지	원물		추출물			glabridin함량/원물 (W/W)
	단가 (₩/kg)	양	양	glabridin 함량	glabridin 총량	
우즈베키스탄1	4,800	1kg	200g	0.89%	1.78g	0.178%
우즈베키스탄2	3,500	1kg	118g	0.79%	0.93g	0.093%
우즈베키스탄3	4,000	1kg	195g	0.67%	1.31g	0.130%
중국	4,000	1kg	197g	0.77%	1.52g	0.152%
인도	3,500	1kg	132g	0.39%	0.51g	0.051%

- 인도산 감초의 glabridin 함량은 다른 원물에 비해서 현저히 낮기 때문에 glabridin 추출을 위한 원물로는 부적합하였으며, 중국과 우즈베키스탄 감초의 glabridin 함량은 0.093%(W/W) 이상이다. 경제성과 원물 수습성을 고려하여 원물 단가 ₩4,000/kg 기준으로 원물내에 0.13% glabridin(W/W) 함량이 적합하다고 판단하였다.

- 고순도 코어소재의 glabridin 함량 : 감초의 고순도 코어소재 제조공정 (그림 11)을 기반으로 제조된 감초추출물의 glabridin 함량을 분석하여 규격화 하였으며, 40% glabridin 함량으로 결정되었다.

② 로즈마리

- 로즈마리 원물의 carnosic acid 함량 : 로즈마리 원물로는 단가가 저렴한 중국산이 가장 많이 이용되므로, 중국산 건조 로즈마리를 80% 에탄올로 1:9(W/V)로 실온에서 24시간동안 추출한 다음, 여과 및 건조한 후 carnosic acid 함량을 측정하였다.

표 11. 로즈마리 원물 및 추출물의 carnosic acid 함량

원산지	원물양	추출물	carnosic acid 함량	carnosic acid 총량(g)	carnosic acid 함량/원물 (W/W)
중국	1kg	202g	18%	36.36g	3.6%

로즈마리 원물의 carnosic acid 함량은 3.6%로 측정되었으며, 일반적인 값을 고려하여 3.2%로 규격화함이 적합한 것으로 판단하였다.

- 고순도 코어소재의 carnosic acid 함량 : 로즈마리의 고순도 코어소재 제조공정(그림 12)를 기반으로 제조된 로즈마리추출물의 carnosic acid 함량이 52.1% 함유된 것을 확인하였으며, 50% carnosic acid를 고순도 로즈마리추출물의 규격으로 지정하였다.

③ 토복령

- 토복령 원물의 dioscin 함량 : 토복령 원물로는 국내에서 자연산을 채취하여 한약재로 유통되고 있으며, 경동 시장 한약재료상에서 채취 지역이 서로 다른 원물을 확보하여 40% 주정 1:9(W/V)로 30℃에서 24시간동안 추출한 다음, 여과 및 건조한 후 추출 및 유효성분을 분석하였다.

표 12. 원산지별 토복령 원물 및 추출물의 dioscin 함량

원산지	원물		추출물			dioscin 함량/원물 (W/W)
	단가 (600g)	양	양	dioscin 함량	dioscin 총량	
경북 의성1	10,000	50 g	10.2 g	0.15%	0.0153 g	0.031%
경북 의성2	10,000	50 g	11.5 g	0.25%	0.0287 g	0.057%
경북 봉화	6,000	50 g	7.5 g	0.33%	0.0247 g	0.049%
경북 경주	8,000	50 g	6.3 g	0.29%	0.0183 g	0.037%

전남 순창	7,000	50 g	7.4 g	0.36%	0.0266 g	0.053%
경기도	10,000	50 g	6.9 g	0.37%	0.0255 g	0.051%
경북 영천	10,000	50 g	8.1 g	0.36%	0.0288 g	0.058%

토복령을 국내 산지별 원물의 dioscin 함량을 확인한 결과, 산지별 원물의 dioscin 함량의 평균값은 0.048%이므로, 0.04%로 규격화함이 적합하다고 판단하였다.

- 고순도 코어소재의 dioscin 함량 : 토복령의 고순도 코어소재 제조공정(그림 13)를 기반으로 제조된 토복령추출물의 dioscin 함량이 5.75% 함유된 것을 확인하였으며, 5% dioscin 을 고순도 토복령추출물의 규격으로 지정하였다.

④ 섬기린초

- 섬기린초 원물의 ST-7(1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-glucose) 함량 : 섬기린초는 우리나라의 울릉도와 독도 및 강원 산간 지역에 분포하는 다년생 자생식물로서 유통 및 판매가 이루어지지 않는 원료이다. 따라서, 다인소재에서 경북 달성 지역 농가 계약 재배로 섬기린초를 식재한 후, 재배 기간에 따른 유효성분 함량을 평가하고 있다. 섬기린초 건조 원물을 분쇄한 다음, 40% 에탄올1:9(W/V)로 실온에서 24시간동안 추출한 다음, 여과 및 건조한 후 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-glucose(ST-7) 함량을 측정하였다.

표 13. 재배 기간별 섬기린초 원물 및 추출물의 galloyl glucose 함량

재배 기간	원물양	추출물(g)	ST-7 함량	ST-7 총량	ST-7 함량/원물 (W/W)
6개월(재배1차년)	10g	3.05g	0.011%	0.335mg	0.0036%
14개월(재배2차년)	10g	3.03g	0.025%	0.757mg	0.0076%

섬기린초 원물을 추출하여 ST-7 성분의 함량을 확인한 결과, 14개월(재배 2년차) 재배한 건조 원물의 ST-7 함량이 0.025%이므로, 0.02%로 규격화함이 적합하다고 판단하였다.

- 섬기린초 코어소재의 galloyl glucose(ST-7, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-glucose) 함량 : 섬기린초의 고순도 코어소재 제조공정(Fig. 1-10)을 기반으로 제조된 섬기린초추출물의 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-glucose(ST-7) 함량이 0.122% 함유된 것을 확인하였으며(표 13), 1% 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-glucose(ST-7)를 고순도 섬기린초추출물의 규격으로 지정하였다.

표 14. 원물 및 고순도 코어소재의 유효성분 함량 표준화 규격

항목	감초	로즈마리	토복령	섬기린초
유효성분	glabridin	carnosic acid	Dioscin	1,2,4,6-tetra- <i>O</i> -galloyl- β -glucose (ST-7)
원물	0.13%	3.2%	0.04%	0.02%
고순도 코어소재	40%	50%	5%	0.1%

나) 원물 및 코어소재 항균력 규격화

① 감초

감초 코어소재는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633에 대한 항균활성을 methanol로 용해하여 테스트 하였으며, 40% glabridin으로 규격화된 코어용 고순도 감초추출물의 항균력은 *B. subtilis*에 대한 MIC값이 3ppm 이었다.

② 로즈마리

유효성분 함량 규격화된 고순도 로즈마리 코어소재를 이용하여 *Bacillus subtilis* ATCC 6633에 대한 항균활성을 확인하고, 항균력을 규격화 하였다. 50% carnosic acid로 규격화된 코어용 고순도 로즈마리추출물의 항균력은 *B. subtilis*에 대한 MIC값이 8ppm 이었다.

③ 토복령

유효성분 함량 규격화된 고순도 토복령 코어소재를 이용하여 *Candida albicans* ATCC 10231 에 대한 항균활성을 확인하고, 항균력을 규격화 하였다. 5% dioscin으로 규격화된 코어용 고순도 토복령추출물의 항균력은 *C. albicans*에 대한 MIC값이 48ppm 임을 확인하였다.

④ 섬기린초

유효성분 함량 규격화된 고순도 섬기린초 코어소재를 이용하여 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 에 대한 항균활성을 확인하고, 항균력을 규격화 하였다. 1% ST-7(1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl- β -glucose)으로 규격화된 코어용 고순도 섬기린초추출물의 항균력은 *P. aeruginosa*에 대한 MIC값이 312ppm 임을 확인하였다.

표 15. 고순도 코어소재 항균력 규격화(MIC값)

(단위 : ppm)

코어 소재	유효성분 규격	용해 용매	BS ¹⁾	PA ²⁾	CA ³⁾
감초추출물	40% glabridin	methanol	3	NA	NA
로즈마리추출물	50% carnosic acid	methanol	8	NA	-
토복령추출물	5% dioscin	40% ethanol	NA	NA	48
섬기린초추출물	1% ST-7	40% ethanol	-	312	NA
Streptomycin		ditilled water	0.03	10	NA
Amphotericin B		DMSO	NA	NA	2.5

1) *B. subtilis*, 2) *P. aeruginosa*, 3) *C. albicans*, NA; No activity, -; Not tested

(3) 나노화 소재 안전성 평가

가) 복귀돌연변이시험

제2협동기관(명지대)에서 제조한 Zein 단백질을 이용한 감초 나노소재에 대한 미생물의 돌연변이 유발성 여부를 판단하기 위하여 복귀돌연변이시험을 진행하였다. 용량설정시험 결과, 대사활성계 미적용군 (-S9)에서 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주의 78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 이상의 농도에서 생육저해가 관찰되었고, 대사활성계 적용군 (+S9)에서 *S. typhimurium* TA98, TA1535, TA1537 균주의 1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 이상, TA100 균주는 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 농도에서 생육저해가 관찰되었다. *E. coli* WP2uvr A 균주는 대사활성계 적용 및 미적용 군 모두에서 생육저해가 관찰되지 않았다. 용량설정시험 결과를 토대로 본시험의 최고농도는 생육저해관측농도를 포함한 공비 2의 5단계 시험군을 구성하여 본시험을 실시하였다. 본 시험결과, 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 모든 조건에서 각각의 균주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다(표 16 및 17). 한편 모든 양성대조군에서의 콜로니수는 음성대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었으므로 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다. 따라서 감초 나노소재는 본 시험 조건하에 사용한 균주들에 대해 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로부터 음성으로 판단하였다.

나) 체외염색체이상시험

제2협동기관(명지대)에서 제조한 감초 나노소재에 대해 염색체의 구조적 이상 유발 여부를 판단하기 위하여 염색체이상시험을 진행하였다. 용량설정시험 결과, 단시간처리법의 대사활성계 미적용군에서 39.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 단시간처리법의 대사활성계 적용군에서 156 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 연속처리법의 대사활성계 미적용군에서 19.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 세포증식을 50% 이상 억제하였다. 용량설정시험 결과를 토대로 본시험의 최고농도는 50% 증식저해관측농도를 포함한 공비 2의 4단계 시험군을 구성하여 본시험을 실시하였다. 본 시험결과, 단시간처리법 및 연속처리법의 대사활성계 미적용군에서 염색체 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 하지만, 단시간처리법의 대사활성계 적용군에서 염색체 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 7.5%로, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 용량의존적인 증가가 확인되었다(표 18). 따라서 감초 나노소재는 본 시험 조건하에 사용한 세포에 대해 염색체 수적이상을 유발하는 것으로부터 의양성으로 판단된다.

감초의 지표성분인 glabridin과 염색체 수적이상과 관련된 문헌검색 결과, Wang *et al.*, (2016)에 의하면 glabridin은 간암세포주의 braf/MEK signaling pathway에 관여하면서 암세포의 세포분열주기중 G1주기를 지연시켜 세포증식을 억제하고, 항암활성을 나타내는 것으로 보고하였다. 문헌결과를 바탕으로, 나노소재에 포집된 감초코어소재에 의해 세포가 특정 주기에서 지연된 상태로 느리게 분열이 일어났기 때문에 결과관측시기에 염색체 수적이상이 관측된 것으로 판단된다. 본 시험결과 수적이상이 양성대조군과 비교하여 심각한 수준으로 발생한 것이 아니므로 염색체 수적이상이 발생되지 않는 84 $\mu\text{g/ml}$ (glabridin 농도: 15.8ppm)미만인 농도에서 활용 시 문제없을 것으로 사료된다.

다) 체내소핵시험

제2협동기관(명지대)에서 제조한 감초 나노소재에 대해 골수 및 말초혈액 세포의 염색체 손상 또는 세포분열 이상 유발 여부를 판단하기 위하여 2016년 6월 27일 소핵시험을 진행하였다. 용량설정시험 결과, 2000 mg/kg을 최고용량으로 시험하였을 때 암수 모두 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 용량설정시험 결과를 토대로 본시험의 최고농도를 포함한 공비 2의 2단계 시험군을 구성하여 본시험을 실시하였다. 본 시험결과, 시험물질 처리군의 다염성적혈구(PCE, Polychromatic erythrocyte) 중 소핵다염성적혈구(MNPCE, micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 또한, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 관찰되지 않았다(표 19). 한편 모든 양성대조군에서의 콜로니수는 음성대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었으므로 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다. 따라서 감초 나노소재는 본 시험 조건하에 사용한 마우스 골수세포의 소핵유발성은 없는 것으로부터 음성으로 판단된다.

표 16. 미생물에 대한 감초나노소재의 복귀돌연변이시험 결과 (대사활성계 미적용군)

Strain	Test substance	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	22 , 23 , 20	22	2
		2.44	21 , 26 , 22	23	3
	Nano_herb_GB	4.88	24 , 29 , 22	25	4
		9.77	25 , 27 , 25	26	1
		19.5	22 , 21 , 25	23	2
		39.1	20 , 20 , 22	21	1
		78.1	16* , 18* , 15*	16	2
2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	722 , 733 , 677	711	30	
TA100	Water for injection	0	90 , 93 , 103	95	7
		2.44	100 , 85 , 90	92	8
	Nano_herb_GB	4.88	101 , 98 , 103	101	3
		9.77	105 , 104 , 106	105	1
		19.5	100 , 90 , 98	96	5
		39.1	91* , 102* , 106*	100	8
		78.1	70* , 71* , 67*	69	2
Sodium azide (SA)	1.5	616 , 617 , 647	627	18	
TA1535	Water for injection	0	8 , 12 , 9	10	2
		2.44	10 , 15 , 12	12	3
	Nano_herb_GB	4.88	7 , 11 , 9	9	2
		9.77	11 , 8 , 8	9	2
		19.5	7 , 12 , 9	9	3
		39.1	11 , 11 , 7	10	2
		78.1	6* , 7* , 4*	6	2
Sodium azide (SA)	1.5	458 , 481 , 461	467	13	
TA1537	Water for injection	0	9 , 7 , 7	8	1
		2.44	8 , 8 , 7	8	1
	Nano_herb_GB	4.88	9 , 7 , 8	8	1
		9.77	8 , 10 , 7	8	2
		19.5	8 , 7 , 9	8	1
		39.1	8* , 7* , 4*	6	2
		78.1	3* , 4* , 3*	3	1
9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	498 , 639 , 538	558	73	
WP2 ^{uvrA} (pKM101)	Water for injection	0	115 , 113 , 110	113	3
		313†	112 , 126 , 109	116	9
	Nano_herb_GB	625†	102 , 96 , 115	104	10
		1,250†	116 , 102 , 128	115	13
		2,500†	96 , 116 , 96	103	12
		5,000†	98 , 73 , 80	84	13
		4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	0.1	589 , 585 , 541	572

S.D.: Standard Deviation

*: Indicated growth inhibition

†: Precipitation

표 17. 미생물에 대한 감초나노소재의 복귀돌연변이시험 결과 (대사활성계 적용군)

Strain	Test substance	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	28 , 32 , 30	30	2
		39.1	35 , 34 , 35	35	1
	Nano_herb_GB	78.1	27 , 22 , 30	26	4
		156	22 , 27 , 32	27	5
		313†	30 , 29 , 29	29	1
		625†	31 , 34 , 33	33	2
		1,250†	24* , 25* , 22*	24	2
2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	408 , 369 , 406	394	22	
TA100	Water for injection	0	113 , 103 , 103	106	6
		9.77	82 , 104 , 110	99	15
	Nano_herb_GB	19.5	95 , 110 , 93	99	9
		39.1	99 , 116 , 117	111	10
		78.1	118 , 100 , 105	108	9
		156	106 , 118 , 107	110	7
		313†	95* , 104* , 101*	100	5
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	760 , 616 , 621	666	82	
TA1535	Water for injection	0	10 , 12 , 12	11	1
		39.1	11 , 10 , 8	10	2
	Nano_herb_GB	78.1	9 , 7 , 11	9	2
		156	10 , 9 , 10	10	1
		313†	10 , 12 , 8	10	2
		625†	9 , 10 , 9	9	1
		1,250†	5* , 3* , 4*	4	1
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	135 , 152 , 129	139	12	
TA1537	Water for injection	0	15 , 12 , 13	13	2
		39.1	11 , 16 , 13	13	3
	Nano_herb_GB	78.1	19 , 12 , 10	14	5
		156	14 , 13 , 11	13	2
		313†	10 , 12 , 11	11	1
		625†	4* , 4* , 6*	5	1
		1,250†	2* , 0* , 4*	2	2
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	191 , 195 , 143	176	29	
WP2uvrA (pKM101)	Water for injection	0	164 , 170 , 152	162	9
		313†	179 , 181 , 190	183	6
	Nano_herb_GB	625†	191 , 195 , 181	189	7
		1,250†	164 , 160 , 157	160	4
		2,500†	173 , 174 , 181	176	4
		5,000†	106 , 106 , 109	107	2
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	462 , 480 , 440	461	20	

S.D.: Standard Deviation

*: Indicated growth inhibition

†: Precipitation

표 18. CHL/IU 세포에 대한 감초 나노소재의 염색체이상시험 결과

Test substance	Dose (µg/mL)	RFD (%)	SP min	Trt-Rac Time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations								Number of cells with numerical aberrations			Other ^{a)}				
						crb	csb	cse	cse	fig	gap		total (%)		end	pol		total (%)			
											ctg	ccg	gap-	gap+							
Water for injection	0	100	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	2 (1.0)	0	0	0 (0.0)			
Nano_herb_GB	5.25†	96.0	-	6-18	not observed																
	10.5†	99.4	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	21.0†	91.2	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	42.0†	67.3	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
100					1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0	0	1 (0.5)				
MMC	0.1	44.3	-	6-18	100	4	0	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	10	0	22	0	0	0	0	0	60* (30.0)	60 (30.0)	0	0	0 (0.0)			
Water for injection	0	100	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	1	0	1	0	0	0	0	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0	0	0 (0.0)			
Nano_herb_GB	10.5†	96.5	+	6-18	not observed																
	21.0†	72.2	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
					100	2	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0	1	1 (0.5)			
	42.0†	78.7	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
					100	1	0	0	0	0	0	3	0	1 (0.5)	4 (2.0)	0	4	5* (4.0)			
	84.0†	63.8	+	6-18	100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
100					2	0	1	0	0	0	0	0	4 (2.0)	4 (2.0)	1	6	15** (7.5)				
B[a]P	20	42.6	+	6-18	100	5	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
					100	6	1	12	0	0	1	0	0	42* (21.0)	43 (21.5)	0	0	1 (0.5)			
Water for injection	0	100	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)			
Nano_herb_GB	2.63	98.4	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	1 (0.5)	0	0	0 (0.0)			
	5.25†	96.3	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)			
	10.5†	86.6	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	1 (0.5)			
21.0†	67.7	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)				
MMC	0.1	42.7	-	24-0	100	7	0	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
					100	20	0	49	0	0	0	0	0	99* (49.5)	99 (49.5)	0	0	1 (0.5)			

Aberration: ctg: chromatid gap, c1g: chromosomal gap, crb: chromatid break, cse: chromatid exchange, ccb: chromosomal break, cte: chromosomal exchange, fig: fragmentation, end: endoreduplication, pol: polyploidy

MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene

RFD: Relative Population Doubling, Trt-Rac time: Treatment-Recovery time

gap-: Total number of cells with structural aberrations excluding gap, gap+: Total number of cells with structural aberrations including gap

a) Other were excluded from the number of cells with chromosomal aberrations.

Significant difference from negative control by Fisher's exact test: * p<0.01

Significant difference from negative control by Cochran-Armitage trend test: * p<0.05, ** p<0.01

†: Precipitation

표 19. ICR 마우스에 대한 감초 나노소재의 소핵시험 결과

Groups	Dose (mg/kg)	Route	Hours after dosing	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	141 / 500	1 / 2000
					1102	160 / 500	2 / 2000
					1103	153 / 500	3 / 2000
					1104	150 / 500	1 / 2000
					1105	178 / 500	1 / 2000
					Total	782 / 2500	8 / 10000
					%(Mean±S.D.)	31.3 ± 2.77	0.080 ± 0.045
					1201	171 / 500	2 / 2000
					1202	166 / 500	1 / 2000
					1203	144 / 500	0 / 2000
					1204	176 / 500	3 / 2000
					1205	172 / 500	2 / 2000
					Total	829 / 2500	8 / 10000
					%(Mean±S.D.)	33.2 ± 2.54	0.080 ± 0.057
Test Substance	Nano_herb_GB	1,000	P.O.	24	1301	146 / 500	1 / 2000
					1302	180 / 500	1 / 2000
					1303	171 / 500	0 / 2000
					1304	188 / 500	3 / 2000
					1305	162 / 500	0 / 2000
					Total	847 / 2500	5 / 10000
					%(Mean±S.D.)	33.9 ± 3.26	0.050 ± 0.061
					1401	168 / 500	2 / 2000
					1402	152 / 500	2 / 2000
					1403	178 / 500	1 / 2000
					1404	188 / 500	1 / 2000
					1405	185 / 500	3 / 2000
					Total	871 / 2500	9 / 10000
					%(Mean±S.D.)	34.8 ± 2.92	0.090 ± 0.042
Positive control	MMC	2	IP.	24	1501	174 / 500	167 / 2000
					1502	167 / 500	193 / 2000
					1503	181 / 500	169 / 2000
					1504	145 / 500	147 / 2000
					1505	131 / 500	186 / 2000
					Total	798 / 2500	862† / 10000
					%(Mean±S.D.)	31.9 ± 4.18	8.620 ± 0.900

P.O. : Per Os.

IP. : Intraperitoneal

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

S.D. : Standard Deviation

MMC : Mitomycin C

Significant difference from negative control by Kastendaum & Bowman : † p<0.01

(4) 토복령추출물의 항효모활성 물질 분리정제 및 구조규명

가) 유효성분 분리정제

토복령 40%주정추출물에 함유된 항효모활성 유효성분은 분획 및 일련의 크로마토그래피와 항효모활성에 따라 분리정제하였다. 토복령 40%주정추출물을 50%에탄올에 녹여 4종류의 용매(헥산, 다이클로로메테인, 에틸아세테이트 및 부탄올)를 차례로 가하여 각각의 분획물을 획득하였다. 5개의 분획 중 가장 우수한 항효모활성을 보이는 DCM분획을 선택하였다 (그림 16).

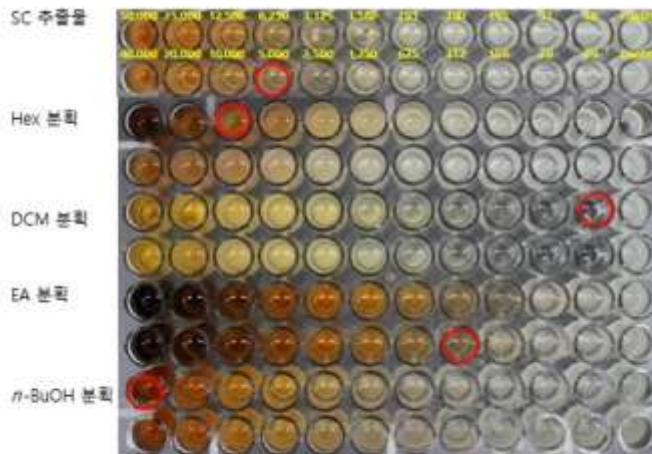


그림 15. 토복령 1차추출물 및 용매 분획물의 MIC 결과

토복령 DCM 분획을 ODS-A resin을 사용한 칼럼크로마토그래피(Flash column chromatography; FC)를 실시하여 6개 소분획을 분리하였으며, 각각의 소분획(FC50 ~ FC100)에 대하여 MIC test를 진행한 결과, 항균력이 2.4ppm으로 우수한 FC90 소분획을 확보하였다. 확보된 FC90 소분획에 대하여 prep-HPLC를 실시하여 1종의 유효성분을 순수분리 하였으며 MIC test를 진행한 결과, 항균력이 1.9ppm으로 매우 강한 항진균활성을 나타내었다 (그림 15).

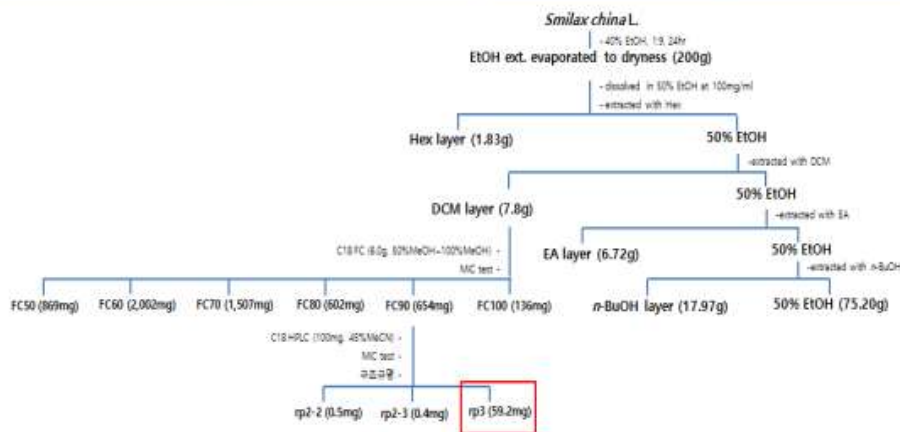


그림 16. 토복령 유효성분 분리정제 scheme

나) 유효성분 구조동정

- MS: 토복령의 DCM 분획에서 분리 정제된 유효성분은 분광학적 분석법(mass spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy 등)을 적용하여 그 구조를 규명하였다. 우선, DCM 분획을 고속액체 크로마토그래피와 질량분석법(mass spectroscopy; MS)을 통하여 분석한 결과, UV 파장 226 nm에서 가장 높은 흡광도를 보였고 (그림 17. A, B), 이 물질의 질량 분석 결과 양이온 모드에서는 $[M+H]^+$ m/z 869.6 분자량의 이온이 주로 검출되었고 (그림 17. C), 음이온 모드에서는 $[M-H]^-$ m/z 867.7 이온과 $[M+2Na]^-$ m/z 913.8 이온이 검출되었다 (그림 17. D). 이 결과를 바탕으로 유효성분은 m/z 868.6 분자량의 물질로 예상되었다.

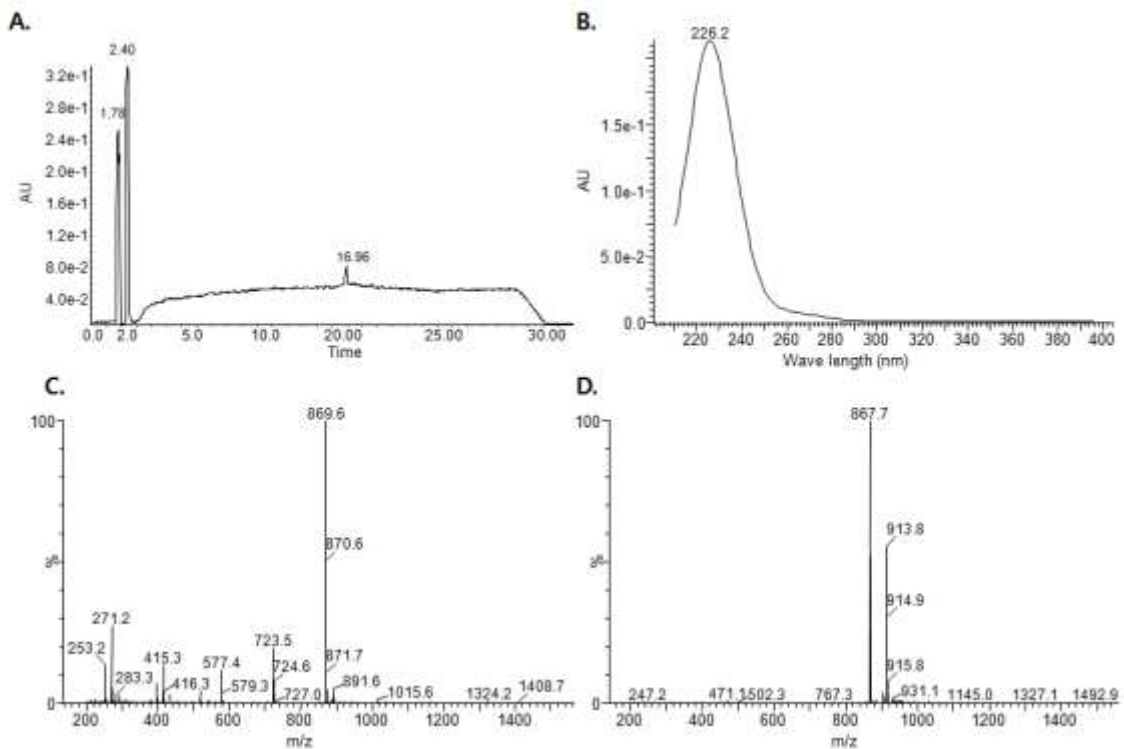


그림 17. 토복령 추출물의 유효성분의 LC-MS 분석 결과.

(DCM 분획의 고속액체크로마토그램 (A) 및 유효성분의 자외선 흡광파장 (B), 양이온 모드 분자량 (C), 음이온 모드 분자량 (D))

- 1D-NMR: 유효성분의 화학적 구조는 메탄올- d_4 용매조건에서 핵자기공명분광법(Nuclear magnetic resonance; NMR) 분석을 통하여 규명하였다. 1H -NMR 스펙트럼 (그림 18. A) 분석 결과, 0.79, 0.80, 0.81, 0.96, 0.97, 1.05, 1.24, 1.25, 1.26 ppm의 시그널을 통하여 구조 내에 C-메틸 그룹이 6개 존재하며, 5.32ppm에서 1개의 이중결합과 5.20, 4.84, 4.51ppm에서 3개의 아노머릭 시그널이라 예상되는 특이적인 시그널이 확인되었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼 (그림 18. B) 분석을 통하여, 총 52개의 탄소 시그널이 확인 되었고, 142.04와 122.78ppm 시그널을 통하여 1개의 이중결합이 존재하며, 100.60, 102.46 및 103.14ppm의 3개의 아노머릭 탄소 시그널을 통하여 3개의 당이 결합되어있는 것을 확인하였고,

110.72ppm 시그널을 통하여 1개의 에스터 결합이 존재하는 steroidal saponin 계열의 물질임을 유추할 수 있었다. 따라서, 유효성분의 분자량과 1D-NMR 결과를 바탕으로 문헌조사를 실시한 결과, 본 유효성분이 steroidal saponin 계열 물질 중 'dioscin'과 분자량 및 NMR 패턴이 유사함을 알 수 있었다 (그림 18. C, D).

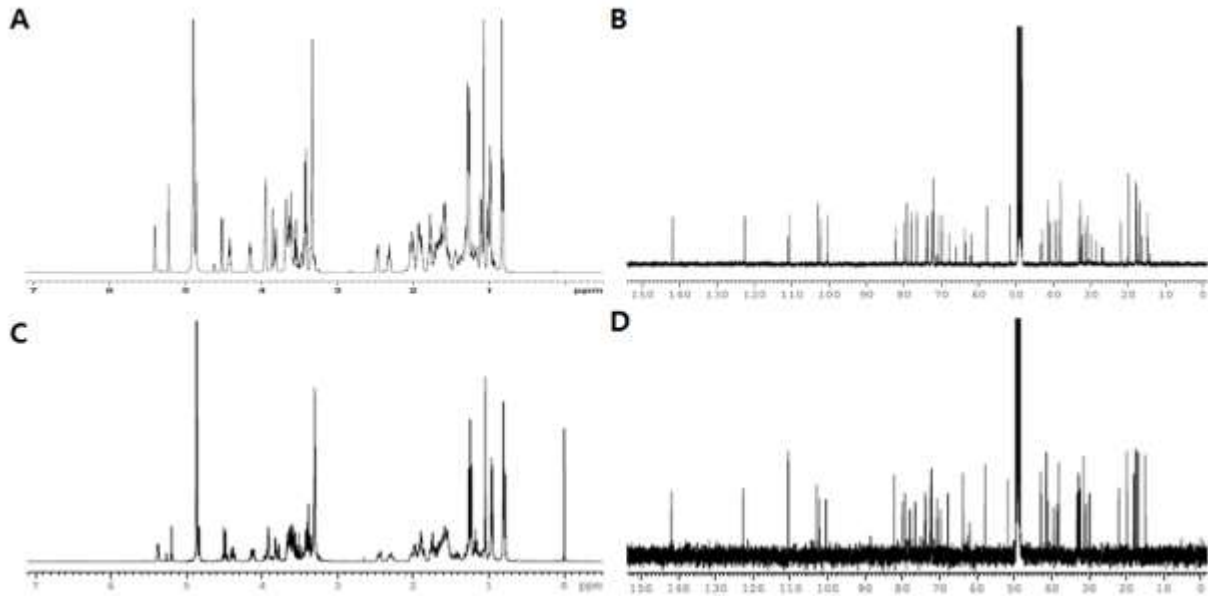


그림 18. 토복령 유효성분과 dioscin의 1D-NMR 스펙트럼.

(토복령 유효성분의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 (A), $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 (B) 및 dioscin의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 (C), $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 (D))

- 2D-NMR: 유효성분의 보다 정확한 구조를 규명을 위하여 2D-NMR (HSQC, COSY)을 시행하였다. HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy, 그림 19. A)로 탄소 시그널과 수소 시그널을 연결 하였다. 수소가 치환되지 않은 4급 탄소 4개의 시그널이 33.34, 41.57, 110.72, 142.04ppm에 나타나는 것을 확인하였고, 당 특이적 시그널인 4.51ppm과 100.60ppm 그리고 5.20ppm과 102.46ppm, 4.84ppm과 103.2ppm의 연결을 확인하였으며, 이중결합 시그널인 5.32ppm과 122.78ppm 결합을 확인하였다. 이를 바탕으로 HMBC(Heteronuclear multiple bond correlation)와 COSY(Correlation spectroscopy) 분석으로 4급 탄소와 당을 연결하였고, 인접한 수소들의 위치를 배열하였다. 동정된 구조를 참고문헌과 비교하여 본 유효성분은 dioscin임을 확인하였다(그림 20).

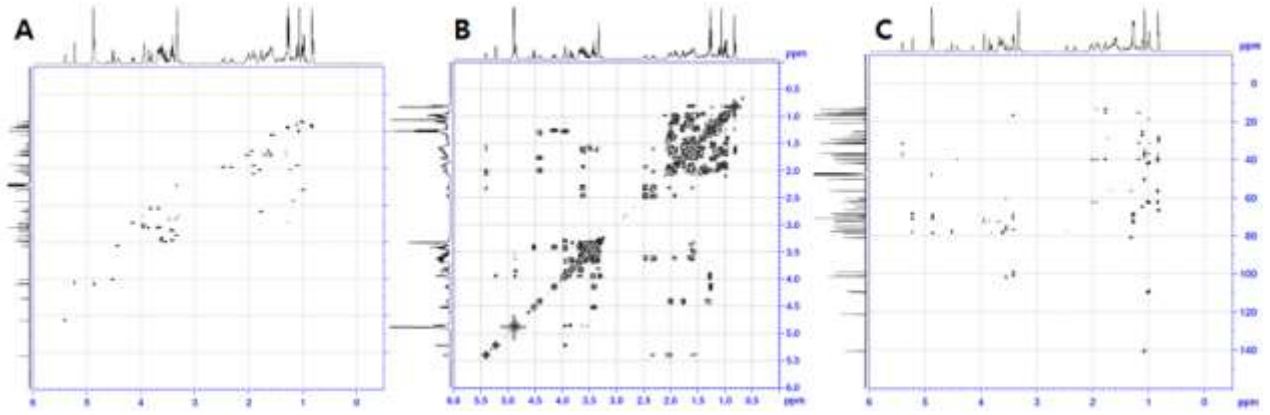


그림 19. 토복령 유효성분의 2D-NMR 스펙트럼 (HSQC(A), COSY(B), HMBC(C))

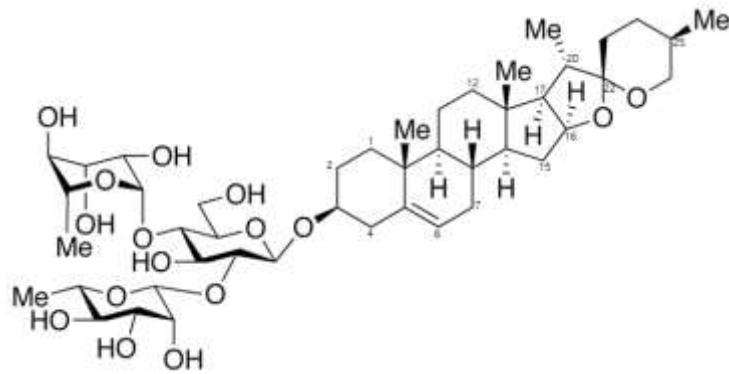


그림 20. 토복령 유효성분 구조 (dioscin)

2. 2차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) 나노소재 완성도 평가

가) 나노소재 미생물 오염여부 확인

협동기관으로부터 제공받은 나노소재의 미생물(일반세균, 효모, 곰팡이 등)에 대한 오염 여부를 확인하고자 오염도평가를 진행하였다. 나노소재를 멸균희석액에 희석하여 10% 및 1% 희석액으로 제조하였다. 농도별 시료는 미생물들의 각기 다른 생육특성을 고려하여 NA(nutrient agar), YMA(yeast mold agar), PDA(potato dextrose agar), TSA(tryptic soy agar) 4종 고체배지에 도달평판법(streak plate)으로 100 μ l 도달한 후, 30 $^{\circ}$ C incubator에 7일간 배양하며 오염균 성장여부를 관측하였다.

미생물의 성장이 관측되면 미생물의 특성을 확인하기 위하여 그람염색을 실시하고, 현미경으로 관측하였다. 미생물의 콜로니를 채취하여 슬라이드 글라스에 도말 및 고정시킨 다음, 염색액 2종(crystal violet, safranin)을 순차적으로 가하여 1분간 미생물을 염색하고, 멸균수로 세척하여 현미경 관측검체를 준비하였다. 현미경으로 검체에 염색된 색을 관측하여 미생물의 그람염색특성을 파악하였다.

나) 나노소재의 코어소재 포집률 확인

협동기관으로부터 제공받은 나노소재의 코어소재 포집률을 확인하기 위하여 1차년도에 코어소재 유효성분 규격화에 이용한 HPLC 유효성분 함량분석법을 적용하였다.

우선, 나노소재의 코어소재 포집률 분석 전 나노소재의 구성비율(나노소재에 구성된 피복소재 및 코어소재 비율)에 대한 정보는 협동기관으로부터 제공받았으며, 구성비율 정보를 바탕으로 나노소재에 포집된 코어소재의 양 및 유효성분의 양을 산술적으로 계산하였다.

그런 다음, 나노소재는 침전없이 완전히 녹일 수 있는 DMSO(dimethyl sulfoxide) 또는 Methanol에 용해하여 유효성분 함량분석을 진행하였으며, 예측된 유효성분 함량과 실제로 측정된 유효성분 함량의 차이를 통하여 나노소재 내 코어소재 포집률을 계산하였다.

$$\text{나노소재 내 코어소재 포집률 (\%)} = \frac{\text{실제 유효성분 함량}}{\text{예상 유효성분 함량}} \times 100$$

다) 나노소재 항균력 평가

협동기관으로부터 제공받은 나노소재의 항균력을 평가하기 위하여 1차년도에 코어소재 항균력 규격화에 이용한 항균력평가법인 CLSI(Clinical and Laboratory Standard Institute) guideline에 따라 액체배지 희석법(broth microdilution method)을 적용하였다.

우선, 나노소재는 침전없이 완전히 녹일 수 있는 용매인 DMSO 또는 Methanol에 용해한 시료 및 멸균수에 현탁된 시료 2종류를 이용하여 각 코어소재의 타깃 균에 대한 항균력 평가를 진행하였다. 대조군으로는 나노소재에 적용된 코어소재 및 항균제(Streptomycin)

n, Amphotericin B)를 사용하였다. 나노소재 용매 용해시료 및 나노소재 멸균수 현탁시료에 대한 항균력평가 결과비교를 통하여 나노소재의 항균력 개선여부를 판단하였다.

(2) 나노소재 제품 적용 가능성 평가

가) 나노소재 물 분산성 평가

식품 및 화장품은 제품성분의 30~90%가 물인 경우가 많다. 나노소재를 산업적으로 활용하기 위해서 수용액에서 분산력 유지여부를 확인하는 것이 매우 중요하다. 본 시험은 용액의 투과도분석법 적용하여 나노소재의 분산성을 평가하고자 하였으며, 그 값은 빛의 투과정도(%)로 나타내었다. 코어소재 및 나노소재는 물에 1%로 현탁하여 테스트하였다. 분석장비는 UV spectrophotometer의 transmittance모드를 사용하여 600nm에서 투과도를 0~180분간 정치시키면서 측정하였다. 비교대상은 나노소재에 포집된 코어소재로서, 서로의 물 분산성 비교를 통하여 코어소재 대비 나노소재의 분산성 개선정도를 확인하고자 하였다. 평가결과는 다음과 같이 해석하였다. 용액의 투과율이 증가할수록 물질의 분산정도는 떨어지고, 침전정도는 증가한다. 이와 반대로, 용액의 투과율이 감소할수록 물질의 분산정도는 유지되고, 침전정도는 감소한다.

나) 나노소재 열안정성 평가

식품 제조공정상 살균을 목적으로 특정온도 및 시간동안 열처리를 하는 공정이 있다. 유제품의 경우 '저온살균공법(65℃, 30분)', 곡물음료 및 맥주의 경우 '고온살균공법(85℃, 15분)', 멸균우유와 같은 특수음료의 경우 '초고온살균공법(120℃, 3초)'을 적용하고 있다. 나노소재를 산업적으로 활용하기 위해서 열처리에 안정적인지 여부를 확인하는 것이 매우 중요하다. 본 시험은 중성차와 유사한 환경인 0.1M phosphate buffer에 나노소재를 0.1% 적용하여 온도별 열처리공정(60~90℃)을 진행하고, 이 시료를 30℃에 4일간 보관하면서 지표성분의 함량분석 및 항균력 평가를 하였다.

(3) 나노소재 식품 보존 효능 평가

가) 소스류 보존 효능 평가

H사에서 제조된 무보존료 비프소스 베이스에 로즈마리소재(코어소재 및 나노소재)를 0.05~0.5% 처리한 다음, 소스류에서 변패를 유발하는 곰팡이 균주인 *Aspergillus niger*를 1×10^2 CFU/ml 접종한 후, 30℃에 보관하면서 균의 발생 및 균수를 측정하였다. 대조군으로는 무처리구 및 양성대조구인 주정 등을 사용하였다. 곰팡이 균수측정은 8% NaCl이 포함된 PDA를 10% 주석산(tartaric acid)으로 pH 3.5로 맞춘 배지를 균주 평판법(pout plate method)를 이용하여 한천배지에 고정시킨 후 30℃에 보관하여 균수를 측정하였다. 균 사멸율은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{균사멸율(\%)} = \frac{\text{무처리군 균수} - \text{처리군 균수}}{\text{무처리군 균수}} \times 100$$

나) 고추장 보존 효능 평가

M사에서 제조된 무보존료 고추장에 감초소재(코어소재 및 나노소재)를 0.025%~0.1% 처리한 다음, 고추장에서 변패를 유발하는 산막효모 균주인 *zygosaccharomyces rouxii*, 팽창효모균주인 *Pichia anomala*를 1×10^4 CFU/ml 접종한 후, 30°C에 보관하면서 균의 발생 및 균수를 측정하였다. 대조군으로는 무처리구 및 양성대조구인 주정 등을 사용하였다. 곰팡이 균수측정은 8% NaCl이 포함된 PDA를 10% 주석산(tartaric acid)으로 pH 3.5로 맞춘 배지를 균주 평판법(pout plate method)를 이용하여 한천배지에 고정시킨 후 30°C에 보관하여 균수를 측정하였다.

다) 간장 보존 효능 평가

M사에서 제조된 무보존료 간장에 로즈마리소재(코어소재 및 나노소재)를 0.025%~0.1% 처리한 다음, 간장에서 변패를 유발하는 산막효모 균주인 *zygosaccharomyces rouxii*를 1×10^4 CFU/ml 접종한 후, 30°C에 보관하면서 균의 발생 및 균수를 측정하였다. 대조군으로는 무처리구 및 양성대조구인 주정 등을 사용하였다. 곰팡이 균수측정은 8% NaCl이 포함된 PDA를 10% 주석산(tartaric acid)으로 pH 3.5로 맞춘 배지를 균주 평판법(pout plate method)를 이용하여 한천배지에 고정시킨 후 30°C에 보관하여 균수를 측정하였다.

라) 증성차 보존 효능 평가

W사에서 제조된 무보존료 증성차에 감초소재(코어소재 및 나노소재)를 0.004%~0.012% 처리한 다음, 증성차에서 변패를 유발하는 내열성세균인 *Bacillus cereus*를 1×10^2 CFU/ml 접종한 후, 30°C에 보관하면서 균의 발생 및 균수를 측정하였다. 대조군으로는 무처리구 및 (주)다인소재 제품인 복합허브추출물 G 등을 사용하였다. 세균 균수측정은 일반세균용 petrifilm (3M, United states)에 시료접종 후 30°C에 보관하여 균수를 측정하였다.

(4) 나노소재 화장품 보존 효능 평가

가) 화장품 방부효능 평가

섬기린초 코어소재 및 나노소재의 화장품 방부효능을 확인하기 위하여 화장품 방부력 테스트를 수행하였다. 유헤에멀전에 추출물을 농도별로 첨가하여 방부제 유효성 테스트를 수행하였다. 화장품의 방부력을 측정하는 방법으로 USP와 CTFA 방법이 많이 사용되고 있으며, 본 시험방법은 미국화장품공업협회(Cosmetic, Toiletry, and Franganc Association, CTFA)의 미생물 가이드라인의 시험법을 사용하였다. 테스트에 사용한 미생물 균주는 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027이다. 배양된 미생물을 혼합하여 1×10^6 CFU/ml이 되도록 접종한 다음, 추출물을 농도별로 각각 첨가한 후 1~28일까지 시간경과를 관찰하여 그래프화 하였다. CTFA기준에 따른 방부력 유효성으로 세균은 접종 7일 이내 99.9% 이상 균수가 감소해야하며, 시험기간 동안 증식이 없어야 한다.

나) 미백 효능 평가

섬기린초 코어소재 및 나노소재의 미백효능을 검증하기 위하여 Tyrosinase inhibitor screening kit(K575-100, Bio vision)를 활용하여 본 시험을 실시하였다. Melanin 합성 주요 단계에 관여하는 Tyrosinase 저해활성 측정은 효소 작용 결과 형성되는 DL- β -3,4-dihydroxyphenyl alanin(DOPA) chrome 을 비색법에 의해 측정하는 Masamoto *et al.* (2003)의 방법을 변형하여 측정하였다. 기질로서 5mM DL-DOPA 용액 0.2 ml, 0.1M 인산 완충용액(pH 6.8) 0.2 ml 및 시료용액 0.5 ml의 혼합액에 Mushroom tyrosinase 0.1 ml을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 475nm 파장에서 흡광도를 측정하고 아래 식에 따라 tyrosinase 저해활성을 산출하였다. 각 처리농도에서의 결과 수치로 50% 저해농도 (IC₅₀)를 계산하여 tyrosinase 저해활성 정도를 표현하였다.

(5) 나노소재 여성호르몬 유사효능 평가

가) 에스트로겐 수용체 결합활성 평가

1차년도에는 토복령의 유효성분으로 steroidal saponin 1종의 구조를 분광학적 분석법을 적용하여 동정한 바 있다. 본 유효성분은 항암, 항균, 골다공증 억제 등 다양한 활성을 나타낸다. 유효성분의 구조는 여성호르몬과 유사하기 때문에 식물성 에스트로겐으로서 활용될 수 있다. 그러므로 토복령 소재를 여성호르몬 보충목적소재로서 활용가능성을 확인하기 위하여 여성호르몬 유사효능검증을 실시하였다. 당해년도에는 토복령 나노소재의 미완성으로 인하여 토복령 코어소재의 여성호르몬 유사효능평가를 우선 진행하였다. 토복령 코어소재의 여성호르몬 유사효능을 검증하기 위한 첫번째 방법으로 human ER reporter assay kit(Cat. No. IB00401 & IB00411, Indigo bioscience, USA)를 사용한 cell-base reaction 시험을 수행하였다. 에스트로겐 수용체가 활성화된 reporter 세포와 시험물질을 각각 100 μ l씩 혼합하여 37°C, 24시간 배양하였다. 이후 상층을 제거하고 luciferase 검출시약 처리 후 700nm에서 발광량을 측정하였다.

나) 에스트로겐 수용체 발현세포 증식효능 평가

토복령 코어소재의 여성호르몬 유사효능을 검증하기 위한 두번째 방법으로 에스트로겐 수용체와 연관된 세포주를 활용한 E-screen assay를 수행하였다. 에스트로겐 수용체가 내재적으로 발현되어있는 MCF-7 세포주와 발현되지 않은 MDA-MB-231 세포주를 시험물질과 함께 37°C, 24시간 배양한다. 이후, MTT 염료를 활용하여 세포증식정도를 확인하였다. 활성 확인은 대조군의 세포생존율을 100%로 두고 시험물질의 증식정도를 확인한다.

(6) 나노소재 안전성 평가

제1협동기관(서울대)에서 제조한 Cycloamylose 기반 섬기린초 나노소재에 대한 안전성검증을 위하여 GLP 시험기관인 '바이오톡스텍'에 위탁하여 유전독성시험 3종을 진행하였다.

가) 복귀돌연변이시험

나노화 섬기린초 추출물에 대한 돌연변이 유발성 여부를 판단하기 위하여 히스티딘 요구성 균주인 살모넬라균 4종(*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537), 트립토판 요구성 균주인 대장균 1종(*Escherichia coli* WP2uvrA)을 이용하여 복귀돌연변이시험을 진행하였다. 세부적인 시험방법은 1차년도 나노소재 안전성평가중 복귀돌연변이시험법과 동일하다.

나) 체외염색체이상시험

나노화 섬기린초 추출물에 대한 염색체이상 유발여부를 판단하기 위하여 검출강도가 높은 Chinese hamster lung(CHL/IU) 세포주를 이용하여 염색체이상시험을 진행하였다. 세부적인 시험방법은 1차년도 나노소재 안전성평가중 체외염색체이상시험법과 동일하다.

다) 체내소핵시험

나노화 섬기린초 추출물에 대한 소핵유발여부를 판단하기 위하여 소핵유발에 감수성이 우수한 ICR 마우스를 이용하여 소핵시험을 진행하였다. 세부적인 시험방법은 1차년도 나노소재 안전성평가중 체내소핵시험법과 동일하다.

나. 연구 결과

(1) 나노소재 완성도 평가

가) 감초 나노소재 완성도평가

① 미생물 오염여부 확인

제2협동기관(명지대)로부터 제공받은 액상 감초 나노소재는 피복소재(Zein protein)와 감초 코어소재(40% glabridin)가 1:1로 구성되는 것이 특징이다. 제공받은 감초 나노소재의 미생물(일반세균, 효모, 곰팡이 등)에 대한 오염여부를 확인하고자 멸균희석액에 나노소재를 희석하여 원액 및 10배 희석액 시료를 준비하였다. 농도별 시료는 미생물들의 각기 다른 생육특성을 고려하여 NA(nutrient agar), YMA(yeast mold agar), PDA(potato dextrose agar), TSA(tryptic soy agar) 4종 고체배지에 100 μ l 접종한 후, 30 $^{\circ}$ C incubator에 7일간 배양하며 오염균 성장여부를 관측하였다.

표 20. 감초 나노소재의 오염여부 확인

시료	NA 배지	YMA 배지	PDA 배지	TSA 배지
나노소재 원액	미검출	미검출	미검출	미검출
나노소재 10배희석액	미검출	미검출	미검출	미검출
피복소재	검출	검출	검출	검출

감초 나노소재의 농도별, 배지 종류별 오염여부 확인결과 오염미생물 성장이 보이지 않

았으며, 피복소재의 경우 미생물이 성장하는 것을 확인하였다 (표 20). 이는, 나노소재가 고순도 코어소재를 포집하며, 항균력을 나타내기 때문인 것으로 사료된다.

② 코어소재 포집률 확인

제2협동기관(명지대)에서 제공한 감초 나노소재를 동결건조하여 분말화 하였으며, 건조 나노소재에 대한 glabridin 함량분석을 통하여 포집률을 분석하고자 하였다. 시료는 모두 Methanol에 완벽히 용해하여 분석을 진행하였다. 본 감초 나노소재는 피복소재(Zein protein)와 감초 코어소재(40% glabridin)가 1:1로 구성되어있으며, 이상적인 나노소재의 경우 H PLC 함량분석 시 20% glabridin이 검출될 것으로 예측하였다.

표 21. 감초 나노소재의 Glabridin 함량분석 결과

시료	분석농도	Glabridin 예측함량	Glabridin 실제함량	포집률
감초 코어소재	0.1%	40%	40.53%	-
감초 나노소재	0.1%	20%	18.87%	94.35%

함량분석의 정확성을 위하여 나노소재에 사용된 코어소재 또한 동시에 Glabridin 함량 분석을 진행하였다. 감초 코어소재의 경우, 표 21의 결과와 같이 예측함량과 큰 차이를 보이지 않았으며, 감초 나노소재의 경우, 예측함량 대비 1.2% 감소한 함량을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 감초 나노소재는 코어소재를 약 94.35% 포집함을 확인할 수 있다.

③ 항균력평가

감초 나노소재는 코어소재와 함께 *Bacillus cereus* ATCC 6633 균주에 대한 항균활성을 평가하였다. 용해용매는 methanol과 물 2종류로 나누어 진행하였다. methanol에 대한 MIC 비교는 각 소재에 대한 정확한 항균력을 확인하고자 함이며, 물에 대한 MIC 비교는 수용화도 개선에 따른 항균활성 개선정도를 확인하고자 하였다. 만약 나노화 이후 수용화도의 개선이 없다면 두 소재의 methanol 적용 시 항균력과 물 적용 시 항균력의 차이가 동일할 것이며, 개선이 있다면 항균력의 차이가 다를 것으로 예측하였다.

표 22. 감초 나노소재의 항균력 평가결과

시료	유효성분 함량	용해용매	MIC (ppm)
감초 코어소재	40.53%	methanol	3.91
		water	31.25
감초 나노소재	18.87%	methanol	9.76
		water	39.06
Streptomycin	-	water	0.5

코어소재와 나노소재의 유효성분 함량은 약 2.15배 차이난다. 그러므로 코어소재와 나노소재의 항균력의 차이는 약 2~3배 차이날 것으로 예상하였다. methanol 시료에 대한 항균

력의 경우, 코어소재가 3.91ppm이었기 때문에 나노소재는 7.82~11.73ppm 사이 값이 나타날 것으로 예상하였으며, water 시료에 대한 항균력의 경우, 코어소재가 31.25ppm이었기 때문에 나노소재는 62.5~93.75ppm 사이 값이 나타날 것으로 예상하였다.

실질적으로, 나노소재 methanol 용해시료의 MIC값은 9.76ppm이며, 예상범위내의 값을 나타내었다. 나노소재 water 용해시료의 경우, MIC값은 39.06ppm이며, 예상 값보다 1.6배 우수한 항균력을 나타내었다 (표 22). 이상의 결과를 바탕으로 감초 나노소재는 수용화도 개선에 따라 항균력이 약 1.6배 상승한 것으로 판단된다. 그러므로 상기 감초 나노소재를 식품적용효능시험용 시료로서 사용하고자 한다.

나) 로즈마리 나노소재 완성도평가

① 미생물 오염여부 확인

제 1협동기관(서울대)로부터 제공받은 분말상 로즈마리 나노소재는 피복소재(Cycloamylose)와 로즈마리 코어소재(50% Carnosic acid)로 구성되는 것이 특징이다. 제공받은 로즈마리 나노소재 4종의 미생물에 대한 오염여부를 확인하고자 멸균희석액에 나노소재를 희석하여 10% solution 및 1% solution을 준비하였다. 농도별 시료는 미생물들의 각기 다른 생육특성을 고려하여 NA(nutrient agar), YMA(yeast mold agar), PDA(potato dextrose agar), TSA(tryptic soy agar) 4종 고체배지에 100 μ l 접종한 후, 30 $^{\circ}$ C incubator에 7일간 배양하며 오염균 성장여부를 관측하였다.

표 23. 로즈마리 나노소재의 오염여부 확인

No	시료 (피복소재:코어소재)		NA 배지	YMA 배지	PDA 배지	TSA 배지
1	로즈마리나노소재1 (100:1)	10% soln.	미검출	미검출	미검출	검출
		1% soln.	검출	미검출	미검출	검출
2	로즈마리나노소재2 (5:1)	10% soln.	미검출	미검출	미검출	미검출
		1% soln.	미검출	미검출	미검출	미검출
3	로즈마리나노소재3 (2:1)	10% soln.	미검출	미검출	미검출	미검출
		1% soln.	미검출	미검출	미검출	미검출
4	로즈마리나노소재4 (1:1)	10% soln.	미검출	미검출	미검출	미검출
		1% soln.	미검출	미검출	미검출	미검출
5	피복소재		검출	검출	검출	검출

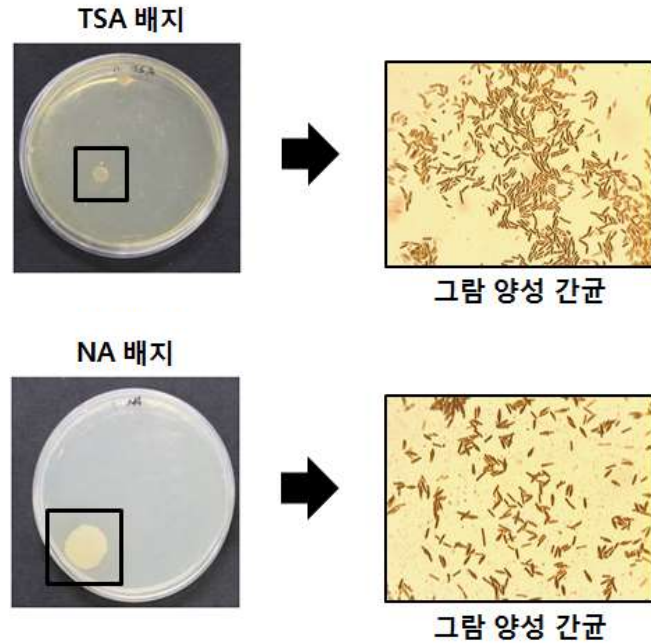


그림 21. 로즈마리 나노소재 1 (100:1) 오염균 확인

나노소재 1의 경우, NA 배지와 TSA 배지에서 오염미생물이 약 2.3~3.0 log CFU/g의 수준으로 검출되었다 (표 23 및 그림 21). 이는 나노소재에 포집된 코어소재의 양이 오염미생물을 제어할 정도의 효능을 나타내지 못하는 것으로 예측하였다. 나노소재 2, 3 및 4의 경우, 오염미생물 성장이 보이지 않는 것을 확인하였다. 이는, 나노소재에 포집된 코어소재가 제대로 항균력을 나타내는 것으로 사료된다.

② 코어소재 포집률 확인

제1협동기관(서울대)에서 제공한 로즈마리 나노소재 4종에 대한 carnosic acid 함량분석을 통하여 포집률을 분석하고자 하였다. 시료는 모두 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 완벽히 용해하여 분석을 진행하였다. 본 로즈마리 나노소재는 피복소재(Cycloamylose)와 로즈마리 코어소재(60% Carnosic acid)로 구성되어있다.

표 24. 로즈마리 나노소재의 Carnosic acid 함량분석 결과

시료 (피복소재:코어소재)	분석농도	CA 예측함량	CA 실제함량	포집률
로즈마리 코어소재	0.1%	60%	61.54%	-
로즈마리나노소재 1 (1:1)	0.1%	30%	29.88%	99.61%
로즈마리나노소재 2 (2:1)	0.1%	19.98%	19.96%	99.92%
로즈마리나노소재 3 (5:1)	0.1%	10%	9.07%	90.7%
로즈마리나노소재 4 (100:1)	0.1%	0.595%	0.578%	97.1%

함량분석의 정확성을 위하여 나노소재에 사용된 코어소재 또한 동시에 Carnosic acid

함량분석을 진행하였다. 로즈마리 코어소재의 경우, 예측함량과 큰 차이를 보이지 않았으며, 로즈마리 나노소재의 경우, 예측함량 대비 약 0.04~0.93% 감소한 함량을 확인할 수 있었다 (표 24). 이 결과를 바탕으로 로즈마리 나노소재는 코어소재를 약 90.7~99.9% 포집함을 확인할 수 있다.

③ 항균력평가

로즈마리 나노소재는 코어소재와 함께 *Bacillus cereus* ATCC 6633 균주에 대한 항균활성을 평가하였다. 용해 용매는 DMSO와 물 2종류로 나누어 진행하였다. DMSO에 대한 MIC 비교는 각 소재에 대한 정확한 항균력을 확인하고자 함이며, 물에 대한 MIC 비교는 수용화도 개선에 따른 항균활성 개선정도를 확인하고자 하였다. 만약 나노화 이후 수용화도의 개선이 없다면 두 소재의 methanol 적용 시 항균력과 물 적용 시 항균력의 차이가 동일할 것이며, 개선이 있다면 항균력의 차이가 다를 것으로 예측하였다.

표 25. 로즈마리 나노소재의 항균력 평가결과

시료 (피복소재:코어소재)	유효성분 함량	용해용매	MIC (ppm)
로즈마리 코어소재	61.54%	DMSO	6.25
		water	15.6
로즈마리나노소재 1 (1:1)	29.88%	DMSO	12.5
		water	31.2
로즈마리나노소재 2 (2:1)	19.96%	DMSO	25
		water	62.5
로즈마리 나노소재 3 (5:1)	9.070%	DMSO	50
		water	100
로즈마리나노소재 4 (100:1)	0.578%	DMSO	312
		water	>500
Streptomycin	-	water	0.5

코어소재와 나노소재의 유효성분 함량은 약 2~100배 차이난다. 그러므로 코어소재와 나노소재의 항균력의 차이는 약 2~100배 차이날 것으로 예상하였다. DMSO 시료에 대한 항균력의 경우, 코어소재가 6.25ppm이었기 때문에 나노소재 4종은 12.5~625ppm 사이 값이 나타날 것으로 예상하였으며, water 시료에 대한 항균력의 경우, 코어소재가 15.6ppm이었기 때문에 나노소재는 31.2~1560ppm 사이 값이 나타날 것으로 예상하였다.

실질적으로, 나노소재 4종 DMSO 용해시료의 MIC값은 각각 12.5ppm(나노소재1), 25ppm(나노소재2), 50ppm(나노소재3), 312ppm(나노소재4)이며, 예상범위내의 값을 나타내었다. 나노소재 water 용해시료의 경우, MIC값은 각각 31.2ppm(나노소재1), 62.5ppm(나노소재2), 100ppm(나노소재3), 500ppm 이상(나노소재4)이며, 나노소재 1~3은 예상범위내의 값을 나타내었고, 나노소재4는 항균력을 나타내지 않았다 (표 25). 이상의 결과를 바탕으로 나노소재 4를 제외한 나노소재 3종은 항균력의 개선은 없지만 예상범위내의 항균력을 나타내기 때문에 효능시험소재로서 활용이 가능할 것으로 판단된다. 그러므로 3개의 나노

소재 중 코어소재를 가장 많이 포집하고 있는 로즈마리 나노소재1를 식품적용효능시험의 시료로서 사용하였다.

다) 토복령 나노소재 완성도평가

① 미생물 오염여부 확인

2협동기관(명지대)로부터 제공받은 액상 토복령 나노소재는 피복소재(Zein + Carboxymethyl cellulose(CMC) = 5:1)와 토복령 코어소재(5% dioscin)가 96:4로 구성되는 것이 특징이다. 제공받은 토복령 나노소재의 미생물(일반세균, 효모, 곰팡이 등)에 대한 오염여부를 확인하고자 멸균희석액에 나노소재를 희석하여 원액 및 10배 희석액 시료를 준비하였다. 농도별 시료는 미생물들의 각기 다른 생육특성을 고려하여 NA(nutrient agar), YMA(yeast mold agar), PDA(potato dextrose agar), TSA(tryptic soy agar) 4종 고체배지에 100 μ l 접종한 후, 30 $^{\circ}$ C incubator에 7일간 배양하며 오염균 성장여부를 관측하였다.

표 26. 토복령 나노소재의 오염여부 확인

시료	NA 배지	YMA 배지	PDA 배지	TSA 배지
나노소재 원액	검출	미검출	미검출	미검출
나노소재 10배 희석액	검출	미검출	미검출	미검출
피복소재	검출	검출	검출	검출

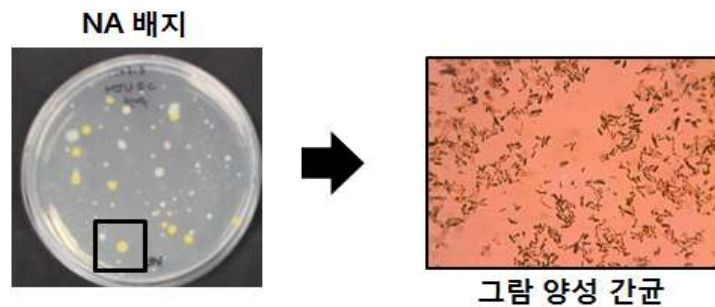


그림 22. 토복령 나노소재 오염균 확인

토복령 나노소재의 농도별, 배지 종류별 오염여부 확인결과 NA배지에서 오염미생물이 약 3.85~3.92 log CFU/g 수준으로 검출되었다 (표 26 및 그림 22). 이는 나노소재에 포집된 코어소재의 양이 오염미생물을 제어할 정도의 효능을 나타내지 못하는 것으로 예측하였다.

② 코어소재 포집률 확인

제2협동기관 (명지대)에서 제공한 토복령 나노소재를 동결건조하여 분말화 하였으며, 건조 나노소재에 대한 dioscin 함량분석을 통하여 포집률을 분석하고자 하였다. 시료는 모두 Methanol에 완벽히 용해하여 분석을 진행하였다. 본 토복령 나노소재는 피복소재 (Zein p rotein + Carboxymethyl cellulose(CMC) = 5:1)와 토복령 코어소재(5% dioscin)가 96:4로

구성되어있으며, 이상적인 나노소재의 경우 HPLC 함량분석 시 0.066% dioscin이 검출될 것으로 예측하였다.

표 27. 토복령 나노소재의 Dioscin 함량분석 결과

시료	분석농도	Dioscin 예측함량	Dioscin 실제함량	포집률
토복령 코어소재	0.1%	1.6%	1.66%	-
토복령 나노소재	0.1%	0.066%	0.063%	95.45%

함량분석의 정확성을 위하여 나노소재에 사용된 코어소재 또한 동시에 dioscin 함량분석을 진행하였다. 토복령 코어소재의 경우, 예측함량과 큰 차이를 보이지 않았으며, 토복령 나노소재의 경우, dioscin의 예측함량 대비 0.009% 감소한 함량을 확인할 수 있었다(표 27). 이 결과를 바탕으로 감초 나노소재는 코어소재를 약 95.45% 포집함을 확인할 수 있다.

③ 항균력평가

토복령 나노소재는 코어소재와 함께 *Candida albicans* ATCC 10231 균주에 대한 항균활성을 평가하였다. 용해 용매는 DMSO와 물 2종류로 나누어 진행하였다. DMSO에 대한 MIC 비교는 각 소재에 대한 정확한 항균력을 확인하고자 함이며, 물에 대한 MIC 비교는 수용화도 개선에 따른 항균활성 개선정도를 확인하고자 하였다. 만약 나노화 이후 수용화도의 개선이 없다면 두 소재의 DMSO 적용 시 항균력과 물 적용 시 항균력의 차이가 동일할 것이며, 개선이 있다면 항균력의 차이가 다를 것으로 예측하였다.

표 28. 토복령 나노소재의 항균력 평가결과

시료	유효성분 함량	용해용매	MIC (ppm)
토복령 코어소재	1.66%	DMSO	78
		water	156
토복령 나노소재	0.063%	DMSO	3,125
		water	>50,000
Amphotericin B	-	DMSO	1

코어소재와 나노소재의 유효성분 함량은 약 26배 차이난다. 그러므로 코어소재와 나노소재의 항균력의 차이는 약 25~30배 차이날 것으로 예상하였다. DMSO 시료에 대한 항균력의 경우, 코어소재가 78ppm이었기 때문에 나노소재는 1,950~2,340ppm 사이 값이 나타날 것으로 예상하였으며, water 시료에 대한 항균력의 경우, 코어소재가 156ppm이었기 때문에 나노소재는 3,900~4,680ppm 사이 값이 나타날 것으로 예상하였다.

실질적으로, 나노소재 DMSO 용해시료의 MIC값은 3,125ppm이며, 나노소재 water 용해시료의 MIC값은 50,000ppm 이상이었다. 두 시료 모두 예상범위 밖의 값을 나타냈다(표 28). 이상의 결과를 바탕으로 토복령 나노소재는 유효성분을 포집하고 있기는 하지만 수용액 상에서 항균력을 나타내지 않으며, 식품적용효능검증을 진행하기 어려울 것으로 판

단된다. 따라서, 토복령 나노소재 제조시 코어소재의 포집함량을 높일 필요가 있다고 판단된다.

라) 섬기린초 나노소재 완성도평가

① 미생물 오염여부 확인

제 1협동기관(서울대)로부터 제공받은 분말상 섬기린초 나노소재는 피복소재(Cycloamylose)와 섬기린초 코어소재(1% ST-7)가 1:1로 구성되는 것이 특징이다. 제공받은 섬기린초 나노소재의 미생물(일반세균, 효모, 곰팡이 등)에 대한 오염여부를 확인하고자 멸균희석액에 나노소재를 희석하여 10% solution 및 1% solution을 준비하였다. 농도별 시료는 미생물들의 각기 다른 생육특성을 고려하여 NA(nutrient agar), YMA(yeast mold agar), PDA (potato dextrose agar), TSA(tryptic soy agar) 4종 고체배지에 100 μ l 접종한 후, 30 $^{\circ}$ C incubator에 7일간 배양하며 오염균 성장여부를 관측하였다.

표 29. 섬기린초 나노소재의 오염여부 확인

시료	NA 배지	YMA 배지	PDA 배지	TSA 배지
나노소재 10% soln.	미검출	미검출	미검출	미검출
나노소재 1% soln.	미검출	미검출	미검출	미검출
피복소재	검출	검출	검출	검출

섬기린초 나노소재의 농도별, 배지 종류별 오염여부 확인결과 오염미생물 성장이 보이지 않았으며, 피복소재의 경우 미생물이 성장하는 것을 확인하였다 (표 29). 이는, 나노소재가 고순도 코어소재를 포집하며, 항균력을 나타내기 때문인 것으로 사료된다.

② 코어소재 포집율 확인

제1협동기관(서울대)에서 제공한 섬기린초 나노소재에 대한 ST-7 함량분석을 통하여 포집률을 분석하고자 하였다. 시료는 모두 DMSO에 완벽히 용해하여 분석을 진행하였다. 본 섬기린초 나노소재는 피복소재(Cycloamylose)와 섬기린초 코어소재(1% ST-7)가 1:1로 구성되어있으며, 이상적인 나노소재의 경우 HPLC 함량분석시 0.5% ST-7이 검출될 것으로 예측하였다.

표 30. 섬기린초 나노소재의 ST-7 함량분석 결과

시료	분석농도	ST-7 예측함량	ST-7 실제함량	포집률
섬기린초 코어소재	2%	4%	4.08%	-
섬기린초 나노소재	2%	2%	1.74%	85.29%

함량분석의 정확성을 위하여 나노소재에 사용된 코어소재 또한 동시에 ST-7 함량분석을 진행하였다. 섬기린초 코어소재의 경우, 예측함량과 큰 차이를 보이지 않았으며, 섬기린초 나노소재의 경우, 예측함량 대비 0.07% 감소한 함량을 확인할 수 있었다 (표 30). 이 결과를 바탕으로 섬기린초 나노소재는 코어소재를 약 85.29% 포집함을 확인할 수 있다.

③ 항균력평가

섬기린초 나노소재는 코어소재와 함께 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 균주에 대한 항균활성을 평가하였다. 용해용매는 50% DMSO와 물 2종류로 나누어 진행하였다. 50% DMSO에 대한 MIC 비교는 각 소재에 대한 정확한 항균력을 확인하고자 함이며, 물에 대한 MIC 비교는 수용화도 개선에 따른 항균활성 개선정도를 확인하고자 하였다. 만약 나노화 이후 수용화도의 개선이 없다면 두 소재의 50% DMSO 적용 시 항균력과 물 적용 시 항균력의 차이가 동일할 것이며, 개선이 있다면 항균력의 차이가 다를 것으로 예측하였다.

표 31. 섬기린초 나노소재의 항균력 평가결과

시료	유효성분 함량	용해용매	MIC (ppm)
섬기린초 코어소재	4.08%	50% DMSO	500
		water	500
섬기린초 나노소재	1.74%	50% DMSO	1,000
		water	1,000
Streptomycin	-	water	1

코어소재와 나노소재의 유효성분 함량은 약 2배 차이난다. 그러므로 코어소재와 나노소재의 항균력의 차이는 약 2~3배 차이날 것으로 예상하였다. 50% DMSO 시료에 대한 항균력의 경우, 코어소재가 5000ppm이었기 때문에 나노소재는 10,000~15,000ppm 사이 값이 나타날 것으로 예상하였으며, water 시료에 대한 항균력의 경우, 코어소재가 5,000ppm이었기 때문에 나노소재는 10,000~15,000ppm 사이 값이 나타날 것으로 예상하였다.

실질적으로, 나노소재 50% DMSO 용해시료의 MIC값은 10,000ppm이며, 나노소재 water 용해시료의 MIC값도 10,000ppm이었다 (표 31). 이상의 결과를 바탕으로 섬기린초 나노소재는 항균력의 개선은 없지만 예상범위내의 항균력을 나타내기 때문에 효능시험소재로서 활용이 가능할 것으로 판단된다. 그러므로 화장품적용 효능시험의 시료로서 사용하였다.

마) 종합결과

아래의 각각의 나노소재에 대한 완성도평가 결과를 종합하면 아래 표와 같으며, 이를 기반으로 식품 및 화장품 적용 효능평가를 진행하고자 한다.

표 32. 나노소재별 완성도평가 결과

항목	감초	로즈마리	토복령	섬기린초
코어소재	40% Glabridin	60% Carnosicacid	1.6% Dioscin	4% ST-7
피복소재	Zein	Cycloamylose	Zein + CMC (5 : 1)	Cycloamylose
구성비 (피복 : 코어)	1 : 1	1 : 1	96 : 4	1 : 1
코어소재 포집률	94.35%	99.61%	95.45%	95.29%
항균력	39.06ppm	31.2ppm	>50000	1,000ppm
시험 진행여부	가능	가능	불가능	가능
적용시험 분야	식품	식품	-	화장품

(2) 나노소재 제품 적용 가능성 평가

가). 나노소재 물 분산성 평가

① 감초 나노소재

감초 코어소재의 경우 빛 투과정도가 0.4%에서 47.2%까지 증가하는 것을 확인하였다. 반면에, 감초 코어소재가 포집된 감초 나노소재의 경우 빛 투과정도가 0.01%에서 18.6%까지 증가하는 것을 확인하였다(그림 23). 두 소재의 투과도 분석결과, 나노소재의 빛 투과도가 코어소재보다 2.5배 감소하였으며, 이 결과로 감초 나노소재는 코어소재보다 물 분산력 및 침전정도가 개선됨을 확인하였다.

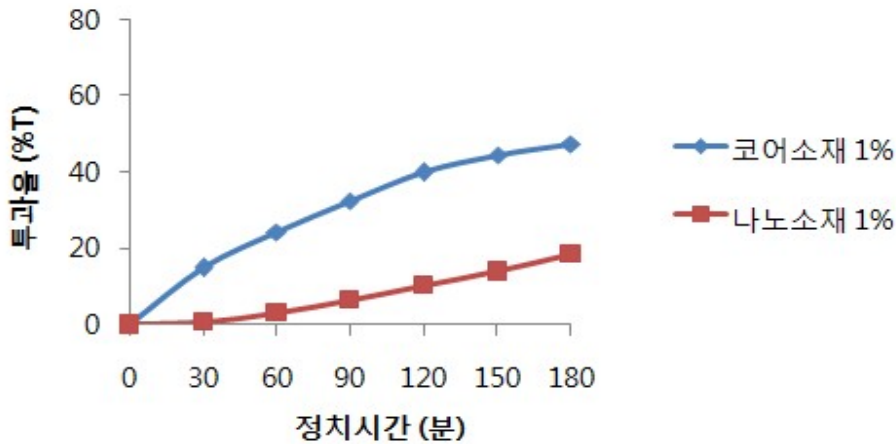


그림 23. 감초 코어소재 및 나노소재 투과도 분석결과

② 로즈마리 나노소재

로즈마리 코어소재의 경우 빛 투과정도가 0.01%에서 40.84% 까지 증가하는 것을 확인하였다. 반면에, 로즈마리 코어소재가 포집된 로즈마리 나노소재의 경우 빛 투과정도가 0.01%에서 29.18%까지 증가하는 것을 확인하였다(그림 24). 두 소재의 투과도 분석결과, 나노소재의 빛 투과도가 코어소재보다 1.4배 감소하였으며, 로즈마리 나노소재는 로즈마리

코어소재보다 물 분산력 및 침전정도가 개선됨을 확인하였다.

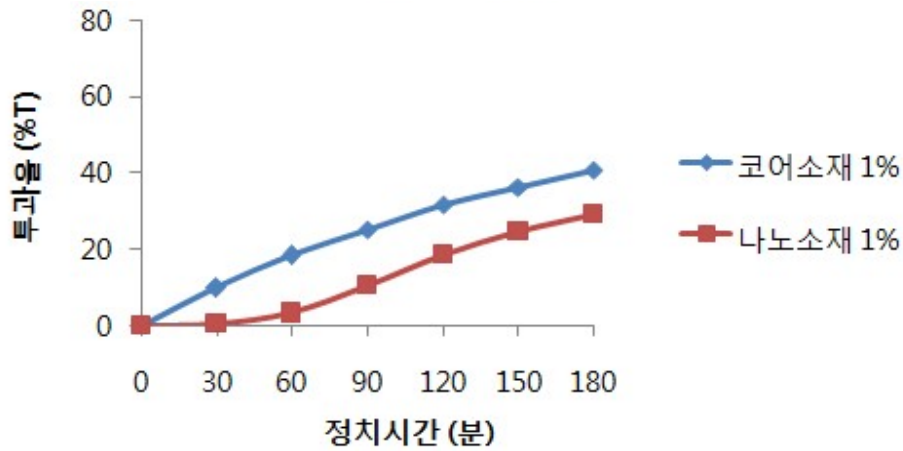


그림 24. 로즈마리 코어소재 및 나노소재 투과도 분석결과

③ 섬기린초 나노소재

섬기린초 코어소재의 경우 빛 투과정도가 0.01%에서 40.19% 까지 증가하는 것을 확인하였다. 반면에, 감초 코어소재가 포집된 감초 나노소재의 경우 빛 투과정도가 0.01%에서 18.01%까지 증가하는 것을 확인하였다(그림 25). 두 소재의 투과도 분석결과, 나노소재의 빛 투과도가 코어소재보다 2.2배 감소하였으며, 섬기린초 나노소재는 섬기린초 코어소재보다 물 분산력 및 침전정도가 개선됨을 확인하였다.

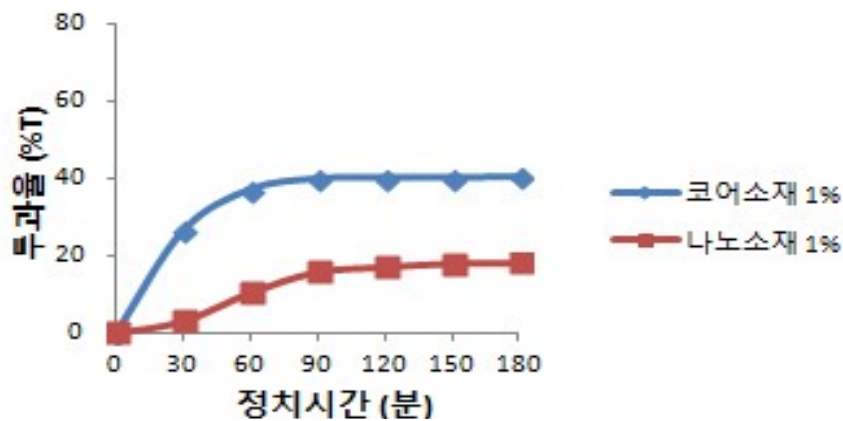


그림 25. 섬기린초 코어소재 및 나노소재 투과도 분석결과

나) 나노소재 열안정성 평가

① 감초 나노소재

감초 추출물에 존재하는 glabridin은 안정적이다. 하지만, Ao *et al.*, (2010)의 연구결과에 따르면, glabridin과 같은 폴리페놀계열 물질도 온도, pH, 산화제 등에 의해 안정성에 영향을 받을 수 있다고 한다. 식품제조공정에 적용되는 열처리가 일반적인 온도에서 진행되

는 과정이 아닌 만큼 열안정성 확인이 꼭 이루어져야 하기 때문에 본 실험을 진행하였다.

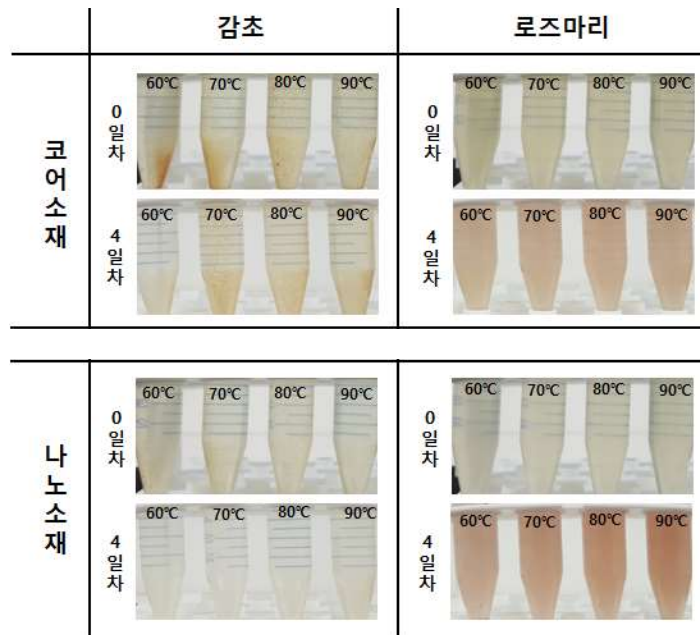


그림 26. 감초소재 및 로즈마리 소재의 열처리공정별 시료상태

감초 코어소재의 열처리 이후 시료상태(그림 26)를 보면 기벽에 달라붙으면서 vortex 및 sonication을 하여도 잘 분리되지 않는 것을 확인하였다. 반면에, 감초 나노소재의 경우 상대적으로 기벽에 붙는 현상이 개선된 것을 알 수 있다. 그리고, 감초 코어소재 및 나노소재의 열처리공정 온도별 Glabridin 함량을 비교하였을 때, 코어소재의 경우 Glabridin이 91.3~93.8% 존재하였으며, 나노소재의 경우 Glabridin이 93.8~97.2% 존재함을 확인하였다(그림 27). Glabridin의 함량이 감소한 정도에 비하여 항균력의 경우 열처리온도와 상관없이 일정하게 MIC값이 나타나는 것을 확인하였다(코어소재: 62.5ppm, 나노소재: 50ppm). 이 결과를 통하여, 나노화된 감초 코어소재가 일반 코어소재 대비 열안정성이 우수하며, 식품적용시험 진행시 장류보존효능시험 및 열처리 공정이 포함된 음료보존효능시험에 적용하는 것이 적절할 것으로 판단된다.

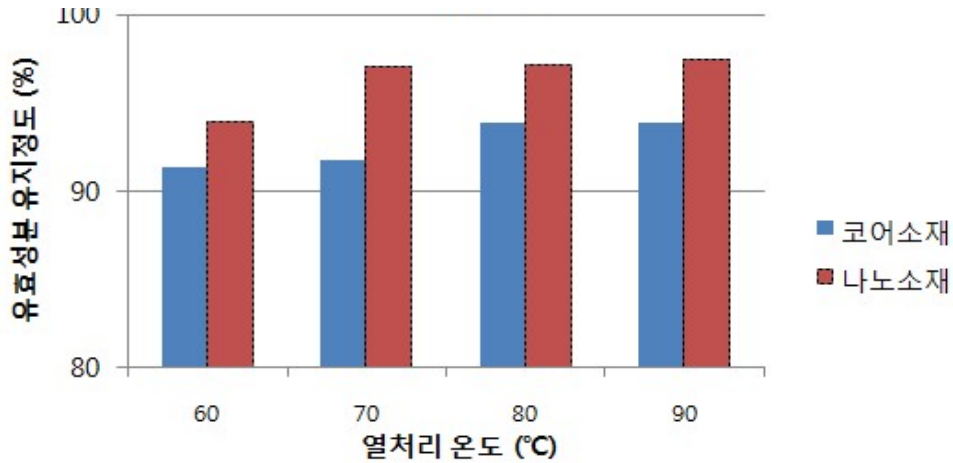


그림 27. 감초 코어소재 및 나노소재 열처리에 따른 Glabridin 유지정도

② 로즈마리 나노소재

로즈마리 추출물은 다양한 diterpenoid 성분을 함유하고 있으며, 항암활성, 항염증활성, 항산화활성 등 다양한 활성을 타나낸다. 이러한 유효성분들은 Zhang *et al.*, (2012)의 연구 결과에 따르면, 극성용매, 빛, 열에 의해 분해되는 것을 알 수 있다. 특히, 로즈마리 코어소재의 표준물질인 Carnosic acid 또한 40°C에서 12일간 보관 시 매일 10%씩 분해되어 최대 90%까지 분해되어 사라지는 것을 확인할 수 있다. 이러한 불안정성을 지닌 로즈마리 코어소재가 나노화로 인해 열안정성이 개선되는지 여부를 확인하고자 실험을 진행하였다.

로즈마리 코어소재 및 나노소재의 열처리공정 온도별 Carnosic acid 함량을 비교하였을 때, 코어소재의 경우 Carnosic acid가 초기 유효성분 함량대비 65.2~74.0% 존재하였으며, 나노소재의 경우 Carnosic acid가 초기 유효성분 함량대비 85.5~96.5% 존재함을 확인하였다(그림 28). 하지만 Figure 1-4의 열처리 이후 4일차의 시료상태를 보면 용액의 색이 붉게 변하였다. 또한, Carnosic acid의 함량이 감소한 정도에 비하여 항균력의 경우 일정한 MIC값이 나타나는 것을 확인하였다 (코어소재: 25ppm, 나노소재: 50ppm, 표 33). 이 결과를 통하여, 나노화된 감초 코어소재가 일반 코어소재 대비 열안정성이 우수하기는 하지만, 제품변색이 우려되어 열처리 공정이 없는 소스류 및 장류보존효능시험에 적용하는 것이 관찰을 것으로 사료된다.

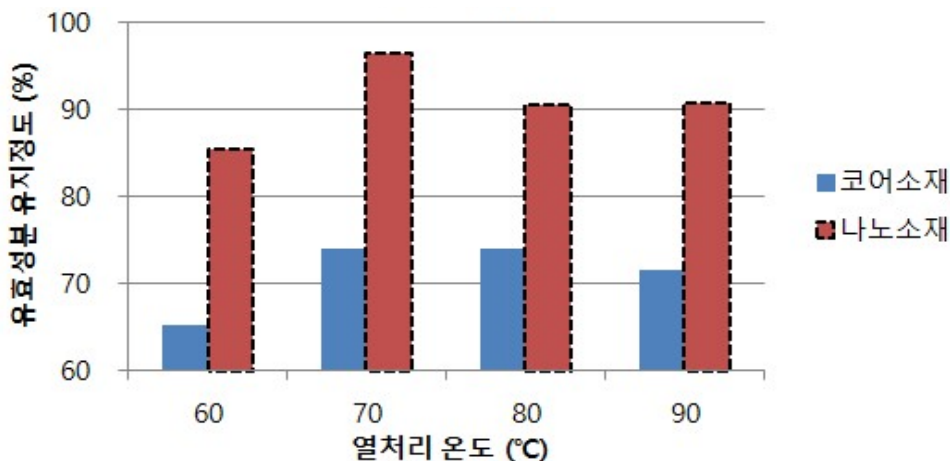


그림 28. 로즈마리 코어소재 및 나노소재 열처리에 따른 Carnosic acid 유지정도

표 33. 감초소재 및 로즈마리소재의 열처리에 따른 항균력 평가결과 (*B. cereus*)

시료	감초 (ppm)		로즈마리 (ppm)	
	코어소재	나노소재	코어소재	나노소재
무처리	50	31.2	12.5	25
60°C	62.5	50	25	50
70°C	62.5	50	25	50
80°C	62.5	50	25	50
90°C	62.5	50	25	50

(3) 나노소재 식품 보존 효능 평가

가) 소스류 보존 효능 평가

H사에서 보존료를 처리하지 않은 비프소스 베이스를 제공받아 소스류 보존효과를 확인하였다. 매 주차마다 pour plate test를 통하여 균수를 확인한 결과 4로그를 접종한 곰팡이가 무처리 및 피복소재에서는 3.2로그로 유지되는 반면, 로즈마리 코어소재 및 나노소재 실험구의 경우 4주차까지 지속적으로 균이 감소하는 것을 확인하였다. 소재별 그리고 농도별 보존효능을 비교한 결과, 농도의존적인 보존 효능을 확인할 수 있으며, 나노소재 0.5% 및 코어소재 0.25%를 처리하였을 때 가장 우수한 곰팡이 제어능을 나타내었다(그림 29).

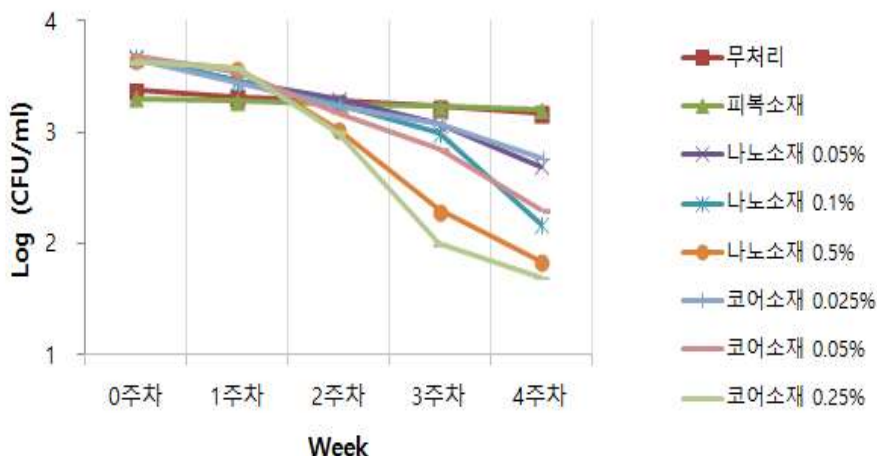


그림 29. 로즈마리 코어소재 및 나노소재의 비프소스 베이스 보존 효과

나) 고추장 보존 효능 평가

M사에서 보존료를 처리하지 않은 고추장을 제공받아 보존효과를 확인하였다. 보존효능 4주차 확인결과, 무처리 및 피복소재는 제품팽창이 육안으로 관찰되었으며, 양성대조구 및 실험구(감초 코어소재 및 감초 나노소재)는 제품팽창 없이 보존효능을 나타냈다(그림 30).

매 주차마다 pour plate test를 통하여 균수를 확인한 결과 주정을 제외한 전체 시험군이 4로그를 접종한 효모가 전체적으로 2주차에 5로그까지 증가하였으나, 감초 코어소재 및 나노소재 실험구의 경우 3~4주차에 다시 3로그까지 균이 감소하는 것을 확인하였다. 소재 별 그리고 농도별 보존효능을 비교한 결과, 농도의존적인 제어능을 확인할 수 있으며, 나노소재가 상대적으로 코어소재보다 0.5로그정도 나은 제어능을 나타내었다(그림 31).

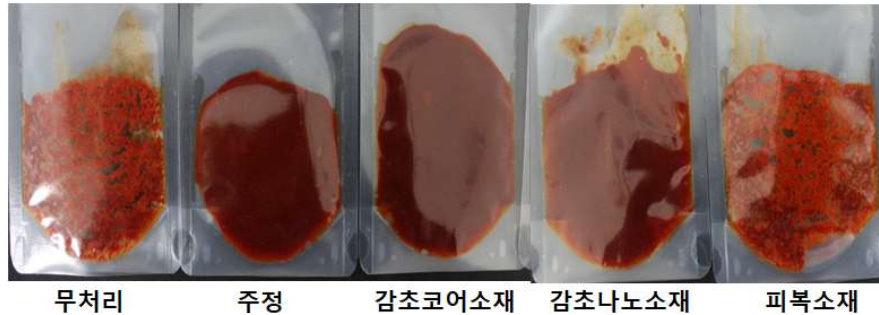


그림 30. 감초 코어소재 및 나노소재의 고추장 보존효능시험 결과 (4주차)

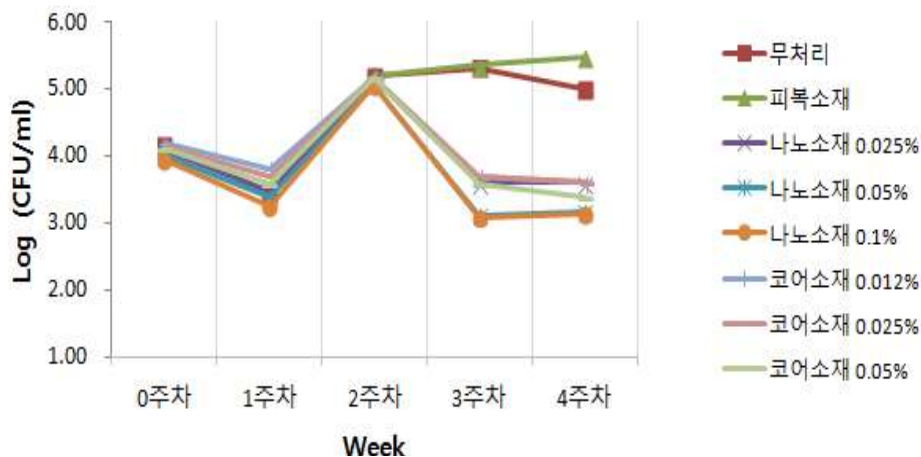


그림 31. 감초 코어소재 및 나노소재의 고추장 보존 효과

다) 간장 보존 효능 평가

M사에서 제조한 보존료를 처리하지 않은 간장을 제공받아 로즈마리소재에 대한 간장 보존효과를 확인하였다. 그 결과, 무처리군 및 피복소재군은 산막형성이 육안으로 관찰되었으며, 양성대조구 및 실험구(로즈마리 코어소재 및 로즈마리 나노소재)는 산막형성 없이 보존효능을 나타냈다(그림 32). 매 주차마다 pour plate test(8% NaCl 첨가 PDA배지 사용)를 통하여 균수를 확인한 결과 무처리 및 피복소재의 경우 균수가 증가하는 경향을, 나머지 시험군은 균수가 감소하는 경향을 확인하였다. 농도별 보존효능을 비교한 결과, 농도의존적인 제어능을 확인하였다(나노소재 500ppm과 코어소재 250ppm: 1로그 감소, 나노소재 1000ppm과 코어소재 500ppm: 2~3로그 감소, 나노소재 2000ppm과 코어소재 1000ppm: 2~3로그 감소). 소재별 보존효능을 비교한 결과, 나노소재가 상대적으로 코어소재보다 0.7로그정도 나은 제어능을 나타내었다(그림 33).

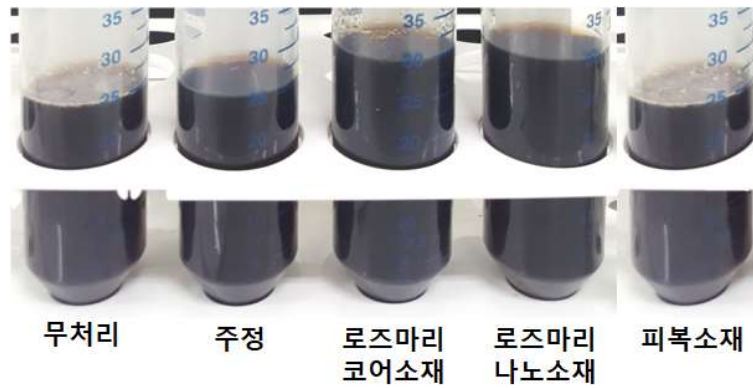


그림 32. 로즈마리 코어소재 및 나노소재의 간장 보존효능시험 결과 (4주차)

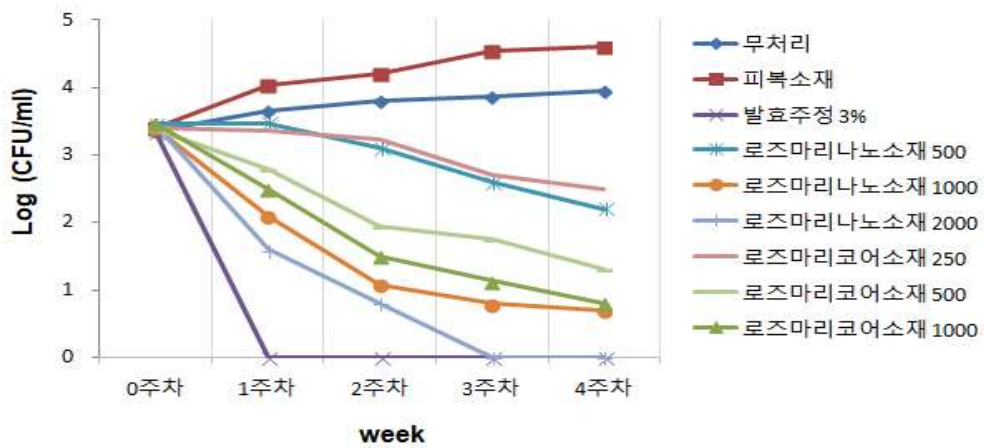


그림 33. 로즈마리 코어소재 및 나노소재의 간장 보존 효과

라) 중성차 보존 효능 평가

W사에서 제조한 보존료가 없는 중성차를 구매하여 감초소재에 대한 중성차 보존 효과를 확인한 결과, 저장 9일차부터 무처리구 및 피복소재군은 음료가 뿌옇게 변하는 것이 육안으로 관찰되었으며, 실제로 균수를 확인한 결과 2로그를 접종했던 세균이 5로그까지 증식한 것을 확인할 수 있었다. 양성대조구 및 실험군(감초 코어소재 및 나노소재)의 경우, 처음 접종하였던 2로그를 꾸준히 유지하는 것을 확인하였다. 이는, 실험군이 농도의존적인 보존효능을 보이지는 않았지만 내열성세균에 대해 증식하지 못하도록 정균작용을 하는 것을 알 수 있다(그림 34).

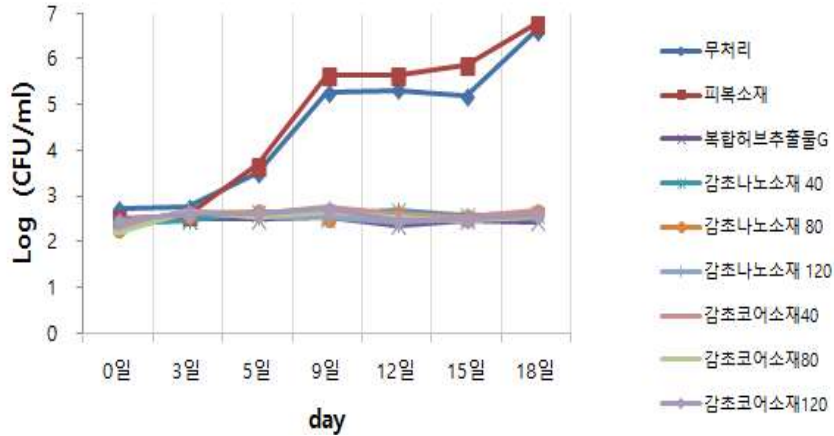


그림 34. 감초 코어소재 및 나노소재의 증식차 보존 효과

(4) 나노소재 화장품 보존 효능 평가

가) 화장품 방부효능 평가

섬기린초 나노소재는 40% 1,3-부틸렌글라이콜과 혼합하여 0.5~5% 농도로 시료를 제조하였으며, 섬기린초 코어소재는 나노소재의 절반인 0.25~2.5% 농도로 시료를 제조하였다. 피복소재인 Cycloamylose의 경우 40% 1,3-부틸렌글라이콜과 혼합하여 0.5~2.5% 농도로 시료를 제조하였다. 화장품 에멀전에 준비된 시료 1%와 균을 혼합하여 화장품 방부력을 평가하였다. Figure 1-15에 나타난 바와 같이 0.0025% 섬기린초 코어소재 및 0.005% 섬기린초 나노소재는 초기에 세균을 제어하는 듯 보였지만, 3일 이후 증식하는 양상을 보였다. 하지만, 0.01~0.05% 섬기린초 나노소재와 0.005~0.025% 섬기린초 코어소재가 1주차에 99.9% 세균을 사멸시키는 우수한 방부력을 나타내었다. 하지만, 동량의 코어소재가 포함된 실험구인 0.005% 코어 실험구와 0.01% 나노 실험구를 비교하였을 때, 나노화 소재의 방부력이 약간 저하하였으므로, 나노화에 따른 방부력 상승은 나타나지 않는 것으로 판단된다 (그림 35).

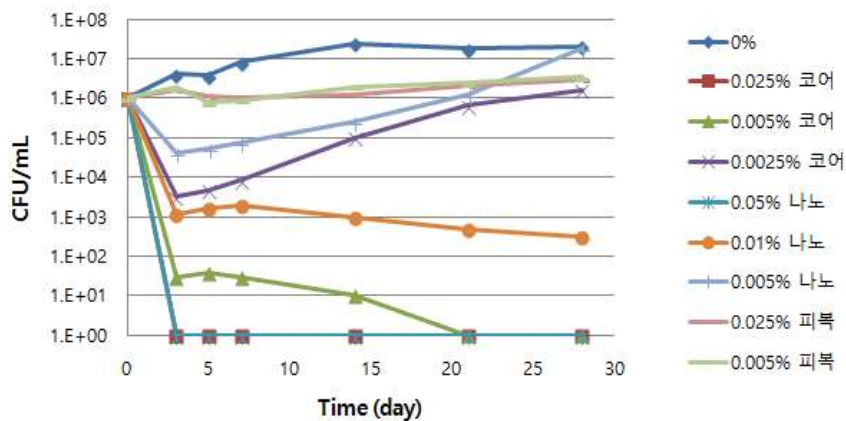


그림 35. 섬기린초 코어소재 및 나노소재의 화장품 보존 효과

나) 미백 효능 평가

L-tyrosinase를 기질로 한 mushroom tyrosinase 효소활성 저해효과를 측정한 결과, 섬기린초 코어소재 및 나노소재는 양성대조군(Kojic acid)과 비교하였을 때 상대적으로 저농도에서 우수한 미백활성을 나타내었다. 양성대조군과 섬기린초 소재를 비교하였을 때, 0.5~10ppm 농도범위에서 농도의존적인 저해활성을 나타내는 경향성은 비슷하였으나, kojic acid보다 섬기린초 소재가 약 2.5배 강력한 저해활성을 나타내었다. 섬기린초 코어소재와 나노소재를 비교하였을대, 섬기린초 나노소재는 코어소재보다 약 1.2배 우수한 타이로시나제 효소활성 저해효과를 나타냈다 (그림 36).

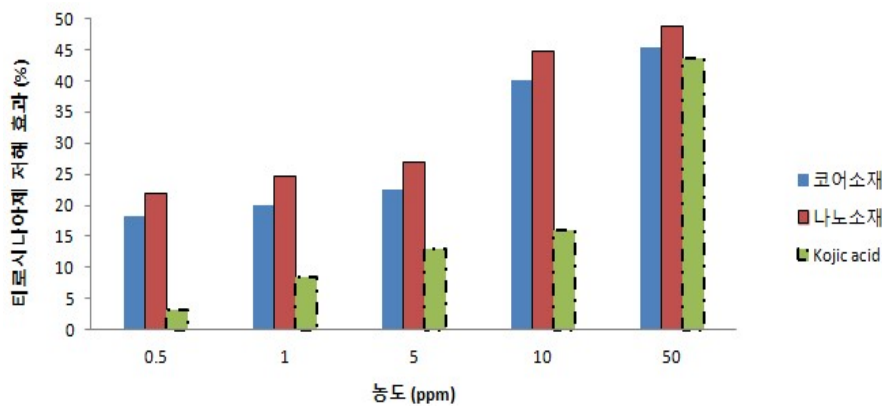


그림 36. 섬기린초 코어소재 및 나노소재의 타이로시나제 저해 효과

다) 섬기린초 소재 화장품 적용 효능평가 종합결과

섬기린초 소재 화장품적용 효능평가(방부효능, 미백효능) 결과를 종합하면, 섬기린초 소재는 모두 화장품에 대한 우수한 방부력을 나타냈으며, 나노소재가 코어소재에 비해 상대적으로 우수한 미백효능을 보여주었다. 그러므로, 섬기린초 나노소재는 화장품분야에서 활용이 가능할 것으로 사료된다.

(5) 나노소재 여성호르몬 유사효능 평가

가) 에스트로겐 수용체 결합활성 평가

17 β -estradiol을 양성대조군(relative potency = 100%)으로 두고 토복령 코어소재의 여성호르몬 유사활성을 비교하였다. cell-base reaction 측면에서 검토한 결과, Estrogen receptor- α 의 경우 코어소재 농도 1~100 μ g/ml까지 농도의존적인 결합활성 증가를 보였으며, 100 μ g/ml 에서 63.36%로 우수한 결합활성을 나타내었다. Estrogen receptor- β 의 경우 코어소재 농도 1~100 μ g/ml까지 농도의존적인 결합활성 증가를 보였으며, 100 μ g/ml 에서 48.81%로 우수한 결합활성을 나타내었다 (그림 37). 위의 결과를 바탕으로 토복령 소재의

에스트로겐 수용체 결합활성을 나타내며, 실질적으로 동물세포에서 작용하는지 여부는 세포증식효능시험을 통하여 검증하고자 한다.

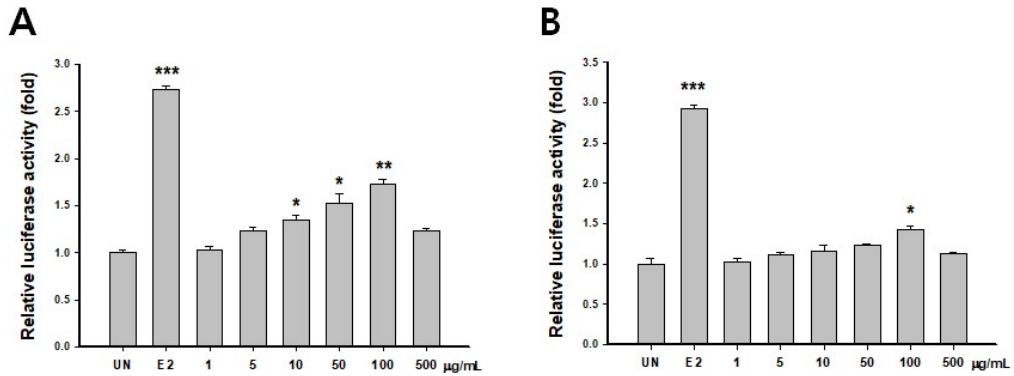


그림 37. 토복령 코어소재의 에스트로겐 수용체 결합활성 (A, ER- α ; B, ER- β)

나) 에스트로겐 수용체 발현세포 증식효능 평가

에스트로겐 수용체가 내재적으로 발현된 MCF-7 세포의 경우, 에스트로겐 10 ng/ml을 처리하였을 때 40% 세포증식을 확인하였으며, 토복령 코어소재를 1~500 μg/ml의 농도로 처리하였을 때, 1~100 μg/ml에서 농도의존적인 세포증식을 나타내었으며, 100 μg/ml 농도에서 21% 세포증식을 확인하였다. 에스트로겐 수용체가 발현되지 않은 MDA-MB-231 세포의 경우, 에스트로겐 10 ng/ml을 처리하였을 때 5% 세포증식을 확인하였으며, 토복령 코어소재를 1~500 μg/ml의 농도로 처리하였을 때 유의적인 세포증식은 나타내지 않았다(그림 38). 위의 결과를 통하여, 토복령 소재가 실질적으로 동물세포 내에서 에스트로겐 수용체와 결합을 통하여 여성호르몬 유사활성을 나타냄을 알 수 있으며, 피토에스트로겐 소재로서 개발가능성이 있음을 검증하였다.

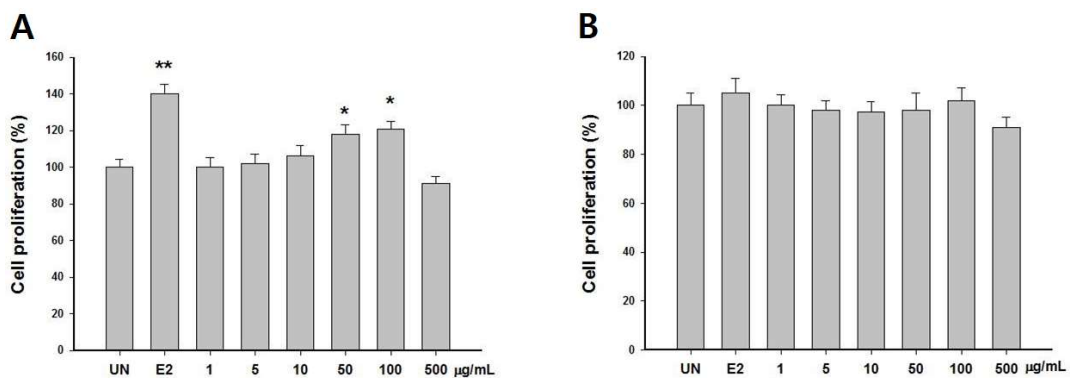


그림 38. 토복령 코어소재의 세포증식활성 (A, MCF-7 증식; B, MDA-MB-231 증식)

(6) 나노소재 안전성 평가

가) 복귀돌연변이시험

제1협동기관(서울대)에서 제조한 Cycloamylose를 이용한 섬기린초 나노소재에 대한 미생물의 돌연변이 유발성 여부를 판단하기 위하여 복귀돌연변이시험을 진행하였다. 용량설정시험 결과, 대사활성계 미적용군 (-S9)에서 *S. typhimurium* TA98, TA1537, *E. coli* WP2uvrA 균주의 1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 이상의 농도에서 생육저해가 관찰되었으며, *S. typhimurium* TA100, TA1535 균주의 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 생육저해가 관찰되었다. 대사활성계 적용군 (+S9)에서는 각 균주의 모든 용량에서 생육저해가 관찰되지 않았다. 용량설정시험 결과를 토대로 본시험의 최고농도는 생육저해관측농도를 포함한 공비 2의 5단계 시험군을 구성하여 본시험을 실시하였다. 본 시험결과, 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 모든 조건에서 각각의 균주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다(표 34 및 35). 한편 모든 양성대조군에서의 콜로니수는 음성대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었으므로 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다. 따라서 섬기린초 나노소재는 본 시험 조건하에 사용한 균주들에 대해 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로부터 음성으로 판단하였다.

나) 체외염색체이상시험

제1협동기관(서울대)에서 제조한 Cycloamylose를 이용한 섬기린초 나노소재에 대한 염색체의 구조적 이상 유발 여부를 판단하기 위하여 염색체이상시험을 진행하였다. 용량설정시험 결과, 단시간처리법의 대사활성계 미적용군에서 103.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 단시간처리법의 대사활성계 적용군에서 365.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 연속처리법의 대사활성계 미적용군에서 87.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 세포증식을 50%이상 억제하였다. 용량설정시험 결과를 토대로 본시험의 최고농도는 50% 증식저해관측농도를 포함한 공비 2의 4단계 시험군을 구성하여 본시험을 실시하였다. 본 시험결과, 단시간처리법 및 연속처리법의 대사활성계 미적용군에서 염색체 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (표 36). 따라서 섬기린초 나노소재는 본 시험 조건하에 사용한 세포에 대해 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로부터 음성으로 판단하였다.

다) 체내소핵시험

제1협동기관(서울대)에서 제조한 Cycloamylose를 이용한 섬기린초 나노소재에 대한 골수 및 말초혈액 세포의 염색체 손상 또는 세포분열 이상 유발 여부를 판단하기 위하여 소핵시험을 진행하였다. 용량설정시험 결과, 2000 mg/kg을 최고용량으로 시험하였을 때 암수 모두 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 용량설정시험 결과를 토대로 본시험의 최고농도를 포함한 공비 2의 2단계 시험군을 구성하여 본시험을 실시하였다. 본 시험결과, 시험물질 처리군의 다염성적혈구(PCE, Polychromatic erythrocyte) 중 소핵다염성적혈구(MNPCE, micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 또한, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 관찰되지 않았다(표 37). 한편 모든 양성대조군에서의 콜로니수는 음성대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었으므로 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다. 따라서 섬기린초 나노소재는 본 시험 조건하에 사용한 마우스 골수세포의 소핵유발성은 없는 것으로부터 음성으로 판단하였다.

표 34. 미생물에 대한 섬기린초 나노소재의 복귀돌연변이시험 결과 (대사활성계 미적용군)

Strain	Test substance	Dose (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	18 , 18 , 20	19	1
		39.1	18 , 17 , 20	18	2
	Nano_herb_ST	78.1	19 , 21 , 21	20	1
		156	22 , 20 , 18	20	2
		313	19 , 22 , 18	20	2
		625	17 , 20 , 18	18	2
		1,250	23* , 20* , 22*	22	2
		2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	576 , 563 , 571	570
TA100	Water for injection	0	81 , 84 , 81	82	2
		156	88 , 89 , 100	92	7
	Nano_herb_ST	313	104 , 100 , 93	99	6
		625	90 , 101 , 94	95	6
		1,250	105 , 105 , 104	105	1
		2,500	88* , 81* , 109*	93	15
		5,000	28* , 42* , 52*	41	12
		Sodium azide (SA)	1.5	710 , 708 , 698	705
TA1535	Water for injection	0	13 , 14 , 13	13	1
		156	15 , 13 , 15	14	1
	Nano_herb_ST	313	13 , 14 , 12	13	1
		625	14 , 16 , 13	14	2
		1,250	13 , 12 , 15	13	2
		2,500	15 , 13 , 17	15	2
		5,000	3* , 5* , 1*	3	2
		Sodium azide (SA)	1.5	482 , 495 , 489	489
TA1537	Water for injection	0	11 , 10 , 11	11	1
		39.1	11 , 10 , 11	11	1
	Nano_herb_ST	78.1	9 , 10 , 12	10	2
		156	15 , 17 , 16	16	1
		313	16 , 13 , 16	15	2
		625	18 , 14 , 16	16	2
		1,250	21* , 16* , 20*	19	3
		9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	485 , 475 , 490	483
WP2uvrA (pKM101)	Water for injection	0	90 , 106 , 96	97	8
		39.1	94 , 97 , 96	96	2
	Nano_herb_ST	78.1	107 , 106 , 110	108	2
		156	114 , 113 , 115	114	1
		313	120 , 116 , 126	121	5
		625	139 , 147 , 154	147	8
		1,250	157* , 174* , 171*	167	9
		4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	0.1	648 , 632 , 615	632

*: Indicated growth inhibition

표 35. 미생물에 대한 섬기린초 나노소재의 복귀돌연변이시험 결과 (대사활성계 적용군)

Strain	Test substance	Dose (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	33 , 30 , 32	32	2
		313	29 , 33 , 30	31	2
	Nano_herb_ST	625	32 , 36 , 32	33	2
		1,250	31 , 34 , 30	32	2
		2,500†	35 , 35 , 33	34	1
		5,000†	36 , 35 , 32	34	2
		2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	311 , 308 , 305	308
TA100	Water for injection	0	87 , 95 , 91	91	4
		313	93 , 92 , 101	95	5
	Nano_herb_ST	625	102 , 108 , 90	100	9
		1,250	75 , 86 , 71	77	8
		2,500†	73 , 72 , 68	71	3
		5,000†	80 , 78 , 80	79	1
		2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	539 , 552 , 535	542
TA1535	Water for injection	0	12 , 10 , 13	12	2
		313	10 , 9 , 8	9	1
	Nano_herb_ST	625	13 , 12 , 10	12	2
		1,250	14 , 10 , 10	11	2
		2,500†	14 , 11 , 15	13	2
		5,000†	14 , 15 , 13	14	1
		2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	134 , 135 , 132	134
TA1537	Water for injection	0	18 , 18 , 18	18	0
		313	18 , 21 , 19	19	2
	Nano_herb_ST	625	22 , 19 , 21	21	2
		1,250	19 , 22 , 21	21	2
		2,500†	21 , 20 , 22	21	1
		5,000†	19 , 23 , 21	21	2
		2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	193 , 197 , 189	193
WP2uvrA (pKM101)	Water for injection	0	163 , 151 , 152	155	7
		313	154 , 149 , 148	150	3
	Nano_herb_ST	625	141 , 145 , 148	145	4
		1,250	153 , 155 , 145	151	5
		2,500†	168 , 161 , 166	165	4
		5,000†	163 , 160 , 165	163	3
		2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	455 , 459 , 457	457

†: Precipitation

표 36. CHL/IU 세포에 대한 섬기린초 나노소재의 염색체이상시험 결과

Test substance	Dose (µg/mL)	RPD (%)	59 mix	Trt-Rec time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations								Number of cells with numerical aberrations			Others ^{a)}			
						ctb	csb	cte	cse	frg	gap		total (%)		end	pol		total (%)		
											ctg	csg	gap-	gap+						
Water for injection	0	100	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1 (0.5)	0		
Nano_herb_ST	12.5	101	-	6-18	not observed															
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25.0	92.4	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50.0	96.5	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	74.2	-	6-18	100	2	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4 (2.0)	0
					100	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4 (2.0)	0	
MMC	0.1	57.0	-	6-18	100	1	0	15	0	0	0	0	0	0	2	2	2 (1.0)	0		
					100	4	0	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.0)	0	
Water for injection	0	100	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nano_herb_ST	45.0	97.3	+	6-18	not observed															
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	90.0	94.5	+	6-18	100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	180	81.8	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3 (1.5)	0	
					100	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (1.5)	0	
	360	48.1	+	6-18	100	4	0	5	0	0	0	0	0	0	2	2	5 (2.5)	0		
					100	2	0	4	0	0	0	0	0	0	1	1	5 (2.5)	0		
B[a]P	20	45.6	+	6-18	100	4	0	18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					100	7	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Water for injection	0	100	-	24-0	100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	0		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0	
Nano_herb_ST	11.3	101	-	24-0	not observed															
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)
	22.5	98.7	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	45.0	94.3	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	90.0	61.3	-	24-0	100	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2	4 (2.0)	0		
					100	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	2	4 (2.0)	0	
MMC	0.1	57.2	-	24-0	100	6	0	24	0	0	0	0	0	0	2	2	3 (1.5)	0		
					100	9	0	25	0	0	0	0	0	0	1	1	3 (1.5)	0		

Aberration; ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, frg: fragmentation, end: endoreduplication, pol: polyploidy

MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene

RPD: Relative Population Doubling, Trt-Rec time: Treatment-Recovery time

gap-: Total number of cells with structural aberrations excluding gap, gap+: Total number of cells with structural aberrations including gap

a): Others were excluded from the number of cells with chromosomal aberrations.

Significant difference from negative control by Fisher's exact test: ** p<0.01

Significant difference from negative control by Cochran-Armitage trend test: ** p<0.01

표 37. ICR 마우스에 대한 섬기린초 나노소재의 소핵시험 결과

Group	Dose (mg/kg)	Route	Hours after dosing	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE
Negative control	0	P.O.	24	1101	164 / 500	3 / 2000
				1102	130 / 500	2 / 2000
				1103	174 / 500	1 / 2000
				1104	161 / 500	1 / 2000
				1105	131 / 500	1 / 2000
				Total	760 / 2500	8 / 10000
				%(Mean±S.D.)	30.4 ± 4.04	0.080 ± 0.045
	500	P.O.	24	1201	138 / 500	3 / 2000
				1202	139 / 500	1 / 2000
				1203	137 / 500	0 / 2000
				1204	166 / 500	1 / 2000
				1205	174 / 500	1 / 2000
				Total	754 / 2500	6 / 10000
				%(Mean±S.D.)	30.2 ± 3.55	0.060 ± 0.055
Test substance	1,000	P.O.	24	1301	154 / 500	3 / 2000
				1302	161 / 500	1 / 2000
				1303	152 / 500	0 / 2000
				1304	115 / 500	1 / 2000
				1305	129 / 500	1 / 2000
				Total	711 / 2500	6 / 10000
				%(Mean±S.D.)	28.4 ± 3.88	0.060 ± 0.055
	2,000	P.O.	24	1401	126 / 500	2 / 2000
				1402	132 / 500	1 / 2000
				1403	163 / 500	1 / 2000
				1404	139 / 500	1 / 2000
				1405	114 / 500	2 / 2000
				Total	674 / 2500	7 / 10000
				%(Mean±S.D.)	27.0 ± 3.65	0.070 ± 0.027
Positive control	2	IP.	24	1501	169 / 500	182 / 2000
				1502	169 / 500	141 / 2000
				1503	164 / 500	185 / 2000
				1504	183 / 500	148 / 2000
				1505	144 / 500	120 / 2000
				Total	829 / 2500	776† / 10000
				%(Mean±S.D.)	33.2 ± 2.82	7.760 ± 1.392

P.O.: Per Os.

IP.: Intrapitoneal

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

S.D.: Standard Deviation

MMC: Mitomycin C

Significant difference from negative control by Kastenbaum & Bowman: † p<0.01

3. 3차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) 나노소재 pilot scale 생산공정 세팅

가) 로즈마리 나노소재 생산공정 확립

1차년도 주관기관 연구결과로 셋팅된 로즈마리 코어소재 lab scale 생산공정을 바탕으로 원물 100kg 단위 생산을 진행하였다. 로즈마리 건조원물은 유효성분인 Carnosic acid 함량이 3.6%로 표준화된 중국산 로즈마리 건조원물을 사용하였으며, 생산 scale 이 커짐에 따라 추출 효율, 여과공정, 회수율 등에서 발생할 수 있는 문제점을 개선하면서 고순도 코어소재 생산공정을 최적화 하였다.

2차년도 제1협동기관 연구결과로 셋팅된 로즈마리 나노소재 lab scale 생산공정을 바탕으로 코어소재 10kg단위 생산을 진행하였다. 로즈마리 코어소재는 유효성분인 Carnosic acid 함량이 표준화된 추출물을 사용하였으며, 나노소재 생산 scale을 고려하여 2개의 건조방법을 비교검토 후 최종 생산공정을 확립하였다. 로즈마리 나노소재 시생산 시료로 항균력 공인인증을 실시하였다.

나) 썬기린초 나노소재 생산공정 확립

1차년도 주관기관 연구결과로 셋팅된 썬기린초 코어소재 lab scale 생산공정을 바탕으로 원물 100kg 단위 생산을 진행하였다. 로즈마리 건조원물은 유효성분인 ST-7(1,2,4,6-tetragalloyl- β -D-glucose) 함량이 표준화된 썬기린초 건조원물을 사용하였으며, 생산 scale 이 커짐에 따라 추출 효율, 여과공정, 회수율 등에서 발생할 수 있는 문제점을 개선하면서 고순도 코어소재 생산공정을 최적화 하였다.

2차년도 제2협동기관 연구결과로 셋팅된 썬기린초 나노소재 lab scale 생산공정을 바탕으로 코어소재 10kg단위 생산을 진행하였다. 썬기린초 코어소재는 유효성분인 ST-7 함량이 표준화된 추출물을 사용하였으며, 나노소재 생산 scale을 고려하여 2개의 건조방법을 비교검토 후 최종 생산공정을 확립하였다. 썬기린초 나노소재 시생산 시료로 항균력 공인인증을 실시하였다.

(2) 제품 규격안 세팅

본 과제를 통하여 개발된 제품화 나노소재 2종(로즈마리 나노소재, 썬기린초 나노소재)에 대한 품질이 보증된 제품을 생산·공급하기 위하여 제품 규격안을 세팅하였다. 품질규격 항목은 크게 성상, 이물, 유효성분 함량, 항균활성 4가지로 나눌 수 있으며, 이에 대한 기준을 설정하였다.

(3) 식품적용 나노소재 유통기한 설정

본 과제를 통하여 개발된 제품화 나노소재 2종(로즈마리 나노소재, 섬기린초 나노소재) 중 식품산업에 적용할 로즈마리 나노소재의 경우 품목유형이 식품(기타가공품)으로서 반드시 유통기한 설정이 필요하다. 하지만, 화장품 산업에 적용할 섬기린초 나노소재는 화장품 원료로서 유통기한 설정이 필요하지만 명확한 법적 가이드라인이 없으며, 적용된 화장품 자체에 대한 안정성 및 유통기한을 상대적으로 중요하게 보기 때문에 우선순위에 있는 로즈마리 나노소재 부터 유통기한 설정실험을 진행하였다.

로즈마리 나노소재에 대한 유통기한을 설정하기 위하여 시제품을 10℃, 25℃, 35℃ 항온항습기(암소)에 약 3개월간 제품을 저장시키면서 실험주기는 저장기간 중 6회 이상이 되도록 1-2주 간격으로 실험을 수행하였다. 평가지표는 크게 성상(이미, 이취), 이화학(케이킹, 이물), 미생물(대장균군) 3부분으로 나눌 수 있으며, 모두 식품공전 제10장 9. 일반시험법을 참고하여 실험을 수행하였다.

각 평가지표 별 품질한계는 다음과 같다. 성상(이물, 이취)의 경우 9점척 도법을 적용하여 5점 이상을 적합인 것으로 선정하였다. 이화학(케이킹)의 경우 멍침이 없이 분말화가 된 것을 적합인 것으로 선정하였다. 미생물(대장균군)의 경우 식품공전 미생물시험 결과 음성을 적합인 것으로 선정하였다.

(4) 로즈마리 나노소재 안전성 평가

시생산된 로즈마리 나노소재에 대한 안전성검증을 위하여 GLP 시험기관인 '바이오톡스텍'에 위탁하여 유전독성시험 3종을 진행하였다.

가) 복귀돌연변이시험

나노화 로즈마리 추출물에 대한 돌연변이 유발성 여부를 판단하기 위하여 히스티딘 요구성 균주인 살모넬라균 4종(*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537), 트립토판 요구성 균주인 대장균 1종(*Escherichia coli* WP2uvrA)을 이용하여 복귀돌연변이시험을 진행하였다. 세부적인 시험방법은 1차년도 나노소재 안전성평가중 복귀돌연변이시험법과 동일하다.

나) 체외염색체이상시험

나노화 로즈마리 추출물에 대한 염색체이상 유발여부를 판단하기 위하여 검출강도가 높은 Chinese hamster lung(CHL/IU) 세포주를 이용하여 염색체이상시험을 진행하였다. 세부적인 시험방법은 1차년도 나노소재 안전성평가중 체외염색체이상시험법과 동일하다.

다) 체내소핵시험

나노화 로즈마리 추출물에 대한 소핵유발여부를 판단하기 위하여 소핵유발에 감수성이 우수한 ICR 마우스를 이용하여 소핵시험을 진행하였다. 세부적인 시험방법은 1차년도 나노소재 안전성평가중 체내소핵시험법과 동일하다.

(5) 섬기린초 나노소재 안전성 평가

섬기린초 나노소재를 화장품 소재로 활용하기 위하여 안전성을 확보하여야 한다.

첫째, 화장품의 오염물질은 잔류농약, 중금속 등이 있으며 이는 원물에서 기인하는 경우가 대다수이다. 이런 미량물질이 인체에 축적되면서 큰 문제를 일으키기 때문에 원물에 대한 오염물질 평가를 우선 진행하였다. 오염물질 평가는 한국인터텍테스팅(주)에 의뢰하여 식약처에서 고시한 시험법 및 한국인터텍테스팅의 표준작업지침서에 따라 수행되었다.

둘째, 화장품은 주로 피부에 적용하기 때문에 피부자극이 기본적으로 고려되어야 한다. 국내에서 요구하고 있는 화장품 안전성 시험항목으로는 단회투여독성 시험, 피부자극 시험, 점막자극 시험 등이 있다. 따라서 섬기린초 나노소재를 화장품에 직접 적용하여 일차자극 테스트 및 누적자극 테스트를 진행하였다. 피부자극테스트는 (주)더마프로에 의뢰하여 미국 화장품협회(PCPC, Oersonal Care Products Council)에서 제시하고 있는 guideline 중에서 단회 첩포시험 방법 및 더마프로 피부과학 연구소의 표준작업지침서에 따라 수행되었다.

가) 원물 잔류농약 및 중금속 분석

섬기린초 건조원물의 잔류농약 분석은 「농산물 품질관리법 시행규칙」 VI. 유해물질 분석법에 따라 잔류농약 102종에 대한 GC-MS/MS 및 LC-MS/MS를 이용한 다성분 동시분석법을 실시하였다. 본 시험은 해당 법령 고시사항을 그대로 수행하였기 때문에 세부 시험법은 따로 작성하지 않았다.

섬기린초 건조원물의 중금속 분석은 「기능성화장품 기준 및 시험방법」 VI. 일반시험법에 따라 중금속 5종에 대한 유도결합플라즈마-질량분석법을 실시하였다. 본 시험은 해당 법령 고시사항을 그대로 수행하였기 때문에 세부 시험법은 따로 작성하지 않았다.

나) 나노소재 피부자극시험

- 의뢰 샘플 : 2종 (섬기린초 코어소재 60% Glycerine 0.3% 솔루션, 섬기린초 나노소재 60% Glycerine 0.3% 솔루션)

- 시험 대상자 : 피험자 선정기준 및 제외기준에 준하는 여성피험자 30명 ~ 50명 (각각의 지원자들은 세부적인 사항에 따른다는 서면 동의서에 서명을 하였으며, 숫자로 된 고유 번호 부여)

- 시험재료: 1) Finn Chambers[®], 2) Micropore tape, 3) Microman(M250), 4) Skin Marker

- 시험방법 1 (일차자극시험): 1) 시험부위는 70% 에탄올로 세척한 뒤 건조시켰다. 2) 시험물질은 의뢰사에서 제공한 상태 그대로 적용하였다. 3) 시험 물질 16 μ L를 Finn Chamvers[®]에 적하시킨 후 시험부위인 등 부위에 얹고, micro-pore tape으로 고정하였다. 4) 첩포는 48 시간 동안하며, 첩포를 제거한 후에는 skin marker로 시험 부위를 표시하고 30 분, 24 시간 후에 각 시험 부위를 관찰하였다.

- 시험방법 2 (누적자극시험): 1) 시험부위는 70% 에탄올로 세척한 뒤 건조시켰다. 2) 시험물질은 의뢰사에서 제공한 상태 그대로 적용하였다. 3) 시험 물질 16 μ L를 Finn Chamvers[®]에 적하시킨 후 시험부위인 등 부위에 얹고, micro-pore tape으로 고정하였다. 4) 첩포는 3주 동안 9회 24시간 동안하며, 1차 첩포시험 종료 후 2주간 휴지기를 갖는다. 5) 휴지기 이후 48시간 동안 2차 첩포시험을 진행한다. 6)시험이후에는 skin marker로 시험 부위를 표

시하고 각 시험 부위를 관찰하였다.

- 판정기준: 피부 반응은 Frosh & Kligman(Frosch PJ, 1979)법을 반영한 기준에 따라 평가
- 결과계산: 48 시간 및 72 시간의 평균 반응도를 아래의 식을 적용하여 계산하였으며, 각 물질에 대한 평균 반응도는 아래 표에 따라 그 결과를 판정하였다.

$$Response = \frac{\sum(Grade \times No. of Responders)}{4(Maximum grade) \times n(Total Subjects)} \times 100 \times 1/2$$

표 38. 화장품에 대한 인체 피부자극 index

자극 범위	판정
0.00 ≤ 피부반응 < 0.87	저자극
0.87 ≤ 피부반응 < 2.42	경자극
2.42 ≤ 피부반응 < 3.44	중자극
3.44 ≤ 피부반응	강자극

(6) 추가 효능평가

가) 섬기린초 나노소재 주름억제 효능평가

섬기린초 나노소재의 화장품 적용 소재로서 2차년도에 미백효능평가를 수행한바 있으며, 타 소재 대비 우수한 효능을 나타냄을 확인하였다. 3차년도에는 주름억제 효능에 대한 추가적인 효능평가를 통하여 화장품 소재로서의 활용가치를 좀 더 확보하고자 하였다.

주름억제 효능평가는 식약처에서 발간한 「기능성화장품 유효성평가를 위한 가이드라인」의 시험방법을 바탕으로 순천천연물약소재개발연구센터에 위탁하여 진행하였다. 주름억제 효능평가 위한 바이오마커는 2가지(엘라스타제, 콜라게나제)를 선정하였으며, 사람섬유아세포주(Human primary fibroblasts)를 이용하여 효능평가를 실시하였다. 피부주름의 발생원인은 크게 엘라스틴 구조변형과 콜라겐 결핍으로 나눌 수 있다. 엘라스틴을 분해하여 구조변형을 유발하는 효소가 엘라스타제이며, 콜라겐을 분해하여 결핍을 유발하는 효소가 콜라게나제이다. 이러한 효소들의 제어를 통하여 노화에 의해 발생하는 피부주름을 충분히 예방할 수 있다. 그렇기 때문에 이 2가지 효소를 바이오마커로 선정하였다.

- 시험방법 1 (엘라스타제 억제활성): 1) 세포주를 배양접시에 접종한 후, DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium-페니실린, 스트렙토마이신, 10% FBS 함유)배지를 넣고 37℃, 5% 이산화탄소 배양기내 에서 배양, 2) 배양된 세포는 PBS(phosphate-buffered saline)으로 세척후, 0.1% triton X-100 · 0.2M Tris 액 (pH 8.0) 혼합용액을 넣어 균질화하고, 4℃, 3000 rmp으로 20분간 원심분리하여 엘라스타제 효소액 확보, 3) 시험물질은 0.2M Tris 액 (pH 8.0)으로 용해하여 사용하며, 양성대조물질로 phosphoramidon을 사용, 4) 엘라스타제 효소액 · 0.2M Tris-HCl 완충액 88μl, 시험물질 10μl, STANA액 (N-succinyl-tri-alanyl-p-nitroanilide, 50mM, 엘라스타제 기질) 2μl를 각 well 당 넣고 37℃, 90분 배양, 5) 4의 배양액은 405nm에서 ELISA reader로 흡광도 측정

- 시험방법 2 (콜라게나제 억제활성): 1) 세포주를 배양접시에 접종한 후, DMEM(Dulbecco's

s modified eagle's medium-페니실린, 스트렙토마이신, 10% FBS 함유)배지를 넣고 37°C, 5% 이산화탄소 배양기내 에서 배양, 2) 배양된 세포는 well 당 5×10^4 개로 분주한 다음 세포배양조건에서 24시간 배양, 3) 2의 well에서 배지를 버리고 10% PBS로 세척한 다음 DMEM에 녹인 시험물질을 넣고 48시간 배양, 4) 3의 well에서 배양액만 취하여 콜라게나제 함량측정 ELISA kit를 이용하여 450nm에서 ELISA reader로 흡광도 측정

- 결과도출: 무처리구는 효소와 기질만 존재하는 시험군으로서 활성화된 효소에 의하여 흡광도가 커지며, 양성시험물질은 효소를 억제하는 표준물질로서 흡광도가 작아지게 된다. 시험물질의 흡광도는 무처리구의 흡광도와 비교를 통하여 상대적인 효소저해활성을 판단할 수 있다.

나) 토복령 코어소재 골대사 효능평가

토복령은 건강기능식품 개발가능성 있는 소재로서 2차년도에 토복령 코어소재의 여성호르몬 유사활성 효능평가를 수행한바 있으며, 타 소재 대비 우수한 효능을 나타냄을 확인한 바 있다. 3차년도에 토복령 나노소재에 대한 효능평가를 수행하고자 하였으나 나노소재 개발이 진행 중인 관계로 코어소재에 대한 추가적인 효능을 평가하고자 하였다. 인체 기관 중 유방, 뼈, 생식기는 에스트로젠 수용체가 존재하며, 에스트로젠에 의하여 기능이 조절된다. 유방세포에 대한 증식여부는 이미 확인하였기 때문에 이번에는 뼈에 대한 대사여부를 검토하고자 하였다.

골대사 효능평가는 식약처 「건강기능식품 기능성 평가 가이드라인」의 시험방법을 바탕으로 한림대학교 기능성소재 개발센터에 위탁하여 진행하였다. 골대사 효능평가 위한 바이오마커는 2가지(Alkaline phosphatase; ALP, Tartarate-resistant acid phosphatase; TRAP)를 선정하였으며, 마우스유래 조골세포주(MC3T3-E1) 및 대식세포주(RAW 264.7)를 이용하여 골대사 효능평가를 실시하였다.

- 시험방법 1 (조골세포 분화활성): 1) 조골세포주를 배양접시에 접종한 후, α -MEM(α -minimum essential medium-스트렙토마이신, 페니실린, 10% FBS 함유)배지를 넣고 37°C, 5% 이산화탄소 배양기내 에서 배양, 2) 배양된 세포는 1×10^4 cell/well이 되도록 96-well plate에 분주하고 24시간 안정화 3) 시험물질은 10% DMSO in PBS로 용해하여 사용하며, 양성대조물질로 17β -estradiol을 사용, 4) 2의 96-well plate에 시험물질 처리후 5일간 배양, 5) 4의 배양된 세포는 TRACP & ALP assay kit(Takara bio inc.)를 사용하여 키트 프로토콜에 따라 조골세포 분화의 바이오마커인 ALP 효소 증감여부 측정

- 시험방법 2 (파골세포 분화억제활성): 1) 대식세포주를 배양접시에 접종한 후, DMEM배지를 넣고 37°C, 5% 이산화탄소 배양기내 에서 배양, 2) 배양된 세포는 5×10^3 cell/well이 되도록 96-well plate에 분주하고 24시간 안정화 3) 시험물질은 10% DMSO in PBS로 용해하여 사용하며, 양성대조물질로 17β -estradiol을 사용, 4) 2의 96-well plate에 시험물질 처리후 5일간 배양, 5) 4의 배양된 세포는 TRACP & ALP assay kit(Takara bio inc.)를 사용하여 키트 프로토콜에 따라 파골세포 분화의 바이오마커인 TRAP 효소 증감여부 측정

- 결과도출: 무처리구는 세포의 기본적인 ALP 및 TRAP 정도를 측정하는 시험군이며, 양성 시험물질은 세포의 ALP 활성증가, TRAP 활성억제를 유도하는 시험군이다. 시험물질의 흡광도는 무처리구의 흡광도와 비교를 통하여 상대적인 효소활성정도를 판단할 수 있다.

나. 연구 결과

(1) 제품화 나노소재 결정

가) 코어소재

1차년도 및 2차년도 연구결과 식품산업 분야에서 적용 가능소재로 감초 및 로즈마리 코어소재가 적절하다 판단하였다(토복령 코어소재는 나노소재 개발이 완료되지 않았기 때문에 검토대상에서 제외하였다). 식품용 천연보존료 소재 중 기술적인 보완이 반드시 필요한 로즈마리 코어소재를 우선적으로 연구하여 제품화 하고자 하였다. 또한, 화장품산업 분야에서 적용 가능소재로 섬기린초 코어소재가 적절하다 판단하였다.

나) 피복소재 및 나노소재

제1협동기관에서 사용한 피복소재인 Cycloamylose의 경우, 미국 FDA에서 GRAS 원료로서 인정받은 소재이지만 대량생산이 불가능하기 때문에 제품화가 어렵다고 판단하였다. 하여, 산업화가 가능하며 식품분야에 적용 가능한 텍스트린류에 대한 추가적인 검토를 통하여 분지 텍스트린을 선발하였다. 또한, 분지텍스트린을 적용한 로즈마리 나노소재 제조를 통해 제품화 하고자 하였다.

제2협동기관에서 사용한 피복소재인 Zein 단백질은 국내에서 법적으로 식품 및 식품첨가물로 사용이 불가능한 원료로이지만 시중에서 구하기 용이하므로 식품분야 보다는 비식품사업 부문에서 활용 가능할 것으로 판단하였다. 하여, Zein 단백질 및 추가소재 1종(Hydroxypropyl- β -cyclodextrin)을 적용한 섬기린초 나노소재 제조를 통해 제품화 하고자 하였다.

다) 제품타입

나노소재 제조 시 나노화 반응은 액상에서 진행된다. 이를 바탕으로 나노소재 제품타입을 결정하자면 액상타입의 나노소재를 제품화하는 것이 가장 경제적이다. 하지만, 제품의 안정적 유통 및 장기간 보관을 위하여 분말타입의 나노소재로 제품화하기로 결정하였다.

(2) 나노소재 pilot scale 생산공정 세팅

가) 로즈마리 나노소재 생산공정 확립

1차년도 주관기관의 로즈마리 고순도 코어소재 제조공정확립 연구 시 최적의 추출용매, 추출온도, 추출시간, 기타 제조조건 검토를 통하여 Carnosic acid 함량이 표준화된 코어소재 제조공정 확립을 완료하였으며, 3차년도에 원물 100kg에 대한 고순도 코어소재 pilot 생산을 진행하였다. 코어소재 생산위한 제조공정은 그림 11과 같다. 원물은 추출용매에 직접 분산시킨 다음 80% 주정을 사용하였으며, 추출용매는 원물대비 9배 중량비로 투여하였고, 상온에서 24시간 추출하였다. 추출액에 동량의 NaOH(pH 6.5~7.0)을 혼합교반 후 filterpress(8 μ m)로 여과하여 맑은 갈색용액을 획득하였으며, 여과액에 HCl을 첨가하여 pH를 5.5로 조절하고 한번 더 filterpress (8 μ m)로 여과하였다. 여과액은 건조하여 최종의 고순도 로즈마리 코어소재를 획득하였다.

pilot 생산된 로즈마리 코어소재의 유효성분 함량 및 항균력을 확인한 결과, 기존에 lab

생산된 코어소재와 pilot 생산된 코어소재의 항균력은 동일하며, 유효성분의 함량은 약 2% 낮아진 것을 확인하였다 (표 39). pilot 생산물의 유효성분 함량은 유효성분 표준화 정도에 크게 벗어나지 않는 수준이므로 적합하게 생산된 것으로 판단된다.

표 39. Lab 및 Pilot 생산 고순도 로즈마리 코어소재 완성도평가

Test	고순도 로즈마리 코어소재	
	Lab 생산	Pilot 생산
회수율	원물대비 20%	원물대비 18%
Carnosic acid 함량	52.1%	50.3%
항균력 (<i>Bacillus cereus</i> , in water)	15.6 ppm	15.6 ppm

제1협동기관 연구결과로 셋팅된 로즈마리 나노소재 lab scale 생산공정을 바탕으로 pilot scale 생산공정을 확립하고자 하였다. 나노소재 pilot 생산에서 추가적으로 검토되어야 할 사항은 건조방법이다. 액상조건에서 형성된 나노소재를 분해 및 변질 없이 분말로 제조하는 여러 가지 방법이 존재하나 그 중에서 산업적으로 가장 많이 사용되는 동결건조, 분무건조 2가지 방법을 검토하였다.

우선, 건조방법 검토를 위한 액상 로즈마리 나노소재를 24g 제조하였다. 분지텍스트린 20g을 정제수 760ml에 혼합 후 100 rpm으로 교반하여 충분히 녹여준다. 이후, 분지텍스트린 용액에 로즈마리 코어소재 4g을 첨가하여 빛 차단조건에서 25℃에 24시간동안 100rpm으로 교반하여 액상 로즈마리 나노소재를 제조하였다. 이후, 제조된 나노소재 중 12g은 -80℃ 초저온냉동고에 24시간 보관 후 동결건조(Freeze dryer FD8508, Ilsin biobase, -80℃, 5기압)를 실시하였으며, 나머지 12g은 분무건조(Mini spray dryer B-290, Buchi korea, 130℃, 펌프압력 30%)를 실시하였다. 분말 나노소재에 대하여 분말형성정도, 유효성분 함량, 항균력 등의 검토를 통하여 로즈마리 나노소재 pilot 생산공정을 확립하고자 하였다.

표 40. 건조방법에 따른 로즈마리 나노소재 완성도 평가

Test	로즈마리 나노소재	
	동결건조	분무건조
분말사진		
분말형성	연한 노랑색 분말	연한 노랑색 분말
회수율	96.7%	85.1%
건조시간	72시간	1시간
Carnosic acid 함량	7.9%	7.5%
항균력 (<i>Bacillus cereus</i> , in water)	156 ppm	156 ppm

건조방법에 따른 로즈마리 나노소재 분말의 완성도평가 결과, 동결건조법으로 제조된 분

말과 분무건조법으로 제조된 분말 모두 유효성분인 Carnosic acid 함량은 7.5~7.9% 였으며, 항균력은 100ppm으로 유사한 것으로 확인하였다. 하지만, 두 분말의 수율 및 건조시간이 큰 차이를 보였다. 동결건조분말의 경우 회수율은 96.7%로 높은 편이었으나, 분말화 하는데 72시간이 소모되었다. 분무건조분말의 경우 회수율은 85.1%로 이전의 분말보다 약 10%정도 낮은 편이지만, 분말화 하는데 1시간이 소모되었다 (표 40). 결론적으로 분말화 공정의 수율과 시간을 고려하였을 때 분무건조법이 가장 효율적인 방법이라고 판단하였다. 하여, 나노소재 제조 시 분무건조공정을 추가한 pilot 생산공정을 확립하였다 (그림 39).

Procedure	Detail	Remark
1. 원료	1 작업지시서를 확인하여 원료준비	고순도 로즈마리 추출물(코어소재) 분지덱스트린 (피복소재)
2. 원료검사	1 원료 원산지, 제조일, 제조처(납품처) 등 확인 2 육안검사: 이물, 성상 확인	
3. 계량	1 코어소재 1kg 2 피복소재 5kg	
4. 피복소재 용해	1 배합조에 피복소재 첨가 2 배합조에 피복소재 용해용매 첨가 3 배합조에서 교반/용해	용매: 정제수 피복소재 1 : 용매 38 (중량비) 100 rpm
5. 혼합/교반	1 배합조에 코어소재 혼합 2 교반	25°C, 24시간, 빛차단, 100rpm
6. 분무건조	1 혼합용액 Spray drying	190°C, 40mg/ml 시료주입
7. 포장	1 중량 허용범위 내에서 포장 2 내포장/외포장 상태검사 3 라벨 확인	
제품검사	1 법적 규격 검사 2 오염도평가 3 유효성분 함량분석 4 항균력 평가	부적합시 회수 및 폐기

그림 39. 로즈마리 나노소재 생산 공정도

확립된 로즈마리 나노소재 pilot 생산공정을 바탕으로 코어소재 1kg 단위 시생산을 진행하였다. 로즈마리 나노소재의 코어소재 : 피복소재 구성비는 1 : 5이다. 유효성분이 50%로

표준화된 로즈마리 코어소재 1kg, 분지덱스트린 5kg을 계량하고 나노소재 제조를 진행하였다. 분지덱스트린에 정제수를 1:38(중량비)를 넣어서 100rpm으로 교반하며 충분히 녹여준다. 이후 로즈마리 코어소재를 첨가하고 빛 차단조건에서 25℃, 24시간동안 100rpm으로 교반하여 액상 로즈마리 나노소재를 제조하였다. 제조된 액상 로즈마리 나노소재는 분무조건을 함으로써 분말화된 로즈마리 나노소재 4.92kg(회수율 82%)을 생산하였다. 전체적인 생산 공정 상 pilot 생산공정의 큰 문제는 없었으며, 대량생산 또한 가능할 것으로 판단된다.

시생산된 로즈마리 나노소재는 한국화학융합시험연구원(KTR)에 *Bacillus cereus* ATCC 14579에 대한 항균력 공인인증시험을 의뢰하였으며, 결과는 기존의 항균력 평가결과와 1 fold 정도 차이를 보이는 312.5 ppm의 항균력 공인성적을 확보하였다 (그림 40).

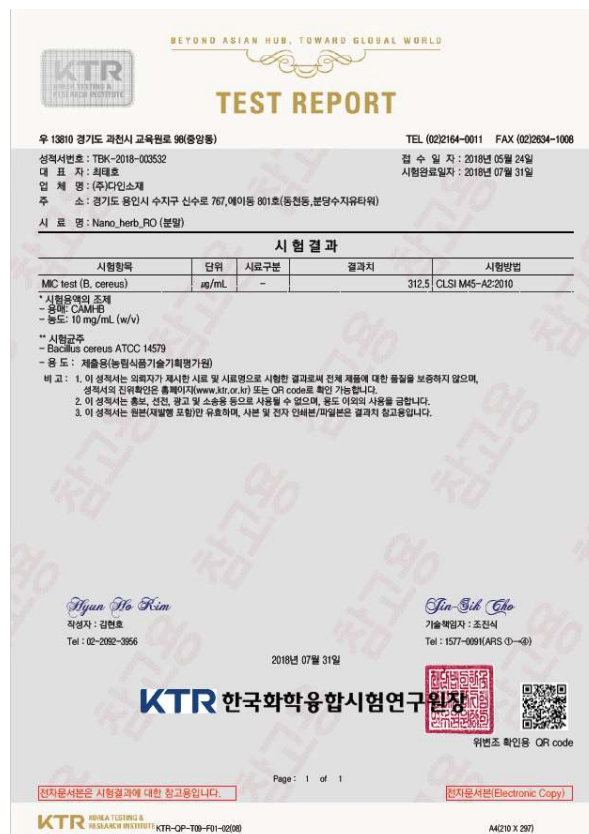


그림 40. 로즈마리 나노소재 시제품의 항균력 시험 성적서 (KTR 공인인증서)

나) 섬기린초 나노소재 생산공정 확립

1차년도 주관기관의 섬기린초 고순도 코어소재 제조공정확립 연구 시 최적의 추출용매, 추출온도, 추출시간, 기타 제조조건 검토를 통하여 ST-7 함량이 표준화된 코어소재 제조공정 확립을 완료하였으며, 3차년도에 원물 100kg에 대한 고순도 코어소재 pilot 생산을 진행하였다. 코어소재 생산위한 제조공정은 그림 13과 같다. 원물은 추출용매에 직접 분산시킨 다음 40% 주정을 사용하였으며, 추출용매는 원물대비 7배 중량비로 투여하였고, 상온에서 24시간 추출하였다. 추출액에 5% KB-G를 처리하여 1시간 교반하여 탈색하였으며, 8μm 여과포를 사용하여 여과하였다. 여과액은 농축하여 최종의 고순도 로즈마리 코어소재(40 brix, paste)를 58L 획득하였다.

pilot 생산된 섬기린초 코어소재의 유효성분 함량 및 항균력을 확인한 결과, 기존에 lab 생산된 코어소재와 pilot 생산된 코어소재의 항균력은 동일하며, 유효성분의 함량 또한 유사한 것을 확인하였다 (표 41). pilot 생산물의 유효성분 함량은 유효성분 표준화 정도에 크게 벗어나지 않는 수준이므로 적합하게 생산된 것으로 판단된다.

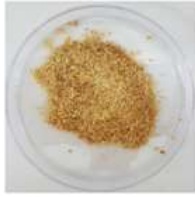

표 41. Lab 및 Pilot 생산 고순도 섬기린초 코어소재 완성도평가

Test	고순도 섬기린초 코어소재	
	Lab 생산	Pilot 생산
회수율	원물대비 25%	원물대비 23%
ST-7 함량	2.33%	2.01%
항균력 (<i>Pseudomonase aeruginosa</i> , in water)	5,000ppm	5,000ppm

제1협동기관 연구결과로 셋팅된 섬기린초 나노소재 lab scale 생산공정을 바탕으로 pilot scale 생산공정을 확립하고자 하였다. 섬기린초 나노소재 또한 pilot 생산에서 반드시 필요한 건조방법 중 동결건조, 분무건조 2가지 방법을 검토하였다.

우선, 건조방법 검토를 위한 액상 섬기린초 나노소재를 20g 제조하였다. 히드록시프로필 시클로 텍스트린 10g을 정제수 200ml에 혼합 후 100 rpm으로 교반하여 충분히 녹여준다. 이후, 히드록시프로필 시클로 텍스트린 용액에 섬기린초 코어소재 10g을 첨가하여 25℃에 24시간동안 100rpm으로 교반하여 액상 섬기린초 나노소재를 제조하였다. 이후, 제조된 나노소재 중 10g은 -80℃ 초저온냉동고에 24시간 보관 후 동결건조(Freeze dryer FD8508, Ilsi n biobase, -80℃, 5기압)를 실시하였으며, 나머지 10g은 분무건조(Mini spray dryer B-290, Buchi korea, 130℃, 펌프압력 30%)를 실시하였다. 분말 나노소재에 대하여 분말형성정도, 유효성분 함량, 항균력 등의 검토를 통하여 섬기린초 나노소재 pilot 생산공정을 확립하고자 하였다.

표 42. 건조방법에 따른 섬기린초 나노소재 완성도 평가

Test	섬기린초 나노소재	
	동결건조	분무건조
분말사진		
분말형성	불규칙한 갈색 분말	연갈색 고운 분말
회수율	91.8%	81.6%
건조시간	96시간	1시간
ST-7 함량	1.09%	1.13%
항균력 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , in water)	10,000 ppm	10,000 ppm

건조방법에 따른 섬기린초 나노소재 분말의 완성도평가 결과, 동결건조법으로 제조된 분

말과 분무건조법으로 제조된 분말 모두 유효성분인 ST-7 함량은 1.09~1.13% 였으며, 항균력은 10000ppm으로 유사한 것으로 확인하였다. 하지만, 두 분말의 형태, 수율 및 건조시간이 큰 차이를 보였다. 동결건조분말의 경우 회수율은 91.8%로 높은 편이었으나, 분말화 하는데 96시간이 소모되었다. 분무건조분말의 경우 회수율은 81.6%로 이전의 분말보다 약 10%정도 낮은 편이지만, 분말화 하는데 1시간이 소모되었다. 또한, 분무건조분말 대비 동결건조분말의 경우 불규칙한 분말을 형성하는 것을 확인하였다 (표 42). 결론적으로 섬기린초 나노소재 분말화에 있어서 분말형성, 수율, 건조시간을 고려하였을 때 분무건조법이 가장 효율적인 방법이라고 판단하였다. 하여, 나노소재 제조 시 분무건조공정을 추가한 pilot 생산공정을 확립하였다 (그림 41).

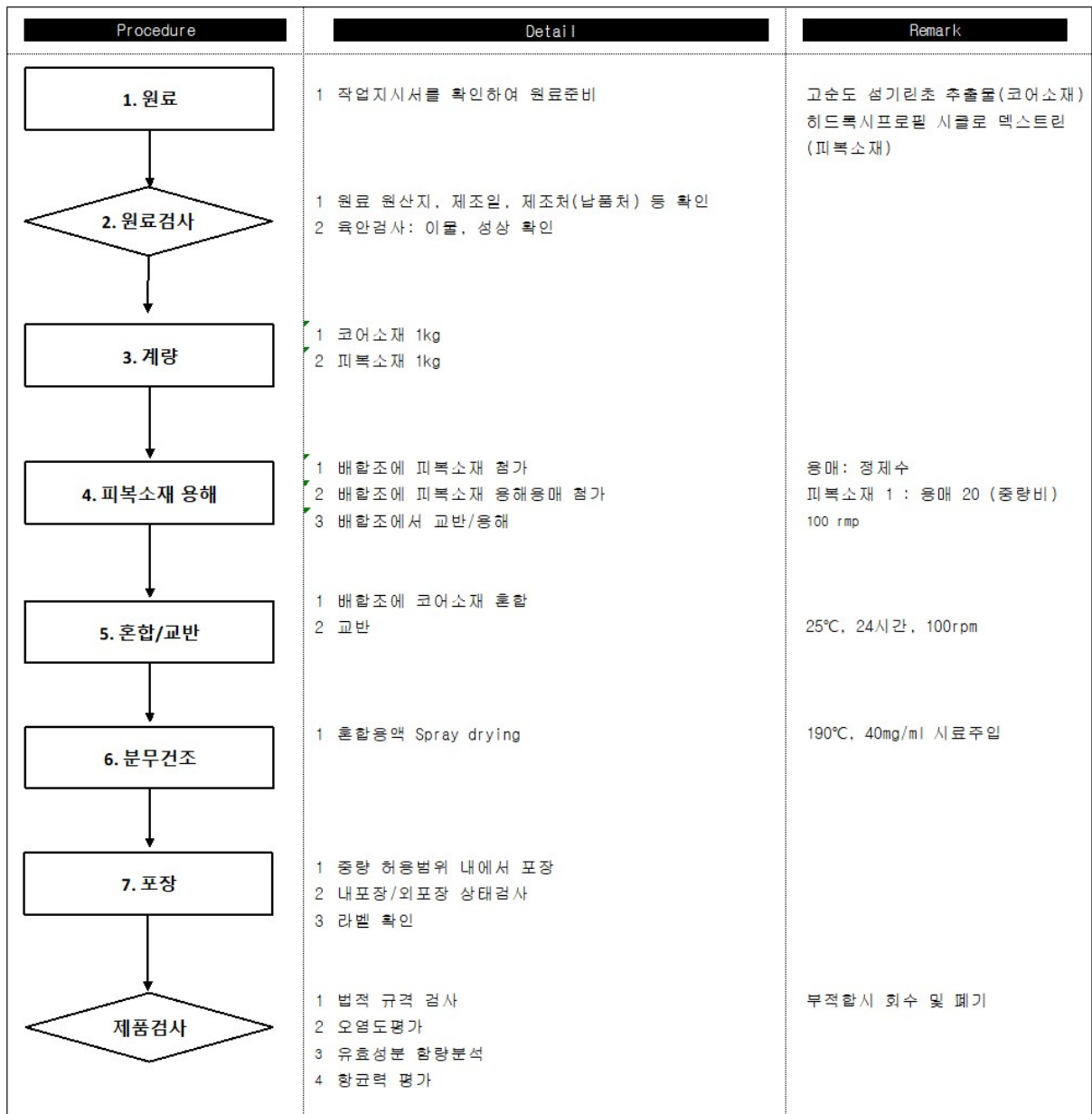


그림 41. 섬기린초 나노소재 생산 공정도

확립된 섬기린초 나노소재 pilot 생산공정을 바탕으로 코어소재 1kg 단위 시생산을 진행

하였다. 섬기린초 나노소재의 코어소재 : 피복소재 구성비는 1 : 1이다. 유효성분이 2%로 표준화된 섬기린초 코어소재 1kg, 히드록시프로필 시클로 텍스트린 1kg을 계량하고 나노소재 제조를 진행하였다. 히드록시프로필 시클로 텍스트린에 정제수를 1:20(중량비)를 넣어서 100rpm으로 교반하며 충분히 녹여준다. 이후 섬기린초 코어소재를 첨가하고 25℃, 24시간 동안 100rpm으로 교반하여 액상 섬기린초 나노소재를 제조하였다. 제조된 액상 로즈마리 나노소재는 분무건조를 함으로써 분말화된 로즈마리 나노소재 1.54kg(회수율 77%)을 생산하였다. 전체적인 생산공정 상 pilot 생산공정의 큰 문제는 없었으며, 대량생산 또한 가능할 것으로 판단된다.

시생산된 섬기린초 나노소재는 한국화학융합시험연구원(KTR)에 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522에 대한 항균력 공인인증시험을 의뢰하였으며, 결과는 기존의 항균력 평가결과와 1 fold정도 차이를 보이는 12500 ppm의 항균력 공인성적을 확보하였다 (그림 42).



그림 42. 섬기린초 나노소재 시제품의 항균력 시험 성적서 (KTR 공인인증서)

(3) 제품 규격안 세팅

가) 로즈마리 나노소재 COA 세팅

로즈마리 나노소재 제품 품질 규격화를 위하여 COA(Certificate of Analysis)를 세팅하였으며, 아래 표에 나타난 바와 같이 연한 노랑색 분말로 제품특유의 향(로즈마리향)이 있는 성상을 띠며, 항균력은 식품 내 변패를 일으키는 내열성세균인 *Bacillus cereus*에 대해 250ppm 이하의 항균활성을 띄며, 로즈마리 나노소재의 유효성분 규격화에 적용된 Carnosic aci

d 함량을 7% 이상으로 지정하였다 (표 43).

표 43. 로즈마리 나노소재 COA

항목	기준		결과	비고
성상	연한 노랑색 분말로 제품특유의 향 있음		적합	
이물	불검출		적합	
항균력	시험균	기준	적합	MIC test (CLSI method)
	<i>Bacillus cereus</i>	< 350 ppm		
유효성분	Carnosic acid	> 7%	적합	
판정			적합	

나) 섬기린초 나노소재 COA 세팅

섬기린초 나노소재 제품 품질 규격화를 위하여 COA(Certificate of Analysis)를 세팅하였으며, 아래 표에 나타난 바와 같이 연한 갈색 분말의 성상을 띠며, 항균력은 화장품 및 식품 제조공정상 문제를 일으키는 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해 15000ppm 이하의 항균활성을 띠며, 섬기린초 나노소재의 유효성분 규격화에 적용된 ST-7 함량을 1% 이상으로 지정하였다 (표 44).

표 44. 섬기린초 나노소재 COA

항목	기준		결과	비고
성상	연한 갈색 분말		적합	
이물	불검출		적합	
항균력	시험균	기준	적합	MBC test (CLSI method)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 15000 ppm		
유효성분	ST-7	> 1%	적합	
판정			적합	

(4) 식품적용 나노소재 유통기한 설정

품질지표 중 결정계수가 가장 높은 이미(異味)검사의 0차 반응식으로 국내 연간변화를 고려하여 23.7개월의 유통기한을 산출하였고 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수 0.85를 곱하여 유통기한을 20개월로 설정하였다.

가. 저장 온도별 저장기간에 따른 각 품질지표변화 분석

10℃, 25℃, 30℃ 저장 온도에서 90일간 저장기간 동안 품질지표의 함량변화는 아래 표와 같다.

표 45. 로즈마리 나노소재의 10℃ 저장결과

저장기간(일)	이미	이취	케이킹	이물	대장균군
0	9.00±0.00	9.00±0.00	미발생	불검출	음성

14	9.00±0.00	8.83±0.41	미발생	불검출	음성
21	8.75±0.21	8.83±0.41	미발생	불검출	음성
28	8.75±0.21	8.83±0.41	미발생	불검출	음성
35	8.75±0.21	8.83±0.41	미발생	불검출	음성
42	8.75±0.21	8.57±0.62	미발생	불검출	음성
49	8.67±0.52	8.57±0.62	미발생	불검출	음성
56	8.67±0.52	8.57±0.62	미발생	불검출	음성
63	8.67±0.52	8.57±0.62	미발생	불검출	음성
70	8.49±0.78	8.57±0.62	미발생	불검출	음성
77	8.49±0.78	8.50±0.12	미발생	불검출	음성
84	8.49±0.78	8.50±0.12	미발생	불검출	음성
91	8.49±0.78	8.50±0.12	미발생	불검출	음성

표 46. 로즈마리 나노소재의 25℃ 저장결과

저장기간(일)	이미	이취	케이킹	이물	대장균군
0	9.00±0.00	9.00±0.00	미발생	불검출	음성
14	8.83±0.41	8.83±0.41	미발생	불검출	음성
21	8.83±0.41	8.83±0.41	미발생	불검출	음성
28	8.83±0.41	8.83±0.41	미발생	불검출	음성
35	8.83±0.41	8.67±0.52	미발생	불검출	음성
42	8.83±0.41	8.67±0.52	미발생	불검출	음성
49	8.67±0.52	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
56	8.67±0.52	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
63	8.67±0.52	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
70	8.57±0.55	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
77	8.57±0.55	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
84	8.57±0.55	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
91	8.33±0.52	8.33±0.52	미발생	불검출	음성

표 47. 로즈마리 나노소재의 35℃ 저장결과

저장기간(일)	이미	이취	케이킹	이물	대장균군
0	9.00±0.00	9.00±0.00	미발생	불검출	음성
14	8.83±0.41	8.83±0.41	미발생	불검출	음성
21	8.83±0.41	8.67±0.52	미발생	불검출	음성
28	8.83±0.41	8.67±0.52	미발생	불검출	음성
35	8.67±0.52	8.67±0.52	미발생	불검출	음성

42	8.67±0.52	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
49	8.50±0.55	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
56	8.50±0.55	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
63	8.50±0.55	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
70	8.50±0.55	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
77	8.50±0.55	8.50±0.55	미발생	불검출	음성
84	8.50±0.55	8.23±0.62	미발생	불검출	음성
91	8.33±0.82	8.23±0.62	미발생	불검출	음성

나. 품질지표별 반응속도상수(K)의 산출

표 48. 저장 온도별 각 품질지표의 반응속도 상수

품질지표	온도(°C)	회귀방정식	결정계수
이미(異味)	0차	10 $Y = -0.0058x + 8.9734$	0.8882
	0차	25 $Y = -0.0047x + 8.9554$	0.9058
		35 $Y = -0.0065x + 8.9425$	0.8926
		1차	10 $Y = -0.0007x + 2.1945$
	1차	25 $Y = -0.0005x + 2.1924$	0.9068
		35 $Y = -0.0007x + 2.1911$	0.8934
이취(異臭)		0차	10 $Y = -0.0058x + 8.9370$
	0차	25 $Y = -0.0065x + 8.9425$	0.8926
		35 $Y = -0.0070x + 8.9021$	0.8700
		1차	10 $Y = -0.0006x + 2.1903$
	1차	25 $Y = -0.0007x + 2.1911$	0.8934
		35 $Y = -0.0008x + 2.1867$	0.8703

1) $Y = KX + B$ (X : 저장기간, Y : 저장기간 X중의 시험항목의 결과값, K : 반응속도상수)

2) $Y = KX + B$ (X : 저장기간, Y : LnA, B : LnA0, K : 반응속도상수)

0차 및 1차 반응식의 결정계수 분석결과, 이미(異味)검사의 0차 반응식의 결정계수가 0.9068로 가장 높으므로, 본 시료의 유통기간 설정을 위한 품질지표로 결정하였다.

다. 온도 영향에 따른 품질지표별 활성화에너지(Ea) 산출

표 49. 이미(異味)검사 활성화에너지 산출(0차 반응식)

저장온도(°C)	저장온도(T)	1/T	K	LnK
10	283	0.0035	0.0058	-5.1499
25	298	0.0034	0.0047	-5.3602
35	308	0.0033	0.0065	-5.0360

표 50. 0차 반응식을 이용한 반응속도상수 산출

저장온도(°C)	저장온도(T)	1/T	K	LnK
10	283	0.0035	-5.2187	0.00541
15	288	0.0035	-5.2038	0.00550
20	293	0.0034	-5.1894	0.00558
25	298	0.0034	-5.1754	0.00565
30	303	0.0033	-5.1620	0.00573

라. 유통기한 산출

로즈마리 나노소재는 실온에서 유통되는 제품으로 품질지표별 실험구 3온도(10°C, 25°C, 35°C)로부터 유도한 아레니우스 0차 반응식으로부터 국내유통온도를 반영하여 유통기한을 산출하였다.

표 51. 연간변화 반응속도상수(K') 산출

저장온도(°C)	국내 연간온조별 예상 유통일수(A)	반응속도상수 (B)	연간변화 반응속 도상수(K')(AxB)
10	152일	0.00541	0.82297
15	30일	0.00550	0.16487
20	61일	0.00558	0.34010
25	61일	0.00565	0.34488
30	61일	0.00573	0.34955

표 52. 이미(異味)검사 0차 반응식을 이용한 유통기한 산출

최초함량(A)	품질규격(B)	A-B	연간변화 반응속도상수(K')	$\{(A-B)/K'\} \times 12$ $[\{(A-B)/K'\} \times 365]$
9	5	4	2.02238	23.7개월(721.9일)

(5) 로즈마리 나노소재 안전성 평가

가) 복귀돌연변이시험

시생산된 로즈마리 나노소재에 대한 미생물의 돌연변이 유발성 여부를 판단하기 위하여 복귀돌연변이시험을 진행하였다. 용량설정시험 결과, 대사활성계 미적용군 (-S9) 에서 *S. typhimurium* TA98, TA1535, *E. coli* WP2uvrA 균주의 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 생육저해가 관찰되었으며, *S. typhimurium* TA100, TA1537 균주의 1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 이상에서 생육저해가 관찰되었다. 대사활성계 적용군 (+S9)에서도 대사활성계 미적용군과 동일한 농도에서 생육저해가 관찰되었다. 용량설정시험 결과를 토대로 본시험의 최고농도는 생육저해관측농도를 포함한 공비 2의 5단계 시험군을 구성하여 본시험을 실시하였다. 본 시험결과, 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 모든 조건에서 각각의 균주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다(표 53 및 54). 한편 모든 양성대조군에서의 콜로니수는 음성대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었으므로 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다. 따라서 로즈마리 나노소재는 본 시험 조건하에 사용한 균주들에 대해 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로부터 음성으로 판단하였다.

나) 체외염색체이상시험

시생산된 로즈마리 나노소재에 대해 염색체의 구조적 이상 유발 여부를 판단하기 위하여 염색체이상시험을 진행하였다. 용량설정시험 결과, 단시간처리법의 대사활성계 미적용군에서 248 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 단시간처리법의 대사활성계 적용군에서 341 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 연속처리법의 대사활성계 미적용군에서 129 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 세포증식을 50%이상 억제하였다. 용량설정시험 결과를 토대로 본시험의 최고농도는 50% 증식저해관측농도를 포함한 공비 2의 4단계 시험군을 구성하여 본시험을 실시하였다. 본 시험결과, 단시간처리법 및 연속처리법에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 하지만, 단시간처리법의 대사활성계 미적용군에의 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 9.0%, 단시간처리법의 대사활성계 적용군의 340 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 18.7%의 염색체 수적이상을 가진 세포의 출현빈도를 확인하였다 (표 55). 따라서 시생산 나노소재는 본 시험 조건하에서 사용한 세포에 대해 염색체 수적이상을 유발하는 것으로부터 의양성으로 판단된다.

로즈마리의 지표성분인 Carnosic acid와 염색체 수적이상과 관련된 문헌검색 결과, James *et al.*, (2006)에 의하면 Carnosic acid는 결장선암세포주의 세포분열주기 중 G2주기를 지연시키고, cyclin A 단백질 생성을 억제하면서 세포분열을 억제하고, 항암활성을 나타내는 것을 보고하였다. 문헌결과를 바탕으로, 로즈마리 나노소재 또한 감초 나노소재처럼 포집된 코어소재에 의해 세포의 특정주기에서 지연된 상태로 느리게 분열이 일어났기 때문에 결과관측시기에 염색체 수적이상이 관측된 것으로 판단된다. 본 시험결과 염색체 수적이상이 발생되지 않는 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만인 농도에서 활용 시 문제없을 것으로 사료된다.

다) 체내소핵시험

시생산된 로즈마리 나노소재에 대한 골수 및 말초혈액 세포의 염색체 손상 또는 세포분열 이상 유발 여부를 판단하기 위하여 소핵시험을 진행하였다. 용량설정시험 결과, 5000

mg/kg을 최고용량으로 시험하였을 때 암수 모두 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 용량설정시험 결과를 토대로 본시험의 최고농도를 포함한 공비 2의 2단계 시험군을 구성하여 본시험을 실시하였다. 본 시험결과, 시험물질 처리군의 다염성적혈구(PCE, Polychromatic erythrocyte) 중 소핵다염성적혈구(MNPCE, micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 또한, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 관찰되지 않았다(표 56). 한편 모든 양성대조군에서의 콜로니수는 음성대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었으므로 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다. 따라서 시생산된 로즈마리 나노소재는 본 시험 조건하에 사용한 마우스 골수세포의 소핵유발성은 없는 것으로부터 음성으로 판단하였다.

표 53. 미생물에 대한 로즈마리 나노소재의 복귀돌연변이시험 결과 (대사활성계 미적용군)

Strain	Test substance	Dose (µg/plate)	1 st Main study			2 nd Main study		
			Individual revertant colony counts	Mean	S.D.	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	24 , 23 , 22	23	1	22 , 20 , 20	21	1
	Nano_herb_RO	156	20 , 19 , 19	19	1	22 , 23 , 19	21	2
		313	20 , 19 , 18	19	1	16 , 19 , 17	17	2
		625	18 , 21 , 18	19	2	19 , 19 , 19	19	0
		1,250	16 , 14 , 15	15	1	17 , 18 , 17	17	1
		2,500	13* , 17* , 16*	15	2	14* , 11* , 13*	13	2
5,000	9* , 16* , 14*	13	4	11* , 13* , 9*	11	2		
	2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	728 , 719 , 744	730	13	718 , 738 , 716	724	12
TA100	Water for injection	0	82 , 83 , 88	84	3	79 , 80 , 75	78	3
	Nano_herb_RO	39.1	99 , 91 , 92	94	4	86 , 90 , 85	87	3
		78.1	97 , 97 , 89	94	5	78 , 76 , 77	77	1
		156	88 , 85 , 82	85	3	84 , 79 , 76	80	4
		313	79 , 86 , 84	83	4	90 , 84 , 82	85	4
		625	79* , 83* , 90*	84	6	76* , 93* , 88*	86	9
		1,250	57* , 61* , 67*	62	5	65* , 68* , 57*	63	6
Sodium azide (SA)	1.5	733 , 740 , 741	738	4	713 , 725 , 733	724	10	
TA1535	Water for injection	0	16 , 14 , 14	15	1	16 , 16 , 16	16	0
	Nano_herb_RO	156	16 , 18 , 16	17	1	18 , 16 , 17	17	1
		313	16 , 18 , 15	16	2	18 , 17 , 14	16	2
		625	17 , 15 , 14	15	2	15 , 17 , 16	16	1
		1,250	16 , 13 , 15	15	2	14 , 14 , 12	13	1
		2,500	6* , 10* , 4*	7	3	5* , 8* , 8*	7	2
5,000	6* , 6* , 2*	5	2	7* , 6* , 5*	6	1		
	Sodium azide (SA)	1.5	586 , 588 , 560	578	16	579 , 590 , 571	580	10
TA1537	Water for injection	0	10 , 9 , 10	10	1	9 , 9 , 10	9	1
	Nano_herb_RO	39.1	6 , 7 , 8	7	1	10 , 9 , 9	9	1
		78.1	9 , 10 , 9	9	1	8 , 8 , 11	9	2
		156	9 , 10 , 11	10	1	10 , 9 , 8	9	1
		313	9 , 9 , 7	8	1	10 , 9 , 12	10	2
		625	6* , 7* , 5*	6	1	5* , 8* , 6*	6	2
1,250	3* , 8* , 4*	5	3	5* , 5* , 7*	6	1		
	9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	587 , 566 , 593	582	14	549 , 531 , 579	553	24
WP2uvrA (pKM101)	Water for injection	0	101 , 101 , 98	100	2	95 , 89 , 88	91	4
	Nano_herb_RO	156	103 , 104 , 98	102	3	92 , 84 , 85	87	4
		313	94 , 103 , 102	100	5	86 , 89 , 88	88	2
		625	107 , 99 , 100	102	4	94 , 86 , 84	88	5
		1,250	102 , 108 , 99	103	5	86 , 79 , 77	81	5
		2,500	78* , 88* , 94*	87	8	59* , 72* , 90*	74	16
5,000	65* , 69* , 70*	68	3	79* , 76* , 75*	77	2		
	4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	0.1	815 , 800 , 763	793	27	748 , 727 , 734	736	11

S.D.: Standard Deviation

*: Indicated growth inhibition

표 54. 미생물에 대한 로즈마리 나노소재의 복귀돌연변이시험 결과 (대사활성계 적용군)

Strain	Test substance	Dose (µg/plate)	1 st Main study			2 nd Main study		
			Individual revertant colony counts	Mean	S.D.	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	36 , 36 , 34	35	1	35 , 33 , 33	34	1
	Nano_herb_RO	156	34 , 35 , 32	34	2	38 , 38 , 39	38	1
		313	38 , 37 , 37	37	1	40 , 38 , 39	39	1
		625	31 , 33 , 31	32	1	35 , 34 , 32	34	2
		1,250	32 , 33 , 30	32	2	35 , 37 , 34	35	2
		2,500	26* , 29* , 34*	30	4	29* , 27* , 30*	29	2
		5,000	19* , 15* , 25*	20	5	20* , 25* , 20*	22	3
2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	403 , 384 , 402	396	11	433 , 411 , 408	417	14	
TA100	Water for injection	0	108 , 106 , 102	105	3	88 , 93 , 88	90	3
	Nano_herb_RO	39.1	102 , 97 , 107	102	5	80 , 84 , 84	83	2
		78.1	102 , 103 , 96	100	4	88 , 90 , 90	89	1
		156	108 , 105 , 99	104	5	93 , 89 , 87	90	3
		313	104 , 101 , 104	103	2	81 , 83 , 85	83	2
		625	97 , 102 , 98	99	3	89 , 90 , 87	89	2
		1,250	85* , 78* , 86*	83	4	70* , 69* , 74*	71	3
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	988 , 984 , 955	976	18	922 , 942 , 970	945	24	
TA1535	Water for injection	0	14 , 12 , 14	13	1	15 , 14 , 13	14	1
	Nano_herb_RO	156	13 , 11 , 12	12	1	16 , 15 , 17	16	1
		313	12 , 10 , 11	11	1	16 , 15 , 14	15	1
		625	14 , 12 , 11	12	2	16 , 17 , 15	16	1
		1,250	12 , 10 , 11	11	1	11 , 12 , 10	11	1
		2,500	11* , 10* , 6*	9	3	6* , 6* , 8*	7	1
		5,000	8* , 3* , 6*	6	3	6* , 3* , 5*	5	2
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	169 , 167 , 171	169	2	173 , 171 , 176	173	3	
TA1537	Water for injection	0	20 , 21 , 22	21	1	18 , 19 , 21	19	2
	Nano_herb_RO	39.1	21 , 19 , 18	19	2	21 , 22 , 24	22	2
		78.1	18 , 21 , 19	19	2	23 , 25 , 18	22	4
		156	20 , 18 , 18	19	1	19 , 20 , 18	19	1
		313	20 , 23 , 22	22	2	21 , 21 , 22	21	1
		625	14* , 20* , 23*	19	5	19* , 19* , 18*	19	1
		1,250	13* , 14* , 9*	12	3	12* , 12* , 14*	13	1
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	217 , 215 , 212	215	3	213 , 208 , 213	211	3	
WP2007-4 (pKM101)	Water for injection	0	139 , 139 , 140	139	1	129 , 130 , 126	128	2
	Nano_herb_RO	156	145 , 142 , 147	145	3	133 , 135 , 134	134	1
		313	147 , 153 , 159	153	6	132 , 138 , 136	135	3
		625	153 , 161 , 165	160	6	151 , 157 , 152	153	3
		1,250	150 , 143 , 148	147	4	141 , 131 , 139	137	5
		2,500	144 , 139 , 137	140	4	120 , 120 , 126	122	3
		5,000	125* , 117* , 123*	122	4	91* , 87* , 89*	89	2
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	529 , 512 , 496	512	17	494 , 458 , 466	473	19	

S.D.: Standard Deviation

*: Indicated growth inhibition

표 55. CHL/IU 세포에 대한 로즈마리 나노소재의 염색체이상시험 결과

Test substance	Dose (µg/mL)	RPD (%)	SP mix	Trit-Rac time (hr)	No. of cell analysed	Number of cells with structural aberrations								Number of cells with numerical aberrations			Others ^{a)}								
						ctb	cxb	cte	cse	fig	gap		total (%)		end	pol		total (%)							
											ctg	cs g	gap-	gap+											
Water for injection	0	100	-	6-18	130	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.3	1	0.3	0	1	0.3	0				
					130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0			
Nano_herb_RO	31.3	92.0	-	6-18	not observed															0					
	62.5	89.9	-	6-18	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0		
					130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0		0	1
	125	82.1	-	6-18	130	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	
					130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0		0
	250	59.4	-	6-18	130	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	1.0	3	1.0	10		3	27**	9.0	0	
					130	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		11	3			
	MMC	0.1	59.4	-	6-18	130	8	0	26	0	0	0	0	0	64**	21.3	65	21.7	0		0	0	0	0	0
130						6	0	30	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Water for injection	0	100	+	6-18	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					130	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		0.3	
Nano_herb_RO	42.5	92.9	+	6-18	not observed															0					
	85.0	87.5	+	6-18	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	
					130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0		0
	170	73.1	+	6-18	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	
					130	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0		0
	340	62.1	+	6-18	130	1	0	1	0	0	0	0	0	4	1.3	5	1.7	28	2		36**	18.7	1	1	
					130	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		23	3			
	B[a]P	20	51.4	+	6-18	130	3	0	34	1	0	0	0	0	73**	24.3	74	24.7	0		0	0	0	0	0
130						4	0	32	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Water for injection	0	100	-	24-0	130	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
Nano_herb_RO	16.3	94.0	-	24-0	not observed															0					
	32.5	85.5	-	24-0	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	
					130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0		0
	65.0	70.1	-	24-0	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0
					130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	
	130	58.2	-	24-0	130	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0
					130	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	
	MMC	0.1	53.1	-	24-0	130	8	0	50	0	0	0	0	0	118**	39.3	120	40.0	0		0	0	0	0	0
130						13	0	59	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Aberration: ctg: chromatid gap, cs g: chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, cxb: chromosome break, cse: chromosome exchange, fig: fragmentation, end: endoreduplication, pol: polyploidy

MMC: Mitozycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene

RPD: Relative Population Doubling, Trit-Rac time: Treatment-Recovery time

gap-: Total number of cells with structural aberrations excluding gap, gap+: Total number of cells with structural aberrations including gap

a): Others were excluded from the number of cells with chromosomal aberrations.

Significant difference from negative control by Fisher's exact test: ** p<0.01

Significant difference from negative control by Cochran-Armitage trend test: ** p<0.01

표 56. ICR 마우스에 대한 로즈마리 나노소재의 소핵시험 결과

Group	Dose (ng/kg)	Route	Hours after dosing	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	163 / 500	3 / 4,000
					1102	156 / 500	0 / 4,000
					1103	157 / 500	3 / 4,000
					1104	160 / 500	3 / 4,000
					1105	146 / 500	1 / 4,000
					Total	782 / 2,500	10 / 20,000
					%(Mean±S.D.)	31.3 ± 1.29	0.050 ± 0.035
		1,250	P.O.	24	1201	146 / 500	0 / 4,000
					1202	162 / 500	1 / 4,000
					1203	162 / 500	3 / 4,000
					1204	162 / 500	2 / 4,000
					1205	158 / 500	1 / 4,000
					Total	790 / 2,500	7 / 20,000
					%(Mean±S.D.)	31.6 ± 1.39	0.035 ± 0.029
Test Substance	Nano_herb_RO	2,500	P.O.	24	1301	139 / 500	2 / 4,000
					1302	152 / 500	1 / 4,000
					1303	159 / 500	0 / 4,000
					1304	161 / 500	0 / 4,000
					1305	155 / 500	2 / 4,000
					Total	766 / 2,500	5 / 20,000
					%(Mean±S.D.)	30.6 ± 1.73	0.025 ± 0.025
		5,000	P.O.	24	1401	167 / 500	3 / 4,000
					1402	153 / 500	1 / 4,000
					1403	162 / 500	0 / 4,000
					1404	158 / 500	1 / 4,000
					1405	157 / 500	2 / 4,000
					Total	797 / 2,500	7 / 20,000
					%(Mean±S.D.)	31.9 ± 1.06	0.035 ± 0.029
Positive control	MMC	2	IP.	24	1501	172 / 500	215 / 4,000
					1502	165 / 500	240 / 4,000
					1503	171 / 500	253 / 4,000
					1504	172 / 500	216 / 4,000
					1505	168 / 500	245 / 4,000
					Total	848 / 2,500	1,169†† / 20,000
					%(Mean±S.D.)	33.9 ± 0.61	5.845 ± 0.434

P.O.: Per Os.

IP.: Intraperitoneal

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

S.D.: Standard Deviation

MMC: Mitomycin C

Significant difference from negative control by Mann-Whitney test: †† p < 0.01

(6) 섬기린초 나노소재 안전성 평가

가) 섬기린초 원물 잔류농약, 중금속 분석

섬기린초 나노소재는 화장품 적용을 위한 소재로서 원료단계에서부터 잔류농약 및 중금속 존재여부를 확인하여 그 안전성을 검증하고자 하였다. 섬기린초 원물의 잔류농약 및 중금속 분석시험은 한국인터텍테스팅(주)에 위탁하여 진행하였으며, 시험은 식약처에서 고시한 방법 및 업체 표준작업지침에 따라 수행되었다.

오염물질별 기준이 상이하므로 식약처에서 고시한 「화장품 안전기준 등에 관한 규정」에 따르면 중금속의 경우 검출 허용 한도(납 20 µg/g 이하, 비소 10 µg/g, 수은 1 µg/g 이하, 카드뮴 5 µg/g 이하, 안티몬 10 µg/g 이하, 등)를 기준으로 삼았다. 잔류농약에 대한 기준은 화장품 안전기준에 없으므로 「농산물 등의 유해물질 잔류기준」에 고시된 농약성분별 검출 허용 한도를 기준으로 삼았다.

잔류농약 시험 결과, 섬기린초 원물에서는 잔류농약 102종이 검출되지 않았다. 또한, 중금속 시험 결과, 섬기린초 원물에서는 중금속 5종 중 비소, 수은, 안티몬은 검출되지 않았으며, 납 및 카드뮴은 기준이하의 미량이 검출되었다 (그림 43). 본 시험결과를 통하여 섬기린초 원물 및 원물에서 유래된 코어소재에는 화장품에 문제가 되는 잔류농약 및 중금속이 없으며, 화장품 소재로 사용해도 안전할 것이라 판단하였다.

intertek
Total Quality. Assured.

REF: IP17-RE00299

시험·검사성적서

성적서 번호: IP17-RE00299
신청기관(인): 주식회사 다인소재
주 소 : 경기도 용인시 수지구 신수로 767, 지식산업센터 8층(동정동, 본당수지구타워)

시료정보
접수번호: IP17-RE00299 시험일자: 2017. 04. 20
시료명: 섬기린초(달성) 완료일자: 2017. 05. 04
시험의 유형: 기타 발행일자: 2017. 05. 04
제조일자 또는 유통기한: 시험목적: 참 고 용

시험항목: 잔류농약 102 종

Acetaminolol, Aconitine, Aflatoxin, Aflatoxin G1, Aflatoxin G2, Aflatoxin M1, Aflatoxin Q1, Aflatoxin Q2, Aflatoxin Q3, Aflatoxin Q4, Aflatoxin Q5, Aflatoxin Q6, Aflatoxin Q7, Aflatoxin Q8, Aflatoxin Q9, Aflatoxin Q10, Aflatoxin Q11, Aflatoxin Q12, Aflatoxin Q13, Aflatoxin Q14, Aflatoxin Q15, Aflatoxin Q16, Aflatoxin Q17, Aflatoxin Q18, Aflatoxin Q19, Aflatoxin Q20, Aflatoxin Q21, Aflatoxin Q22, Aflatoxin Q23, Aflatoxin Q24, Aflatoxin Q25, Aflatoxin Q26, Aflatoxin Q27, Aflatoxin Q28, Aflatoxin Q29, Aflatoxin Q30, Aflatoxin Q31, Aflatoxin Q32, Aflatoxin Q33, Aflatoxin Q34, Aflatoxin Q35, Aflatoxin Q36, Aflatoxin Q37, Aflatoxin Q38, Aflatoxin Q39, Aflatoxin Q40, Aflatoxin Q41, Aflatoxin Q42, Aflatoxin Q43, Aflatoxin Q44, Aflatoxin Q45, Aflatoxin Q46, Aflatoxin Q47, Aflatoxin Q48, Aflatoxin Q49, Aflatoxin Q50, Aflatoxin Q51, Aflatoxin Q52, Aflatoxin Q53, Aflatoxin Q54, Aflatoxin Q55, Aflatoxin Q56, Aflatoxin Q57, Aflatoxin Q58, Aflatoxin Q59, Aflatoxin Q60, Aflatoxin Q61, Aflatoxin Q62, Aflatoxin Q63, Aflatoxin Q64, Aflatoxin Q65, Aflatoxin Q66, Aflatoxin Q67, Aflatoxin Q68, Aflatoxin Q69, Aflatoxin Q70, Aflatoxin Q71, Aflatoxin Q72, Aflatoxin Q73, Aflatoxin Q74, Aflatoxin Q75, Aflatoxin Q76, Aflatoxin Q77, Aflatoxin Q78, Aflatoxin Q79, Aflatoxin Q80, Aflatoxin Q81, Aflatoxin Q82, Aflatoxin Q83, Aflatoxin Q84, Aflatoxin Q85, Aflatoxin Q86, Aflatoxin Q87, Aflatoxin Q88, Aflatoxin Q89, Aflatoxin Q90, Aflatoxin Q91, Aflatoxin Q92, Aflatoxin Q93, Aflatoxin Q94, Aflatoxin Q95, Aflatoxin Q96, Aflatoxin Q97, Aflatoxin Q98, Aflatoxin Q99, Aflatoxin Q100, Aflatoxin Q101, Aflatoxin Q102.

분석결과

시험항목	단위	결과
잔류농약 102 종	mg/kg	불검출

비고: 1. 이 검사성적서는 고객이 제공한 시료에 대한 결과로 전체 제품에 대한 결과를 보장하지 않습니다.
2. 이 검사성적서는 당시의 용의 양이 불고 및 소송용으로 사용할 수 없습니다.

Approved by
Jade Jang / Laboratory Manager

한국인터텍테스팅(주)
시험목적: 성분 분석
시험일자: 2017. 04. 20
시험결과: 잔류농약 102 종 불검출

Test report approved under the direction of
intertek.com
Ministry of Food and Drug Safety

The Test Report is issued by the Company subject to its Terms and Conditions of Business printed overleaf. Attention is drawn to the limitations of liability, indemnification and jurisdictional laws defined therein. This Test Report shall not be reproduced, stored in full, without prior written consent of the Company.
intertek Testing Service Korea Ltd. - a company registered in South Korea. Company No. 104-85-0893

시험·검사성적서

발행번호: IP20170623-0017 접수번호: 170300625-001
검사완료일: 2017-06-23 접수연월일: 2017-06-19

제품명: Herb OS
(종류)제조번호: 품목제조신고번호:

유형·재질·품목명: 기타 화장품 유형 용량(용량유지)기준:

제조(수입)일: 유통(유통유지)기한:

의뢰자: 성명: 회사명: 연락처: 주소: 제조국:

의뢰자: 소재지: 연락처: 회사명: 연락처: 주소: 제조국:

제조명: 소재지: 제조국:

시험·검사목적: 화장품 (기타내부물질검사용)

시험·검사 항목 및 결과

시험·검사 항목	시험·검사 기준	시험·검사 결과	판정	비고
납(mg/g)	기준없음	5.8	상기사항확인함	
비소(mg/g)	기준없음	불검출	상기사항확인함	
수은(mg/g)	기준없음	불검출	상기사항확인함	
카드뮴(mg/g)	기준없음	1.2	상기사항확인함	
안티몬(mg/g)	기준없음	불검출	상기사항확인함	

종합판정: 상기사항확인함
시험검사법: 검체인, 인화수 시험검사책임자: 정준용

비고:
* 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
* 시험이 부족할 경우 시험·검사 항목 및 결과는 별지로 작성 가능합니다.
* 검사결과를 요구하신 날과 호환 등에 표시할 때에는 시험·검사 성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.
* 식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험·검사성적서를 발급합니다.
2017년06월23일

한국인터텍테스팅(주)

04793 서울특별시 성동구 미사신촌로7 (아우디지빌타워 1층) T:02-6090-9500 F:02-3408-0505

본 증명서는 인터텍으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.
또한, 본서이드로 발급받은 증명서(인스)를 인터텍(인터텍)에 등록할 수 있습니다. http://ims.mfds.go.kr Page 1 of 1

그림 43. 섬기린초 원물 잔류농약, 중금속 시험성적서 (한국인터텍테스팅(주))

나) 섬기린초 나노소재 피부자극시험

인체피부 일차자극시험의 시험대상자는 총 31명이 본 시험의 전 과정에 참여하였다. 피험자들의 평균 44.48 ± 6.63세였으며, 최고 연령자는 52세, 최저 연령자는 21세였다. 피험

자들의 피부 특성은 설문에 의해 조사되었다.

인체피부 일차자극 시험 결과, 시험물질 2종(섬기린초 코어소재 및 나노소재)에서 피부반응이 관찰되지 않았다 (표 57). 인체피부의 일차자극 측면에서 본 시험물질은 저자극 범주의 물질로 판단된다.

표 57. 섬기린초 코어소재 및 나노소재의 인체피부 일차자극테스트 결과

Test material	No. of responder	48hr				72hr				Reaction Grade		
		1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	48h	72h	Mean
코어소재	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
나노소재	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
Negative control	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

인체피부 누적자극시험의 시험대상자는 총 51명이 본 시험의 전 과정에 참여하였다. 피험자들의 평균 41.20 ± 8.96세였으며, 최고 연령자는 52세, 최저 연령자는 20세였다. 피험자들의 피부 특성은 설문에 의해 조사되었다.

인체피부 누적자극 시험 결과, 섬기린초 나노소재를 적용하였을 때 유도기 동안 10명의 시험자가 1+ 또는 2+ grade의 피부반응을 보였으나 어떤 경향성이나 특이성은 관찰되지 않았다 (표 58). 인체피부의 누적자극 측면에서 본 섬기린초 나노소재는 안전한 물질로 판단된다.

표 58. 섬기린초 나노소재의 인체피부 누적자극테스트 결과

Test material	1st				2nd				3rd			
	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+
1st week	1	-	-	-	1	1	-	-	6	-	-	-
2nd week	3	1	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-
3rd week	2	1	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-

섬기린초 나노소재 0.3% 솔루션 상태로 피부에 적용했을 때 일차자극 및 누적자극이 없는 것으로 보아, 섬기린초 나노소재를 화장품에 적용하였을 때 피부에 자극을 유발하지 않는 소재라 판단하였다. 따라서, 섬기린초 나노소재의 화장품 적용소재로서의 안전성을 확보하였다.

(7) 추가 효능평가

가) 섬기린초 나노소재 주름억제 효능평가

섬기린초 나노소재 엘라스타제 및 콜라게나제 저해활성은 식약처의 「기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인」 내 시험법에 따라 시험을 진행하였다. 섬기린초 나노소재의 엘라스타제 저해활성을 평가한 결과 1000 µg/ml에서 2.7%, 100 µg/ml에서 0.2%의 저해활성을 나타냈다. 양성대조군으로 사용한 EGCG(Epigallocatechin gallate)는 1000 µg/ml에서 40.0%, 100 µg/ml에서 17.5%, 10 µg/ml에서 4.5%의 저해활성을 나타냈다 (표 59). 결과적으로, 섬기린초 나노소재는 엘라스타제 저해효과는 나타내지 않았다.

표 59. 섬기린초 나노소재의 엘라스타제 저해활성

섬기린초 나노소재		EGCG	
농도	엘라스타제 저해활성	농도	엘라스타제 저해활성
1000 µg/ml	2.7±3.4%	1000 µg/ml	40.0±2.1%
100 µg/ml	0.2±2.3%	100 µg/ml	17.5±1.5%
10 µg/ml	N.D. ¹⁾	10 µg/ml	4.5±1.6%

¹⁾N.D.: Not detected

섬기린초 나노소재 콜라게나제 저해활성을 평가한 결과 1000 µg/ml에서 11.5%, 100 µg/ml에서 2.2%의 저해활성을 나타냈다. 양성대조군으로 사용한 EGCG는 1000 µg/ml에서 85.8%, 100 µg/ml에서 15.5%, 10 µg/ml에서 3.8%의 저해활성을 나타냈다 (표 60). 결과적으로, 섬기린초 나노소재는 약한 콜라게나제 저해효과를 나타냈다.

표 60. 섬기린초 나노소재의 콜라게나제 저해활성

섬기린초 나노소재		EGCG	
농도	콜라게나제 저해활성	농도	콜라게나제 저해활성
1000 µg/ml	11.5±1.2%	1000 µg/ml	85.8±1.5%
100 µg/ml	2.2±1.0%	100 µg/ml	15.5±1.2%
10 µg/ml	N.D.	10 µg/ml	3.8±1.5%

나) 토복령 코어소재 골대사 효능평가

골대사는 오래된 뼈를 파골세포가 흡수하고, 조골세포에 의해 새로운 뼈를 형성하는 일련의 과정에 의해 이루어진다. 그래서 조골세포 및 파골세포의 활성평가를 통하여 골대사를 평가하고자 하였다. 골대사 효능평가 시 선택한 바이오마커 중 ALP의 경우, 조골세포 분화 시 관측하는 지표물질로서 분화가 증가할수록 ALP 또한 증가하는 양상을 나타낸다. 또한, TRAP의 경우, 파골세포의 분화 시 관측하는 지표물질로서 파골세포 분화와 TRAP 생성량은 비례한다.

토복령 코어소재 ALP 활성을 평가한 결과 토복령 소재는 25 µg/ml에서 3.43 µU/µl, 50 µg/ml에서 1.31µU/µl의 ALP 활성을 나타냈다. 양성대조군인 에스트로젠은 1 nM에서 3.58 µU/µl, 100 nM에서 4.26 µU/µl의 ALP 활성을 나타냈다 (그림 43-A). 토복령 코어소재는 에스트로젠과 달리 조골세포 분화를 유도하지 않는 것으로 판단된다.

토복령 코어소재 TRAP 활성을 평가한 결과 토복령 소재는 150 µg/ml에서 3.35 µU/µl, 300 µg/ml에서 2.96 µU/µl, 450 µg/ml에서 0.41 µU/µl의 TRAP 활성을 나타냈다. 양성대조군인 에스트로젠은 1~1000 nM 농도에서 TRAP 활성이 유지되는 것을 확인하였다 (그림

43-B). 토복령 코어소재는 에스트로겐과 달리 파골세포의 분화억제를 유도하는 것으로 판단된다.

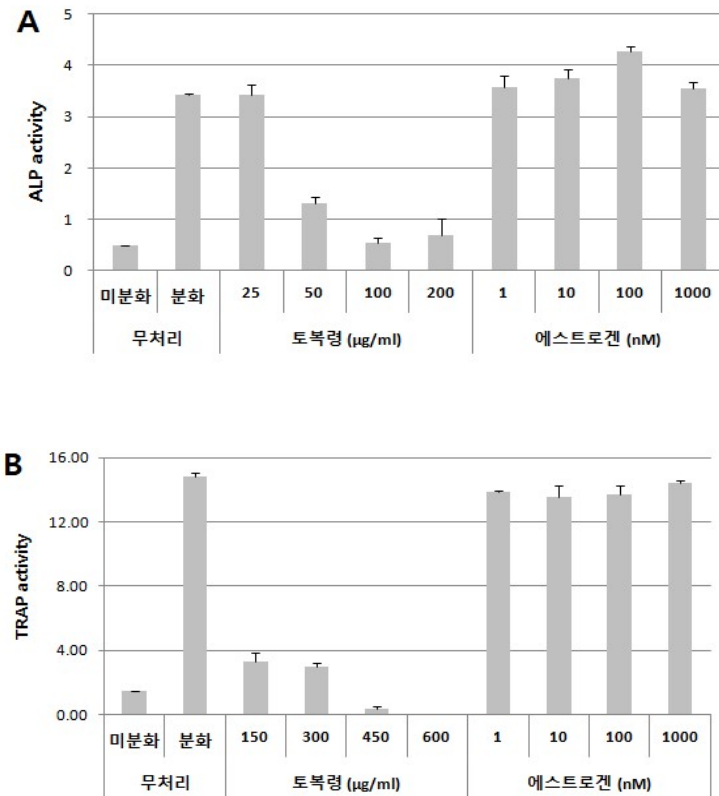


그림 43. 토복령 코어소재 골대사 효능평가 ((A) ALP activity, (B) TRAP activity)

토복령 코어소재가 여성호르몬 유사활성 및 골대사 효능을 가진 건강기능식품 소재임을 확인하였으며, 향후 토복령 나노소재가 완성되면 효능평가를 통하여 건강기능식품 소재로 활용할 예정이다.

II. 제1협동기관 (서울대학교)

1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) 환형아밀로스 제조조건 최적화

가) *Thermus aquaticus* 4- α -glucanotransferase의 분리 및 정제

환형아밀로스(cycloamylose) 제조에 사용할 4- α -glucanotransferase (TAaGT) 효소 생산을 위해 내열성 균주인 *Thermus aquaticus*로부터 분리한 내열성 4- α -glucanotransferase 유전자를 사용하였다. 선별된 균주의 DNA를 42°C에서 2분간 열충격을 주어 transformation 한 후 숙주 세 포인 *Escherichia coli* MC1061을 접종하여 37°C에서 12시간 배양하고, 균체는 lysis 용액에 현탁한 후 초음파 분쇄하였으며, Ni-NTA affinity column에 주입하여 정제하였다.

나) 효소 처리 조건 최적화

Cycloamylose를 생산하기 위하여 아밀로스 함량이 70%로 높은 고아밀로스 (Hylon7)을 사용하였으며, 그림 44의 모식도와 같이 3종류의 효소(isoamylase, TAaGT, glucoamylase) 처리조건을 최적화하였다.



그림 44. Cycloamylose 생산을 위한 효소 처리 과정

① Isoamylase 처리 조건 최적화

1%(w/v) 고아밀로스 전분을 121°C에서 15분 간 autoclave를 통해 호화시킨 후 50mM sodium acetate buffer (pH 4,5)에 isoamylase(*Pseudomonas sp.*, 280U/mg, Megazyme) 5U/g을 40°C에서 시간을 달리하여 반응시킨 후 debranching 정도를 가수분해도 및 분자량 분포도 분석 결과를 비교하여 최적화 하였다.

② TAaGTase 처리 조건 최적화

Linear한 glucan에 TAaGT를 처리할 경우 intramolecular transglycosylation (cyclization)을 촉매하여 cyclic α -1,4-glucan (cycloamylose) 생산이 가능하다. 따라서, TAaGT의 농도를 최적화하기 위해 debranching된 고 아밀로스 전분에 TAaGT를 각각 10U/g, 50U/g, 100U/g, 200U/g으로 처리하여 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 75°C에서 2, 4, 6, 10, 14,

18시간 동안 반응시간을 달리하여 조건을 최적화 하였다. 컬럼은 OH pack SB-804 HQ와 OH pack SB-802 HQ를 차례로 연결하여 분석하였으며 purified water를 이동상으로 분당 0.8mL의 유속으로 흘러 분석하였다. 샘플은 DW에 녹인 다음 0.45 μ m 필터를 이용하여 필터한 후 사용하였다.

③ Glucoamylase 처리 조건 최적화

순수한 cycloamylose를 제조하기 위해서 glucoamylase(*Hormoconis resiniae*, 64U/mg, Megazyme)를 효소 농도와 반응 시간을 달리하여 조건을 최적화하여 non-cyclic glucan과 glucolse 단위의 잔가지를 제거하였다. 구체적으로 10U/g, 50U/g, 100U/g의 glucoamylase를 처리하여 50mM sodium acetate buffer (pH 4.5), 40 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시키는 동안 2시간 간격으로 sampling하여 환원당을 측정하였다.

(2) 환형아밀로스 이화학적 특성 분석

가) HPSEC를 이용한 생산 수율 측정

생산된 cycloamylose의 수율은 HPSEC를 이용하여 측정하였다. 컬럼은 OH pack SB-804 HQ와 OH pack SB-802 HQ를 차례로 연결하여 분석하였다. 정량을 위하여 기준 물질인 standard cycloamylose(EZAKI GLICO CO., LTD. Japan)를 이용하여 standard curve를 그려 각 농도별로 얻은 peak area 값을 계산하여 분석하였다.

나) HPAEC를 이용한 cycloamylose의 중합도 분석

HPAEC(high performance anion exchange chromatography)를 이용하여 생산된 cycloamylose의 중합도를 분석하였다. 컬럼은 CarboPacTM PA-1 column(4.0X250mm, DIONEX, USA)을 사용하였으며, 150mM NaOH와 600mM sodium acetate를 gradient로 이동상을 걸어주어 분당 1.0mL의 유속으로 흘러 분리하였다. Detector는 pulsed amperometric detector(ED40, DIONEX, USA)를 사용하여 분석하였다. 샘플은 0.5% 농도로 DW에 녹인 다음 0.45 μ m 필터를 이용하여 필터한 후 사용하였다.

다) MALDI-TOF를 이용한 cycloamylose의 분자량 측정

생산된 cycloamylose의 분자량 스펙트럼을 분석하기 위하여 MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) mass spectrometer(VoyagerTM-DE STR, Applied Biosystem, Framingham, USA)를 사용하였다.

(3) 환형아밀로스와 천연 항균/항산화소재와의 나노복합체 제조조건 최적화

가) 나노복합체 제조

코어소재는 로즈마리 추출물을 사용하였고, 과량을 피복소재에 포집시키기 위해 1%(w/v)를 사용하였다. 피복소재는 제조한 cycloamylose를 사용하였고, 비교 물질로 β -cyclodextrin(Sigma, USA)와 DE 8~12의 중합도를 가지는 maltodextrin(Samyang Genex Co., Korea)을 사용하였다. 코어소재와 피복소재를 5% EtOH에 용해시킨 후 상온에서 48

시간동안 shaking incubation한 후, 용액 상태로 사용하거나 freeze drying하여 사용하였다.

나) 나노복합체 내 코어소재의 정량화

로즈마리 추출물에 존재하는 carnosic acid을 정량화하기 위해 carnosic acid 표준물질 (Sigma, USA)을 95% EtOH에 녹인 후 200nm~600nm 범위에서 UV-vis spectrophotometer (JP/UV-1650PC, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 흡광도 스펙트럼을 측정하였다. 측정된 흡광도 범위에서 standard carnosic acid의 농도별 흡광도를 측정하여 standard curve를 그린 후, 로즈마리 추출물 내의 carnosic acid 또는 나노복합체 내의 carnosic acid의 흡광도 값을 수식에 대입하여 역으로 계산하여 정량하였다.

다) 나노복합체 제조 조건 최적화

1%(w/v) 로즈마리 추출물과 다양한 농도의 cycloamylose(0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30% (w/v))를 각각 5% EtOH에 용해시킨 후, 상온에서 48시간동안 shaking incubation하였다. 각 샘플을 8시간, 24시간, 48시간에 sampling하여 0.45 μ m 필터로 필터한 후 285nm에서 흡광도를 측정하여 나노복합체에 존재하는 carnosic acid의 농도를 구하였다. 피복소재의 비교 물질로 사용된 β -cyclodextrin은 0.25%, 0.5%, 1%, 2%(w/v) 농도에 대해서 복합체를 제조하였으며 나머지 조건은 모두 동일하게 수행하였다.

라) 나노복합체의 용해도 측정

1%(w/v) 로즈마리 추출물과 1%, 5%, 10%, 20%, 30%(w/v)의 cycloamylose를 5% EtOH에서 혼합한 후, 상온에서 48시간동안 shaking incubation하였다. 샘플을 0.45 μ m 필터로 필터한 후 285nm에서 흡광도를 측정하여 나노복합체에 존재하는 carnosic acid의 농도를 구하였다. 비교 물질로 사용된 β -cyclodextrin은 0.25%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%(w/v)를 사용하였고, maltodextrin은 cycloamylose와 동일한 농도 조건으로 사용하였다.

마) 나노복합체의 형성능 규명

기능성 코어물질과 cycloamylose 간의 나노복합체 형성 여부를 DSC과 XRD, SEM을 이용하여 확인하였다. 시료는 로즈마리 추출물, cycloamylose, 로즈마리 추출물/cycloamylose 물리적 혼합물, 로즈마리 추출물/cycloamylose 나노복합체를 사용하였다. 나노복합체는 로즈마리 추출물과 cycloamylose를 1:10의 중량(%) 비율로 5% EtOH에서 혼합하여 48시간동안 incubation 시킨 후, freeze drying 방법으로 분말화하였다. 물리적 혼합물은 분말 형태의 각 로즈마리 추출물과 cycloamylose를 1:10의 중량(%) 비율로 단순 혼합하여 제조하였다.

① Differential scanning calorimetry (DSC) 분석

Solid state interaction에서 로즈마리추출물과 cycloamylose의 복합체 형성을 확인하기 위하여 differential scanning calorimeter(DSC)를 사용하여 비교하였다. 각 시료 8~9mg을 stainless steel pan에 밀폐시키고 DSC (Perkin Elmer)에서 10 $^{\circ}$ C/min의 속도로 20 $^{\circ}$ C에서

200℃까지 온도를 높이며 DSC 열주사 곡선을 얻었다.

② Powder X-ray diffraction (XRD) 분석

각 시료의 X-선 회절 패턴을 통해 복합체의 결정성을 확인하기 위하여 powder X-ray diffractometer(D8 ADVANCE with DAVINCI, BRUKER, Germany)를 이용하였다. Generator는 40kV, 40mA로 작동하였고, 회절 각도는 2-40 degree (2θ), 스캔 속도는 0.5sec/step으로 측정하였다.

③ Field-Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) 분석

로즈마리 추출물, cycloamylose, 그리고 두 물질의 물리적 혼합물과 나노복합체의 surface morphology를 확인하기 위하여 Field-Emission Scanning Electron Microscope(FESEM) (SIGMA, Carl Zeiss, UK)을 이용하였다. 각 시료들을 carbon tape이 접착된 metal stub에 얇게 올린 후 백금코팅기(EM ACE200, Leica, Austria)를 이용하여 30mA에서 120초 동안 백금막 코팅하였다. FESEM의 배율은 로즈마리 추출물은 5,000배, 나머지 시료들은 500배로 관측하였다.

(4) 천연 항균/항산화 물질의 나노복합체에서의 기능성 분석

가) 나노복합체의 항균력 분석

Cycloamylose와 β -cyclodextrin, maltodextrin의 각 농도별로 제조한 나노복합체 내의 carnosic acid의 농도를 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 정량화하였고, 각 농도별 나노복합체에 대한 항균력을 분석하기 위해 MIC값을 측정하였다. MIC 측정방법은 broth dilution 방법을 이용하였고, 각 샘플을 96 well plate에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 NB 배지 (Difco™, USA)를 이용하여 serial dilution 하였다. 로즈마리 추출물의 항균력 시험에 사용된 균은 *Bacillus subtilis*이며, 600nm에서 흡광도 0.1이 되도록 희석한 후 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 시험균주는 30℃에서 24시간 배양하였고, 육안 관찰시 배지가 투명한 농도를 MIC로 판단하였다.

나) 나노복합체의 항산화능 분석

로즈마리 추출물 500ppm을 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%(w/v) cycloamylose와 혼합하여 복합체를 제조하였으며 ABTS 방법으로 항산화능을 측정하였다. 비교물질로 β -cyclodextrin과 maltodextrin을 사용하였으며 동일한 방법으로 나노복합체를 제조하였다.

(5) 천연 항균/항산화 물질의 나노복합체에서의 안정성 분석

가) 나노복합체의 열안정성 분석

로즈마리 추출물 500ppm을 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%(w/v) cycloamylose와 혼합하여 복합체를 제조한 후, 90℃ water bath에서 24시간동안 열처리하였고, 2시간 간격으로 sampling하여 항산화능을 ABTS 방법으로 측정하였다. 비교물질로 β -cyclodextrin과

maltodextrin을 사용하여 제조한 나노복합체에 대해서도 열안정성 실험을 동일하게 수행하였다.

나) 나노복합체의 광분해 안정성 분석

나노복합체의 광분해안정성을 실험하기 위해 cycloamylose 각 농도별로 (0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30% w/v) 로즈마리 추출물 500ppm과 혼합하여 복합체를 제조한 후, 각 샘플을 1mL씩 유리병에 담아 UV irradiation chamber 내에서 UV를 조사하였다. UV는 8W UVB lamp(SANKYO DENKI G8T5E UVB ULTRAVIOLET, Japan)을 사용하였고, 0, 2, 4, 6, 8, 24시간에서 sampling 하여 항산화능을 ABTS 방법으로 측정하였다. 비교 물질로 β -cyclodextrin과 maltodextrin을 사용하였으며 나노복합체를 제조하여 광분해안정성 실험을 동일하게 수행하였다.

(6) 나노에멀전 제조 (2차년도 예비실험)

가) 나노에멀전 제조방법

콩기름(soybean oil)과 5mM phosphate buffer (pH 7), 다양한 유화제 (tween 20, whey protein isolate (WPI), casein, soy protein isolate (SPI), egg albumin)를 사용하여 oil-in-water (O/W) 에멀전을 제조하였다. 먼저 오일의 0.5%에 해당하는 로즈마리를 오일에 용해시켜 오일상(lipid phase)을 준비하였고, 수상 (aqueous phase)은 각각의 유화제를 5mM phosphate buffer안에 오일과 유화제의 비율이 5:1이 되게 하는 농도로 용해시켜 제조하였다. 유화제가 용해되어 있는 수상에 로즈마리가 용해되어 있는 오일상을 첨가하여 섞은 후, 균질기로 12,000rpm에서 1분 동안 균질화시켜 coarse 에멀전을 제조하였다. Coarse 에멀전을 다시 고압균질기(High pressure homogenizer, HPH)에 넣고 10,000psi (70MPa)의 압력을 가하여 균질화 하였고 이 과정을 세 번 반복하여 에멀전을 제조하였다.

(7) 나노에멀전의 물리화학적 특성 및 안정성 분석

가) 로즈마리의 기름 용해도

로즈마리를 메탄올에 녹여 각각의 농도가 0.0005%, 0.001%, 0.0015%, 0.002%, 0.0025%이 되도록 희석 한 후 285nm에서 흡광도값을 측정하여 standard curve를 그리고 이를 이용하여 분석한 오일에서의 로즈마리 용해도는 0.63% 이었다. 물에서의 로즈마리 용해도가 0.03%임을 고려하면 오일에서 용해도가 향상됨을 알 수 있었다.

나) O/W 나노 에멀전의 물리화학적 특성분석

5가지 유화제(tween 20, WPI, casein, SPI, egg albumin)를 사용하여 오일농도 5, 10, 20%로 제조한 로즈마리 포집-O/W에멀전의 특성은 오일 입자크기와 전하를 측정함으로써 분석하였고, 오일 입자크기와 전하는 Malvern zetasizer ZS90을 이용하였다.

다) O/W 나노 에멀전의 저장안정성 분석

나노에멀전의 저장 중 안정성 변화를 분석하기 위하여 다양한 유화제로 제조한 에멀전

들을 온도를 달리하여(4°C, 25°C) 0일부터 30일까지 저장하여 비교하였다. 저장은 빛을 차단한 채 진행되었고, 유화제의 부패를 막기 위해 아지드화나트륨(Sodium azide)을 0.03% 첨가하였다. 실험 시작 후 0일, 7일, 14일, 30일 별로 에멀전 오일 입자크기를 분석하였다.

라) 기능성 물질을 포함한 나노에멀전의 항균력 측정

로즈마리를 포함한 나노에멀전의 항균력은 에멀전 자체의 혼탁도로 인해서 MIC측정을 진행 할 수 없었다. 따라서 paper disc법을 이용한 항균력 측정을 2차년도에 진행할 예정이며, 유화제 용액을 이용하여 소수성 물질인 로즈마리의 수용액에서의 용해도 측정 및 항균력 실험을 추가로 진행할 예정이다.

다. 연구 결과

(1) 환형아밀로스 제조조건 최적화

가) Isoamylase 처리 조건 최적화

Isoamylose를 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24시간 처리한 후 sampling하여 debranching된 glucan의 가수분해도는 DNS방법 (Miller, 1959)으로 측정하였고 reducing group 양의 증가 유무로 확인하였다.

실험 결과, 그림 45-A에서와 같이 isoamylase을 8시간 처리 하였을 때 환원당이 최대로 증가하였고, 8시간 이후부터는 효소처리 할수록 환원당이 줄어들었다가 plateau에 도달하였다. 이는 linear glucan이 증가함에 따라 서로 aggregation되어 환원당이 줄어드는 것으로 판단된다. 따라서, debranching 위한 isoamylase의 최적처리시간은 8시간으로 판단된다.

Isoamylase 최적 조건으로 처리하여 얻은 debranching된 고아밀로스 전분의 분자량 분포도는 HPSEC(high performance size exclusion chromatography)를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 OH pack SB-806 HQ와 OH pack SB-804 HQ를 차례로 연결하여 분석하였으며 purified water를 이동상으로 분당 0.4mL의 유속으로 흘러 분석하였다. Debranching된 sample은 DW에 녹인 다음 5.0 μ m 필터를 이용하여 필터한 후 사용하였다.

분석결과, 고아밀로스 전분이 debranching되어 아밀로펙틴 분포도(first peak, retention time 20-30min)는 줄어들었고, 아밀로스 분포도(third peak, retention time 32-50min)는 증가하여 약 1.50×10^3 g/mol 부근에서 최대의 분자량 분포를 보였다 (그림 45-B). 따라서 isoamylase를 8시간 처리하였을 경우 linear한 glucan을 얻었음을 확인하였고 이 조건으로 cyclization 단계를 진행하였다.

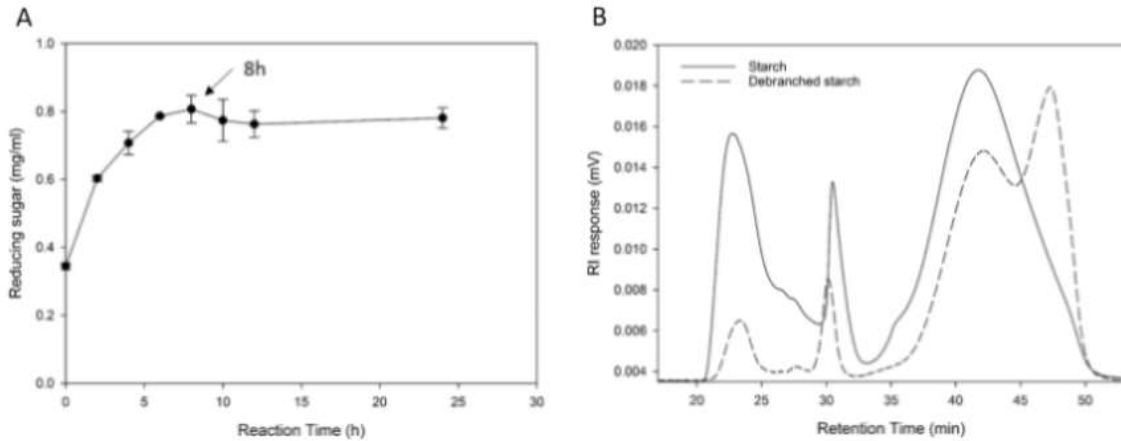


그림 45. (A) Isoamylase 처리 시간에 따른 debranching된 고아밀로스 전분의 환원당 측정, (B) 고아밀로스 전분의 debranching 전과 후의 분자량 분포도 비교.

나) TAaGTase 처리 조건 최적화

TAaGT 처리조건 최적화 실험 결과, TAaGT 농도는 10U/g으로 처리하였을 때 cycloamylose 생산량이 가장 많았고, 효소 농도가 증가할수록 생산량이 줄어드는 것을 알 수 있었다 (그림 46-A). 이는 TAaGT가 linear glucan을 cyclic glucan으로 전환시키는 기능뿐만 아니라 긴 연쇄상의 말토올리고당을 생산하는 disproportionation 기능도 가지고 있기 때문에 높은 효소 농도에서 오랜 시간(12시간 이상) 동안 반응하게 되면 cycloamylose 생산량이 오히려 감소한 것으로 보여진다. 따라서 낮은 효소 농도에서의 알맞은 반응 시간을 최적화하기 위하여 10U/g TAaGT를 2~18시간 동안 처리하여 각 반응 시간에 따라 생산된 cyclomaylose의 양을 HPSEC로 분석하였다(그림 46-B). 14시간의 반응조건에서 cyclomaylose 생산량이 가장 많았고, 그 이후에는 생산량이 줄어드는 것을 확인하였으며, 위와 같은 결과로부터 TAaGT 처리 조건은 10U/g, 14시간으로 정하였다.

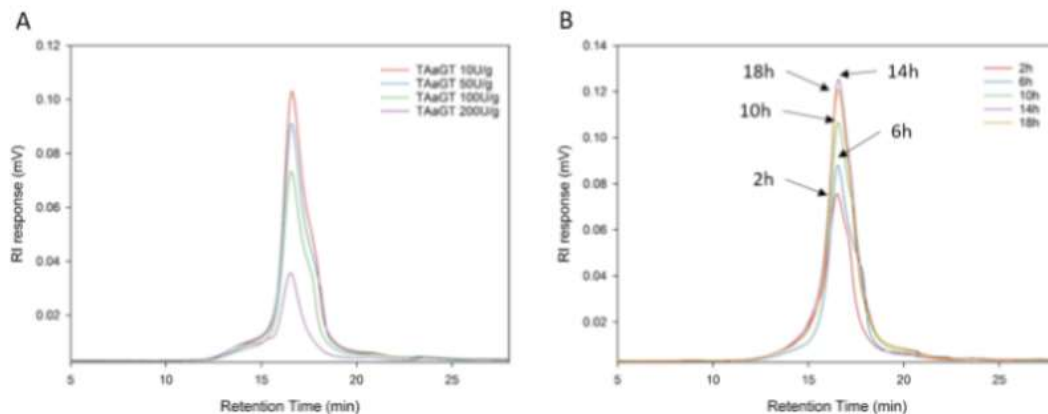


그림 46. (A) HPSEC를 이용한 TAaGT 농도에 따른 cycloamylose 생산량, (B) HPSEC를 이용한 cycloamylose 수율 비교 (10U/g TAaGT 처리).

다) Glucoamylase 처리 조건 최적화

Glucoamylase 처리조건 최적화 실험 결과, glucoamylase를 10U/g 처리한 경우에는 반응 시간이 증가함에 따라 환원당이 증가하였지만 그 증가폭이 크지 않은 반면, 50U/g과 100U/g의 glucoamylase를 처리하였을 때는 환원당이 현저히 증가하였다. 효소 농도는 50U/g과 100U/g 에서 모두 plateau에 도달하였다 (그림 47-A). 따라서, glucoamylase 처리 조건은 낮은 농도인 50U/g으로 정하였으며, 효소 처리 시간은 2시간 이후 환원당이 서서히 증가하여 8시간 이후에는 안정해지므로 8시간을 선택하여 반응 시간을 최적화하였다. 고농도의 glucoamylase를 처리할 경우, glucoamylase에 의해 cycloamylose가 분해될 수 있기 때문에 최적화된 농도에서 분해현상이 일어나는지 확인하기 위하여 standard cycloamylose에 50U/g glucoamylase를 처리하여 시간에 따른 환원당을 측정하였다(그림 47-B). 그 결과 2시간 이후부터 24시간까지 환원당이 거의 증가하지 않아 최적화 된 조건으로 glucoamylase를 처리하여도 cycloamylose가 분해되지 않음을 알 수 있었다.

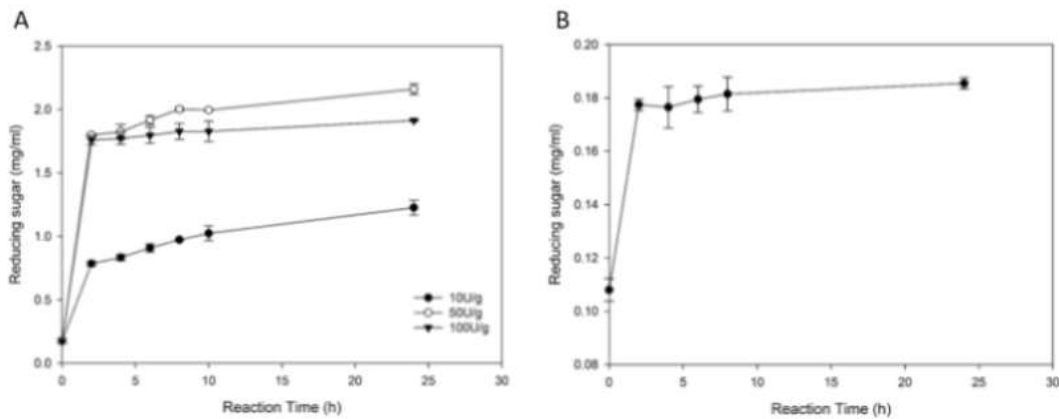


그림 47. (A) Glucoamylase 농도 및 처리 시간에 따른 환원당 변화량 측정, (B) 50U/g glucoamylase를 standard cycloamylose에 처리하였을 때 시간에 따른 환원당 변화량 측정

(2) 환형아밀로스 이화학적 특성 분석

가) HPSEC를 이용한 생산 수율 측정

최종 생산된 cycloamylose를 standard curve에 대입하여 농도를 구한 결과, 0.71%로 계산되었다 (그림 48-B). 따라서 1%(w/v) 고아밀로스 전분으로부터 생산된 cycloamylose의 수율은 71% 이며, HPSEC 분석 결과에서 볼 수 있듯이 standard cycloamylose와 유사한 분자량 분포도를 가지는 cycloamylose가 제조되었음을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 고아밀로스 전분을 이용하여 cycloamylose를 제조하였으며 이전에 쌀 전분(49.2%) 또는 고구마 전분(48.56%)으로부터 생산한 cycloamylose 보다 높은 생산 수율을 얻었다.

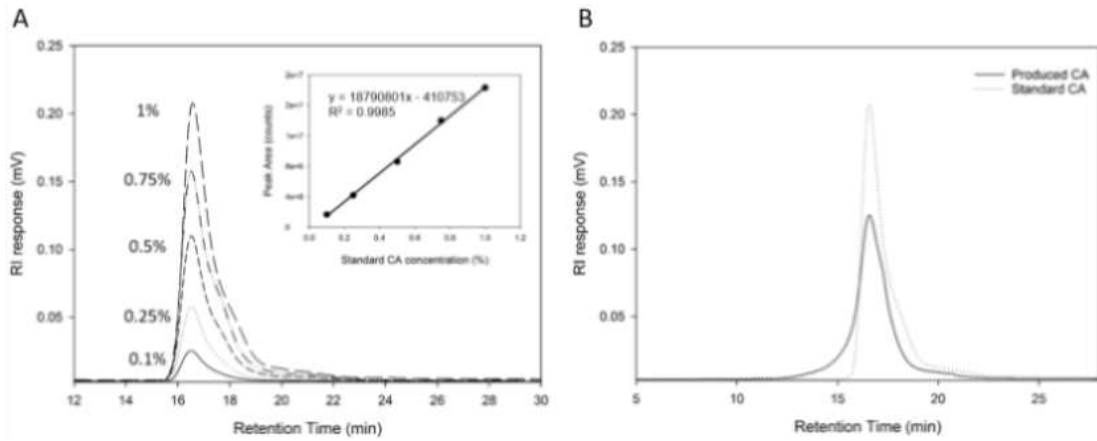


그림 48. (A) Standard cycloamylose를 이용한 standard curve, (B) HPSEC를 이용한 standard cycloamylose와 제조한 cycloamylose의 분자량 분포도 비교.

나) HPAEC를 이용한 cycloamylose의 중합도 분석

환형아밀로스 중합도 측정 결과, 다양한 중합도(DP, degree of polymerization) 분포도를 가진 cycloamylose가 생산되었음을 확인하였으며, DP 17부터 DP 43까지의 중합도가 많이 분포함을 알 수 있었다(그림 49-A). 제조한 cycloamylose의 중합도 분포도를 분석한 결과, DP 26을 가진 cycloamylose가 가장 많이 생산되었고 DP 36이상의 중합도를 가진 cycloamylose도 생산되었음을 알 수 있었으며, 이 결과는 상업적으로 판매되고 있는 standard cycloamylose와 매우 유사함을 확인하였다(그림 49-B 및 C).

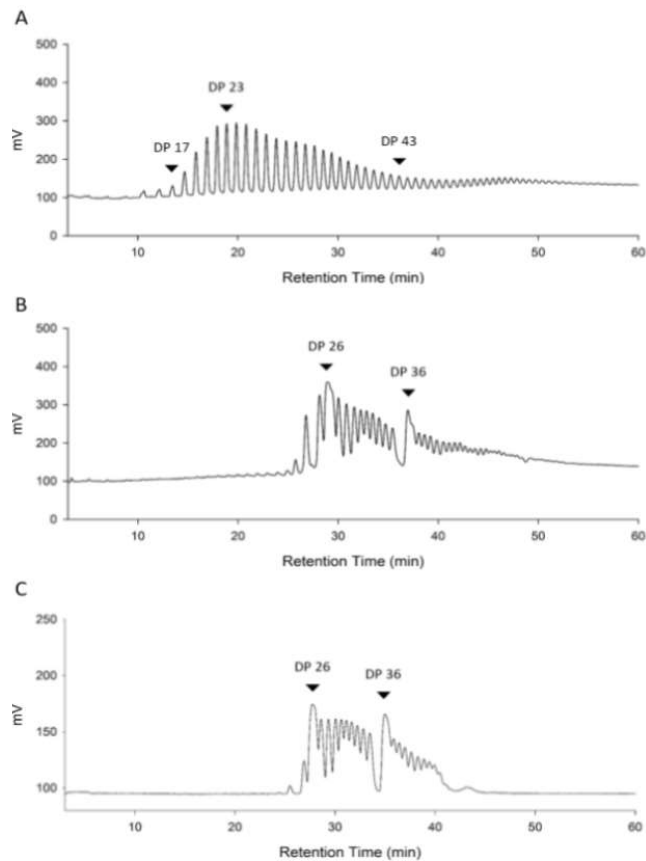


그림 49. HPAEC를 이용한 cycloamylose 중합도 분석 ((A) 고아밀로스 전분에 isoamylase 처리, (B) 제조한 cycloamylose, (C) Standard cycloamylose.

다) MALDI-TOF를 이용한 cycloamylose의 분자량 측정

환형아밀로스의 분자량을 분석한 결과, 생산된 cycloamylose는 DP 7에서 DP 41 범위의 중합도를 보였다(그림 50-A). 생산된 cycloamylose의 cyclic 여부를 확인한 결과 표 53에서 나타낸 cyclic glucan의 이론적인 값과 일치하여 cyclic한 glucan이 생성되었음을 확인하였다. Cycloamylose standard 물질의 분자량 분포와 비교하였을 때 standard 물질에는 없는 DP 7에서 DP 16 범위의 낮은 중합도를 갖는 특성을 보였으며 DP 23 부터 그 이상의 중합도 범위까지는 standard cyclodamylose와 매우 유사함을 알 수 있었다(그림 50-B).

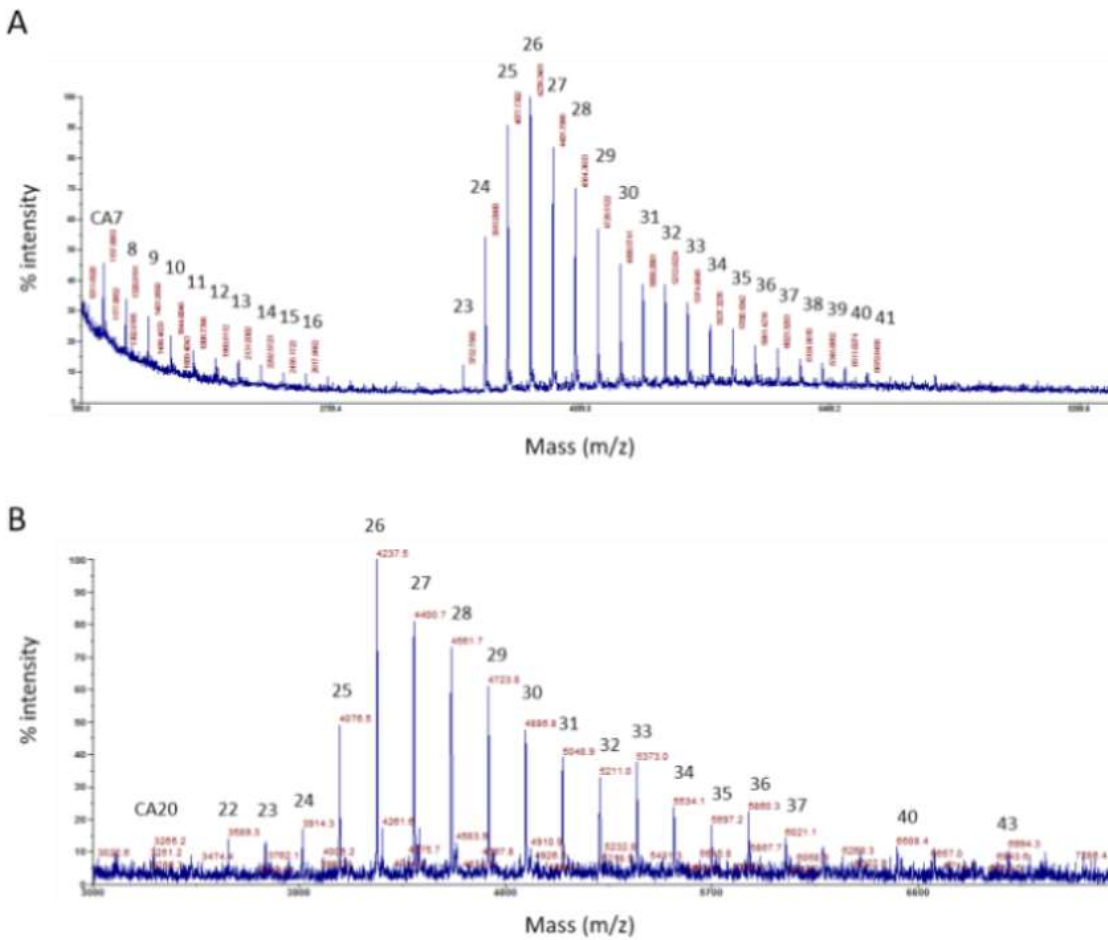


그림 50. MALDI-TOF를 이용한 제조된 cycloamylose(A)와 standard cycloamylose(B)의 분자량 분포.

표 61. Cyclic glucan과 noncyclic glucan의 이론적 분자량 및 MALDI-TOF를 이용하여 측정된 standard CA와 생산된 CA의 실험적 분자량.

Compound (DP)	Mass (Da)			
	Theoretical		Experimental	
	Non cyclic glucan ^a	Cyclic glucan ^b	Standard CA	Production CA
7	1175	1157		1157
8	1337	1319		1320
9	1499	1481		1481
10	1661	1643		1644
11	1823	1805		1806
12	1985	1967		1968
13	2147	2129		2131
14	2309	2291		2292
15	2471	2453		2456
16	2633	2615		2617
17	2795	2777		
18	2957	2939		
19	3119	3101		
20	3281	3263		
21	3443	3425		
22	3605	3587		
23	3767	3749		3752
24	3929	3911		3915
25	4091	4073	4076	4077
26	4253	4235	4237	4239
27	4415	4397	4401	4401
28	4577	4559	4562	4564
29	4739	4721	4724	4726
30	4901	4883	4887	4888
31	5063	5045	5049	5050
32	5225	5207	5211	5212
33	5387	5369	5373	5374
34	5549	5531	5534	5537
35	5711	5693	5697	5700
36	5873	5855	5860	5861
37	6035	6017	6021	6023
38	6197	6179		6184
39	6359	6341		6346
40	6521	6503		6511
41	6683	6665		6670

a calculated as $162n + 18 + 23Da$, 18Da the additional mass of a reducing end residue.
b calculated as $162n + 23Da$, in which 162 Dais the mass of a glucosyl residue, n DP, and 23Da the mass of sodium ion.

(3) 환형아밀로스와 천연 항균/항산화소재와의 나노복합체 제조조건 최적화

가) 나노복합체 내 코어소재의 정량화

나노복합체 내 코어소재 정량분석결과, 285nm에서 흡광도가 증가하여 carnosic acid의 흡광 파장임을 확인하였으며 기존 연구(Zhang *et al.*, 2012)와 일치함을 알 수 있었다(그림 51-A). Carnosic acid 표준물질을 이용하여 0부터 0.015%까지의 농도 범위에 대해 흡광도를 측정하였고 이를 이용하여 standard curve를 얻을 수 있었다(그림 51-B). 따라서 포접 복합체 내의 carnosic acid의 농도는 standard curve로부터 얻은 $y=83.881x+0.0046$ 의 수식 이용하여 역으로 계산하여 구하였다.

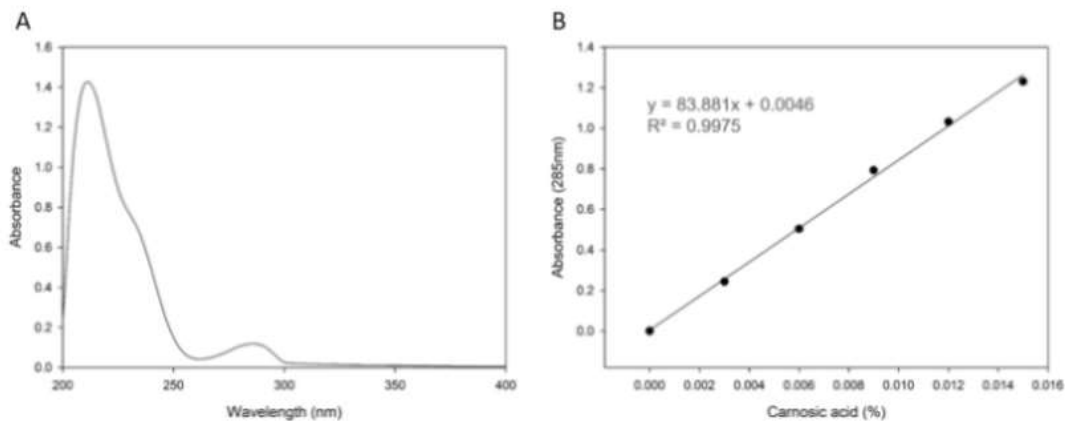


그림 51. (A) UV-vis spectrophotometer를 이용한 carnosic acid의 흡광 스펙트럼, (B) Carnosic acid 농도에 따른 흡광도 standard curve.

나) 나노복합체 제조 조건 최적화

나노복합체 제조 최적화 실험결과, cycloamylose의 농도가 0에서 30%로 증가할수록 포접 된 carnosic acid의 농도는 약 0.03%에서 0.09%로 3배가량 증가하였으며, 나노복합체 제조 시 반응 시간은 피복소재의 모든 농도에 대해서 48시간째에 평형에 도달하였다(그림 52-A). 이와 같은 결과를 토대로 나노복합체 제조 시 코어소재의 농도에 따라 피복소재의 농도를 결정하여 사용하였으며 반응 시간은 48시간으로 동일하게 하였다. 비교 물질로서 사용된 β -cyclodextrin은 피복소재의 낮은 용해도(1.8%)로 인해 0.25부터 2%까지 사용하였으며, 피복소재의 농도가 0.25에서 2%까지 증가할수록 포접 된 carnosic acid의 농도는 반응 48시간에서 0.048%에서 0.059%로 약 1.2배 증가하였다(그림 52-B). β -cyclodextrin을 피복소재로 사용하였을 경우 cycloamylose와 다르게, 반응 초기에는 포접 되는 carnosic acid의 농도가 높았으나 시간이 지남에 따라 농도가 줄어드는 것을 확인하였다. 이는 cyclodextrin이 점점 aggregation 되어 용해도가 낮아지기 때문인 것으로 확인되었다.

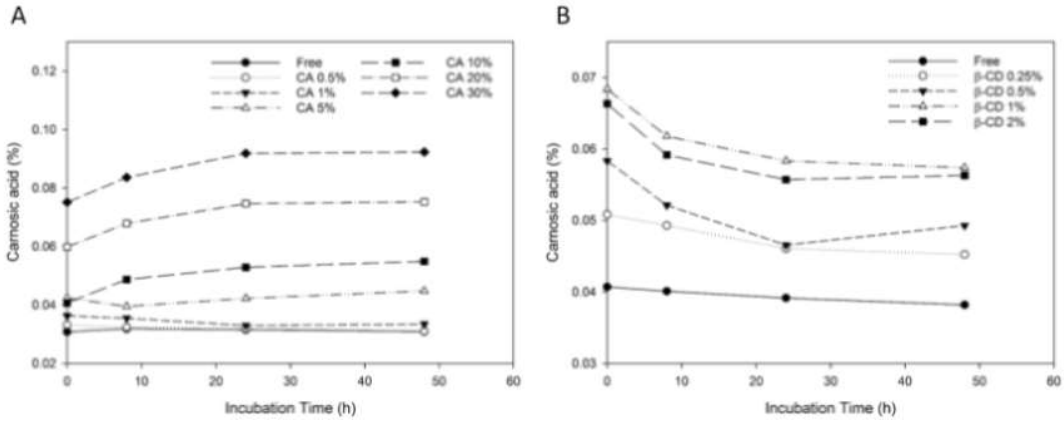


그림 52. 나노복합체 제조 조건(반응 시간, 농도) 최적화. (A) Cycloamylose(CA)의 농도 및 반응 시간에 대한 포접된 carnosic acid의 농도 분석, (B) β -cyclodextrin (β -CD)의 농도 및 반응 시간에 대한 포접된 carnosic acid의 농도 분석.

다) 나노복합체의 용해도 측정

각 피복소재 별 농도에 대한 carnosic acid의 용해도를 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 측정한 결과, cycloamylose를 30%까지 사용하였을 때 carnosic acid의 용해도는 0.033%에서 0.095%로 약 3배 증가하였고, cycloamylose가 가지는 높은 용해도(30%)로 인해 농도가 높을수록 코어소재의 용해도도 증가하는 양상을 보였다 (그림 53). β -cyclodextrin의 경우 낮은 농도에서 높은 용해도를 나타내었으며 2%에서 가장 높은 용해도(0.057%)를 나타내었다. 이는 β -cyclodextrin 자체의 낮은 용해도(1.8%)의 영향으로 인해 2%이상의 농도에서는 aggregation이 일어나면서 용해도가 감소하는 경향을 보인 것으로 추측된다. Maltodextrin의 경우, 30%까지 사용하였을 때 용해도가 가장 높았으며, 값은 0.066%로 측정되었고 control에 비해 약 2배 증가하였다. 이와 같은 결과로부터 난용성의 코어소재가 피복소재와 복합체를 형성하면서 용해도가 증가한 것을 확인하였으며, 각 피복소재의 용해도 또한 영향을 주는 것으로 해석할 수 있다. 또한, 각 피복소재에 대한 최대 용해도는 cycloamylose > maltodextrin > β -cyclodextrin 순으로 나타났다.

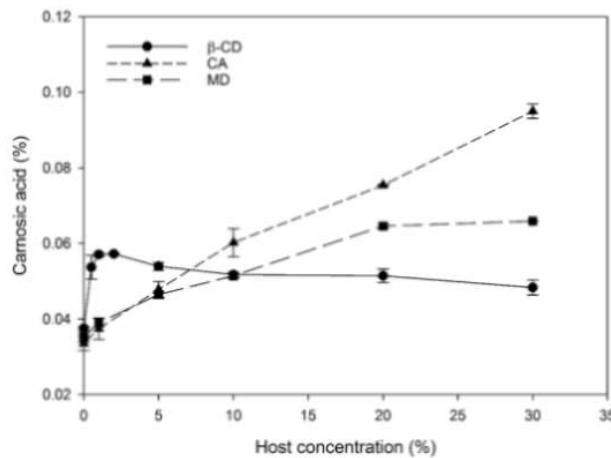


그림 53. Cycloamylose(CA), maltodextrin(MD), β -cyclodextrin(β -CD)의 각 농도에 대한 carnosic acid의 용해도 비교.

라) 나노복합체의 형성능 규명

① Differential scanning calorimetry (DSC) 분석

DSC 분석결과, 로즈마리 추출물과 cycloamylose의 물리적 혼합물과 형성된 나노복합체의 DSC 열주사 곡선은 서로 다른 형태를 보였다 (그림 54). 물리적 혼합물(그림 54-C)의 경우 로즈마리 추출물(Fig. 3-11A)에서 관찰된 온도인 140~180°C에서 용융 peak을 나타낸 반면, 나노복합체(그림 54-D)는 로즈마리 추출물 고유온도에서 변곡점이 나타나지 않았으며, cycloamylose(그림 54-B)와 유사한 열주사 곡선을 나타내었다. 코어소재에 피복소재가 복합체를 형성할 때 guest 분자가 host의 cavity 또는 crystal lattice에 들어가게 되면 complex의 melting, boiling 또는 sublimation point가 일반적으로 사라지거나 다른 온도로 shift 된다. 따라서, 로즈마리 추출물의 기능성 소재가 cycloamylose와 나노복합체를 형성하였음을 알 수 있었다.

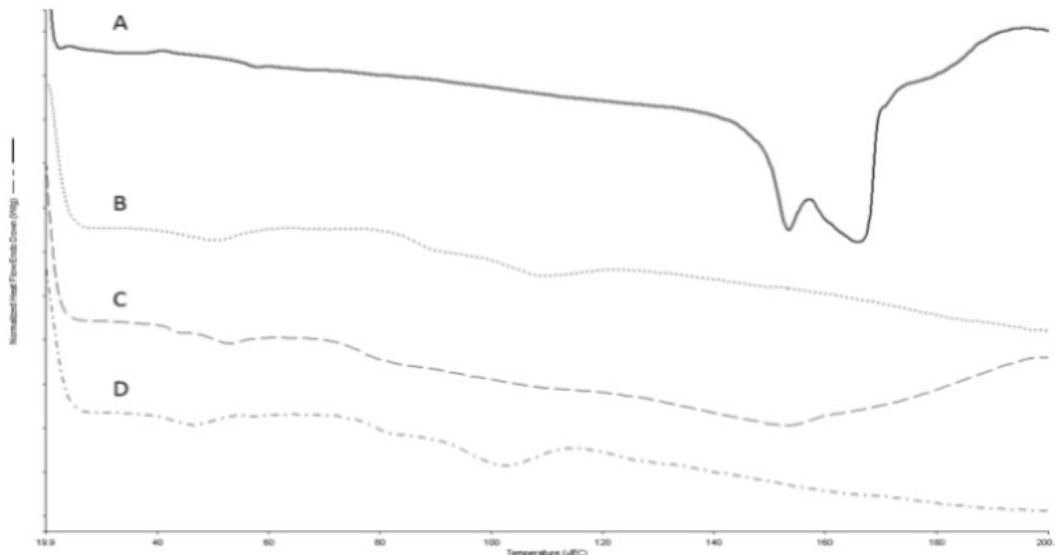


그림 54. Differential scanning calorimetry (DSC) 열주사 곡선. (A) 로즈마리 추출물, (B) cycloamylose, (C) 로즈마리 추출물/cycloamylose의 physical mixture, (D) 로즈마리 추출물/cycloamylose의 나노복합체

② Powder X-ray diffraction (XRD) 분석

실험결과, 로즈마리 추출물의 XRD 패턴은 여러 개의 결정 peak를 확인할 수 있었으며 (그림 55-A), cycloamylose의 경우 고유의 결정 peak를 보이지 않는 것으로 나타났다(그림 55-B). 이러한 특징적인 XRD 패턴을 이용하여 로즈마리 추출물/cycloamylose의 물리적 혼합물과 나노복합체를 비교하였다. 물리적 혼합물은 $2\theta = 5$ degree 및 10~20 degree 에서 나타나는 로즈마리 추출물 결정 peak와 cycloamylose의 XRD 패턴이 공존하는 결과를 보였다(그림 55-C). 나노복합체는 cycloamylose와 유사한 XRD 패턴을 보였으며, 로즈마리 추출물의 결정 peak는 나타나지 않았다(그림 55-D). 이러한 결과는 로즈마리 추출물과 cycloamylose가 복합체를 형성함으로써 로즈마리 추출물의 결정성을 크게 감소시킨 것으로 보여 진다.

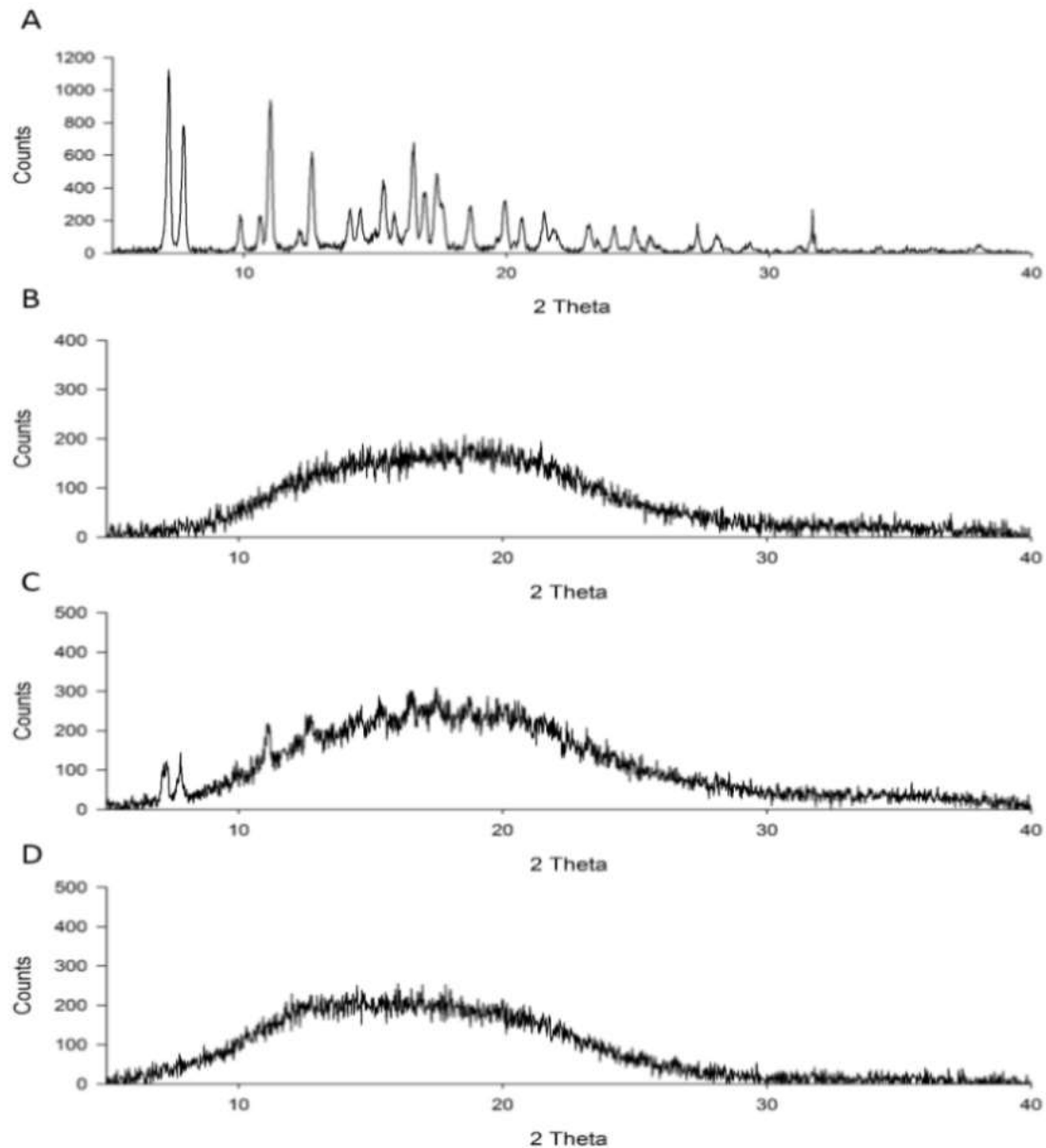


그림 55. X-ray diffraction(XRD) 패턴. (A) 로즈마리 추출물, (B) cycloamylose, (C) 로즈마리 추출물/cycloamylose의 physical mixture, (D) 로즈마리 추출물/cycloamylose의 나노복합체

③ Field-Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) 분석

분석결과, cycloamylose는 평평하고 각진 구조를 가지는 것으로 나타났으며(그림 56-A), 로즈마리 추출물은 결정성 구조를 가지는 것으로 나타났다(그림 56-B). 물리적 혼합물에서는 cycloamylose와 로즈마리 추출물이 서로 혼합되어 각자의 구조를 유지하고 있는 것을 볼 수 있다(그림 56-C). 반면, 나노복합체의 경우 cycloamylose의 평평하고 각진 구조는 사라지고 로즈마리 추출물과 뒤섞여 불규칙적인 구조를 형성하고 있음을 확인할 수 있었으며, 물리적 혼합물에서 보이는 큰 입자 상태의 로즈마리 추출물은 관찰되지 않았다. SEM 측정 결과를 통해 나노복합체가 각 물질들이 가지는 기존의 구조와는 다른

새로운 구조를 형성하는 것을 확인 할 수 있었으며, 이는 앞의 XRD 결과와 같이 나노복합체에서 로즈마리 추출물의 결정성이 사라졌기 때문이라 생각된다.

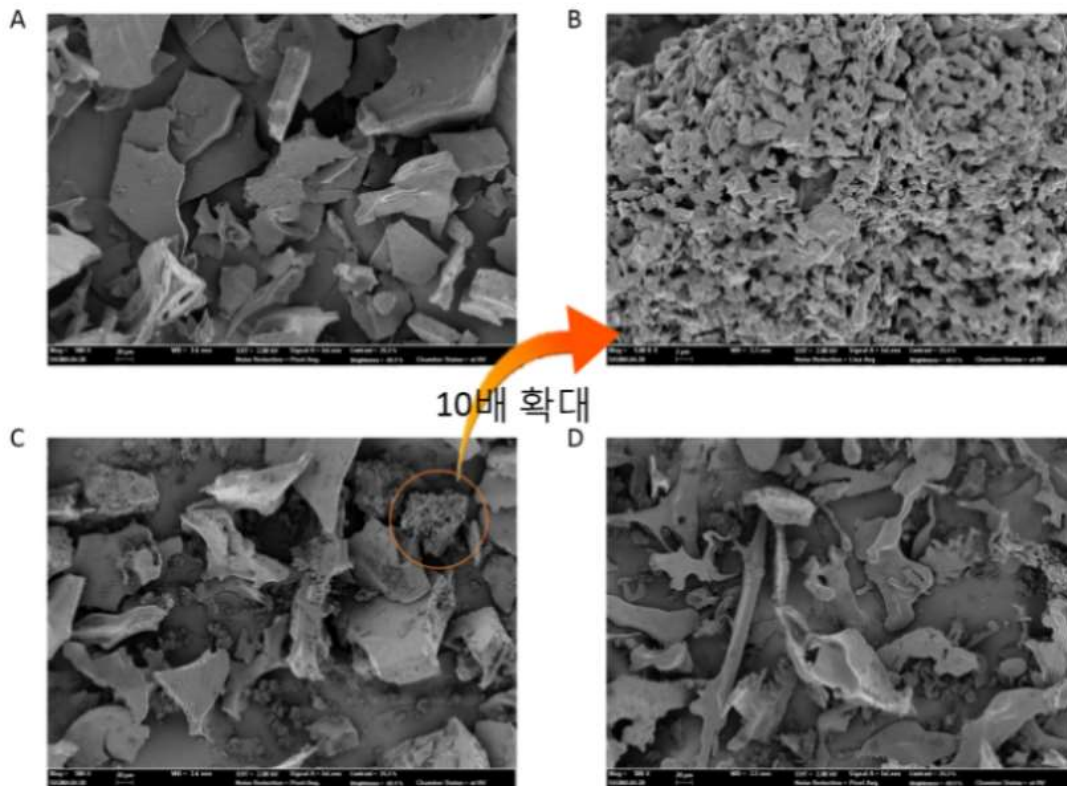


그림 56. Field-Emission Scanning Electron Microphotographs. (A) cycloamylose(500X), (B) 로즈마리 추출물(5000X), (C) 로즈마리 추출물/cycloamylose의 물리적 혼합물(500X), (D) 로즈마리 추출물/cycloamylose의 나노복합체(500X)

(4) 천연 향균/항산화 물질의 나노복합체에서의 기능성 분석

가) 나노복합체의 항균력 분석

항균력 분석결과, 나노복합체를 형성하지 않은 control의 MIC값은 45.21ppm으로 측정되었고, 30% cycloamylose를 사용한 나노복합체의 MIC값은 7.63ppm으로 측정되었으며 피복소재의 농도가 높을수록 MIC값이 낮아지는 경향성을 나타내었다(그림 57 및 표 63). Maltodextrin을 사용한 나노복합체의 경우에도 control에 비해 피복소재의 농도가 증가할수록 MIC값이 낮아졌으며, cycloamylose와 비슷한 경향성을 보였다. 이와 같은 결과는 피복소재로 사용된 cycloamylose와 maltodextrin이 5% EtOH 용매 내에서 불안정한 코어소재를 안정화시켜 주어 항균력을 유지할 수 있도록 해주기 때문인 것으로 추측된다.

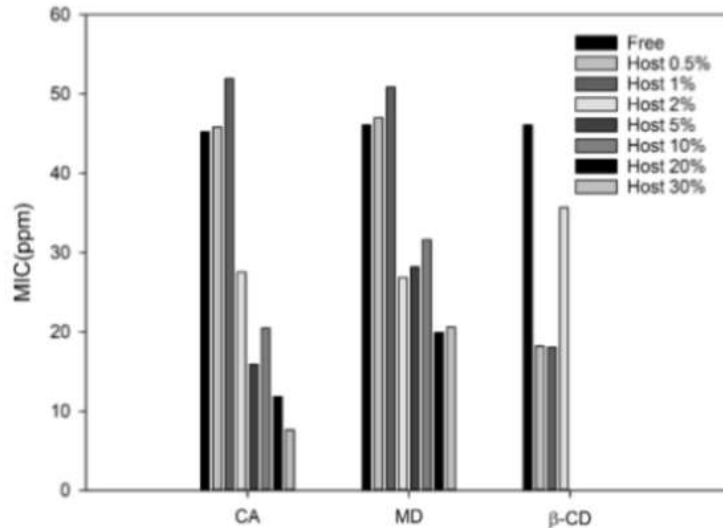


그림 57. Cycloamylose(CA), maltodextrin(MD), β-cyclodextrin(β-CD)의 각 농도에 대한 항균력(MIC) 측정

표 63. 각 피복소재의 농도별 MIC 측정값

Host concentration (%)	MIC (ppm)		
	CA	MD	β-CD
Free	45.21	46.11	46.11
carinosic acid			
0.5	45.81	47.00	18.16
1	51.92	50.88	18.05
2	27.52	26.85	35.65
5	15.89	28.19	-
10	20.47	31.62	-
20	11.82	19.91	-
30	7.63	20.58	-

Ethanol의 농도에 따른 항균력의 변화를 확인하기 위해, 5% EtOH과 50% EtOH 용매 내에서 코어소재의 안정화 및 항균력의 차이와 나노복합체 제조 시 필요한 incubation 시간에 대한 코어소재의 항균력 변화를 비교하였다 (표 64). 실험결과, 나노복합체 제조 시간을 1시간 내로 하였을 경우 50% EtOH에서의 MIC값은 8.7ppm이었고, 5% EtOH에서의 MIC값은 14.13ppm으로 측정되었다. 이는 난용성의 코어소재가 용매로 사용되는 EtOH의 농도에 따라 기능성에 영향을 받는 것으로 추측되며, 50% EtOH보다 5% EtOH에서 불안정한 것으로 보여 진다. 또한, 나노복합체 제조 시간을 48시간으로 하였을 경우에는 50% EtOH에서의 MIC값이 9.14ppm으로 초기 값과 비교하였을 때 큰 차이가 없었으나, 5% EtOH에서의 MIC값은 49.53ppm으로 측정되어 초기 값에 비해 확연히 높아진 결과를 나타내었다. 따라서 코어소재가 5% EtOH 용매 내에서 보관되는 시간이 길어질수록 기능성이 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며, cycloamylose와 maltodextrin이 이러한 코어소재를 안정화시켜 주어 항균력이 유지되는 것으로 보여 진다.

β -cyclodextrin의 경우 0.5%와 1%를 사용하였을 때는 MIC값이 약 18ppm으로 낮아졌지만 2%에서는 35.65ppm으로 다시 높아지는 결과를 나타내었다. 이러한 이유는 cyclodextrin이 시간이 지남에 따라 aggregation 되며 이러한 현상이 carnosic acid의 항균력에 영향을 주는 것으로 보여 진다.

표 64. EtOH 농도와 incubation 시간에 따른 코어소재의 MIC 측정값 비교

Incubation time (h)	MIC (ppm)	
	50% EtOH	5% EtOH
1	8.70	14.13
48	9.14	49.53

나) 나노복합체의 항산화능 분석

실험결과, 복합체를 형성하지 않은 carnosic acid의 항산화능은 38.30%로 나타났으며, cycloamylose 농도에 따른 항산화능은 약 38~42%로 control과 유사하였으며, 농도에 따른 경향성은 보이지 않았다(표 65). 또한, 비교 물질로 사용한 β -cyclodextrin과 maltodextrin의 경우에도 농도에 따른 항산화능의 차이는 거의 없었다. 따라서 피복소재의 종류 및 농도는 로즈마리 추출물의 항산화능에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

표 65. 피복소재의 종류 및 농도에 따른 코어소재의 항산화능 비교

Host material	Antioxidant activity (ABTS radical scavenging activity %)							
	Host concentration (wt %)							
	0	0.5	1	2	5	10	20	30
control	38.302							
CA		38.395	39.085	40.241	39.799	42.477	41.260	40.667
β -CD		39.698	40.199	40.930	40.510	40.389	39.767	40.544
MD		38.712	40.379	38.050	38.178	37.928	39.489	41.075

(5) 천연 항균/항산화 물질의 나노복합체에서의 안정성 분석

가) 나노복합체의 열안정성 분석

Control의 항산화능은 39.84%에서 열처리(90°C, 24시간) 후 16.9%로 감소하였다. Cycloamylose의 경우에는 피복소재의 농도가 증가할수록 항산화능의 감소량이 줄어들어 열안정성이 있음을 확인하였으며, 30% cycloamylose에서는 항산화능이 43.05%에서 29.9%로 감소하여 control에 비해 천천히 항산화능이 떨어지면서 약 2배정도의 열안정성을 보였다 (그림 58-A).

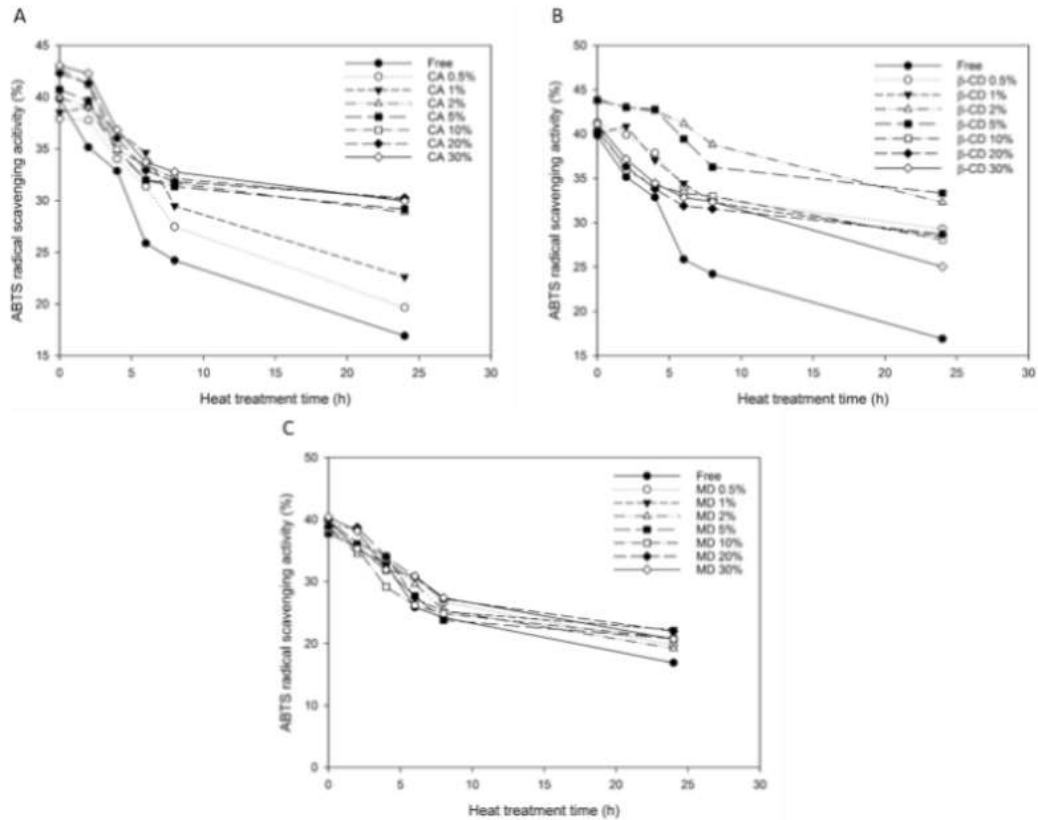


그림 58. 피복소재 농도에 따른 나노복합체의 열안정성
 ((A) cycloamylose, (B) β -cyclodextrin, (C) maltodextrin)

β -cyclodextrin의 경우, 피복소재의 농도가 5%에서 가장 항산화능이 적게 감소하였으며, 그 값은 43.8%에서 33.3%로 감소하였다(그림 58-B). 또한, 10%이상의 농도에서는 오히려 안정성이 감소하였는데 이는 높은 농도일수록 안정성이 증가하는 cycloamylose와는 다른 양상을 보였다. Maltodextrin의 경우, control에 비해 안정성이 약간 증가하지만 농도에 따라서는 큰 차이를 보이지 않았다(그림 58-C). 따라서 코어소재의 열안정성을 증진시켜 주는 피복소재로는 cycloamylose와 β -cyclodextrin으로 확인되었다.

각 피복소재의 농도에 따른 열안정성을 비교한 결과, 낮은농도의 피복소재(0.5-5%)에서는 β -cyclodextrin > cycloamylose > maltodextrin 순으로 열안정성에 기여하는 것으로 나타났으며(그림 59-A~D), 10% 이상의 피복소재 농도에서는 cycloamylose > β -cyclodextrin > maltodextrin 순으로 열안정성에 기여하는 것으로 나타났다(그림 59-E~G).

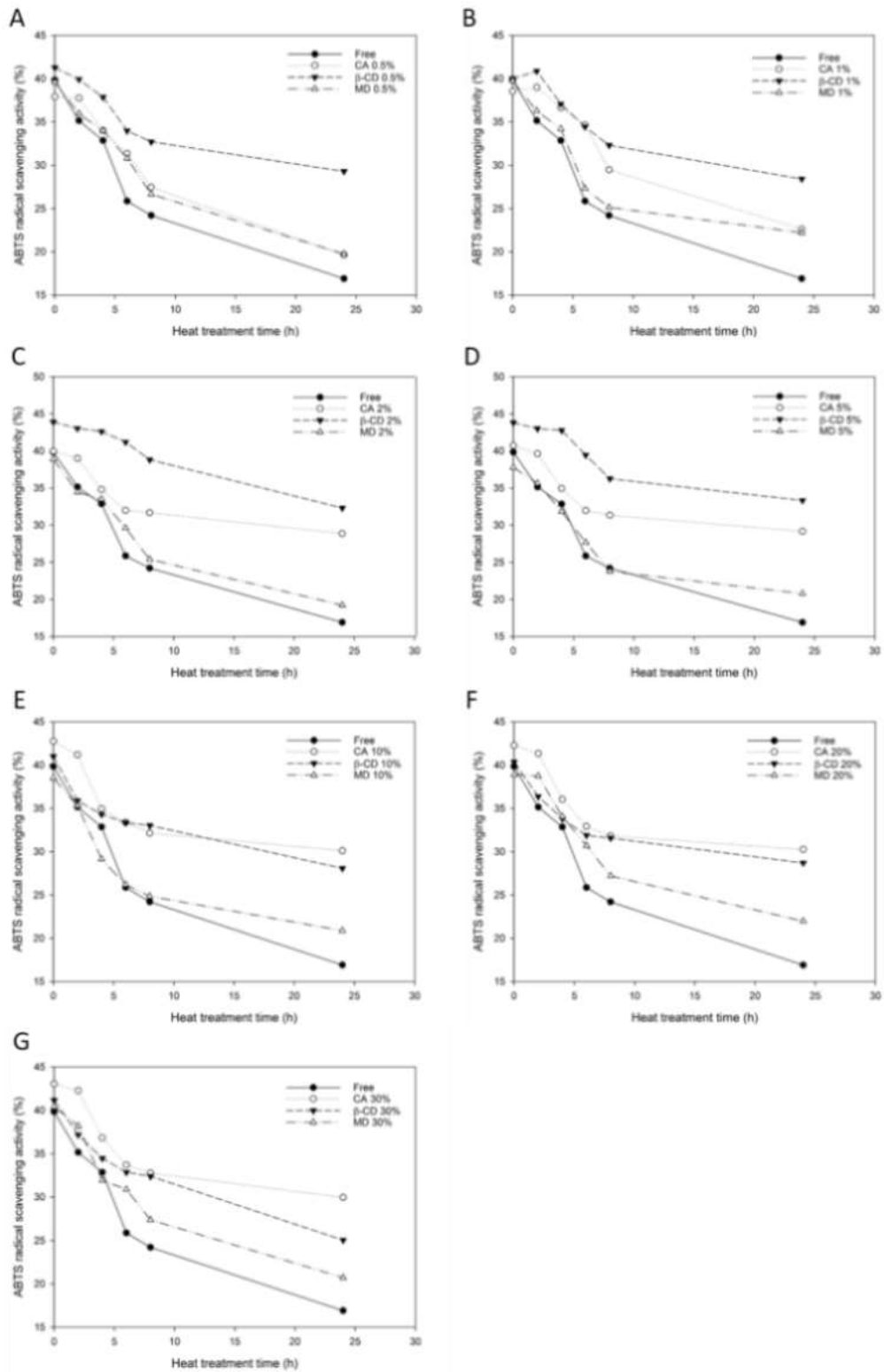


그림 59. 농도에 따른 각 피복소재의 열안정성 비교
 ((A) 0.5%, (B) 1%, (C) 2%, (D) 5%, (E) 10%, (F) 20%, (G) 30%)

나) 나노복합체의 광분해 안정성 분석

복합체를 형성하지 않은 carnosic acid의 항산화능은 36.76%로 나타났으며 24시간 동안 UVB 조사 후에는 9.22%로 감소하였다. Carnosic acid가 cyclodextrin과 나노복합체를 형

성한 경우에는 cycloamylose의 농도가 증가할수록 항산화능의 감소량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었으며, 30% cycloamylose에서는 항산화능이 38.27%에서 18.45%로 감소하여 control에 비해 약 1.9배 광분해 안정성을 보여 cycloamylose가 로즈마리 추출물과 복합체를 형성함으로써 기능성 물질을 안정화시켜 안정성이 증가한 것으로 생각된다(그림 60-A). 앞서 보여진 열안정성 실험 결과와 비교했을 때 로즈마리 추출물은 열에 의한 degradation보다 UV에 의한 degradation이 더 급속도로 일어났다. 피복소재의 비교 물질로 β -cyclodextrin의 경우 0.5~5% 범위에서 높은 안정성을 나타냈으며 1%, 24시간일 때 항산화능이 항산화능이 27.08%로 초기 40.39%보다 감소하였지만 다른 농도의 β -cyclodextrin 보다 안정한 값을 보다(그림 60-B). 이는 control과 비교하여 약 2.7배 안정성이 향상되었으며, cycloamylose 보다는 약 1.4배 안정적인 것을 알 수 있었다. 반면, β -cyclodextrin의 10~30% 범위에서는 안정성이 오히려 감소하였는데, 이는 고농도의 β -cyclodextrin이 용해되지 못하고 aggregation 되는 현상으로 인해 복합체를 형성한 로즈마리 추출물도 함께 aggregation 되면서 항산화능이 감소하는 것으로 보여 진다. Maltodextrin의 경우에는, 0.5~5% 범위에서는 control과 큰 차이가 없었지만, 10% 이상의 농도에서는 안정성에 기여하는 결과를 나타내었다(그림 60-C). 가장 안정적인 조건은 30% 였으며 control에 비해 약 1.3배 안정성이 향상되었다(41.75% \rightarrow 13.91%).

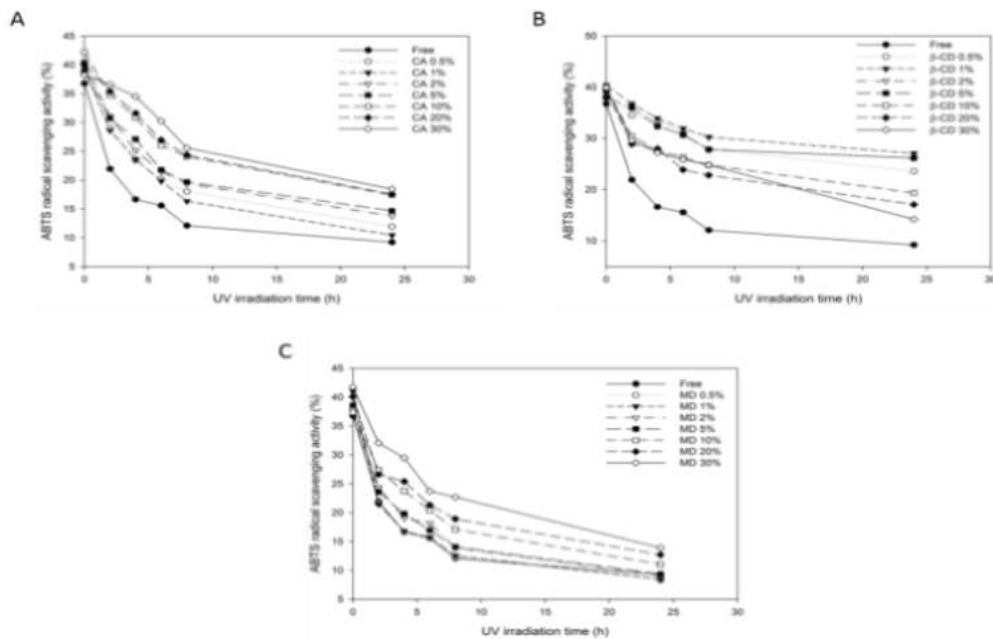


그림 60. 피복소재 농도에 따른 나노복합체의 광분해안정성 ((A) cycloamylose, (B) β -cyclodextrin, (C) maltodextrin)

각 피복소재의 농도에 따른 광분해안정성을 비교한 결과, 낮은농도의 피복소재(0.5-10%)에서는 β -cyclodextrin > cycloamylose > maltodextrin 순으로 광분해안정성에 기여하였으며(그림 61-A~E), 피복소재의 농도가 20% 이상에서는 cycloamylose > β -cyclodextrin > maltodextrin 순으로 광분해안정성에 기여하는 것으로 나타났다(그림 61-F~G).

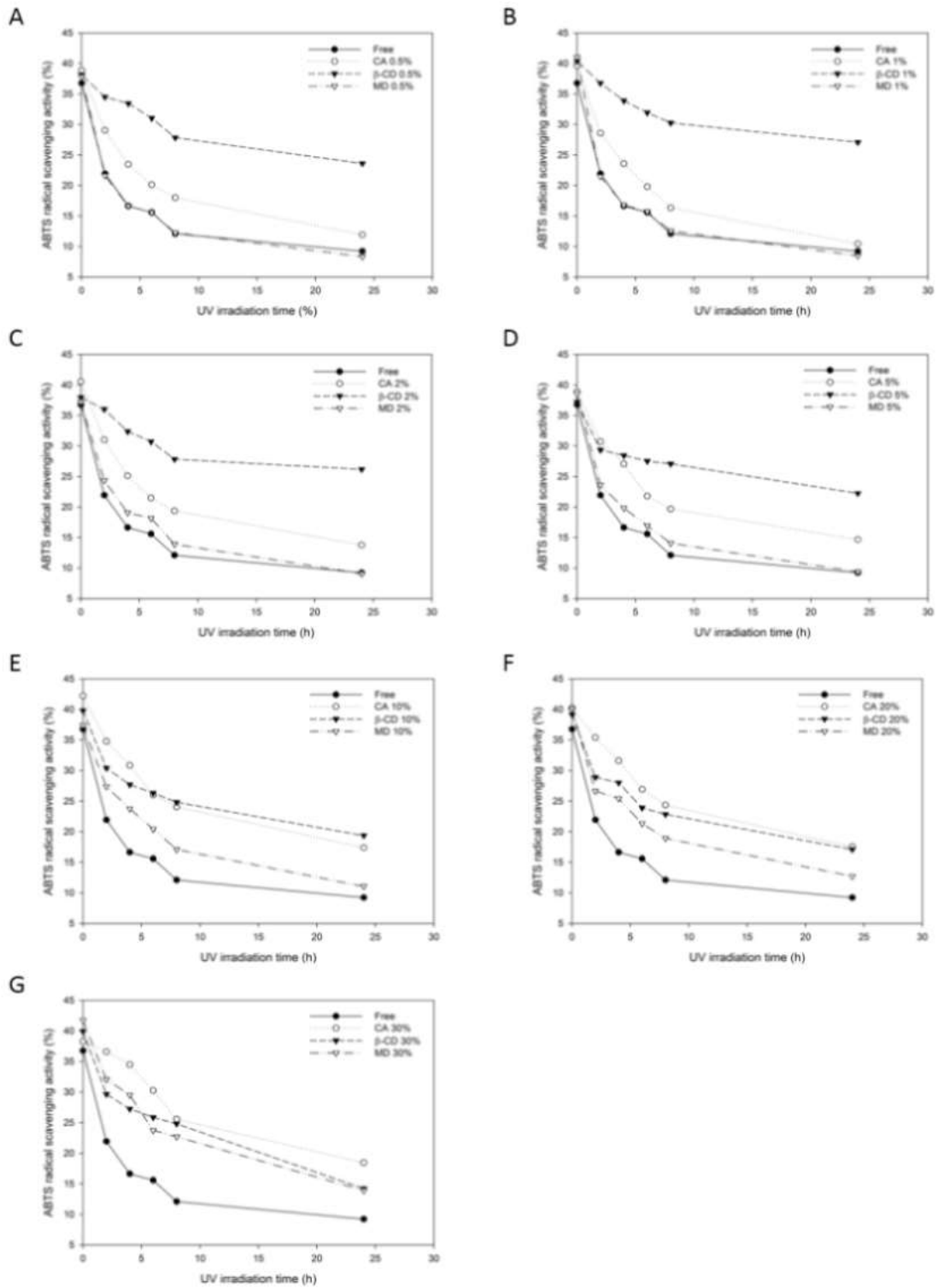


그림 61. 농도에 따른 각 피복소재의 광분해안정성 비교
 ((A) 0.5%, (B) 1%, (C) 2%, (D) 5%, (E) 10%, (F) 20%, (G) 30%)

(6) 나노에멀전의 물리화학적 특성 및 안정성 분석

가) O/W 나노 에멀전의 물리화학적 특성분석

SPI에 의해 안정화된 에멀전을 제외하고, 모든 에멀전이 200nm 이하의 입자크기를 나타냈다 (그림 62-A). SPI에 의해 안정화된 에멀전의 오일들은 300nm에서 350nm 범위의 입자크기를 나타냈다. Tween 20을 제외하고는 대부분 에멀전에서 오일의 양이 증가 할수록 입자크기가 증가하는 경향을 나타냈으나, Tween20로 안정화된 에멀전의 오일입자 크기는 오일의 양이 증가 할수록 오히려 입자크기가 감소하는 결과를 나타내었다. SPI로 안정화된 에멀전의 오일 입자크기는 다른 유화제로 안정화된 에멀전의 오일 입자크기와 비교하여 모든 오일 농도에서 입자 크기가 큰 것을 알 수 있었다. 다른 유화제들에 비해 본 연구의 제조조건에서는 SPI의 유화력이 가장 낮은 것으로 생각되며, 이는 SPI가 낮은 HLB값을 가지므로(유화제의 친수성부분은 작고 소수성부분은 큰 형태) 물에 잘 녹지 않아 O/W에멀전에서 불안정한 유화상태를 유지하고 있는 것으로 생각된다.

에멀전의 제타전위는 표면의 정전기적 반발력을 통한 콜로이드간의 안정성 유지를 위해서 매우 중요한 요소이다. 일반적으로 오일 표면에 제타전위가 존재하면 오일들이 서로 달라붙지 않아 오일들 간에 유착이 일어나지 않고 에멀전이 안정하다고 생각되어 지는데 +/- 30mV 정도일 때 가장 안정한 콜로이드 분산상을 이루는 것으로 알려져있다. 전위 값은 유화제에 따라 다른 값을 가지게 되는데 본 실험에서는 모든 에멀전의 제타전위가 음전하 (negative charge)를 나타내었다 (그림 62-B). 이는 사용된 유화제가 Tween 20를 제외하고 모두 천연 단백질류이기 때문이다. 단백질의 경우는 isoelectric point 아래의 pH에서는 양전하 (positive charge)를 나타내며, isoelectric point 이상의 pH에서는 음전하를 나타내는데, 본 연구에서는 pH 7에서 에멀전이 제조되었으므로, 모두 음전하를 나타내었다. Tween 20는 non-ionic surfactant로 이론상 전하를 띄지 않아야 하지만, 여러 가지 불순물이 제조과정 중 혼입되어 음전하를 나타낸다고 알려져 있다.

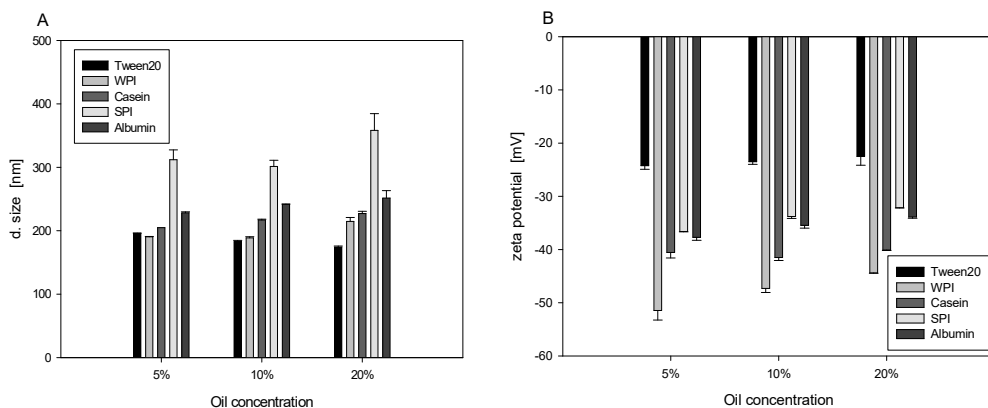


그림 62. 유화제와 오일농도별 에멀전 오일입자의 크기(A)와 전하(B)

나) O/W 나노 에멀전의 저장안정성 분석

실험결과, 7일과 14일을 제외한 30일 동안 저장한 결과, SPI를 유화제로 사용하고 오일 함량이 20%인 에멀전을 제외하면 대부분 에멀전의 입자크기가 30일 동안 크게 변화지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 3-20), SPI를 유화제로 사용한 O/W 에멀전의 경우에는 제조 직후에서 나타낸 결과와 같이 가장 불안정한 에멀전을 형성하였는데, 이는 본 연구에서 에멀전을 오일과 유화제 비율을 동일하게 5:1로 고정하여 제조하였기 때문에 초래되는 결과

라고 생각되며, SPI로 안정화된 에멀전의 경우는 오일과 유화제의 비율을 조정함으로써 안정한 에멀전을 제조할 수 있을 것으로 생각된다. 온도를 달리하여 저장안정성을 비교한 결과, 4℃와 25℃의 온도 수준에서는 에멀전의 안정성이 크게 영향을 받지 않는 것으로 생각된다.



그림 63. 유화제별 30일 동안의 오일입자 크기변화
(T=tween20, W=WPI, C=casein, S=SPI, E=egg albumin, 5, 10, 20 : 오일함량 (%))

2. 2차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) 코어소재 용해도 측정

가) 감초/ 로즈마리 추출물의 농도에 따른 standard curve

감초, 로즈마리 추출물의 물과 기름에 대한 용해도를 알아보기 위해 먼저 각 추출물의 농도에 따른 standard curve를 작성하였다. 먼저 감초와 로즈마리 추출물을 95% EtOH에 녹인 후 200nm~600nm 범위에서 UV-vis spectrophotometer (JP/UV-1650PC, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 흡광도 스펙트럼을 측정하였다.

나) 감초/ 로즈마리 추출물의 물, 기름에 대한 용해도

일정량의 감초와 로즈마리 추출물(0.1 wt%)을 물, 기름에 넣은 후 sonicator(Powersonic 410, Hwasin, Korea)로 30분 동안 초음파 처리 후 50℃에서 3시간 동안 충분히 교반시키며 녹여 주었다. 녹지 않은 추출물은 원심분리기(Supra 22K, Hanil Sci. Co., Korea)를 이용하여 원심분리 하였고(14,795xg, 20분) 상층액만 취하여 실험에 사용하였다. Standard curve로부터 얻은 수식을 이용하여 상층액에 녹아 있는 코어소재 양을 계산 하였고, 처음 양과 비교하여 각각의 용해도를 구하였다.

(2) O/W 나노에멀션 제조

가) 유화제 선택

O/W 나노에멀션을 제조하기 위해서 합성 유화제와 천연 유화제를 각각 2종류씩 선택하였다. 합성 유화제로는 decaglycerol laurate와 decaglycerol monooleate를 사용하였으며, 천연 유화제로는 whey protein isolate와 casein을 사용하였다. 선택된 모든 유화제들은 친수성을 띄었으며 물에 잘 용해되었다(HLB value > 8).

나) 에멀션 제조 및 조건 최적화

일반적으로 기름과 유화제의 비율이 10대 1까지는 안정화된 에멀션을 만들 수 있는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 단백질 유화제의 유화력을 고려하여 기름과 유화제의 비율을 6대 1로 진행하였다. 먼저 오일의 0.3 wt%(3,000ppm)에 해당하는 코어소재(감초, 로즈마리)를 기름에 용해시켜 유상(lipid phase)을 준비하였고, 수상(aqueous phase)은 각각의 유화제를 기름과 유화제의 비율이 6:1이 되게 하는 농도로 5mM phosphate buffer안에 용해시켜 제조하였다. 유화제가 용해되어 있는 수상에 코어소재가 용해되어 있는 유상을 첨가하여 섞은 후(10wt%), 균질기(T25 digital ULTRA-TURRAX®, IKA, Germany)로 12,000rpm에서 1분 동안 균질화시켜 coarse 에멀션을 제조하였다.

(3) 나노에멀션의 물리화학적 특성 및 안정성 분석

가) 광학 현미경을 통한 O/W 에멀션 생성여부 관찰

제조된 에멀션은 광학현미경을 이용하여 W/O 에멀션 생성 여부를 관찰하였다. 현미경의 접안렌즈의 배율은 x10이었으며 대물렌즈를 저배율에서 고배율로 높여가며 관찰하였다.

나) O/W 나노 에멀션의 저장 안정성 분석

다양한 유화제(Decaglycerol laurate, decaglycerol monooleate, wpi, casein)로 만든 나노 에멀션의 저장 안정성을 확인하기 위해서 제조된 에멀션들을 25°C 실온에 저장하면서 4주 동안 평균 입도 크기와 전기적 전위(제타포텐셜) 차이 변화를 분석하였다. 입도 변화와 전위차는 레이저 입도 분석기(Zetasizer ZS90, Malvern, UK)를 통하여 측정하였고 저장 기간 중 단백질 유화제의 부패를 방지하기 위해서 아지드화 나트륨(sodium azide)용액 0.02w/v%를 첨가해 주었다. 온도 이외의 요소를 방지하기 위해서 암실에서 진행하였다.

다) 코어소재 첨가 나노에멀션의 항산화력 측정

항산화력이란 활성산소(O₂⁻, H₂O₂, OH 등)의 산화활동을 억제하거나 제거하는 힘을 말하는데 감초, 로즈마리와 같은 페놀화합물들은 예전부터 항산화력이 뛰어난 물질로 많이 알려져 있다. 위 실험에서는 단순히 코어소재가 녹아있는 기름의 항산화력을 대조군으로 설정하고 그 기름으로 에멀션을 제조하면 항산화력이 어떻게 변화하는지에 대해 알아보았다. 항산화력 측정에는 DPPH assay를 사용하였는데 DPPH는 그 자체가 매우 안정한 Free radical로 517nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물인데 대표적인 항산화력 측정에 쓰이는 시약이다. 실험 시작 전 DPPH는 0.1mM이 되도록 EtOH에 잘 섞어 주었다(3.94mg in ethanol 100ml). 그 후 샘플 에멀션과 DPPH용액을 1:3의 비율로 brown tube에 넣어주고 vortexing한 후 30분 동안 암실에서 반응시켰다. 반응된 에멀션-DPPH용액은 UV-vis spectrophotometer를 통하여 517nm에서의 흡광도 값을 구하였고 식(Eq. 3-1)을 이용하여 항산화력을 나타냈다. 이 실험에서는 에멀션 자체의 혼탁함으로 인한 영향을 최소화하기 위해 모든 에멀션은 1/20으로 희석한 후 진행하였고 나온 결과에 희석 배수를 다시 곱해주었다.

$$\text{Eq. 3-1. Radical scavenging activity (\%)} = \frac{C - (S - B)}{C} \times 100$$

Where C= control, S= sample and B= blank

C는 control으로 0.1mM DPPH용액에 에탄올을 첨가해 준 것이며, S는 sample로 제조된 에멀션과 DPPH용액이 반응된 것이다. B는 코어물질이 들어가지 않고 제조된 에멀션과 DPPH용액을 반응 시킨 것으로 코어물질이 외에 항산화에 영향을 끼칠 수 있는 요인을 제거하기 위해 포함되었다.

라) 코어소재 첨가 나노에멀션의 광안정성 측정

코어소재가 기름에 단순히 녹아 있는 것에 비해 에멀션 시스템 지방입자에 함유되었을 때, UV에 의한 광안정성 효과가 있는지 알아보았다. 실험은 UV 광선을 샘플에 24시간 동안 쬐면서 특정 시간마다 코어물질의 잔존량을 측정하였다. 광안정성 실험은 평소 햇빛에 들어있는 자외선에서 UVA가 차지하는 비율이 UVB에 비해 훨씬 높으며 투과율도 높기 때문에 UVA 광선을 사용하였다. 먼저 Petri dish에 샘플을 각각 4 ml 씩 넣고 aqueous phase의 증발을 막기 위해서 sealing한 후 2/5/10/24시간 동안 UVA에 노출시켰다. 이때 각 시간마다 에멀션에 잔류하는 코어물질의 양을 측정하기 위해서 샘플을 95% EtOH과 함께 섞어 1분 동안 stirring한 후 원심분리하였고 상층액(코어물질이 녹아있는 EtOH)을 취하여 분석에 사용하였다. 감초는 230nm에서, 로즈마리는 280nm에서 흡광도 값을 측정하여 잔존량을 계산했다.

마) 코어소재 첨가 나노에멀션의 항균력 측정

항산화력과 마찬가지로 대부분의 페놀화합물은 항균력을 지니는 경우가 많은데 특히 감초와 로즈마리는 천연 항균제로 많이 알려져 있어 많은 연구가 진행되어 왔다. 하지만 에멀션 시스템에서의 항균관련 연구는 다른 시스템에 비해서 많이 보고된 바가 없는데 그 이유는 에멀션은 그 자체로 매우 혼탁한 양상을 가지고 있으므로 MIC test를 진행할 수도 없으며 대부분의 항균물질이 유상 안에 존재하여 agar well diffusion test나 paper disc assay를 진행하기에는 기름이 agar medium 속으로 충분한 확산이 일어나지 않기 때문이다. 본 실험에서도 MIC test와 paper disc assay를 먼저 시도하였지만 원하고자 하는 데이터를 얻지 못하였다. 따라서 time kill assay를 이용하여 항균력을 측정을 시도하였다. Time kill assay는 특정 시간동안 항균제와 균을 반응 시킨 후 반응물을 agar plate에 도말하여 처음대비 감소된 균의 CFU/ml 수치를 구하여 항균력 변화를 측정할 수 있다

먼저 일정한 *B.subtilis* 양을 실험에 적용하기 위해 균의 O.D.값(at 600nm)과 그때의 CFU/ml 값의 상관관계를 그래프로 나타내었다(Fig. 3-10). 이를 통해 O.D값이 0.1일 때 균의 농도가 3.4×10^6 CFU/ml 수준임을 알 수 있었으며, stock solution을 1/10로 희석하여 실험의 대조군으로 사용하였다. 결정된 농도의 *B.subtilis*는 감초, 로즈마리 추출물이 함유된 에멀션과 1:1(v/v%)로 첨가한 다음 rotator를 이용하여 30분 동안 반응시킨 후 NB plate에 도말하여 균의 집락 수를 관찰하였다(37°C에서 24시간 배양).

바) 섬기린초와 코어소재 첨가 나노에멀션의 항균력 시너지

수용성 소재인 섬기린초와 토복령 추출물의 첨가로 인한 나노에멀션의 항균력 시너지 효과를 측정하기 위하여 섬기린초와 토복령 추출물을 감초 및 로즈마리 에멀션의 물 층에 첨가한 후 항균력 변화를 측정하였다. 항균력테스트는 time kill assay로 진행하였고, 섬기린초와 토복령은 5mM phosphate buffer에 일정 농도(3,000ppm)를 첨가한 후 30분 동안 sonication시켜 녹여주었으며 녹지 않은 물질은 원심분리하여 제거하였다. 실험은 총 5가지 샘플에 일정량의 균을 넣어주고 각 조건에서 나온 균의 집락수를 계산하였다(Fig. 3-12).

(4) 로즈마리추출물과 Cycloamylose (CA) 복합체의 수용액에서의 안정성

로즈마리추출물에 함유된 항균 및 항산화 성분은 빛, 온도 등에 불안정한 특징을 가지는 것으로 밝혀진 바 있다. Zhang *et al.* (2012)은 로즈마리추출물의 유효 성분인 carnosic acid와 carnosol은 빛에 노출된 에탄올 용액에서 빠르게 분해되고, 높은 온도에서 분해가 더 잘 일어난다고 보고하였다. 본 연구팀은 1차년도 연구에서 로즈마리추출물과 CA 복합체의 자외선과 열에 대한 안정성을 테스트한 결과, CA가 로즈마리추출물의 유효성분을 보호해 줌으로써 자외선과 열에 대한 안정성을 높여줄 수 있음을 확인하였다. 이와 같은 연구 결과를 토대로 2차년도 연구에서는 CA가 로즈마리추출물 유효성분의 분해에 미치는 영향에 대한 자세한 기작을 밝히기 위한 추가적인 연구를 수행하였다. 또한 유효성분의 안정성에 자외선과 열뿐만 아니라 용매의 조건도 영향을 미치는지에 대한 연구도 함께 수행하였다.

가) 로즈마리추출물의 용매에 따른 안정성 및 HPLC를 이용한 분해 산물 분석

유효성분의 용매 조건에 따른 안정성 연구를 위해 용매 조건은 50% 에탄올과 5% 에탄올로 정하여 실험을 진행하였다. 로즈마리추출물 500 ppm을 50%와 5% 에탄올에 각각 녹인 후 상온에서 빛을 차단한 상태로 1시간 동안 교반하였다. 그런 다음 0.45 μ m filter를 이용하여 여과하였으며, 용액에 녹아 있는 carnosic acid의 함량을 HPLC system을 이용하여 측정하였다. 컬럼은 Lichrospher® 100 RP-18 (250 x 4.6, 5 μ m; Merck, Germany)를 사용하였고 이동상으로 65% ACN + 35% DW + 0.1% TFA를 사용하여 1 mL/min으로 흘러주었다.

나) 수용액에서 로즈마리추출물과 Cycloamylose (CA) 복합체의 안정성 분석

앞의 연구 결과, 5% 에탄올의 용매조건에서는 50% 에탄올 용매조건 보다 로즈마리추출물에 포함된 유효성분의 안정성을 크게 저하시키는 것을 확인하였다. 따라서 로즈마리추출물이 CA와 복합체를 형성하였을 때 5% 에탄올 수용액에서도 안정성 증대에 효과가 있는지 확인하기 위해 다음과 같은 연구를 수행하였다. 로즈마리추출물 500 ppm과 다양한 농도의 CA(1%, 5%, 10%, 20%, 30 wt.%)를 5% 에탄올에 녹인 다음 교반하여 복합체를 제조한 후 HPLC를 이용하여 저장 기간에 따른 안정성을 분석하였다.

다) 로즈마리추출물과 CA 복합체의 저장기간에 따른 항산화 활성 분석

앞선 연구 결과에서 CA 복합체는 수용액에서 로즈마리추출물의 분해산물 중 carnosol의 안정성 증진에 효과가 있음을 확인하였다. Carnosol은 carnosic acid와 마찬가지로 강력한 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있다(Richheimer *et al.*, 1996). 따라서 로즈마리추출물과 CA 복합체가 carnosol의 안정성 증진 효과로 인한 항산화 활성에 영향을 미치는지에 대한 조사를 진행하였다.

로즈마리추출물 500 ppm과 다양한 농도의 CA (1%, 5%, 10%, 20%, 30 wt.%)를 5% 에탄올에서 교반하여 복합체를 제조한 후 상온에서 빛을 차단하여 10일 동안 저장하였고, 저장 기간에 따라 샘플링 하여 ABTS 라디칼 소거능 측정 방법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 DW에 녹여 혼합하고,

상온에서 24시간 반응시킨 후 ABTS 양이온을 형성시켰다. ABTS 양이온이 포함된 용액을 DW로 희석하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.7이 되도록 준비하였다. ABTS 양이온 용액 900 μ L에 DW 90 μ L, 샘플 10 μ L를 가하여 상온에서 20분 동안 방치 후에 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 샘플을 녹인 용매인 5% 에탄올을 대조군으로 사용하여 다음의 식으로 라디칼 소거능을 상대적인 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity} = (1 - A_{\text{test}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

나. 연구 결과

(1) 코어소재 용해도 측정

가) 감초/ 로즈마리 추출물의 농도에 따른 standard curve

측정결과, 감초는 230nm에서, 로즈마리는 285nm에서 흡광도가 증가하여 각 표준물질의 흡광 파장임을 확인하였다. 구해진 흡광 파장대에서 감초는 0부터 0.002% 농도 범위에 대해, 로즈마리는 0부터 0.02% 농도 범위에 대해 흡광도를 측정하였고 이를 plotting하였다 (그림 64). 감초 추출물의 경우 $Y=0.0645X+0.0009$ 를, 로즈마리 추출물의 경우 $Y=0.0046X-0.0068$ 의 standard curve 수식을 얻었다.

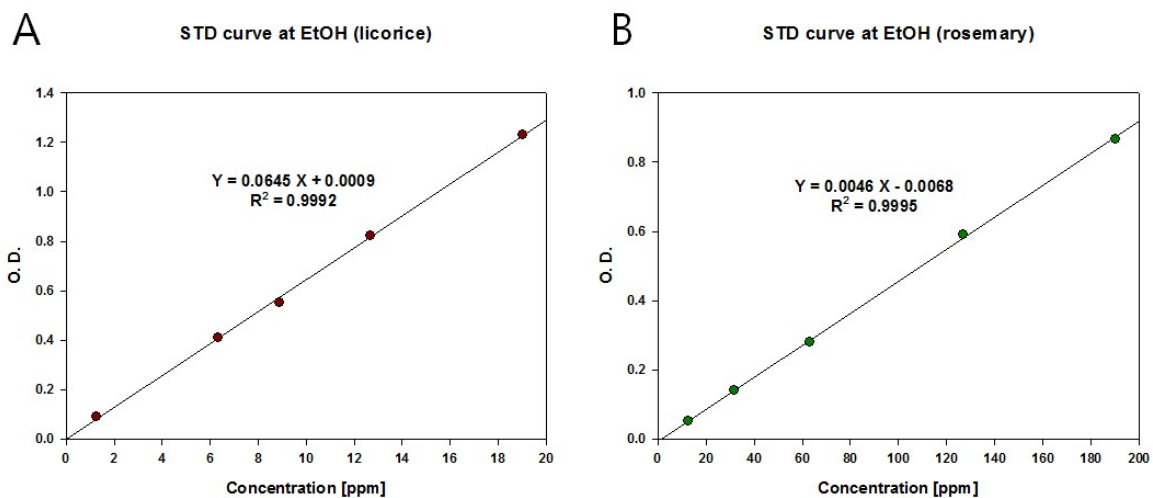


그림 64. 감초(A), 로즈마리(B) 추출물의 농도에 따른 standard curve

나) 감초/ 로즈마리 추출물의 물, 기름에 대한 용해도

실험 결과, 물에 대한 용해도는 감초와 로즈마리 추출물이 각각 4.5%, 42.4%를 보였고, 기름에 대한 용해도는 88.5%와 60.8%로 나타났다(표 66). 이와 같은 결과를 통해 감초 추출물이 로즈마리 추출물에 비해서 더욱 친유성(소수성)을 띄는 것을 알 수 있었다. 이는 두 추출물의 표준물질로 알려진 glabridin과 carnosic acid의 분자모형을 통해서도 그 결과를 유추해 볼 수 있는데, glabridin과 carnosic acid는 모두 벤젠고리를 가지고 있는 방향족 화합물로 소수성을 띄는 것처럼 보인다. 하지만 그중에서 carnosic acid는 glabridin

에 비해 분자량 대비 하이드록실기(-OH)와 카르복실기(-COOH) 등을 더 많이 가지고 있어 물에도 일정부분 녹을 것으로 예상된다(그림 65).

표 66. 감초, 로즈마리 추출물의 물/기름 용해도

Solubility [%]	Licorice extract	Rosemary extract
Water	4.5 ± 2.0	42.4 ± 3.9
Oil	88.5 ± 2.7	60.8 ± 2.4

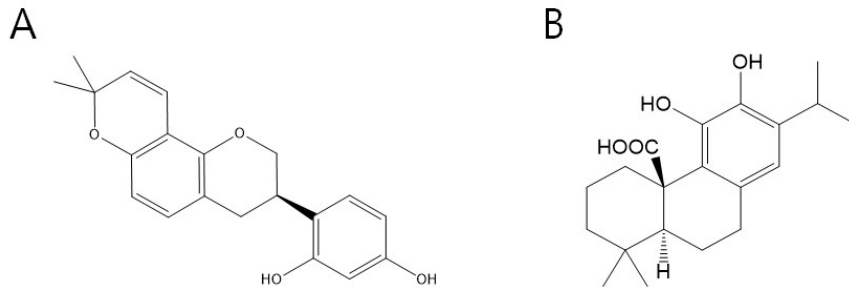


그림 65. Glabridin(A, 감초), carnosic acid(B, 로즈마리)의 분자모형

(2) O/W 나노에멀션 제조

가) 유화제 선택

Decaglycerol류 유화제는 10개의 glycerin을 탈수축합 반응에 의해 polyglycerin-10으로 만든 후, 식물유래 지방산을 에스테르 결합시켜 제조한 것으로 축합도가 높기 때문에 넓은 범위의 HLB 값 제조가 가능하며 내산성, 내염성, 내열성 등이 뛰어나므로 식품 화장품 분야에 사용된다. Decaglycerol laurate와 decaglycerol monooleate는 각각 lauric acid와 mono-oleic acid를 polyglycerin-10에 붙인 것으로 HLB 값은 17과 14.5이다. WPI와 casein은 천연 단백질로서 아미노산으로 구성되어있고, 친수성과 소수성을 나타내는 여러 가지 아미노산들로 인하여 물과 기름 사이에서 유화제 역할을 하게 되고 O/W 에멀션 제조에 많이 쓰이는 물질이다.

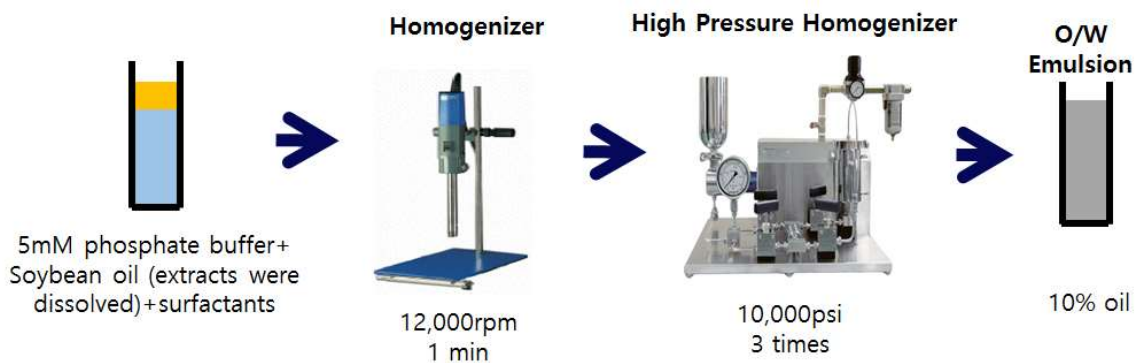


그림 66. O/W 에멀션 제조공정 모식도

나) 에멀션 제조 및 조건 최적화

Coarse 에멀션은 다시 고압균질기(MN250A, Micronox, Korea)를 이용하여 나노에멀션으로 만들었는데(그림 66), 이때 고압 균질기의 압력과 통과 횟수를 최적화 한 결과, 10,000psi (70MPa)로 3번 통과시킨 에멀션을 본 실험의 샘플로 사용하였다(표 67). 같은 압력 하에서 3번, 5번 반복한 샘플들 간에 평균 입도크기는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

표 67. 고압균질기의 압력과 반복횟수에 따른 에멀션의 평균 입도크기

Average size based on repetition (nm)	Pressure (psi)		
	3,000	5,000	10,000
1	333.8 ± 52.5	279.1 ± 10.5	235.2 ± 7.0
3	278.0 ± 8.7	242.1 ± 6.3	200.7 ± 9.1
5	268.0 ± 3.5	239.1 ± 3.6	194.7 ± 13.6

에멀션의 기름 함량은 전체의 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%에 해당하는 기름을 넣고 10,000psi의 압력을 3번 가한 후 각각의 입도크기를 측정하여 제조조건을 최적화하였다. 측정결과, 모든 함량에서 거의 동일한 입도크기(200nm 수준)를 보였는데(표 68), 이를 통해 평균 에멀션 입도크기에 있어 기름함량이 미치는 영향은 거의 없는 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 전체 에멀션 대비 적정 농도 이상의 코어물질 첨가를 고려하여 기름이 10% 들어간 O/W 나노에멀션을 제조하였다.

표 68. 기름 함량에 따른 에멀션의 평균 입도크기 (10,000psi, X3)

Average size (nm)	Oil content (%)					
	0.5	1	2	5	10	20
	207.0	209.8	204.9	203.3	204.7	211.3

(3) 나노에멀션의 물리화학적 특성 및 안정성 분석

가) 광학 현미경을 통한 O/W 에멀션 생성여부 관찰

결과적으로 대물렌즈의 배율이 x100일 때 그림(그림 67)과 같은 사진을 얻을 수 있었다. 육안 상으로 약 0.2um 정도의 oil droplet들이 고르게 분산되어 있는 것을 확인하였으며, 전체적으로 원 모양을 하고 있어 우리가 일반적으로 알고 있는 전형적인 O/W 에멀션의 형태를 유지하고 있었다. 정확한 입도의 평균크기는 저장안정성을 진행하는 동안 레이저 입도분석기를 통하여 측정하였다.

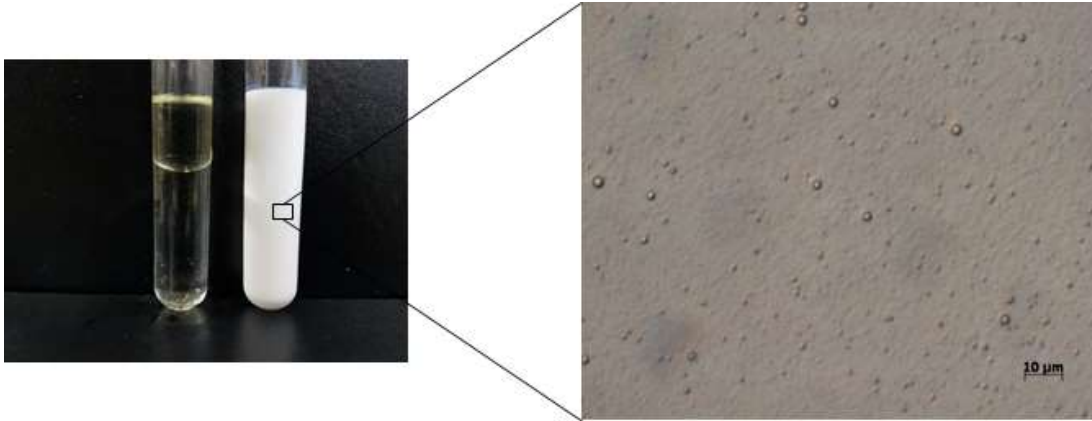


그림 67. 광학현미경을 이용한 O/W 나노에멀전의 입도모형 (1,000배 확대)

나) O/W 나노 에멀전의 저장 안정성 분석

제조 직후 에멀전의 입도크기는 유화제의 종류와 기름에 녹아있는 코어소재 추출물에 따라서 182.5~221.9nm의 변화를 보였지만 전반적으로 확인한 차이 없이 200nm 수준을 유지하였다(그림 68). 이를 통해 O/W 에멀전에서 적정 HLB값 이상의 유화제를 사용할 경우 기름방울 크기는 유화제의 종류 보다는 제조 조건에 의해 영향 받음을 알 수 있다.

에멀전의 제타포텐셜은 표면의 정전기적 반발력을 통한 콜로이드간의 안정성 유지를 위해서 매우 중요한 요소이다. 일반적으로 기름 표면에 제타전위가 존재하면 기름들이 서로 달라붙지 않아 기름들 간에 유착이 일어나지 않고 에멀전이 안정하다고 생각되어 있는데 +/- 30mV 정도일 때 가장 안정한 콜로이드 분산상을 이루는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 에멀전의 제타포텐셜이 유화제에 따라 다른 값을 가지게 되었는데 이는 입도크기와는 다르게 제조 조건보다는 유화제의 종류에 따라 값이 달라지게 됨을 확인 하였다(그림 69). 일반적으로 단백질 유화제의 경우는 isoelectric point 아래의 pH에서는 양전하(positive charge)를 나타내며, isoelectric point 이상의 pH에서는 음전하를 나타내는데, 본 연구에서는 pH 7(phosphate buffer)에서 에멀전이 제조되었으므로, 모두 음전하를 나타내었다(-47.8~-42.9mV). 합성 유화제의 경우는 non-ionic surfactant로 이론상 전하를 띄지 않아야 하지만, 여러 가지 불순물이 제조과정 중 혼입되어 약한 음전하를 나타낸 것으로 생각된다.

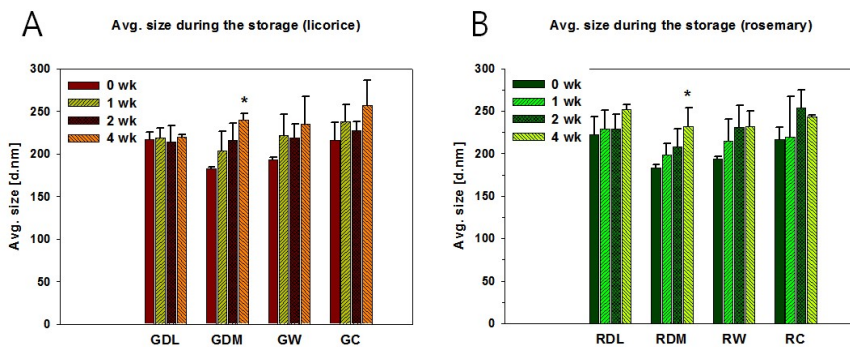


그림 68. 감초(A)/로즈마리(B) 추출물 첨가 나노에멀전의 저장 중 평균 입도크기 변화 (G: 감초; R: 로즈마리; DL: decaglycerol laurate; DM: decaglycerol monooleate; W: wpi; C: casein)

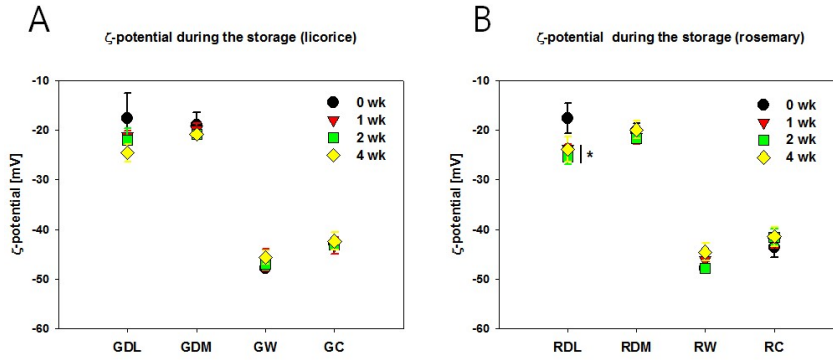


그림 69. 감초(A)/로즈마리(B) 추출물 첨가 나노에멀션의 저장 중 제타포텐셜 변화 (G: 감초; R: 로즈마리; DL: decaglycerol laurate; DM: decaglycerol monooleate; W: wpi; C: casein)

4주 동안 저장하면서 측정된 평균 입도크기와 제타포텐셜의 변화를 살펴보면 두 가지 모두 일반적으로 큰 변화 없이 처음(0주) 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 다만 입도크기에서는 decaglycerol monooleate 유화제로 제조한 감초, 로즈마리 에멀션에서 4주차에 들어서 유의적인 차이를 보였고(239.4nm, 231.7nm), 제타포텐셜의 경우에도 저장기간 동안 특정 로즈마리 에멀션(decaglycerol laurate)에서 0주차와는 다른 값을 보였다 (-23.7~-25.4mV). 그래도 이로 인하여 에멀션이 크게 불안정해졌다고 보기엔 그 변화량 차이가 매우 미미하였고 따라서 전체적으로 평균적으로 200nm 수준의 입자를 가지는 나노에멀션은 25°C의 온도에서 그 안정성이 오래 지속되는 것으로 생각된다.

다) 코어소재 첨가 나노에멀션의 항산화력 측정

실험 결과 에멀션 제조 직후, 대조군과 비교하였을 때 감초와 로즈마리 에멀션 모두에서 항산화력이 유의적으로 증가하는 모습을 보이지 않았다(그림 70). 하지만 평균적으로 감초 에멀션은 5.8%, 로즈마리 에멀션은 12.5% 정도 대조군에 비해 증가하는 수치를 얻었는데, 이는 일반 기름보다 에멀션 상태일 때가 높은 표면적을 가지고 있고 이렇게 증가된 표면적이 코어소재로 하여금 DPPH 분자와 결합할 수 있는 면적을 같은 시간동안 더 많이 제공했을 것으로 생각된다.

저장 중에는 합성유화제로 유화시킨 에멀션의 항산화력이 거의 일정하게 유지되는 결과를 보였는데 이는 4주 동안 지속적으로 감소하는 대조군에 비교하여 큰 차이를 보였다. 저장 1주차에서부터 이미 항산화력이 유의적으로 차이를 보였고 결국 한달 뒤 항산화력을 비교한 결과 대조군에 비해 감초 에멀션에서 82.7%, 로즈마리 에멀션에서 60.4% 증가된 항산화력을 보였다. 이를통해 에멀션 안에 들어있는 감초, 로즈마리는 그것이 일반 기름에 녹아있을 때보다 훨씬 안정성이 증대 되는 것으로 나타났다. 그러나 천연유화제(단백질)로 유화시킨 에멀션의 경우에는 저장기간 동안 대조군과 비슷한 경향으로 항산화력이 떨어지는 모습을 보였다.

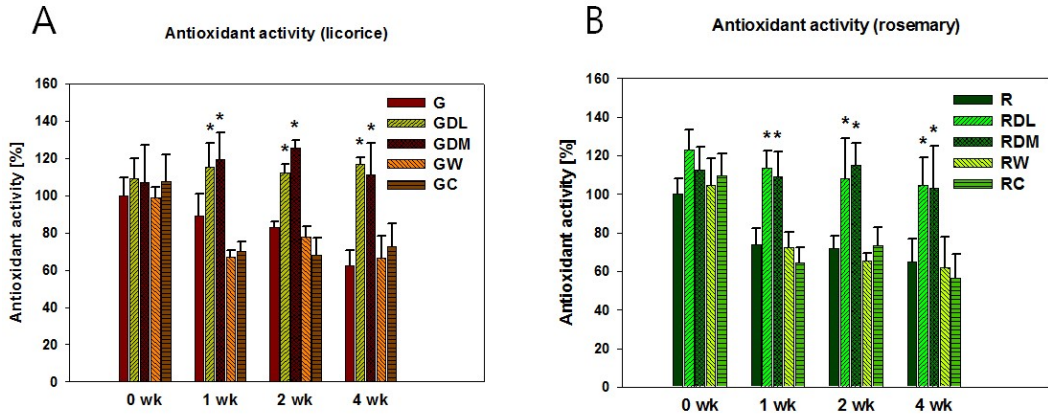


그림 70. 감초, 로즈마리 추출물 첨가 나노에멀전의 항산화력 (대조군= 100%) (G: 감초; R: 로즈마리; DL: decaglycerol laurate; DM: decaglycerol monooleate; W: wpi; C: casein)

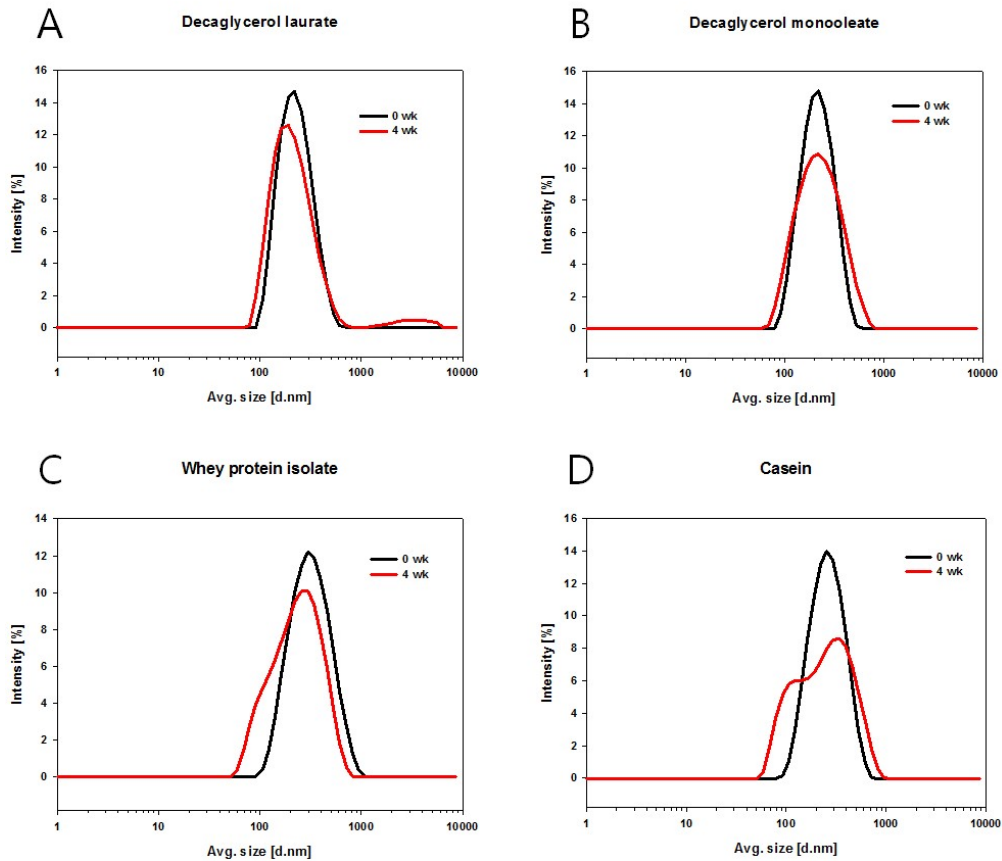


그림 71. 유화제별 나노에멀전의 입도분포도 변화 (A: decaglycerol laurate; B: decaglycerol monooleate; C: wpi; D: casein)

저장 안정성 결과는 천연 유화제와 합성 유화제의 큰 차이가 없어 항산화력도 비슷한 결과가 나올 것으로 예상하였음에도 이런 결과가 나온 것은 단백질 유화제의 aggregation 이 하나의 원인으로 예상된다. 실제로 저장기간 중 oil droplet의 평균크기 자체는 크게

변하지 않았지만 입도들의 분포도를 살펴보면 합성 유화제에 비해 천연유화제는 0주차와 4주차에 분포모양의 변화가 생긴 것을 알 수 있다(그림 71). 합성 유화제의 경우 0주차와 4주차의 그래프 모형이 너비의 차이만 있을 뿐 1-peak 형태를 유지하였지만 천연 유화제의 경우는 약간의 shoulder가 생기거나 거의 2-peak 형태를 띄는 모형이었다. 만약 단백질끼리의 aggregation이 일어났다면 코어물질을 더욱 두껍게 감싸는 형태를 하게 될 것이고 그것이 코어물질의 항산화 기작을 방해하였을 것이다. 하지만 천연 유화제들의 항산화력 감소 이유에 대해서는 더욱 확실한 근거가 요구되며 추후 연구가 필요하다.

라) 코어소재 첨가 나노에멀션의 광안정성 측정

24시간 후 코어물질의 잔존량을 분석한 결과, 에멀션 상태일 때 대조군에 비해서 평균적으로 2.63배 더 잔류하였다. 대조군과 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 어느정도 에멀션 시스템이 코어물질의 UV 안정성을 높이는 것으로 나타났다(그림 72). 대조군에서는 유상만 존재하기 때문에 샘플이 투명함을 띄게 되고 UV광선이 쉽게 안쪽까지 파고들어 많은 양의 코어물질에 영향을 끼칠 수 있지만, 에멀션은 빛의 산란으로 인한 특유의 혼탁함 때문에 UV광선이 상대적으로 안쪽까지 파고들지 못해 이러한 결과가 나오는 것으로 추측된다. 광안정성 결과에서는 천연 유화제 에멀션과 합성 유화제 에멀션 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

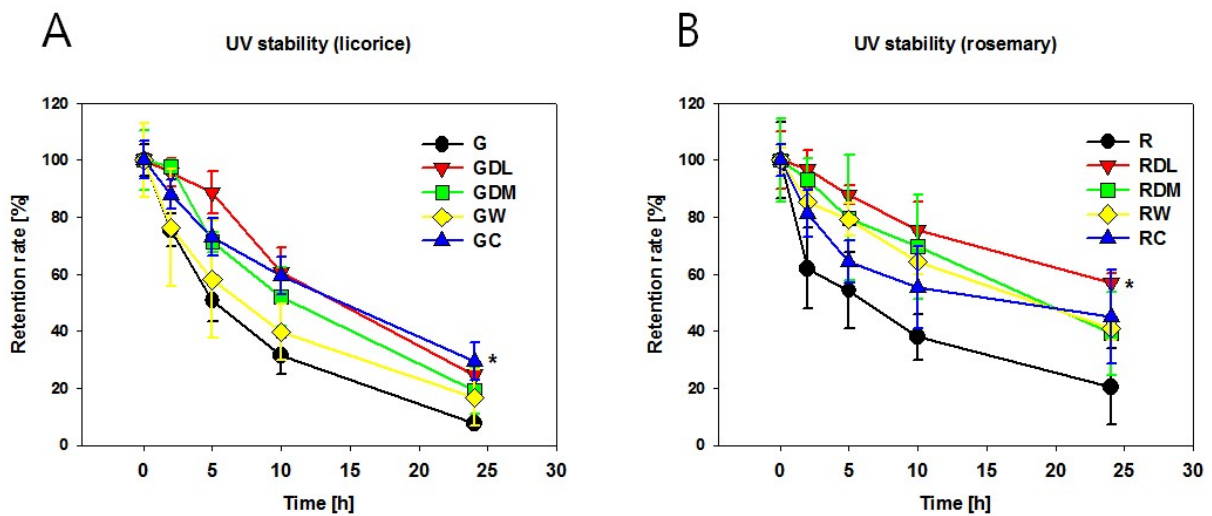


그림 72. UVA를 조사하였을 때 에멀션 속에 녹아있는 감초(A), 로즈마리(B)의 잔존량 (G: 감초; R: 로즈마리; DL: decaglycerol laurate; DM: decaglycerol monooleate; W: wpi; C: casein)

마) 코어소재 첨가 나노에멀션의 항균력 측정

3번의 반복실험 결과 아무것도 처리하지 않은 대조군의 균 농도는 평균 228,900 CFU/ml 수준을 보였다. 여기에 감초를 함유한 에멀션을 첨가할 경우 185,500 CFU/ml로, 로즈마리 에멀션을 첨가할 경우 79,667 CFU/ml의 농도를 보여 균이 약간씩 감소하는 경향을 보였다(그림 74-A). 감소된 균의 log cycle 변화량은 감초 -0.09 log cycle, 로즈마리 -0.46 log cycle이었으며, 로즈마리를 함유한 에멀션의 경우 대조군과 비교하였을 때 유의적인 감소량을 보였다(그림 74-B).

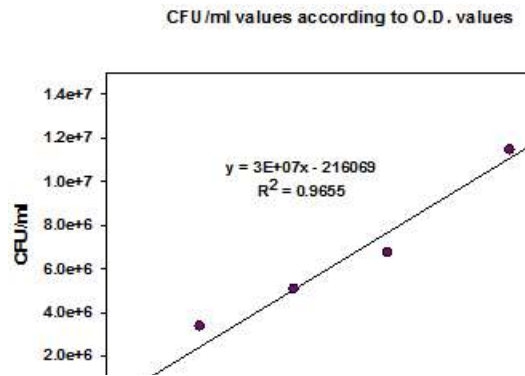


그림 73. 균의 CFU/ml 값과 O.D값(600nm)의 상관관계

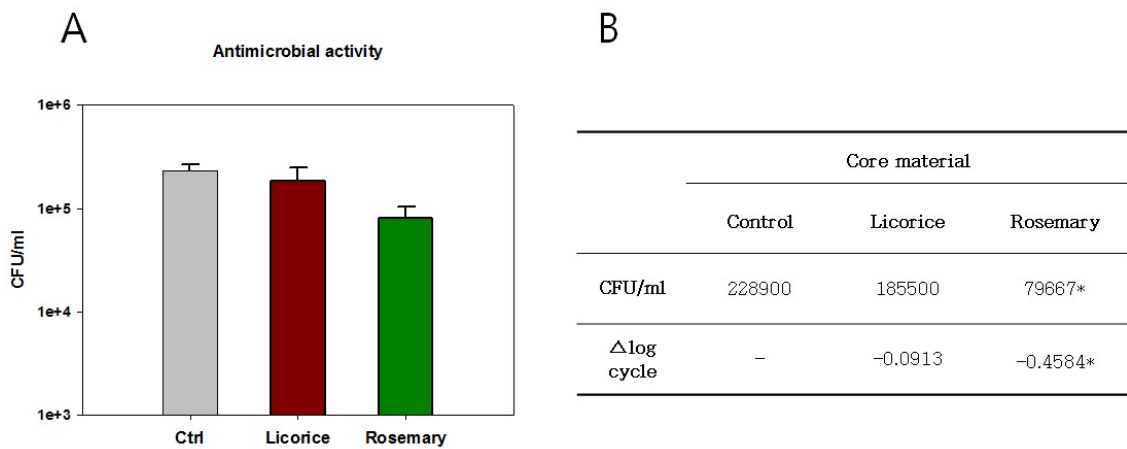


그림 74. 감초 및 로즈마리 에멀션 첨가 시 줄어든 균락의 개수(A)와 log cycle변화량(B).

감초는 로즈마리에 비해 더 높은 소수성 성질을 가지므로 기름방울 내에서 더 안쪽에 녹아있을 것이고 반대로 로즈마리는 그 분자에 친수성기를 많이 달고 있기 때문에 기름의 표면부근에도 다량 존재할 것으로 예상된다. 따라서 이러한 분자들의 기름 속 위치로 인해 기름방울이 균의 세포벽과 맞닿았을 때 로즈마리 에멀션에서 좀 더 강한 항균력을 나타냈을 것으로 추측된다. 하지만 이전부터 알려진 감초 및 로즈마리의 항균력을 고려한다면 이들이 코어물질로서 O/W 에멀션 안에 함유되었을 때는 그 항균력이 크게 감소하는 것으로 생각된다. 이는 항산화력과 다른 양상을 보이는데 에멀션 시스템에서 증가되는 항산화력과 달리 균과의 표면적 증가가 항균력에는 크게 영향을 끼치지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 에멀션 시스템 내에서 페놀화합물의 항균메커니즘 규명에 있어서는 좀 더 연구가 필요할 것으로 보인다.

바) 섬기린초와 코어소재 첨가 나노에멀션의 항균력 시너지

실험 결과, 토복령추출물은 *B.subtilis* 균주에 전혀 영향을 끼치지 못하는 것으로 나타났다. 일반적으로 토복령 추출물의 표준물질인 Steroisal saponin이 항진균, 항효모 물질로 알려져 있어 본 실험에 사용한 균에는 효과가 없었던 것으로 생각된다. 따라서 실험은 섬기린초와 코어소재 첨가 에멀션간의 항균효과를 중점적으로 하여 진행하였다. 샘플로 1)

phosphate buffer Brf), 2) phosphate buffer에 녹인 섬기린초(S/Bfr), 3) 코어소재 무첨가에 멸균+섬기린초(S/Ems), 4) 코어소재 첨가 에멸션(G/Ems or R/Ems), 5) 코어소재 첨가에 멸균+섬기린초(S+G/Ems or S+R/Ems)를 제조하여 항균력을 비교하였다.

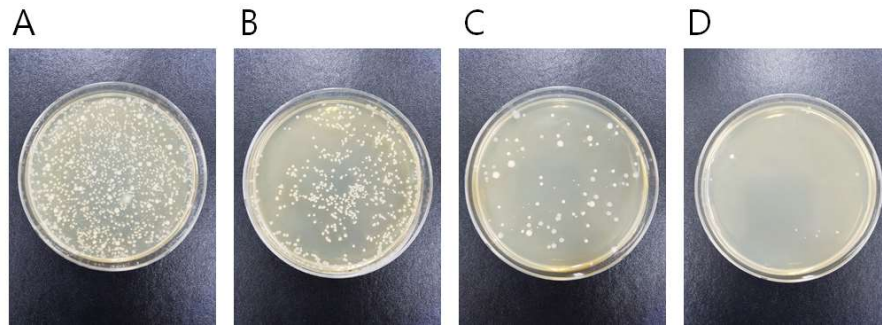


그림 75. 섬기린초 농도에 따른 *B.subtilis* 균의 colony 개수 변화
(A: 600ppm, B: 900ppm, C: 1,200ppm, D: 1,500ppm)

섬기린초의 첨가로 인한 감초 및 로즈마리 에멸션의 항균 시너지 효과는 Fig. 3-13에 나타내었다. 실험결과, 2번 샘플과 3번 샘플에서 각각 -1.84 log cycle, -1.64 log cycle 정도의 균의 변화량을 보였지만, 섬기린초가 버퍼 속에 존재할 때나 에멸션 물 층에 존재할 때 항균력의 차이는 보이지 않았다. 하지만 5번 샘플에서 로즈마리 에멸션과 감초에멸션에서는 항균력 효과를 보였다. 감초에멸션-섬기린초(S+G/Ems)가 1.71 log cycle 만큼의 균의 감소를 보인 반면에 로즈마리에멸션-섬기린초(S+R/Ems)에서는 2.96 log cycle이나 균이 감소하였다. 이는 에멸션 시스템 내에서 섬기린초만 사용하여 나온 감소량(1.64 log cycle)을 감안 한다면, 항균력에 있어서 감초-섬기린초 에멸션은 상가효과(Additive)가 로즈마리-섬기린초 에멸션에서는 상승효과(Synergistic)가 나타나는 것으로 생각된다. 이러한 결과가 나온 이유는 위에서 언급한 것처럼 기름의 표면부근에 다량 존재할 것으로 예측되어지는 로즈마리가 물 층에 존재하는 섬기린초와 특별한 결합이나 반응을 보여 항균력을 급격히 증대시키는 역할 하였을 것으로 생각된다.

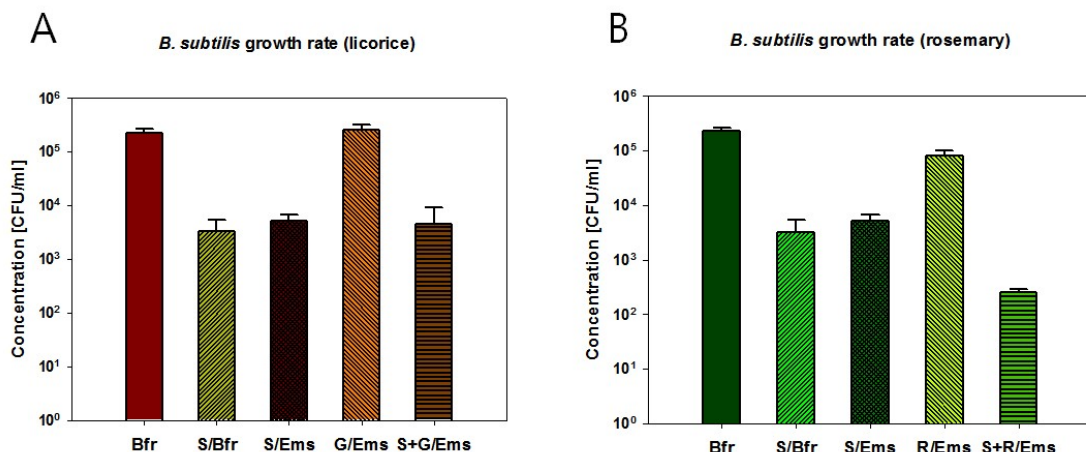


그림 76. 감초에멸션-섬기린초(A), 로즈마리에멸션-섬기린초(B)의 항균력

(4) 로즈마리추출물과 Cycloamylose (CA) 복합체의 수용액에서의 안정성

가) 로즈마리추출물의 용매에 따른 안정성 및 HPLC를 이용한 분해 산물 분석

과장은 205 nm에서 최대흡수파장으로 분석되었고, 베이스라인도 가장 안정적이었다. 로즈마리추출물을 분석하기 전 carnosic acid 표준물질 (Sigma, Korea)을 95% 에탄올 녹인 후 분석한 결과, retention time은 15.7분으로 측정되었고, 함량 분석을 위해 얻은 standard equation을 그림 77에 나타내었다. 로즈마리추출물 500 ppm을 각 용매에 녹인 샘플을 HPLC로 분석한 결과, 50% 에탄올과 5% 에탄올에 용해된 carnosic acid의 함량은 각각 202 ppm와 152 ppm으로 측정되었다. 용매함량이 낮은 5% 에탄올에서는 물이 다량 함유되어 있어 carnosic acid가 잘 용해되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

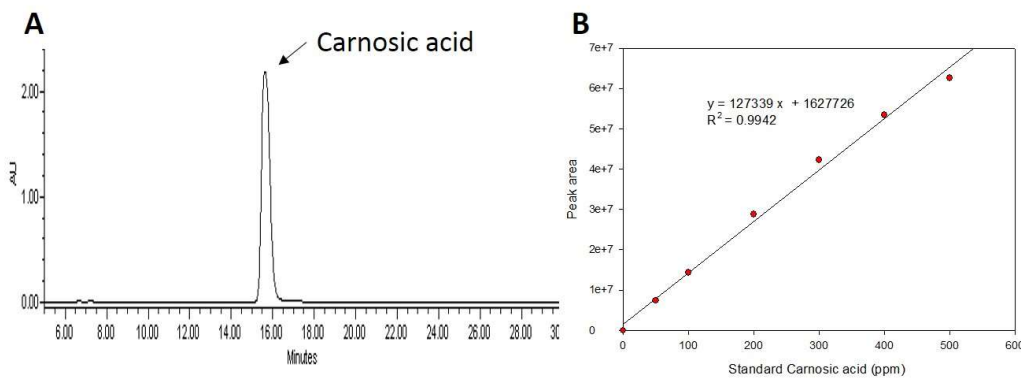


그림 77 (A) carnosic acid 표준물질의 HPLC 크로마토그램 (RT: 15.7 min)
(B) carnosic acid 표준물질의 회기직선방정식

또한 각 용매에 포함된 carnosic acid 안정성을 확인하기 위해 10일 동안 상온에서 빛을 차단하여 저장하였고, 저장 일수에 따라 carnosic acid의 함량 변화를 HPLC를 이용하여 분석하였다 (그림 78). HPLC 크로마토그램 결과에서 나타난 특징적인 피크는 4개로 나타났으며, Zhang et al.의 연구 결과와 유사한 결과를 얻었다(Fig. 3-17). 각 피크의 물질을 분석한 결과, 피크1은 carnosic acid, 피크2는 carnosol, 피크3은 epirosmanol ethyl ether, 피크4는 rosmanol을 나타내는 것으로 추측된다(그림 80-A). 따라서 HPLC 결과를 분석해보면, carnosic acid의 함량은 4일까지 계속 줄어들며 5일째 완전히 분해되는 것이 확인되었고, 50% 에탄올과 5% 에탄올에서 모두 같은 결과를 나타낸 것으로 보아 에탄올의 함량에 관계없이 용액에 녹아있는 상태에서는 매우 불안정한 것을 알 수 있었다. Carnosic acid의 분해 산물로 canosol이 생성되었으며 carnosic acid가 완전히 분해되는 저장 5일째 까지 그 함량이 계속 증가하다가 5일 이후 carnosic acid가 존재하지 않는 상태가 되면 함량이 감소하면서 분해가 일어나는 것을 알 수 있었다. 또한 carnosol은 50% 에탄올 조건 보다는 5% 에탄올조건에서 더 급격하게 분해되었다. 4일 이상의 저장에서는 carnosol 역시 분해되어 epirosmanol ethyl ether 분해산물이 생성되어 증가하였으며 rosmanol 분해 산물도 생성되는 것을 확인할 수 있었다(그림 79).

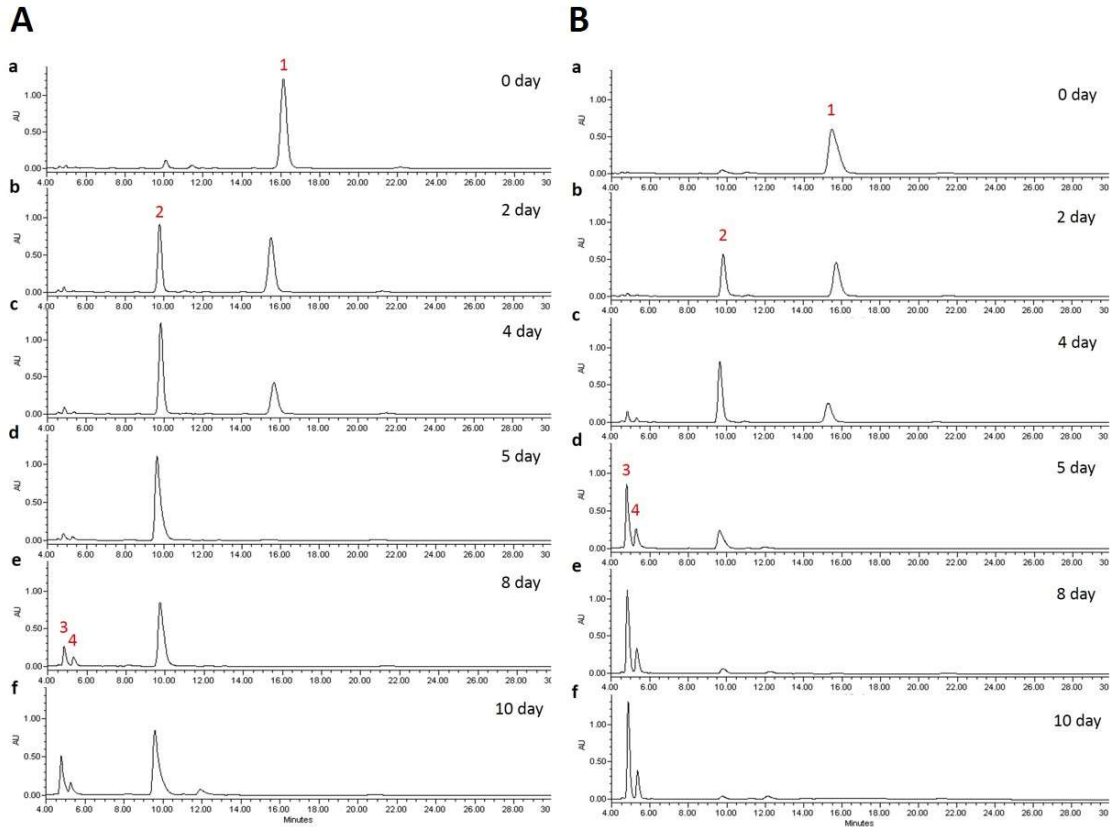


그림 78. HPLC를 이용한 로즈마리추출물의 용매조건에 따른 저장안정성 분석 (A) 50% 에탄올에 용해된 로즈마리추출물, (B) 5% 에탄올에 용해된 로즈마리추출물. a~f는 저장 기간에 따른 분해 산물의 크로마토그램을 나타내며, 1은 carnosic acid, 2는 carnosol, 3은 epirosmanol ethyl ether, 4는 rosmanol 을 나타냄.

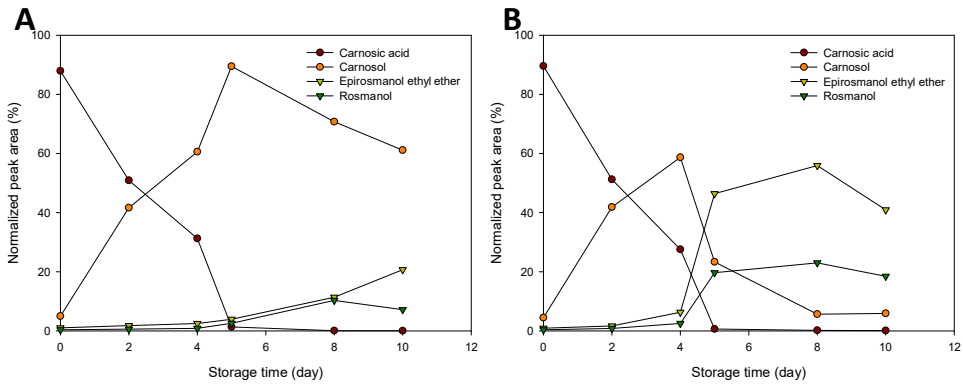


그림 79. 로즈마리추출물의 각 용매조건에 따른 분해 산물의 함량 (A) 50% 에탄올에서의 로즈마리추출물의 분해 산물, (B) 5% 에탄올에서의 로즈마리추출물의 분해 산물.

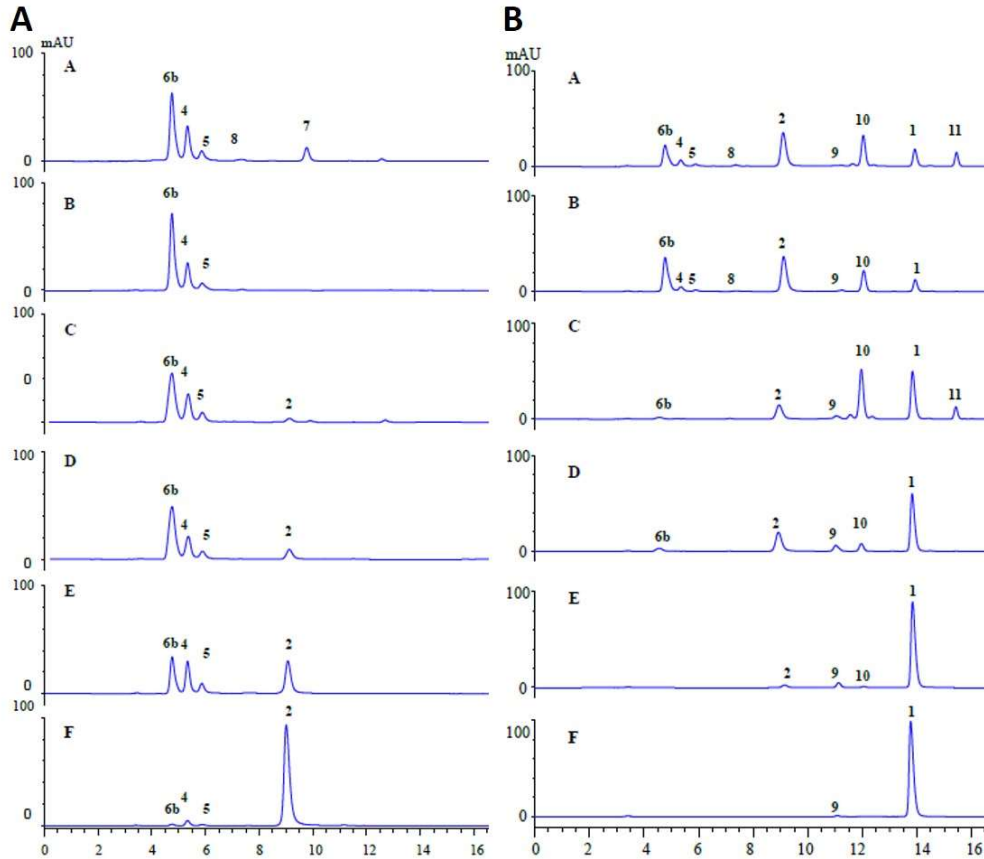


그림 80. 저장조건에 따른 (A) carnosol과 (B) carnosic acid의 함량변화(a: 40°C with light exposure, b: 40°C in dark, c: room temperature with light exposure, d: room temperature in dark, e: 4°C in dark, f: -10°C in dark).

The peaks are labeled as 1. carnosic acid, 2. carnosol, 4. rosmanol, 5. epirosmanol, 6b. epirosmanol ethyl ether, 7. 11-ethoxy-rosmanol semiquinone and 8. rosmadial, 9. carnosic acid quinone 10. 5,6,7,10-tetrahydro-7-hydroxy-rosmariquinone, 11. the light induced degradation product (Zhang et al., 2012).

나) 수용액에서 로즈마리추출물과 Cycloamylose (CA) 복합체의 안정성 분석

가장 높은 농도 (30%)의 CA를 사용하였을 때 로즈마리추출물에 함유한 유효성분의 안정성을 나타낸 HPLC 크로마토그램은 Fig. 3-18에 나타내었다. 결과에서 보듯이, carnosic acid는 4일까지 점차적으로 줄어들어 5일 쯤 완전히 분해되었고, 그 분해 산물로 생성된 canosol은 5일째 최대가 되었다가 그 이후 소량 분해되어 epirosmanol ethyl ehter와 rosmanol이 생성되었다. 이와 같은 경향은 로즈마리추출물이 50% 에탄올에 용해되어 있을 때와 유사하였으며, 5% 에탄올 용매조건에서도 CA가 로즈마리추출물의 안정성 증대에 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

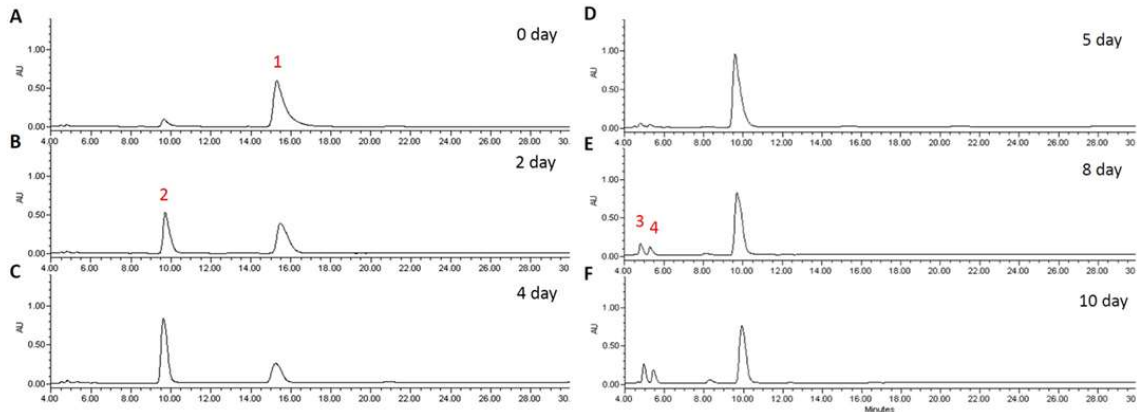


그림 81. 5% 에탄올 용매조건에서 로즈마리추출물과 CA 복합체의 유효성분 함량 및 안정성 분석. A~F는 10일 동안 저장한 로즈마리추출물의 크로마토그램을 나타내며, 1은 carnosic acid, 2는 carnosol, 3은 epirosmanol ethyl ether, 4는 rosmanol을 나타냄.

CA의 비교물질로 β -CD와 maltodextrin (DE 8~12)을 사용하여 각 호스트물질의 농도에 따라 복합체를 제조하여 로즈마리추출물의 분해 산물에 대한 분석도 함께 수행하였다. 1% β -CD와 30% maltodextrin로 제조한 복합체에서 로즈마리추출물에 함유한 유효성분의 저장안정성(0일, 4일, 10일)을 분석한 HPLC 크로마토그램은 Fig. 3-19에 나타내었다. CA 복합체와 마찬가지로 β -CD와 maltodextrin로 제조한 복합체 역시 carnosic acid의 안정성에는 영향을 미치지 못하였으나 carnosol의 안정성에는 영향을 주는 것으로 확인되었다. 하지만 β -CD 복합체의 경우, 자체의 낮은 용해도로 인해 CA나 maltodextrin 복합체에 비해 carnosic acid의 용해도를 높여주지 못하여 수용액에 용해되어 있는 carnosic acid의 함량이 상대적으로 낮았으며 이에 따라 carnosol의 함량도 낮은 것으로 분석되었다.

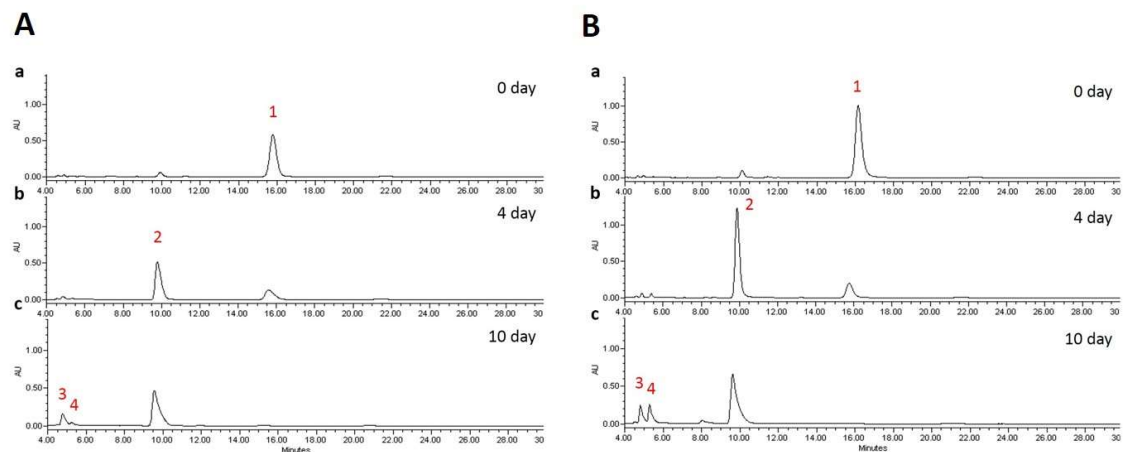


그림 82. 5% 에탄올 용매조건에서의 저장 기간에 따른 유효성분의 안정성 분석. (A) 로즈마리추출물과 β -CD 복합체, (B) 로즈마리추출물과 MD 복합체.

CA의 농도에 따른 각 분해 산물의 함량을 분석함으로써 보다 자세한 CA의 효과를 분석한 결과, carnosic acid의 분해속도는 CA 복합체와 대조군 사이에서 유의적인 차이가 없었으며, 5일째까지 빠르게 분해되었다(그림 82). 반면, carnosic acid의 분해 산물로 생성된

carnosol은 대조군과 CA 복합체 사이에 큰 차이가 있었다. CA가 존재하지 않은 대조군에서의 carnosol 함량은 carnosic acid가 분해되면서 증가하였다. 즉, carnosic acid가 존재하는 저장 4일째까지는 분해가 일어나지 않고 증가하다가 carnosic acid가 모두 분해되어 존재하지 않는 상태에서는 빠른 속도로 분해가 일어났다. 그러나 CA와 복합체를 형성한 경우, carnosic acid가 존재하지 않는 상태에서도 그 함량이 크게 줄어들지 않았으며 분해 속도도 유의적으로 감소하였다. 특히 CA의 농도가 5% 이상에서 유의적인 효과가 나타났으며, 농도가 증가할수록 안정성도 증가하는 결과가 관찰되었다. Carnosol의 분해 산물로 생성된 epiromanol ethyl ether와 rosmanol의 경우, 대조군에서는 그 함량이 크게 증가하는 반면, CA와의 복합체에서는 함량이 크게 증가하지 않았다. 이러한 결과는 carnosol이 분해되는 양과 관련이 있으며, CA가 carnosol의 분해를 감소시켜 분해산물의 생성을 감소시켰기 때문이다. 따라서 이러한 연구 결과를 통해 CA는 carnosic acid의 안정성 보다는 carnosol의 안정성을 증진시키는 데에 큰 효과가 있는 것을 확인하였다.

다) 로즈마리추출물과 CA 복합체의 저장기간에 따른 항산화 활성 분석

실험 결과, CA가 존재하지 않은 대조군에서는 항산화 활성이 0일부터 4일까지 점차적으로 감소하여 72%까지 감소하였고 5일째에 43%로 급격히 감소하는 경향을 나타내었다(그림 84). 그 후 10일까지 점차적으로 감소하여 35%까지 감소하였다. 항산화 성분인 carnosic acid가 분해되어 carnosol이 형성되지만 carnosic acid가 점차적으로 감소하는 4일째까지는 항산화 활성도 서서히 감소하는 것으로 보아 carnosol보다 carnosic acid가 항산화 활성의 주성분인 것으로 보여진다. 또한 carnosol이 급격히 분해되는 5일째에는 항산화 활성도 급격히 감소하여 carnosol도 항산화 활성에 주요한 성분임을 확인하였으며, carnosol의 분해 산물은 항산화 활성에 관여하지 않음을 확인할 수 있다.

로즈마리추출물과 CA 복합체에서는 CA의 농도에 따라 항산화 활성의 안정성에 영향을 주는 것으로 확인되었다. 1% CA와 복합체를 제조한 경우 대조군과 유사한 경향을 나타내었으나, 5% CA의 경우에는 항산화 활성 감소 속도가 조금 지연되었다. 특히 10% 이상의 CA 농도에서는 carnosic acid가 감소하고 carnosol이 생성되는 4일에서 5일째에 대조군에 비해 항산화 활성의 감소 속도가 유의적으로 지연되었다. 복합체 형성에 사용된 CA 농도가 높아질수록 항산화 활성 감소 속도가 더욱 지연되었다. 30% CA로 복합체를 제조한 경우, 10일째 항산화 활성이 70%로 확인되었으며, 대조군(35%)과 비교했을 때 약 2배 정도 항산화 안정성 효과를 나타내었다. 이 결과는, CA 복합체가 carnosol의 분해를 방지해 주는 효과로 인해 carnosol의 기능성인 항산화 활성을 유지해 주었기 때문이라고 생각된다. 이러한 연구 결과를 통해 CA 복합체가 로즈마리추출물의 항산화 활성의 안정성에 우수한 효능을 나타냄을 확인할 수 있었다.

CA의 비교 물질로 사용된 β -CD의 경우, 저농도(0.25~0.5%)에서는 항산화 활성이 비교적 덜 감소하는 것으로 나타났으나, 고농도(0.75~1%)에서는 항산화 활성의 안정성에 큰 효과를 주지 않는 것으로 나타났다. HPLC 결과에서는 고농도의 β -CD 또한 carnosol의 분해를 방지해 주는 것으로 나타났으나, 항산화 활성에서 고농도보다 저농도에서 더 두드러진 효과가 나타났다. 이와같은 결과는 β -CD가 0.75% 이상에서는 로즈마리추출물과 aggregation이 일어나 용해도가 낮아지기 때문인 것으로 판단된다. 또 다른 비교 물질로 사용된 maltodextrin의 경우, 1~5% 농도에서는 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았으나,

10~30% 농도에서는 CA와 유사하게 항산화 활성의 안정성에 큰 효능을 나타내었다. 따라서 본 연구 결과는 CA와 maltodextrin이 β -CD보다 로즈마리추출물의 항산화 성분인 carnosol의 안정성과 용해도에 크게 기여함으로써 수용액에서의 항산화 활성을 오랜 기간 유지할 수 있음을 확인하였다.

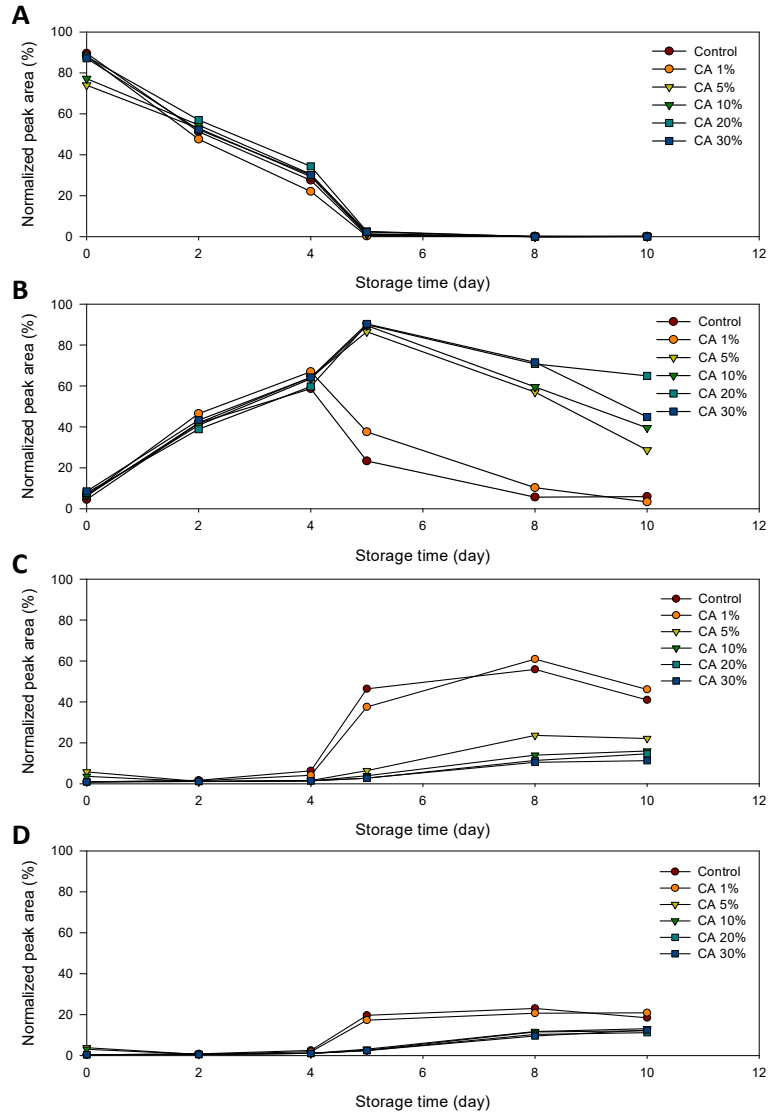


그림 83. CA 농도에 따른 로즈마리 추출물 분해산물의 함량변화 및 저장안정성.
(A) carnosic acid, (B) carnosol, (C) epirosmanol ethyl ether, (D) rosmanol.

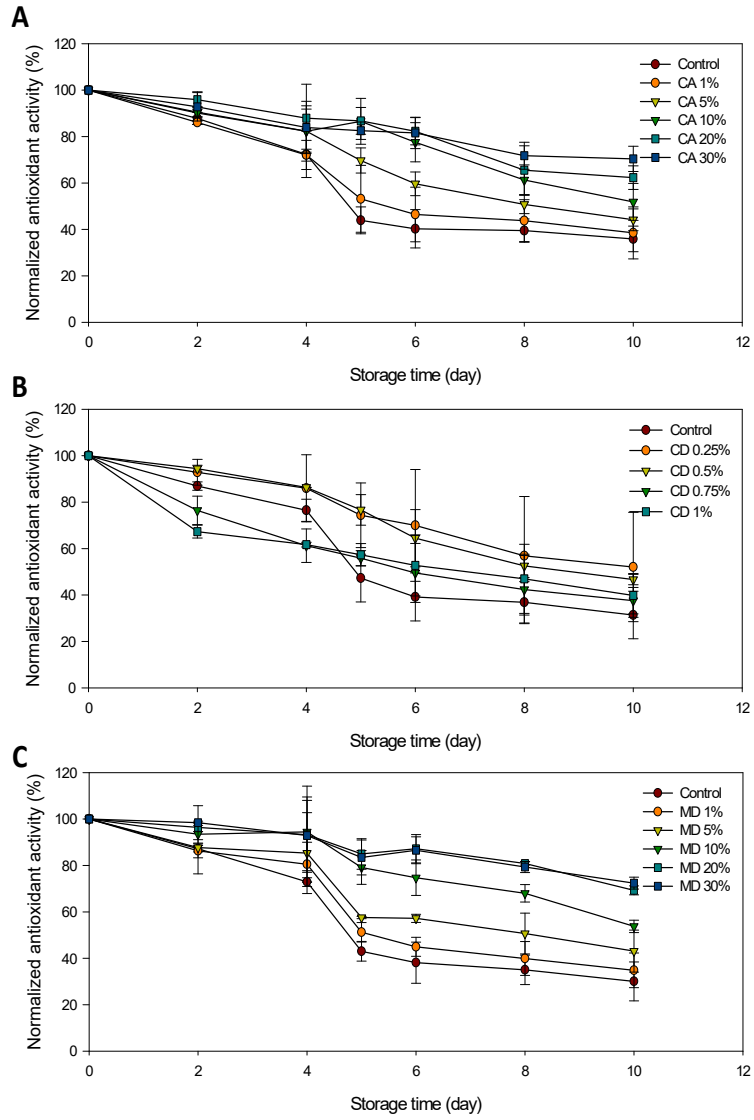


그림 84. 로즈마리추출물과 CA (A), β -CD (B), maltodextrin (C) 복합체의 저장에 따른 항산화 활성 변화.

3. 3차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) 감초 나노복합체 제조

감초추출물(10 wt%, 100,000ppm)을 EtOH에 넣어 완전히 용해시킨 후, 5% EtOH가 되도록 증류수 및 환형 다당류가 존재하는 용액에 희석하여 결과적으로 5,000ppm의 감초추출물이 각 샘플에 존재하도록 하였다. 그 후, 1시간 동안 rotator를 통해 추출물을 호스트에 반응시키고 녹지 않은 추출물은 원심분리기(Supra 22K, Hanil Sci. Co., Korea)를 이용하여(14,795xg, 20분) 상층액만 취하는 방법으로 제거하였다. 완성된 나노복합체 용액 속에 존재하는 감초추출물의 양은 감초추출물의 표준물질인 glabridin의 흡광 파장(230nm)에서 그 흡광도를 측정하여 확인하였다.

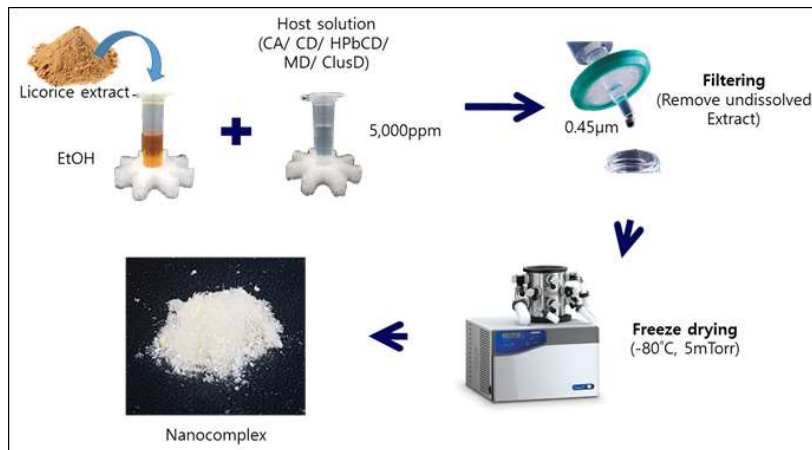


그림 85. 나노복합체 제조 공정

기능성 코어물질인 감초추출물이 포접된 것으로 생각된 나노복합체 용액을 고형화 시키기 위해 그림 85의 순서로 나노복합체를 완성하였다. 각각의 환형 다당류를 호스트로 하는 용액(CA, HPbCD, MD, ClusD= 5%, CD= 1%)에 감초 추출물(5,000ppm)을 넣어 반응시키고, 녹지 않은 물질은 제거 시켰다. 그 후, 동결건조(Ilshin Biobase)를 통해 3일간 동결 건조(-80°C, 5mTorr) 하였고 이때 생성된 파우더를 나노복합체로 하였다. 만들어진 나노복합체는 감초추출물의 영향으로 인해 약한 황갈색을 띠는 백색의 물질이었다.

(2) 로즈마리 나노에멀전 제조

2차년도에 진행하였던 에멀전 제조조건 최적화를 바탕으로 멀티나노소재를 만들기 위해 로즈마리 추출물이 들어간 O/W 나노에멀전을 제조하였다. 유화제로는 HLB 값이 17로 O/W 에멀전에 사용하기 적합하며 내산성, 내염성, 내열성 등이 뛰어나 여러 산업에서 많이 사용되는 decaglycerol laurate를 사용하였다. 먼저 oil의 0.5 wt%(5,000ppm)에 해당하는

로즈마리추출물을 기름에 용해시켜 유상(lipid phase)을 준비하였고, 수상(aqueous phase)은 유화제를 기름과 유화제의 비율이 10:1이 되게 하는 농도로 5mM phosphate buffer안에 용해시켜 제조하였다. 유화제가 용해되어 있는 수상에 로즈마리가 용해되어 있는 유상을 첨가하여 섞은 후(10wt%), 균질기(T25 digital ULTRA-TURRAX®, IKA, Germany)로 12,000rpm에서 1분 동안 균질화시켜 coarse 에멀션을 제조하였다. Coarse 에멀션은 다시 고압균질기(MN250A, Micronox, Korea)를 이용하여 10,000psi (70MPa)로 3번 통과시켜 나노에멀션으로 제조하였다 (그림 86).

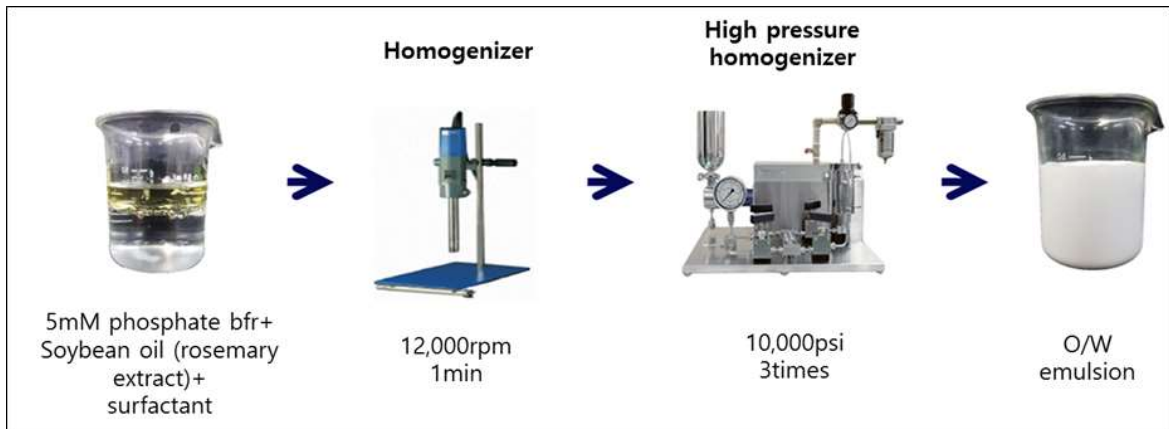


그림 86. 로즈마리추출물 첨가 O/W 나노에멀션 제조과정

(3) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 제조

가) 나노복합체 제조조건 확립

로즈마리추출물 분말을 95% 에탄올에 용해시켜 20% (w/v) 용액으로 준비하고, 분지텍스트린은 증류수에 용해시켜 1~30% (w/v) 농도가 되도록 준비하였다. 두 용액은 최종적으로 로즈마리추출물 1% (w/v), 분지텍스트린 0.5~30% (w/v), 용매는 5% 에탄올이 되도록 혼합한다. 빛을 차단한 상태로 25℃에서 24시간 동안 교반하였다. 교반 중 4시간 간격으로 시료를 채취하여 0.45 μ m 필터 (PVDF)로 여과한 후 여과된 용액의 카르노스산 농도를 UV/vis 분광 광도계를 이용하여 측정된 흡광도 (285nm)로부터 다음 표준 곡선 방정식에 대입하여 구하였다.

$$\text{Standard equation (carnosic acid): } y = 83.881x + 0.0046$$

나) 나노복합체 용해도 비교

상기 제조 조건에 따라 분지텍스트린 농도별로 나노소재를 제조한 후 용액 내 카르노스산 농도를 측정하였다. 분지텍스트린의 카르노스산 용해도 증진 효과를 조사하기 위해 1차년도에 수행했던 환형아밀로스(CA)와 베타사이클로덱스트린(β -CD)과 비교하였다.

(4) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체의 형성능 및 이화학적 특성 조사

가) 나노복합체 이화학적 특성 조사를 위한 고체 복합체 제조

고체 복합체는 카르노스산 및 분지텍스트린 복합체 형성 및 이화학적 특성을 조사하기 위해 준비되었다. 로즈마리추출물과 분지텍스트린은 1:5 중량비로 5% 에탄올에서 혼합하고 25°C에서 12시간 이상 교반하였다. 복합체 샘플을 초저온 냉동기 (-80°C)에서 12시간 이상 동결시킨 후 동결건조기(FD8508, 일신바이오베이스)를 사용하여 -80°C 및 5mTorr에서 동결건조하였다. 물리적 혼합물은 동결건조 복합체의 제조에 사용된 것과 동일한 중량비로 로즈마리 추출물 및 분지텍스트린을 단순 혼합하여 준비하였다.

나) 나노복합체의 이화학적 특성 분석

나노복합체의 형성 및 이화학적 특성은 XRD, FESEM 및 DLS를 통해 분석되었다. 로즈마리추출물, 분지텍스트린, 물리적 혼합물 및 고체 복합체의 X선 회절 (SmartLab, Japan) 패턴은 2θ 각도로 5~40° 범위에서 0.5sec/step 속도의 스캔 조건에서 얻어졌다. FESEM (SUPRA, Germany)은 각 샘플의 표면 특성을 확인하기 위해 사용되었으며, 각 샘플을 백금 코팅한 후 2차 전자 검출기 모드에서 이미지를 관찰하였다. 나노복합체의 입도 분석은 고체 복합체 1% (w/v)를 증류수에 용해시켜 동적 광산란법(DLS)으로 측정하였으며, 대조군은 고체 복합체에 포함된 로즈마리추출물의 중량비와 동일한 양의 로즈마리추출물 단독 물질을 증류수에 용해시켜 측정하였다.

(5) 나노화 소재 효능평가

가) 나노복합체의 항산화능 평가

나노복합체의 항산화 활성을 평가하기 위해 ABTS 라디칼 소거능 방법을 사용하였다. ABTS 양이온 용액 (7mM ABTS + 2.45 mM potassium persulfate)을 준비하고 항산화능을 측정하기 전 UV/vis 분광 광도계를 이용하여 734nm에서 흡광도 0.7이 되도록 증류수로 희석하였다. 샘플은 로즈마리추출물 (0.05 wt.%)을 5% 에탄올에서 다양한 농도 (0.5~30 wt.%)의 분지텍스트린과 혼합하여 나노복합체를 제조하였다. 제조한 나노복합체 샘플을 증류수로 10배 희석한 후 시료 100μl를 ABTS 양이온 용액 900μl와 혼합하였다. 혼합 용액을 실온에서 20분 동안 반응시키고, UV/vis 분광 광도계를 사용하여 734nm에서 흡광도를 측정한 후 다음 방정식에 대입하여 ABTS 라디칼 소거 활성을 결정하였다.

ABTS radical scavenging activity:

$$\% \text{ decoloration} = [1 - (\text{absorbance sample} / \text{absorbance control})] \times 100$$

나) 나노복합체의 항균 활성 평가

나노복합체의 항균 활성은 MIC를 측정하는 방법으로 평가하였다. '3-가'절에서 설명한 대로 복합체를 준비하였다. 각 샘플 100μl를 96 well-plate에 분배하고 100μl의 NB 배지를 첨가하여 단계 희석하였다. 대상 균주로는 Bacillus subtilis를 사용하였고, UV/vis 분광 광

도계를 사용하여 600nm에서 측정된 흡광도 값이 0.1 (세포밀도: 1.5×10^8 CFU/ml)이 되도록 세균 현탁액을 제조한 후 $100\mu\text{l}$ 을 각 well에 분배하였다. 30°C 배양기에서 24시간 동안 배양한 다음 육안으로 균의 생육을 확인하여 MIC 값을 결정하였다.

(6) 로즈마리추출물 분지덱스트린 나노소재의 안정성 평가

가) 나노복합체 열안정성 평가

'5-가'절에서 기술한 대로 나노복합체를 제조한 후 열 가속 시험을 수행하였다. 시료는 90°C 수조에서 24시간 동안 열처리하면서 2시간 간격으로 수집하였다. 수집된 복합체의 항산화 활성을 ABTS 라디칼 소거능 방법을 이용하여 평가하였다.

나) 나노복합체 저장안정성 평가

'5-가'절에서 기술한 대로 나노복합체를 제조한 후 10일 동안 수용액에서 저장 중 항산화 활성의 변화를 조사하였다.

다. 연구 결과

(1) 감초 나노복합체 제조

가) 감초 나노복합체의 용해도 평가

그림 87은 감초추출물의 나노복합체 호스트의 종류 및 농도에 따른 용해도 및 항산화력을 나타낸 그래프이며, CD에 경우 2% 이상에서는 용해도가 급격히 떨어지기 때문에 다른 호스트들에 비해 비교적 낮은 농도 범위를 설정하였다.

감초추출물의 표준물질인 glabridin은 여러 개의 벤젠고리를 가지고 있는 폐놀화합물로 강한 소수성을 띄기 때문에 아무런 호스트가 존재하지 않는 상태(중류수)에서는 넣어준 양에 비해 그 용해도가 4%정도 밖에 되지 않지만 포접능이 있는 수용성 환형 다당류가 호스트물질로써 존재하면 추출물이 호스트 속으로 포접되기 때문에 물에서의 용해도가 증가하는 결과를 얻을 수 있다. 특히, CD와 HPbCD에 경우에는 1.2%를 기준으로 다른 호스트 물질들에 비해 감초추출물의 물 용해도가 확연히 증가하는 결과가 나타났는데 CA, MD, ClusD에 경우 감초의 용해도가 대조군 대비 약 3.0~3.3배 높아진 반면에 CD와 HPbCD에서는 각각 12.3배와 13.4배나 증가하였다. 또한 호스트 농도가 그 이상으로 높아지면 감초의 용해도도 지속적으로 증가하여 최고 22.3배까지도 도달하는 결과가 나왔다. 이러한 결과가 나온 이유는 CD나 HPbCD는 그 분자모형이 매우 환형(cyclic)을 나타내므로 그 속에 게스트(guest) 물질을 잘 포접시킬 수 있는 반면 나머지 호스트 물질들은 이들에 비해 선형적인(linear) 모습을 보이기 때문에 상대적으로 약한 포접능을 가지는 것으로 생각된다.

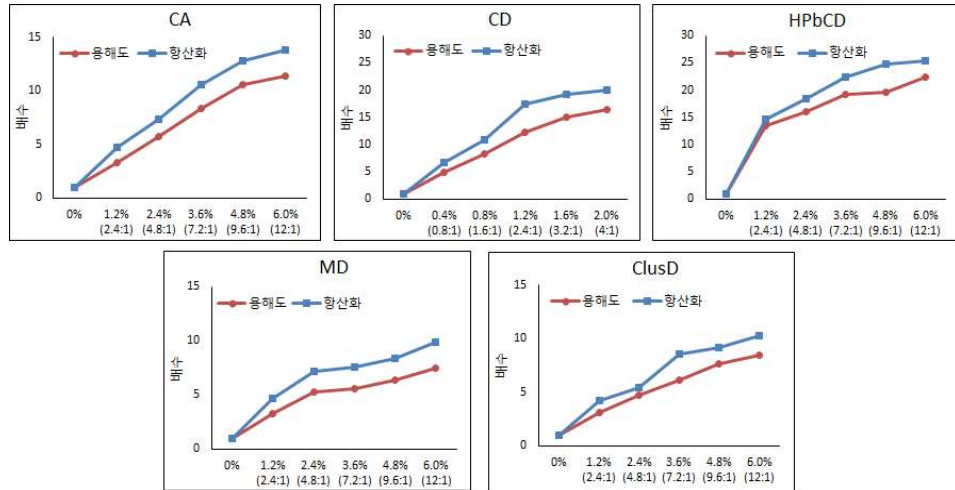


그림 87. 감초 추출물의 cyclic glucan의 종류 및 농도에 따른 수용액에서의 용해도/항산화력 증가량 (CA: cycloamylose, CD: β -cyclodextrin, HPbCD: hydroxy propyl- β -cyclodextrin, MD: maltodextrin, ClusD: clustered dextrin), (대조군=1)

또한 감초추출물은 페놀화합물로서 항균력 뿐만 아니라 항산화능력도 탁월한 것으로 알려져 있어 감초추출물의 용해도가 증가할수록 항산화력 또한 증가될 것으로 예상되었다. 따라서 만들어진 나노복합체 solution의 항산화력을 측정하였으며 항산화 측정은 ABTS assay를 이용하였다. 측정방법으로는 먼저 7mM ABTS와 2.45mM potassium persulfate를 증류수에 녹여 혼합하고 상온에서 24시간 반응하여 양이온을 형성 시킨 후, 734 nm에서 흡광도 값이 0.7이 되도록 준비한다. 그 후에 만들어진 ABTS 용액과 각각의 샘플을 9:1의 비율로 섞어 상온에서 7분 동안 반응시킨 후, 흡광도를 측정하고 결과를 반응식에 대입하였다.

감초추출물이 들어간 나노복합체 용액의 항산화력 또한 용해도와 비슷한 결과가 나타났는데 모든 샘플에서 host의 농도가 증가 할수록 항산화력 또한 크게 증가하는 경향을 보였다. 이는 감초추출물의 양이 그만큼 증가되었기 때문으로 생각된다. 특이점으로는 대조군 대비 용해도의 증가량에 비해 항산화력의 증가량이 좀 더 큰 것을 알 수 있는데, 이는 용해도에 경우 glabridin의 양을 기준(230nm)으로 측정된 반면에 항산화능은 감초추출물에 포함된 glabridin 이외에 물질도 항산화작용을 도왔기 때문에 좀 더 높은 수치가 나왔을 것으로 생각된다.

나) 감초 나노복합체의 저장안정성

각각의 호스트 농도를 CD는 1%, 그 외에 선행 다당류는 5%로 하여 감초추출물과 반응시켜 나노복합체 수용액을 제조하였고, 저장안정성을 보기위해 한 달 동안 저장하면서(암실, 상온) 변화하는 항산화력을 측정하였다. 그림 88에 저장 중 나노복합체 수용액의 항산화능 결과를 나타내었고 각 호스트의 제조 직후 항산화 값을 100으로 하여 정규화(normalize)하였다.

대조군에서는 제조 직후부터 급격하게 항산화력 수치가 떨어졌지만 호스트가 존재하면 처음 일주일 정도는 거의 모든 종류에서 항산화력이 감소되지 않고 0일차와 비슷한 수치를 보이는 것으로 나타났다. 이는 감초추출물 성분이 홀로 존재할 때보다 호스트에 의해

감싸지게 되면 외부의 자극으로부터 영향을 덜 받게되고 안정성이 유지되면서 나타난 결과라 생각된다. 저장 후 2주차부터는 호스트의 종류별로도 약간씩의 변화가 나타나는데 이를 수치화하기 위해서 degradation rate (k)를 계산하였다. Degradation rate의 관계식은 다음에 나타내었다.

$$k = 1/t * \ln(C_0 / C)$$

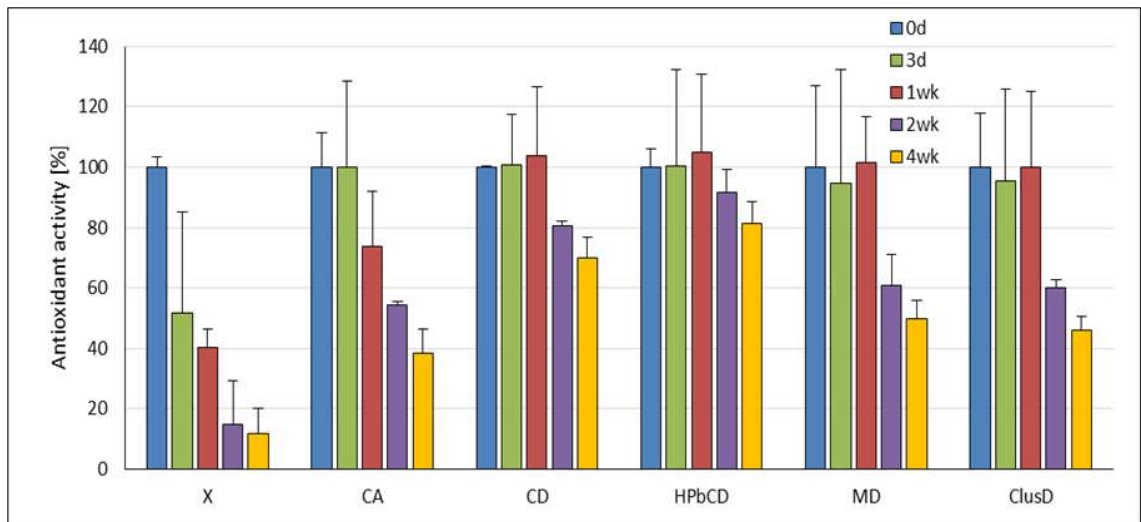


그림 88. 저장 중 나노복합체 solution의 항산화능 변화(CA: cycloamylose, CD: β -cyclodextrin, HPbCD: hydroxy propyl- β -cyclodextrin, MD: maltodextrin, ClusD: clustered dextrin)

아무것도 넣지 않은 증류수에 들어있는 감초추출물의 k값은 약 0.09였는데, 선형 다당류가 호스트로 존재하게 되면 0.03수준 이하로 값이 떨어지는 걸 확인하였다. 그만큼 호스트의 존재 자체가 상당한 수준의 저장안정성을 높일 수 있는 것으로 생각된다. 또한 CD와 HPbCD를 호스트로 한 샘플들은 다른 세 가지 호스트들에 비해서 감초추출물의 용해도, 항산화력 뿐만 아니라 저장중 안정성에도 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각되는데 ABTS assay를 통해 항산화 수치를 측정된 결과 CD와 HPbCD 샘플에서는 제조 직후 평균적으로 2042.4의 수치가 나왔다. 이는 다른 CA, MD, ClusD (210.9)에 비해서 약 9.68배 높은 값이었다. 저장 중 degradation rate (k) 또한 CD와 HPbCD는 각각 0.014, 0.008인 것에 비해 나머지 호스트들은 0.03 수준을 보여 호스트가 환형의 분자모형을 가지면 게스트물질을 잘 포접하고 더 안정하게 유지하는 것처럼 보인다. 호스트별 저장 중 항산화 값과 degradation rate에 대한 결과는 표 69에 나타내었다.

표 69. 각 호스트별 저장 기간 중 항산화력 수치와 degradation rate (k) 값 (X: control, CA: cycloamylose, CD: β -cyclodextrin, HPbCD: hydroxy propyl- β -cyclodextrin, MD: maltodextrin, ClusD: clustered dextrin)

	0주	1주	1주	2주	4주	k	R ²
X	68.7	35.6	27.5	10.0	4.1	0.09	0.95
CA	261.7	261.6	192.8	142.5	100.1	0.034	0.95
CD	2094.4	2188.2	2175.9	1684.7	1478.8	0.014	0.87
HPbCD	1990.4	1993.8	2087.2	1821.8	1618.0	0.008	0.85
MD	189.8	179.5	192.9	115.4	89.1	0.028	0.89
ClusD	181.2	172.9	181.3	108.7	79.1	0.03	0.91

다) 감초 나노복합체 형성능 확인

감초 추출물과 여러 종류의 호스트간의 나노복합체 형성 여부를 알아보기 위해 주사전자현미경(Field-Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM) 이미지와 푸리에 변환 적외분광법(Fourier transform infrared, FTIR)을 이용하여 측정하였다. 샘플은 감초추출물, 감초추출물과 호스트물질의 물리적 혼합물(physical mixture, PM), 감초추출물이 들어있는 나노복합체(Freeze dried, FD)로 나누어 비교하였다. 먼저 FE-SEM(SUPRA 55VP, Carl Zeiss, Germany) 이미지는 진공상태에서 샘플들을 20nm의 두께로 백금코팅을 실시한 뒤, working distance (WD) 3.7~4.0nm, 가속전압 2kV에서 15,000배율 확대하여 촬영하였다. HPbCD를 호스트로 한 나노복합체의 이미지를 보면, HPbCD는 구의 형태로 표면에 세공(pore)이 존재하였고(그림 89-A), 감초추출물은 결정성 구조를 가지면서 덩어리져 있는 형태였다(그림 89-B). 물리적 혼합물에서는 HPbCD와 감초추출물이 서로 섞여 각자의 형태를 유지하면서 혼합되어있는 상태로 존재하였다(그림 89-C). 반면에 나노복합체를 형성한 샘플에서는 이전에 모습들이 사라지고 새롭게 평평하고 표면이 매끈한 형태를 하고 있었다(그림 89-D). 따라서 SEM 측정 결과를 통해 나노복합체는 HPbCD 및 감초추출물이 가지는 기존의 구조와 다르게 새로운 구조를 형성하는 것으로 확인 할 수 있었다.

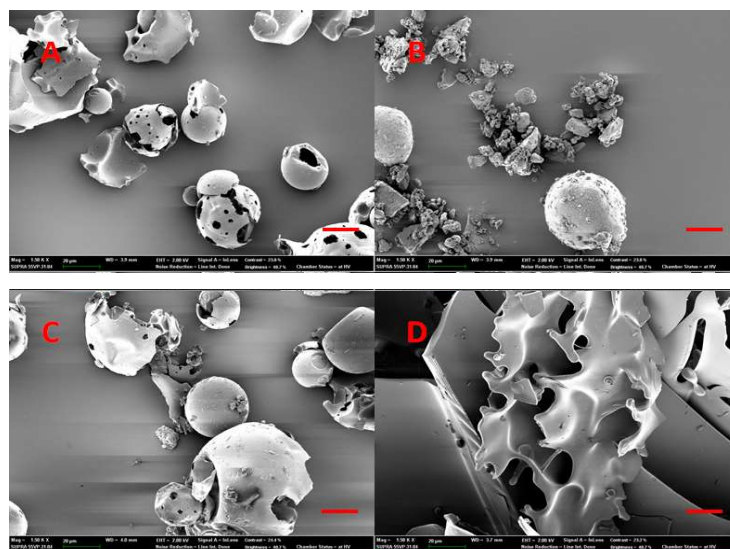


그림 89. 감초 나노복합체 SEM이미지

(A=HPbCD, B=감초추출물, C=물리적 혼합물, D=나노복합체; 1bar=20 μ m)

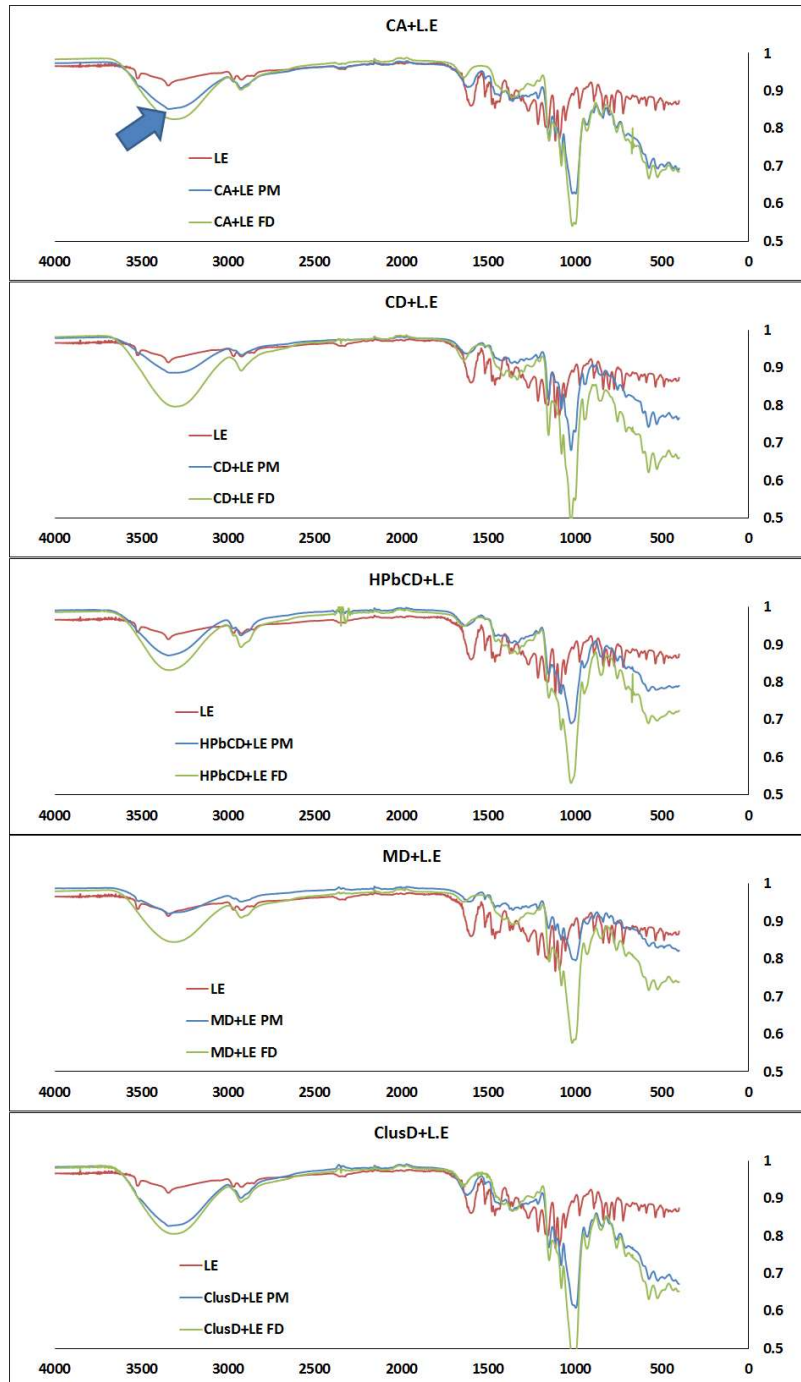


그림 90. 나노복합체의 FTIR 결과 (CA: cycloamylose, CD: β -cyclodextrin, HPbCD: hydroxy propyl- β -cyclodextrin, MD: maltodextrin, ClusD: clustered dextrin; LE= 감초추출물, PM= 물리적 혼합물, FD=나노복합체)

FT-IR (TENSOR27, Bruker, Germany)의 경우, Spectral range는 4,000 ~ 400 cm^{-1} , resolution은 4 cm^{-1} 으로 측정하였고 sample scan time은 32로 하였다. 감초추출물은 3314 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} 부근에서 강한 peak를 나타내었고 나노복합체(FD)는 아무 것도 처리하지 않은 각각의 환형 다당류들과 비슷한 peak 패턴을 보였다 (data not

shown). 이에 비해 물리적혼합물(PM)들은 추출물과 호스트들이 가지는 peak를 모두 가지는 듯한 모습을 보였는데 PM은 대부분 FD의 패턴을 따라가다가도 추출물이 peak를 가지는 부근에서는 약하게나마 같이 peak를 나타내는 것으로 보였다. 따라서 SEM 뿐만 아니라 FT-IR 데이터를 통해서도 나노복합체는 물리적혼합물과는 다르게 완전히 달라진 분자들 간에 결합형태 및 모형을 나타내는 것으로 생각된다. 각 호스트별 물리적혼합물과 나노복합체의 FT-IR 결과는 그림 90에 나타내었다.

(2) 멀티나노소재의 제조 및 안정성 평가

가) 멀티나노소재 이화학적 특성

나노에멀전 시스템을 이용하여 로즈마리추출물을 캡슐화(encapsulate)시키면 저장안정성이 증대되고 넓어진 표면적으로 인해 항산화력 또한 증가하는 효과를 보인다. 하지만 항균력의 경우, 추출물의 항균력을 감안한다면 에멀전 시스템 내에서 오히려 감소하는 경향이 나타났는데, 이를 해결하기 위해 에멀전 수상에 나노복합체를 섞어 멀티나노소재를 제조하고 그 결과 균과 코어소재의 물리적 결합을 높이고자 하였다. 멀티나노소재의 제조는 나노에멀전의 oil양은 고정시키고 나노복합체의 농도를 바꿔가면서 섞고 각각의 안정성을 통해 최적화하였다. 나노에멀전의 기름은 10%로 정해놓고, 나노복합체의 농도를 0%부터 10%까지 넣었을 때의 각각의 droplet size(입도크기)와 ζ -potential(제타전위) 값을 그림 91에 나타내었다.

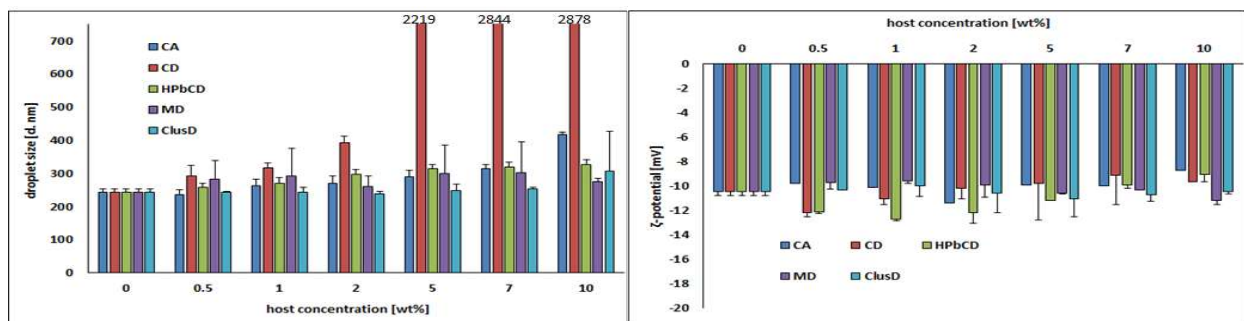


그림 91. 호스트 농도별 멀티나노소재의 평균 droplet size 및 ζ -potential 값(CA: cycloamylose, CD: β -cyclodextrin, HPbCD: hydroxy propyl- β -cyclodextrin, MD: maltodextrin, ClusD: clustered dextrin)

먼저 CD를 제외한 나머지 환형 다당류들을 호스트로 한 나노복합체가 섞인 멀티나노소재의 평균 입도크기는 복합체의 농도와는 관계없이 일정한 수준을 유지하였다. 나노복합체가 아예 들어가 있지 않은 나노에멀전의 평균 입도크기는 243.0nm였으며 복합체의 농도 최대가 되어도 약 400nm수준을 유지하였다. 반면에 CD의 경우는 2% 미만까지는 다른 호스트들과 입도크기가 비슷하였지만 5%이상 들어가게 되면 값이 크게 증가하여 2,200nm(2.2 μ m) 이상의 평균 입자크기를 보였으며 급격히 안정성이 떨어지는 것을 확인하였다. 이는 CD가 다른 환형 다당류들에 비해 낮은 용해도를 가지며 특정농도 이상에서는 서로 응집(aggregation)되어 평균입자크기에 영향을 미친 것으로 생각된다. 호스트의 종류

별, 농도별로 큰 차이를 보이는 평균입자크기의 비해서 제타전위의 경우는 큰 변화 없이 대조군과 비슷한 값을 보였다. 이를 통해 나노복합체의 첨가는 표면의 정전기적 반발력에 의한 영향보다는 입도크기의 변화로 콜로이드의 안정성을 결정하는 것으로 생각된다. 이렇게 각각의 조건으로 생성된 멀티나노소재의 샘플들을 한달 동안 저장하면서 생기는 변화는 그림 92에 나타내었다. 평균입자 크기가 변화 없었던 것을 고려한다면 CA, HPbCD, MD, ClusD가 들어간 멀티나노소재에서는 호스트 농도에 상관없이 모두 대조군과 비슷한 것으로 예상되었으나 실제 저장 후에는 5% 이상에서 크림링 현상이 발견되어 불안정한 모습을 보였다. CD 또한 농도가 1%가 넘어가게 되면 서로 응집되거나 유적(oil droplet) 표면에 소수성 부분이 달라붙어 서로 엉키게 되면서 침전현상을 나타냈다. 따라서 평균 입도크기와 제타전위, 저장 중 나타나는 여러 현상들을 고려해 CA, HPbCD, MD, ClusD를 호스트로 하여 만든 나노복합체는 전체의 5%, CD로 만들어진 나노복합체는 1%로 하여 나노에멀전에 첨가 및 멀티나노소재를 제조하고 여러 가지 특성을 측정하였다.

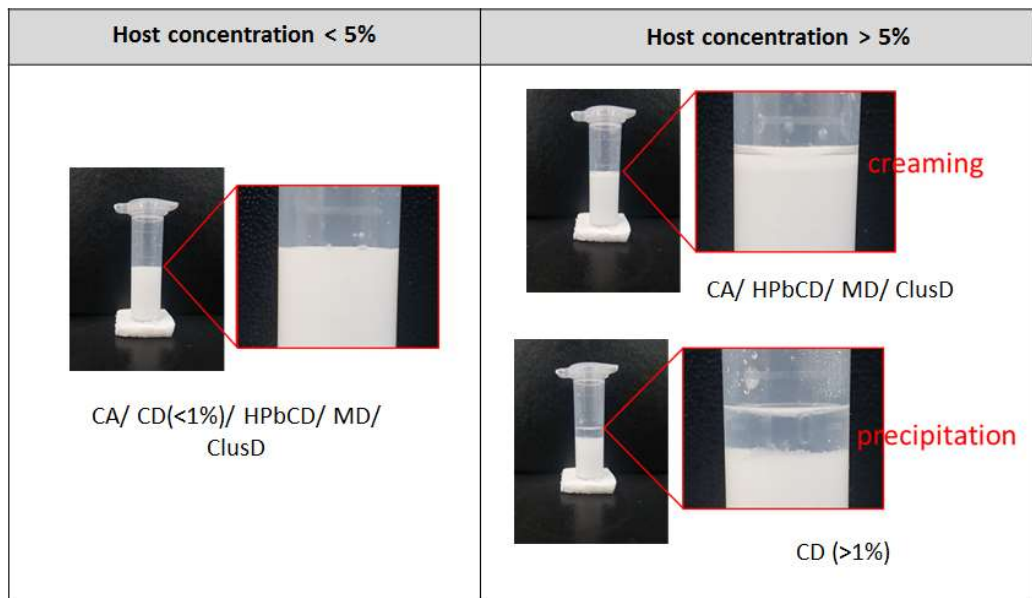


그림 92. 호스트 농도별 멀티나노소재의 크림링, 침전현상을 통한 저장안정성 측정

나) 멀티나노소재의 효능평가

제조된 멀티나노소재의 항산화 및 항균력을 알아보기 위해서 (그림 93)와 같이 5가지의 시스템을 서로 비교하면 실험을 진행하였다. 대조군으로는 수용액 중에 감초가 포접된 나노복합체(그림 93-A)와 로즈마리가 캡슐화 되어있는 나노에멀전(그림 93-B)을 선정하였고, 코어소재가 없는 에멀전에 감초-나노복합체를 섞은 샘플(그림 93-C), 반대로 감초가 들어 있지 않은 환형 다당류에 로즈마리-나노에멀전을 혼합한 샘플(그림 93-D), 감초-로즈마리 모두 포함된 멀티나노소재(그림 93-E)를 실험군으로 사용하였다. 호스트의 종류로는 CA, CD, HPbCD를 사용하였는데, MD와 ClusD의 경우는 CA를 호스트로 사용하였을 때와 호스트 자체의 용해도, 게스트물질과의 결합력, 제조된 멀티나노소재의 평균 입도크기, 제타 전위 및 저장 중 안정성 등이 매우 비슷한 결과를 가졌기 때문에 CA를 대표로 하여 실험하였다. 포접되거나 캡슐화된 감초와 로즈마리의 양은 동일하게 넣어 실험하였다.

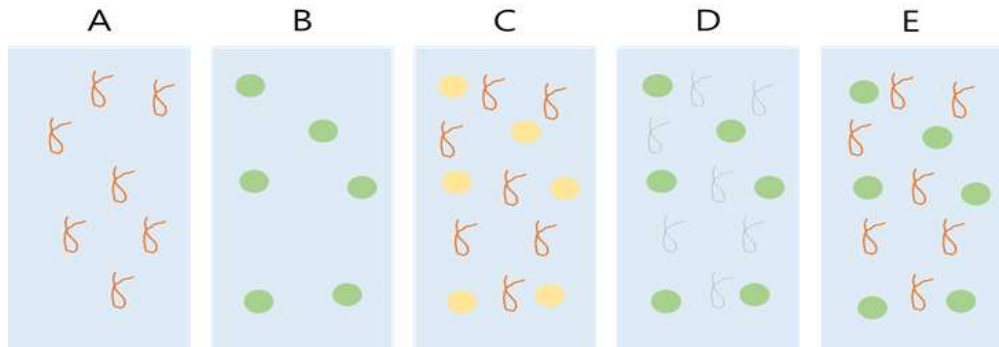


그림 93. A~E까지의 환경을 제조하여 항균/항산화 실험 진행 {A: 나노복합체(licorice), B: 나노에멀전(rosemary), C: 나노복합체(licorice) + 나노에멀전(X), D: cyclic glucan(X) + 나노에멀전(rosemary), E: 멀티나노소재}

① 멀티나노소재의 항산화 활성 평가

감초가 포접된 나노복합체(A)와 로즈마리가 캡슐화된 에멀전(B)의 항산화력을 비교하면 (그림 94), 모든 호스트 종류에서 A의 샘플에서 더 높은 항산화력이 발견되었다. 이는 일반적으로 잘 알려진 로즈마리의 항산화력을 감안한다면 환형 다당류에 비해서 기름 안에 있는 게스트물질의 항산화효과가 비교적 낮게 측정된 것으로 게스트물질이 기름 안에 완전히 캡슐화 되었기 때문에 밖으로 항산화력의 효과가 덜 발휘되었던 것으로 생각된다.

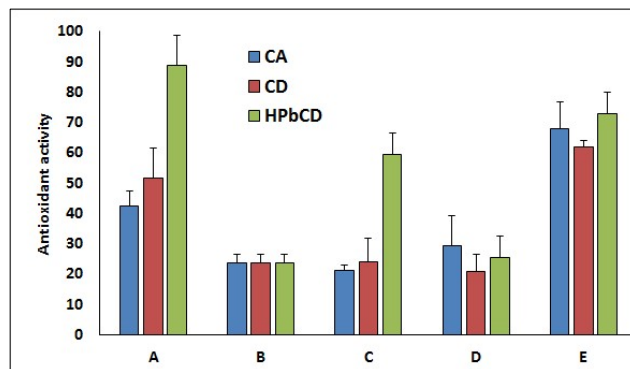


그림 94. 각 시스템 및 호스트 별 항산화력{A: 나노복합체(licorice), B: 나노에멀전(rosemary), C: 나노복합체(licorice) + 나노에멀전(X), D: cyclic glucan (X) + 나노에멀전(rosemary), E: 멀티나노소재}

나노복합체 내에서도 호스트의 종류에 따라서 항산화력이 차이를 보였는데, CA<CD<HPbCD 순으로 더 높은 항산화력을 보였다. 이 결과는 위에서 실험하였던 그림 94의 결과와 비슷한 경향을 나타냈는데 같은 양의 감초추출물을 넣었을 때 CA에 비해서 HPbCD에서 더 높은 용해도를 나타내 그만큼 많은 감초가 존재하는 HPbCD 호스트에서 높은 항산화력이 측정된 것을 알 수 있다. CD의 경우 HPbCD의 양(5%)에 비해 낮은 양(1%)이 들어있었기 때문에 상대적으로 낮은 감초 용해도로 인한 낮은 항산화 값을 보였다.

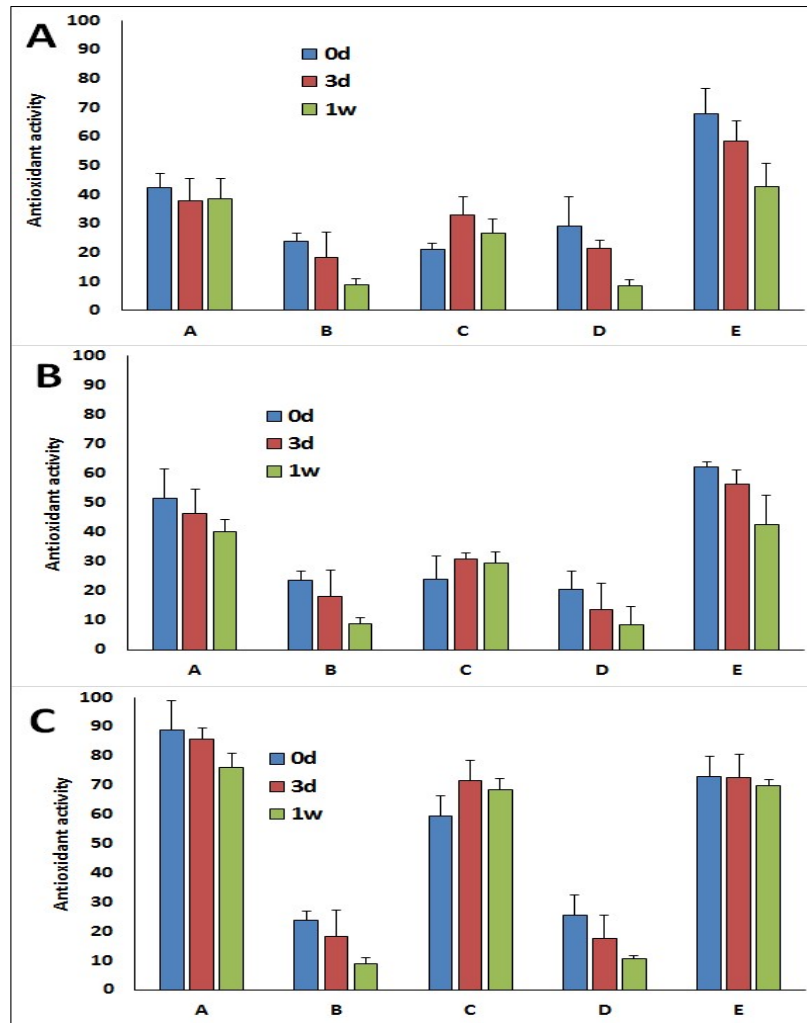


그림 95. 각 시스템의 호스트 별 저장 중 항산화능 변화 (A: CA, B: CD, C: HPbCD)

또한 나노복합체만 존재하는 상태(A)와 나노복합체 주변에 에멀전을 섞은 상태(C)의 항산화력이 달라졌는데, 아무것도 캡슐화시키지 않은 기름방울의 존재만으로도 항산화력이 다소 감소하는 결과를 보였다. 이는 나노복합체 내에 포접된 감초 성분이 빠져나와 기름 속으로 녹아져 들어갔거나, 나노복합체 자체가 기름표면에 달라붙어 응집현상이 나타나 감소된 항산화능을 보이는 것으로 생각된다. 나노에멀전의 경우는 환형 다당류의 첨가 유무(B, D)의 관계없이 비슷한 항산화력을 가졌다. 멀티나노소재(E)의 항산화력은 약간의 차이는 있었지만 나노복합체(A)와 나노에멀전(B)의 항산화력의 합과 비슷한 값을 나타냈으며, 이를 통해 멀티나노소재의 항산화능은 나노에멀전에 비해 나노복합체가 더해지면 향상된 항산화력을 나타내었다. 위 시스템을 호스트별로 나누어 일주일 동안 저장한 결과는 그림 95에 나타냈었고, 제조 직후와 마찬가지로 나노복합체의 항산화능과 나노에멀전의 항산화능의 합으로 멀티나노소재의 항산화능을 구할 수 있었다. (호스트별 멀티나노소재의 degradation rate, k: CA= 0.20, CD= 0.16, HPbCD= 0.02)

② 멀티나노소재의 항균 활성 평가

에멀전을 기반으로 한 멀티나노소재는 그 자체로 매우 혼탁하여 MIC test를 진행할 수 없고 계스트물질 또한 기름 안에 존재하기도 하여서 agar well diffusion test나 paper disc assay를 진행하기에는 정확한 결과를 보이기 어려웠기 때문에 time kill assay를 이용하여 항균력을 측정하였다. Time kill assay는 특정 시간(30분)동안 샘플과 균(*B.subtilis*)을 반응 시킨 후 반응물을 아가 배지에 도말하여 처음대비 감소된 균의 CFU/ml 수치를 구하여 항균력을 측정하였다.

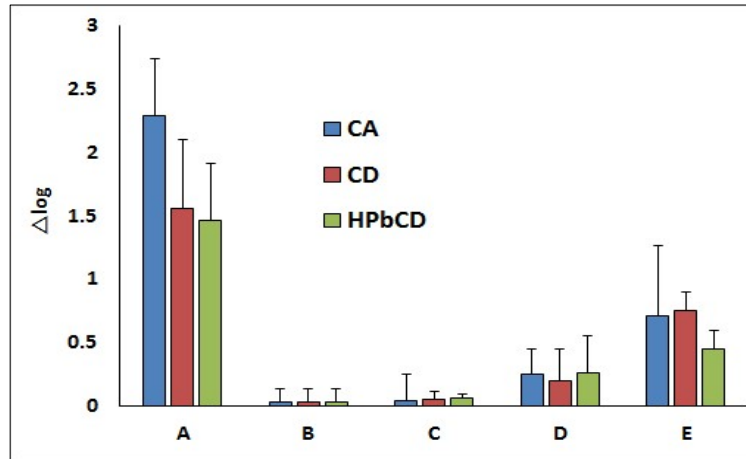


그림 96. 각 시스템별 감소된 균의 수를 통한 항균력 측정(A: 나노복합체(licorice), B: 나노에멀전(rosemary), C: 나노복합체(licorice) + 나노에멀전(X), D: cyclic glucan (X) + 나노에멀전(rosemary), E: 멀티나노소재)

2차년도 결과에서 에멀전 시스템만을 이용하여 항균력을 측정하면 코어소재가 들어갔음에도 불구하고 항균효과가 거의 나타나지 않거나 매우 약하게 측정되었는데, 이번 실험(그림 96)에서도 나노에멀전에 로즈마리 추출물을 캡슐화시킨 샘플(B)에서는 약 0.04 log cycle밖에 균을 감소시키지 못하였다. 항산화력과 마찬가지로 기름방울 내에 존재하는 로즈마리분자가 매우 촘촘히 캡슐화 되어있어 밖으로 항균효과를 나타내지 못하는 것으로 생각된다. 반면에 나노복합체를 이룬 샘플에서는 약 1.5~2.0 log cycle까지 균을 줄이는 효과가 나타났는데, 기름과는 달리 나노복합체는 수용액상에 잘 섞이게 되므로 균과의 결합이 쉽게 이루어 질 것이고, 복합체 안에 있는 코어물질의 항균력이 비교적 균에 잘 전달된 것으로 보여 진다. 호스트의 종류도 나노복합체의 항균력에 영향을 미쳤는데 항산화와는 달리 CA가 HPbCD보다 높은 항균효과를 보였다. 멀티나노소재(E)는 나노복합체의 첨가로 인해 항균력이 거의 나타나지 않은 나노에멀전에 비해서 1 log cycle 정도의 균 감소량 효과가 나타났다. 이렇듯 나노복합체는 나노에멀전의 수상에 존재하면서도 항산화력과 항균력을 지속적으로 나타내는 결과를 나타냈는데 나노복합체가 에멀전 기름과 반응을 가지는지 알아보기 위해 steady-state 방법을 통해 알아보았다(그림97). 일반적인 나노에멀전은 운동거동이 물과 비슷한 newtonian 형태를 보인 반면(A), 수상에 나노복합체를 첨가하게 되면 낮은 shear rate에서 점도가 생기는 shear thinning 현상이 나타났다(B). 이를 통해 호스트와 기름방울이 서로 네트워크를 형성하여 달라진 거동을 보이는 것으로 생각되

며 멀티나노소재가 항균, 항산화 등의 효과를 나타낼 때, 각각의 두 시스템이 독립적이기 보다는 상호적으로 영향을 끼치는 것으로 보인다. 따라서 멀티나노소재의 항균력은 단순한 코어물질의 농도보다는 항균력이 발휘되는 환경적 요인에도 많은 영향을 받을 것으로 생각된다.

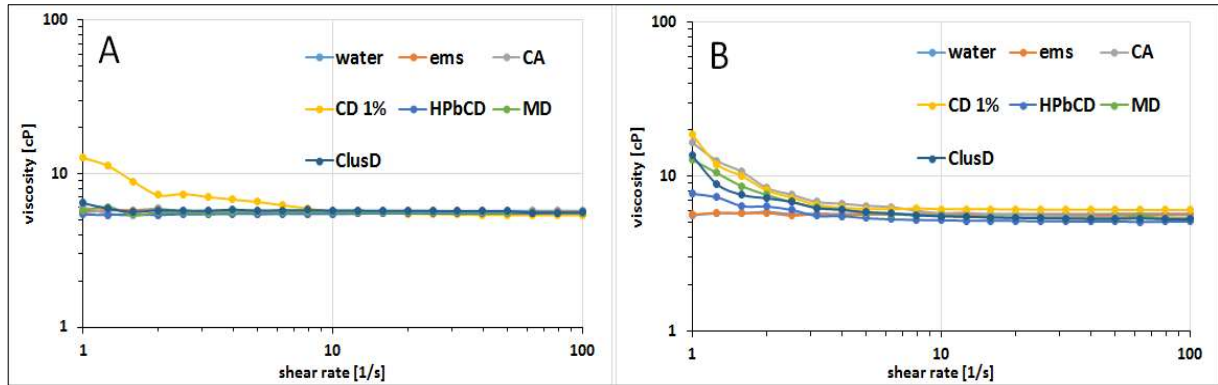


그림 97. 호스트를 물(A)과 에멀전(B)에 각각 섞었을 때 나타나는 점도의 변화

한가지 눈여겨 볼 만한 점은, 로즈마리-나노에멀전(B) 수상에 게스트물질을 포접하고 있지 않은 순수한 환형 다당류의 단순한 첨가(D)만으로도 항균력의 증가(균 감소량: 0.04 log cycle→0.27log cycle)가 나타난 것이다. 이렇게 항균소재가 더 첨가되지 않았음에도 불구하고 항균력이 높아진 이유는 첫 번째로 제타전위의 변화를 들 수 있다. 일반적으로 *B.subtilis*를 포함한 박테리아 셀의 제타전위는 -20mV~-30mV로 알려져있다. 이번 실험을 통해서도 실험에 사용한 균주의 제타전위는 -21.7mV임을 알 수 있었다(그림 98). 이때 나노에멀전의 제타전위는 -51.4mV 였는데 호스트 물질의 첨가만으로도 -45.3mV으로 제타전위의 절대 값이 약간 떨어지는 경향을 나타냈다.

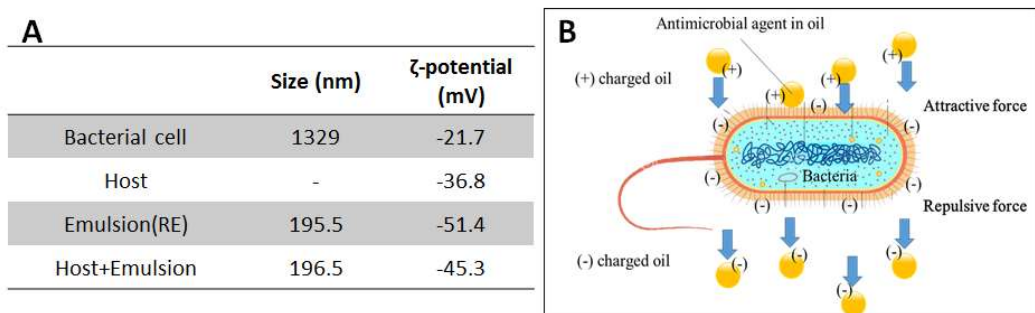


그림 98. 균과 나노에멀전 제타전위(A)의 의한 균과의 반응 모식도(B)

이로 인해 균주와 나노에멀전 간의 반발력의 크기가 약해져 기름방울 내에 존재하는 로즈마리의 항균효과가 균에 더 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 실제로 D-글루코사민과 N-아세틸글루코사민으로 이루어진 선형 다당류인 키토산은 그 자체로 항균력을 나타내는데 그 이유 중 하나가 표면이 (+)로 이루어져 있기 때문에 (-)차지를 띠는 균 표면에 잘 달라붙어서 균의 대사활동을 방해하는 것으로 알려져있다. 이처럼 환형 다당류의 첨가로 인한

변화된 나노에멀전의 제타전위가 항균력에 영향을 미쳤을 것이다. 두 번째로는 기름 속에 들어있는 로즈마리 분자가 수용액 상으로 방출되었을 때 바깥에 존재하는 호스트들에 의해 다시 포접되고 균과의 결합을 통한 항균력의 증진을 생각할 수 있다. 실제로 에멀전 수상에 호스트의 양이 증가할수록 항균력 또한 증가하는 결과를 나타냈는데(그림 99), 상대적으로 많은 양의 호스트가 수상에 존재한다면 에멀전 기름 층에서 방출된 로즈마리추출물의 분자가 더 많이 호스트 안으로 들어갈 것이고 항균제로써의 효과를 발휘하였을 것이다.

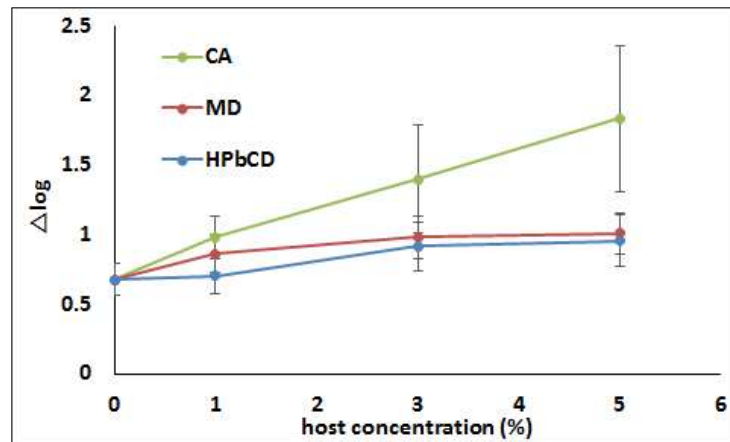


그림 99. 로즈마리-나노에멀전 수상에 존재하는 cyclic glucan의 종류 및 농도에 의한 항균력의 변화

이렇듯, 멀티나노소재는 나노에멀전에 비해 항균 및 항산화력 효과가 모두 증가하는 결과를 나타냈다. 또한 단순히 나노에멀전 수상에 포접능이 있는 환형 다당류를 첨가하였을 때 나타나는 항균력 상승 및 유변학적 변화, 안정성에 대한 효과 등을 고려한다면 천연 항균/항산화소재의 효율을 증진 시키는 연구에 기초실험으로써의 의의가 크다고 볼 있다. 더 나아가 이러한 멀티나노소재를 통해 물과 기름 층 모두에 기능성 물질을 첨가하여 친수성, 소수성 환경 모두에서 높은 효율을 가지는 새로운 식품의 제형을 개발하는 데에도 도움이 될 것으로 생각된다.

(3) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 제조 및 용해도 평가

가) 로즈마리추출물 분지텍스트린 나노복합체 제조조건 확립

과량의 로즈마리추출물을 다른 농도의 분지텍스트린 용액에 혼합하여 시간에 따라 용해되는 카르노스산의 농도를 측정된 결과를 그림 100-A에 나타내었다. 분지텍스트린이 없는 로즈마리추출물 단독을 교반하였을 때 용해된 카르노스산의 함량은 48시간동안 거의 변하지 않았다. 반면 분지텍스트린의 5% 이상 존재 시, 혼합액을 24시간까지 교반하여 복합체 형성을 계속함으로써 용해된 카르노스산의 함량은 점진적으로 증가하였다. 이러한 결과는 분지텍스트린의 농도가 높을수록 카르노스산과 복합체를 형성하기 위한 충분한 시간이 필요하다는 것을 의미한다. 즉 복합체 형성에 대한 연장된 교반이 카르노스산과 분지텍스트린 사이의 상호 작용을 증가시킨다는 것이 증명되었다. 또한 24시간 후 추가 교반은 카르노스산을 용해시키는 데 더 이상 효과적이지 않은 것으로 나타났다.

나) 로즈마리추출물 분지텍스트린 나노복합체 용해도 비교

로즈마리추출물 분지텍스트린 나노소재의 카르노스산의 용해도는 대조군(로즈마리추출물 단독)에 비해 분지텍스트린이 1%, 5%, 10%, 30%로 증가할수록 1.27배, 1.37배, 1.69배, 2.05배 증가하였다 (그림 100-B). 호스트로서 베타사이클로덱스트린을 사용하였을 때 1%, 5%에서 카르노스산의 용해도를 높이는 데 분지텍스트린보다 효과적이었으나, 10%, 30%와 같이 고농도에서는 분지텍스트린보다 효과적이지 않았다. 1차년도에 개발된 환형아밀로스는 10%까지는 분지텍스트린과 비슷한 효과를 보였으나 30%에서는 유의적으로 우수한 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 호스트 물질에 따라 카르노스산과 상이한 상호작용 특성을 가지는 것을 시사하며, 호스트 물질의 cavity size, conformation 의 차이가 그 원인일 수 있다. 분지텍스트린은 고농도에서 환형아밀로스보다 효과적이지는 않았지만 환형아밀로스는 아직까지 상업적으로 식품에 이용이 가능하지 않다는 점을 고려할 때, 카르노스산의 용해도 향상을 위한 solubilizer로서 분지텍스트린의 사용을 제안할 수 있다.

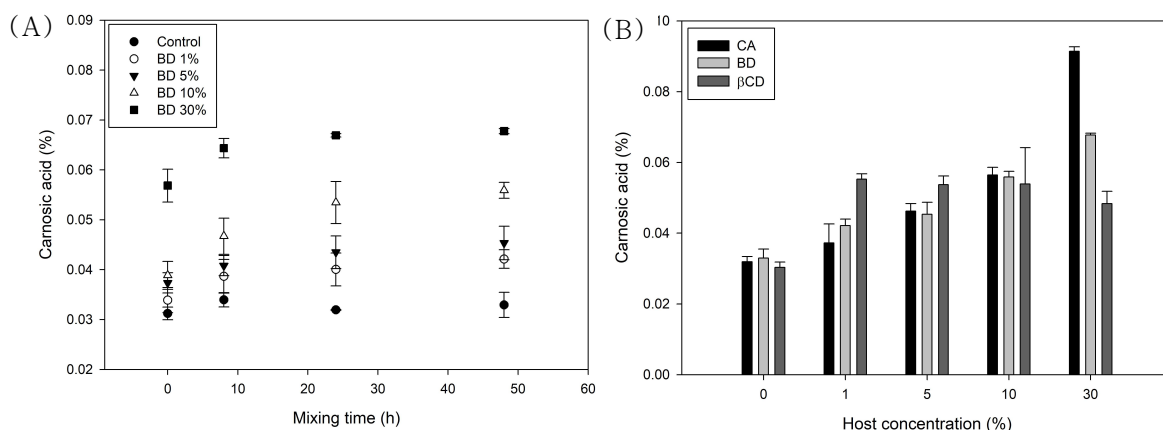


그림 100. (A) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체 제조 조건, (B) 피복소재 (CA, BD, β CD)에 따른 로즈마리 복합체의 용해도 비교

(4) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체의 형성능 및 이화학적 특성 조사

가) 결정학적 특성(XRD)

로즈마리추출물과 분지텍스트린 사이의 분자 상호작용 및 복합체 형성을 확인하기 위해 X선 회절 분석이 수행되었다. 로즈마리추출물, 분지텍스트린, 물리적 혼합물, 고체 복합체의 X선 회절 패턴을 순서대로 (그림 101-A)에 나타내었다. 로즈마리추출물은 결정성 패턴을 나타내었고 분지텍스트린은 자연적인 무정형 특성을 보였다. 물리적 혼합물에서는 로즈마리추출물의 결정질 피크가 분지텍스트린의 무정형 패턴에 중첩되어 약간 감소되어 나타났다. 한편, 고체 복합체의 회절패턴에서는 로즈마리추출물에 상응하는 결정질 피크가 완전히 사라지고 무정형 패턴만이 관찰되었다. 또한 분지텍스트린의 회절 패턴에서 20° 부근에서 나타난 넓게 굴곡진 패턴이 복합체에서는 좀 더 넓게 확장되었다. 로즈마리추출물과 분지텍스트린의 물리적 혼합물과 고체 복합체의 상이한 결정성은 두 물질간의 분자 상호 작용에 의해 야기되며 따라서 두 물질이 복합체를 형성하였음을 의미한다.

나) 표면특성(FESEM)

전계 방출 주사 전자 현미경은 시료 표면으로부터 다양한 정보를 제공하며 호스트와 게스트 물질의 고유한 표면 특성과 그 변화를 분석함으로써 복합체의 형성 여부를 확인할 수 있다. 로즈마리추출물은 불규칙한 모양의 결정 입자로 나타났으며 이는 XRD 분석에서 결정성 특성을 나타내는 결과와 일치한다(그림 101-B). 분지텍스트린은 분무 건조된 분말에서 일반적으로 관찰되는 무정형 구형 입자를 나타내었다. 로즈마리추출물과 분지텍스트린의 물리적 혼합물에서는 두 입자가 원래의 형태를 유지하는 것으로 관찰되었다. 반면 복합체의 표면 형태는 두 입자의 원래 형태와는 상당히 다른 불규칙한 입자 형태로 관찰되었다. 복합체의 형태는 일정한 모양을 나타내지 않았으며, 다양한 크기와 밀도를 보였다. 또한 작은 입자가 큰 입자의 표면에 부착된 형태도 발견되었다. 복합체는 로즈마리추출물의 손실 및 분지텍스트린의 형태학적 외관에서 명백한 변화를 나타내었으며, 이는 일반적으로 분자 간 상호 작용의 증거로 간주되어진다.

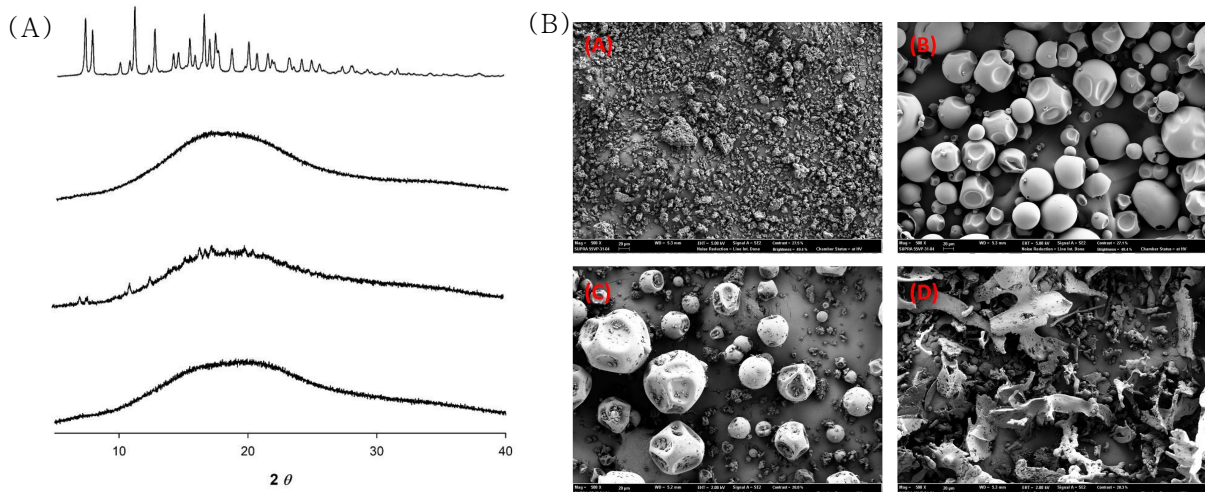


그림 101. (A) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체의 X-선 회절 분석, (B) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체의 표면 분석 ((A)로즈마리추출물; (B)분지텍스트린; (C)물리적 혼합물; (D)고체 복합체)

다) 입도 분석

로즈마리추출물 분지텍스트린 나노소재의 용액 중의 분산 정도를 확인하기 위해 입도를 평가하였다 (표 70). 로즈마리추출물 단독을 수용액 중에 분산 시켜 측정된 결과, 4729 nm의 평균 직경을 갖는 것으로 확인되었다. 큰 평균 직경은 물에 대한 매우 낮은 분산성과 응집체 형성을 나타낸다. 대조적으로 분지텍스트린과의 복합체를 형성한 나노소재의 경우, 985.7nm의 평균 직경을 나타내었다. 이러한 결과는 나노소재가 로즈마리추출물 단독에 비해 물에 대한 분산성이 높음을 의미한다. 즉, 분지텍스트린과의 복합체 형성은 로즈마리추출물의 물에서의 응집, 침전 등의 불안정성을 방지하고 물에서 분산성을 높여 안정성에 기여할 수 있다.

표 70. 로즈마리추출물 및 분지텍스트린 나노소재의 입도 비교

물질	평균 직경(d, nm)	PDI
로즈마리추출물	4729±154.7	0.206±0.216
나노소재 (분지텍스트린:로즈마리추출물=5:1)	985.7±29.3	0.343±0.029

(5) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체의 효능평가

가) 항산화 활성 평가

로즈마리추출물 분지텍스트린 나노소재의 항산화 활성을 ABTS 라디칼 소거능 방법을 통해 평가하였다 (그림 102). 수용액에서의 로즈마리추출물 단독의 항산화 활성은 19.49%로 측정되었다. 반면 분지텍스트린의 존재 하에서, 로즈마리추출물의 항산화 활성은 분지텍스트린의 농도가 1%에서 30%로 증가함에 따라 21.24%에서 54.25%로 점진적으로 증가하였다. 비교 물질로 사용한 베타사이클로덱스트린의 경우, 1% 존재 하에서 가장 높은 항산화 활성을 나타내었고 그 이상의 농도에서는 항산화 활성이 감소되는 결과를 나타내었다. 이러한 결과에서 분지텍스트린은 고농도로 존재하여도 로즈마리추출물의 항산화 활성에 부정적인 영향을 미치지 않으며, 항산화 활성을 향상시키는 긍정적 효과는 호스트 물질에 따른 로즈마리추출물의 가용화와 관련되어있음을 알 수 있다. 이는 항산화 활성이 용액 내의 분지텍스트린의 농도가 증가함에 따라 증가한 결과를 통해 입증되었다. 따라서 나노소재는 카르노스산의 용해도를 향상시킴으로 인해 결과적으로 용액에서의 항산화 기능을 향상시켰다.

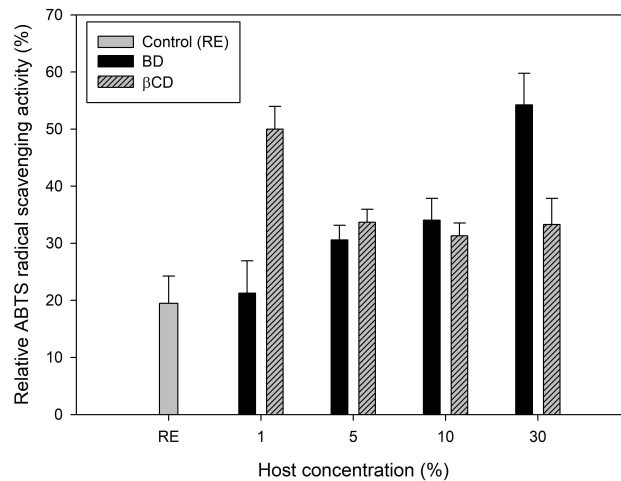


그림 102. 피복소재 종류 및 농도에 따른 로즈마리 나노복합체의 항산화 활성 비교

나) 항균 활성 평가

식품의 부패균 중의 하나인 *Bacillus subtilis*에 대하여 로즈마리추출물 및 분지텍스트린 나노소재의 항균 활성을 조사하였다. 로즈마리추출물 및 나노소재의 항균활성은 미생물의 가시적인 성장을 방해하는 항균제의 최저 농도로 정의되는 MIC(minimal inhibition concentration) assay를 통해 측정되었다. 그 결과, 수용액에서의 로즈마리추출물 단독의 MIC값은 53.16ppm으로 측정되었다 (표 71). 나노소재의 효능을 시험한 결과, 분지텍스트린의 농

도가 1%에서 30%로 증가함에 따라 MIC값은 57.63ppm에서 11.01ppm으로 감소하였다. 즉 낮은 MIC값은 높은 항균 활성을 나타내므로 분지텍스트린의 고농도 존재에 의해 로즈마리추출물의 항균 활성은 증가하였음을 알 수 있다. 베타사이클로텍스트린의 경우, 농도가 높을수록 MIC값은 높아지며 항균 활성은 감소하는 것으로 나타났다. 이 결과는 분지텍스트린이 베타사이클로텍스트린 보다 부패균의 성장 억제에 효과적임을 보였다. 또한 고농도의 분지텍스트린의 존재 하에서 로즈마리추출물의 항균 활성은 복합체 형성에 의해 저해 받지 않으며, 로즈마리추출물의 용해도에 의존한다는 것을 알 수 있다. 이러한 이유는 분지텍스트린에 의한 로즈마리추출물의 향상된 수용성이 수용액에서 병원균과의 접촉을 촉진시켰기 때문으로 설명된다. 따라서 이러한 결과는 로즈마리추출물 분지텍스트린 나노소재가 수용성 식품 시스템에서 부패균을 효과적으로 억제할 수 있음을 시사한다.

표 71. 피복소재 종류 및 농도에 따른 로즈마리 나노복합체의 항균 활성 비교

호스트 농도	로즈마리 분지텍스트린 나노소재(MIC, ppm)	로즈마리 베타사이클로텍스트린 나노소재 (MIC, ppm)
0%	53.16±2.51	53.16±2.51
1%	57.63±4.65	33.11±12.09
5%	37.88±7.71	37.73±0.73
10%	35.79±0.96	43.13±10.78
30%	11.01±0.43	37.17±0.79

(6) 로즈마리추출물 분지텍스트린 나노복합체의 안정성 평가

가) 나노복합체 열안정성 평가

로즈마리추출물 및 나노소재의 열 안정성을 열 가속 시험을 통해 항산화 활성을 측정하여 평가하였다. 열을 가하기 전 로즈마리추출물과 나노소재의 초기 항산화 활성을 100%로 결정하고 열을 가해준 시간에 따른 항산화 활성의 변화를 백분율로 나타내었다 (그림 103-A). 그 결과, 로즈마리추출물 단독의 항산화 활성은 열을 가한 지 24시간 후 47.3%로 감소하였다. 분지텍스트린 나노소재의 경우, 1%에서 30%로 농도가 증가함에 따라 24시간 후의 항산화 활성은 53.6%에서 69.1%로 증가하였다. 분지텍스트린의 존재 하에 로즈마리추출물의 항산화 활성의 열안정성은 로즈마리추출물 단독으로 존재할 때 보다 약 1.13~1.46배 증가하였다. 따라서 분지텍스트린은 로즈마리추출물의 열안정성에 기여하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 식품의 제조, 가공, 운반, 보관 중에 발생하는 열로 인해 기능성 성분이 분해되어 그 기능이 저하되는 것을 분지텍스트린이 막아 줄 수 있음을 시사하며, 분지텍스트린은 로즈마리추출물의 안정제로 사용될 수 있다.

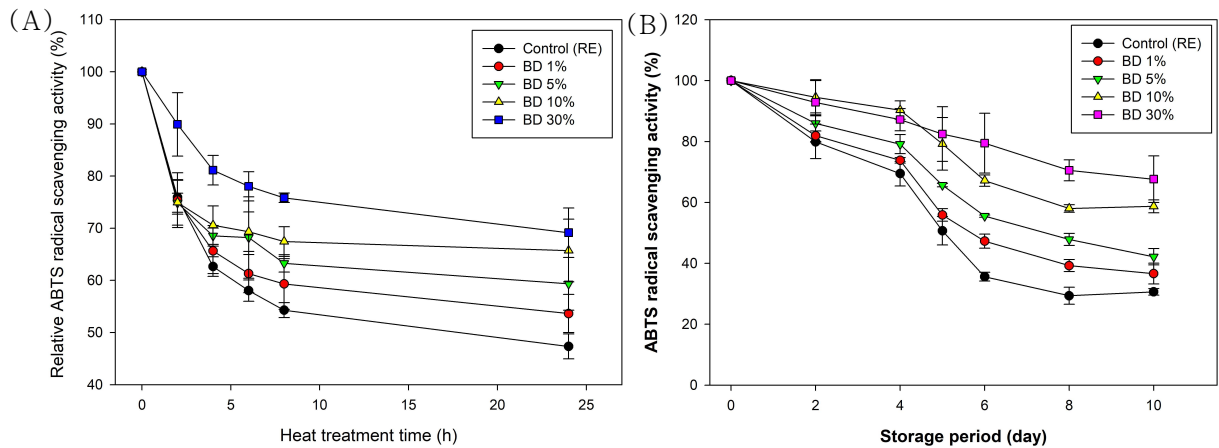


그림 103. (A) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체의 열안정성, (B) 로즈마리 분지텍스트린 나노복합체의 저장 안정성

나) 나노복합체 저장안정성 평가

수용액에 용해된 로즈마리추출물 및 나노소재의 저장 안정성을 항산화 활성의 변화를 측정하여 평가하였다. 초기 항산화 활성을 100%로 결정하고 10일 동안 저장 중 항산화 활성을 백분율로 나타내었다 (그림 103-B). 로즈마리추출물 단독의 항산화 활성은 10일 후 100%에서 30.6%로 감소하였다. 반면 분지텍스트린 나노소재는 분지텍스트린의 농도에 따라 항산화 활성의 감소에 차이가 있었다. 분지텍스트린의 농도가 1%에서 30%로 증가함에 따라 10일 후의 나노소재의 항산화 활성은 36.6%에서 67.6%로 증가하였다. 이는 로즈마리추출물 단독의 경우 보다 약 1.19~2.20배 높은 항산화 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 분지텍스트린이 로즈마리추출물과 상호작용하여 로즈마리추출물이 수용액에서의 산화로 인해 분해되는 것을 막아주는 데 효과가 있음을 시사한다. 또한 로즈마리추출물의 항산화 활성의 감소는 4~6일에 두드러지게 나타나는데, 이는 2차년도 결과에서 보고한 바와 같이 항산화 기능 성분인 카르노스산이 4~5일 쯤 카르노졸로 완전히 분해되며, 카르노졸 또한 5~6일 쯤 빠르게 분해되는 현상에 기인한다. 반면 분지텍스트린 나노소재는 카르노스산의 분해 중간 산물의 안정성에 기여하여 4~6일 쯤 일어나는 급격한 항산화 활성의 변화를 완화시켜준다. 본 연구 결과를 통해 분지텍스트린은 로즈마리추출물의 수용액에서의 산화 안정성에도 기여하는 것을 알 수 있다.

III. 제2협동기관 (명지대학교)

1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) 난백, 식물 유래 단백질 계열의 나노소재화 보조제 개발

가) 난백 유래 단백질의 나노소재화 보조제 개발

① 자가 조립에 의한 나노소재 제조공정

난백 단백질인 오브알부민(Ovalbumin, OA)과 고순도 로즈마리추출물(Rosemary extracts, RE)을 일정 비율로 섞어 자가 조립 혼합물(Self assembled RE-OA)을 제조하였다. 혼합물을 다시 한 번 균일하게 섞어준 다음, 실온에서 2시간 교반하였다. 부유물은 원심분리로 제거한 후에 상층부의 RE-OA 나노소재를 취하여 사용하였다 (그림 104).



그림 104. 자가 조립에 의한 RE-OA 나노소재 제조공정

② 열처리에 의한 나노소재 제조공정

오브알부민을 열처리(Heat treated)하여 나노소재 크기로 제조하였다. 열처리한 나노 단백질에 RE를 추가하여 교반 및 원심분리한 이후, 상층부의 RE-OA 나노소재화 보조제를 취하여 사용하였다(그림 105).

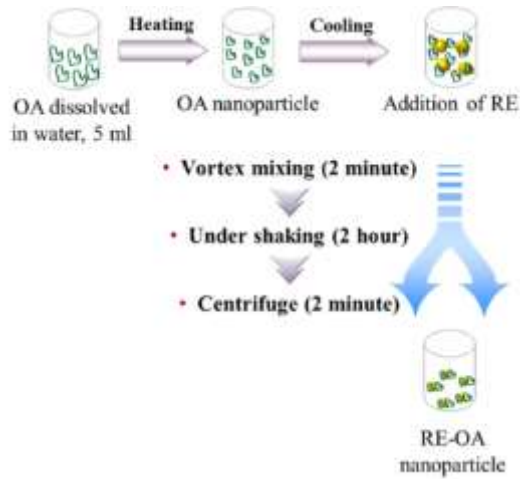


그림 105. 열처리에 의한 RE-OA 나노소재 제조과정

나) 식물(콩) 유래 단백질의 나노소재화 보조제 개발

콩 단백질인 Soy protein isolate(SPI)를 교반 및 열처리하여 나노소재 크기로 제조하였다. 나노 단백질과 고순도 로즈마리추출물(Rosemary extracts, RE)을 일정 비율로 혼합하여 나노소재 혼합물을 제조하였다. 다시 한 번 균일하게 섞어준 후에, 부유물은 원심분리로 제거하고, 상층부의 RE-SPI 나노소재를 취하여 사용하였다 (그림 106).

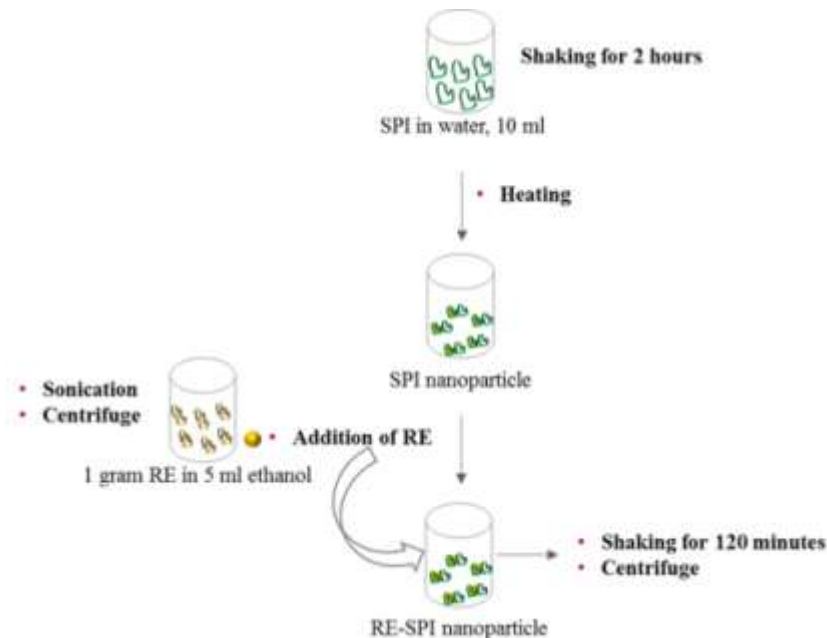


그림 105. RE-SPI 나노소재 제조과정

다) 식물(옥수수) 유래 단백질의 나노소재화 보조제 개발

옥수수 유래 단백질인 Zein을 고순도 감초추출물(Glabridin, GB)과 일정 비율로 섞어서 자가 조립 혼합물(Self assembled GB-Zein)을 제조하였다. 증발건조기를 이용하여 에탄올

을 증발시킨 후에 동량의 증류수를 첨가하여 제조한 GB-Zein 나노소재를 사용하였다 (그림 106).

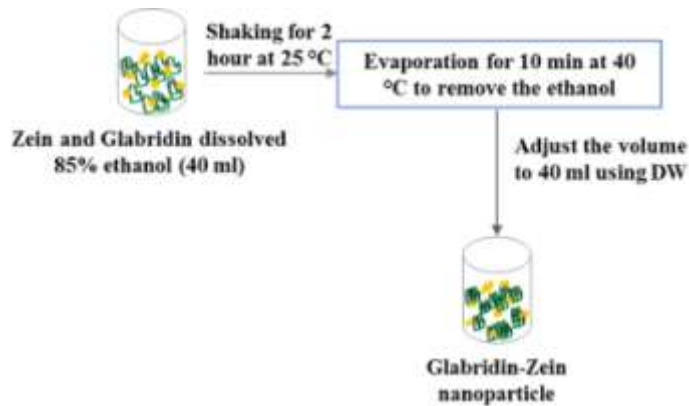


그림 106. GB-Protein 나노소재 제조공정

라) 고순도 감초추출물을 이용한 단백질 나노소재화 정도비교

혈청단백질(Human serum albumin, HSA)과 난백단백질(Ovalbumin, OA), 옥수수유래 단백질(Zein)을 물에 녹여 교반하며 자가 조립 혼합물을 제조하였다. 제조된 혼합물을 에탄올(85%)을 사용하여 일정 농도로 희석한 후에 에탄올에 녹인 고순도 감초추출물을 첨가하였다. 이후, 균일하게 섞어주며 실온에서 교반하여 나노복합체를 제조하였다 (그림 107).

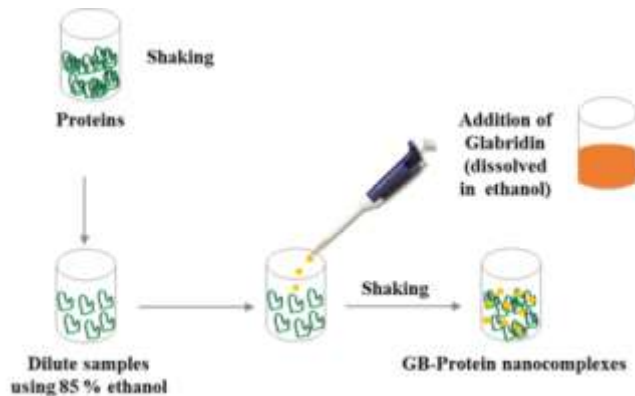


그림 107. GB-Protein 나노소재 제조공정

(2) Fluorescence, UV/Vis spectroscopy를 통한 광학적 특성, 포집도 평가

가) 나노소재 포집도 평가

나노소재를 0 ~ 1%까지 6단계로 용해하여 Fluorescence spectroscopy를 분석하여 나노소재의 포집정도를 평가하였다. 또한, 단백질을 구성하는 아미노산 중 Tyrosine 및 Tryptophan의 SFS intensity 비교를 통하여 코어소재의 결합여부를 파악하였다.

나) 나노소재 용해도 비교

용해한 나노소재의 UV/Vis spectroscopy를 분석하여 코어소재(Free core extract)와 나노소재의 용해도를 비교하였다.

(3) DLS (Dynamic Light Scattering) 분석을 통한 크기, 균일성, 제타전위 측정

가) 크기 (Z-average)

DLS를 이용하여 나노소재의 입자크기를 비교하고자 하였다. 코어소재 및 나노소재를 1% 용액으로 제조하고, 용액 내 분산하여 존재하는 입자크기를 분석하여 나노규모의 입자가 형성되었는지 확인하였다.

나) 다분산지수 (Polydispersity index, PDI)

나노입자의 균일성을 구하기 위해 사용되는 수식인 PDI를 사용하여 나노소재의 균일성을 확인하고자 하였다. 코어소재 및 나노소재를 1% 용액으로 제조하고, 용액 내 분산하여 존재하는 입자의 균일성을 비교하였다.

다) 제타전위 (Zeta-potential)

입자의 표면전위를 측정하여 나노입자의 구조적 안정성을 확인하기 위하여 Zeta potential 수치를 측정하였다. 코어소재 및 나노소재를 1% 용액으로 제조하고, 용액 내 분산하여 존재하는 입자의 표면전위를 비교하였다.

라) 형태학적 배열 (Morphology)

나노입자의 표면 형태를 확인하기 위하여 FE-SEM (Field emission scanning electron microscopy)을 사용하여 나노입자를 촬영하였으며, 이를 비교하기 위하여 코어소재를 포집하지 않은 Zein 단백질을 같이 촬영하여 형태학적 비교를 실시하였다.

(4) 고순도 추출물의 나노소재화에 따른 항산화효과 및 결합도 분석

가) 나노소재 항산화효과 분석

Radical 소거능력을 확인하는 방법 중 하나인 ABTS assay를 이용하여 고순도 추출물 및 나노소재의 항산화 효능을 비교분석 하였다.

나) 나노소재 결합도 분석

Benesi-Hildebrand equation 방법을 통한 나노소재의 결합상수 및 결합도를 계산하였다. 또한, Stern-Volmer equation을 활용한 결합상수 및 결합도를 계산하였다.

[Benesi-Hildebrand equation]

$$\frac{1}{\Delta A(\text{흡광도})} = \frac{1}{K\Delta\epsilon_{425}[\text{핵심성분}]} \times \left(\frac{1}{[\text{보조제}]} + \frac{1}{\Delta\epsilon_{425}[\text{핵심성분}]} \right)$$

[Stern-Volmer equation]

$$\frac{F_0(\text{처음형광세기})}{F(\text{나중형광세기})} = 1 + k_q t_0[\text{핵심성분}] = 1 + K_D[\text{핵심성분}]$$

다. 연구 결과

(1) 난백, 식물 유래 단백질 계열의 나노소재 광학적 특성 및 포집도 평가

가) 난백 유래 단백질 나노소재화 보조제 개발

Fluorescence spectroscopy를 이용하여 RE-OA 나노소재의 포집도를 평가하였다. 우선, 자가 조립 및 열처리를 통해 제조한 시료 모두에서 고순도 로즈마리추출물이 오브알부민에 결합하고 있음을 확인하였다 (그림 108).

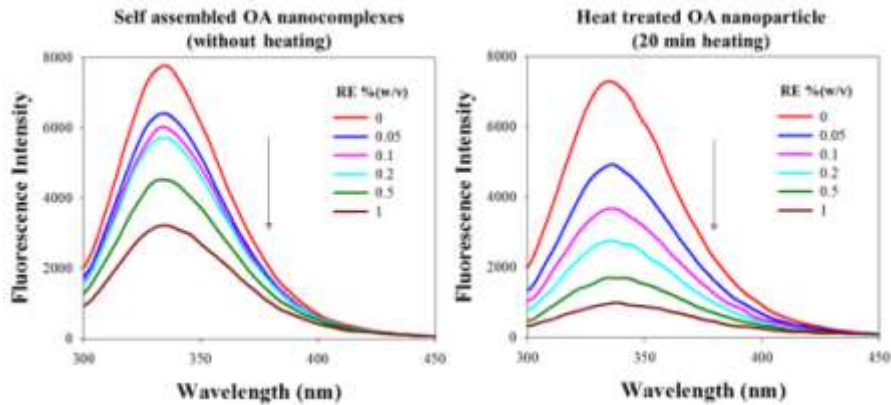


그림 108. 자가 조립(좌)과 열처리(우) RE-OA 나노소재의 포집도 평가

선행 연구를 통해 Tyrosine residues와 Tryptophan residues와 같은 오브알부민의 특정 아미노산에 고순도 로즈마리추출물이 결합할 것으로 예상하였다. 구조적 전이를 확인하는 SFS intensity 비교 결과로 결합 후의 고순도 로즈마리추출물의 고유파장이 감소하는 동시에 최대방출파장이 이동하는 것을 증명하였다 (그림 109). 본 연구를 통해 제조된 나노소재 (RE-OA)의 결합이 잘 이뤄졌음을 확인하였다.

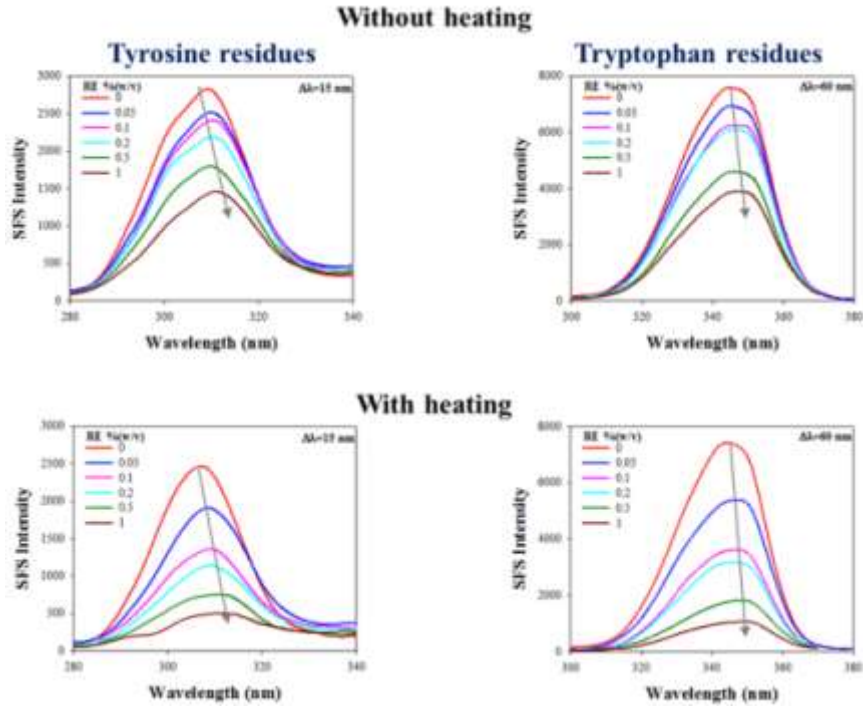


그림 109. 구조적 전이로 인한 RE-OA 나노소재의 로즈마리 고유파장 감소 및 최대방출파장 이동

다음으로, UV/Vis spectroscopy를 이용하여 고순도 로즈마리추출물(Free RE)과 나노소재(RE-OA)의 용해도 비교한 결과, 나노소재화를 통해 로즈마리추출물의 용해도가 기존대비 약 3배 증가된 것이 증명되었으며, 열처리를 통하여 용해도가 최대 5배까지 증가시킬 수 있음을 확인하였다 (그림 110).

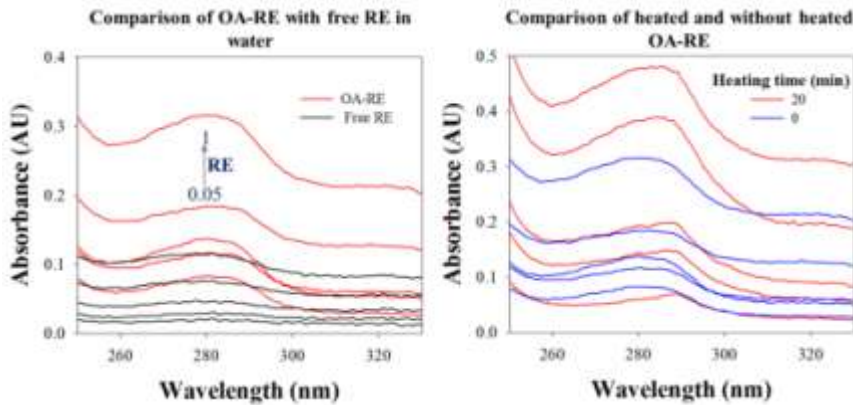


그림 110. 고순도 로즈마리추출물(Free RE)과 RE-OA 나노소재의 용해도 비교 (열처리 전(좌), 열처리 후(우))

나) 식물(콩) 유래 단백질의 나노소재화 보조제 개발

Fluorescence spectroscopy를 이용하여 RE-SPI 나노소재화 보조제의 포집도를 평가하였

다. 열처리 시간을 달리한 시료 모두에서 고순도 로즈마리추출물이 SPI에 결합하고 있음을 확인하였다 (그림 11).

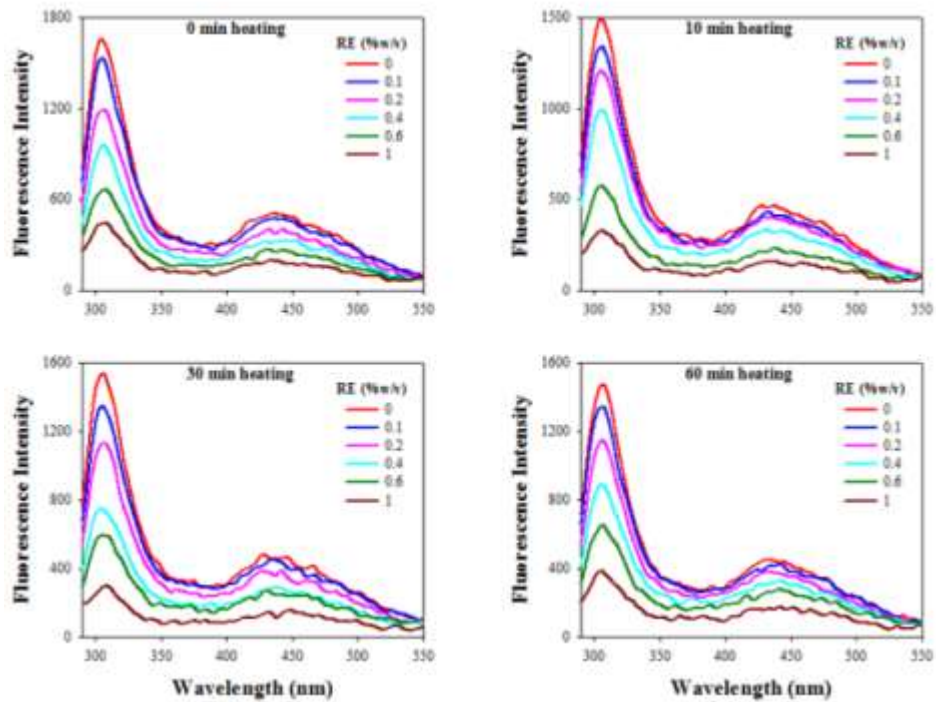


그림 11. 열처리 시간과 고순도 로즈마리추출물 농도에 따른 RE-SPI 나노소재의 포집도 평가

선행 연구를 통해 Tyrosine residues와 Tryptophan residues와 같은 SPI의 특정 아미노산에 고순도 로즈마리추출물이 결합할 것으로 예상하였다. 구조적 전이를 확인하는 SFS intensity 비교한 결과, 결합 후의 고순도 로즈마리추출물의 고유파장이 감소하는 동시에 최대방출파장이 이동하는 것을 증명하였다 (그림 112 및 113). 본 연구를 통해 제조된 나노소재(RE-SPI)의 결합이 잘 이뤄졌음을 알 수 있으며, 열처리 시간(0, 10, 30, 60분)을 달리하여 실험한 결과, 열처리를 가한 시료의 경우에 결합이 더 잘되는 것을 확인하였다.

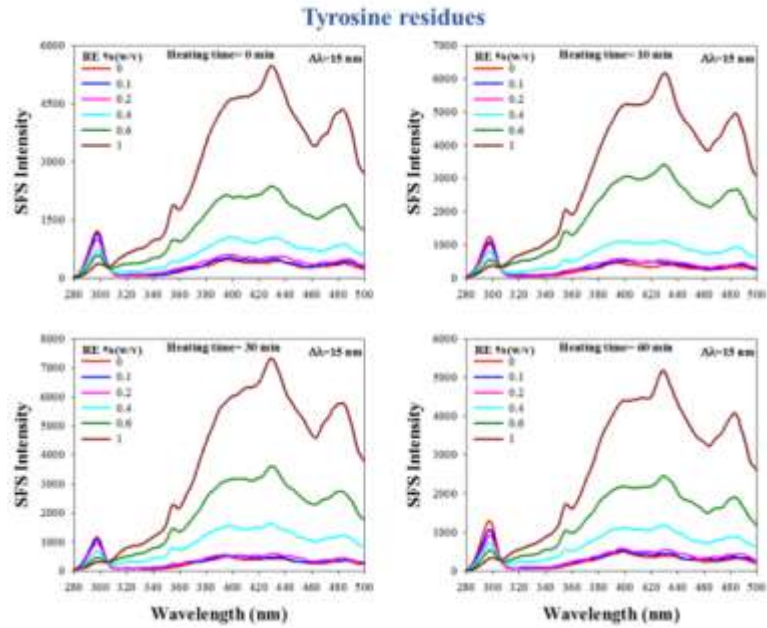


그림 112. 구조적 전이로 인한 RE-SPI 나노소재의 로즈마리 고유파장 감소 및 최대방출파장 이동(Tyrosine)

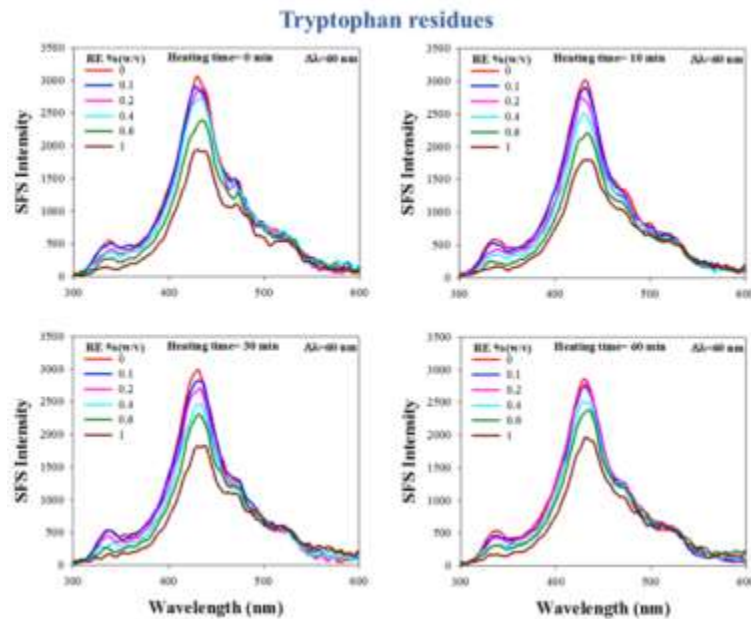


그림 113. 구조적 전이로 인한 RE-SPI 나노소재의 로즈마리 고유파장 감소 및 최대방출파장 이동(Tryptophan)

다) 식물(옥수수) 유래 단백질의 나노소재화 보조제

Fluorescence spectroscopy를 이용하여 GB-Zein 나노소재의 포집도를 평가하였다. 제조한 시료에서 고순도 감초추출물이 Zein에 결합하고 있음을 확인하였다 (그림 114).

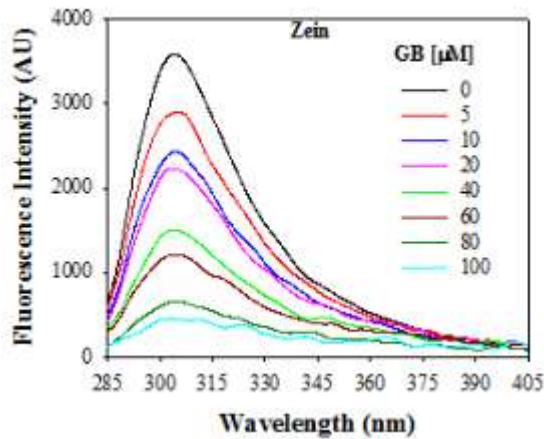


그림 114. 자가 조립 GB-Zein 나노소재화 보조제의 포집도 평가

선행 연구를 통해 Tyrosine residues와 Tryptophan residues와 같은 Zein의 특정 아미노산에 고순도 감초추출물이 결합할 것으로 예상하였다. 구조적 전이를 확인하는 SFS intensity 비교 결과, 결합 후의 고순도 감초추출물의 고유파장이 감소하는 동시에 최대방출파장이 이동하는 것을 증명하였다 (그림 115). 본 연구를 통해 제조된 나노소재 (BG-Zein)의 결합이 잘 이뤄졌음을 확인하였다.

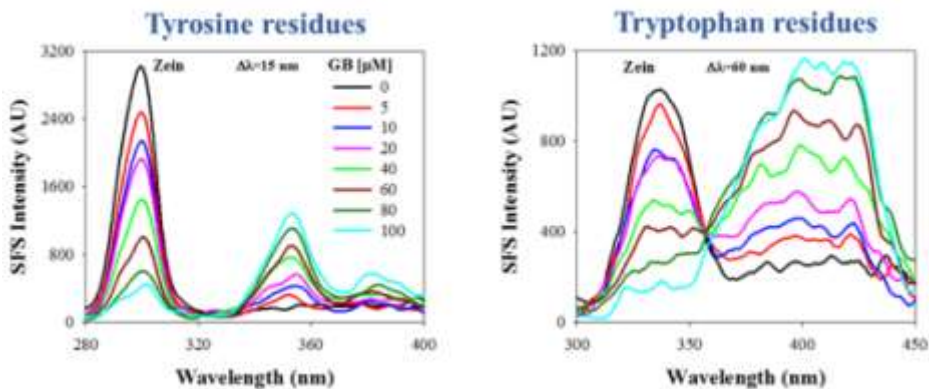


그림 115. 구조적 전이로 인한 GB-Zein 나노소재화의 GB 고유파장 감소 및 최대방출파장 이동

라) 고순도 감초추출물을 이용한 단백질별 나노소재화

동물성(HSA, OA)과 식물성(Zein) 단백질을 사용하여 제조한 나노복합체의 포집도를 평가하였다. 그 결과, 고순도 감초추출물(GB)이 세 종류의 단백질 모두에 결합하고 있음을 확인하였다 (그림 116).

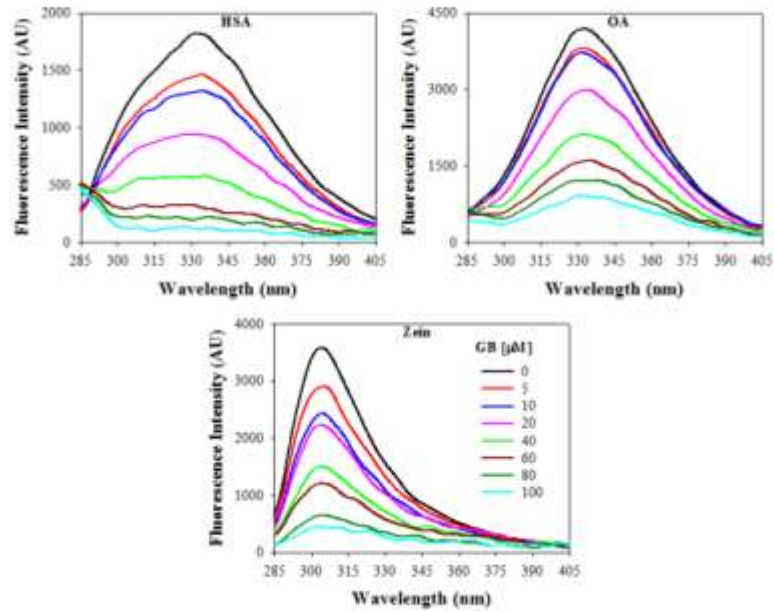


그림 116. GB-Protein 나노소재화 보조제의 포집도 평가

구조적 전이를 확인하는 SFS intensity 비교 결과, 결합 후의 고순도 감초추출물의 고유 파장이 감소하는 동시에 최대방출파장이 이동하는 것을 세 종류의 단백질 모두에서 증명하였다 (그림 117 및 118). 본 연구를 통해 제조된 나노소재(GB-Protein)의 결합이 잘 이뤄졌음을 확인하였다.

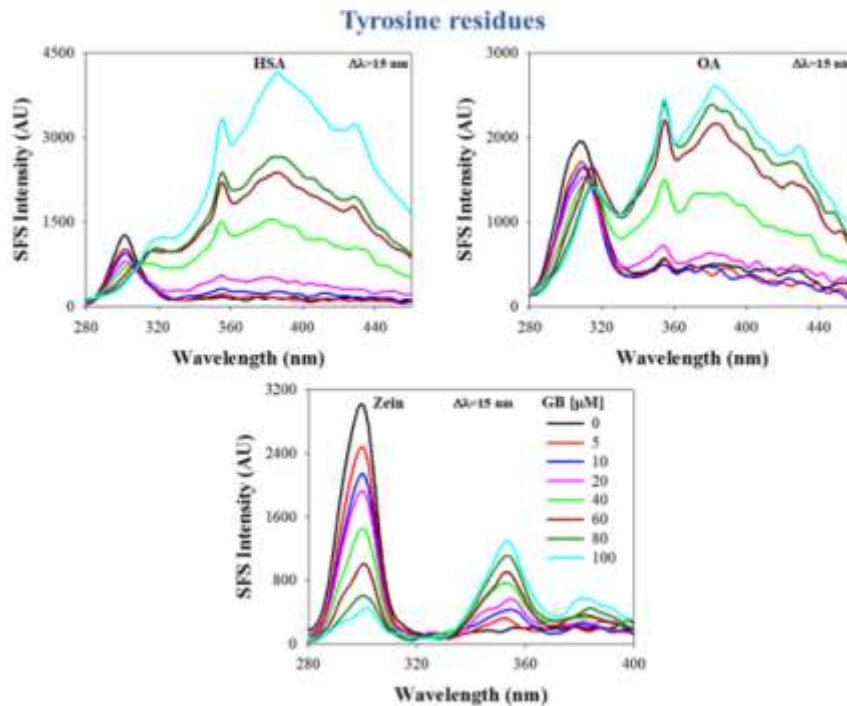


그림 117. 구조적 전이로 인한 GB-Protein 나노소재의 glabridin 고유파장 감소 및 최대방출파장 이동(Tyrosine)

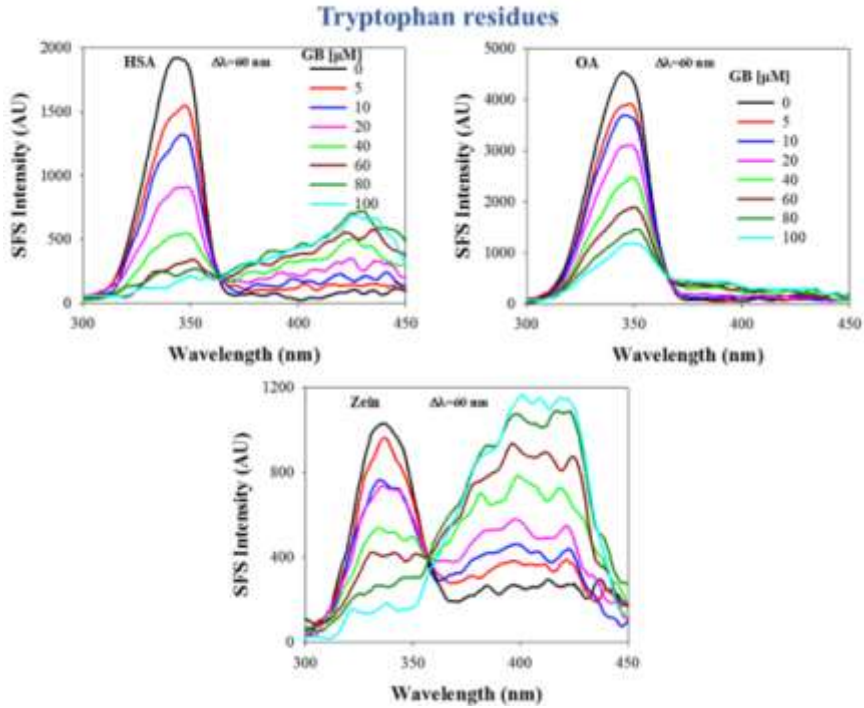


그림 118. 구조적 전이로 인한 GB-Protein 나노소재의 glabridin 고유파장 감소 및 최대방출파장 이동(Tryptophan)

UV/Vis spectroscopy를 이용하여 고순도 감초추출물(Free GB)의 용해도를 확인하였다(그림 119). 실험 결과 추출물의 특성상 에탄올과 같은 용매에 매우 잘 녹으며, 물에서는 용해도가 현저히 감소함을 확인하였다.

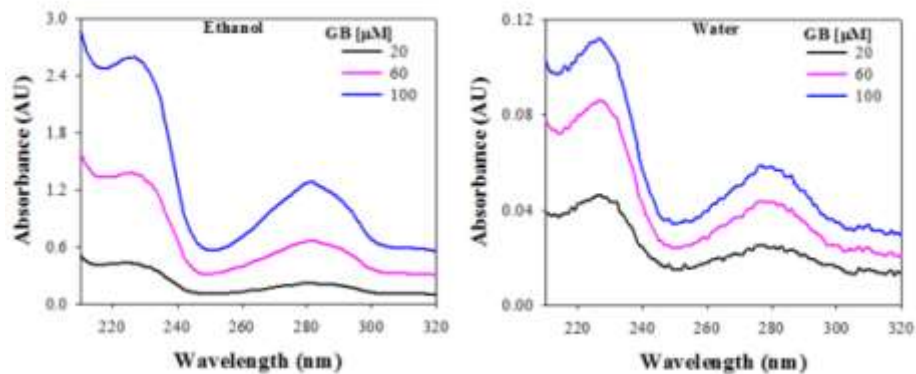


그림 119. 고순도 감초추출물(Free GB)의 용해도 비교. (에탄올(좌), 물(우))

세 종류의 단백질을 사용한 감초추출물 나노소재(GB-Protein)의 용해도를 비교한 결과는 그림 120과 같다. 실험 결과 나노소재화를 통해 감초추출물의 용해도가 약 16배 이상 증가된 것을 확인하였다.

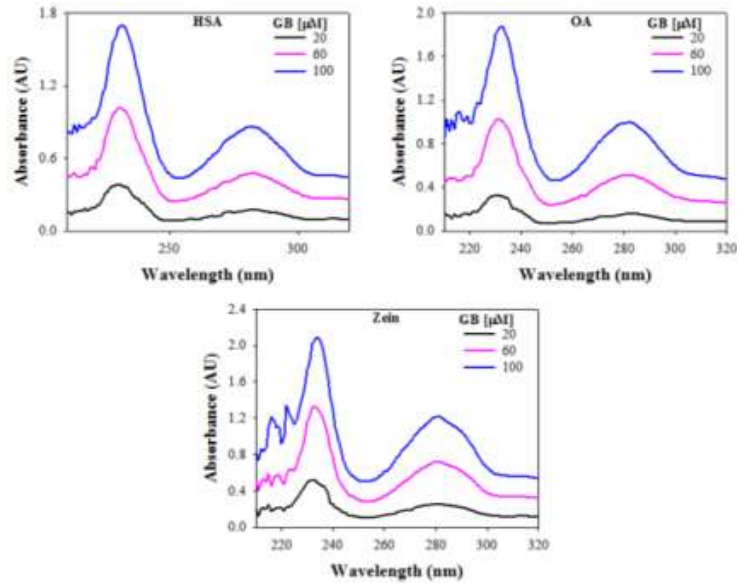


그림 120. 감초추출물 나노소재의 용해도 비교

(2) DLS (Dynamic Light Scattering) 분석을 통한 크기, 균일성, 제타전위 측정

가) 난백 유래 단백질 보조제와 코어소재의 나노소재화 (그림 121)

① 크기(Z-average)

실험 결과로 자가 조립 RE-OA의 경우, 고순도 로즈마리추출물 1%를 기준으로 추출물을 첨가하지 않았을 때 53 nm이었던 크기가 추출물을 첨가하며 104 nm로 증가하였다. 열처리한 RE-OA의 경우, 추출물을 첨가했을 때, 35 nm에서 140 nm로 증가하였다. 자가 조립과 열처리 과정을 거친 경우에 입자의 크기가 증가하긴 했지만, 충분히 나노입자의 크기라고 판단할 수 있는 범위라는 것을 확인하였다.

② 다 분산 지수(Polydispersity index, PDI)

실험 결과로 자가 조립 RE-OA의 경우, 고순도 로즈마리추출물 1%를 기준으로 추출물을 첨가하지 않았을 때 0.4이었던 PDI 값이 추출물을 첨가하였을 때 그대로 유지되는 것을 확인하였다. 열처리한 RE-OA의 경우, 추출물을 첨가했을 때 0.6이었던 PDI 값이 0.4로 감소하는 것을 확인하였다. 자가 조립과 열처리 과정을 거친 경우에 입자의 균일성이 그대로 유지되거나 더 높아지는 것을 확인하였다.

③ 제타전위(Zeta-potential)

실험 결과로 자가 조립 RE-OA의 경우, 고순도 로즈마리추출물 1%를 기준으로 추출물을 첨가하지 않았을 때 -27 mV이었던 Zeta potential 수치가 추출물을 첨가하였을 때 -38 mV로 감소하였다. 열처리한 RE-OA의 경우, 추출물을 첨가했을 때 -23 mV이었던 Zeta

potential 수치가 -37 mV로 감소하는 것을 확인하였다. 자가 조립과 열처리 과정을 거친 경우에 입자의 표면전위가 약 11~14 mV 낮아지는 것을 확인하였다. 이는 RE-OA 나노소재화 보조제가 음전하를 띄고 있으며, 고순도 로즈마리추출물과 오브알부민이 결합할 때 입자가 서로 밀어내며 안정적으로 유지되는 성질이 더 강해짐을 의미한다.

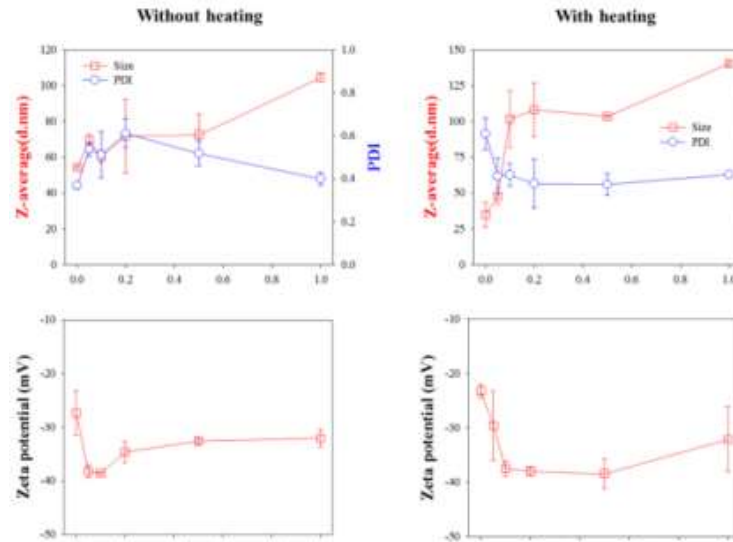


그림 121. DLS 분석을 통한 RE-OA 나노소재의 크기, 균일성, 제타전위 측정

나) 식물(콩) 유래 단백질 보조제와 코어소재의 나노소재화 (그림 122)

① 크기(Z-average)

실험 결과로 고순도 로즈마리추출물 1%를 기준으로, 모든 열처리 시간대에서, 추출물을 첨가했을 때 입자의 크기가 더 작아졌으며, 충분히 나노입자의 크기라고 판단할 수 있는 범위라는 것을 확인하였다.

② 다 분산 지수(Polydispersity index, PDI)

실험 결과로 고순도 로즈마리추출물 1%를 기준으로, 모든 열처리 시간대에서, 추출물을 첨가하지 않았을 때의 PDI 값보다 추출물을 첨가하였을 때 수치가 감소하였다. 이를 통하여 입자의 균일성이 더 높아지는 것을 확인하였다.

③ 제타전위(Zeta-potential)

실험 결과로 고순도 로즈마리추출물 1%를 기준으로 추출물을 첨가하지 않았을 때 -10 mV이었던 Zeta potential 수치가 추출물을 첨가하였을 때 -30 mV미만으로 감소하였다. 이는 RE-SPI 나노소재가 음전하를 띄고 있으며, 고순도 로즈마리추출물과 SPI가 결합할 때 입자가 서로 밀어내며 안정적으로 유지되는 성질이 더 강해짐을 의미한다.

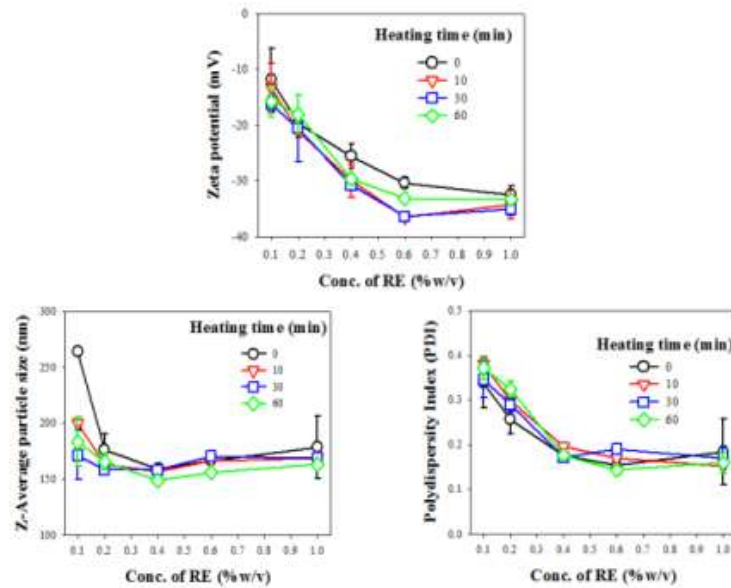


그림 122. DLS 분석을 통한 RE-SPI 나노소제화 보조제의 크기, 균일성, 제타전위 측정

다) 식물(옥수수) 유래 단백질 보조제와 코어소재의 나노소제화 (그림 123)

① 크기(Z-average)

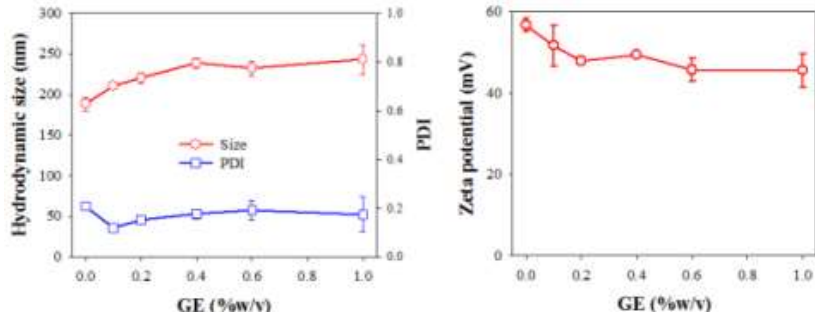
실험 결과로 고순도 감초추출물 1%를 기준으로, 추출물을 첨가했을 때 입자의 크기가 190 nm에서 240 nm로 증가했지만, 충분히 나노입자의 크기라고 판단할 수 있는 범위라는 것을 확인하였다.

② 다 분산 지수(Polydispersity index, PDI)

실험 결과로 고순도 감초추출물 1%를 기준으로, 추출물을 첨가하지 않았을 때의 PDI 값보다 추출물을 첨가하였을 때 수치가 0.22에서 0.18로 감소하였다. 이를 통하여 입자의 균일성이 더 높아지는 것을 확인하였다.

③ 제타전위(Zeta-potential)

실험 결과로 고순도 감초추출물 1%를 기준으로 추출물을 첨가하지 않았을 때 56 mV이었던 Zeta potential 수치가 추출물을 첨가하였을 때 45 mV로 감소하였다. 이는 GB-Zein 나노소재가 양전하를 띄고 있으며, 추출물 첨가 후에 수치가 감소하긴 했지만, 고순도 감초추출물과 Zein이 결합할 때 충분히 입자가 서로 밀어내며 안정적으로 유지되는 성질이 더 강해짐을 의미한다.



(GE: Gamcho extract, 감초추출물)

그림 123. DLS 분석을 통한 GB-Zein 나노소재화 보조제의 크기, 균일성, 제타전위 측정

④ 형태학적 배열(Morphology)

나노입자의 표면 형태를 확인하기 위하여 FE-SEM (Field emission scanning electron microscopy)을 사용하여 촬영하였다 (그림 124). 확인한 결과 GB의 농도가 높은 경우에도 비교적 균일한 모양과 크기의 나노소재화가 이뤄짐을 확인하였다.

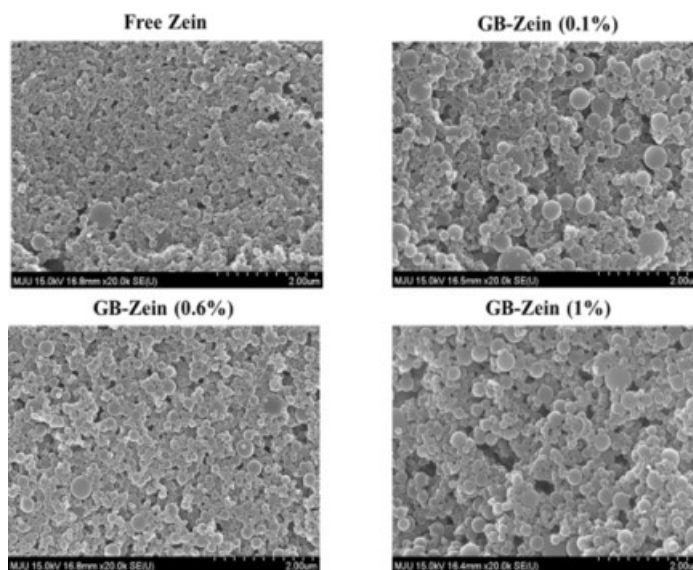


그림 124. FE-SEM을 이용한 GB-Zein 나노소재화 보조제의 크기, 균일성 확인

라) 고순도 감초추출물을 이용한 단백질분 나노소재화 정도비교 (그림 125)

① 크기(Z-average)

DLS를 이용하여 세 종류의 단백질별 나노소재의 입자 크기를 비교하였다. 실험 결과로 세 종류의 단백질 모두 충분히 나노입자의 크기라고 판단할 수 있는 범위의 입자로 결합한 것을 확인하였다. 또한, 추출물의 농도가 높아질수록 입자의 크기가 크게 변하는 동물성 단백질(HSA, OA)과는 달리, 식물성 단백질인 Zein을 이용한 경우에 안정적인 크기를 유지함을 확인하였다.

② 다 분산 지수(Polydispersity index, PDI)

실험 결과로 세 종류의 단백질 모두 추출물을 첨가했을 때 균일도가 높아짐을 확인하였다. 수치상으로는 동물성 단백질의 PDI 값이 더 낮게 측정됐지만, Zein의 경우에 추출물의 농도에 따라서 비교적 일정한 균일성을 보임을 확인하였다.

③ 제타전위(Zeta-potential)

입자의 표면전위를 측정하여 나노입자의 구조적 안정성을 확인하기 위하여 Zeta potential 수치를 측정하였다. 실험 결과로 동물성 단백질의 경우에 추출물과 단백질의 결합에 의해서 입자 서로 밀어내며 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다. 식물성 단백질인 Zein의 경우에 추출물의 농도가 증가할수록 입자간의 밀어내는 힘이 증가하는 경향을 보였지만, 그 정도가 매우 적음을 확인하였다. GB-Zein의 경우 나노소재화 방법을 달리하여 재실험을 실시하였다 (Fig. 4-4, 4-15).

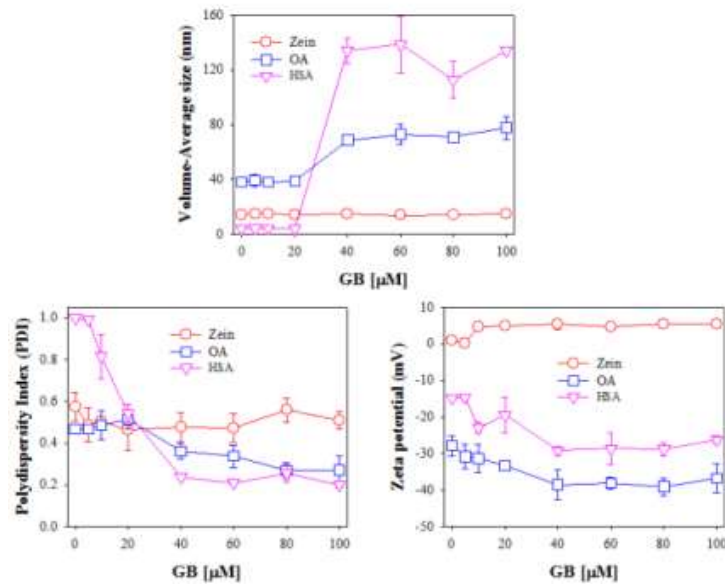


그림 125. DLS 분석을 통한 GB-Protein 나노소재의 크기, 균일성, 제타전위 측정

(3) 고순도 추출물의 나노소재화에 따른 항산화효과 분석

가) RE-OA 나노소재화 보조제의 항산화효과

고순도 로즈마리추출물(Free RE)과 RE-OA 나노소재의 항산화 효과를 비교한 결과 (그림 126), 고순도 로즈마리추출물이 나노소재화가 된 경우에 항산화효과가 최대 약 20% 증가하는 것을 확인하였다.

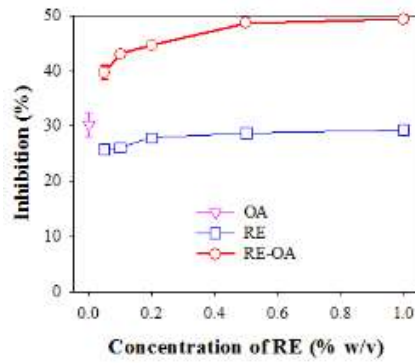


그림 126. ABTS assay를 이용한 Free RE와 RE-OA 나노소재의 항산화 효과 비교

나) GB-Zein 나노소재화 보조제의 항산화효과

고순도 감초추출물(Free GB)과 GB-Protein 나노소재의 항산화 효과를 비교하였다. 실험에는 단백질별 항산화효과의 차를 확인하기 위하여 동물성 단백질(HSA, OA), 식물성 단백질(Zein)을 모두 사용하였다. 실험 결과로 3종의 단백질 모두에서 고순도 감초추출물이 나노소재화가 된 경우에 항산화효과가 최대 약 30% 증가하는 것을 확인하였다.

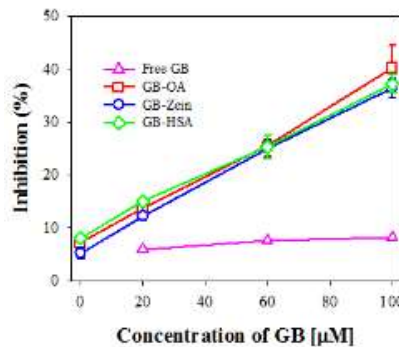


그림 127. ABTS assay를 이용한 Free GB와 GB-Protein 나노소재의 항산화 효과 비교

(4) 고순도 추출물의 나노소재화에 따른 결합상수 및 결합도 분석

표 72. 감초추출물-제인, 오브알부민, HSA 나노소재의 결합상수, 결합도

Protein	Binding constant (K) M ⁻¹	R ²	Binding number (n)	R ²	K _D	R ²
Zein	5.67×10 ⁴	0.97	0.82	0.97	6.52×10 ¹²	0.90
OA	1.78×10 ⁴	0.92	1.19	0.96	3.56×10 ¹²	0.97
HSA	4.55×10 ⁴	0.97	1.17	0.97	1.36×10 ¹³	0.91

표 73. 로즈마리추출물-오브알부민 나노소재의 결합상수, 결합도

Protein	Binding constant (K) M ⁻¹	R ²	Binding number (n)	R ²	K _D	R ²
OA	8.23×10 ⁴	0.99	1.006	0.98	6.76×10 ¹¹	0.96

2. 2차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) Desolvation 기반 나노소재화 공정 개발

가) 토복령 추출물(DS) 나노복합소재

0.25 mg/mL의 농도로 고정된 토복령 추출물(DS)과 5 mg/mL의 농도로 고정된 옥수수 단백질 Zein을 25 mL 의 80% 에탄올에 용해시킨 후 교반하였으며, 그 결과로 생긴 DS-Zein 용액을 사전에 교반된 셀룰로오스 기반의 다당류인 carboxymethyl cellulose(CMC) 용액 75mL에 혼합하였다. CMC 용액의 농도는 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0 mg/mL로 다양(20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1 비율의 Zein 과 CMC)하게 설정하였다. 이 혼합물을 30분간 교반 후 20mL의 에탄올을 제거하기 위해 회전식증발기(rotary evaporator)를 이용하여 알코올을 증발, 제거하여 나노복합소재를 제조하였다 (그림 128).

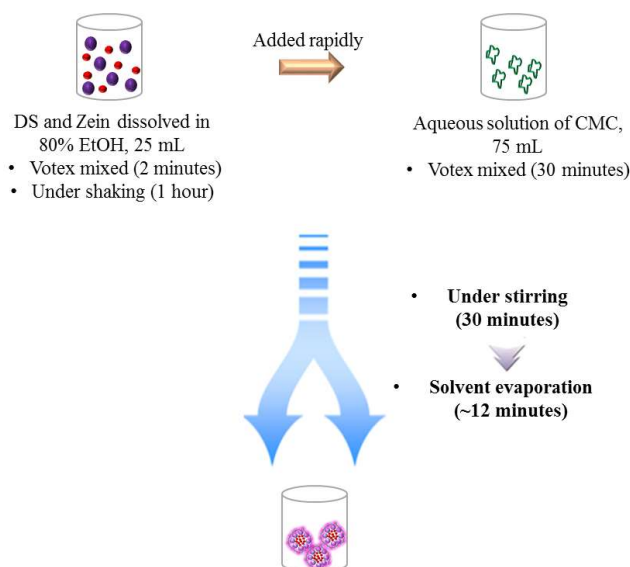


그림 128. 토복령 추출물(DS)-Zein-CMC 나노복합소재 제조공정

나) 섬기린초 추출물(AB) 나노복합소재

AB와 Zein은 25mL의 80% 에탄올에 용해시키고, AB의 농도는 0.25 mg/mL, Zein은 5 mg/mL로 혼합하였다. 혼합물은 2분간 교반하고, 1시간동안 약하게 교반하였으며, 이 결과로 생긴 AB- Zein 용액을 미리 30분간 저어준 CMC용액 75 mL에 첨가하였다. CMC의 농도는 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg/mL으로 설정하였다 (각각 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1 비율의 Zein과 CMC). 혼합물을 30분간 교반하고 용액 속에 있는 20mL의 에탄올을 없애기 위해 증발회전식증발기(rotary evaporator)를 이용하여 알코올을 증발, 제거하여 나노복합소재를 제조하였다 (그림 129).

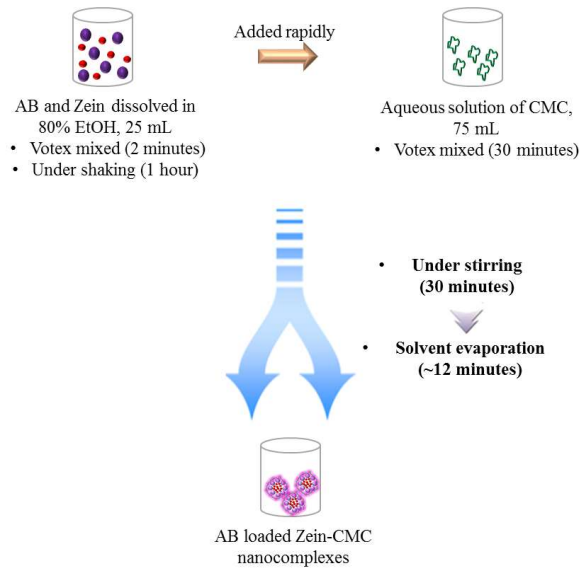


그림 129. 섬기린초 추출물을 함유하는 Zein-CMC 나노복합소재 제조 방법

(2) 항용매 공동침전법 기반 나노소재화 공정 개발

가) 감초추출물(GB) 나노복합소재

Zein-AOT 복합체는 항용매 공동침전법(antisolvent co-precipitation)으로 제조하였다. 각 20:1, 10:1, 5:1, 2:1 과 1:1 (w/w) 질량비의 Zein (0.5g)과 AOT (0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5g)을 80% (v/v) 에탄올-물 용액에 용해하였다. 결과로 생긴 용액은 2분간 교반해 모두 용해된 것을 확인한 후 중간 속도로 1시간 동안 교반하였다. Zein-AOT 분산의 결과물 (25 ml)은 75 ml의 완충제 용액(20 mM Tris-HCl, pH 7.0)에 빠르게 첨가하고, 30분간 자기교반(magnetic stirring)을 실시하였다. 용액 속에 있는 에탄올은 회전증발기를 이용하여 35°C 에서 감압 하에 증발시키고, 손실량은 동일한 pH 완충 용액으로 보충하였다 (그림 130).

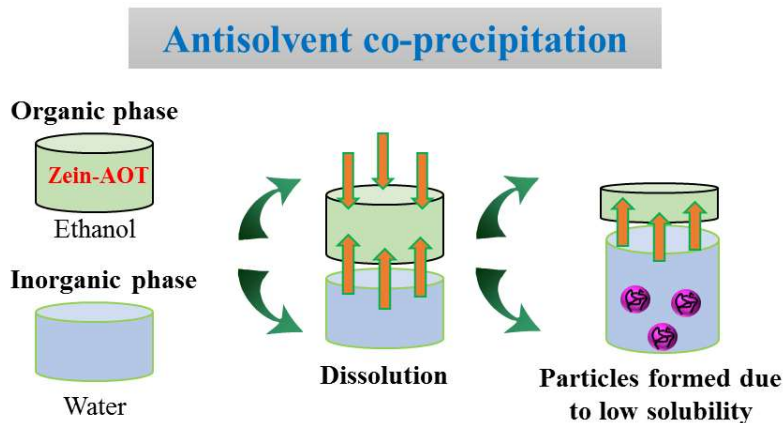


그림 130. Zein-AOT 복합체의 제조 공정

나) 토복령추출물(DS) 및 섬기린초추출물(ST) 나노복합소재

Zein-Caseinate 나노입자는 항용매 공동침전법으로 제조하였다. Zein (0.6g)은 80% (v/v) 에탄올-물 용액(25 mL)에 용해하였고, 완전히 녹을 때까지(3시간) 교반하였다. 이때, Zein 용액에 토복령(*Smilax china*)과 섬기린초(*Sedum takesimense*)추출물을 첨가하여 혼합하였다. Sodium Caseinate [CAS: 9005-46-3] (1.2g)은 증류수(75 mL)에 용해 후, 3시간 동안 교반하였다. Casein 용액은 0.1M의 HCl을 사용해 pH 6.5로 조절하였다. 이후 Zein 용액과 카제인나트륨 용액을 혼합하여 1시간 동안 자기 교반하였다. 혼합용액의 에탄올은 35°C 에서 회전증발기를 사용해 제거하였으며, 감소된 부피는 증류수로 보충하였다 (그림 131).

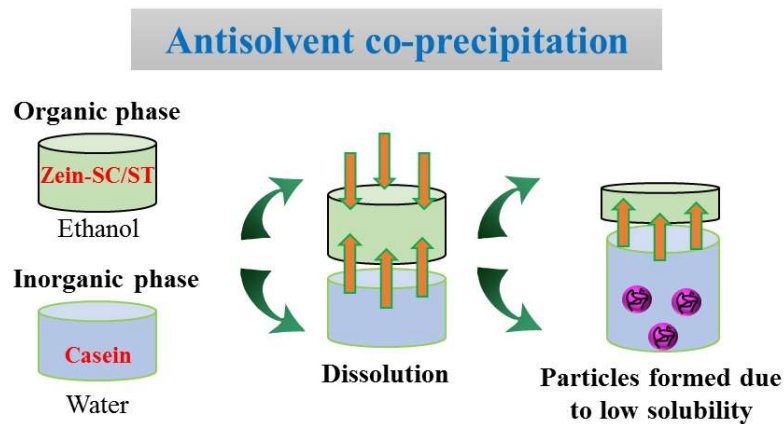


그림 131. 토복령 및 섬기린초 추출물 함유 나노소재 제조 공정

(3) 나노복합소재 물리화학적 특성 분석

가) 크기 (Z-average)

DLS를 이용하여 나노소재의 입자크기를 비교하고자 하였다. 코어소재 및 나노소재를 1% 용액으로 제조하고, 용액 내 분산하여 존재하는 입자크기를 분석하여 나노규모의 입자가 형성되었는지 확인하였다.

나) 다분산지수 (Polydispersity index, PDI)

나노입자의 균일성을 구하기 위해 사용되는 수식인 PDI를 사용하여 나노소재의 균일성을 확인하고자 하였다. 코어소재 및 나노소재를 1% 용액으로 제조하고, 용액 내 분산하여 존재하는 입자의 균일성을 비교하였다.

다) 제타전위 (Zeta-potential)

입자의 표면전위를 측정하여 나노입자의 구조적 안정성을 확인하기 위하여 Zeta potential 수치를 측정하였다. 코어소재 및 나노소재를 1% 용액으로 제조하고, 용액 내 분산하여 존재하는 입자의 표면전위를 비교하였다.

라) 형태학적 배열 (Morphology)

나노입자의 표면 형태를 확인하기 위하여 FE-SEM (Field emission scanning electron microscopy)을 사용하여 나노입자를 촬영하였으며, 이를 비교하기 위하여 코어소재를 포집하지 않은 Zein 단백질을 같이 촬영하여 형태학적 비교를 실시하였다.

마) 나노복합소재 형성 메커니즘 규명

결합이 없는 피복소재와 나노복합소재의 FTIR 스펙트럼 비교분석을 통하여 특정 작용기의 결합형성여부를 파악하였다. 또한, Synchronous fluorescence 및 UV-Vis 스펙트럼 비교분석을 통하여 나노복합소재의 형성여부를 확인하였다.

(3) 나노복합소재 안정성 평가

가) 나노복합소재의 pH 안정성 평가

나노소재에 대한 pH의 영향은 최적화된 5:1의 Zein-CMC 비율로 수행하였다. Zein-CMC 나노복합소재와 코어소재 함유 Zein 나노입자 비교를 통하여 두 나노복합소재의 pH영향력 및 소재활용 가능성을 평가하고자 하였다. Tris-HCl 완충용액(pH 범위 3.0-8.0) 에 나노복합소재를 혼합하고, 12시간 동안 보관 후 나노복합소재의 크기를 관측하였다.

나) 나노복합소재의 장시간 보관안정성 평가

Zein, Zein-CMC, 또는 Zein-AOT 나노복합소재를 10일간 상온에서 보관하면서 보관일자별 입자크기, 제타전위를 측정하여 안정성이 유지되는지 확인하였다.

다) 나노복합소재의 염(NaCl) 안정성 평가

인간의 위장기관에서의 이온강도는 부위에 따라 다양하다. 그렇기 때문에, 다양한 이온 환경에서 나노복합소재의 성상을 결정하는 것은 매우 중요하다. 본 시험에서는 다양한 염 농도(5, 10, 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 300 mM NaCl)에서 나노복합소재의 성상을 확인하고자 하였다. 염은 CMC가 없이 침전물이 관찰된 Tris-HCl buffer(pH 5.0 과 7.0)에 용해한 후 Zein-CMC 나노복합소재를 혼합하여 12시간동안 보관 후 나노복합소재의 크기 및 제타전위를 관측하였다.

다. 연구 결과

(1) Desolvation 방법적용 나노소재 제조

가) 토복령 나노복합소재 제조

① 크기, PDI, 및 제타전위

토복령 나노복합소재의 크기, PDI(polydispersity index), 제타전위는 Zetasizer Nano ZS를 이용해 측정하였으며, 나노복합소재의 형태는 전자현미경(SEM)분석을 통해 관찰하였다. 또한, 나노소재의 안정성에 pH와 염이 미치는 영향은 Zetasizer Nano ZS를 이용해 측정하였다 (그림 132).

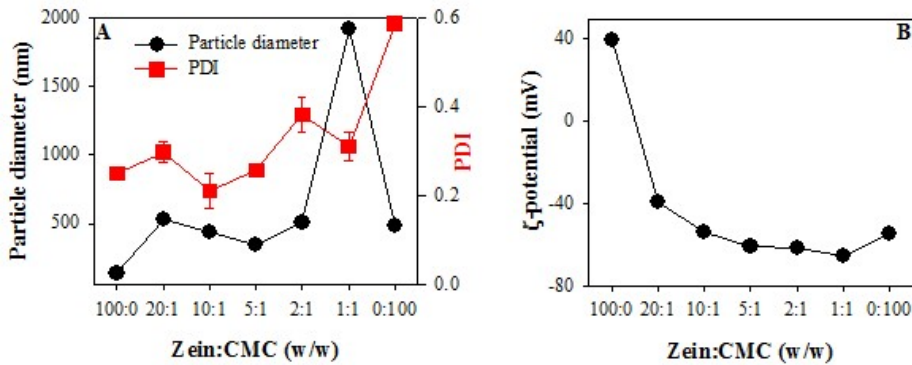


그림 132. Zein 및 CMC 혼합비율에 따른 토복령 나노복합소재 크기 및 PDI (좌), 제타전위(우)

총 5종의 성분비가 다른 Zein-CMC 실험 결과, 5:1 비율의 Zein-CMC가 가장 작은 입자 크기에서 안정적인 것으로 관측되었다. CMC 성분의 증가 및 토복령 추출물을 함유한 Zein-CMC 혼합물 크기의 증가는 제타전위가 큰(비교적 안정적인) 나노입자 형성을 초래하는 것으로 판단된다.

토복령 추출물을 함유한 나노복합소재는 300-350 nm 와 -60 mV 범위의 입자 크기로 형성되며, 복합체의 다분산지수(PDI)는 0.25로 균질하였다. 제타전위의 점진적 감소와 CMC 성분의 증가는 CMC가 음전하를 띠며 따라 CMC가 Zein 나노입자를 둘러싼 증착층 형성을 의미한다.

② 입자형태

토복령 Zein-CMC 나노복합소재의 전자현미경(SEM) 분석은 Zeta Nano ZS를 통해 얻어진 자료와 상충하는 것으로 판단된다. 토복령 추출물을 함유한 Zein 나노복합체는 자연적으로 응집되며 불규칙한 형태를 띠고, Zein-CMC 나노복합체는 구형의 형태를 가지는 것으로 나타났다. 총 5종 비율의 Zein-CMC 나노복합소재 중 5:1 비율만이 균일한 구형 형태와 크기를 보이는 것을 그림 133을 통하여 알 수 있다.

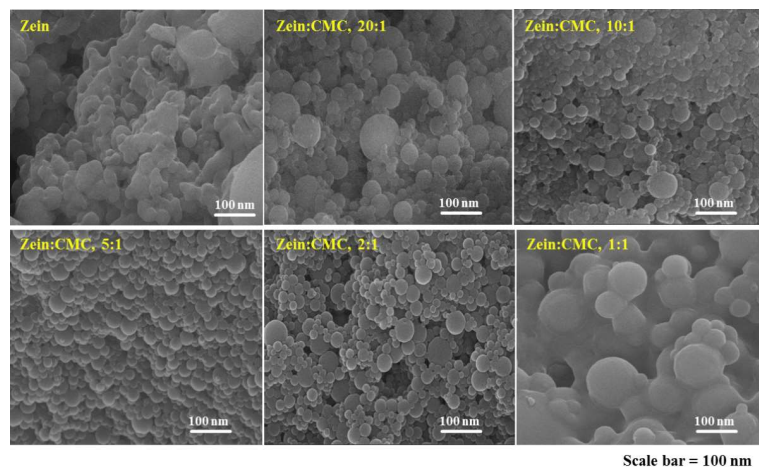


그림 133. 토복령 추출물-Zein-CMC 나노복합소재의 형태적 특징

나) 섬기린초 나노복합소재 제조

① 크기, PDI, 및 제타전위

섬기린초 추출물과 가장 작은 입자의 최적화된 캡슐화를 위해 다섯 가지 경우의 CMC-Zein 비율로 연구를 수행하였다. 20:1 에서 2:1 비율일 때 입자의 크기가 거의 동등한 것으로 관찰되었으나 20:1, 10:1의 비율에서 용매가 증발되었을 때 눈에 보이는 입자가 확인되었다. 따라서, 5:1 비율이 나노복합소재 제조에 최적화 되어있다는 것을 알 수 있다.

섬기린초 추출물을 함유한 Zein-CMC 혼합물의 크기는 CMC의 농도와 비례하며, 제타전위의 점진적 감소와 CMC 성분의 증가는 CMC가 음전하를 띠며 따라 Zein 나노입자를 둘러싼 증착층을 형성한다는 것이 입증되었다. 이를 통해 얻어진 섬기린초 추출물을 함유한 나노복합소재의 입자는 제타전위 -40 mV, 크기는 360-390 nm, 복합체의 다분산지수(PDI)는 0.26으로 균질성을 나타낸다 (그림 134).

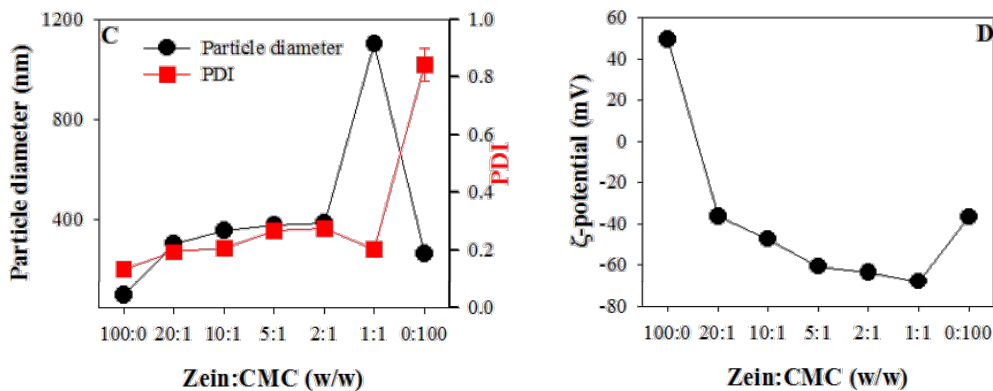


그림 134. 섬기린초 나노복합소재 안정성 증대를 위한 CMC 첨가 최적화

(2) 향용매 공동침전법 적용 나노소재 제조

가) 감초 나노복합소재 제조

① 크기, PDI, 및 제타전위

순수 Zein과 AOT 콜로이드성 입자의 크기는 210, 404 nm이고, 다분산 지수(PDI)는 각각 0.04와 0.48로 나타났다. AOT의 함량이 증가함에 따라 입자의 크기의 Zein과 AOT의 비율 2:1까지 감소하는 경향을 보였다. 하지만, 함량비 1:1의 비율에서 입자크기 및 제타전위가 대폭 증가하였다. 이는 상호작용으로 복합체가 감소한 것을 나타낸다. 제타전위 값은 분산매의 AOT 함량이 증가함에 따라 점진적으로 감소하며, 이는 Zein 입자 표면에 AOT가 흡착됨에 따라 코어 셸 구조를 형성하는 것으로 판단된다 (그림 135).

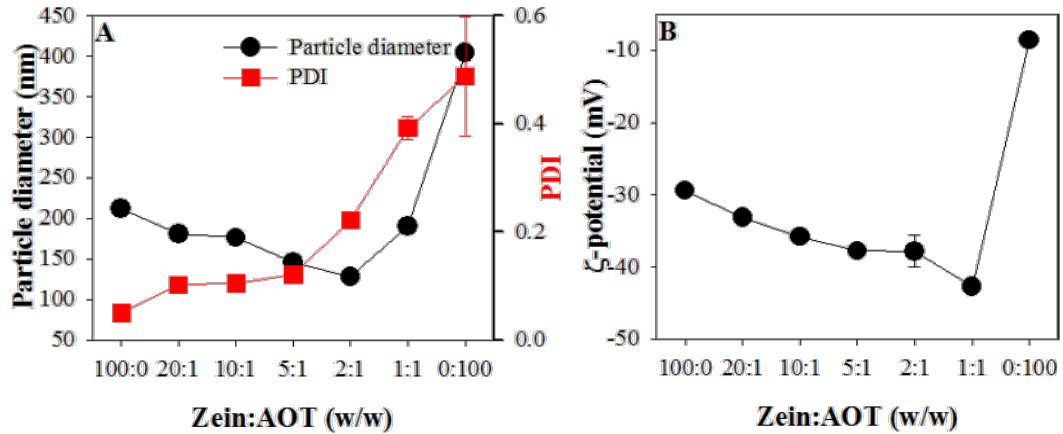


그림 135. Zein기반 나노소재의 AOT 첨가비 최적화 농도 결정

② 입자형태

Zein 콜로이드성 입자는 직경 범위 100에서 250 nm의 단일 구형 입자가 빼곡히 모여 있는 형태로 관찰되었다. 이는 동적 광산란에 의해 측정된 평균 입자 직경과 일치하였다. Zein과 AOT의 질량비가 10:1 일 때 입자의 크기가 다소 작은 것으로 관찰되었으며, AOT 함량이 증가했을 때는 AOT로 구성된 직경이 크고 불규칙한 모양을 형성하는 것으로 관찰되었다. 이는 AOT가 존재할 때 Zein입자가 압축되기 때문인 것으로 사료된다 (그림 136).

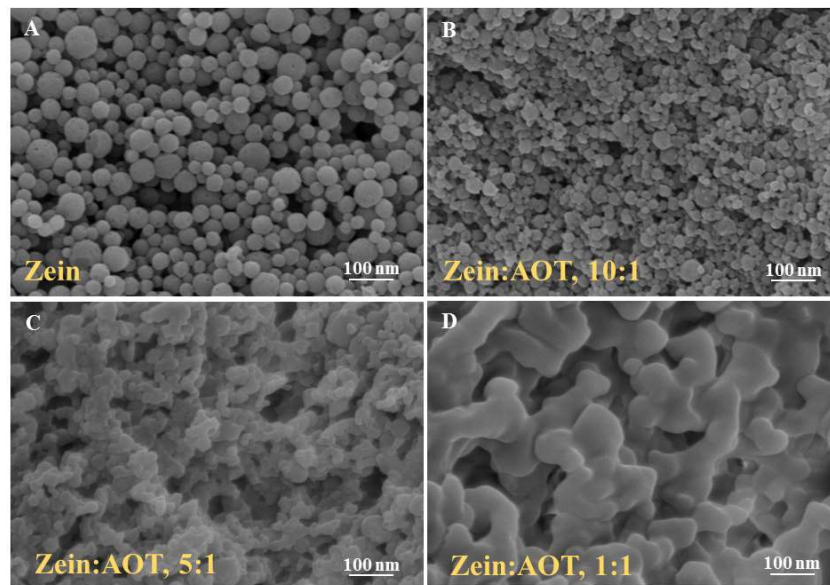


그림 136. Zein-AOT 나노복합소재의 성분비에 따른 형태적 특징

③ 나노복합소재 형성 메커니즘 규명

Zein과 AOT의 복합 과정 메커니즘을 규명하기 위해 형광 염료 Nile red (NR)가 사용되었다. NR은 물에 불용성으로 각각의 형광스펙트럼은 주어진 환경에서 예민하게 반응한다. AOT의 존재 하에 NR은 최고 약 670 nm의 낮은 형광을 나타냈으며, 이는 NR이 수용 상

태로 존재한다는 것을 나타낸다. Zein의 존재 하에 NR의 형광 강도는 청색광 영역으로 이동과 함께 최고 방출($\lambda_{max} = 622 \text{ nm}$)과장으로 크게 증가한다. 이는 NR이 Zein의 소수성 영역으로 결합되었다는 것을 나타낸다. Zein 용액에 AOT 함량이 증가했을 때 NR의 형광 강도는 점차 증가하는 것으로 판단된다 (그림 137).

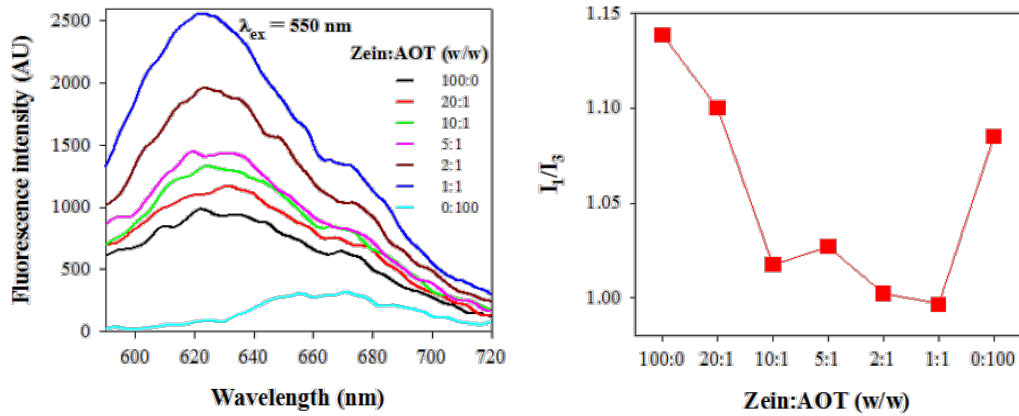


그림 137. 형광염료를 이용한 나노복합소재화 과정 메커니즘 규명

이러한 현상은 Zein-AOT 복합체가 소수성 형광염료 NR을 효과적으로 용해시킬 수 있는 소수성 사이트를 제공할 수 있다는 것을 나타낸다. 형광발광을 위한 소수성 염료인 Pyrene은 파장 범위 350-450 nm에서 5종의 피크를 보인다. 형광 스펙트럼 첫 번째부터 세 번째 최고점(I_1/I_3)의 강도 값은 대개 pyrene 분자를 둘러싼 cybotactic region의 극성을 측정하는 데 사용된다. I_1/I_3 의 높은 값은 일반적으로 pyrene 분자 주변의 극성 환경을 나타내는 반면, I_1/I_3 에서의 낮은 값은 pyrene 분자의 실험 결과로 보았을 때 무극성 환경을 나타낸다. Zein과 AOT 용액에서 I_1/I_3 값은 1.13과 1.08로 각각 물에서의 값(1.8)보다 낮았다. 이는 pyrene이 Zein과 AOT의 소수성 영역에 존재하는 것을 나타낸다. 제조 용액에서 AOT의 증가는 I_1/I_3 값은 대폭 감소해 Zein과 AOT 비율 1:1에서 최저값(0.99)에 도달했다. 이는 pyrene 분자가 소수성 환경에 있다는 것을 보여준다. 소수성의 증가는 공동침전 후 pyrene 분자의 Zein-AOT 복합 시스템 소수성 영역으로의 변화로 볼 수 있다.

순수 Zein 나노입자의 FTIR 스펙트럼은 AOT가 3183 cm^{-1} 일 때 최고 $3281, 3181 \text{ cm}^{-1}$ 로 나타났다. 적외선 스펙트럼에서는 $3100-3500 \text{ cm}^{-1}$ 의 범위에서 물의 hydroxyls-bound의 OH 신축 진동을 나타내는 특유의 최대흡수파장 피크가 관찰되었다. 수소결합의 발생으로 복합체를 형성한 이후 스펙트럼에서 3281 과 3181 cm^{-1} 의 최고점이 Zein-AOT비율 20:1, 5:1, 1:1에서 $3283, 3284, 3285, 3181, 3184, 3186 \text{ cm}^{-1}$ 로 변화되는 것이 확인되었다. 이 결과는 Zein에 함유된 글루타민의 아마이드기와 AOT의 하이드록실기 사이 수소결합의 형성을 나타내는 것으로 사료된다. Zein의 펩티드 backbone의 특징적인 최고점은 1649 cm^{-1} (amide I, C=O stretching), 1532 cm^{-1} (amide II, NH bend coupled with CN stretch)와 1450 cm^{-1} (amide II, CH₂ bend)로 관찰되었다. Zein 나노입자와 비교했을 때 amide I과 amide II의 결합이 복합 표본으로 바뀌었고, 1:1의 Zein: AOT일 때, 최고점은 각각 $1652, 1542$ and 1459 cm^{-1} 으로 나타났다. 이 결과는 수소결합과 함께 나타나는데, 또한 높은 비율의

Zein의 소수성 아미노산과 부피가 큰 AOT의 탄화수소 꼬리 사이의 소수성 상호작용이 나타나는 것으로 판단된다 (그림 138).

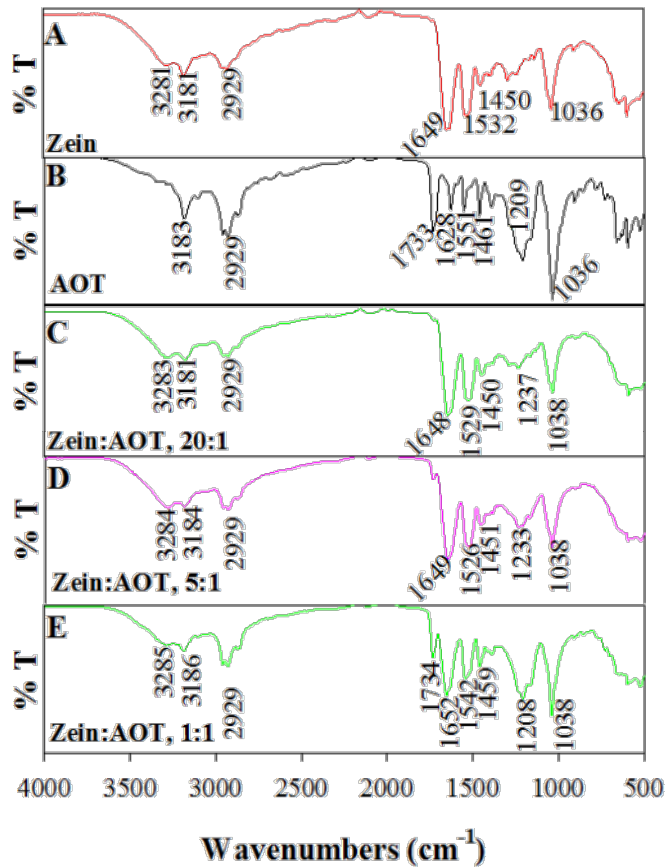


그림 138. FTIR 분석기법을 이용한 나노복합소재 메커니즘 규명

Synchronous fluorescence 분광은 염색체 분자 주변 극성의 변화에 관한 정보를 제공한다. 자극과 방사 파장 사이의 변화값($\Delta\lambda$)은 15와 60 nm로 유지된다. Synchronous fluorescence는 티로신과 트립토판 잔기의 각각의 스펙트럼 추이를 제공한다. Zein의 티로신 아미노산 잔기는 15 nm의 파장 간격($\Delta\lambda$)으로 빛을 흡수할 경우, 방출 형광이 280-340 nm 영역에서 형성되어 315 nm에서 최대치를 보인다 (AOT의 형광강도는 0에 가까움). AOT가 존재할 때 Zein:AOT 20:1에서 5:1의 비율까지 형광 강도는 불규칙하게 증가했으며, 이는 항용매 공동침전 과정 후의 Zein의 티로신 아미노산 잔기의 노출을 나타낸다. 형광 강도는 2:1과 1:1 비율의 Zein:AOT의 Zein에 비해 감소했다. 이는 다량의 AOT에서 Zein의 티로신 잔기의 재배열을 나타낸다. 증가된 등급의 AOT 첨가에 따른 형광강도의 감소는 Zein과 AOT의 강한 상호작용과 DLS 측정으로 확인된 침전물 복합체를 형성하는 특정 비율을 나타낸다 (그림 139). Zein, AOT, Zein-AOT복합체의 UV/Vis 흡수 스펙트럼은 항용매 공동침전 과정 이후 관찰하였다. Zein은 280 nm 영역에서 흡수가 증가한 것을 보였다. 이는 방향족 아미노산 잔기의 흡수로 나타난 것으로 사료된다. AOT의 흡수는 Zein보다 명백히 낮았다. 성분비 20:1에서 1:1까지의 AOT의 증가와 함께 UV/Vis 흡수 강도는 순수 Zein의 흡수강도보다 점차 감소하였다. 이 결과를 바탕으로, 흡수 강도의 감소

는 Zein-AOT 나노복합체의 형성을 의미한다.

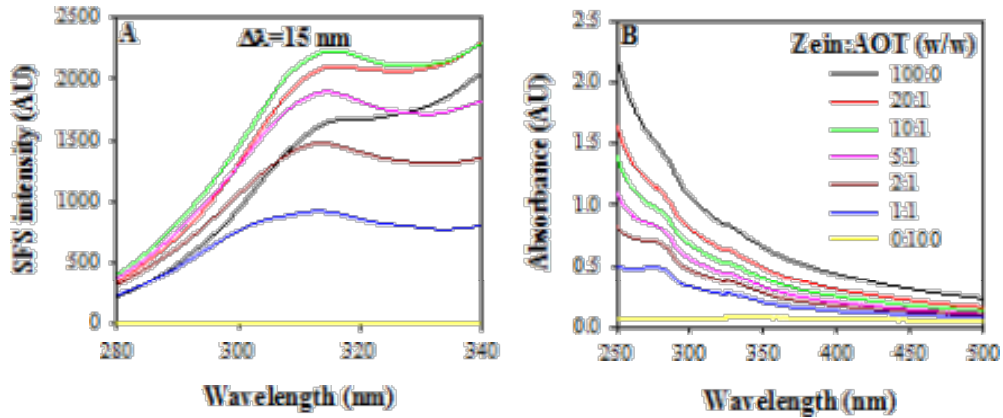


그림 139. SFS 분석기법을 이용한 나노복합소재 메커니즘 규명

나) 토복령 나노복합소재 및 섬기린초 나노복합소재 제조

① 크기, PDI, 및 제타전위

순수 Zein과 Zein-Caseinate 콜로이드 입자의 크기는 각각 142, 195 nm로 관찰되었으며, 토복령(SC) 추출물이 함유된 Zein 입자는 Zein 입자와 유사하게 입자크기가 유지되었으나, 섬기린초(ST)가 함유된 입자는 순수 Zein 입자보다 감소하였다. 이때, Zein 콜로이드성 입자는 높은 양의 제타전위(49 mV)를 보였으며, SC 또는 ST를 함유한 Zein 나노입자 또한 유사한 양의 제타전하로 측정되었다.

SC와 ST가 함유된 Zein-Caseinate 나노입자의 경우, 크기는 Zein-Caseinate에 비해 증가하였다. Zein-Caseinate는 Caseinate가 중성의 pH에서 음의 전하를 띠며 따라 높은 음의 전하를 가지게 된다. 따라서, SC와 ST를 함유한 Zein-Caseinate 나노입자 또한 음의 전하를 유지하였다.

이상의 결과를 통하여, SC 또는 ST를 함유한 Zein 나노입자는 냉동건조 후에 증류수에 재분산 시킬 수 없었으나, SC 또는 ST를 함유한 Zein-Caseinate는 가벼운 교반으로 물에 쉽게 분산이 가능하다고 사료 된다 (그림 140).

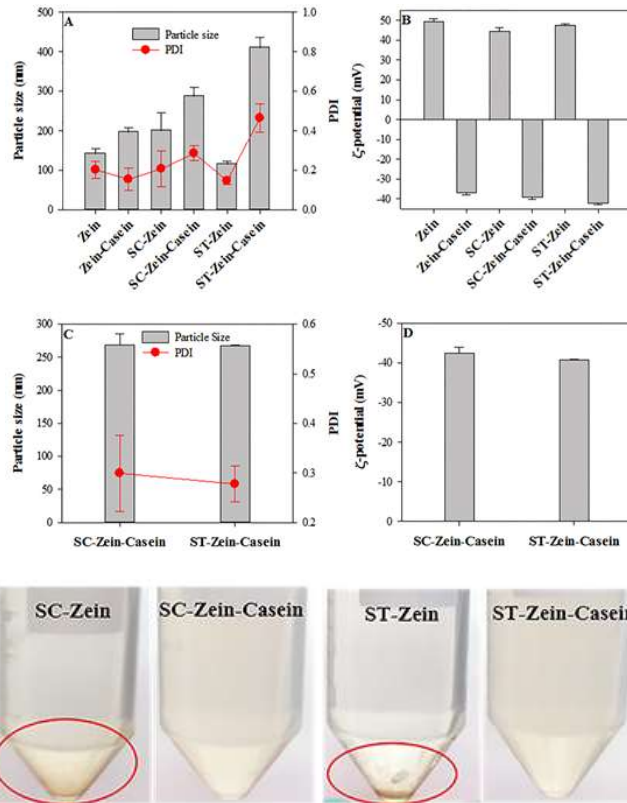


그림 140. 토복령, 섬기린초 추출물을 함유하는 Zein-Casein 기반 나노소재

② 입자형태

순수 Zein 콜로이드 입자는 거의 균일한 구형의 모양으로 50에서 150 nm의 크기 범위로 나타났다(그림 141-A). Caseinate를 첨가한 경우, Zein입자 주변에 피막을 형성하는 것이 관측되었다(그림 141-B). SC-Zein 또는 ST-Zein은 순수 Zein 콜로이드 입자와 유사한 형태를 나타냈다(그림 141-C). Zein-Caseinate 입자를 함유한 SC 또는 ST는 Zein-Caseinate 입자와 유사한 형태를 가지고 있는 것으로 관찰되었다. 입자를 함유한 ST는 입자를 함유한 SC가 뭉쳐있는 곳에서 여전히 400에서 500 nm의 크기 범위로 나타났다(그림 141-D~F).

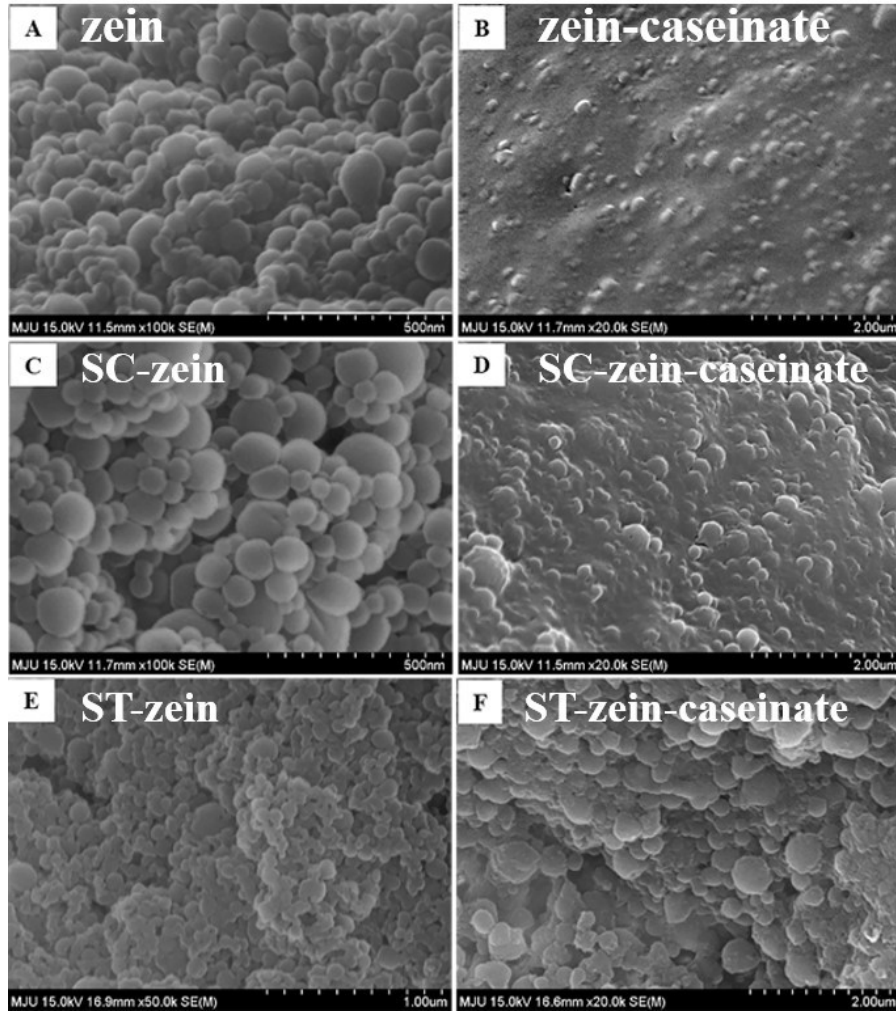


그림 141. 토복령, 섬기린초 추출물을 함유하는 Zein-Casein 기반 나노소재의 형태

③ 나노복합소재 형성 메커니즘 규명

Zein의 FTIR 스펙트럼은 하이드록실기, CH₂, amide I과 amide II에서 3285, 2958, 1639 and 1525 cm⁻¹의 특징적인 흡수대를 보였다. 하지만, 토복령(SC) 또는 섬기린초(ST)의 가장 특징적인 최고점은 Zein 나노입자를 함유했을 때 사라졌다. 이는, SC또는 ST가 입자 안으로 포함되기 때문에 결합의 굴신이 약화되어 복합체가 형성되며, SC-Zein 와 ST-Zein 나노입자에서는 단백질 amide I 과 amide II 결합의 중요한 변화가 나타난다. 이는 (i.e 수소 결합과 소수성 상호작용) SC, ST와 Zein 사이의 비공유결합에 관여한다는 것을 유추할 수 있다 (그림 142).

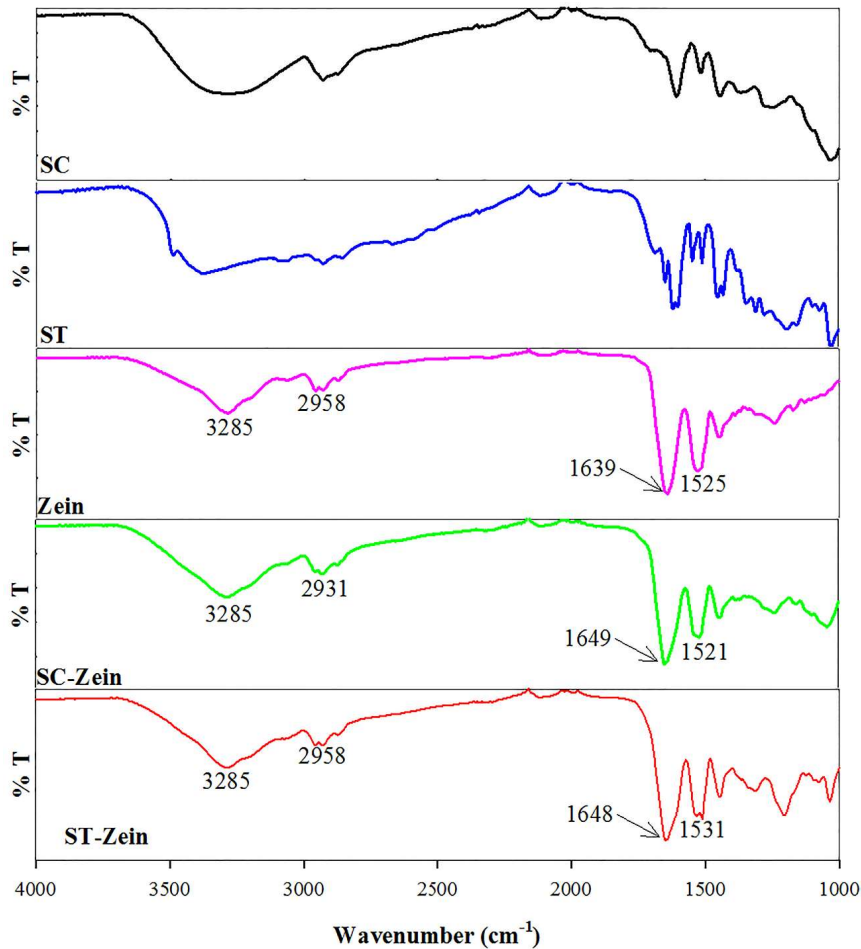


그림 142. 토복령, 섬기린초 추출물 함유 Zein-Casein 기반 나노소재의 FTIR 특성

(3) 나노복합소재 안정성 평가

가) 나노복합소재별 pH 안정성 평가

① Desolvation 방법 적용한 토복령 나노복합소재

나노소재에 대한 pH의 영향은 최적화된 5:1의 Zein-CMC 비율로 수행하였다. 토복령 추출물 함유 Zein-CMC 나노복합소재와 토복령 추출물 함유 Zein 나노입자 비교를 통하여 두 나노복합소재의 pH 영향력 및 소재활용 가능성을 평가하고자 하였다. Tris-HCl 완충용액(pH 범위 3.0-8.0)에 나노복합소재를 혼합하고, 12시간 동안 보관후 나노복합소재의 크기를 관측하였다.

토복령 추출물 함유 Zein 나노입자의 경우, Tris-HCl 완충용액을 가했을 때, pH 5.0, 6.0, 7.0에서 침전물이 형성되었다. 토복령 추출물 함유 Zein-CMC 나노복합소재의 경우, pH 3.0에서 8.0까지 전범위에서 침전현상이 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 통하여, CMC의 첨가가 나노복합소재의 pH에 대한 콜로이드 안정성에 기여한다는 것을 나타낸다 (그림 143).

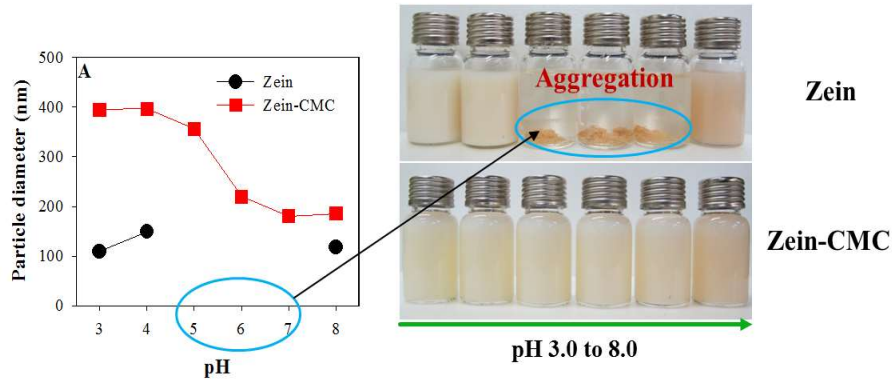


그림 143. 토복령 나노복합소재의 pH에 따른 안정성 확인

② Desolvation 방법 적용한 섬기린초 나노복합소재

pH의 영향은 나노복합소재 형성이 최적화된 5:1의 Zein-CMC 비율로 연구 수행하였다. 섬기린초 추출물 함유 Zein-CMC 나노복합체와 섬기린초 추출물 함유 Zein 나노입자를 비교분석하고자 하였다. Tris-HCl을 완충제로 사용하였으며, pH 범위는 3.0~8.0으로 설정하여 시험물질을 조제하였다. 모든 용액은 12시간동안 보관이후 결과를 관측하였다.

섬기린초 추출물 함유 Zein 나노입자의 경우, Tris HCl buffer를 가했을 때 pH 5.0, 6.0, 7.0 에서 침전물이 형성되었다. 섬기린초 추출물 함유 Zein-CMC 나노복합소재의 경우, 완충용액 사용 시, pH 3.0에서 8.0까지 아무런 침전도 관찰되지 않았다 (그림 144). 이 결과는 CMC의 존재가 나노복합소재의 pH안정성에 기여한다는 것을 나타낸다.

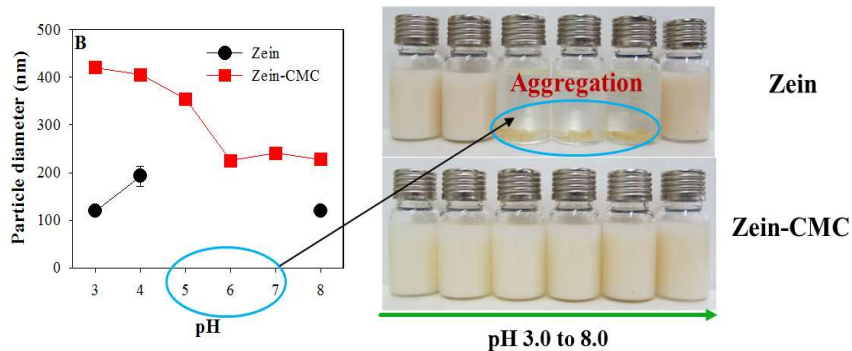


그림 144. 다양한 pH 조건에서 안정성을 유지하는 Zein-CMC 섬기린초 추출물 함유 나노소재

③ 항응매 공동침전법 적용 감초 나노복합소재

AOT가 존재할 때 Zein 입자는 pH 8.0, 7.0일때, PDI 0.06, 크기 202 nm의 직경을 나타낸다. 이 때, 제타전위는 -43.45 에서 -30.67 mV로 변화한다. 이 결과는 좋은 콜로이드 안정성과 함께 균일한 입자의 존재를 나타낸다. 순수 Zein 입자는 pH 6~3.5 사이에서 침전물에 대한 큰 민감성을 보인다. AOT의 존재 하에, 혼합된 콜로이드성 입자의 직경은 약 80nm 사이의 범위를 유지한다. 입자의 직경은 PDI가 감소할 때 (pH 5.0) 증가했고 pH

3.5에서는 변화가 없었다. 이는 균일한 입자의 미세한 침전물의 형성을 나타낸다. 입자의 전위는 pH 6.0~8.0에서 증가했고, pH 5.0에서는 감소하였다. pH 5.0에서 Zein 분자는 순수한 양의 전하를 가지며, Zein과 AOT 사이의 정전기가 해당 pH에서 입자 크기의 증가에 영향을 줄 수 있음을 나타낸다. 이 결과는 순수 Zein 나노입자와 비교했을 때, 넓은 pH 범위에서 Zein-AOT 혼합 나노소재의 콜로이드 안정성이 더 높다는 것을 입증하였다 (그림 145).

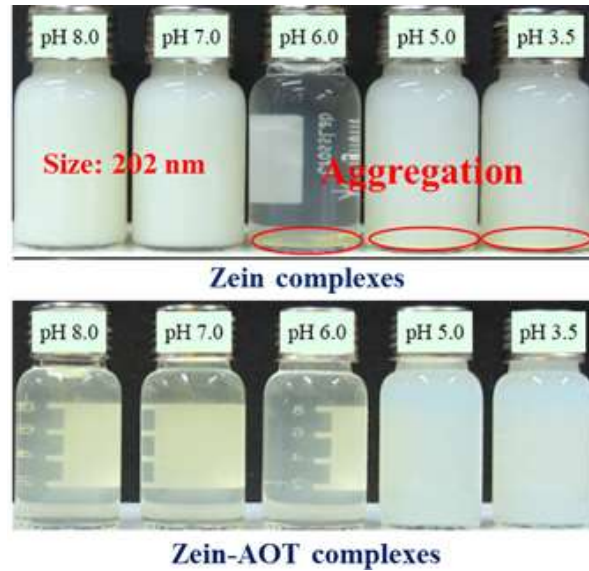


그림 145. 다양한 pH 조건에서 나노소재의 콜로이드 침전 안정성

④ 항응매 공동침전법 적용 토복령 및 섬기린초 나노복합소재

SC-Zein과 ST-Zein 콜로이드 입자는 pH 5 또는 6 또는 7의 완충제 용액에서 혼합되었을 때 응집되었다 (Zein이 가장 응집되기 쉬운 곳에서 Zein 단백질의 등전점은 약 pH 6.2). 그러나 SC-Zein과 ST-Zein 콜로이드 입자로의 Caseinate 첨가는 입자의 응집을 저해했으며, 이는 입자가 이 pH값에서 안정성에 영향을 미치는 것을 나타냈다 (그림 146).

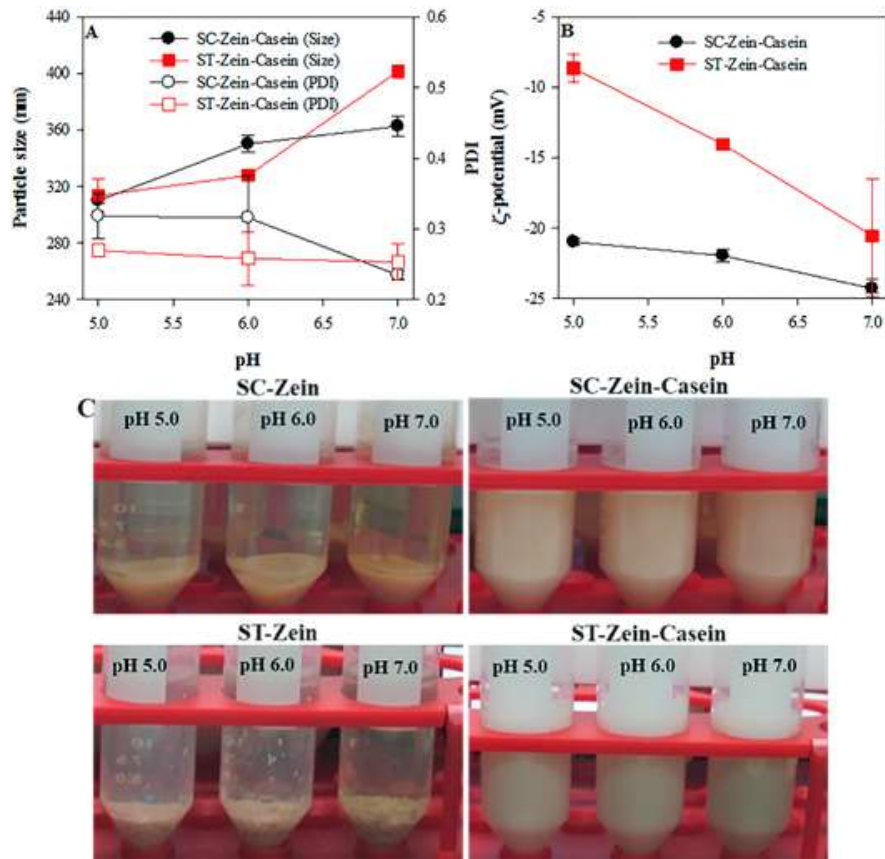


그림 146. 토복령, 섬기린초 추출물을 함유하는 Zein-Casein 기반 나노소제의 pH 영향

나) 나노복합소재별 장시간 보관안정성 평가

① Desolvation 방법 적용한 토복령 나노복합소재

토복령 추출물을 함유한 Zein 또는 Zein-CMC 나노입자 크기와 제타전위를 보관일자별로 측정된 결과, 9일 동안 안정적인 경향성을 나타내는 것으로 확인되었다. 입자크기, PDI, 제타전위의 유의하지 않은 변화는 좋은 저장성을 나타낸다고 판단할 수 있다 (그림 147).

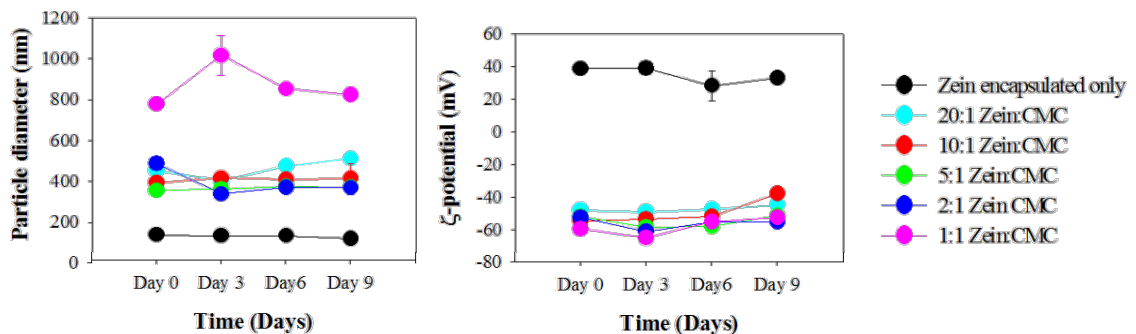


그림 147. 보관일자에 따른 나노복합소재의 입자크기 및 제타전위

② Desolvation 방법 적용한 섬기린초 나노복합소재

섬기린초 추출물을 함유한 Zein-CMC 나노입자의 크기와 제타전위는 9일 동안 안정적인 상태로 유지되는 것을 확인하였다. 입자의 크기, PDI, 제타전위의 유의하지 않은 변화는 좋은 저장성을 나타내는 것으로 판단된다 (그림 148).

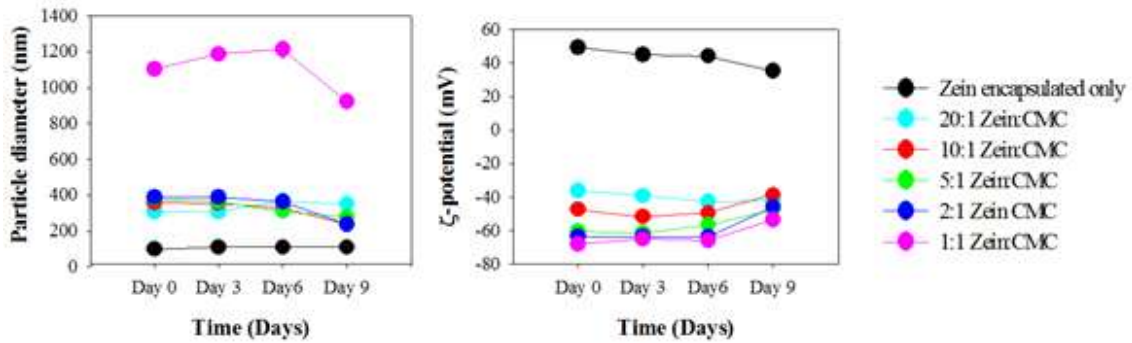


그림 148. 장시간(9시간) 보관 조건에서 안정성을 유지하는 Zein-CMC 섬기린초 추출물 함유 나노소재

③ 항용매 공동침전법 적용 감초 나노복합소재

입자크기, PDI, 제타전위의 변화는 감초추출물을 함유한 Zein-AOT 복합체의 형성을 나타낸다. 입자크기와 제타전위는 Zein-AOT 복합체로 캡슐화 된 감초 추출물이 9일 동안 안정적인 상태를 유지함을 입증하였다 (그림 149).

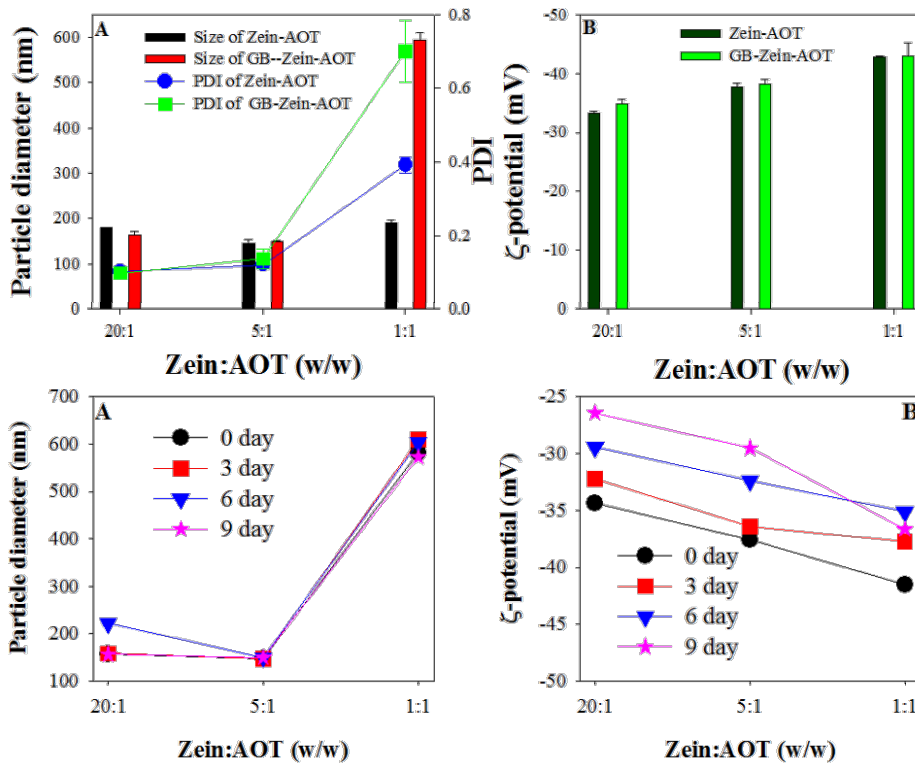


그림 149. 감초추출물 함유 나노소재의 크기, 다분산지수, 제타전위 안정성

다) 나노복합소재별 염(NaCl) 안정성 평가

① Desolvation 방법 적용한 토복령 나노복합소제

pH 5.0와 7.0에서 염 농도 75 mM까지 나노복합소제 이온강도의 분명하지 않은 효과를 보여주었다. 하지만, 75 mM이상의 염이 존재할 때에는 침전물이 형성되며, 나노입자의 크기가 대폭 증가하였다(400nm~1,000nm). 염의 존재가 정전기의 척력을 약화시켜 침전물을 형성함에 따라 이온화가 소멸되는 것이며, 이것은 나노복합소제가 충분히 안정적인 상태를 나타낸다.

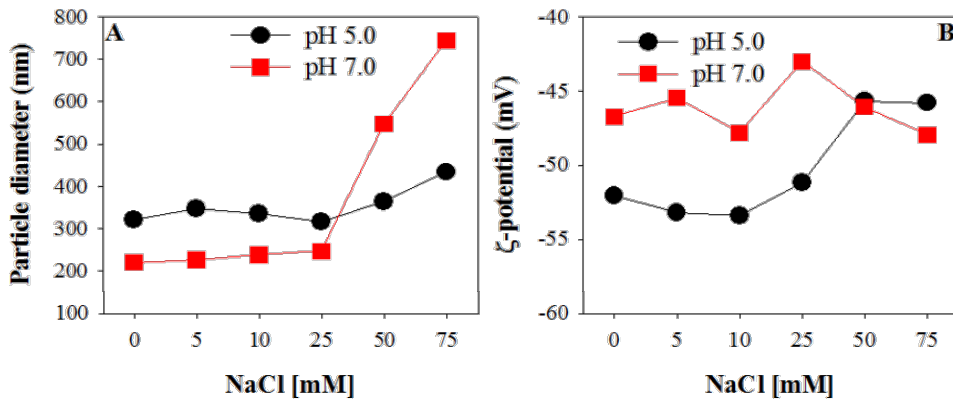


그림 150. 다양한 이온환경에서 토복령 추출물-Zein-CMC 나노복합소제의 안정성 확인

② Desolvation 방법 적용한 섬기린초 나노복합소제

5.0, 10, 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 300 mM 농도의 염화나트륨 수용액에서 나노복합소제의 성상을 분석하여 섬기린초 추출물 함유 나노복합소제의 이온안정성을 확인하고자 하였다. 모든 용액은 12시간동안 보관 후 결과를 관측하였다.

pH 5.0 과 7.0에서 염화나트륨 농도의 증가는 100 mM 이온 농도까지 나노복합소제 이온 강도에 유의적이지 않은 변화를 보였다. 그러나 150 mM 이상의 NaCl (pH 5.0 와 7.0)이 존재할 때에는 침전물이 형성되며, 입자의 크기가 대폭 증가되는 것으로 관측되었다 (1000 nm). 이는 나노복합소제가 적절한 염 농도에서 충분히 안정적인 상태를 나타내는 것으로 사료된다 (그림 151).

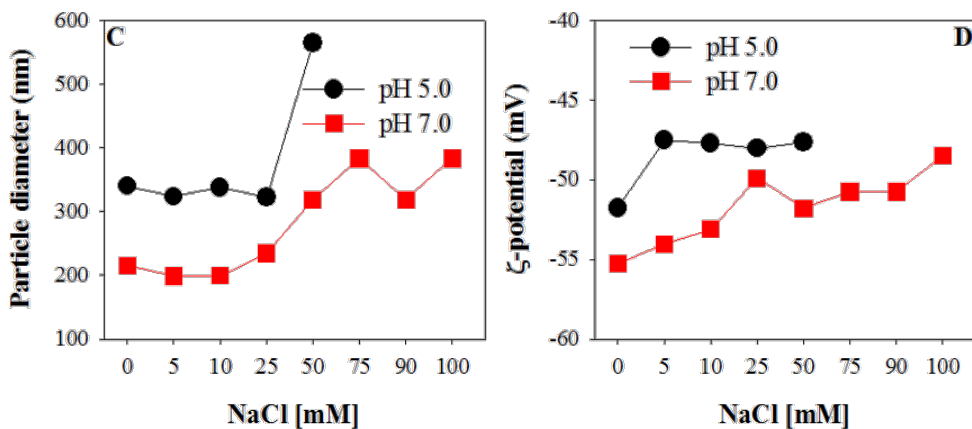


그림 151. 전해질 이온용액 상에서 섬기린초 나노복합소제의 안정성

③ 항응매 공동침전법 적용 토부령 및 섬기린초 나노복합소재

염화나트륨(50, 100 mM)은 이온성 차폐 효과로 인해 SC-Zein-Caseinate과 ST-Zein-Caseinate 콜로이드 입자의 크기를 감소시켰다. 그러나 염화나트륨 농도의 증가는 두 종류의 나노입자의 크기를 미세하게 증가시켰다. 이는 소금이 존재할 때 입자의 응집을 나타낸다. SC 및 ST 두 가지의 나노입자의 경우 1000 mM 염화나트륨의 첨가까지 입자의 응집이 관찰되지 않았으며, 이는 나노입자의 좋은 콜로이드 안정성을 가지는 것으로 사료된다 (그림 152).

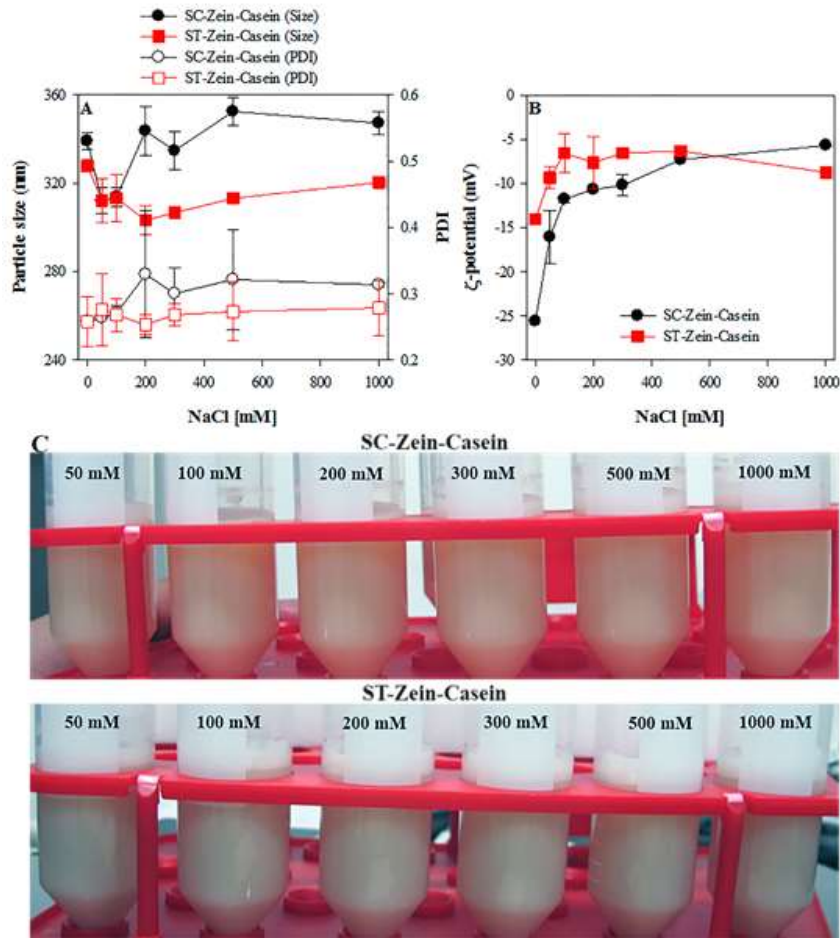


그림 152. 토부령, 섬기린초 추출물을 함유하는 Zein-Casein 기반 나노소재의 염의 영향

3. 3차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) 로즈마리추출물-L7D-덱스트린 나노소재 제조

나노복합소재에 사용될 피복소재는 45ml 물에 100:0, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2 (*w/w*)의 비율로 덱스트린 (0.5g)과 L7D (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 1g)를 용해하여 준비한다. 나노복합소재에 사용될 코어소재인 로즈마리 추출물은 5ml 에탄올에 2% 농도로 녹여 준비한다. 준비된 로즈마리 추출물은 시린지 펌프에 장착하고 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 속도로 덱스트린-L7D 용액에 흘려준다. 로즈마리 나노소재가 형성된 용액중의 에탄올은 회전감압농축기에서 35 $^{\circ}\text{C}$ 에서 감압하여 제거하여 액상의 로즈마리추출물-L7D-덱스트린 나노복합소재를 제조하였다 (그림 153).

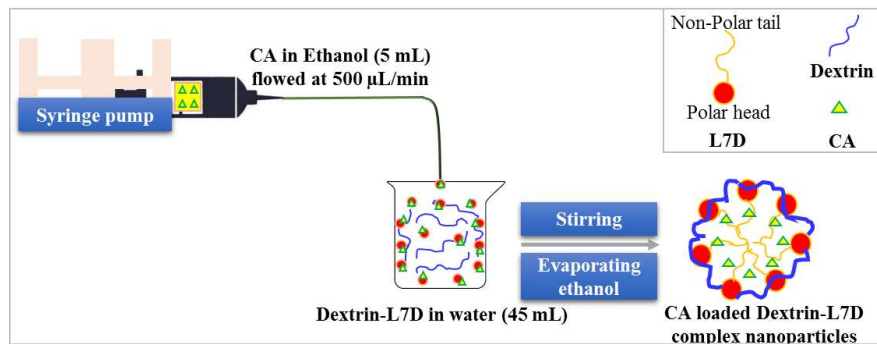


그림 153. 로즈마리추출물-L7D-덱스트린 나노복합소재 제조공정

(2) 고도로 분지된 고리형 덱스트린-카르노식산(CA)/로즈마린산(RA) 나노소재 제조공정 최적화

덱스트린은 증류수에 10% 농도(*w/v*)로 용해하여 준비한다. 덱스트린 용액에 총분류 1%에 해당하는 CA/RA 분말을 혼합한다. 혼합용액은 3시간 동안 35 $^{\circ}\text{C}$ 로 초음파분쇄기에서 처리한 이후, 4500 G에서 10분간 원심분리를 실시한다. 원심분리시 구조적변형으로 인하여 침전된 고형분을 제외하고 나노입자가 분산하여 존재하는 상등액을 획득하였다 (그림 154).

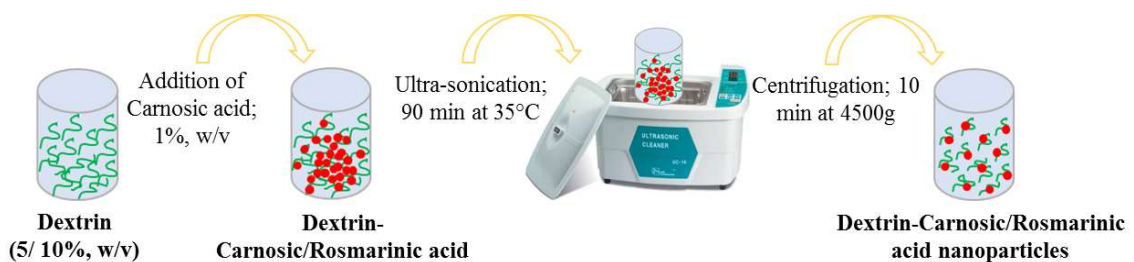


그림 154. 고도로 분지된 고리형 덱스트린-CA/RA 나노소재 제조공정

(3) 로즈마리추출물-M7D-카제인 나노소재 제조

가) 카제인-M7D 복합체 제조

카제인은 2 mg/ml 농도로 물에 용해하여 준비한다. 카제인 용액에 100:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:5 (w/w) 비율에 맞는 M7D를 첨가하여 25°C로 3시간동안 300rpm으로 교반하여 카제인-M7D 혼합용액을 제조하고, 용액별 물리화학적 특성을 확인하여 최적 복합체를 형성하는 혼합비를 도출하였다 (그림 155).

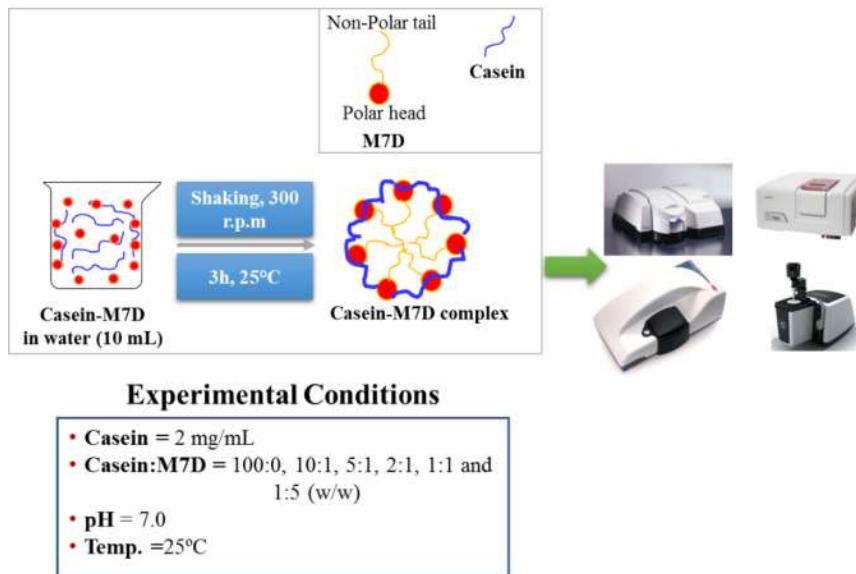
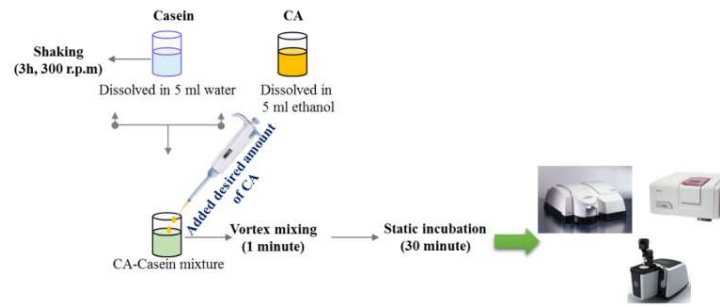


그림 155. 카제인-M7D 복합체 제조공정

나) 로즈마리추출물-카제인 복합체 제조

로즈마리 추출물-카제인 복합체 제조를 통하여 피복소재 구성성분 중 하나인 카제인의 결합특성을 파악하고자 하였다. 카제인은 10 μM 농도로 5ml 물에 녹인다음 3시간동안 300rpm으로 교반하여 카제인 용액을 준비한다. 로즈마리 추출물은 5ml 에탄올에 2% 농도로 녹여 준비한다. 준비된 로즈마리 추출물은 마이크로 파이펫을 이용하여 적정속도로 5 ~ 50 μM 정도를 카제인 용액에 주입한다. 로즈마리추출물-카제인 복합체 용액은 30분간 정지 배양한 다음 그 특성을 분석 하였다 (그림 156).



Experimental Conditions

- Casein = 10 μ M
- CA = 5 to 50 μ M
- pH = 7.0
- Temp. = 25°C

그림 156. 로즈마리추출물-카제인 복합체 제조과정

다) 로즈마리추출물-M7D-카제인 나노소재 제조

나노복합소에 사용될 피복소재는 45 ml 물에 상기의 실험을 통하여 도출된 카제인과 M7D를 용해하여 준비한다. 나노복합소에 사용될 코어소재인 로즈마리 추출물은 5 ml 에탄올에 2% 농도로 녹여 준비한다. 준비된 로즈마리 추출물은 시린지 펌프에 장착하고 500 μ L/min 속도로 카제인-M7D 용액에 흘려준다. 로즈마리 나노소재가 형성된 용액중의 에탄올은 회전감압농축기에서 35°C에서 감압하여 제거하여 액상의 로즈마리추출물-M7D-카제인 나노복합소재를 제조하였다 (그림 157).

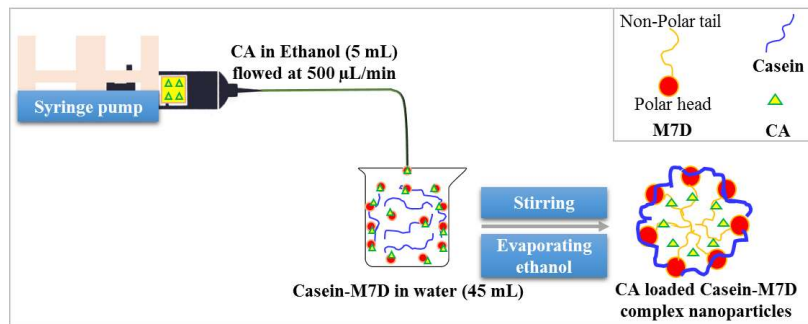


그림 157. 로즈마리추출물-카제인-M7D 나노소재 제조과정

(4) 로즈마리추출물(CA)-소혈청알부민(BSA) 나노복합체 제조

피복소재로 사용할 소 혈청 알부민(Bovine serume albumin)은 PBS(Phosphate buffered saline) 완충액(농도: 0.02 mol/L, pH 7.4, NaCl 0.1 mol/L)에 용해하여 준비하였으며, 로즈마리추출물은 5ml의 에탄올에 용해하여 스탁용액을 제조하였다. 준비된 BSA 용액에 각기 다른비율의 로즈마리추출물 스탁용액을 첨가하여 나노복합체를 제조하였으며, 모든 샘플은 특성을 분석하기 전 30분간 정치하였다.

(5) 섬기린초추출물-히드록시프로필 시클로덱스트린(HPBCD) 나노복합체 제조

피복소재인 HPBCD와 섬기린초추출물의 최적혼합비율은 선행연구를 통하여 미리 확인한바 있으므로 개별적인 실험방법 수록은 하지 않았다. HPBCD는 5 ml의 에탄올에 녹여 준비하고, 섬기린초추출물은 40 ml의 물에 녹여 준비한다. 에탄올에 녹인 HPBCD는 시린지펌프에 장착하고 섬기린초추출물 용액에 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 로 흘려주어 나노복합체를 제조한다. 나노복합체 용액에 존재하는 에탄올은 회전감압농축기에서 40 $^{\circ}\text{C}$ 온도로 제거하여 제조를 완료하였다 (그림 158).

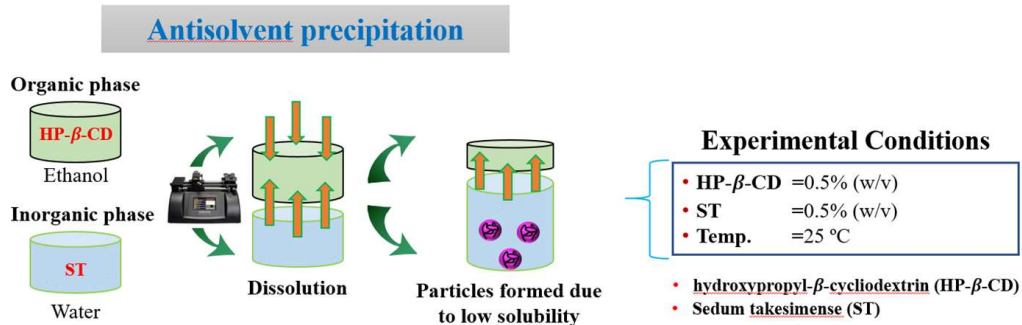


그림 158. 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체 제조공정

(6) 마이크로 유체를 이용한 나노에멀전 제조

펙틴(PEC)과 오브알부민(OVA)을 항균제인 sodium azide와 함께 0.02% (w/v)의 pH 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 구연산-구연산 나트륨, pH 4.0 및 3.0)을 1 : 3의 중량비 및 0.4% (w/v) 농도로 첨가하여 실온에서 24시간 교반하여 완전히 용해한다. 나노에멀전의 코어소재로 사용될 로즈마리 추출물은 해바라기유에 1 mg/ml 농도로 첨가하여 혼합한다. 마이크로 유체장치의 말단부에는 PEC 용액(수상부)을, 중간부에는 OVA 용액(수상부)을, 선두부에는 코어소재 함유 해바라기유(유상부)를 장착한 다음 수상부는 50 $\mu\text{L} / \text{min}$, 유상부는 5 $\mu\text{L} / \text{min}$ 로 주입하여 나노에멀전을 제조하였다.

(6) 나노복합소재 물리화학적 특성 분석

가) 크기 (Z-average)

DLS를 이용하여 나노소재의 입자크기를 비교하고자 하였다. 코어소재 및 나노소재를 1% 용액으로 제조하고, 용액 내 분산하여 존재하는 입자크기를 분석하여 나노규모의 입자가 형성되었는지 확인하였다.

나) 다분산지수 (Polydispersity index, PDI)

나노입자의 균일성을 구하기 위해 사용되는 수식인 PDI를 사용하여 나노소재의 균일성을 확인하고자 하였다. 코어소재 및 나노소재를 1% 용액으로 제조하고, 용액 내 분산하여 존재하는 입자의 균일성을 비교하였다.

다) 제타전위 (Zeta-potential)

입자의 표면전위를 측정하여 나노입자의 구조적 안정성을 확인하기 위하여 Zeta potential 수치를 측정하였다. 코어소재 및 나노소재를 1% 용액으로 제조하고, 용액 내 분산하여 존재하는 입자의 표면전위를 비교하였다.

라) 형태학적 배열 (Morphology)

나노입자의 표면 형태를 확인하기 위하여 FE-SEM (Field emission scanning electron microscopy)을 사용하여 나노입자를 촬영하였으며, 이를 비교하기 위하여 코어소재를 포함하지 않은 Zein 단백질을 같이 촬영하여 형태학적 비교를 실시하였다.

마) 나노복합소재 형성 메커니즘 규명

결합이 없는 피복소재와 나노복합소재의 FT-IR 스펙트럼 비교분석을 통하여 특정 작용기의 결합형성여부를 파악하였다. 또한, Synchronous fluorescence 및 UV-Vis 스펙트럼 비교분석을 통하여 나노복합소재의 형성여부를 확인하였다.

다. 연구 결과

(1) 로즈마리추출물-L7D-덱스트린 나노소재 제조

가) CA함유 Dextrin-L7D 나노복합입자의 형성 (그림 159)

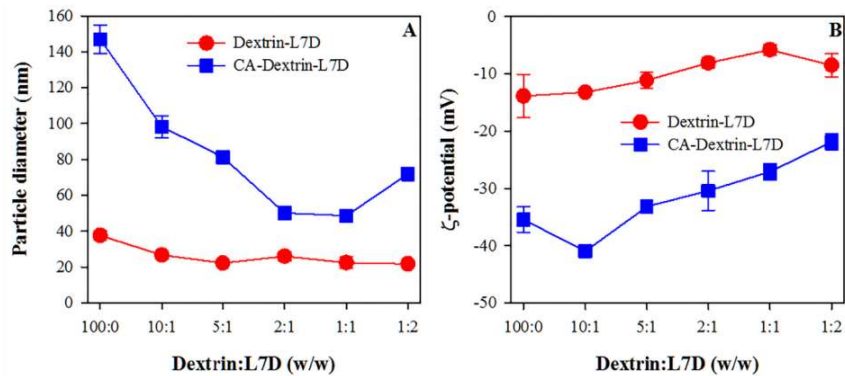


그림 159. CA함유 Dextrin-L7D 나노복합입자 입자크기 및 제타전위

Dextrin-L7D 나노복합입자의 크기는 L7D 농도의 증가에 따라 약 37 nm에서 21 nm로 감소되었다. 나노복합입자에 CA이 첨가됨에 따라 입자크기가 증가되었고 L7D의 양이 증가함에 따라 감소되었다. CA의 존재에서 Dextrin-L7D의 비율이 2:1, 1:1일 때 가장 작은 입자크기를 보였다.

제타전위의 경우 CA 함유된 나노복합입자에서 더욱 큰 음의 값을 나타냈으며, 이는 수용액 상에서 더욱 안정하게 존재할 수 있음을 나타낸다.

나) CA 함유된 Dextrin-L7D 나노복합입자의 형태 (그림 160)

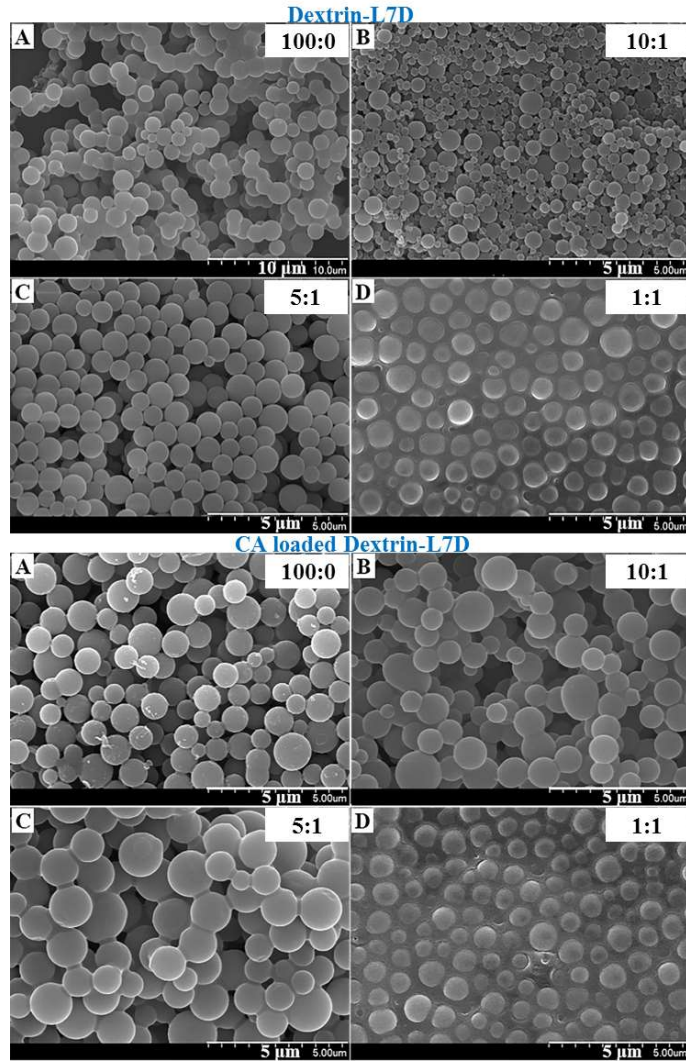
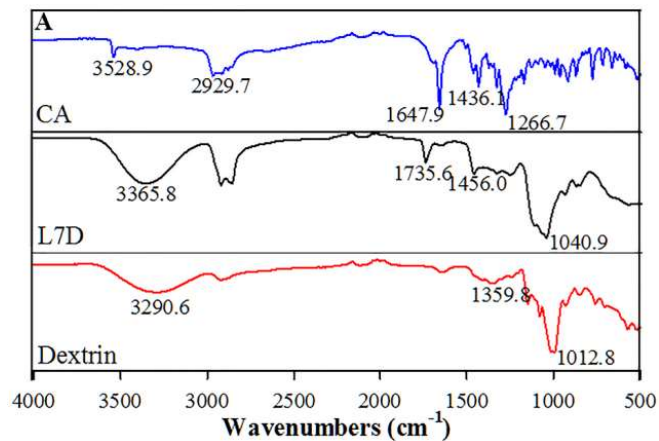


그림 160. CA함유 Dextrin-L7D 나노복합입자 입자형태

SEM 측정을 통해 나노복합입자의 형태를 볼 수 있다. CA가 함유된 또는 함유되지 않은 Dextrin-L7D 나노복합입자는 원형으로 나타났다. 농도의 L7D와 Dextrin에서 나노입자는 L7D 합성물에 포함되어 부분적으로 film 형태를 나타냈다.

다) CA 함유 Dextrin-L7D 나노복합입자 형성 메커니즘



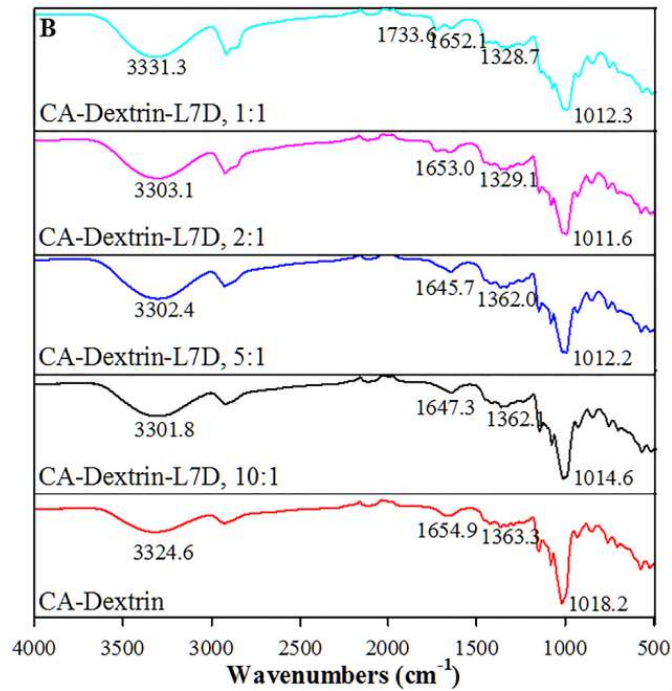


그림 161. CA함유 Dextrin-L7D 나노복합입자 FTIR 분석결과

적외선 파장에서 3100–3500 cm^{-1} 범위의 피크는 수산기에 결합한 물의 OH 스트레칭 진동으로 나타난다. L7D 농도가 증가함에 따라 OH 스트레칭 피크의 이동이 나타났으며, 이는 수소결합의 형성을 나타낸다. 또한 CA의 피크는 나노복합체에서 나타나지 않았으며, 이는 CA가 나노입자 속으로 캡슐화 되었음을 나타낸다.

라) CA 함유된 Dextrin-L7D 나노복합입자의 pH 안정성 (그림 162)

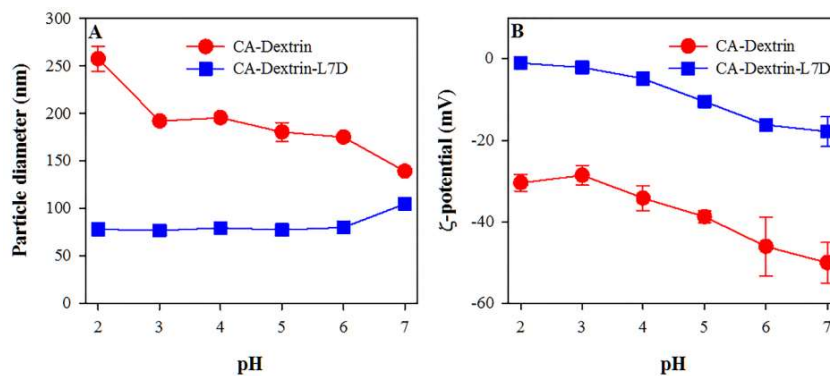


그림 162. pH별 CA함유 Dextrin-L7D 나노복합입자의 입자크기 및 제타전위

CA-Dextrin 나노입자의 크기는 pH가 7.0에서 2.0까지 감소됨에 따라 150 nm 에서 250 nm으로 증가되었다. CA-L7D-Dextrin 나노복합입자의 크기는 pH의 변화에도 100 nm 이하로 유지되었고, 이는 좋은 콜로이드 안정성을 나타낸다.

CA-Dextrin과 CA-L7D-Dextrin 나노복합입자의 제타전위는 pH 7.0에서 음의 값을 나타내었고, pH가 감소됨에 따라 증가되었다.

마) CA 함유 Dextrin-L7D 나노복합입자의 소금안정성 (그림 163)

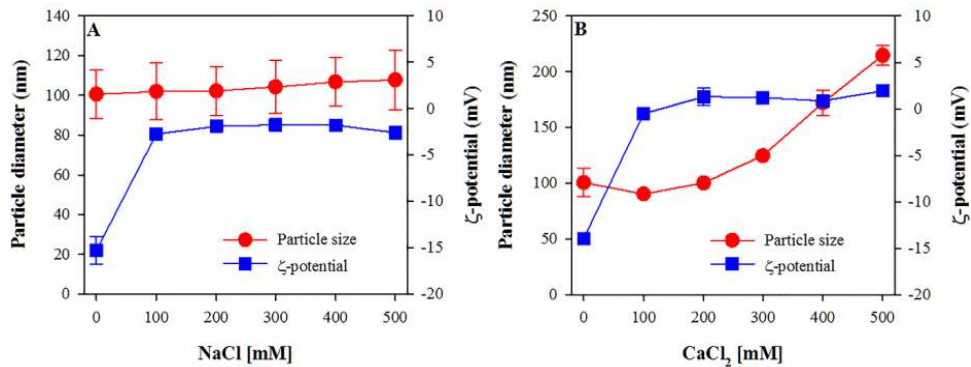


그림 163. 염 종류별, 염 농도별 CA함유 Dextrin-L7D 나노복합입자의 입자크기 및 제타전위

CA-L7D-Dextrin 나노복합입자의 크기는 NaCl 농도 증가에도 일정하게 유지되었으며, 이는 NaCl은 나노입자에 효과를 나타내지 않음을 나타낸다. CaCl₂의 증가에 따라, Dextrin 과L7D 사이에 염다리의 형성에 의해 나노복합입자의 크기가 증가하였다. NaCl과 CaCl₂가 첨가되며 나노복합입자의 표면 전위가 변화하였으며 농도에 따른 변화는 나타나지 않았다.

(2) 고도로 분지된 고리형 텍스트린-카르노식산(CA)/로즈마린산(RA) 나노소재 제조공정 최적화

가) CA/RA 함유된 Dextrin 나노입자의 형성 (그림 164)

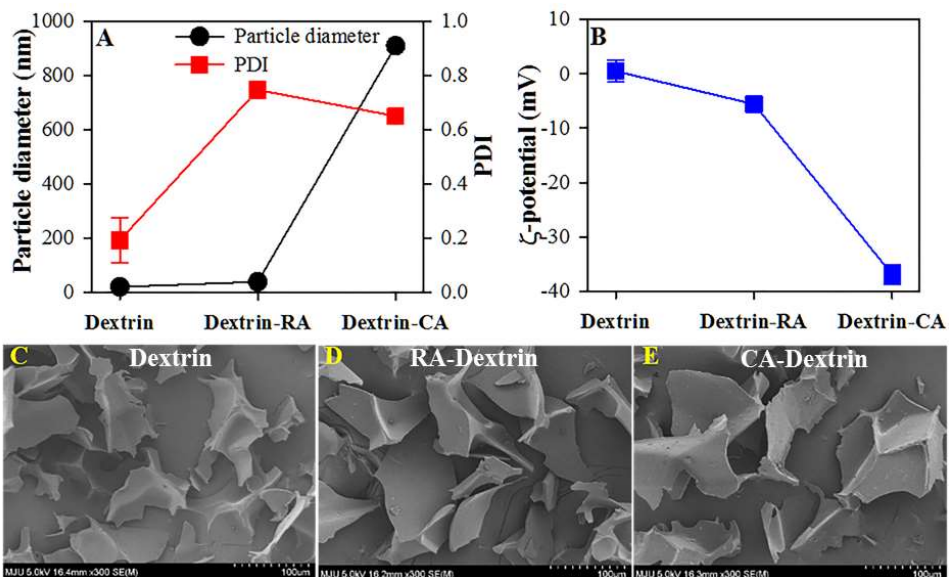
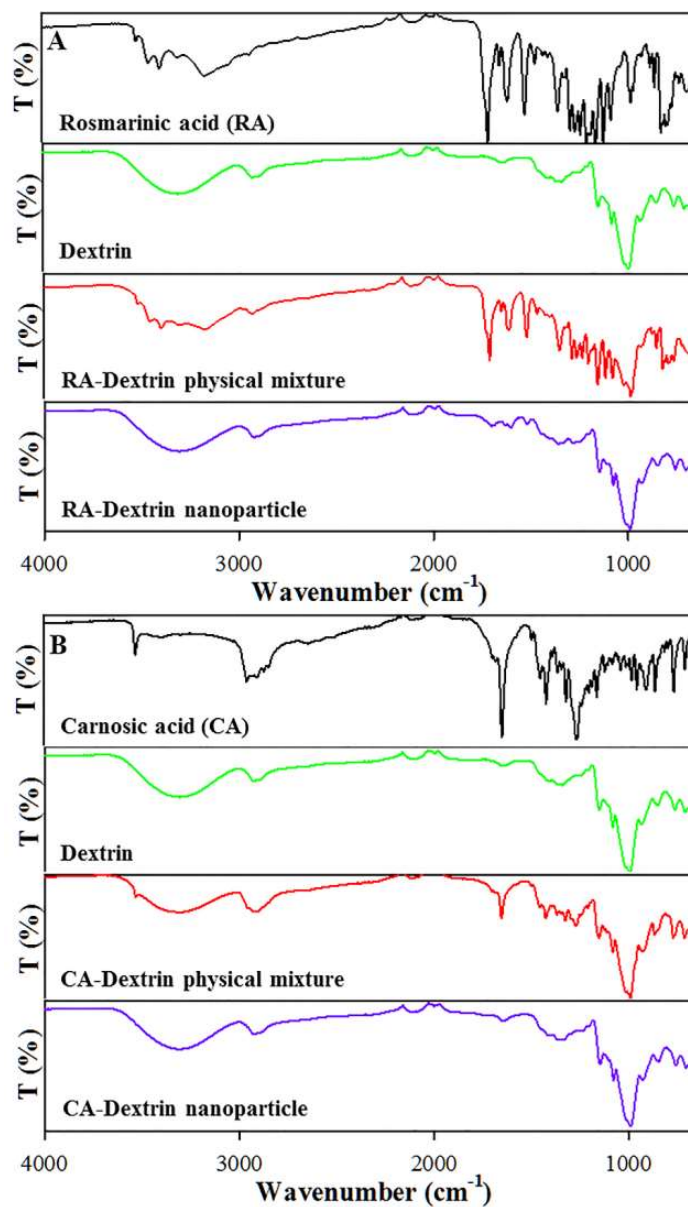


그림 164. CA/RA 함유된 Dextrin 나노입자의 입자크기, 제타전위, 입자형태

Dextrin 단독의 의 입자 크기는 약 20 nm이며 PDI 는 0.2로 나타났다. RA와 CA의 첨가는 나노복합입자의 크기를 약 40 과 910 nm 로 증가시켰고, PDI는 각각 0.7과 0.6로 나타났다. 또한 Dextrin 과 CA/RA 함유된 나노복합입자는 복합적인 형태로 나타났다.

나) CA/RA 함유 Dextrin 나노입자의 FTIR 과 XRD 스펙트럼



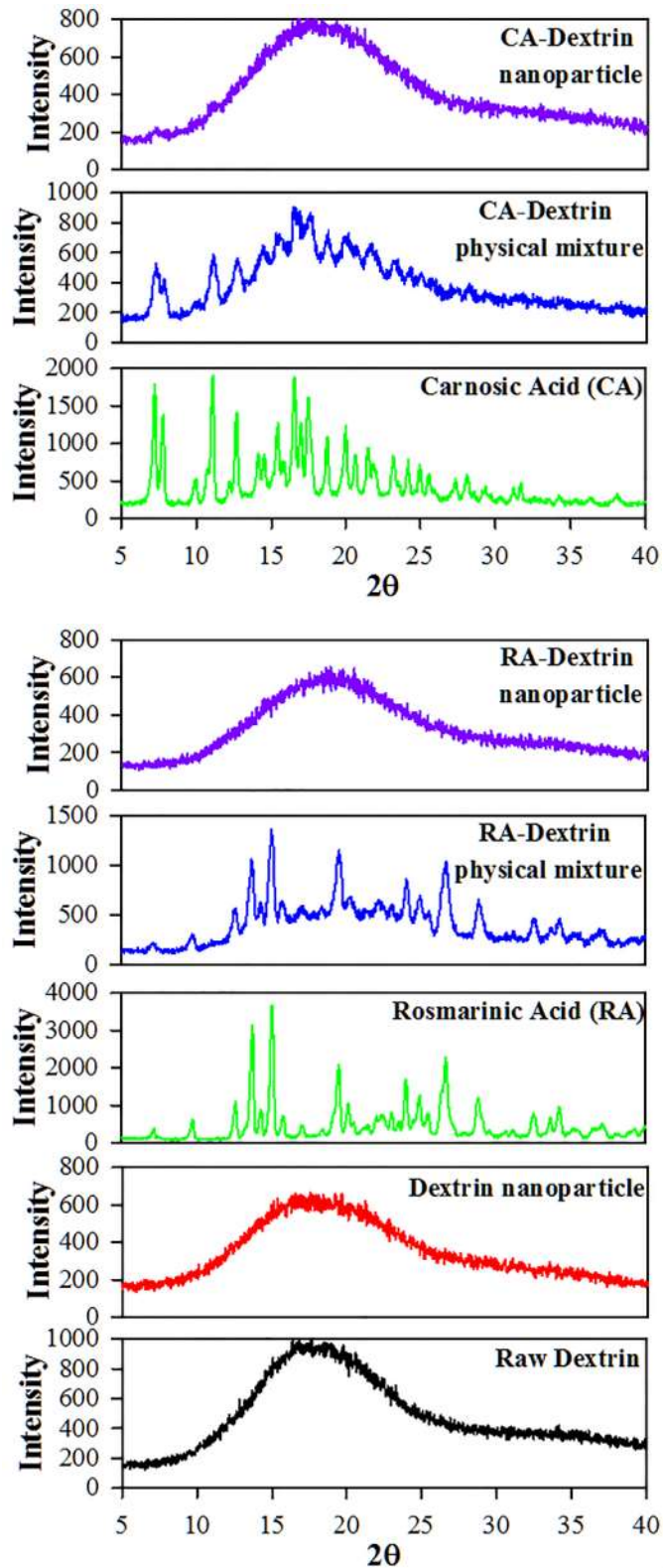


그림 165. CA/RA 함유 Dextrin 나노입자의 FTIR 과 XRD 스펙트럼

RA/CA는 FTIR과 XRD 스펙트럼에서 특정 피크를 나타낸다. 물리적으로 혼합된 RA/CA-Dextrin에서, CA/RA의 특정 피크가 나타났으며 이는 RA/CA의 존재를 나타낸다. 그러나, 나노입자 형성 후 CA/RA의 특정 피크는 사라졌으며, 이는 CA/RA이 Dextrin 나노입자 안으로 들어갔음을 나타낸다.

다) CA/RA 함유 Dextrin 나노입자의 DSC와 TGA 스펙트럼

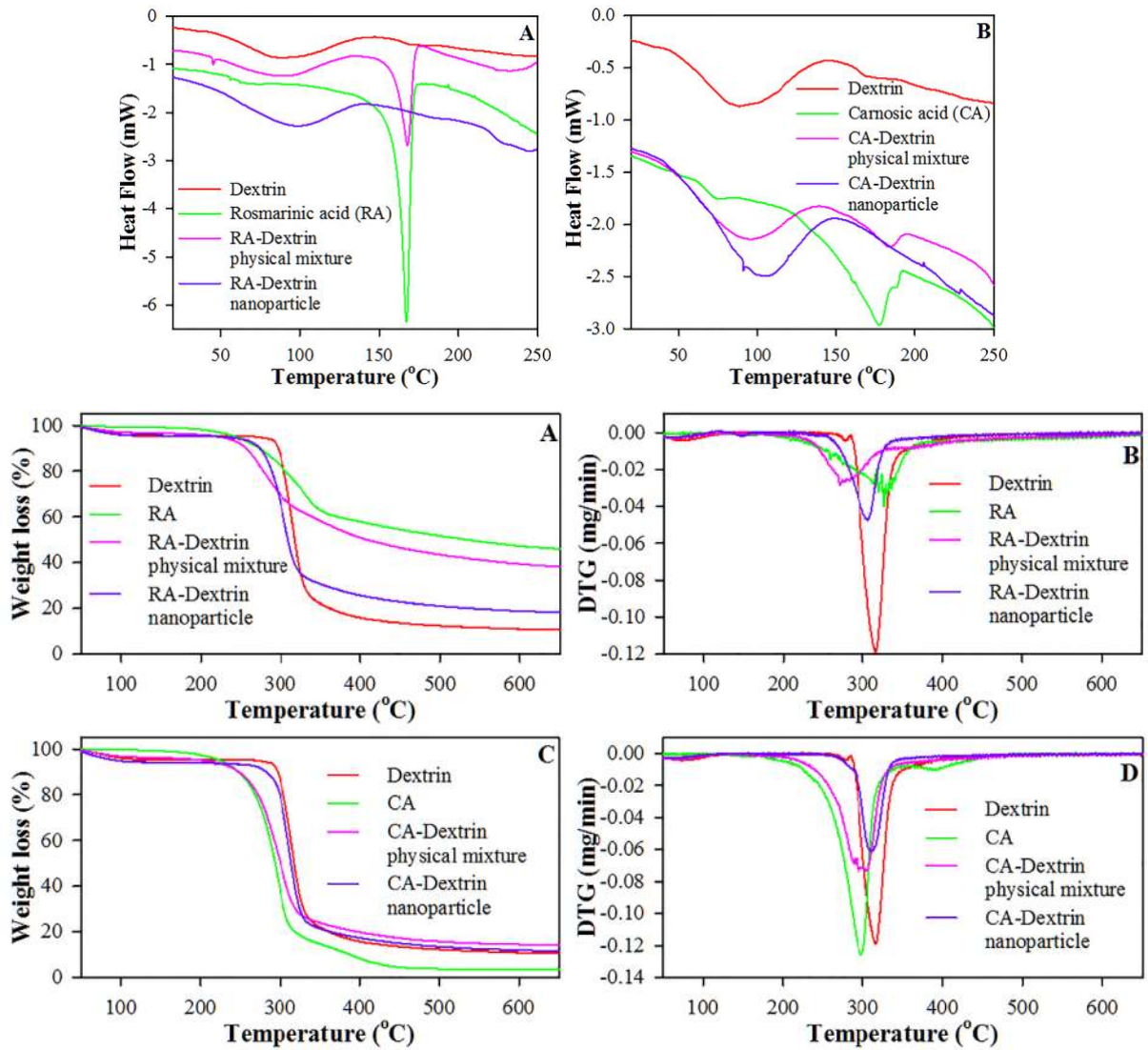


그림 166. CA/RA 함유 Dextrin 나노입자의 DSC와 TGA 스펙트럼

CA/RA 함유된 Dextrin 나노입자의 온도 안정성이 향상되었다.

(3) 로즈마리추출물-M7D-카제인 나노소재 제조

가) 카제인-M7D 복합체의 특성

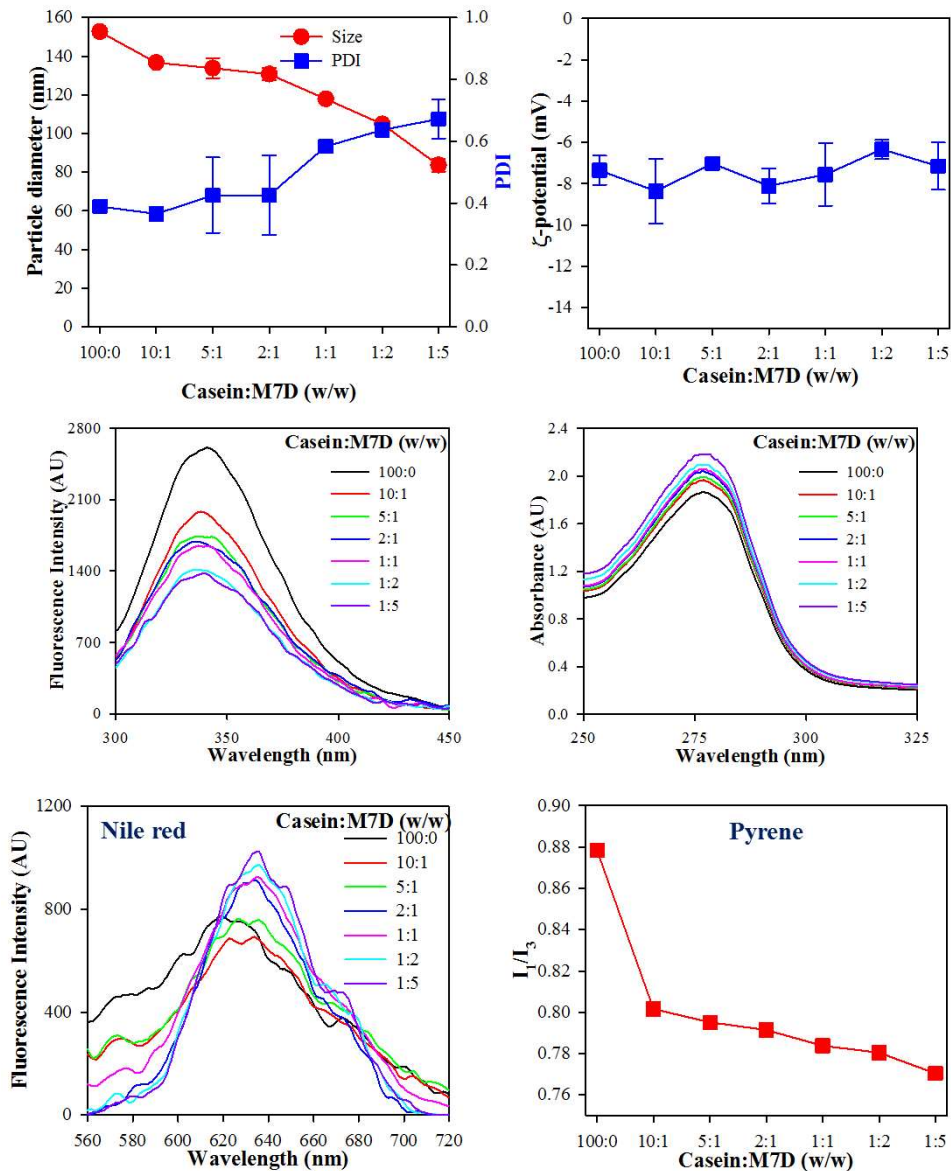


그림 167. 카제인-M7D 복합체 분광학적 분석 스펙트럼

M7D의 증가에 따른 입자크기의 감소는 카제인 미셀이 파괴됨에 따라 나노클러스터의 형성에 의해 나타났다. 비이온의 M7D와 카제인의 수소결합과 소수성 상호작용에 의해 제타전위는 일정하게 유지되었다.

카제인은 다섯개의 트립토판(Trp) 잔기를 가지고 있는데 Trp-164와 Trp-199는 α 1-casein에, Trp-109와 Trp-193은 α 2-casein에, Trp-143은 β -casein에 위치하고 있다. M7D는 카제인의 트립토판 잔기의 형광을 소광시키는데, 이는 카제인과 M7D의 결합을 나타낸다.

275 nm (방향족 아미노산 잔기)에서 카제인의 UV-vis 흡수 스펙트럼은 M7D의 첨가에 따라 증가하였으며, 이는 기저상태에서의 복합체 형성을 나타낸다. 또한 M7D의 증가에 따라 파이렌 극성이 감소하며 나일 레드 형광이 증가하였으며, 이 결과는 단일 카제인보다 카제인-M7D 복합체가 소수성 부분을 증가시킨다는 것을 나타낸다.

나) CA-카제인 복합체의 특성

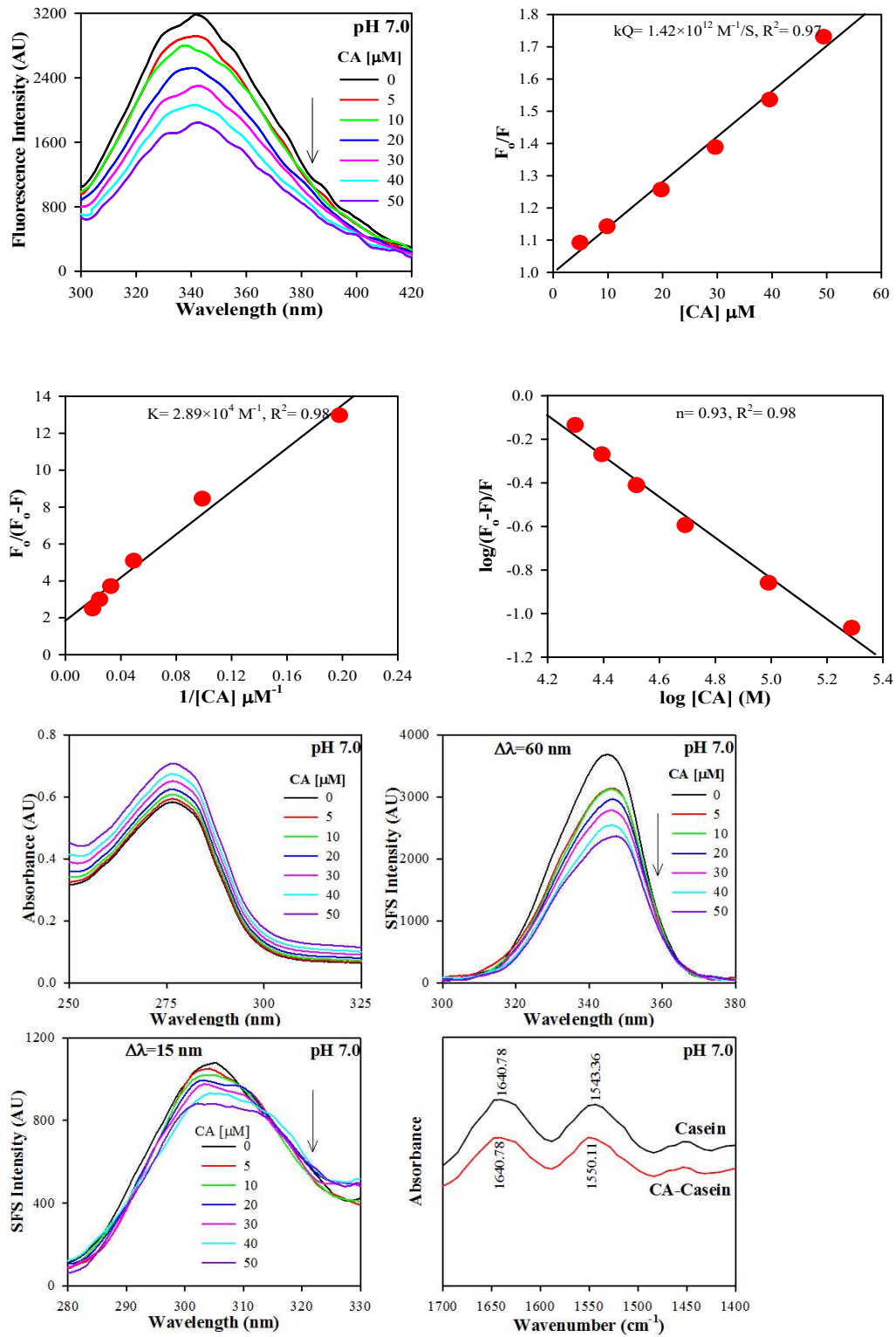


그림 168. CA-카제인 복합체 분광학적 분석 스펙트럼

CA에 의한 카제인의 Trp 형광의 소광은 CA-카제인 복합체의 형성을 나타낸다. CA-카제인 복합체는 화학양론적으로 1:1로 결합하며, 결합상수는 $2.89 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ 로 나타났다. 이는 CA와 카제인이 중간정도의 친화력을 가진다는 것을 나타낸다.

CA 농도의 증가에 따른 카제인의 UV-vis 흡수의 증가는 CA와 카제인의 결합에 의해 나타난다.

또한 CA 농도의 증가에 따른 동기형광 스펙트럼의 적색이동은 결합에 따른 카제인의 구조 변화를 나타내며, 카제인의 아마이드 II 밴드(1550.11cm^{-1})의 1543.36cm^{-1} 으로의 이동은 CA의 C=O 와 C-N 펩타이드 모이어티의 강한 상호작용과 유도된 폴리펩타이드의 재배열을 나타낸다.

다) CA 함유된 카제인-M7D 나노복합입자의 특성

카제인-M7D 복합체의 크기는 CA의 첨가에 의해 영향을 받았으며, CA의 존재 하에 특정 비율에서의 카제인-M7D 복합체의 제타전위의 감소는 CA가 복합체의 표면에 음의 전하를 제공하는 것을 나타낸다. CA-카제인 또는 CA-카제인-M7D 복합체는 pH 값의 폭넓은 변화에도 안정하게 유지되었다. 그러나 카제인의 등전점(pH 4.0)에서 침전물을 형성하였으며, M7D의 존재에 의해 억제되지 않았다.

(4) 로즈마리추출물(CA)-소혈청알부민(BSA) 나노복합체 제조

가) CA에 의한 BSA 형광의 변화

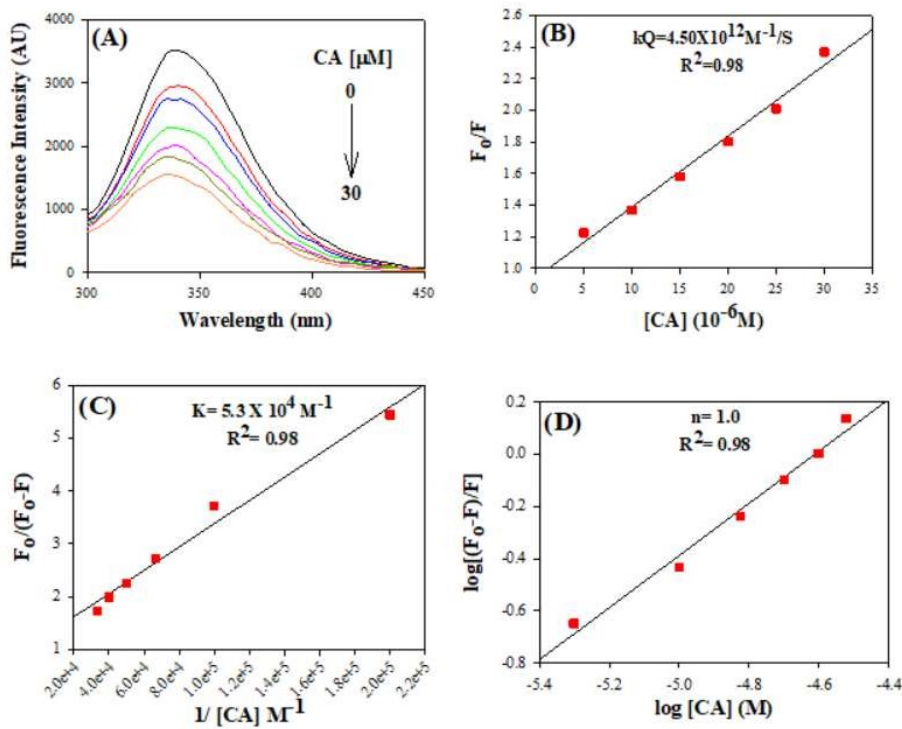
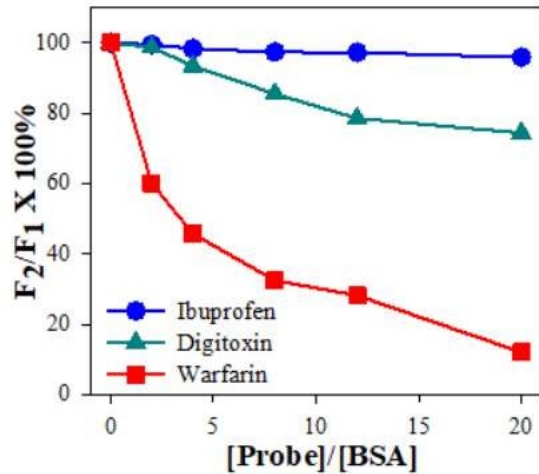


그림 169. CA-BSA 나노복합체 형광 스펙트럼

- CA에 의한 BSA의 형광 소광 스펙트럼, $\lambda_{ex} = 280\text{nm}$ (A). Stern-Volmer 소광 상수, kQ (B), 결합 상수, K (C), 결합 수, n (D)



Ibuprofen, Digitoxin 및 Warfarin를 이용한 BSA 단백질 상의 CA 결합 부위 결정

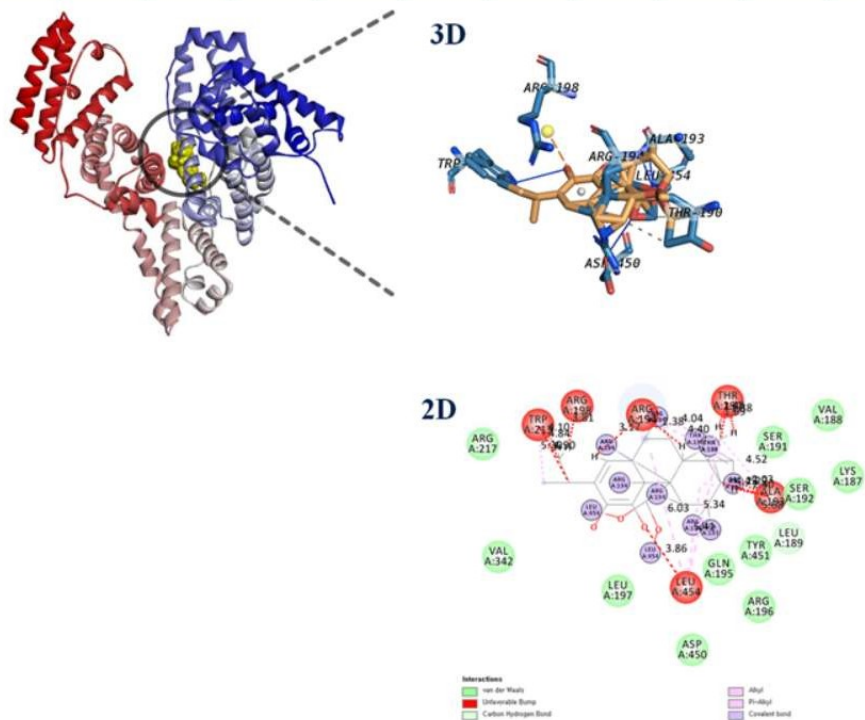


그림 170. CA-BSA 나노복합체에서 BSA 단백질 상의 CA 결합부위 결정 이미지

나) 단백질-리간드 도킹 시뮬레이션에 의한 BSA-CA결합 부위 결정 (그림 170)

280 nm 파장에서 CA에 의한 BSA의 형광의 소광은 CA-BSA 복합체의 형성을 나타낸다. CA-BSA 복합체는 화학양론적으로 1:1로 결합하며, 결합상수는 $5.3 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ 로 나타났으며, 이는 CA와 BSA가 중간정도의 친화력으로 결합하는 것을 나타낸다.

BSA에는 상대적으로 높은 친화성을 나타내는 3개의 결합부위가 존재 (사이트 I, II, III)한다. 사이트 마커 경쟁 실험에서 CA는 사이트 I에 주로 결합하는 와파린에 의해 가장 크게 영향을 받았으며, 이는 CA가 BSA의 사이트 I (하위 도메인 IIA)에 결합한다는 것을 나타낸다. 또한 분자도킹 시뮬레이션 결과 CA가 BSA의 사이트 I의 소수성 공동 부분에 깊이 결합하는 것으로 나타났다.

다) CA에 의한 BSA 구조의 변화

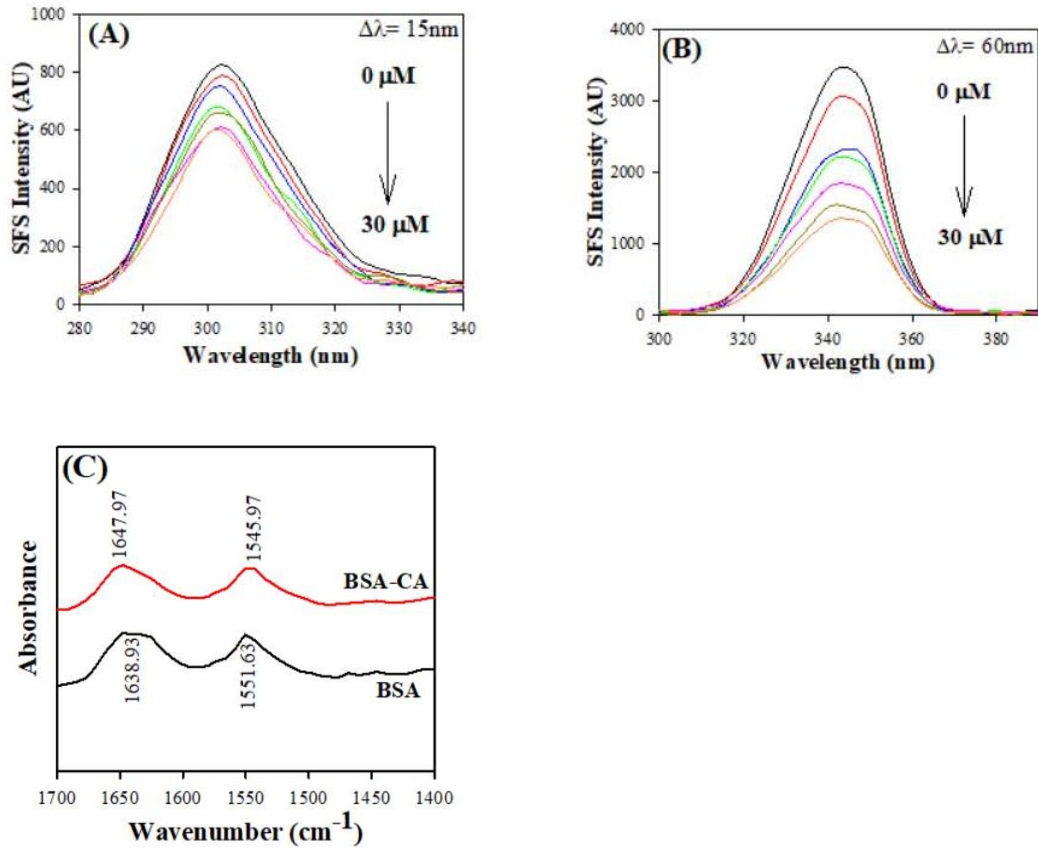


그림 171. CA-BSA 나노복합체 FTIR 스펙트럼

$\Delta\lambda = 15\text{ nm}$ (A) and $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$ (B)에서의 동기형광 스펙트럼. CA 유무에 따른 BSA의 FT-IR 스펙트럼(C)

CA 유무에 따른 BSA의 FT-IR 스펙트럼(C)을 측정하였다. CA 농도의 증가에 따른 $\Delta\lambda = 15, 60\text{nm}$ 의 동기형광 스펙트럼은 각각 티로신과 트립토판 잔기의 스펙트럼을 제공한다.

동기형광측정 결과 CA 결합 시 티로신의 영향보다 트립토판의 영향을 크게 받는 것으로 나타났다. BSA 및 BSA-CA의 FTIR 스펙트럼에서 아미드 I의 피크 위치가 1647.97에서 1638.93 cm^{-1} 로, 아미드 II 밴드의 피크 위치는 1545.97에서 1551.63 cm^{-1} 로 이동했으며 이는 BSA의 2차 구조의 변화를 나타낸다.

라) CA-BSA 복합입자의 크기 및 제타전위

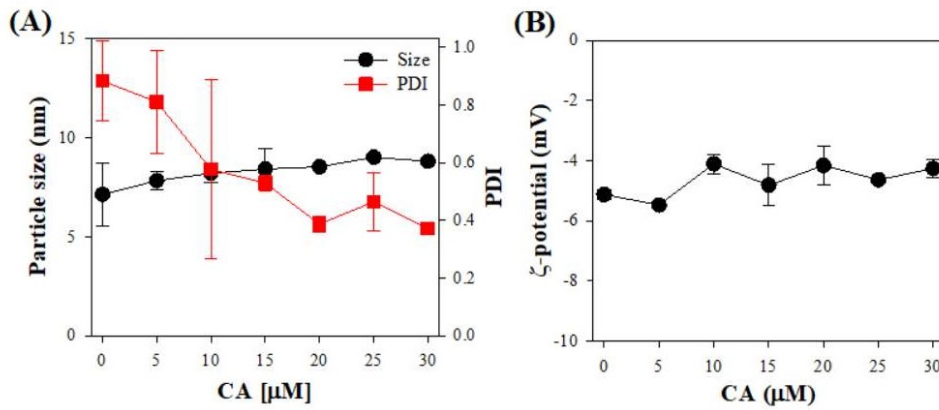


그림 172. CA-BSA 나노복합체 입자크기 및 제타전위

BSA-CA 복합입자의 크기와 제타전위는 CA 첨가의 영향을 받지 않았다. CA의 농도 증가에 따라 감소된 PDI 값은 균일한 입자 분포를 갖는 BSA-CA 복합체의 형성을 나타낸다.

(5) 섬기린초추출물-히드록시프로필 시클로덱스트린(HPBCD) 나노복합체 제조

가) 섬기린초추출물 HPBCD 나노복합체의 특성

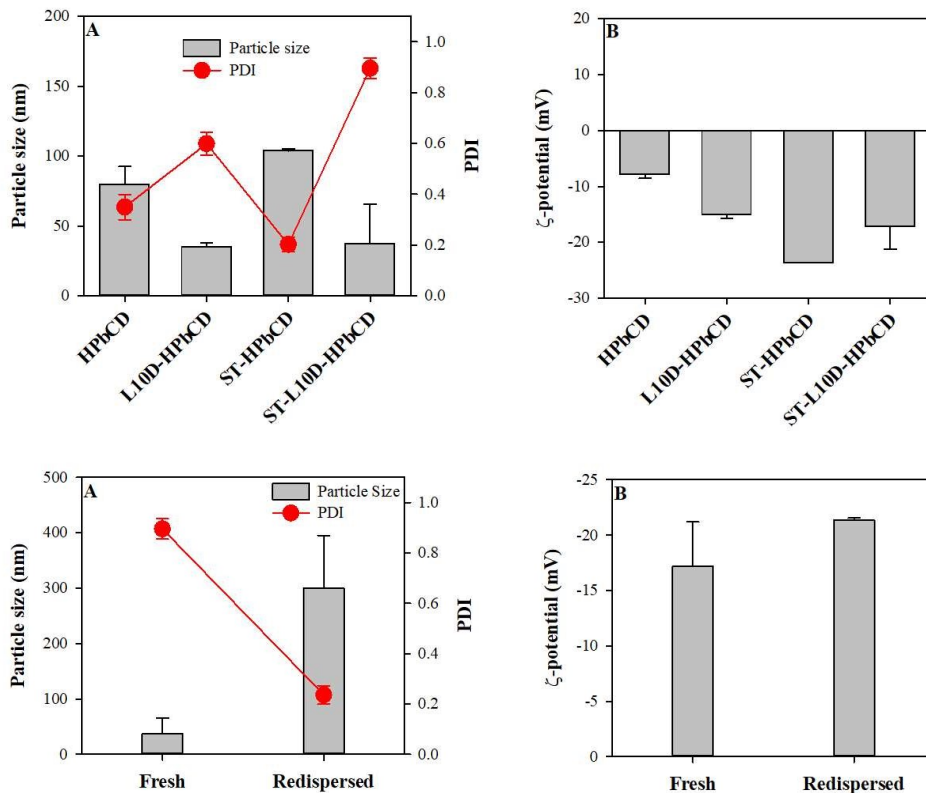


그림 173. 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체 입자크기 및 제타전위

단일 HPBCD의 크기는 70 nm 정도로 나타났으며, 유화제인 L10D가 HPBCD와 혼합물을 형성했을 때 사이즈가 40 nm까지 감소하였다. 섬기린초추출물과 HPBCD가 복합체를 형성한 경우, 70 nm였던 사이즈가 100 nm까지 증가하였다. L10D-HPBCD 혼합물이 섬기린초추출물과 복합체를

형성한 경우, 40 nm 였던 사이즈가 크게 증가하지 않았다.

제타전위는 모든 경우의 복합체가 음의 값으로 유지되었으며 섬기린초추출물이 존재할 때 큰 변화를 나타내지 않았다. 특히, 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체가 -20mV로 가장 안정한 수치를 나타냈다. 이는 섬기린초추출물이 나노복합체를 형성할 때 수용액 상에서 안정하게 존재할 수 있음을 나타낸다.

나노복합체를 동결건조한 후 물에 다시 용해 시켰을 때 입자의 크기는 증가했으나 PDI 값은 감소했다. 이는 나노복합체를 동결건조상태로 가공한 후 물에 다시 용해했을 때 균일한 입자를 형성하는 것을 나타내며 입자의 크기는 용해 과정에서 조건을 달리하여 추후 개선이 가능하다.

위의 분석결과를 바탕으로 주관기관과 협의한 결과, 섬기린초추출물-HPBCD-L10D 나노복합입자가 입자크기가 작고 안정성도 우수하지만, 대량생산공정에 적용이 가능하고, 상대적으로 안정성이 좀더 우수한 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합입자가 산업화에 적절하다 판단하였다. 또한, 코어소재 및 피복소재의 혼합비는 두 소재의 용해도 및 효능을 고려하여 1 : 1 로 결정하였다.

나) 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체의 pH 안정성

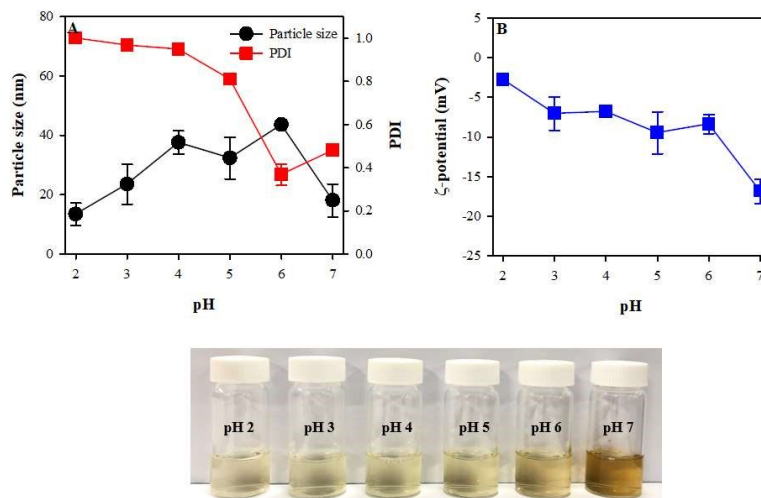


그림 174. pH 농도별 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체의 입자크기, 제타전위, 색변화

비식품분야에서 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체의 다양한 제품적용을 위하여 pH2-pH7까지 넓은 범위의 안정성을 평가하였다. pH의 변화에도 나노복합체의 크기는 평균 40 nm로 큰 변화를 나타내지 않았으며, pH의 감소에 따라 PDI 값은 0.2에서 1.0까지 증가하였다. 제타전위의 경우 pH가 감소함에 따라 -20 mV에서 -3 mV까지 증가하였다. 이는 표면의 전하가 산 이온에 의해 변화할 수 있음을 시사한다.

섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체에 대하여 pH 조정 후 12시간이 경과했을 때의 변화양상을 관측한 결과, 침전물은 관찰되지 않았으며 pH가 높아질수록 진한 녹색으로 변화하는 것을 확인하였다. 이는 적용가능한 제품의 pH가 약산성인 경우 제품의 변색에 영향이 적은 것을 간접적으로 시사한다.

다) 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체의 염안정성

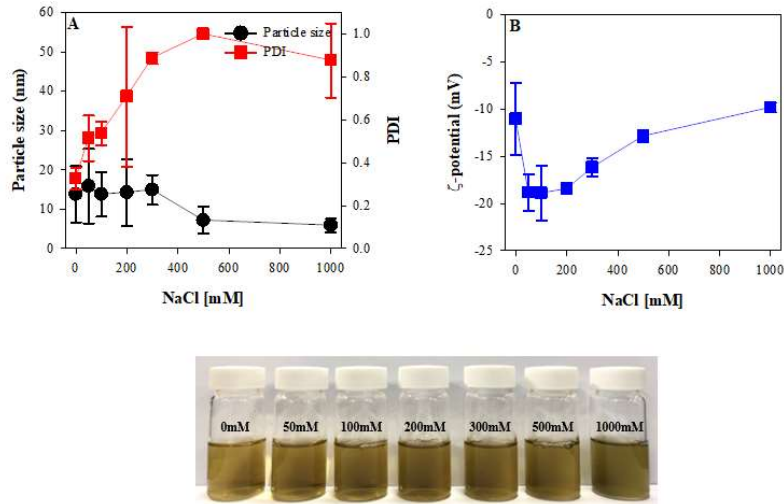


그림 175. 염 농도별 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체의 입자크기, 제타전위, 색변화

비식품분야에서 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체의 다양한 제품적용을 위하여 나노복합체 용액에 염(NaCl)을 농도별로 첨가함에 따라 나노복합체에 물리화학적 영향을 주는지 여부를 평가하였다. 그 결과, 염 농도가 증가함에 따라 PDI 값이 0.2에서 1.0까지 증가하였다. 이는 염의 농도가 증가함에 따라 균일하지 않은 입자의 형성을 나타낸다. 그러나 입자의 크기는 염 농도가 증가하여도 큰변화를 나타내지 않았으며, 이는 염의 다양한 농도에서도 나노복합체가 안정하게 존재할 수 있음을 시사한다. 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체에 대하여 농도별 염 처리 후 12시간이 경과했을 때 변화양상을 관측한 결과, 침전물은 관찰되지 않았으며 염 농도가 증가함에 따라 약간 진해진 녹색이 관측되었다. 이는 적용가능한 제품의 염 농도가 영향주는 정도는 작지만, 되도록 500mM 이하의 농도를 적용하는 경우 제품의 변색에 영향이 적은 것을 간접적으로 시사한다.

라) 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체의 효능평가

① 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체의 항산화 효능평가

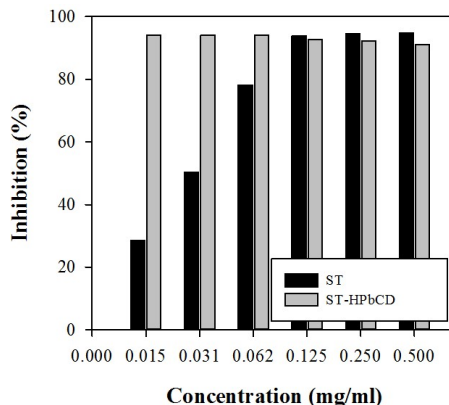


그림 176. 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체 항산화력 측정

섬기린초추출물 농도에 따른 섬기린초 코어소재 및 섬기린초 나노복합체의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. 그 결과, 섬기린초 코어소재의 경우 농도의 증가에 따라 라디칼 제거능이 점차적으

로 증가하였다. 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체의 경우, 적은 코어소재 농도에서도 높은 라디컬 소거능을 나타내었다. 이는 나노복합체의 라디컬 소거능 효율이 코어소재 대비 최대 3.3배까지 증가하였다는 것을 나타낸다.

② 섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체의 항균 효능평가

섬기린초 코어소재 및 섬기린초 나노복합체에 대하여 비식품산업의 제품생산공정에서 크게 문제가 되는 녹농균(*Pseudomonase aeruginosa*)에 대한 항균효능을 평가하였다. 본 평가는 주관기관에서 수행되었으며, 결과를 공유 받았다. 결과를 살펴보면, 섬기린초 코어소재 대비 섬기린초 나노복합체의 항균효능은 유사한 것으로 확인되었다.

③ 효능평가 결과

섬기린초추출물-HPBCD 나노복합체의 효능은 섬기린초 코어소재 대비 개선된 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 제품화된 나노복합체는 항산화 및 항균소재로서 활용이 가능함을 확인하였다.

(6) 마이크로 유체를 이용한 나노에멀전 제조

가) 안정화된 오브알부민-펙틴 나노 에멀전의 입자크기, PDI, 제타전위

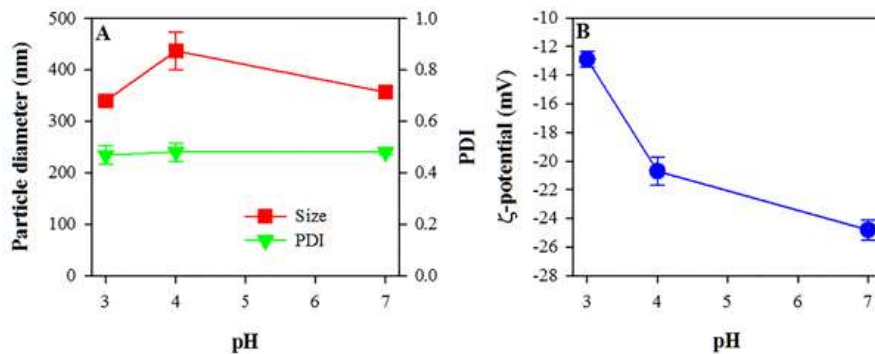


그림 177. 다른 pH 조건에서의 안정화된 OVA-PEC 나노에멀전의 크기, PDI 및 제타전위

안정화된 OVA-PEC 나노 에멀전은 pH 7.0에서 약 357 nm의 입자 크기를 나타내었고 pH 4.0에서 437 nm로 증가하였다. pH를 3.0으로 더 낮추었을 때 입자 크기 더욱 감소하였으며, PDI 값은 약 0.45로 유지되었다. 제타전위는 pH를 7.0에서 3.0으로 낮추었을 때 감소하였다. 이 결과는 나노 에멀전의 성질이 OVA와 PEC의 복합체 형성에 따라 달라질 수 있음을 나타낸다.

나) 안정화된 오브알부민-펙틴 나노 에멀전의 형상

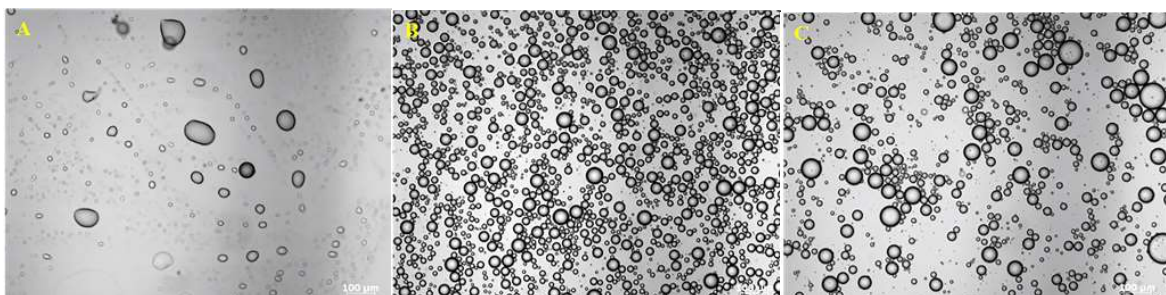


그림 178. pH 조건(A : pH 7.0, B : pH 4.0, C : pH 3.0)별 OVA-PEC 나노에멀전의 형상

안정화된 오브알부민-펙틴 나노 에멀전은 pH 4.0 및 3.0에서 작은 물방울 모양의 미세 구조를 나타냈으며, 이는 pH 4.0 및 3.0에서 복합체의 형성을 나타낸다.

IV. 위탁기관 (한양대학교)

1. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) 유용물질의 효능 분석법 확립

가) 유용물질의 항균효능 분석법 확립

4종 천연 식물추출물(로즈마리, 감초, 토복령, 섬기린초)의 항균효능 분석법을 확립하기 위하여 MIC(Minimum inhibitory concentration) 방법을 이용하였다. MIC 분석법은 항균 활성이 있는 물질의 최소저해농도를 구하는 방법이다. 실험 과정은 (1)배지 및 시험샘플 준비 → (2)시험균 접종 및 배양 → (3)MIC 판별의 순서로 진행된다. 배지는 시험균에 맞는 액상배지를 준비하며, 본 연구에서는 tryptic soy broth, potato dextrose broth 배지를 사용하였다. 시험샘플은 96 well plate 내에서 MIC 농도가 나올 수 있도록 시작 농도를 설정한다. Powder 형태의 4종 추출물을 MIC 분석법에 적합한 농도로 만들기 위해 ethanol을 용매로 하여 추출물 용액을 제조하였다. 로즈마리, 감초 시료는 100% ethanol을 용매로 사용했으며, 토복령, 섬기린초 시료는 40% ethanol을 용매로 사용하였다. 준비된 시험샘플은 액체배지희석법(broth microdilution method)을 이용하여 96-well plate 상에서 단계별로 희석한다.

시험균은 각 추출물의 항균 활성이 발현되는 균주로 설정했으며, 배양온도 및 시간은 각 시험균별 최적 배양 조건에 따라 적용하였다. 감초 추출물은 *B.subtilis*, 로즈마리 추출물은 *B.subtilis*, *A.niger*, 토복령 추출물은 *C.albicans*, 섬기린초 추출물은 *P.aeruginosa*를 대상으로 실험을 진행했으며, 각 균주의 배양조건은 다음과 같다. *B.subtilis*는 30°C에서 24시간, *A.niger*, *C.albicans*는 30°C에서 48시간, *P.aeruginosa*는 37°C에서 24시간 배양하였다. 각 시험균은 액상배지에서 배양한 뒤, densimat을 이용하여 McFarland value를 0.5로 맞춘 후, 액상 배지에 100배 희석해 접종하였다. 배양이 완료된 96 well plate는 microplate reader 기기를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양 전후의 흡광도 차이를 비교하여 흡광도가 증가하지 않은 최소 시료 농도를 MIC 값으로 산출했다.

나) 유용물질의 항산화 효능분석법 확립

본 연구에서는 4종 천연 식물추출물(로즈마리, 감초, 토복령, 섬기린초)의 항산화 효능분석법을 확립하기 위하여 DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) 라디칼 소거능 및 ORAC(oxygen radical absorbance capacity) 방법을 이용하였다. DPPH 라디칼 소거능 측정법은 DPPH radical이 항산화제로부터 수소를 얻어 DPPH로 변환될 때 보라색이 탈색되는 원리를 이용한 방법으로, 항산화제의 활성은 DPPH 라디칼이 소멸되는 비율로 산출될 수 있다. 각 시료의 항산화 활성을 평가하기 위하여 100% ethanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH용액 0.1 mL에 시료 0.1 mL을 첨가하여 혼합 후 암소에서 45분 동안 방치하고

microplate reader(varioskan flash, Thermo, CA USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능을 아래의 식으로 계산한 후 각 농도별 라디칼 소거능에 대한 검량선에서 라디칼 소거능이 50%가 되는 농도인 EC₅₀을 구하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging effect (\%)} = \frac{\{(C-CB)-(S-SB)\}}{(C-CB)} \times 100$$

S: sample, SB: sample blank, C: control, CB: control blank

ORAC 분석법은 radical chain reaction의 가장 핵심적인 단계인 수소 전자전달과 관련하여 항산화 물질의 free radical 소거 능력을 측정하는 방법이다. 이 분석법은 식품 내에 존재하는 친수성 성분과 친유성 성분 모두에 반응하기 때문에 응용 범위가 넓다는 장점을 가지며, 반응 감도가 예민하여 정확도를 높일 수 있는 방법이기도 하다. 실험방법은 Black 96-well plate에 시료를 25 uL씩 넣고, 75 mM phosphate buffer(pH 7.5)에 녹인 8 nM fluorescein 150 uL을 첨가한 뒤, 37°C에서 15분 간 incubation 시킨다. 이 후, 흡광도 측정 직전에 과산화 라디칼의 생성을 위해 80 mg/mL AAPH (2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride)를 첨가한다. Microplate reader를 이용하여 485nm에서 전자여기 후 535nm에서 방출되는 조건으로 37°C에서 60분간 30초 마다 fluorescence의 감소율을 측정한다. 결과값은 시료 첨가구와 무 첨가구의 area under curve(AUC)값을 나타낸 후 trolox를 이용하여 작성한 검량선에 대입하여 나타내었다.

(2) 유용물질 혼합에 따른 활성증진조건 탐색

가) 유용물질 혼합에 따른 항균 활성

유용물질의 병합효과를 관찰하기 위하여 혼합물질의 항균활성 분석은 checkerboard 방법을 이용하였으며, 혼합물의 병합효과는 FIC(Fractional Inhibitory Concentration) index를 이용하여 아래와 같이 판단하였다.

FIC<0.5: synergy, 0.5≤FIC≤1: addition, 1<FIC≤4: indifference, 4<FIC: antagonism

항균효능의 병합효과를 보기위한 혼합균은, 타겟 균주가 *B.subtilis*로 같은 감초, 로즈마리 추출물에 한하여 실험을 진행하였다. Checkerboard 분석법은 두 항균물질의 조합에 따른 분할 저해 농도 지수를 통해 두 물질의 관계를 나타내며, 분석 시에는 96-well plate의 열과 행에 각각 감초, 로즈마리 추출물을 2배씩 단계별로 희석하여 넣는다. 이 때, 첫 well의 시료 농도는 MIC 농도의 2배 이상이 되도록 설정한다. 이 후, *B.subtilis*를 포함한 액체배지를 100 uL씩 분주하여 24시간 배양 후 흡광도가 증가하지 않은 곳에서 FIC index 값을 산출하였다.

나) 원물 및 코어소재 항균력 규격화

본 연구에서는 항산화 활성을 갖는 추출물 4종을 혼합하여 항산화 상승작용이 우수한 혼합균을 도출하고 항산화 상승작용이 가장 극대화되는 최적의 혼합 비율을 찾고자 하였

다. 4종 추출물을 각각 혼합한 6종의 혼합균 시료를 제조했으며, 혼합균의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능으로 측정하였다. 각 시료의 혼합 비율은 개별적 항산화 활성의 비율이 1:1이 되도록 농도를 조정하여 결정하였다. 단일 물질의 EC₅₀으로부터 계산한 혼합물질의 EC₅₀ 예측값과 실제로 추출물을 혼합하여 측정한 실측값을 비교하여 EC₅₀이 5% 이상 감소할 경우 synergy effect가 있다고 판단하였다. 또한, EC₅₀이 5% 이상 증가할 경우 antagonism, 5% 이내의 차이를 보일 경우 additive effect로 판단하였다.

(3) 나노 제형화에 따른 항균/항산화 효능 평가법 표준화

가) 나노소재의 항균 효능 평가법 표준화

① MIC test

MIC(Minimum inhibitory concentration)는 항균 활성이 있는 물질의 최소저해농도를 구하는 실험이다. 액체배지희석법(broth microdilution method)을 이용하여 96-well plate에 액체배지를 100 uL씩 분주하고, 시료 stock을 100 uL씩 첨가하여 단계별로 희석한다. 이후, 균을 포함한 배지를 100 uL씩 분주하여 30°C에서 24h 배양한 뒤, 흡광도가 증가하지 않는 최소 시료 농도를 MIC 값으로 한다. 이 때, 배양 온도 및 시간은 타겟 균주에 따라 다르게 적용한다.

② Checkerboard 방법

Checkerboard 방법은 여러 항균물질들의 조합에 따른 분할 저해 농도 지수를 산출함으로써 항균력 상승효과 여부를 판단하는 실험이다. 96-well plate의 각 열과 행에 2가지 시료를 단계별로 희석하여 50 uL씩 분주한 뒤, 균을 포함한 배지를 100 uL씩 분주하여 배양한다. 배양 후 흡광도가 증가하지 않은 곳에서 FIC index를 계산한다. FIC index 계산식 및 시너지 효과 판단기준은 다음과 같다.

$$FIC = (MIC_A \text{ combination} / MIC_A \text{ alone}) + (MIC_B \text{ combination} / MIC_B \text{ alone})$$

FIC<0.5: synergy, 0.5≤FIC≤1: addition, 1<FIC≤4: indifference, 4<FIC: antagonism

③ Time kill assay

Time kill assay는 항균물질의 시간대별 항균력을 평가하는 실험이다. 액체배지에 항균물질 분주 후 균을 접종하여 배양시키면서 일정 시간 별로 시료를 채취 및 희석하고, agar plate에 도말 및 배양하여 생성된 균의 집락 수를 counting함으로써 항균물질의 균 생육 억제능을 확인한다.

나) 나노소재의 항산화 효능 평가법 표준화

① *In vivo* 항산화능 평가법(DPPH, ORAC)

나노소재 항산화 효능 평가법을 표준화하기 위하여 나노소재화된 레스베라트롤과 나노소재화되지 않은 유리 레스베라트롤의 항산화활성을 *in vitro*와 세포를 이용한 실험을 이용하여 분석하였다.

- DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼은 항산화능이 있는 물질로부터 수소를 얻어 DPPH로 변환되므로, 항산화제의 활성은 DPPH 라디칼이 소멸되는 비율로 산출될 수 있다. 나노소재의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하기 위해 96 well plate에 시료를 0.1 mL씩 넣은 후, 에탄올에 녹인 0.2 mM DPPH를 0.1 mL씩 각 well에 첨가하였다. 시료를 실온에서 차광하여 45 분간 반응시킨 이후 microplate reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능에 대한 계산식은 다음과 같다.

$$\text{DPPH radical scavenging effect (\%)} = \frac{\{(C-CB)-(S-SB)\}}{(C-CB)} \times 100$$

S: sample, SB: sample blank, C: control, CB: control blank

- ORAC

ORAC assay는 활성산소를 흡수하는 능력을 측정하는 실험으로, 과산화 라디칼을 생성하는 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH)를 시료에 첨가하여 과산화 라디칼의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율을 측정하는 방법이다. 항산화제를 첨가했을 때 항산화제의 농도에 비례하여 free radical 손상이 억제되므로, fluorescent의 색 감소가 억제된다. 나노소재의 항산화능을 측정하기 위해 96 well black microplate에 시료를 25 μ L씩 넣은 후, phosphate buffer에 녹인 8 nM fluorescein 150 μ L을 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 15분 간 반응을 시킨 후, 80 mg/mL AAPH 25 μ L를 각 well에 첨가하였다. 이후, 37 $^{\circ}$ C에서 microplate reader를 kinetic mode로 설정 후 1시간동안 형광의 감소율을 측정하였다. Area under curve(AUC)를 구하는 수식은 다음과 같다.

$$\text{Area under curve(AUC)}=1+\text{RFU}_1/\text{RFU}_0+\text{RFU}_2/\text{RFU}_0+\dots+\text{RFU}_{59}/\text{RFU}_0+\text{RFU}_{60}/\text{RFU}_0$$

RFUx : Relative fluorescence value of time points

② *Ex vivo* 항산화능 평가법(Cellular antioxidant activity; CAA)

CAA(cellular antioxidant activity) assay는 세포 항산화 활성을 측정하는 실험으로, HepG2 cell (human hepatocellular carcinoma cell)을 배양한 후 나노소재를 처리한다. 배양한 세포를 DCFH-DA(Folin - Ciocalteu reagent)를 이용해 형광발색을 시킨 후 ABAP (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) 함유 HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)로 세척한다. 세포배양액의 형광분석(emission: 528 nm, excitation: 485 nm)을 통해 시료의 항산화 활성을 분석한다.

(4) 나노소재의 입자크기에 따른 항균/항산화 활성 분석

가) 입자크기별 나노소재 제조 및 입자특성 분석

Chitosan과 γ -poly glutamic acid의 이온결합(ionic gelation)을 이용하여 로즈마리 추출물을 함유하는 나노입자를 제조하였다. 나노소재는 입자특성에 영향을 받음으로 이에 대한 평가를 확립할 수 있는 입자크기에 따른 기준 나노소재를 제조하였다. γ -Poly glutamic acid 농도를 고정하고, 포집되는 로즈마리 소재의 농도를 최종 나노분산액에서 1 mg/mL로 조정하고, chitosan 농도를 조절하면서 형성된 나노입자의 크기를 측정하였다.

나노 캡슐의 입자크기(particle size)를 비롯하여 입자의 분산도(polydispersity index, PDI) 및 제타전위(zeta potential) 등의 물리화학적 특성은 분산액 상태 나노입자를 Malvern Zetasizer Nano ZS 를 이용한 광산란(dynamic light scattering)분석을 통해 측정하였다.

나) 입자크기별 나노소재의 항균 활성 분석

나노소재의 입자크기가 항균 활성에 미치는 영향을 파악하기 위해 일차적으로 MIC 방법으로 입자크기별(200, 400, 600 nm) 로즈마리 추출물 함유 나노입자의 항균 활성을 분석하였다.

다) 입자크기별 나노소재의 항산화 활성 분석

나노소재의 입자크기가 항산화 활성에 미치는 영향을 파악하기 위해 입자크기별(200, 400, 600 nm) 로즈마리 추출물 함유 나노입자의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다.

(5) 나노소재의 피복소재에 따른 항균/항산화 활성 분석

가) 나노소재의 피복소재별 항균 활성 분석

나노소재의 피복소재별 항균 활성을 분석하기 위해 MIC 방법을 사용하였다. 본 실험서 사용한 항산화 물질은 로즈마리 추출물과 glabridin(감초 추출물 유효성분)이며, 타겟 균주는 *B.subtilis*로 하였다. 로즈마리 추출물은 cycloamylose 기반 나노복합체와 chitosan/ γ -Poly glutamic acid 기반 나노입자의 활성을 비교했으며, glabridin은 zein 단백질 기반 나노복합체와 chitosan/ γ -poly glutamic acid 기반 나노입자의 활성을 비교하였다.

나) 나노소재의 피복소재별 항산화 활성 분석

나노소재의 피복소재가 항산화 활성에 미치는 영향을 파악하기 위해 ABTS 방법으로 항산화 활성을 분석하였다. ABTS 방법은 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)의 양이온 라디칼을 소거하는 항산화제의 능력을 평가하는 것이다. ABTS+은 potassium persulfate와 ABTS의 산화에 의해 생성되며 734 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

나. 연구 결과

(1) 유용물질의 효능 분석법 확립

가) 유용물질의 항균효능 분석법 확립

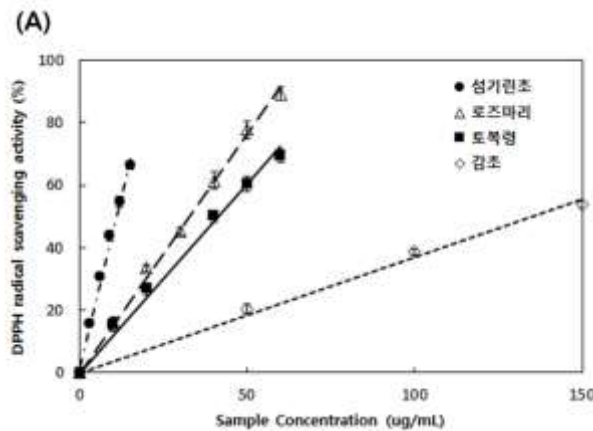
감초 추출물은 *B.subtilis*의 성장을 3 ug/mL 농도에서 억제했으며, 로즈마리 추출물은 *B.subtilis*를 8 ug/mL, *A.niger*를 1,000 ug/mL 농도에서 억제하였다. 또한, 토복령 추출물은 *C.albicans*를 1,000 ug/mL 농도에서, 섬기린초 추출물은 *P.aeruginosa*를 250 ug/mL 농도에서 억제함을 확인하였다(표 74). 4종 추출물 중 로즈마리 추출물은 그람 양성균 및 곰팡이의 성장을 억제하여 비교적 넓은 항균 스펙트럼을 보였다. 각자의 타겟 균주가 다르기 때문에 절대비교는 불가능하지만, 감초 추출물이 가장 낮은 농도인 3 ug/mL에서 *B.subtilis* 성장 억제 효과를 나타냈다.

표 74. 천연 식물추출물 4종의 항균 활성

추출물	MIC(ug/mL)			
	<i>B.subtilis</i>	<i>A.niger</i>	<i>C.albicans</i>	<i>P.aeruginosa</i>
감초	3			
로즈마리	8	1,000		
토복령			1,000	
섬기린초				250

나) 유용물질의 항산화 효능분석법 확립

4종 천연 식물 추출물(로즈마리, 감초, 토복령, 섬기린초)의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능과 ORAC 측정을 통하여 분석하였다. DPPH 라디칼 소거능은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 50%의 라디칼 소거활성을 나타내는 시료의 양(EC₅₀)으로 나타내었다. ORAC value는 trolox로 표준곡선을 작성하여 농축액 1 g당 trolox equivalent($\mu\text{mol trolox/g}$)으로 표현했다 (그림 179 및 180).



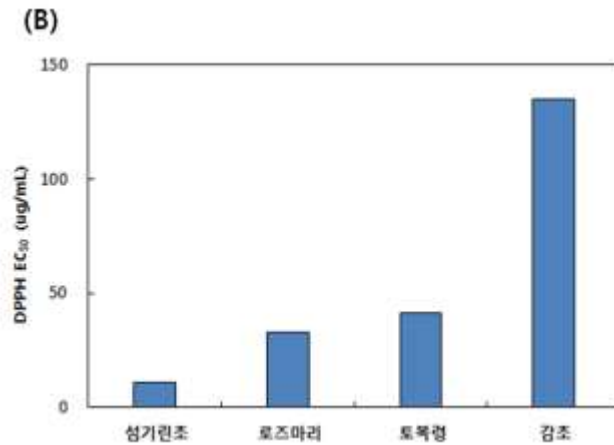


그림 179. 추출물 4종의 DPPH 라디컬 소거능 표준곡선(A)과 DPPH EC₅₀ (B)

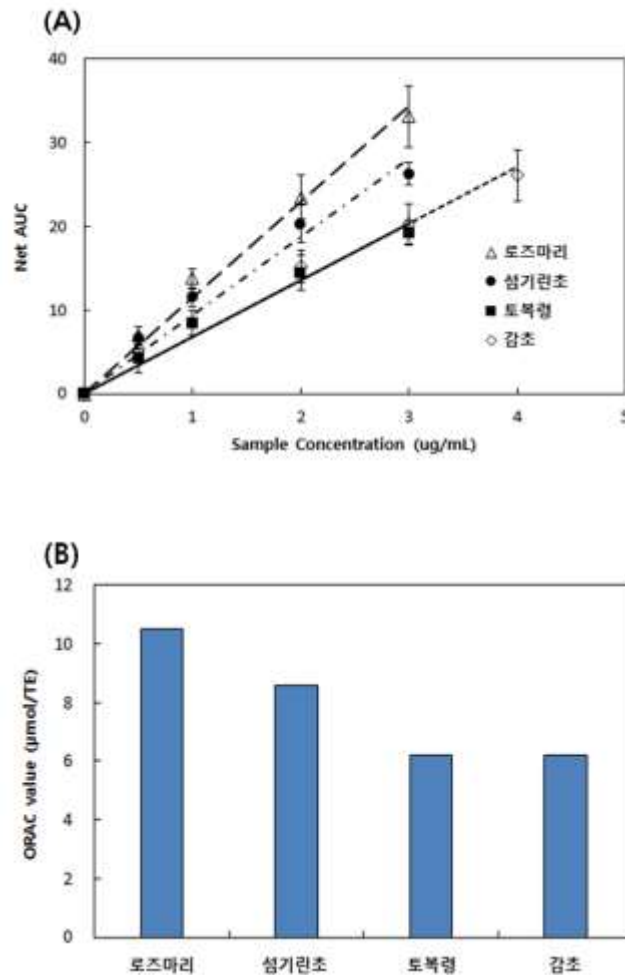


그림 180. 추출물 4종의 ORAC 표준곡선(A)과 ORAC value(B)

DPPH와 ORAC 방법에 의한 항산화활성 측정결과, 4종의 모든 추출물에서 농도의존적인 항산화활성이 관측되었다. DPPH 라디컬 소거능 활성에서는 썬기린초>로즈마리>토복령>감초 순으로 높은 활성을 나타냈다. ORAC value에서는 로즈마리>썬기린초>토복령>

감초 순으로 높은 활성을 나타냈다. 두 가지 분석방법에서 가장 높은 활성을 나타내는 시료가 다소 다르게 나왔지만, 두 가지 방법에서 모두 섬기린초, 로즈마리의 활성이 비교적 높고, 토복령, 감초의 활성이 비교적 낮게 측정되어 전반적으로 비슷한 경향을 가지고 있음을 알 수 있었다.

(2) 유용물질 혼합에 따른 활성증진조건 탐색

가) 유용물질 혼합에 따른 항균 활성

감초, 로즈마리 추출물의 혼합 항균 활성을 평가한 결과, FIC index 값은 1로 두 물질의 혼합효과는 additive effect로 확인되었다 (표 75). 따라서 로즈마리와 감초는 서로 혼합되면서 길항작용은 나타내지 않으나 상승작용 또한 나타나지 않는 것으로 판단된다.

표 75. 로즈마리, 감초 추출물의 혼합 항균 활성

타겟 균주	A	B	FIC index	
<i>B.subtilis</i>	로즈마리	감초	1	Additive effect

나) 원물 및 코어소재 항균력 규격화

천연 식물추출물 혼합균의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과(표 76), 총 6개의 혼합균 중 감초+토복령, 감초+섬기린초의 2개 혼합균에서 상승작용을 나타냈다. 2가지 혼합균을 제외한 나머지 4종의 혼합균에서는 모두 additive effect로 판단되어 혼합에 의해 항산화 활성이 오히려 감소되는 길항작용을 나타내는 혼합균은 없음을 확인하였다.

표 76. 천연 식물추출물 혼합균의 DPPH 라디칼 소거능 및 상승효과

Combinations	Expected EC ₅₀	Observed EC ₅₀	Effect
로즈마리 + 감초	83.91	85.14	Additive
로즈마리 + 토복령	37.09	36.81	Additive
로즈마리 + 섬기린초	21.80	20.93	Additive
감초 + 토복령	88.24	79.87	Synergistic
감초 + 섬기린초	72.95	64.09	Synergistic
토복령 + 섬기린초	26.13	25.83	Additive

각 복합균 별로 항산화 시너지 활성이 가장 우수한 혼합비율을 결정하기 위하여, 각 혼합비율에 따른 항산화 활성을 측정하였다. 복합균의 혼합비율은 활성을 기준으로 결정되었으며, 각 항산화 활성의 비율이 10:90, 30:70, 50:50, 70:50, 90:10이 되도록 각 시료의 농도를 조절하여 시료를 제조한 후 DPPH 라디칼 소거능 활성을 측정하였다. 또한, 각 활성의 상승효과는 시료 혼합에 의해 산출된 계산값과 실측값의 차이로 결정하였다(그림 181). 측정 결과, 감초+토복령, 감초+섬기린초의 2종 혼합균에서 모두 50:50 비율의 상승효과가 가장 높았다 .

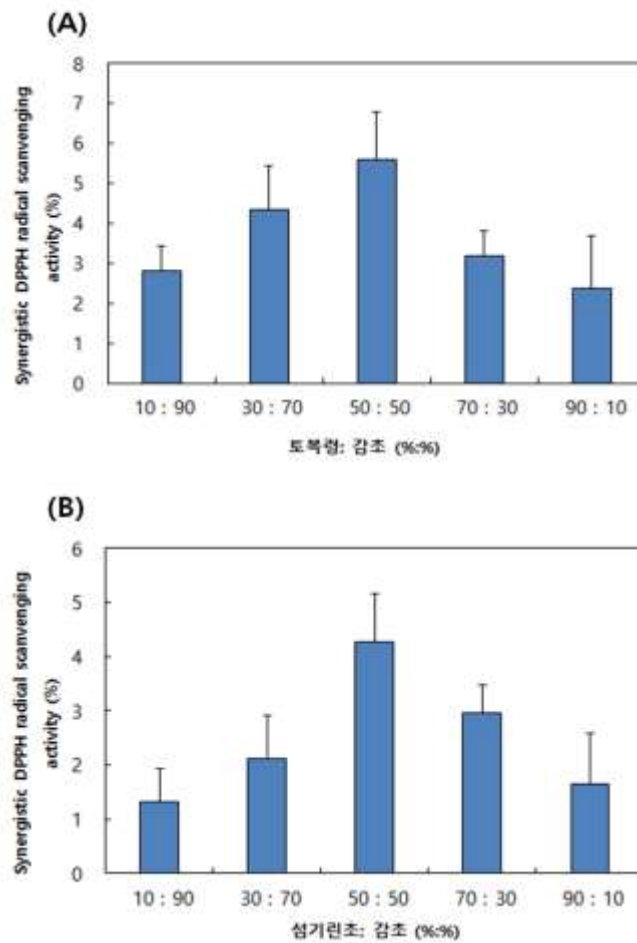


그림 181. 추출물 혼합비율별 항산화 시너지 활성 분석 (토복령+감초(A), 섬기린초+감초(B))

(3) 나노 제형화에 따른 항균/항산화 효능 평가법 표준화

가) 나노소재의 항균 효능 평가법 표준화

① MIC test

나노제형화 이전과 이후의 유용성분의 MIC 농도를 비교한 결과, 유용성분의 종류에 따라 나노제형화 이후 MIC 농도가 동일하거나 더 낮았다. 또한 유용성분이 포함되지 않은 blank 나노제형만의 항균실험결과 항균활성을 나타내지 않음을 확인하였다 (표 77). 이러한 모든 결과를 종합했을 때, 나노화한 항균물질의 항균력이 유지 혹은 상승되었음을 확인하였다.

표 77. 나노제형화가 천연물 5종의 MIC에 미치는 영향(*S.mutans*, *S.sobrinus*)

Antimicrobials	<i>S. mutans</i>		<i>S.sobrinus</i>	
	Free	NPs	Free	NPs
Grapefruit seed extract	0.13	0.06	0.03	0.03
Clove oil	1	1	0.13	0.13
Thyme oil	1	1	1	1
Cinnamon oil	2	2	1	1
Black pepper oil	2	2	1	1

② Checkerboard 방법

나노제형화 이전과 이후의 유용성분들의 혼합에 따른 FIC index 값을 비교한 결과(표 78), 나노제형화에 따른 큰 차이는 보이지 않았다. 나노제형화 전후의 FIC index 값의 차이는 0.01~0.17 범위에서 나타났으며, 같은 조합이어도 타겟 균주에 따라 다른 결과가 나올 수 있음을 확인하였다.

표 78. 나노제형화가 유용성분들의 FIC index에 미치는 영향(*S.mutans*, *S.sobrinus*)

Combinations	<i>S. mutans</i>		<i>S. sobrinus</i>	
	Free	NPs	Free	NPs
Grapefruit seed extract +				
Clove oil	0.69±0.09	0.52±0.13	0.61±0.09	0.63±0.10
Thyme oil	0.75±0.00	0.88±0.14	0.77±0.18	0.76±0.23
Cinnamon oil	0.64±0.08	0.61±0.11	0.60±0.08	0.69±0.13
Black pepper oil	0.69±0.21	0.71±0.25	0.79±0.19	0.77±0.22

③ Time kill assay

Clove oil과 thymol oil의 혼합물의 나노소재화됨에 따른 항균특성변화를 관측하기 위하여 항균물질이 포함되지 않은 Control, 나노소재화되지 않은 항균혼합물(free), 나노소재화한 항균혼합물을 각각 비교한 결과(Fig. 4), 나노소재화한 항균혼합물의 활성이 가장 좋음을 확인하였다. 항균물질을 포함하지 않는 blank 나노제형은 MIC의 결과와 마찬가지로 time kill assay에서도 항균활성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다(data not shown). 항균물질의 농도가 같음에도 불구하고 나노소재의 생육 억제능이 뛰어나게 나온 것은 나노입자가 내부에 포집한 항균물질을 보호하여 보다 뛰어난 항균 활성이 발현되었다고 판단된다. 시간대별 결과를 살펴보면, 3시간까지는 나노제형화에 상관없이 비슷한 수준의 균수가 관측되었으나, 6시간 이후부터 나노입자가 나노입자화되지 않은 항균혼합물에 비해 뛰어난 활성을 보인다. 이렇게 Time kill assay를 통해서도 MIC 실험에서 감지되지 않는 시간변화에 따른 항균활성을 관측할 수 있으므로 나노제형화에 의한 항균활성의 차이를 보다 명확하게 확인할 수 있을 것으로 판단된다.

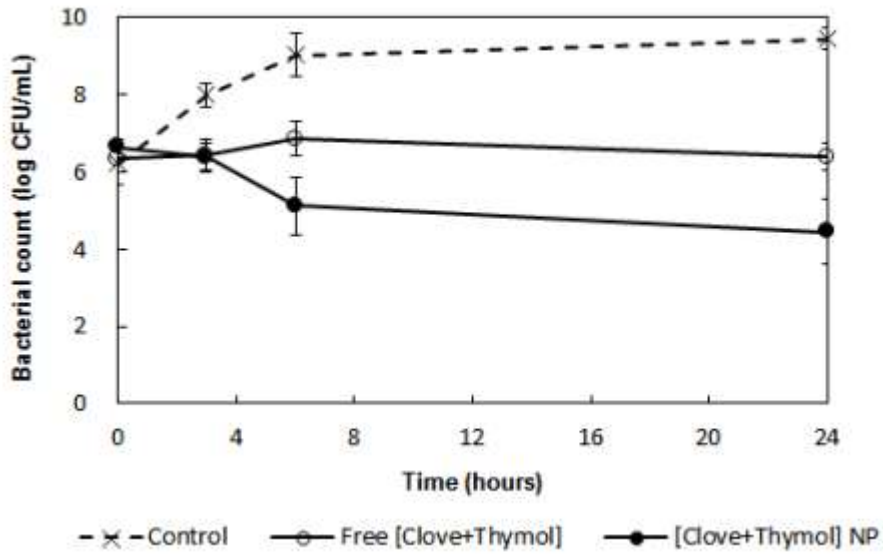


그림 182. 나노제형화에 따른 시간대별 항균 활성(Time kill assay)

나) 나노소재의 항산화 효능 평가법 표준화

① *In vivo* 항산화능 평가법(DPPH, ORAC)

- DPPH 방법: 나노화 하지 않은 Free 레스베라트롤과 레스베라트롤 나노입자의 DPPH 라디칼 소거능을 평가한 결과, Free와 나노입자의 DPPH 라디칼 소거능에 유의적 차이가 없었다 (그림 183). 이 결과를 통해 본 실험에서는 나노캡슐화 과정을 거친 후에도 내부에 포집된 유용성분의 항산화능이 유지됨을 확인하였다. 또한, 나노소재의 입자크기(200, 400, 600nm)에 따른 항산화능의 유의적 차이가 없음을 확인하였다. 그러나 나노제형화에 따른 항산화활성은 나노제형화에 사용된 피복물질과 제조조건, 나노제형화된 항산화물질의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있다.

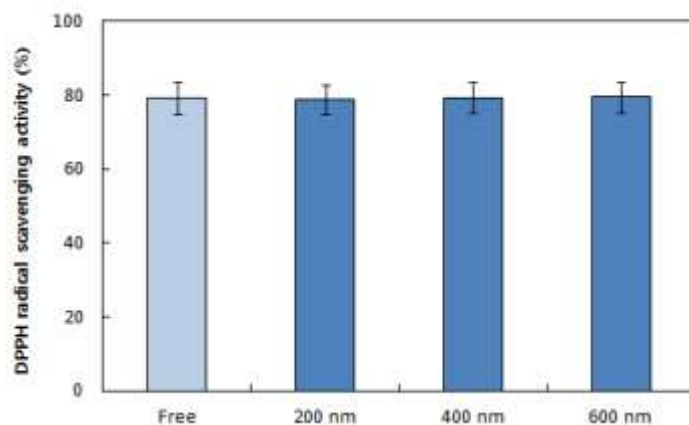


그림 183. 나노입자크기별 레스베라트롤 함유 나노소재의 DPPH 라디칼 소거능

- ORAC 방법: 나노화 하지 않은 Free 레스베라트롤과 레스베라트롤 함유 나노입자의 ORAC value를 비교한 결과, Free와 나노입자의 ORAC 항산화 활성에 유의적 차이가 없었다(그림 184). 이 결과를 통해 나노캡슐화 과정을 거친 후에도 나노캡슐 내부에 포집된

유효성분의 항산화능이 유지됨을 확인하였다. 또한, 나노소재의 입자크기(200, 400, 600nm)에 따른 항산화능의 유의적 차이가 없음을 확인하였다. 나노제형화에 따른 ORAC 항산화활성은 나노제형화에 사용된 피복물질과 제조조건, 나노제형화된 항산화물질의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있다.

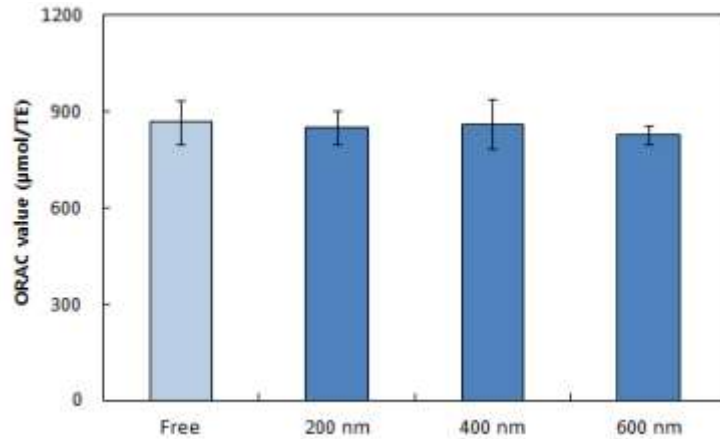


그림 184. 레스베라트롤 함유 나노입자 크기별 나노소재의 ORAC 수치

② *Ex vivo* 항산화능 평가법(Cellular antioxidant activity; CAA)

나노화 하지 않은 Free 레스베라트롤과 레스베라트롤 함유 나노입자의 세포 항산화 활성을 비교한 결과, Free와 나노입자의 CAA 활성에 유의적 차이가 없었다 (그림 185). 이 결과를 통해 나노캡슐화 과정을 거친 후에도 Core 물질의 항산화능이 유지됨을 확인하였다. 또한, 나노소재의 입자크기(200, 400, 600nm)에 따른 항산화능의 유의적 차이가 없음을 확인하였다.

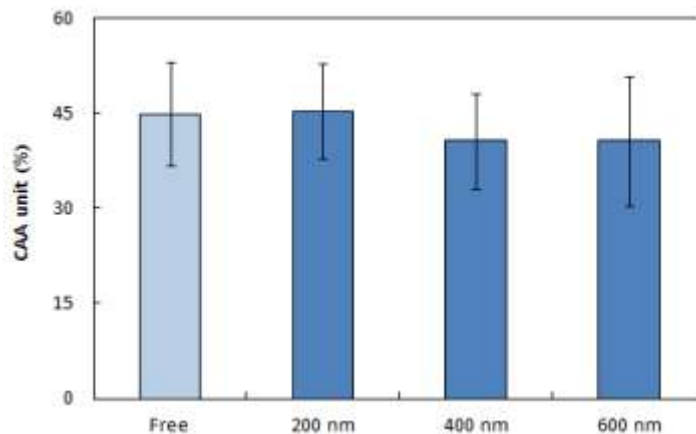


그림 185. 나노입자 크기별 나노소재의 CAA unit

이상과 같이 나노소재 표준화 실험에 사용된 유효성분의 경우 나노소재화됨에 따라 입자크기의 변화에 따라 항산화활성이 변화되지 않음을 확인하였다. 그러나 이러한 나노제형화에 따른 항산화활성은 나노제형화에 사용된 피복물질과 제조조건, 나노제형화된 항산화물질의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있다.

다) 나노제형화에 따른 항균/항산화 효능 평가시의 유의점

다양한 나노소재의 항균활성을 MIC, checkerboard, time kill assay를 통해서 관측하였고 항산화활성은 DPPH 라디칼 소거능과 ORAC 수치, CAA를 통해서 분석하였다. 나노소재의 항균/항산화 효능을 보다 효과적으로 분석하기 위해서는 나노소재화된 유용성분의 활성뿐만 아니라 나노소재화 되기 이전의 유용성분 자체의 활성과의 비교가 요구된다. 또한 유용성분이 포함되지 않은 blank 나노소재만의 효능을 분석 또한 반드시 선행되어야 한다.

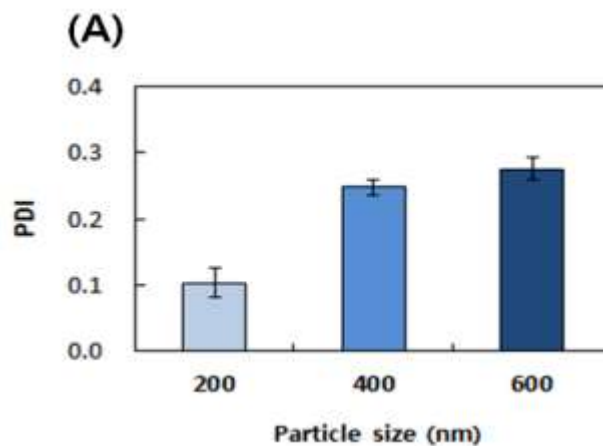
나노소재화된 유용성분과 나노소재화 되기 이전의 유용성분 자체의 활성과의 비교를 통해서 유용성분이 나노화됨에 따라서 변화되는 효능과 나노소재화 방법이 유용성분에 미치는 영향을 일차적으로 관측할 수 있다. 그러나 보다 명확한 나노소재화의 효능평가를 위해서는 유용성분이 포집되지 않은 blank 나노소재만의 효능평가가 요구된다. 이 분석을 통해서 나노소재화 전과 달라진 나노소재의 효능이 유용성분이 나노화됨에 따라 발현되는 것인지 혹은 피복물질이 나타내는 활성에 의해 단순 발현되는 것인지를 분석할 수 있다.

(4) 나노소재의 입자크기에 따른 항균/항산화 활성 분석

가) 입자크기별 나노소재 제조 및 입자특성 분석

최종 나노분산액에서의 기준으로 chitosan 농도가 0.1, 1.2, 1.8 mg/mL일 때 각각 200, 400, 600 nm의 입자가 형성되었다.

나노소재의 입자크기가 항균/항산화 효능에 미치는 영향을 파악하기 위해 chitosan/ γ -poly glutamic acid 나노 입자를 제조하여 물리학적 특성을 분석하였다(그림 186). 입자특성 분석 결과, chitosan 0.1-1.8 mg/mL 농도와 γ -Poly glutamic acid 0.05 mg/mL 농도에서 227.7-605.0 nm 범위의 나노입자가 형성되었으며, 입자의 균일한 형성 정도를 나타내주는 PDI 수치가 모두 0.3 이하의 값을 보여 균일한 나노입자 형성이 되었음을 확인하였다. zeta potential 수치는 23.4~51.2 mV 범위의 값을 보여 양전하를 띤 chitosan에 의해 형성된 나노입자가 모두 비교적 높은 양전하 값을 보였다. 또한, PDI, zeta potential 값은 로즈마리 나노소재의 입자크기가 클수록 증가하는 경향을 나타냈다.



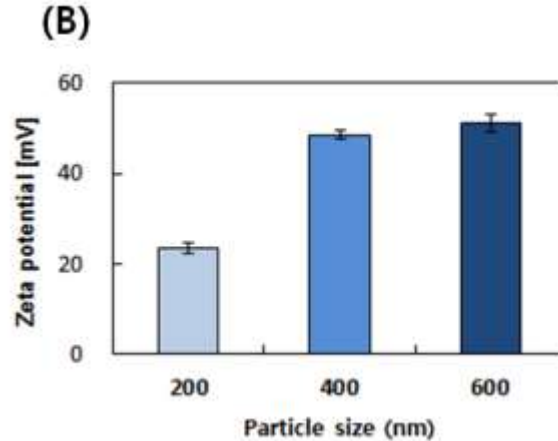


그림 186. 로즈마리 나노소재의 입자크기별 입자특성(PDI (A), zeta potential (B))

나) 입자크기별 나노소재의 항균 활성 분석

실험 결과, Free와 200 nm 나노입자는 8 ug/mL, 400 nm, 600 nm 나노입자는 4 ug/mL의 활성을 보였다 (표 79). 이는 입자크기가 클수록 chitosan의 농도가 높아져 chitosan 자체의 항균 활성이 발현됐을 가능성이 있기 때문에, 로즈마리를 포집시키지 않은 blank 나노입자를 제조해 MIC 활성을 측정하였으나, MIC 방법에서는 피복물질의 간섭효과가 탐지되지 않았다. 이러한 결과는 chitosan이 항균물질이기 하지만 본 실험에서 나노제조에 사용된 농도(0.1~1.8 mg/mL)가 낮기 때문에 항균효과가 나타나지 않은 것으로 판단된다.

표 79. 로즈마리 나노소재의 입자크기에 따른 MIC (ug/mL)

	Free	나노입자크기 (nm)		
		200	400	600
로즈마리 추출물	8	8	4	4

다) 입자크기별 나노소재의 항산화 활성 분석

DPPH 항산화 활성을 ascorbid acid equivalent 값으로 환산하여 계산한 결과, 200, 400, 600 nm 입자의 유의적인 활성 차이는 나타나지 않았다 (그림 187). 또한, 대조군으로 사용된 동일한 농도의 로즈마리 추출물(Free)과 나노소재의 항산화 활성 차이 역시 나타나지 않았다. 이는 나노소재의 피복물질 및 제조조건이 항산화 활성을 측정할 때 간섭효과가 나타나지 않는다고 볼 수 있으며, 분산액 상태에서 chitosan, γ -poly glutamic acid 기반 나노소재의 항산화 활성이 효과적으로 측정될 수 있음을 의미한다.

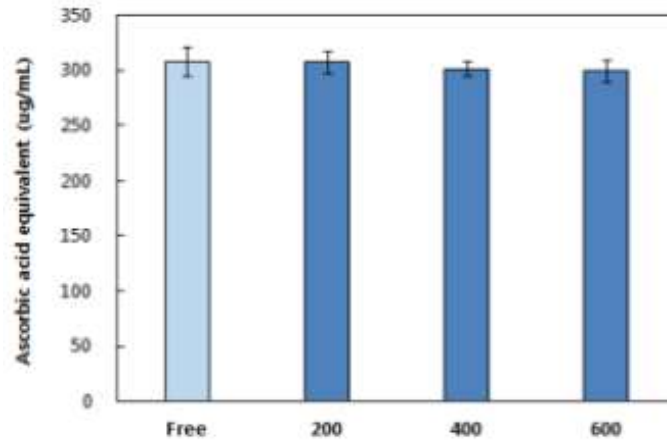


그림 187. 로즈마리 나노소재의 입자크기에 따른 DPPH 항산화 활성

(5) 나노소재의 피복소재에 따른 항균/항산화 활성 분석

가) 나노소재의 피복소재별 항균 활성 분석

로즈마리 추출물의 경우, free, nanocomplex, nanoparticle의 MIC가 8 ug/mL로 모두 같았다. 이는 로즈마리 나노소재에 사용된 피복소재가 core 물질의 항균력 발현에 영향을 미치지 않음을 의미한다. 반면에, glabridin의 경우, free와 nanoparticle의 MIC는 4 ug/mL, nanocomplex의 MIC는 8 ug/mL로 측정되어 nanocomplex의 항균 활성이 비교적 낮게 측정되었다 (표 80).

표 80. 로즈마리, glabridin 나노소재의 피복소재별 항균 활성

Core	MIC (ug/mL)		
	Free	Nanocomplex	Nanoparticle
로즈마리	8	8	8
Glabridin	4	8	4

나) 나노소재의 피복소재별 항산화 활성 분석

항산화 활성 분석 역시 로즈마리 추출물은 cycloamylose 기반 나노복합체와 chitosan/γ-poly glutamic acid 기반 나노입자의 활성을 비교했으며, Glabridin은 zein 단백질 기반 나노복합체와 chitosan/γ-Poly glutamic acid 기반 나노입자의 활성을 비교하였다. ABTS 분석 결과, 로즈마리와 Glabridin의 경향이 비슷하게 확인되었다. 두 가지 경우에서 모두 free와 nanoparticle의 활성은 유의적 차이가 없었으며, nanocomplex는 그에 비해 활성이 낮게 측정되었다(그림 188). 이는 nanocomplex 제조에 사용된 피복소재 자체의 영향일 가능성도 있으며, nanoparticle과 nanocomplex의 제조방법 차이에서 비롯된 결과일 가능성도 있다고 판단된다.

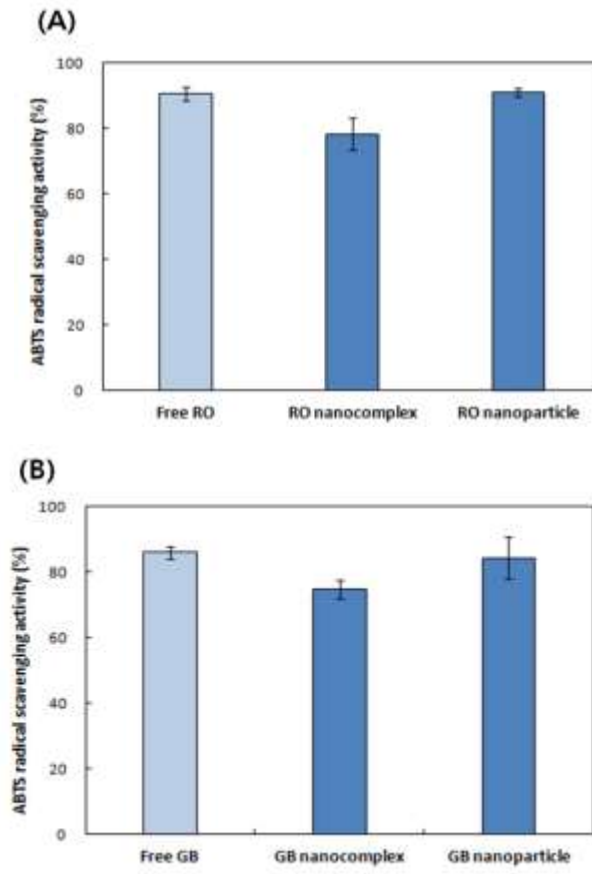


그림 188. 나노소재의 피복소재별 항산화 활성 ((A) 로즈마리, (B) Glabridin)

2. 2차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) 효능평가위한 천연 항균소재 함유 나노소재 대상선정

가) 로즈마리 추출물 함유 키토산 나노캡슐 소재 (위탁기관 개발소재)

Chitosan과 γ -poly glutamic acid의 이온결합(ionic gelation)을 이용하여 로즈마리 추출물을 함유하는 나노입자를 자체적으로 제조하였다. 나노소재는 입자특성에 영향을 받음으로 이에 대한 평가를 확립할 수 있는 입자크기에 따른 기준 나노소재를 제조하였다. γ -Poly glutamic acid 농도를 고정하고, 포집되는 로즈마리 소재의 농도를 최종 나노분산액에서 1 mg/mL로 조정된 뒤, chitosan 농도를 조절하면서 형성된 나노입자의 크기를 측정하였다. 최종 나노분산액에서의 기준으로 chitosan 농도가 0.1, 1.2, 1.8 mg/mL일 때 각각 200, 400, 600 nm의 입자가 형성되었다.

나) 천연 항균/항산화소재 나노에멀전 (제1협동기관 개발소재)

제1협동기관으로부터 콩기름(soybean oil)과 5mM phosphate buffer (pH 7), 다양한 유화제 (whey protein isolate (WPI), casein, decaglycerol laurate, decaglycerol monooleate)를 사용하여 제조한 로즈마리 추출물 함유 oil-in-water (O/W) 에멀전 제공받아 분석하였다. 나노제형은 로즈마리(0.5%)를 용해시킨 오일(oil phase)과 각각의 유화제를 용해시킨 5 mM phosphate buffer (aqueous phase)를 비율이 5:1이 되도록 혼합한뒤 균질기로 12,000rpm에서 1분 동안 균질화시켜 coarse 에멀전을 제조하였다. Coarse 에멀전을 다시 고압균질기(High pressure homogenizer, HPH)에 넣고 10,000psi (70MPa)의 압력을 가하여 균질화 하였고 이 과정을 세 번 반복하여 에멀전을 제조하였다.

다) 단백질, 지질기반 식품나노소재 (제2협동기관 개발소재)

제2협동기관으로부터 나노크기로 제조한 난백 단백질 오브알부민(ovalbumin)에 항균소재(로즈마리, 토복령, 섬기린초 추출물)를 서로 결합시켜 제조한 나노소재를 제공받아 분석하였다. 또한, 나노크기로 제조한 대두 단백질(soy protein isolate), 옥수수 단백질(zein)에 코어소재를 결합한 나노소재를 제공받아 분석하였다. 오브알부민이 나노크기로 변환되는 방법은 desolvation 방법 등을 사용했으며, 오브알부민의 소수성 아미노산 잔기인 트립토판과 항균소재와의 상호작용을 통해 결합하여 제조하였다. 제인과 감초추출물의 결합은 감초추출물의 핵심 기능 성분인 글라브리딘과 제인 단백질의 소수성 아미노산 잔기인 트립토판, 티로신과의 상호작용을 통해 형성되었다.

(2) 개발 나노소재에 대한 항균/항산화활성 분석

가) 개발 나노소재의 항균활성 분석

① Disk diffusion assay 활성 분석

디스크 확산 분석(disk diffusion assay)는 항균소재를 흡수시킨 멸균 paper disc를 균을 도말한 고체 배지에 부착하여 배양했을 때 균의 생육이 저해되는 범위(inhibition zone)의 직경을 측정하여 항균활성을 측정하는 방법이다. 본 실험에서는 약 10^6 CFU/mL의 박테리아 배양액을 nutrient 한천플레이트에 도말하고 여기에 항균소재 30 μ L를 적용한 지름 8 mm의 종이 디스크를 올려준 뒤 30 $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 배양하여 생육억제범위의 직경을 측정 하였다.

② MIC (minimum inhibitory concentration) 활성 분석

MIC assay는 미생물 성장을 억제할 수 있는 최저저해농도를 분석하는 방법으로 액체배지희석법(broth microdilution method)을 이용하여 96-well plate에 액체배지를 100 μ L씩 분주하고, 시료 stock을 100 μ L씩 첨가하여 단계별로 희석한다. 이 후, 균을 포함한 배지를 100 μ L씩 분주하여 30 $^{\circ}$ C에서 24h 배양한 뒤, 흡광도가 증가하지 않는 최소 시료 농도를 MIC 값으로 한다. 이 때, 배양 온도 및 시간은 타겟 균주에 따라 다르게 적용한다. 본 실험에서는 코어소재의 활성에 맞게 감초 추출물 나노소재는 *B.subtilis*, 토복령 추출물 나노소재는 *C.albicans*, 섬기린초 추출물 나노소재는 *P.aeruginosa*를 대상으로 평가하였다.

③ Time-kill assay 활성 분석

Time kill assay는 항균물질의 시간대별 항균력을 평가하는 실험이다. 액체배지에 항균물질 분주 후 균을 접종하여 배양시키면서 일정 시간 별로 시료를 채취 및 희석하고, agar plate에 도말 및 배양하여 생성된 균의 집락 수를 counting함으로써 항균물질의 균 생육억제능을 확인한다. 본 실험에서는 TSB (tryptic soy broth) 배지에서 10^4 CFU/mL의 *B.subtilis*를 30 $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 배양한 뒤, 0, 3, 9 및 24 시간에서 콜로니 수를 측정하여 time kill 결과를 도출하였다.

나) 개발 나노소재의 항산화활성 분석

① DPPH radical scavenging assay 활성 분석

본 연구에서는 4종 천연 식물추출물(로즈마리, 감초, 토복령, 섬기린초)의 항산화 효능분석법을 확립하기 위하여 DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) 라디칼 소거능 및 ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 방법을 이용하였다. DPPH 라디칼 소거능 측정법은 DPPH radical이 항산화제로부터 수소를 얻어 DPPH로 변환될 때 보라색이 탈색되는 원리를 이용한 방법으로, 항산화제의 활성은 DPPH 라디칼이 소멸되는 비율로 산출될 수 있다. 각 시료의 항산화 활성을 평가하기 위하여 100% ethanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH용액 0.1 mL에 시료 0.1 mL을 첨가하여 혼합 후 암소에서 45분 동안 방치하고 microplate reader(varioskan flash, Thermo, CA USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능을 아래의 식으로 계산한 후 각 농도별 라디칼 소거능에

대한 검량선에서 라디칼 소거능이 50%가 되는 농도인 EC₅₀을 구하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging effect (\%)} = \frac{\{(C-CB)-(S-SB)\}}{(C-CB)} \times 100$$

S: sample, SB: sample blank, C: control, CB: control blank

② ORAC assay 활성 분석

ORAC 분석법은 radical chain reaction의 가장 핵심적인 단계인 수소 전자전달과 관련하여 항산화 물질의 free radical 소거 능력을 측정하는 방법이다. 이 분석법은 식품 내에 존재하는 친수성 성분과 친유성 성분 모두에 반응하기 때문에 응용 범위가 넓다는 장점을 가지며, 반응 감도가 예민하여 정확도를 높일 수 있는 방법이기도 하다. 실험방법은 Black 96-well plate에 시료를 25 uL씩 넣고, 75 mM phosphate buffer(pH 7.5)에 녹인 8 nM fluorescein 150 uL을 첨가한 뒤, 37°C에서 15분 간 incubation 시킨다. 이 후, 흡광도 측정 직전에 과산화 라디칼의 생성을 위해 80 mg/mL AAPH (2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride)를 첨가한다. Microplate reader를 이용하여 485nm에서 전자여기 후 535 nm에서 방출되는 조건으로 37°C에서 60분간 30초 마다 fluorescence의 감소율을 측정한다. 결과값은 시료 첨가구와 무 첨가구의 area under curve(AUC)값을 나타낸 후 trolox를 이용하여 작성한 검량선에 대입하여 나타내었다.

③ CAA assay 활성 분석

세포단위에서의 항산화 활성을 평가하기 위해 HepG2 cell (human hepatocellular carcinoma cell)을 배양한 후 나노식품소재로 처리하였다. 배양한 HepG2 세포s는 DCFH-DA (Folin - Ciocalteu reagent)를 이용해 형광발색을 시킨 후 ABAP (2,20-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) 함유 HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)로 세척하여주었다. 최종 처리가 완료된 세포 배양액은 파장대 emission 528 nm, excitation 485 nm에서 형광강도를 분석하여 항산화 활성정도를 산출하였다.

(3) 개발 나노소재 안정성 평가

로즈마리 추출물 함유 키토산-PGA 나노입자 분산액을 실제 식품적용조건에서 항균 안정성을 평가하였다. 실제 식품적용조건으로는 *B.subtilis* 균과 같은 열수 박테리아 (thermoduric bacteria)가 차 음료의 유통 과정에서 주요한 문제이기 때문에 보리차를 식품 모델로 선정하였다. 항균제로 처리 한 보리차에 10⁴ CFU / mL의 농도로 조정 한 *B.subtilis* 균을 접종 하였다. 로즈마리 추출물의 최종 농도를 1/8 MIC로 조정하고, 처리하지 않은 보리차를 대조군으로 사용 하였다. 모든 시료는 30°C에서 7 일 동안 보관했습니다. 시료의 미생물 분석은 0일, 1일, 3일, 5일 및 7일에 수행되었다. NA에서 10 배 단계 희석액을 제조하고 플레이트를 30°C에서 24 시간 동안 배양 하였다. 콜로니 수를 세고 결과를 log CFU/mL로 표시 하였다.

(4) 개발 나노소재의 ex vivo 흡수율 평가 (Confocal microscopy)

항균소재의 활성이 미생물 내 유입을 통해 발현되며, 나노소재화를 통해 그 유입 정도가 증가하여 항균활성이 증가하는 것으로 보고되어 있다. 이에 천연 항균소재의 나노제형화에 따른 정성적인 유입정도의 증가를 분석하기 위해 Caco-2 세포에 대한 나노소재의 세포투과정도를 confocal 현미경(TCS SP5 AOBS, Leica, Mannheim, Germany)을 통해 분석하였다. 이를 위해 Caco-2 세포를 6 well plate에서 커버 글래스에 4×10^5 cell/well의 농도로 접종한 뒤 confluence가 50%에 도달할 때까지 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고, 항균 나노소재 2 mL 씩 각 웰에 첨가하였다. 샘플과 2 시간 동안 배양한 뒤 세포를 PBS로 2 회 세척하고 70% EtOH로 고정 시킨 뒤 DIO cell labeling solution을 이용하여 세포막을 염색하여 분석하였다.

5) 개발 나노소재의 항균/항산화 효능 향상조건 확립

가) 나노소재 제형의 적용형태에 따른 항균활성

키토산-PGA를 이용하여 천연 항균소재 나노제형의 사례에서 제조 후 나노소재만을 분리하여 재분산시킨 형태와 제조한 그대로의 분산액 상태로 적용한 형태에 대하여 디스크 확산법과 time-kill assay를 실시하여 항균활성을 비교하였다.

나) 나노소재 내 천연 항균성분 농도에 따른 항균활성

로즈마리 추출물의 농도가 항균 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 1차년도에서 규명한 로즈마리 추출물의 MIC 농도와 1/2 MIC 농도로 적용한 나노제형에 대해 항균활성을 비교하였다.

다) 나노소재의 입자크기 / 피복소재에 따른 항균활성

캡슐화에 의한 로즈마리 추출물의 항균 활성 증가를 보다 명확하게 분석하기 위해 로즈마리 추출물, 로즈마리를 함유하지 않은 나노입자(blank NPD), 로즈마리 추출물 함유 나노입자(NPD)의 *B.subtilis* 균에 대한 time-kill assay를 수행하였다.

다. 연구 결과

(1) 개발 나노소재에 대한 항균/항산화활성 분석

가) 개발 나노소재의 항균활성 분석

① Disk diffusion assay 활성 분석

디스크 확산 분석은 *B.subtilis*을 이용하여 캡슐화 하지 않은 로즈마리 추출물(free), 로즈마리 추출물 함유 키토산-PGA 나노소재를 제조 후 분리하여 재분산 시킨 상태(NP)와 제

조 직후의 분산액 상태(NPD)를 대상으로 수행되었다 (그림 189). 로즈마리 추출물과, NP 및 NPD의 저해 구역은 각각 11.83, 12.67 및 15.17 mm로 나타났다. NP 상태와의 비교에서 로즈마리 추출물 항균활성의 유의적인 차이는 관찰되지 않았으나 제조 직후의 분산액 상태(NPD)를 적용했을 때는 유의적인 활성의 증가를 나타내었다.

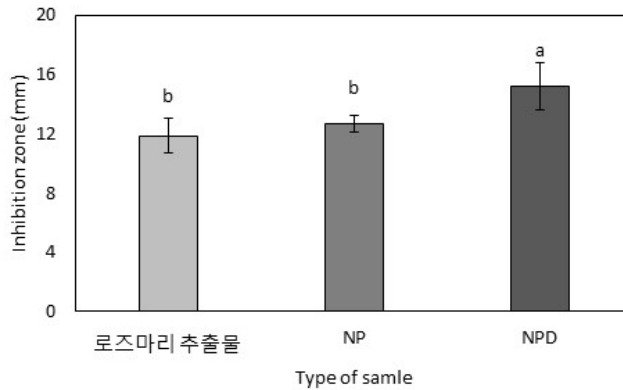


그림 189. 로즈마리 추출물 함유 키토산-PGA 나노소재의 disk diffusion 항균활성

② MIC (minimum inhibitory concentration) 활성 분석

MIC 분석은 *B.subtilis*을 이용하여 캡슐화 하지 않은 로즈마리 추출물(free), 로즈마리 추출물 함유 키토산-PGA 나노소재를 제조 후 분리하여 재분산 시킨 상태(NP)와 제조 직후의 분산액 상태(NPD)를 대상으로 수행되었다(그림 190). 로즈마리 추출물과, NP 및 NPD의 MIC는 각각 8, 4, 4 ug/mL로 나타났다. MIC 결과에서 나노캡슐화에 의해 로즈마리 추출물의 항균활성이 증가하는 결과를 나타내었으나 나노입자의 적용 형태에 따른 활성의 차이는 나타나지 않았다.

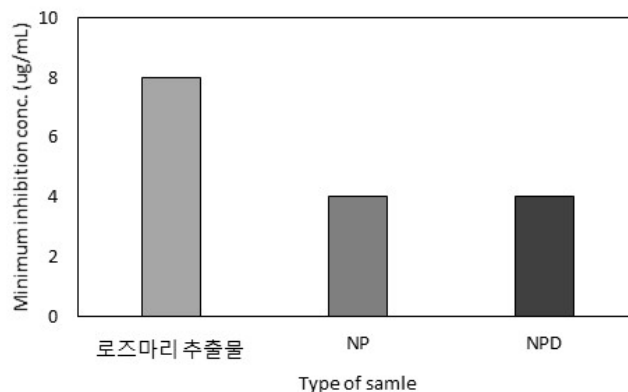


그림 190. 로즈마리 추출물 함유 키토산-PGA 나노소재의 미생물 생육억제 최소농도 (MIC)

나노소재화 하지 않은 토복령 추출물과 섬기린초 추출물은 각각 500 ug/mL과 1000 ug/mL의 농도에서 *C.albicans*와 *P.aeruginosa* 균의 성장을 각각 저해하는 것으로 나타났다. 반면, 토복령 추출물과 섬기린초 추출물을 함유한 나노소재에서는 실험 적용 조건에서 MIC 활성을 나타내지 않았다. MIC의 실험은 항균소재를 높은 농도에서 이를 희석해가면

서 활성을 억제할 수 있는 최소저해농도를 도출하는 연구인데, 본 실험에서 평가한 나노소재에 함유된 천연 항균소재의 농도는 250 ug/mL 수준이었다. 따라서, MIC 분석 시작 농도가 캡슐화 하지 않은 항균소재의 최소 저해농도보다 낮은 농도에서 분석되어 MIC 항균활성이 나타나지 않았던 것으로 분석된다.

③ Time-kill assay 활성 분석

B.subtilis 균주에 로즈마리 추출물(free)과 로즈마리 추출물을 함유하지 않은 공 나노캡슐(blank NPs), 로즈마리 추출물 함유 나노캡슐(NPs)을 각각 처리한 뒤 24시간 경과시점에서 미생물 생육억제 정도를 평가하였다(그림 191). 처리 후 균의 집락(colony) 수를 평가하였을 때, blank NP에서 로즈마리 추출물을 함유하지 않음에도 불구하고 control 대비 유의적으로 높은 항균 활성을 나타내었으며, 로즈마리 추출물의 경우 blank NPs 보다 유의적으로 효과적인 항균활성을 나타내었다. 로즈마리 추출물을 키토산-PGA에 포집시킨 나노소재에서는 blank NPs와 로즈마리 추출물의 개별 항균활성의 합보다 더 큰 항균 활성이 나타났으며 24시간 경과시점에서 모든 균이 사멸하는 결과를 나타내었다.

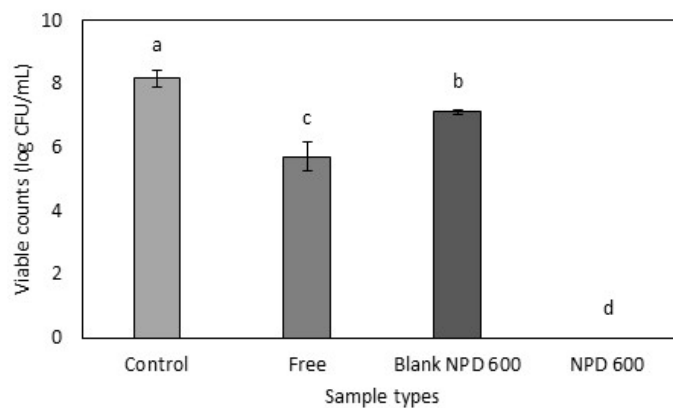


그림 191. 로즈마리 추출물 함유 키토산-PGA 나노소재의 time kill 항균활성 (24시간 경과시점)

나) 개발 나노소재의 항산화활성 분석

① DPPH radical scavenging assay 활성 분석

토복령과 섬기린초를 대상으로 이를 CMC와 zein으로 포집한 나노소재에 대한 DPPH 라디칼 소거능을 평가하였다(그림 192). 피복소재의 영향을 평가하기 위해 CMC와 zein의 자체 항산화 활성을 평가하였을 때, 16.58%와 30.50%로 각각 나타났다. 토복령과 섬기린초 추출물의 항산화 활성의 결과 33.96%, 51.29%로 나타났으며, CMC와 zein을 이용하여 나노소재화 하였을 때, 토복령 나노소재와 섬기린초 나노소재에서 각각 46.75%와 88.04%로 나타났다. 결과를 통해 CMC와 zein을 이용한 나노캡슐화는 토복령 또는 섬기린초의 활성을 효과적으로 증진시킬 수 있음이 확인되었다.

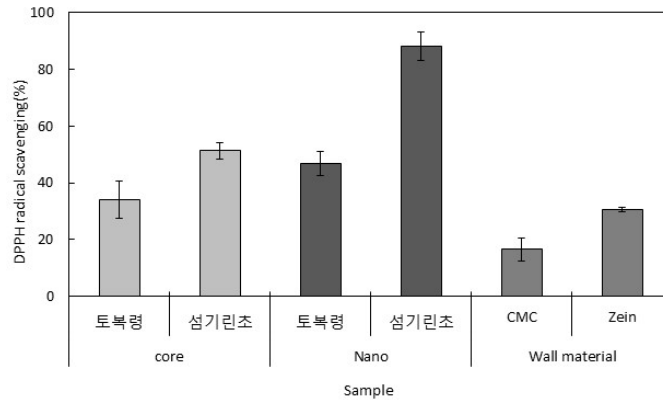


그림 192. 토복령, 섬기린초 함유 CMC-zein 나노소재의 DPPH 라디칼 소거능

② ORAC assay 활성 분석

토복령과 섬기린초 추출물과 이를 함유한 CMC-zein 나노소재에 대한 ORAC 항산화 활성을 평가하였다(그림 193). 피복소재의 영향을 평가하기 위해 CMC와 zein의 자체 항산화 활성을 평가하였을 때, -93.54와 665.61 $\mu\text{mol}/\text{TE}$ 로 각각 나타났다. 토복령과 섬기린초 추출물의 항산화 활성의 결과 1249.34와 1108.07 $\mu\text{mol}/\text{TE}$ 로 나타났으며, CMC와 zein을 이용하여 나노소재화 하였을 때, 토복령 나노소재와 섬기린초 나노소재에서 각각 1714.45와 1529.72 $\mu\text{mol}/\text{TE}$ 로 나타났다. 이 결과를 통해, CMC와 zein을 이용하여 토복령 또는 섬기린초 추출물을 나노소재화 하는 것이 코어소재의 생리활성을 증진시킬 수 있는 방법임을 확인하였다.

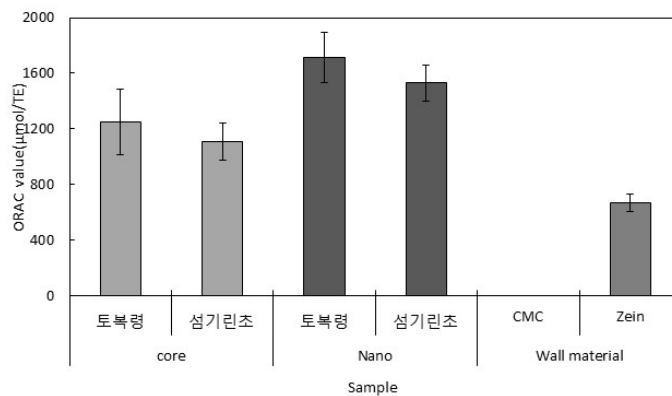


그림 193. 토복령, 섬기린초 함유 CMC-zein 나노소재의 ORAC 항산화 활성

③ CAA assay 활성 분석

토복령과 섬기린초 추출물과 이를 함유하는 CMC-zein 나노소재에 대한 세포항산화 (CAA) 활성을 평가하였다(그림 194). 피복소재의 영향 평가에서 피복소재인 CMC와 zein을 자체 항산화 활성을 평가하였을 때, 162.37와 233.93 unit으로 각각 나타났다. 캡슐하지 않은 토복령과 섬기린초 추출물의 항산화 활성의 결과 2,190.05과 1,411.06 unit으로 나타

났으며, CMC와 zein로 포집한 토복령, 섬기린초 나노소재에서는 각각 2,702.04와 2,048.31 unit으로 나타났다. 이를 통해 토복령 또는 섬기린초 추출물의 활성 증진 방법으로서 CMC와 zein를 이용한 나노소재화가 효과적임을 확인하였다.

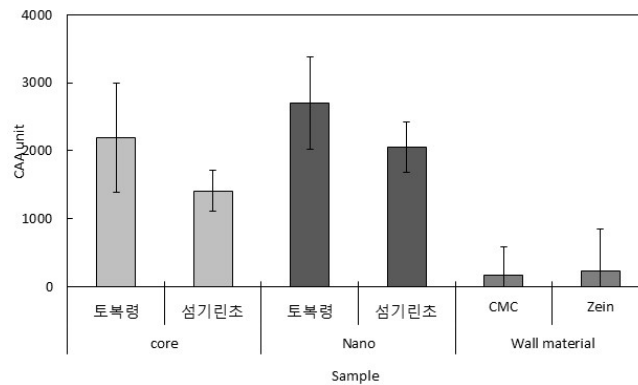


그림 194. 토복령, 섬기린초 함유 CMC-zein 나노소재의 세포 향산화(CAA) 활성

(3) 개발 나노소재 안정성 평가

MIC 농도의 1/8에 해당하는 농도로 로즈마리 추출물과 로즈마리 추출물 함유 나노입자를 처리 한 후, 보리차를 30 °C에서 7 일 동안 저장 하였다 (그림 195). 그 결과 보리차의 항균 활성은 NPD 600, NPD 400, NPD 200, Free 순으로 높게 나타났다. 모든 나노제형은 보리차에서 로즈마리 추출물보다 높은 항균활성을 나타내었으며, NPD 600은 세 가지 유형의 나노제형 중 가장 높은 항균 활성을 보였다. 이러한 결과를 통해 키토산-PGA를 이용한 나노 캡슐화가 로즈마리 추출물의 항균 활성을 향상시킬 수 있는 효과적인 방법으로 확인할 수 있었다.

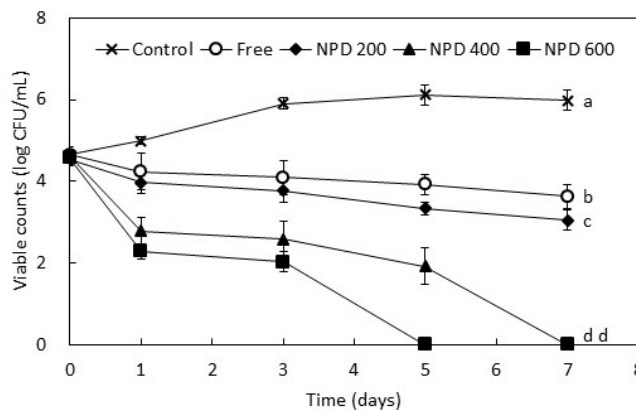


그림 195. 보리차 중 *B.subtilis*에 대한 로즈마리 추출물 함유 나노소재의 항균 효과

(4) 개발 나노소재의 ex vivo 흡수율 평가 (Confocal microscopy)

Confocal 현미경을 통해 나노소재의 세포 내 유입정도를 분석을 하기 위해 나노소재에 사용된 zein의 형광발색 조건을 탐색하였다(그림 196). 기존 발표된 연구들에서 zein은

365-395 nm와 465-485 nm의 파장대에서 농도 의존적으로 형광강도가 증가하는 것으로 보고되었으며, 스크리닝을 통해 excitation 405 nm과 emission 590 nm 파장대에서 나노 입자의 형광이 안정적으로 발현되는 것을 확인하였고 이를 분석조건으로 이용하였다.

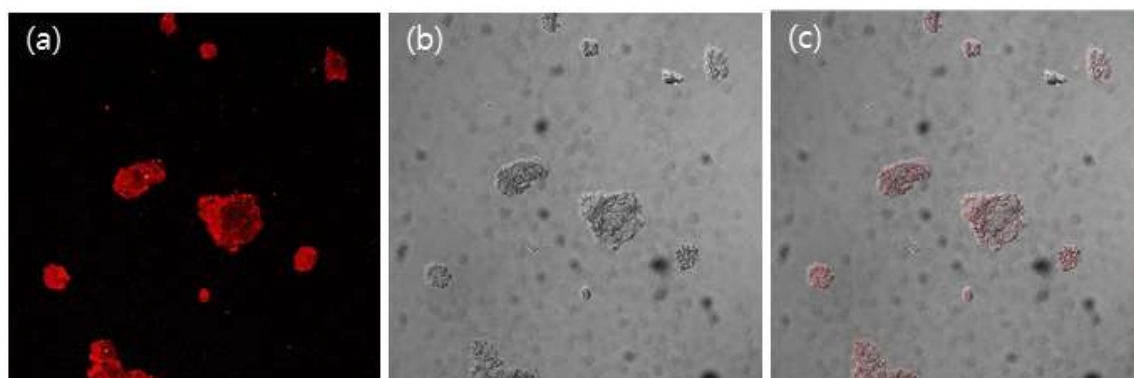


그림 196. Zein의 형광발색 조건 탐색결과 (a) fluorescence, (b) phase, (c) overlay

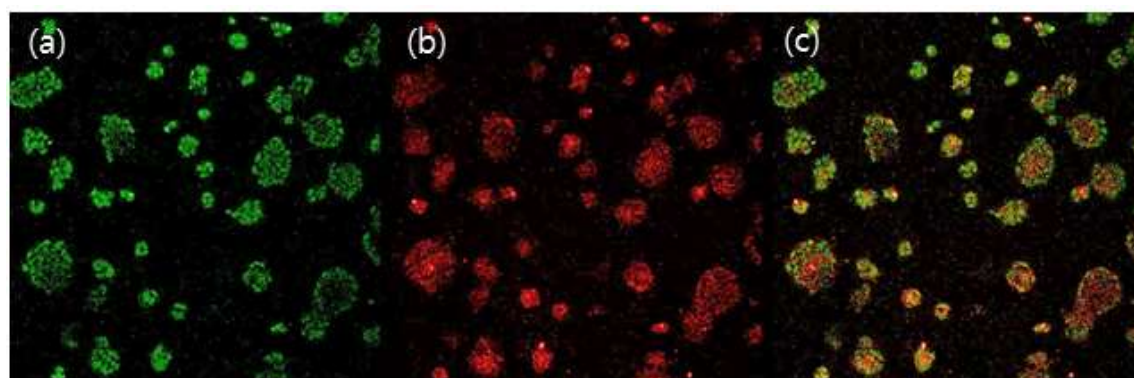


그림 197. Caco-2 세포 내로 유입된 zein의 confocal 분석결과 ((a) Caco-2 cell (Sybr green), (b) Zein, (c) Sybr green-zein)

1차년도 실험결과를 통해 세포 독성이 발현되지 않는 나노제형의 농도(60배 희석) 구간에서 zein 나노소재를 Caco-2 세포에 적용하여 confocal microscopy 분석을 실시하였다(그림 197). Zein의 형광색과의 대조를 위해 Caco-2 세포를 Sybr green 염색시약으로 염색하여 실시하였다. 그 결과 zein을 Caco-2 세포에 처리하여 배양하였을 때, 붉은색으로 표지된 zein이 초록색으로 표지된 Caco-2 내부로 유입된 결과를 나타내었고, 이를 통해 나노제형이 세포내로 효과적으로 흡수되었음을 확인하였다.

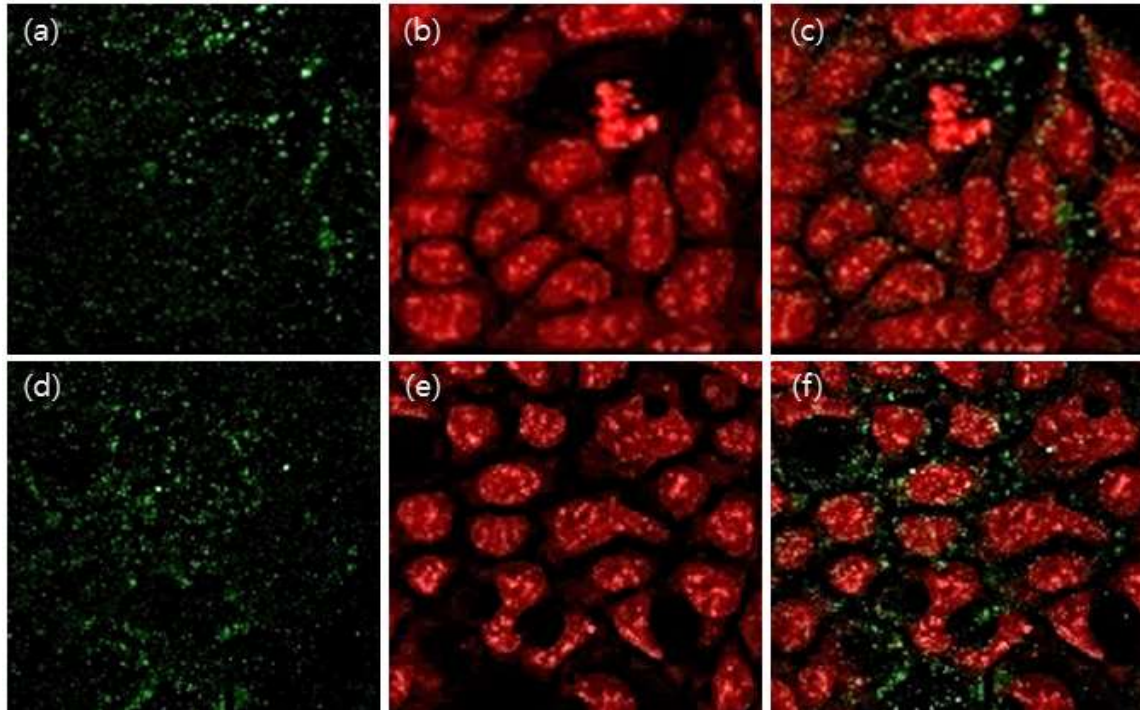


그림 198. 토복령 추출물과 토복령 추출물 함유 나노소재의 Caco-2 세포투과
 (a) 토복령 추출물, (b) Caco-2 세포, (c) 토복령 추출물의 세포유입
 (d) 토복령 함유 나노소재, (e) Caco-2 세포, (f) 토복령 함유 나노소재의 세포유입

추가적으로 토복령 함유 나노소재의 경우 토복령 자체의 형광특성을 이용하여 실질적인 항균물질의 투과정도를 평가하였다(그림 198). 형광검출 파장대로는 excitation 485 nm, emission 538 nm로 사용하였다. 이때, 세포핵의 경우 세포핵을 propidium iodide (PI)로 염색하여 토복령과 구분하여 분석하였고, 분석 조건은 excitation 488 nm, emission 636 nm에서 분석하였다. 분석결과 토복령 함유 나노소재를 Caco-2 세포에 처리하여 배양하였을 때, 초록색으로 형광발색한 토복령이 빨간색으로 표지된 Caco-2 세포 내부로 유입된 결과를 나타내었고, 토복령 함유 나노소재에서 토복령의 세포내로의 유입이 보다 효과적으로 이루어졌음을 확인하였다.

5) 개발 나노소재의 항균/항산화 효능 향상조건 확립

가) 나노소재 제형의 적용형태에 따른 항균활성

키토산-PGA를 이용하여 천연 항균소재 나노제형의 사례에서 제조 후 나노소재만을 분리하여 재분산시킨 형태와 제조한 그대로의 분산액 상태로 적용했을 때, 분산액 그대로 적용한 형태가 디스크 확산법과 time-kill assay에서 더 효과적인 항균활성을 나타내었다.

표 81. 로즈마리 추출물 함유 키토산-PGA의 입자크기에 따른 디스크 확산 분석 결과

	NPDs ¹⁾	NPs ²⁾	Free ³⁾
NP 200	13.17 ± 1.47 ^b	11.33 ± 0.52 ^c	
NP 400	15.00 ± 1.79 ^a	12.00 ± 0.89 ^{bc}	11.83 ± 1.17 ^{bc}
NP 600	15.17 ± 1.60 ^a	12.67 ± 0.52 ^{bc}	

^{a-c}Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$

1) Nanoparticle dispersions, 2) Nanoparticles, 3) Free rosemary extract

디스크 확산 분석은 *B.subtilis*을 이용하여 캡슐화 하지 않은 로즈마리 추출물(free), 로즈마리 추출물 함유 키토산-PGA 나노소재를 제조 후 분리하여 재분산 시킨 상태(NP)와 제조 직후의 분산액 상태(NPD)를 대상으로 수행되었다(표 81). 로즈마리 추출물과, NP 및 NPD의 저해 구역은 각각 11.83, 11.33-12.67 및 13.17-15.17 mm로 나타났으며 NP 상태와의 비교에서 로즈마리 추출물 항균활성의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 반면, 분산액 상태인 NPD의 경우 유의적인 항균활성의 증가를 나타내었다($p < 0.05$). 이를 통해 키토산-PGA 나노입자를 분산액 상태로 적용했을 때, 로즈마리 추출물의 항균 활성이 향상 될 수 있음을 확인하였다.

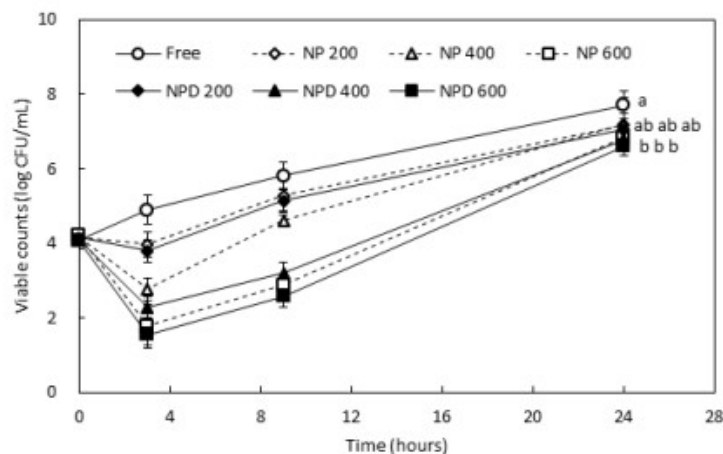


그림 199. *Bacillus subtilis* 균에 대한 키토산-PGA 나노제형의 time kill 활성

키토산-PGA 나노입자의 형태(NP: 입자 수거 후 재분산 / NPD: 입자 제조 직후 분산상태)와 각 형태의 입자크기에 따른 항균 활성 경향을 확인하였다(그림 199). 1차년도에서 도출한 로즈마리 추출물의 MIC 농도의 1/2 수준에서 항균 활성을 평가했을 때, NPD > NP > free 순서로 활성이 높게 나타났다. 이러한 결과는 디스크 확산법 결과와도 동일한 경향으로 나노 입자 제조 직후의 분산액 상태에서 로즈마리 추출물의 항균활성이 가장 효과적인 것으로 확인되었고, 따라서, 이후 실험에서는 NPD 제형을 선정하여 실험에 적용하였다.

나) 나노소재 내 천연 항균성분 농도에 따른 항균활성

효능평가 결과, 모든 샘플에서 로즈마리 추출물 농도가 증가함에 따라 항균 활성이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며, 나노캡슐화에 따라 대조군에 비해 *B.subtilis* 균의 생존이 유의적으로 억제되는 결과를 나타내었다.

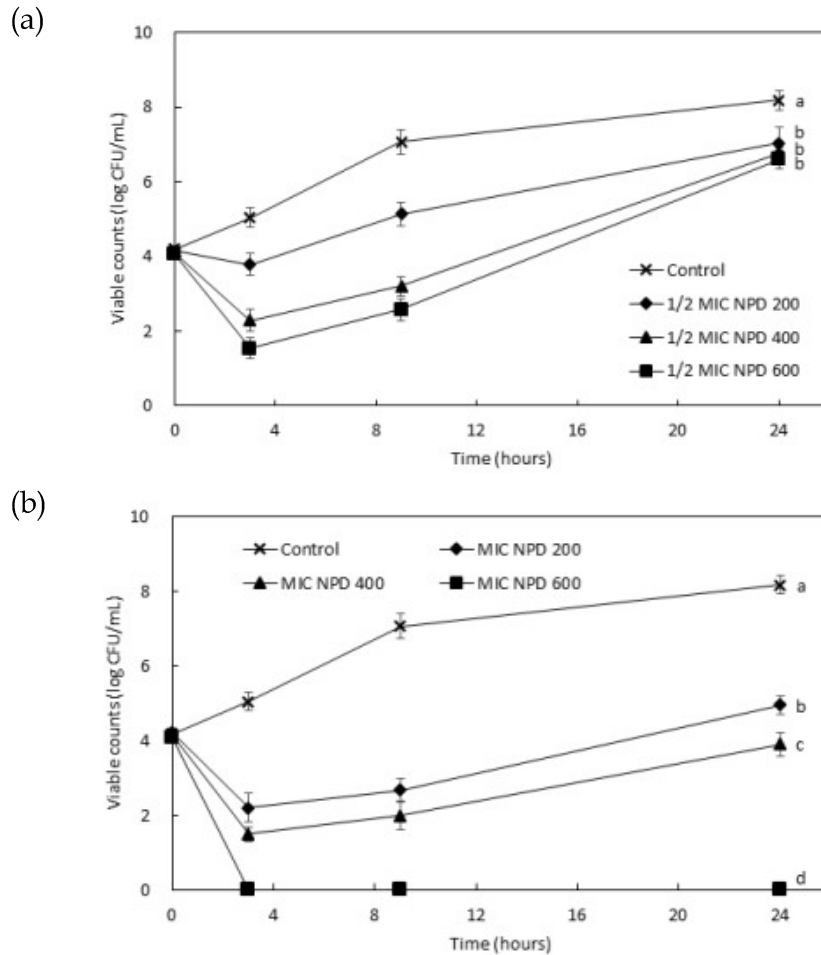


그림 200. *Bacillus subtilis* 균에 대한 MIC 농도 별 키토산-PGA 나노제형의 time kill 활성. (a) 1/2 MIC 농도, (b) MIC 농도

MIC 농도에 따라서는 1/2 MIC 농도 처리군의 경우 NPD의 입자크기의 변화는 24 시간 경과 시점에서 *B.subtilis* 균의 생존률에 대해 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면, MIC 농도에서 분석한 결과에서는 NPD 처리군에서는 24 시간 후 모든 입자크기에서 *B.subtilis*의 생존률이 증가하지 않고 유지되었으며, 입자크기가 증가함에 따라 항균 활성이 유의적으로 증가하는 결과를 나타내었다($p < 0.05$). 특히, 나노제형이 600 nm의 입자크기를 가진 샘플(NPD 600)에서 NPD 200과 NPD 400에 비해 현저한 항균 활성의 증가를 나타내었으며, 처리 3 시간 후에 균이 완전히 사멸하는 결과를 나타내었다. 결과를 통해 MIC 농도로 제조하였을 때 나노소재의 항균활성이 효과적으로 증가함을 확인하였고, 이후 실험에서 MIC 농도를 선정하여 적용하였다.

다) 나노소재의 입자크기 / 피복소재에 따른 항균활성

효능평가 결과, 모든 입자크기의 NPD에서 free 로스마리 추출물과 blank NPDs보다 유의적으로 높은 항균 활성이 나타났다.

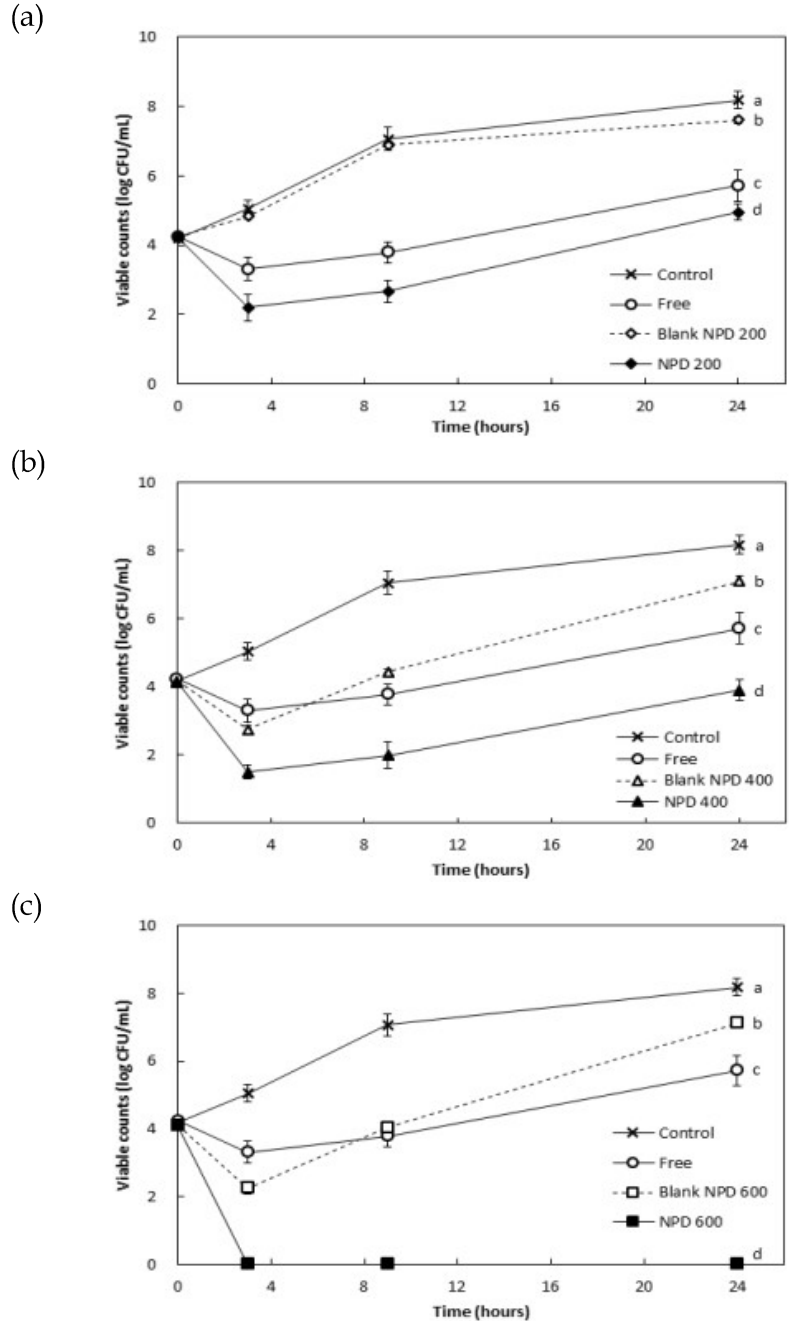


그림 201. 입자크기 별 키토산-PGA 나노제형의 time kill 활성 (a) NPD 200 nm, (b) NPD 400 nm, (c) NPD 600 nm

천연 항균소재 함유 키토산-PGA 나노제형을 입자크기(200, 400, 600 nm)에 따라 분석하였을 때, 디스크 확산법에서와 같이 time-kill assay에서도 입자크기 증가에 따라 활성이

증가하는 경향을 나타내었다. Blank NPD들의 경우 200 nm에서 전반적인 항균 활성은 낮았으나, 유리 로즈마리 추출물 보다 유의적으로 높은 항균 효과가 있는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). 또한, 입자크기가 증가함에 따라 항균활성이 증가하였으며, 400 nm와 600 nm에서는 처리 3시간 이후부터 blank NPD 임에도 free 로즈마리 추출물보다 높은 항균 활성을 나타내었다. 키토산-PGA 나노제형의 제조과정에서 입자크기가 증가할수록 더 높은 농도의 키토산이 사용되었으며, 이를 통해 키토산-PGA 나노제형의 항균 활성은 키토산 농도와 양의 상관관계에 있는 것으로 분석되었다.

나노소재의 적용형태의 경우 나노소재만을 분리하여 수거 할 경우 소재의 순도를 증진시킬 수 있다는 장점이 있으나, 재분산 과정에서 본래의 나노소재의 특성이 손실되는 사례들이 보고되어 있으며, 항균소재에 적용하는 형태가 액상으로 적용하는 만큼 추후 실제 제품 개발에 있어 2차 가공과정을 줄여나가는 것이 유효할 것으로 판단된다. 또한, 기존 연구들에서 키토산의 양전하를 띤 아미노 그룹은 음전하의 박테리아 세포막과 상호작용을 하면서 항균활성을 나타낸다는 연구가 보고되어 있으며, 본 연구의 결과에서 키토산과 로즈마리 소재 자체의 항균활성이 시너지효과를 나타낸 것으로 분석된다.

종합적으로 보았을 때, 키토산-PGA 나노소재의 경우 분산액 그대로 적용한 형태와 동일 형태 내에서는 600 nm 입자크기에서 항균활성이 증진되는 결과를 나타내었다. 이를 통해 동일 피복소재를 다른 항균소재의 나노소재화에 적용할 때 피복소재의 농도, 적용형태 등을 고려하여 효과적인 소재화를 이룰 수 있을 것으로 보인다.

3. 3차년도 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 수행 방법

(1) 산업화 적용에 따른 개발나노소재의 항산화 효능 평가

본 연구에서는 제1협동기관에서 개발하고 제품화된 로즈마리 나노소재의 항산화 효능을 평가하기 위하여 DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) 라디칼 소거능, FRAP (ferric reducing antioxidant power) 및 ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 방법을 이용하였다.

가) DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼은 항산화능이 있는 물질로부터 수소를 얻어 DPPH로 변환되므로 항산화제의 활성은 DPPH 라디칼이 소멸되는 비율로 산출할 수 있다. 나노소재의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하기 위해 96 well plate에 시료를 20 μ L씩 넣은 후, 에탄올에 녹인 0.36 mM DPPH를 100 μ L씩 각 well에 첨가하였다. 시료를 차광하여 45분간 반응시킨 이후 microplate reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능(%)은 다음의 계산식을 이용하여 산출되었다.

$$\text{DPPH radical scavenging effect (\%)} = \frac{\{(C-CB)-(S-SB)\}}{(C-CB)} \times 100$$

S: sample, SB: sample blank, C: control, CB: control blank

나) FRAP 측정

FRAP 측정은 철이온의 환원능을 측정하는 실험으로, 환원성 물질인 항산화제를 첨가했을 때, TPTZ와 결합한 Fe^{3+} 가 Fe^{2+} 로 환원되어 청색 계열의 색을 나타내는 현상을 이용한 방법이다. 청색으로 변한 TPTZ는 595nm의 흡광도에서 강한 흡광도를 나타내므로 시료와 일정시간 반응하도록 하여 595nm에서 흡광도를 측정하여 항산화능을 나타낼 수 있다. 표준 나노입자의 항산화능을 측정하기 위해 pH 3.6의 300 mM acetate buffer, 40 mM HCl에 녹인 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) 용액, 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 용액을 10:1:1의 비율로 혼합하여 FRAP 용액을 제조하였다. 이후 96 well plate에 희석한 시료를 50 μ L씩 넣고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 온도를 유지한 FRAP 용액 150 μ L를 첨가하였다. 실온에서 4분간 반응시킨 시료를 microplate reader 로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 시료의 FRAP 결과는 trolox equivalents (mM) / sample (g)로 표기하였다.

다) ORAC 측정

ORAC assay는 활성산소를 흡수하는 능력의 수치를 측정하는 실험으로, 과산화 free radical을 생성하는 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH)를 시료에

첨가하여 과산화 free radical의 생성과 소멸에 의한 형광도의 감소율을 측정하는 방법이다. 나노입자의 항산화능을 측정하기 위해 black 96 well plate에 시료를 25 μ L씩 넣고, phosphate buffer에 녹인 0.4 mM fluorescein 150 μ L을 첨가한다. 이 혼합액을 37 $^{\circ}$ C에서 15분 간 반응을 시킨 후, 80 mg/mL AAPH 25 μ L를 각 well에 첨가하고 10초간 shaking 하였다. 이후, 37 $^{\circ}$ C에서 microplate reader로 1시간동안 형광의 감소율을 측정하였다 (emission 530nm, excitation 485 nm, 30초 간격). 표준시약으로는 trolox를 사용하여 시료와 trolox의 area under curve (AUC)는 다음의 식을 이용하여 계산하였다. 시료의 ORAC 수치는 표준시약농도와 ACU간의 회귀곡선을 이용하여 trolox equivalents (mM) / sample (g)로 표기하였다.

$$\text{Area under curve(AUC)}=1+\text{RFU}_1/\text{RFU}_0+\text{RFU}_2/\text{RFU}_0+\dots+\text{RFU}_{59}/\text{RFU}_0+\text{RFU}_{60}/\text{RFU}_0$$

RFUx : Relative fluorescence value of time points

(2) 나노소재의 세포독성 평가(MTT assay)

제1협동기관에서 개발하고 제품화된 로즈마리나노소재의 안전성 검증을 위하여 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 이용한 세포독성 평가를 진행하였다. 96 well plate에 passage number가 20-35인 Caco-2 cell을 1×10^4 cells/well의 density로 seeding 한 후, 24시간 동안 CO2 incubator에서 배양하였다. 이후, 나노소재시료를 각 well마다 20 μ L씩 처리하였고, 대조군으로는 PBS를 20 μ L씩 처리하였다. CO2 incubator에서 24시간 동안 배양 후, 0.5 mg/mL MTT (in PBS)를 각 well당 20 μ L씩 처리하고 다시 4시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 이후, 생성된 formazan 결정을 가라앉히기 위해 원심분리(1,500 rpm, 5분)하고 상층액을 제거하였다. 모든 well에 Dimethyl sulfoxide (DMSO)를 150 μ L씩 첨가하여 formazan 결정을 잘 용해시킨 후, 15분간 실온에서 반응 시키고 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability에 대한 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{sample-blank})}{(\text{control-blank})} \times 100$$

(3) 동물실험을 통한 개발나노소재의 독성평가

가) 단회투여 독성평가

제1협동기관에서 개발하고 제품화된 로즈마리나노소재의 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고 치사량을 알아보기 위하여 독성시험을 수행하였다. 시험동물은 (주)샘타코 BIO KOREA에서 생산된 5주령의 Sprague-Dawley(SD)계 암수를 분양받아 검역 및 순화과정을 거친 뒤 건강한 개체임을 확인 한 후 시험에 사용하였다. 순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 무작위 법을 이용하여 균을 분리하였다. 단회투여 독성평가를 위해 16시간 이상 절식시킨 후, 암수 10마리씩 대조군과 시험군에

각각 멸균증류수와 로즈마리나노소재(2000 mg/kg body weight)를 1회 경구 투여하고 4시간째까지 일반증상을 관찰하고 사료를 공급하였으며 음수는 자유섭취시켰다. 투여 당일에는 투여 후 30 분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간째까지 각 개체별로 일반증상을 관찰하였고, 투여 후 14일까지 매일 1회 이상 일반증상관찰을 수행하였다. 또한 체중은 투여 후 3일, 7일 14일에 측정하였다.

나) 반복투여 독성평가

제1협동기관에서 개발하고 제품화된 로즈마리나노소재의 반복 경구투여 시 나타나는 전신적 독성반응을 평가하고 무독성량을 조사하기 위하여 반복투여 독성시험을 수행하였다. 시험동물은 (주)샘타코 BIO KOREA에서 생산된 5주령의 SD계 암수를 분양받아 검역 및 순화과정을 거친 뒤 건강한 개체임을 확인 한 후 시험에 사용하였다. 순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 무작위 법을 이용하여 군을 분리하였다. 반복투여 독성평가를 위하여 0 (대조군), 500, 1000, 2,000 mg/kg B.W.의 용량으로 14일 동안 매일 동일한 시간에 반복 투여하였다.

일반증상은 시험기간 중 매일 2 회씩(투여전, 투여후) 관찰하였으며, 첫 투여 당일에는 투여 후 4 시간까지 매 시간마다 관찰하였다. 일반증상관찰은 14 일까지 실시하였다. 체중은 입수일, 군분리일, 투여당일(투여 전), 매 주 1 회 및 부검(절식 후)시 체중을 측정하였다. 사료 섭취량과 음수 섭취량은 투여 개시 후 매주 1 회 측정하였다. 관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대하여 채혈 및 안락사 시킨 다음 체표 및 모든 체공(external surface & all orifices), 두개강(cranial cavity), 흉강 및 복강의 모든 장기(thoracic and abdominal cavities & their contents)에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 특히, 간, 신장, 비장, 부신, 고환, 난소, 뇌, 심장, 흉선, 부고환, 자궁, 응고선을 포함한 정낭+전립선에 대한 중량을 측정하였고, 절식체중에 대한 상대장기중량비(%)를 산출하였다. 좌우가 있는 장기는 좌우를 별도로 측정하여 무게를 합산하여 산출하였다.

다) 혈액학적 검사

모든 동물에 대하여 채혈 전에 약 18 시간이상 절식시킨 실험동물을 isoflurane를 이용하여 마취시킨 후 복대동맥으로부터 채혈하였다. 채취한 혈액 중 약 2 mL의 혈액은 EDTA가 함유된 CBC bottle에 취하여 혈액분석기(ADVIA 2120i, Siemens, Germany)를 이용하여 다음의 항목들을 측정하였다: white blood cell count, differential leucocyte count, red blood cell count, hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), RBC indices, platelet.

라) 혈액생화학적 검사

모든 동물에 대하여 채혈한 혈액 중 혈액검사에 사용된 혈액을 제외한 나머지의 혈액을 실온에서 응고시킨 다음 원심분리(3000 rpm, 10 분)하여 혈청을 취한 후 생화학분석기(TBA-40FR, TOSHIBA, Japan)를 이용하여 다음과 같이 측정하였다: total bilirubin, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma glutamyl-transferase, creatinine, blood urea nitrogen

마) 조직병리학적 검사

모든 동물을 개체별로 간, 신장, 비장을 적출한 다음 10 % neutral buffered formalin에 고정하고, 고정된 장기·조직 중, 대조군 및 고용량군의 모든 개체의 장기에 대해서는 탈수·파라핀침투, 조직의 파라핀 포매, 박절 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 검체슬라이드를 제작하여 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 검체제작 후 잔여 장기·조직 및 고정 장기·조직은 10 % neutral buffer formalin에 하였다.

(4) 안전성 평가 보고서

본 연구과제를 통해 개발된 로즈마리나노소재의 안전성 평가 보고서는 식품의약품안전처의 나노기술응용식품 업계자율 안전성 평가 가이드라인에 기반하여 작성하였다. 안전성 평가보고서는 로즈마리나노소재의 제조방법과 입자의 물리화학적 특성(입도분석, 결정학적 특성, 표면특성), 단회 및 반복투여 독성시험, 유전독성시험(복귀돌연변이시험, 체외염색체 이상시험, 체내소핵시험) 결과를 토대로 작성되었다.

나. 연구 결과

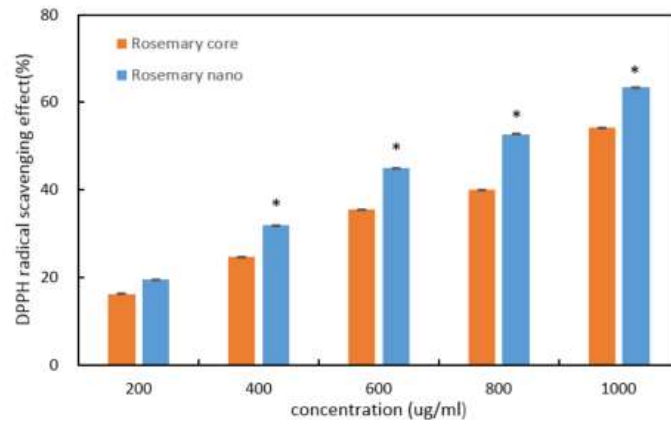
(1) 산업화 적용에 따른 개발나노소재의 항산화 효능

제1협동기관에서 개발하고 제품화된 로즈마리코어소재가 나노입자화됨에 따른 항산화효능의 변화를 관측하기 위하여, 나노화 하지 않은 로즈마리코어소재와 로즈마리나노소재의 항산화활성을 DPPH 라디칼 소거능과 FRAP, ORAC 방법을 이용하여 다양한 농도구간에서 측정하였다. 각 실험의 민감도를 고려하여 DPPH 라디칼소거능과 FRAP의 측정은 로즈마리코어소재의 농도를 기준으로 0.2-1.0 mg/mL의 농도구간에서 분석되었으며, ORAC은 25-200 µg/mL의 농도구간에서 측정되었다.

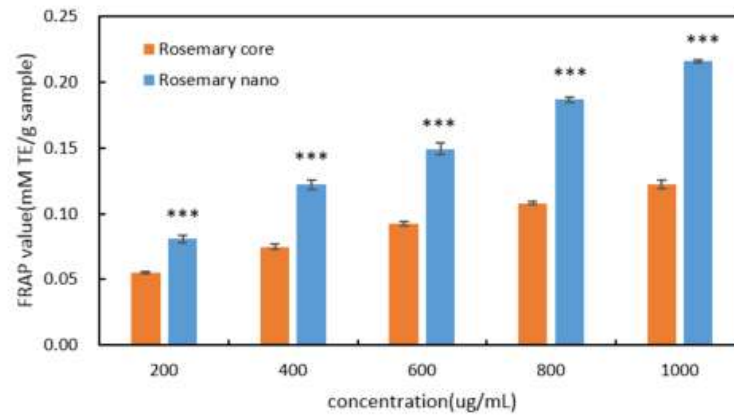
DPPH 라디칼소거능과 FRAP과 ORAC 측정 결과, 유용성분인 로즈마리의 농도가 증가할수록 로즈마리나노소재와 로즈마리코어소재 모두 각 항산화활성이 증가되는 농도의존적 경향을 나타내었다. 또한 모든 항산화실험에서 로즈마리나노소재가 로즈마리코어소재보다 항산화활성이 우수한 것으로 관측되었다. 이러한 경향은 실험한 모든 농도구간에서 관측되었으며 특히 0.2 mg/mL 농도의 DPPH 라디칼소거능을 제외한 모든 농도구간에서 유의적 차이를 나타냈다. 또한 로즈마리소재가 나노입자화됨에 따라 증가된 항산화활성의 정도는 측정된 방법과 실험 농도에 따라 다소 상이하지만, DPPH 라디칼소거능과 ORAC 수치는 대략 1.2-1.3배 증진되었고 FRAP 수치는 1.8배까지 증진된 결과를 나타냈다.

이러한 결과는 로즈마리소재가 나노입자화됨에 따라서 수용액에서의 분산력 및 용해도가 증가되기 때문인 것으로 추정된다. 또한 이러한 결과를 통해서 본 과제에서 연구된 나노입자화 기술은 로즈마리소재의 항산화활성을 향상시킬 수 있는 효과적인 방안이라고 판단된다.

(A)



(B)



(C)

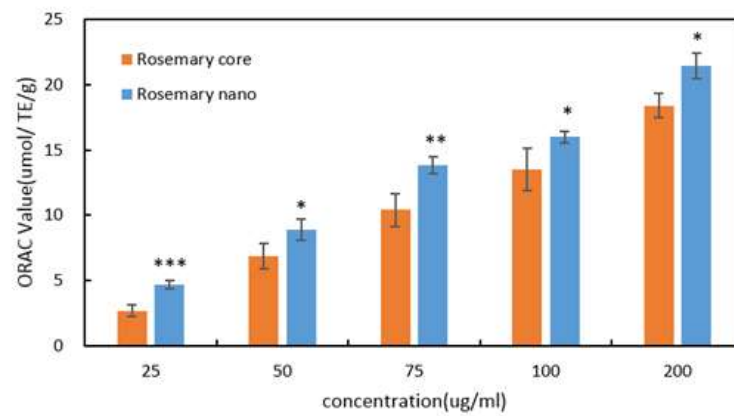


그림 202. 나노입자화가 로즈마리소제의 항산화활성에 미치는 영향 (A: DPPH 라디칼 소거능, B: FRAP value, C: ORAC value)

(2) 나노소재의 세포독성(MTT assay)

제1협동기관에서 개발하고 제품화된 로즈마리나노소재의 세포독성을 평가하기 위하여, Caco-2 cell을 이용하여 1 mg/mL 농도를 단계별로 희석하여 세포독성평가를 수행하였다. 실험 결과, 모든 농도범위에서 세포 생존률이 80% 이상으로 로즈마리나노소재는 세포생장에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

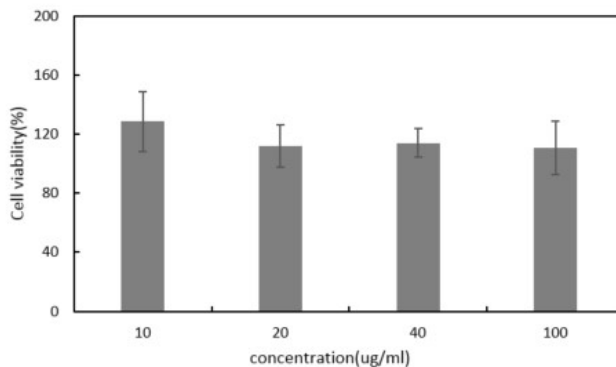


그림 203. 로즈마리나노소재의 세포독성

(3) 동물실험을 통한 개발나노소재의 독성평가

가) 단회투여 독성평가

제1협동기관에서 개발하고 제품화된 로즈마리나노소재에 대한 단회투여독성평가를 수행하였다. 시험 기간동안 로즈마리나노소재(2000 mg/kg body weight) 투여군과 대조군(멸균증류수) 모두 사망동물은 관찰되지 않았으며 (표 82) 실험군과 대조군간에 체중변화에서 유의적인 변화는 관찰되지 않았으며 정상적인 체중증가를 보였다 (표 83). 또한 부검소견에서의 이상소견이 관찰 되지 않았다 (표 84). 일반증상관찰 결과 시험물질 투여군 전례에서 투여 후 1일째에 연변(Soft stool)이 관찰되었으나, 2일째에 모두 회복되었으며 나머지 대조군은 이상소견이 관찰되지 않았다. 시험물질을 투여한 후 14일간 사망 유무를 관찰한 결과 모든 시험군의 암수동물에서 로즈마리나노소재 투여에 기인된 사망은 관찰되지 않아 LD₅₀ 값은 2000 mg/kg body weight 이상인 것으로 판단된다.

표 82. 로즈마리나노소재의 단회투여에 의한 사망률 및 임상증상

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead / total)
G1	0	Male	5	Normal	0 % (0 / 5) ^a
		Female	5	Normal	0 % (0 / 5)
G2	2000	Male	5	Soft stool	0 % (0 / 5)
		Female	5	Soft stool	0 % (0 / 5)

^a : Number of dead animals / Number of tested animals

표 83. 로즈마리나노소제의 단회투여에 의한 체중변화

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Days after administration(g)				
			0	3	7	14	
G1	0	Male	Mean	180.4	193.7	228.3	286.0
			S.D.	4.5	5.4	4.2	9.3
			N	5	5	5	5
G2	2000	Male	Mean	178.6	191.0	223.9	286.8
			S.D.	5.8	5.9	8.4	8.9
			N	5	5	5	5
G1	0	Female	Mean	149.8	153.2	164.4	230.1
			S.D.	4.9	5.8	10.0	18.6
			N	5	5	5	5
G2	2000	Female	Mean	146.7	157.8	168.9	224.6
			S.D.	2.2	6.2	8.1	14.2
			N	5	5	5	5

N : Number of animals
S.D. : Standard deviation

표 84. 로즈마리나노소제의 단회투여에 의한 부검소견

Findings	Group	G1		G2	
	Dose (mg/kg B.W.)	0		2000	
	Sex	Male	Female	Male	Female
No remarkable finding		5	5	5	5

나) 반복투여 독성평가

제1협동기관에서 개발하고 제품화된 로즈마리나노소제에 대한 반복투여 독성평가를 수행하였다. 시험물질의 투여용량은 본 시험물질을 이용한 단회 경구투여 독성시험 결과에 기초하여 2000 mg/kg 을 본 시험의 고용량으로 설정하였고, 1000 mg/kg 및 500 mg/kg 을 중용량과 저용량의 투여용량으로 각각 설정하였다.

① 사망동물 및 일반증상, 체중 측정

실험기간 중 일반증상관찰 결과, 대조군 및 시험물질 투여군 암·수 모두 시험물질 투여 기간동안 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다(표 85). 체중측정 결과 대조군과 시험물질 투여군을 비교하여 통계학적으로 유의한 결과 또한 관찰되지 않았다(표 86).

② 사료섭취량 및 음수섭취량

사료섭취량 측정결과, 수컷 고용량군에서 첫 투여시 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다. 암컷 고용량군에서는 1 주차에 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가($p < 0.05$)가 관찰되었고, 2 주차에 중용량 및 고용량군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다(표 87).

음수섭취량 측정결과, 수컷은 저용량군에서 투여 시, 1주 및 2 주차에 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가($p < 0.05$)가 되었고, 중용량군에서 1 주차에 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가($p < 0.05$)가 되었으며, 고용량군에서는 1주 및 2 주차에 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다. 암컷은 저용량군에서 투여시 및 2 주차에 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가($p < 0.05$)가 되었고, 중용량군 및 고용량군에서는 투여시, 1주 및 2 주차에 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다(표 88).

그러나, 사료 및 음수섭취량에 대한 이러한 변화는 체중측정결과에서 대조군과 유의한 변화로 연결되지 않아 로즈마리나노소재 투여로 인한 독성변화는 아닌 것으로 판단된다.

③ 부검 및 장기무게

부검소견 결과, 대조군 및 시험물질 투여군에서는 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 동물은 없었다(표 89). 절대장기 및 상대장기 중량 측정결과, 수컷의 고용량군, 암컷의 중용량군 고용량군에서 간의 무게가 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다(표 90-93). 그러나 조직병리학적 검사 소견에서 특이적인 검경소견이 관찰되지 않아, 이러한 중량변화는 로즈마리나노소재 투여에 의한 독성변화는 아닌 것으로 사료된다. 나머지 장기무게에서는 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다.

④ 혈액학적 검사

혈액학적 검사 결과, 수컷은 Basophils (Baso, $103 \text{ cell}/\mu\text{L}$, %) 저용량군 및 중용량군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 감소($p < 0.05$)가 관찰되었고, 암컷은 고용량군에서 RBC indices의 항목이 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 감소($p < 0.05$)가 관찰되었다. 나머지 혈액학적 검사에서는 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다(표 85-86).

⑤ 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사 결과, 모든 시험물질투여군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다(표 94).

⑥ 조직학적 검사

신장: 신우의 결합조직에서 mast cell 침윤이 전례에서 경도로 관찰되었다. 세뇨관내에 광물질 침착례가 다수 관찰되었고 일부 예에서는 근위 세뇨관의 상피세포 세포질내에 Hyaline globules과 간질에 림파구의 침윤을 동반한 재생성 세뇨관이 관찰되었다.

간장: 전례에서 Glisson's sheath에 mast cell의 침윤과 림파구의 침윤이 정상 범위 수준에서 관찰되었으며, 일부 예에서 수외조혈상이 정상범위 내에서 관찰되었다.

그 이외에 병변은 관찰되지 않았다.

비장: 전례에서 이상소견이 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 신장에서 관찰된 mineralization, hyaline globule in proximal tubule 은 배경 병변으로 생각되며 각 군별로 차이가 보이는 병변은 관찰되지 않았으며 일부 예에서는 다른 예에서 관찰되지 않은 세뇨관의 재생을 보이는 간질성신염으로 우발 병변으로 생각된다. 간장에서 문맥주변부의 Glisson's sheath에 mast cell과 림파구의 침윤은 정상범위내에서 관찰되었으며 일부 예에서 수외 조형 소견이 관찰되었으나 이 또한 정상 범위로 생각된다. 이상의 결과로부터 처치에 의한 특정한 병변이라고 생각되는 병변은 관찰되지 않았다.

⑦ 종합평가

이상의 평가결과를 종합해보면, 나노입자 로즈마리를 암·수 rat에서 0, 500, 1000, 2000 mg/kg 의 용량으로 14일 동안 반복 경구투여 시 시험물질 투여와 관련된 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다. 그러므로 본 시험조건에서 무독성량(NOAEL ; No Observed Adverse Effect Level)은 2000 mg/kg 이며, 표적장기는 없는 것으로 사료되었다.

표 85. 로즈마리나노소제의 반복투여시의 사망률 및 임상증상

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality
G1	0	Male	5	Normal	0 % (0 / 5) ^a
G2	500	Male	5	Normal	0 % (0 / 5)
G3	1000	Male	5	Normal	0 % (0 / 5)
G4	2000	Male	5	Normal	0 % (0 / 5)
G1	0	Female	5	Normal	0 % (0 / 5)
G2	500	Female	5	Normal	0 % (0 / 5)
G3	1000	Female	5	Normal	0 % (0 / 5)
G4	2000	Female	5	Normal	0 % (0 / 5)

^a : Number of dead animals / Number of tested animals

표 86. 로즈마리나노소재의 반복투여시의 체중변화

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Weeks after administration(g)			
			0	1	2	
G1	0	Male	Mean	190.8	238.0	294.3
			S.D.	8.9	15.7	24.0
			N	5	5	5
G2	500	Male	Mean	193.9	239.3	300.5
			S.D.	6.3	8.4	9.9
			N	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	191.5	239.5	297.2
			S.D.	7.2	11.5	14.9
			N	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	192.5	235.5	297.6
			S.D.	6.5	7.4	21.0
			N	5	5	5
G1	0	Female	Mean	149.6	168.6	192.5
			S.D.	3.4	9.6	9.4
			N	5	5	5
G2	500	Female	Mean	150.4	170.9	196.0
			S.D.	7.5	8.5	9.6
			N	5	5	5
G3	1000	Female	Mean	152.3	169.3	194.3
			S.D.	6.8	12.1	8.9
			N	5	5	5
G4	2000	Female	Mean	149.1	169.5	197.9
			S.D.	4.0	6.0	2.2
			N	5	5	5

N : Number of animals,
S.D. : Standard deviation

표 87. 로즈마리나노소재의 반복투여시의 사료섭취량

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Weeks after administration(g)			
			0	1	2	
G1	0	Male	Mean	22.9	25.0	29.6
			S.D.	0.7	0.5	2.3
			N	5	5	5
G2	500	Male	Mean	23.4	28.7	30.6
			S.D.	1.1	0.4	1.0
			N	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	22.9	28.2	29.2
			S.D.	0.2	1.3	0.7
			N	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	21.1	28.9	32.1*
			S.D.	0.8	1.2	3.4
			N	5	5	5
G1	0	Female	Mean	16.9	17.6	18.0
			S.D.	0.3	1.4	0.2
			N	5	5	5
G2	500	Female	Mean	16.7	19.5	18.8
			S.D.	0.4	1.7	1.3
			N	5	5	5
G3	1000	Female	Mean	16.6	20.3*	19.9*
			S.D.	0.2	1.6	1.6
			N	5	5	5
G4	2000	Female	Mean	16.1	21.8*	21.3*
			S.D.	0.8	0.3	0.3
			N	5	5	5

N : Number of animals,

S.D. : Standard deviation

* : Significantly different from vehicle control (P<0.05) by Scheffe's test

표 88. 로즈마리나노소재의 반복투여시의 음수섭취량

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Weeks after administration(g)			
			0	1	2	
G1	0	Male	Mean	33.0	32.7	34.5
			S.D.	1.2	4.5	3.7
			N	5	5	5
G2	500	Male	Mean	38.2*	42.2*	45.3*
			S.D.	1.1	0.2	0.8
			N	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	35.5	42.4*	39.3
			S.D.	0.4	3.1	0.0
			N	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	35.3	44.9*	49.3*
			S.D.	4.0	2.2	3.9
			N	5	5	5
G1	0	Female	Mean	27.3	23.3	22.9
			S.D.	0.5	1.6	1.1
			N	5	5	5
G2	500	Female	Mean	29.6*	28.3	26.1*
			S.D.	1.2	4.8	4.7
			N	5	5	5
G3	1000	Female	Mean	30.6*	35.1*	32.2*
			S.D.	1.5	3.2	1.5
			N	5	5	5
G4	2000	Female	Mean	30.8*	39.3*	37.8*
			S.D.	0.7	0.4	0.0
			N	5	5	5

N : Number of animals,

S.D. : Standard deviation

* : Significantly different from vehicle control (P<0.05) by Scheffe's test

표 89. 로즈마리나노소재의 반복투여시의 부검소견

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Necropsy day	Finding
G1	0	Male	5	14	No remarkable finding
G2	500	Male	5	14	No remarkable finding
G3	1000	Male	5	14	No remarkable finding
G4	2000	Male	5	14	No remarkable finding
G1	0	Female	5	14	No remarkable finding
G2	500	Female	5	14	No remarkable finding
G3	1000	Female	5	14	No remarkable finding
G4	2000	Female	5	14	No remarkable finding

표 90. 로즈마리나노소재의 반복투여시의 수컷 흰쥐의 절대 장기중량

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Body weight(g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Adrenal gland(g)	Testis (g)
G1	0	Male	Mean	261.7	8.647	2.130	0.712	0.051	3.285
			S.D.	19.4	0.995	0.195	0.132	0.003	0.192
			N	5	5	5	5	5	5
G2	500	Male	Mean	265.7	9.479	2.061	0.747	0.053	3.007
			S.D.	8.9	0.463	0.179	0.088	0.007	0.477
			N	5	5	5	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	265.3	9.709	2.072	0.669	0.055	3.491
			S.D.	14.7	0.755	0.096	0.053	0.005	0.137
			N	5	5	5	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	265.2	11.163*	2.304	0.754	0.054	3.294
			S.D.	14.3	0.540	0.186	0.127	0.009	0.233
			N	5	5	5	5	5	5
Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Brain (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Epididymis (g)	Prostate* (g)	Lungs (g)
G1	0	Male	Mean	1.896	1.128	0.563	0.602	1.845	1.261
			S.D.	0.050	0.068	0.082	0.023	0.397	0.237
			N	5	5	5	5	5	5
G2	500	Male	Mean	2.030	1.125	0.549	0.588	1.906	1.255
			S.D.	0.509	0.131	0.132	0.034	0.335	0.113
			N	5	5	5	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	1.684	1.092	0.609	0.655	1.886	1.211
			S.D.	0.173	0.184	0.067	0.091	0.454	0.174
			N	5	5	5	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	1.908	1.097	0.520	0.615	1.872	1.314
			S.D.	0.101	0.059	0.202	0.035	0.294	0.205
			N	5	5	5	5	5	5

N : Number of animals.

S.D. : Standard deviation.

* : Significantly different from vehicle control (P<0.05) by Scheffe's test

표 91. 로즈마리나노소재의 반복투여시의 암컷 흰쥐의 절대 장기중량

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Body weight (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Adrenal gland (g)	Ovary (g)
G1	0	Female	Mean	172.0	5.656	1.487	0.464	0.052	0.091
			S.D.	7.7	0.295	0.080	0.039	0.006	0.026
			N	5	5	5	5	5	5
G2	500	Female	Mean	176.3	6.171	1.607	0.527	0.059	0.067
			S.D.	6.9	0.580	0.135	0.060	0.012	0.010
			N	5	5	5	5	5	5
G3	1000	Female	Mean	175.1	6.804*	1.535	0.514	0.055	0.098
			S.D.	12.7	0.635	0.128	0.079	0.006	0.018
			N	5	5	5	5	5	5
G4	2000	Female	Mean	177.7	7.697*	1.583	0.544	0.058	0.084
			S.D.	3.8	0.393	0.072	0.080	0.005	0.017
			N	5	5	5	5	5	5
Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Brain (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Uterus (g)	Lungs (g)	
G1	0	Female	Mean	1.788	0.766	0.458	0.535	1.163	
			S.D.	0.099	0.064	0.085	0.212	0.184	
			N	5	5	5	5	5	
G2	500	Female	Mean	1.789	0.831	0.430	0.537	1.218	
			S.D.	0.055	0.067	0.032	0.130	0.134	
			N	5	5	5	5	5	
G3	1000	Female	Mean	1.624	0.752	0.405	0.498	1.336	
			S.D.	0.217	0.088	0.070	0.160	0.269	
			N	5	5	5	5	5	
G4	2000	Female	Mean	1.781	0.805	0.446	0.572	1.392	
			S.D.	0.042	0.029	0.094	0.121	0.167	
			N	5	5	5	5	5	

N : Number of animals,

S.D. : Standard deviation

* : Significantly different from vehicle control (P<0.05) by Scheffe's test

표 92. 로즈마리 나노소재의 반복투여시의 수컷 흰쥐의 상대 장기중량

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Body weight	Liver (%)	Kidney (%)	Spleen (%)	Adrenal gland(%)	Testis (%)
G1	0	Male	Mean	261.7	3.306	0.813	0.270	0.020	1.260
			S.D.	19.4	0.308	0.020	0.035	0.002	0.102
			N	5	5	5	5	5	5
G2	500	Male	Mean	265.7	3.567	0.775	0.281	0.020	1.134
			S.D.	8.9	0.123	0.052	0.026	0.003	0.193
			N	5	5	5	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	265.3	3.665	0.781	0.253	0.021	1.317
			S.D.	14.7	0.300	0.011	0.025	0.001	0.023
			N	5	5	5	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	265.2	4.214*	0.868	0.283	0.020	1.243
			S.D.	14.3	0.180	0.039	0.034	0.004	0.078
			N	5	5	5	5	5	5
Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Brain (%)	Heart (%)	Thymus (%)	Epididymis(%)	Prostate*	Lungs (%)
G1	0	Male	Mean	0.728	0.432	0.215	0.231	0.700	0.483
			S.D.	0.055	0.018	0.022	0.019	0.106	0.088
			N	5	5	5	5	5	5
G2	500	Male	Mean	0.760	0.423	0.206	0.221	0.716	0.473
			S.D.	0.166	0.037	0.044	0.013	0.116	0.054
			N	5	5	5	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	0.636	0.410	0.230	0.247	0.706	0.455
			S.D.	0.075	0.049	0.027	0.035	0.137	0.049
			N	5	5	5	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	0.720	0.414	0.194	0.232	0.706	0.496
			S.D.	0.038	0.009	0.067	0.012	0.105	0.072
			N	5	5	5	5	5	5

N : Number of animals,

S.D. : Standard deviation,

* : Significantly different from vehicle control (P<0.05) by Scheffe's test

표 93. 로즈마리나노소제의 반복투여시의 암컷 흰쥐의 상대 장기중량

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Body weight	Liver (%)	Kidney (%)	Spleen (%)	Adrenal gland (%)	Ovary (%)
G1	0	Female	Mean	172.0	3.289	0.865	0.270	0.030	0.053
			S.D.	7.7	0.138	0.042	0.015	0.005	0.017
			N	5	5	5	5	5	5
G2	500	Female	Mean	176.3	3.501	0.912	0.299	0.033	0.038
			S.D.	6.9	0.314	0.071	0.025	0.006	0.006
			N	5	5	5	5	5	5
G3	1000	Female	Mean	175.1	3.882*	0.877	0.293	0.032	0.056
			S.D.	12.7	0.119	0.048	0.036	0.003	0.010
			N	5	5	5	5	5	5
G4	2000	Female	Mean	177.7	4.333*	0.891	0.305	0.033	0.047
			S.D.	3.8	0.229	0.038	0.041	0.003	0.010
			N	5	5	5	5	5	5
Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		Brain (%)	Heart (%)	Thymus (%)	Uterus (%)	Lungs (%)	
G1	0	Female	Mean	1.040	0.446	0.265	0.311	0.674	
			S.D.	0.051	0.038	0.043	0.118	0.091	
			N	5	5	5	5	5	
G2	500	Female	Mean	1.017	0.471	0.244	0.304	0.692	
			S.D.	0.060	0.033	0.011	0.068	0.077	
			N	5	5	5	5	5	
G3	1000	Female	Mean	0.933	0.429	0.233	0.290	0.762	
			S.D.	0.152	0.027	0.046	0.111	0.144	
			N	5	5	5	5	5	
G4	2000	Female	Mean	1.003	0.453	0.251	0.322	0.783	
			S.D.	0.031	0.020	0.052	0.066	0.090	
			N	5	5	5	5	5	

N : Number of animals,

S.D. : Standard deviation,

* : Significantly different from vehicle control (P<0.05) by Scheffe's test

표 94. 로즈마리나노소재의 반복투여시의 수컷 흰쥐의 혈액학적 검사

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		RBC (x10 ⁶ cells/ul)	HGB (g/dl)	HCT %	RBC Index			PLT (x10 ³ cells/ul)
							MCV (fL)	MCH pg	MCHC g/dl	
G1	0	Male	Mean	8.09	15.1	48.9	60.4	18.7	30.9	1253
			S.D.	0.24	0.6	1.1	1.2	0.6	0.5	123
			N	5	5	5	5	5	5	5
G2	500	Male	Mean	7.20	13.6	44.0	61.1	18.9	30.8	838
			S.D.	0.85	1.6	5.2	1.1	0.4	0.5	505
			N	5	5	5	5	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	7.58	14.1	45.7	60.3	18.6	30.9	1149
			S.D.	0.32	0.6	2.0	1.6	0.7	0.5	111
			N	5	5	5	5	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	7.26	13.9	45.2	62.3	19.1	30.6	924
			S.D.	0.49	0.7	2.6	1.5	0.6	0.5	488
			N	5	5	5	5	5	5	5
Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		WBC (x10 ⁶ cells/ul)	WBC Differential Counting (%)					
					Neut	Lymph	Mono	Eos	Baso	
G1	0	Male	Mean	5.90	8.3	87.9	2.0	0.8	0.5	
			S.D.	1.82	2.0	2.3	0.9	0.3	0.1	
			N	5	5	5	5	5	5	
G2	500	Male	Mean	5.32	10.1	85.8	2.4	1.0	0.2*	
			S.D.	2.49	1.3	1.6	0.8	0.2	0.1	
			N	5	5	5	5	5	5	
G3	1000	Male	Mean	5.23	11.6	83.7	2.6	1.4	0.2*	
			S.D.	1.71	2.8	3.8	0.7	1.1	0.1	
			N	5	5	5	5	5	5	
G4	2000	Male	Mean	4.98	12.0	84.1	2.4	0.8	0.4	
			S.D.	1.65	2.2	1.7	0.7	0.4	0.2	
			N	5	5	5	5	5	5	

N : Number of animals,

S.D. : Standard deviation

* : Significantly different from vehicle control (P<0.05) by Scheffe's test

표 95. 로즈마리나노소재의 반복투여시의 암컷 흰쥐의 혈액학적 검사

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		RBC (x10 ⁶ cells/ul)	HGB (g/dl)	HCT %	RBC Index			PLT (x10 ³ cells/ul)
							MCV (fL)	MCH pg	MCHC g/dl	
G1	0	Female	Mean	7.92	14.7	46.7	58.9	18.6	31.5	1229
			S.D.	0.28	0.5	1.7	0.9	0.4	0.5	152
			N	5	5	5	5	5	5	5
G2	500	Female	Mean	7.70	14.3	46.3	60.1	18.6	31.0	1187
			S.D.	0.36	0.5	2.4	2.0	0.3	0.9	191
			N	5	5	5	5	5	5	5
G3	1000	Female	Mean	7.53	14.2	45.0	59.7	18.8	31.4	1323
			S.D.	0.29	0.6	1.7	0.5	0.2	0.5	146
			N	5	5	5	5	5	5	5
G4	2000	Female	Mean	7.30*	13.7	43.7	59.9	18.8	31.4	1326
			S.D.	0.27	0.4	0.8	1.4	0.4	0.5	105
			N	5	5	5	5	5	5	5

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		WBC (x10 ⁶ cells/ul)	WBC Differential Counting (%)				
					Neut	Lymph	Mono	Eos	Baso
G1	0	Female	Mean	3.80	9.8	86.3	1.8	1.4	0.4
			S.D.	0.65	3.0	2.8	0.6	0.3	0.1
			N	5	5	5	5	5	5
G2	500	Female	Mean	3.19	7.7	88.3	1.7	1.6	0.4
			S.D.	1.49	1.8	2.5	0.5	0.8	0.2
			N	5	5	5	5	5	5
G3	1000	Female	Mean	4.12	9.1	87.9	1.4	0.9	0.3
			S.D.	0.91	3.3	3.6	0.5	0.1	0.2
			N	5	5	5	5	5	5
G4	2000	Female	Mean	3.36	10.2	87.1	1.2	1.0	0.2
			S.D.	0.33	3.3	3.8	0.3	0.5	0.1
			N	5	5	5	5	5	5

N : Number of animals,

S.D. : Standard deviation,

* : Significantly different from vehicle control (P<0.05) by Scheffe's test

표 96. 로즈마리나노소제의 반복투여시의 혈액생화학적 검사

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		BUN mg/dl	CREA mg/dl	T-BIL mg/dl	GOT u/l	GPT u/l	ALP u/l	GGT u/l
G1	0	Male	Mean	18	0.93	0.32	117	38	315	1
			S.D.	1	0.07	0.06	21	10	60	1
			N	5	5	5	5	5	5	5
G2	500	Male	Mean	21	1.02	0.38	124	40	346	0
			S.D.	3	0.09	0.06	25	10	109	0
			N	5	5	5	5	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	17	0.86	0.33	120	34	242	1
			S.D.	3	0.09	0.05	21	7	39	1
			N	5	5	5	5	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	18	0.89	0.33	107	35	254	1
			S.D.	2	0.15	0.04	26	6	57	0
			N	5	5	5	5	5	5	5
Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex		BUN mg/dl	CREA mg/dl	T-BIL mg/dl	GOT u/l	GPT u/l	ALP u/l	GGT u/l
G1	0	Female	Mean	20	0.93	0.35	143	26	216	1
			S.D.	1	0.07	0.09	20	5	71	1
			N	5	5	5	5	5	5	5
G2	500	Female	Mean	17	0.94	0.37	135	25	175	1
			S.D.	1	0.15	0.08	23	4	40	1
			N	5	5	5	5	5	5	5
G3	1000	Female	Mean	18	0.89	0.35	129	23	156	1
			S.D.	1	0.05	0.05	26	4	20	1
			N	5	5	5	5	5	5	5
G4	2000	Female	Mean	18	0.94	0.36	115	27	157	1
			S.D.	4	0.10	0.07	16	7	27	1
			N	5	5	5	5	5	5	5

N : Number of animals,
S.D. : Standard deviation

(4) 안전성 평가 보고서

가) 안전성 평가 방법

① 로즈마리나노소재의 제조

로즈마리추출물 분말을 95% 에탄올에 용해시켜 20% (w/v) 용액으로 준비하고, 분지텍스트린은 증류수에 용해시켜 1~30% (w/v) 농도가 되도록 준비하였다. 두 용액은 최종적으로 로즈마리추출물 1% (w/v), 분지텍스트린 0.5~30% (w/v), 용매는 5% 에탄올이 되도록 혼합한다. 빛을 차단한 상태로 25°C에서 24시간 동안 교반하여 나노복합체를 제조하였다.

② 물리화학적 특성 분석

나노복합체의 형성 및 물리화학적 특성은 XRD, FESEM 및 DLS를 통해 분석되었다. 로즈마리추출물, 분지텍스트린, 물리적 혼합물 및 고체 복합체의 X선 회절 (SmartLab, Japan) 패턴은 2θ 각도로 5~40° 범위에서 0.5sec/step 속도의 스캔 조건에서 얻어졌다. FESEM (SUPRA, Germany)은 각 샘플의 표면 특성을 확인하기 위해 사용되었으며, 각 샘플을 백금 코팅한 후 2차 전자 검출기 모드에서 이미지를 관찰하였다. 나노복합체의 입도 분석은 고체 복합체 1% (w/v)를 증류수에 용해시켜 동적 광산란법(DLS)으로 측정하였으며, 대조군은 고체 복합체에 포함된 로즈마리추출물의 중량비와 동일한 양의 로즈마리추출물 단독 물질을 증류수에 용해시켜 측정하였다.

③ 단회투여 독성시험

단회투여 독성평가를 위해 16시간 이상 절식시킨 후, 암수 10마리씩 대조군과 시험군에 각각 멸균증류수와 로즈마리나노소재(2000 mg/kg body weight)를 1회 경구 투여하고 4시간째까지 일반증상을 관찰하고 사료를 공급하였으며 음수는 자유섭취시켰다. 투여 당일에는 투여 후 30 분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간째까지 각 개체별로 일반증상을 관찰하였고, 투여 후 14일까지 매일 1회 이상 일반증상관찰을 수행하였다. 또한 체중은 투여 후 3일, 7일 14일에 측정하였다.

④ 반복투여 독성시험

반복투여 독성평가를 위하여 0 (대조군), 500, 1000, 2,000 mg/kg B.W.의 용량으로 14일 동안 매일 동일한 시간에 반복 투여하였다. 일반증상은 시험기간 중 매일 2 회씩(투여전, 투여후) 관찰하였으며, 첫 투여 당일에는 투여 후 4 시간까지 매 시간마다 관찰하였다. 일반증상관찰은 14 일까지 실시하였다. 체중은 입수일, 군분리일, 투여당일(투여 전), 매 주 1 회 및 부검(절식 후)시 체중을 측정하였다. 사료 섭취량과 음수 섭취량은 투여 개시 후 매 주 1 회 측정하였다. 관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대하여 채혈 및 안락사 시킨 다음 체표 및 모든 체공, 두개강, 흉강 및 복강의 모든 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 특히, 간, 신장, 비장, 부신, 고환, 난소, 뇌, 심장, 흉선, 부고환, 자궁, 응고선을 포함한 정낭+전립선에 대한 중량을 측정하였고, 절식체중에 대한 상대장기중량비(%)를 산출하였다. 좌우가 있는 장기는 좌우를 별도로 측정하여 무게를 합산하여 산출하였다. 모든 동물에 대하여 채혈 전에 약 18 시간이상 절식시킨 실험동물을 isoflurane를

이용하여 마취시킨 후 복대동맥으로부터 채혈하였다. 혈액학적 검사를 위해 채취한 혈액은 EDTA가 함유된 CBC bottle에 취하여 혈액분석기(ADVIA 2120i, Siemens, Germany)를 이용하여 다음의 항목들을 측정하였다: white blood cell count, differential leucocyte count, red blood cell count, hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), RBC indices, platelet. 혈액검사에 사용된 혈액을 제외한 나머지의 혈액을 실온에서 응고시킨 다음 원심분리(3000 rpm, 10 분)하여 혈청을 취한 후 생화학분석기(TBA-40FR, TOSHIBA, Japan)를 이용하여 다음과 같이 측정하였다: total bilirubin, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma glutamyl-transferase, creatinine, blood urea nitrogen. 조직병리학적 검사를 위해서 모든 동물을 개체별로 간, 신장, 비장을 적출한 다음 10 % neutral buffered formalin에 고정하고, 고정된 장기·조직 중, 대조군 및 고용량군의 모든 개체의 장기에 대해서는 탈수·파라핀침투, 조직의 파라핀 포매, 박절 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 검체슬라이드를 제작하여 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하였다. 검체제작 후 잔여 장기·조직 및 고정 장기·조직은 10 % neutral buffer formalin에 하였다.

⑤ 유전독성시험 - 복귀돌연변이 시험

로즈마리나노소재에 대한 돌연변이 유발성 여부를 판단하기 위하여 히스티딘 요구성 균주인 살모넬라균 4종(*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537), 트립토판 요구성 균주인 대장균 1종(*Escherichia coli* WP2uvrA)을 이용하여 복귀돌연변이 시험을 진행하였다. 최고용량을 5,000 μ g/plate로 설정하고 공비4(1250, 313, 78.1 및 19.5 μ g/plate)를 해당 균주용 agar 배지에 균주와 함께 처리하여 48시간 배양한 후, 복귀변이 콜로니에 대한 육안계측을 하여 돌연변이 여부를 판단하였다.

⑥ 유전독성시험 - 체외염색체이상시험

로즈마리나노소재에 대한 염색체이상 유발여부를 판단하기 위하여 검출강도가 높은 Chinese hamster lung(CHL/IU) 세포주를 이용하여 염색체이상시험을 진행하였다. 최고용량을 5,000 μ g/mL로 설정하고 이하 8농도(2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1, 및 19.5 μ g/mL)로 용량설정시험을 실시하여 세포증식을 50% 이상 억제하는 용량을 본 시험의 최고농도로 설정하였다. 설정된 최고농도를 바탕으로 공비2-3용량의 시험물질균을 세포주에 처리하고 18-24시간 배양한 후, 200개 세포주에 대한 염색체 구조이상 및 수적이상 여부를 관측하여 염색체 이상여부를 판단하였다.

⑦ 유전독성시험 - 체내소핵시험

로즈마리나노소재에 대한 소핵유발여부를 판단하기 위하여 소핵유발에 감수성이 우수한 ICR 마우스를 이용하여 소핵시험을 진행하였다. 최고용량을 2,000mg/kg로 설정하고 공비 2-2용량(1,000, 500 mg/kg)의 시험물질을 단회경구투여 후 24, 48, 및 72시간에 골수를 채취하여 소핵다염성적혈구의 출혈빈도를 육안관측하여 소핵유발여부를 판단하였다.

나) 안전성 평가 결과

① 입도 분석

로즈마리나노소재를 DLS 분석을 통해 입자크기를 측정된 결과, 985.7 ± 29.3 nm의 평균 직경을 나타내었으며 0.343의 PDI를 나타냈다.

② 결정학적 특성(XRD)

로즈마리추출물과 분지텍스트린 사이의 분자 상호작용 및 복합체 형성을 확인하기 위해 X선 회절 분석이 수행되었다. 로즈마리추출물은 결정성 패턴을 나타내었고 분지텍스트린은 자연적인 무정형 특성을 보였다. 물리적 혼합물에서는 로즈마리추출물의 결정질 피크가 분지텍스트린의 무정형 패턴에 중첩되어 약간 감소되어 나타났다. 한편, 로즈마리나노소재의 회절패턴에서는 로즈마리추출물에 상응하는 결정질 피크가 완전히 사라지고 무정형 패턴만이 관찰되었다. 또한 분지텍스트린의 회절 패턴에서 20° 부근에서 나타난 넓게 굴곡진 패턴이 복합체에서는 좀 더 넓게 확장되었다. 로즈마리추출물과 분지텍스트린의 물리적 혼합물과 고체 복합체의 상이한 결정성은 두 물질간의 분자 상호 작용에 의해 야기되며 따라서 두 물질이 복합체를 형성하였음을 의미한다.

③ 표면특성(FESEM)

로즈마리추출물은 불규칙한 모양의 결정 입자로 나타났으며 이는 XRD 분석에서 결정성 특성을 나타내는 결과와 일치한다. 분지텍스트린은 분무 건조된 분말에서 일반적으로 관찰되는 무정형 구형 입자를 나타내었다. 로즈마리추출물과 분지텍스트린의 물리적 혼합물에서는 두 입자가 원래의 형태를 유지하는 것으로 관찰되었다. 반면 로즈마리나노소재의 표면 형태는 두 입자의 원래 형태와는 상당히 다른 불규칙한 입자 형태로 관찰되었다. 복합체의 형태는 일정한 모양을 나타내지 않았으며, 다양한 크기와 밀도를 보였다. 또한 작은 입자가 큰 입자의 표면에 부착된 형태도 발견되었다. 복합체는 로즈마리추출물의 손실 및 분지텍스트린의 형태학적 외관에서 명백한 변화를 나타내었으며, 이는 일반적으로 분자 간 상호 작용의 증거로 간주되어진다.

④ 단회투여 독성시험 결과

시험 기간동안 로즈마리나노소재(2000 mg/kg body weight) 투여군과 대조군(멸균증류수) 간에 체중변화에서 유의적인 변화는 관찰되지 않았으며 정상적인 체중증가를 보였다. 또한 부검소견에서의 이상소견이 관찰 되지 않았다. 일반증상관찰 결과 시험물질 투여군 전례에서 투여 후 1일째에 연변(Soft stool)이 관찰되었으나, 2일째에 모두 회복되었으며 나머지 대조군은 이상소견이 관찰되지 않았다. 시험물질을 투여한 후 14일간 사망 유무를 관찰한 결과 모든 시험군의 암수동물에서 로즈마리나노소재 투여에 기인된 사망은 관찰되지 않아 LD₅₀ 값은 2000 mg/kg body weight 이상인 것으로 판단된다.

⑤ 반복투여 독성시험 결과

실험기간 중 일반증상관찰 결과, 대조군 및 시험물질 투여군 암·수 모두 시험물질 투여 기간동안 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 체중측정 결과 대조군과 시험물질 투여군을 비교하여 통계학적으로 유의한 결과 또한 관찰되지 않았다. 사료 및 음수섭취량에 일부 유의적인 차이를 나타내기도 하지만, 이러한 변화는 체중측정결과에서 대조군과 유

의한 변화로 연결되지 않아 로즈마리나노소재 투여로 인한 독성변화는 아닌 것으로 판단된다. 부검소견 결과, 대조군 및 시험물질 투여군에서는 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰된 동물은 없었다. 절대장기 및 상대장기 중량 측정결과, 일부 간 무게가 유의적으로 증가되었으나 조직병리학적 검사 소견에서 특이적인 검경소견이 관찰되지 않아, 이러한 중량변화는 로즈마리나노소재 투여에 의한 독성변화는 아닌 것으로 사료된다. 나머지 장기무게에서는 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다.

혈액학적 검사 결과, 수컷은 Basophils (Baso, 103 cell/ μ L, %) 저용량군 및 중용량군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 감소($p < 0.05$)가 관찰되었고, 암컷은 고용량군에서 RBC indices의 항목이 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 감소($p < 0.05$)가 관찰되었다. 나머지 혈액학적 검사에서는 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다. 혈액생화학적 검사 결과, 모든 시험물질투여군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다.

조직병리 검사 결과, 신장에서 관찰된 mineralization, hyaline globule in proximal tubule은 배경 병변으로 생각되며 각 군별로 차이가 보이는 병변은 관찰되지 않았다. 간장에서 문맥주변부의 Glisson's sheath에 mast cell과 림파구의 침윤은 정상범위내에서 관찰되었으며 일부 예에서 수외 조형 소견이 관찰되었으나 이 또한 정상 범위로 생각된다. 이상의 결과로부터 처치에 의한 특정한 병변이라고 생각되는 병변은 관찰되지 않았다.

이상을 종합한 결과, 나노입자 로즈마리를 암·수 rat에서 0, 500, 1000, 2000 mg/kg의 용량으로 14일 동안 반복 경구투여 시 시험물질 투여와 관련된 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다. 그러므로 본 시험조건에서 무독성량(NOEL ; No Observed Adverse Effect Level)은 2000 mg/kg이며, 표적장기는 없는 것으로 사료되었다.

⑥ 유전독성 - 복귀돌연변이시험 결과

로즈마리 나노소재에 대한 미생물의 돌연변이 유발성 여부를 판단하기 위하여 복귀돌연변이시험을 진행하였다. 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 모든 조건에서 각각의 군주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다. 한편 모든 양성대조군에서의 콜로니수는 음성대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었으므로 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다. 따라서 로즈마리 나노소재는 본 시험 조건하에 사용한 군주들에 대해 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로부터 음성으로 판단하였다.

⑦ 유전독성 - 체외염색체이상시험 결과

로즈마리 나노소재에 대해 염색체의 구조적 이상 유발 여부를 판단하기 위하여 염색체 이상시험을 진행하였다. 본 시험결과, 단시간처리법 및 연속처리법에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 하지만, 단시간처리법의 대사활성계 미적용군의 250 μ g/ml에서 9.0%, 단시간처리법의 대사활성계 적용군의 340 μ g/ml에서 18.7%의 염색체 수적이상을 가진 세포의 출현빈도를 확인하였다. 따라서 나노소재는 본 시험 조건하에서 사용한 세포에 대해 염색체 수적이상을 유발하는 것으로부터 의양성으로 판단된다.

로즈마리의 지표성분인 Carnosic acid는 결장선암세포주의 세포분열주기 중 G2주기를 지연시키고, cyclin A 단백질 생성을 억제하면서 세포분열을 억제하고, 항암활성을 나타낸

다고 보고되었다. 따라서, 로즈마리 나노소재는 포집된 코어소재에 의해 세포의 특정주기에서 지연된 상태로 느리게 분열이 일어났기 때문에 결과관측시기에 염색체 수적이상이 관측된 것으로 판단된다. 본 시험결과 염색체 수적이상이 발생되지 않는 250 µg/ml 미만인 농도에서 활용 시 문제없을 것으로 사료된다.

⑧ 유전독성 - 체내소핵시험 결과

로즈마리 나노소재에 대한 골수 및 말초혈액 세포의 염색체 손상 또는 세포분열 이상 유발 여부를 판단하기 위하여 소핵시험을 진행하였다. 시험물질 처리군의 다염성적혈구 (polychromatic erythrocyte) 중 소핵다염성적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 또한, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 한편 모든 양성대조군에서의 콜로니수는 음성대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었으므로 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다. 따라서 시생산된 로즈마리 나노소재는 본 시험 조건하에 사용한 마우스 골수세포의 소핵유발성은 없는 것으로부터 음성으로 판단하였다.

다) 고찰 및 결론

본 연구에서는 로즈마리추출물과 분지텍스트린을 이용하여 로즈마리나노소재를 제조(입자크기: 985.7nm)하였다. 이에 대해 안전성을 평가하기 위하여 단회 및 반복투여 독성을 시험하였으며 유전독성을 평가하기 위해 복귀돌연변이시험, 체외염색체이상시험, 체내소핵시험을 실시하였다. 그 결과 단회 및 반복독성투여의 모든 암수동물에서 로즈마리나노소재의 투여에 기인된 사망은 관찰되지 않았으며 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중변화를 초래하지 않았다. 또한 혈액학적 및 혈액생화학적, 조직병리 검사 모두에서 로즈마리나노소재투여와 관련된 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 유전독성시험결과, 로즈마리나노소재는 복귀돌연변이와 마우스 골수세포의 소핵유발성을 나타내지 않았으며 체외염색체이상시험 결과에서는 염색체 수적이상이 발생되지 않는 250 µg/ml 미만인 농도에서 활용 시 문제없을 것으로 판단된다. 따라서 단회 및 반복투여 독성과 유전독성으로 인한 영향을 나타내지 않으며 안전한 것으로 판단되었다.

제 3 절. 연구개발성과

1. 요약표

(단위 : 건수)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I							논 문 평 균 IF
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건				
가중치																				
최종목표	4	3		1		3	2		2		2	5	2		9	2	3	3	5	1
1 차 년 도	목 표	1											1		3					
	실 적	2										1			7		2			
2 차 년 도	목 표	1	1						1			2			3	1	1	1		
	실 적	5	1						1			2	1		7	1	1	1		
3 차 년 도	목 표	2	2		1	2			1	2	2				3	1	1	2	1	1
	실 적	3	2		2	2			1	2	2	1			5	1	3	2	1	2
소 계	목 표	4	3		1	2			2	2	4	1			9	2	2	3	1	1
	실 적	10	3		2	2			2	2	5	3			19	2	6	3	1	2
종료 1차년도							1					1	1				1		1	
종료 2차년도						1	1												1	
종료 3차년도																			1	
종료 4차년도																			1	
종료 5차년도																				
소 계						1	2					1	1				1		4	
합 계	10	3		2		3	2		2		2	5	3		19	2	6	3	5	2

2. 항목별 세부 연구개발성과

가) 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부	게재일
1	Improving solubility, stability, and cellular uptake of resveratrol by nano encapsulation with chitosan and γ -poly (glutamic acid)	COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES	전영욱	147	네덜란드	ELSEVIER	SCI	2016.07.30
2	감마오리자놀 함유 칼슘-펙틴 미세 및 나노캡슐의 제조와 입자 크기에 따른 캡슐특성	한국식품과학회지	이슬	49(1)	한국	한국식품과학회	비SCI	2017.02.28
3	Physicochemical interactions of cycloamylose with phenolic compounds	Carbohydrate polymers	노신정	174	영국	ELSEVIER	SCI	2017.07.10
4	Effect of xanthan gum on lipid digestion and bioaccessibility of β -carotene-loaded rice starch-based filled hydrogels	Food research international	박신제	105	네덜란드	ELSEVIER	SCI	2018.03.01
5	Emulsifier dependent in vitro digestion and bioaccessibility of β -carotene loaded in oil-in-water emulsions	Food biophysics	박신제	13(2)	독일	Springer verlag	SCIE	2018.03.03
6	UV and storage stability of retinol contained in oil-in-water nanoemulsions	Food chemistry	박희수	272	네덜란드	ELSEVIER	SCI	2018.08.20
7	feasibility and characterization of the cycloamylose production from high amylose corn starch	Cereal chemistry	박지운	2018	미국	AACC international	SCI	2018.09.04
8	Exploring Binding Mechanisms between Curcumin and Silkworm 30Kc19 Protein Using Spectroscopic Analyses and Computational Simulations	Biotechnology and Bioprocess Engineering	라작	2018	한국	한국생물공학회	SCIE	2018.09.18

나) 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국식품과학회 학술대회	이경현	2016.08.17	대구 엑스코	대한민국
2	2016 IuFoST	노신정	2016.08.23	더블린	아일랜드
3	2016 IuFoST	박지운	2016.08.23	더블린	아일랜드
4	2015 한국공업화학회 추계학술대회	Md. Abdul Razzak	2015.11.04	제주	대한민국
5	2015 한국식품과학회 추계학술대회	Md. Abdul Razzak	2015.11.24	서울	대한민국
6	2016 TechConnect World Innovation, National Innovation Summit and National SBIR/STTR Conference	최신식	2016.5.23.~25	워싱턴	미국
7	Institute of Biological Engineering 2016 (초청강연)	최신식	2016.04.08	그린빌	미국
8	한국식품과학회 학술대회	이경현	2017. 06. 22	제주	대한민국
9	한국산업식품공학회 학술대회	박신제	2017. 04. 21	서울대학교	대한민국
10	한국식품과학회 학술대회	박신제	2017. 06. 21	제주	대한민국
11	한국식품과학회 학술대회	박지운	2017. 06. 23	제주	대한민국
12	2017 IFT Annual Meeting	박지운	2015.06.27	라스베거스	미국
13	한국생물공학회 학술대회	MD. Abdul Razzak	2017. 04. 07	경주	대한민국
14	한국생물공학회 학술대회	Arvie Camille DE GUZMAN	2017. 04. 07	경주	대한민국
15	한국생물공학회 학술대회	Md. Abdul Razzak	2017.10.13	부산 벅스코	대한민국
16	산업식품공학회 학술대회	박신제	2018.04.27	서울여대	대한민국
17	한국식품과학회 학술대회	박지운	2018.06.27	부산 벅스코	대한민국
18	한국식품과학회 학술대회	이은지	2018.06.27	부산 벅스코	대한민국
19	2018 IFT Annual Meet	박지운	2018.07.18	시카고	미국

다) 특허출원 및 등록

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	번호	등록인	등록일	번호	
1	오브알부민 나노복합입자 및 이의 제조방법	대 한 민 국	명지대 학교 산학협 력단	2016- 06-29	10-201 6-0081 488				100%
2	에스트로겐과 유사한 작용 효과를 갖는 청미래덩굴 뿌리 추출물 조성물	대 한 민 국	(주)다인 소재	2016- 08-08	10-201 6-0100 573				100%
3	섬기린초에서 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부미백 또는 피부 과색소성 질환의 예방 및 개선용 조성물	대 한 민 국	(주)다 인소재	2016- 10-21	10-201 6-0137 607				100%

4	섬기린초에서 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부미백 또는 피부 과색소성 질환의 예방 및 개선용 조성물	대한민국				(주)다인 소재	2017-06-15	10-1749497	100%
5	Composition for skin whitening or for preventing and alleviating skin hyperpigmentation disorder comprising compound isolated from sedum takesimense as effective ingredient	국제특허	(주)다인 소재	2017-05-26	PCT/KR 2017/005514				100%
6	섬기린초추출물과 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물	대한민국	(주)다인 소재	2017-07-21	10-2017-0092495				100%
7	글라브리딘-제인 복합체 나노입자, 이의 제조방법 및 이의 용도	대한민국	명지대학교 산학협력단	2017-08-02	10-2017-0098224				100%
8	카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체 및 그 제조방법	대한민국	서울대학교 산학협력단	2017-08-11	10-2017-0102441				100%
9	에스트로겐과 유사한 작용 효과를 갖는 청미래덩굴 뿌리 추출물 조성물	대한민국				(주)다인 소재	2017-11-06	10-1796677	100%
10	카르노스산 내포 분지텍스트린 복합체 및 그의 제조방법	대한민국	서울대학교 산학협력단	2018-09-10	10-2018-0107694				100%
11	글라브리딘-제인 복합체 나노입자, 이의 제조방법 및 이의 용도	대한민국				명지대학교 산학협력단	2018-09-20	10-1902846	100%
12	섬기린초 추출물 탄수화물 나노복합체 및 이의 제조방법	대한민국	명지대학교 산학협력단	2018-10-10	10-2018-0120675				100%
13	섬기린초 추출물 단백질 나노복합체 및 이의 제조방법	대한민국	명지대학교 산학협력단	2018-10-10	10-2018-0120674				100%

라) 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	이경미	2016		○				○	○				
2	김진호	2016		○			○		○				
3	이경현	2017		○				○	○				
4	홍성은	2018		○				○	○				
5	조은성	2018		○				○	○				
6	한유경	2018		○				○	○				

마) 기술이전

No	개발기관	이전기관	이전일자	이전 기술명
1	서울대학교	(주)다인소재	2018-11-09	카르노스산 내포 분지텍스트린 복합체 및 그의 제조방법
2	명지대학교	(주)다인소재	2018-11-07	섬기린초 추출물 단백질 나노복합체 및 이의 제조방법

바) 기술인증

No	소재명	인증기관	인증일자	인증항목
1	로즈마리 나노소재	한국화학융합시험연구원	2018-07-31	나노소재 항균력 공인인증
2	섬기린초 나노소재	한국화학융합시험연구원	2018-07-31	나노소재 항균력 공인인증

사) 제품화

No	소재명	제품화기관	세부내용
1	허브추출물 NP	(주) 다인소재	서울대학교 기술이전 통한 로즈마리 나노소재 제품화
2	섬기린 THC	(주) 다인소재	명지대학교 기술이전 통한 섬기린초 나노소재 제품화

아) 기타

No	분류	건수	기관	일자	세부내용
1	고용창출	2건	(주)다인소재	2017-04-01	고용대상: 조영민 고용목적: 나노소재기반 천연보존소재영업
			(주)다인소재	2018-04-01	고용대상: 김이슬 고용목적: 나노소재 pilot 생산
2	교육지도	2건	서울대학교	2017-03-14	교육주제: Cycloamylose의 효소적 생산방법 및 기능성물질을 포함한 나노복합체 제조기술 교육목적: 나노소재 산업화위한 기술전수
			한양대학교	2018-08-	교육주제: 나노소재 효능 및 안전성 평가 교육목적: 나노소재 올바른 평가방법 전수
3	정책건의	3건	한양대학교	2017-03-31	주관부처: 한국해양과학기술진흥원 시책명: 2017 해양수산R&D 기술수요조사 기술목적: 생리활성가치는 해양수산물의 생리활성 규명과 나노소재화를 통한 안정성 및 기능성 증진
			서울대학교	2018-03-03	주관부처: 농림부 시책명: 2018년 농림축산식품부, 농촌진흥청 공동 기술수요조사 기술목적: 자생식물추출물 기능성증진위한 새로운 전달시스템 기술개발
			명지대학교	2018-04-27	주관부처: 과학기술정보통신부 시책명: 2018년 바이오 의료기술개발사업 수요조사 기술목적: 저분자화합물-단백질 나노복합체 생산공정확립 통한 고부가가치 소재 개발
4	홍보전시	1건	(주)다인소재	2018-05-04	박람회명: Seoul food 2018 전시품목: 제품화 나노소재 시제품 2종 보고서 기고 저널명: 식품산업과 영양
5	전문연구보 고서	2건	한양대학교	2018-06-01	주요내용: 키토산기반 전달시스템을 이용한 식품성분의 나노캡슐화
			다인,서울,명지	2018-09-14	보고서 기고 저널명: 식품과학과 산업 주요내용: 식품산업용 천연항균소재와 나노기술

제 4 절. 연구결과

1. 기술적 성과

개발기술명	관련기술 최고보유국	기술수준 비교		기술개발 도달수준	연관 연구실적물
		우리나라	연구신청팀		
천연 항균/항산화소재 내포 탄수화물 기반 나노복합체 개발	일본	70%	70%	90%	기술실시(이전) 1건 SCI 논문 2건
천연 항균/항산화 소재 내포 나노에멀전 개발	일본	50%	80%	90%	SCI 논문 1건 SCIE 논문 1건
나노복합체와 나노에멀전 기술을 접목한 멀티나노소재 제조공정 개발	미국	70%	70%	90%	
나노소재화를 위한 단백질, 지질 보조제	미국, 유럽	60%	70%	80%	기술실시(이전) 1건
나노소재화 공정 기술 개발	미국, 유럽	50%	60%	90%	SCIE 논문 1건
나노소재화 공정 최적화 및 제형화	미국, 유럽	60%	70%	90%	

2. 사업화 성과

가) 사업화성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	3억원
		관련제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	9억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 0.1 % 국외 : 0 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 0.3 % 국외 : 0.05 %

나) 사업화계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	약 1년			
	소요예산(백만원)	200			
	예상 매출규모 (백만원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	300	1,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	0.1	0.3
		국외	0	0	0.1
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	탄수화물 및 단백질 기반 나노소재 제조기술을 바탕으로 체내 흡수율을 높인 건강기능식품 소재 개발계획을 가지고 있음				

제 5 절. 세부과제별 연구결과 요약 및 고찰

1. 주관기관 ((주) 다인소재): 고순도 코어소재 확보 및 나노소재의 식품응용연구와 유전독성평가

가. 1차년도

1차년도 주관기관 연구개발 목표는 나노화용 천연 항균/항산화소재 제조공정 확립 및 유효성분 규격화와 안전성평가(유전독성 시험)이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- 나노화를 위한 코어소재로서 고순도 감초추출물, 로즈마리추출물, 토복령추출물, 섬기린초추출물의 제조공정을 원가 절감 방법을 반영하여 확립
- 4종의 원물 및 코어 소재의 유효성분 및 항균력 MIC값 규격화 (토복령추출물의 항효모활성물질은 분리정제 및 구조동정을 통하여 dioscin임을 밝혔으며, 이 성분으로 규격화 확보, 섬기린초 추출물은 유효성분인 ST-7 (1,2,4,6-tetra-O-galloyl- β -glucose)을 시약으로 판매하지 않으므로 원물에서 분리정제 후 규격화용 표준물질로 사용하여 규격화 확보)
- 생산원가 절감을 위한 원료 수급은 추출물 해외 소싱, 원물 계약 수급 및 자생식물인 섬기린초는 계약재배를 통하여 경제적인 원물 수급방법 확보
- 제2협동기관에서 제조한 Zein을 이용한 나노화 감초추출물의 유전독성시험을 통한 나노소재의 안전성 확보

나. 2차년도

2차년도 주관기관 연구개발 목표는 나노소재의 식품보존효능 및 화장품 적용효능 검증 및 안전성평가(유전독성 시험)이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- 협동기관으로부터 제공받은 나노소재 4종(감초, 로즈마리, 토복령, 섬기린초 나노소재)에 대한 확인시험을 통하여 시험가능 나노소재 3종(감초, 로즈마리, 섬기린초 나노소재) 선발
- 감초나노소재 및 로즈마리 나노소재는 식품적용이 가능한 원료로서 식품 보존 효능시험을 진행하였으며, 그 결과 무처리구 및 코어소재 대비 우수한 식품보존효능 확인
- 섬기린초나노소재는 식품적용 불가능한 원료로서 화장품 적용 방부력/미백 효능시험을 진행하였으며, 그 결과 무처리구, 코어소재 대비 우수한 세균 제어능과 미백효능확인
- 토복령은 건강기능식품 개발가능성 있는 소재로서 코어소재 및 나노소재에 대한 여성호르몬 유사활성시험을 진행하고자 하였으나 나노소재의 미완성으로 인하여 코어소재의 효능시험을 우선 진행하였으며, 그 결과 타 소재 대비 우수한 여성호르몬 유사활성 확인
- 제1협동기관에서 제조한 Cycloamylose을 이용한 나노화 섬기린초 추출물의 유전독성

시험을 통한 나노소재의 안전성 확보

다. 3차년도

3차년도 주관기관 연구개발 목표는 나노소재 pilot 생산공정 확립 및 제품화 및 안전성 평가(유전독성 시험)이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- 2차년도에 협동기관으로부터 제공받아 효능평가를 진행했던 나노소재 3종(감초, 로즈마리, 섬기린초 나노소재)중 대량생산 가능성 및 사업성 평가를 통하여 제품화위한 나노소재 2종 선발완료(식품용 천연보존료 1종(로즈마리 나노소재), 비식품용 천연보존료 1종(섬기린초 나노소재))
- 선발된 나노소재 2종의 lab scale 생산공정 기반 회수율, 유효성분 함량, 항균력 검토를 통하여 pilot 생산공정 셋팅 및 제품규격안 수립완료. 그 이후, 제품화 나노소재 2종의 KTR 항균력 공인인증 획득완료
- 식품용 천연보존료 제품인 로즈마리 나노소재의 유전독성시험 통한 나노소재 안전성 확보
- 비식품용 소재인 섬기린초 나노소재의 일차 및 누적 피부자극시험 통한 화장품용 소재로서의 안전성 확보

2. 제1협동기관 (서울대학교): 천연 항균/항산화소재의 기능성 증진을 위한 나노소재화 기술개발

가. 1차년도

1차년도 제1협동기관 연구개발 목표는 천연 항균/항산화소재의 기능성 증진을 위한 나노복합체 제조기술 개발이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- 나노복합체 캐리어로 사용될 환형아밀로스(cycloamylose) 제조조건 최적화 완료(고아밀로스 전분 이용, isoamylas: 5U/g - 8시간, TAcGT: 10U/g - 14시간, glucoamylse: 50U/g - 8시간)
- 환형아밀로스 생산수율 약 70%, 중합도는 7-41인 cyclic 한 glucan 생산여부 확인
- 나노복합체 최적제조조건: 환형아밀로스(피복소재) 농도 30%, 천연항균/항산화소재(코어소재) 농도 1%, 반응 시간 48시간
- 나노복합체 형성여부는 DSC와 XRD, SEM으로 분석하였으며 로즈마리추출물의 특징적인 결정성이 사라지거나 감소하여 나노복합체가 형성되었음을 확인
- 나노복합체의 기능성 및 안정성 분석 결과, 나노복합체를 형성한 경우 control에 비해 항균 효능(MIC 값 : 45.21ppm→7.63ppm)의 유의적 차이를 확인하였으며, 열안정성은 약 2배 증가, 광분해안정성은 약 1.9배 증가 확인

나. 2차년도

2차년도 제1 협동기관 연구개발 목표는 천연 향균/항산화소재 기능성 증진을 위한 나노에멀전 제조 기술 개발이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- 감초, 로즈마리를 콩기름에 녹인 후 수중 유적형 나노에멀전(O/W 에멀전)을 제조 및 최적화 완료
- 에멀전 유적(油滴)의 평균지름은 코어소재와 유화제의 종류에 따라 182.5~221.9nm, zeta potential은 -17.6~-47.9mV 수준이었으며, 4주 저장기간 동안 대부분의 샘플에서 size 와 zeta potential의 평균값은 큰 변화가 없이 유지되었고, 유화제에 따라 약간의 size distribution 차이를 확인
- 나노에멀전의 항산화력은 소재가 단순히 녹아있는 일반 상태의 기름(대조군)에 비해 감초에서 5.8%, 로즈마리에서 12.5% 더 높은 효능 확인 (4주 저장 후에는 decaglycerol laurate와 decaglycerol monooleate를 이용하여 만든 에멀전에서 대조군에 비해 평균적으로 감초는 82.7%, 로즈마리는 60.4%나 증가된 항산화능 확인)
- 에멀전의 광안정성 측정을 위해 24시간 동안 UV를 조사하여 기름 속 코어소재의 잔존량을 측정한 결과, 에멀전 상태가 대조군에 비해 평균적으로 2.63배 더 잔류하여 광안정성 효과가 있음을 확인
- Time kill assay를 통한 항균력 측정결과 감초 에멀전에서 처음 대비 약 0.06 log cycle, 로즈마리 에멀전에서 약 0.46 log cycle의 균의 감소가 나타났으나 유의적인 항균활성은 아님. 하지만 에멀전 물 층에 섬기린초를 첨가한 후 다시 항균력을 측정한 결과 감초, 로즈마리 에멀전에서 각각 1.71와 2.96 log cycle 감소를 보였는데, 이는 섬기린초만 사용하여 나온 감소량(1.64 log cycle)을 감안 한다면, 항균력에 있어서 감초-섬기린초 에멀전은 상가효과(Additive)가 로즈마리-섬기린초 에멀전에서는 상승효과(Synergistic)가 나타나는 것으로 판단됨
- 로즈마리와 CA 복합체의 수용액에서의 저장 안정성을 HPLC로 분석한 결과, CA에 의해 carnosol의 안정성이 증진됨을 확인하였으며, 이에 따라 CA 복합체에서 항산화 활성의 안정성이 대조군에 비해 약 2배 높은 것으로 확인됨

다. 3차년도

3차년도 제1 협동기관 연구개발 목표는 나노복합체와 나노에멀전기술을 이용한 멀티나노소재 제조공정 최적화이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- 나노복합체의 피복소재로 사용된 환형다당류 종류로는 cycloamylose (CA), β -cyclodextrin (CD), hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD), maltodextrin (MD), clustered dextrin (ClusD)이었고, 감초추출물과의 복합체 형성 시 나타나는 다양한 특성 변화를 통하여 나노복합체 형성 여부 확인 완료
- CA, HP β CD, MD, ClusD가 포함된 멀티나노소재의 oil droplet size (243.0~416.8nm)는

피복소재의 농도유의적인 변화가 관찰되지 않았으며, 제타포텐셜 또한 유의적인 변화가 없음(평균 -10.4mV)

- CD를 포함한 멀티나노소재는 2% 이상의 농도에서 급격한 size 증가(>2,200nm)를 보였으며, 크리밍 현상이나 침전현상이 쉽게 나타나 CD가 다른 호스트 물질에 비해 불안정성에 기여하는 것으로 확인됨
- 세 가지의 환형 다당류(CA, CD, HP β CD)를 피복소재로 사용한 멀티나노소재의 항산화 활성은 피복소재의 유형과는 관계없이 코어소재의 농도에 의존적이었으며 나노에멀전에 비해선 약 2.57배 증가한 것을 확인
- 세 가지의 환형 다당류(CA, CD, HP β CD)를 피복소재로 사용한 멀티나노소재의 평균 활성 또한 나노에멀전에 비해 4.47배 증가한 것을 확인
- 로즈마리추출물-분지텍스트린 나노소재 개발: 제조 조건 확립 및 이화학적 특성(UV/vis 분광 광도계, XRD, FESEM, DLS 등) 분석을 통하여 로즈마리추출물 단독물질보다 분지텍스트린 최대 농도(30%)의 존재 하d[사 로즈마리추출물의 용해도(2.05배), 항산화 활성(2.79배), 평균 활성(4.82배), 열 안정성(1.46배), 저장안정성(2.20배)이 우수함을 확인

3. 제2협동기관 (명지대학교): 단백질, 지질기반 식품나노소재 제형화 기술개발

가. 1차년도

1차년도 제2협동기관 연구개발 목표는 나노소재화를 위한 보조제 (단백질, 지질기반)개발이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- 난백 단백질 오브알부민(ovalbumin)을 나노크기로 제형화 한 후, 이를 보조제로 하여 제1세부(다인소재)로부터 공급받은 코어소재(로즈마리 추출물, 감초 추출물)와 서로 결합하여 나노소재화 완료
- 오브알부민이 나노크기로 변환되는 방법은 desolvation 방법 등을 사용했으며, 코어소재와 결합은 오브알부민이 가지고 있는 소수성 아미노산 잔기인 트립토판과 상호작용을 통해 이루어짐을 확인
- 식물 단백질인 콩단백질(soy protein isolate), 옥수수단백질(제인, zein)을 나노크기의 보조제로 제형화한 후, 코어소재를 결합하여 나노소재화 완료하였으며, 오브알부민에 비해 가격, 안전성 경쟁력이 우수한 식물 단백질 중 특히 제인이 코어소재 중 감초추출물과 안정적으로 결합하여 우수한 식품나노소재로 제형화 됨을 확인
- 제인과 감초추출물의 결합 메커니즘은 감초추출물의 핵심 기능 성분인 글라브리딘과 제인 단백질의 소수성 아미노산 잔기인 트립토판, 티로신과 상호작용을 통해 이루어짐을 확인

나. 2차년도

2차년도 제2 협동기관 연구개발 목표는 나노소재화 공정기술개발이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- Desolvation 방법에 의한 나노소재화 공정개발: 기존 desolvation 방법을 개선한 항용매(anti-solvent) 침전 co-precipitation 방법을 응용하였으며, 옥수수 단백질 (Zein)을 desolvation 대상으로 적용하여 감초 나노화소재를 개발함
- 생고분자-겔 방법에 의한 나노소재화 공정개발: 카르복시메틸셀룰로오스(CMC) 및 카제인나트륨(Caseinate)을 단백질 기반 나노소재화 공정에 도입하여 섬기린초 및 토복령 나노화소재를 개발함
- 주관연구기관과 협업하여 제2 협동기관이 제조한 나노화소재 3종(감초, 토복령, 섬기린초 나노화소재)에 함유된 유용성분의 농도를 역산하여 포집효율을 계산하였으며, 최대 90% 이상의 포집도를 달성함

다. 3차년도

3차년도 제2 협동기관 연구개발 목표는 나노소재화 공정 최적화 및 제형화이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- 시린지 펌프 활용한 미세유체공정기술을 적용한 로즈마리 나노소재 및 섬기린초 나노소재 제조공정 확립 및 이화학적 특징 분석 완료
- 미세유체 채널칩 활용한 미세유체공정기술을 적용한 나노소재 제조공정 확립 및 이화학적 특징 분석 완료
- 컴퓨터 시뮬레이션 기법을 통한 코어성분-피복소재(단백질) 결합 메커니즘 규명 완료

4. 위탁기관 (한양대학교): 식품나노소재에 대한 안전성평가 및 효능검증

가. 1차년도

1차년도 위탁기관 연구개발 목표는 유용물질 혼합 및 나노제형화에 따른 효능 평가법 표준화이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- 4종의 천연 식물추출물(로즈마리, 감초, 토복령, 섬기린초)의 항균 활성을 분석한 결과, 각 타겟 균주에 대해 3~1000 ug/mL의 농도에서 생육을 억제함을 확인
- 4종의 천연 식물추출물(로즈마리, 감초, 토복령, 섬기린초)항산화 활성은 DPPH, ORAC 실험에서 모두 로즈마리, 섬기린초가 감초, 토복령에 비해 높은 활성 확인
- 추출물 간 혼합 활성 평가 결과, 로즈마리+감초 항균 활성은 additive effect로 확인되었고, 항산화 활성은 감초+토복령, 감초+섬기린초 조합을 5:5 비율로 혼합했을 때 가장 높은 시너지 효과를 보임을 확인

- 나노제형화에 따른 항균(MIC, checkerboard, time kill assay) 및 항산화(DPPH, ORAC, CAA) 효능 평가법 표준화 통한 나노제형화 따른 활성변화 분석 할 수 있는 방안 강구

나. 2차년도

2차년도 위탁기관 연구개발 목표는 1차년도를 통해 표준화한 효능 평가법을 통해 개발된 나노소재에 대한 항균/항산화 활성을 평가하고, 안정성과 세포 투과정도를 평가하는 것이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- 개발된 나노소재 키토산-PGA과 CMC-zein 기반 소재를 이용하여 분석한 결과, 항균 활성(disc diffusion assay, MIC, time kill), 항산화활성(DPPH radical 소거능, ORAC assay, CAA), 세포투과(confocal microscopy) 결과 모두에서 나노소재화에 따라 로즈마리, 토복령, 섬기린초 추출물의 활성 증가 경향성 확인
- 키토산-PGA 소재를 기반으로 하였을 때, 제형에 따라 나노분산액 상태로 적용했을 때 활성이 우수했으며, 동일 제형 내 입자크기(피복소재 농도)에 따라서는 (600 nm 크기의 입자의) 활성이 가장 높은 결과를 나타냄

다. 3차년도

3차년도 위탁기관 연구개발 목표는 1-2차년도를 통해 개발된 식품 나노소재에 대한 안전성을 평가하고 효능을 검증하는 것이며, 이에 대한 전반적인 연구를 수행하였다.

- 제1협동기관에서 개발하고 제품화된 나노소재인 로즈마리나노소재의 항산화 활성(DPPH radical 소거능, FRAP assay, ORAC assay)을 측정된 결과, 모든 항산화활성 측정 방법에서 로즈마리나노소재가 로즈마리코어소재보다 유의적으로 높은 항산화활성을 나타냈으며 최대 1.8배가량 증진된 결과를 보임
- 제1협동기관에서 개발하고 제품화된 나노소재인 로즈마리나노소재의 Caco-2 세포를 이용한 세포독성 실험에서 세포독성 없음을 확인
- 제1협동기관에서 개발하고 제품화된 나노소재인 로즈마리나노소재의 동물실험을 이용한 단회투여독성 및 반복투여독성실험 결과, 섭취로 인한 사망이 관찰되지 않았으며, 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중변화를 초래하지 않았고, 특이한 임상증상 및 부검 시 내부장기의 어떠한 육안적 이상소견도 관찰되지 않음을 확인
- 제1협동기관에서 개발하고 제품화된 나노소재인 로즈마리나노소재는 혈액과 장기 등 평가지표에 독성으로 인한 영향을 나타내지 않으며 안전한 것으로 판단됨

5. 고찰

가. 총괄

[과제최종목표]

- 나노화를 위한 천연 향균/항산화소재 (감초, 로즈마리, 토복령, 섬기린초 추출물)의 제조공정 확립 및 유효성분 규격화
- 천연 향균/항산화소재의 기능성 증진을 위한 나노복합체 제조 기술 개발
- 천연 향균/항산화소재의 기능성 증진을 위한 나노에멀전 제조 기술 개발
- 나노복합체와 나노에멀전 기술을 접목한 멀티 나노소재 제조 공정 개발
- 식품 성분의 나노소재화 위한 보조제(탁백질, 지질 기반) 개발
- 천연 향균/항산화소재의 나노소재화 최적화 공정 개발 (Solvent-displacement , Desolvation , 생고분자-겔(Biopolymer-Gel), 실린더 균질화, 유체 폭발 반응)
- 나노소재 제형화(분말, 페이스트, 나노화이버 등) 공정 기술 개발 및 최적화
- 나노 소재의 식품(음료, 소스, 장류 등) 보존효능 및 화장품 방부, 미백) 적용효능 검증
- 향균/항산화 소재의 나노소재화 pilot 생산공정 확립 및 제품화
- 천연 향균/항산화소재의 혼합 및 나노제형화에 따른 효능 평가법 표준화
- 개발 나노소재의 제형별, 저장조건별 효능 평가 및 향상법 확립
- 개발 나노소재 산업화 적용 효능 검증 및 안전성 평가

상기와 같은 최종연구목표를 가지고 4개 기관이 3년간 성실히 연구를 수행하였으며, 2개 제품화 성공에 따라 목표로 하였던 사업화성과(고용창출, 기술이전, 지적재산권 등), 학술성과(학술발표, SCI/비SCI 논문, 교육지도, 인력양성 등) 및 기타성과(정책활용 및 홍보 등)를 충분히 달성하였다. 현재, 제품의 매출이 발생하지는 않은 상황이지만 향후 꾸준한 대외홍보 및 업체제안을 통하여 이 부분도 충분히 달성할 수 있을 것으로 판단된다.

나. 주관기관

[주관기관 최종목표]

- 코어용 고순도 천연 향균/항산화 소재 제조공정 확립 및 유효성분 규격화
- 나노소재화 pilot 생산공정 확립 및 제품화
- 나노소재의 향균/항산화 식품 보존 효능 검증
- 나노소재의 화장품 적용 방부/미백 효능 검증

주관기관은 상기와 같은 최종연구목표를 가지고 1차년도에는 유효성분 함량 및 항균효능으로 규격화된 고순도 천연 향균/항산화 소재 제조공정을 확립하여 협동 및 위탁기관에 나노소재 개발을 위한 핵심원료를 공급할 수 있었다. 2차년도에는 2개의 협동기관에서 개발한 3종의 나노소재를 가지고 다양한 식품군(소스류, 장류, 음료류)에 적용한 식품보존효능의 검증 및 화장품 방부/미백 효능 검증을 완료하여 식품 및 비식품 산업에 나노소재의 적용가능성을 확인할 수 있었다. 3차년도에는 협동기관에서 개발한 나노소재 중 대량생산

및 산업화가 가능한 2종을 선택하여 나노소재 pilot 생산공정을 확립하였으며, 이를 기반으로 2종(식품산업 적용제품 1종, 화장품산업 적용제품 1종)의 제품화를 완료하였다.

과제 시작시 최초로 설정하였던 목표를 바탕으로 3년간 협동 및 위탁기관과 협력하여 성실히 연구를 수행하여 마침내 최종산물인 나노소재 제품화에 성공하였으므로 본 과제에 기여하는 바가 크다.

다. 제1협동기관

[제1협동기관 최종목표]

- 천연 항균/항산화소재의 기능 증진 및 생체이용률을 향상시킬 수 있는 나노복합체 (nanocomplex)와 나노에멀전 (nanoemulsion) 제조 기술 개발
- 제조한 나노소재의 물리화학적 특성 및 안정성 평가
- 나노에멀전과 나노복합체 기술을 접목한 멀티나노소재 제조 및 제품 적용을 위한 대량 생산 공정 개발

제1협동기관은 상기와 같은 최종연구목표를 가지고 1차년도에는 나노복합체 캐리어로 사용될 환형아밀로스 생산공정을 세팅하고, 환형아밀로스 기반 나노복합체를 개발하여 이화학적 특성 및 안정성을 검증하였다. 2차년도에는 고순도 항균/항산화소재를 기반으로 하는 나노에멀전 제조공정을 확립하고, 개발된 나노에멀전의 물리화학적 특성 및 안정성을 검증하였다. 3차년도에는 1-2차년도에 개발한 2종의 나노소재 제조기술을 접목한 멀티 나노소재 제조공정을 확립하여 신규한 나노소재를 개발하였다. 또한, 주관기관의 나노소재 제품선정을 함께 검토하였다.

과제 시작시 최초로 설정하였던 목표를 바탕으로 3년간 나노소재 제조기술 개발에 매진하였으며, 대량생산 및 산업화가 가능한 나노소재 1종의 제조기술을 참여기업에 기술이전함으로써 과제 최종목표인 제품개발에 일조하였으므로 본 과제에 기여하는 바가 크다.

라. 제2협동기관

[제2협동기관 최종목표]

- 식품 나노소재화를 위한 단백질, 지질, 생고분자 보조제 개발
- 흡광도, 형광세기 기반의 결합상수, 결합도 계산을 통한 포집도, 안정도 측정 분석
- 식품 나노소재의 분말, 페이스트, 나노화이버 제형화 기술 개발

제2협동기관은 상기와 같은 최종연구목표를 가지고 1차년도에는 동물, 식물유래 단백질 및 지질 계열 나노소재화 보조제 개발을 완수하였으며, 개발된 나노소재의 다양한 물리화학적 분석을 통하여 포집도 및 안정도를 검증하였다. 2차년도에는 Desolvation, 항용매 공동침전법 등 다양한 나노소재화 제조공정을 세팅하고, 나노소재를 개발하여 나노소재 수

을 및 유용성분 포집효율을 검증하였다. 3차년도에는 마이크로 유체채널을 이용한 신규 나노소재를 개발하였으며, 나노소재 형성 메커니즘을 규명하였다. 또한, 주관기관이 개발하고자 하는 나노소재 분말제품 제조를 위한 방법을 함께 검토하였다.

과제 시작시 최초로 설정하였던 목표를 바탕으로 3년간 나노소재 제조기술 개발에 매진하였으며, 대량생산 및 산업화가 가능한 나노소재 1종의 제조기술을 참여기업에 기술이전함으로써 과제 최종목표인 제품개발에 일조하였으므로 본 과제에 기여하는 바가 크다.

마. 위탁기관

[위탁기관 최종목표]

- 식품 나노소재의 항균/항산화 평가 표준화 연구
- 유용성분 함유 나노소재의 효능 향상 검증
- 개발 나노소재 독성(위해성) 평가를 통한 안전성 검증 연구

위탁기관은 상기와 같은 최종연구목표를 가지고 1차년도에는 고순도 천연소재 및 나노소재의 항균/항산화 효능평가를 위한 다양한 방법을 시도하여 표준화된 효능평가방법을 세팅하였다. 2차년도에는 협동기관에서 개발한 나노소재의 항균 및 항산화 효능을 검증하고, 더 나아가 나노소재의 입자크기별, 피복소재별 효능비교를 통하여 효능 향상 방안을 도출하였다. 3차년도에는 제품화 나노소재 1종의 독성평가를 통하여 안전성을 검증하였으며, 식약처 가이드라인을 기반으로하는 안전성 평가보고서를 작성하였다.

과제 시작시 최초로 설정하였던 목표를 바탕으로 3년간 고순도 천연소재 및 나노소재의 효능 검증을 위하여 성실히 연구를 수행하였으며, 개발된 나노소재 제품의 안전성을 검증하여 소비기업 및 소비자가 믿고 사용할 수 있는 근거를 제시하였기에 본 과제에 기여하는 바가 크다.

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절. 연구목표대비 달성도

기관명	연구목표	가중치 (%)	개발내용	달성도 (%)	비고
주관 (다인소재)	고순도 코어소재 제조공정 확립	25	- 고순도 코어소재 제조공정 확립 - 원물 및 코어소재 유효성분 규격화 - 원물 및 코어소재 항균력 규격화	100	
	나노소재 식품 보존효능 및 화장품 적용 효능검증	25	- 나노소재 완성도 평가 - 나노소재 식품 보존 효능평가 - 나노소재 화장품 적용 효능평가 - 나노소재 여성호르몬 유사효능 평가	100	
	나노소재 pilot 생산공정 확립 및 제품화	50	- 나노소재 pilot 생산공정 확립 - 나노소재 제품 규격안 세팅 - 나노소재 안전성평가	100	
제1협동 (서울대)	천연 항균/항산화소재의 기능성 증진 위한 나노복합체 제조 기술 개발	40	- 나노복합체 캐리어인 환형아밀로스 대량생산 - 나노복합체 제조조건 최적화 - 나노복합체 안정성 분석	100	
	천연 항균/항산화소재 기능성 증진을 위한 나노에멀전 제조 기술 개발	30	- 고압균질기 이용 나노에멀전 제조조건 확립 - 나노에멀전 안정성 확립 - 나노에멀전 항균/항산화 효능평가 - 나노복합체 저장안정성 평가	100	
	나노복합체와 나노에멀전 기술을 접목한 멀티나노소재 제조공정 최적화	30	- 코어물질-나노복합체-나노에멀전 혼합통한 멀티나노소재 제조 - 멀티나노소재의 안정성 분석 - 멀티나노소재의 특성 및 항균, 항산화력 측정	100	
제2협동 (명지대)	나노소재화를 위한 보조제 개발 (단백질, 지질 기반)	30	- 단백질, 지질 기반 보조제 개발 - DLS 분석: 나노소재 물리화학 특성 확립 - 나노소재 광학적 특성, 포집도 평가	100	
	나노소재화 공정기술개발	35	- Desolvation기반 나노소재 공정개발 - 생고분자겔기반 나노소재 공정개발 - 나노소재 수율 및 코어소재 포집효율 검증	100	
	나노소재화공정 최적화 및 제형화	35	- 미세유체체널칩, 시린지펌프 등의 방법 이용한 나노소재 대량, 연속제조공정 개발 - 나노소재 안정성 검증(pH, 염, 저장안정성) - 나노소재 용해도 향상 검증(분광, 현광분석)	100	
위탁 (한양대)	유용물질 혼합 및 나노제형화에 따른 효능 평가법 표준화	30	- 유용물질 혼합에 따른 활성진조건 탐색 - 나노제형화에 따른 효능분석법 확립 - 나노소재 입자크기 따른 효능연구 - 피복소재 종류따른 나노소재 효능연구	100	
	개발 나노소재의 효능 평가 및 향상법 확립	30	- 나노소재 항균/항산화 활성 평가 및 표준화 - 나노소재 안정성 평가 - 나노소재 ex vivo 흡수율 평가 - 나노소재 항균/항산화 효능하상조건 확립	100	
	개발 나노소재 산업화 적용 효능 검증 및 안전성 평가	40	- 개발 나노소재 항산화활성 변화 관측 - 개발 나노소재 세포독성평가 - 개발 나노소재 안전성 검증 (단회투여독성, 반복투여독성) - 식약처 가이드라인 따른 나노소재 안전성 평가보고서 작성	100	

제 2 절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 4개의 코어소재 중 식품 활용 가능한 소재인 감초 로즈마리, 토복령을 식품 보존을 위한 나노소재로 검토하고자 하였으나 감초 및 로즈마리 나노소재만 검토가 완료된 상황이며, 토복령 나노소재는 현재까지 개발 진행 중. 개발 완료 후 식품 보존 및 여러 효능에 대한 검토가 필요함.
- 1차년도 연구에서 로즈마리/환형아밀로스 나노소재를 개발하였으나, 환형아밀로스 대량생산에 경제적인 제약이 따르는 점을 고려하여 상대적으로 경제성이 우수하며 환형아밀로스를 대체할 수 있는 물질로 분지텍스트린 및 Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) 을 추가 선정함.
- 코어물질과 피복소재의 조합에 대한 평가 결과, 비식품용으로 섬기린초/HP β CD이 선정되었으며, 본 기관에서는 3차년도 연구 계획으로 섬기린초/HP β CD 나노소재의 제조 및 특성 평가를 수행하기로 하였으며, 식품용으로 사용가능한 로즈마리/분지텍스트린 나노소재의 제조 및 특성 평가를 추가적으로 수행하기로 함.
- 3차년도 연구 일정을 고려하여 본 기관에서 두 소재에 대한 연구를 모두 수행하기는 어려운 바, 로즈마리/분지텍스트린 나노소재 연구는 본 기관에서 수행하고, 섬기린초/HP β CD 나노소재 연구는 명지대(협동)에서 수행하는 것으로 변경함.
- 본 과제를 통해 개발된 나노입자화 기술은 천연추출물의 항균 및 항산화효능을 증진시킬 뿐만 아니라 세포독성 및 동물실험을 통하여 안전성 또한 확인되어 산업화 적용이 가능함을 확인하였음. 그러나 이 기술은 본 과제에서 연구된 소재만 국한되는 것이 아니라 다양한 다른 유용성분으로 적용범위를 확대시킬 수 있으며 이를 통해 보다 다양한 기능성 제품의 개발이 가능할 것으로 예측됨. 따라서 적용범위 확대를 위한 후속연구가 필요함.

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

1) 연구결과 활용

가) 활용분야

- 나노복합체 제조기술 및 형성 메커니즘
 - ① 신규한 탄수화물 및 단백질 유래 소재개발
 - ② 새로운 식품나노소재 제형개발
 - ③ 천연물을 유용성분으로 하는 식품제조공정 확립
 - ④ 식품 이외의 고부가가치 제품(화장품, 의약외품 등) 소재개발
 - ⑤ 고부가가치 소재의 제형 및 공정개발
- 나노복합체 기반 항균/항산화 천연소재
 - ① 식품용 천연보존료
 - ② 화장품용 천연보존료 및 미백소재
 - ③ 사료용 천연보존료
 - ④ 여성 갱년기 건강기능식품용 원료소재
 - ⑤ 의약외품용 기능성 소재

나) 활용방안

- 나노복합체 제조기술 및 형성 메커니즘: 수용성 나노복합체 및 나노에멀전이 함유된 식품(음료, 소스류, 장류 등) 및 화장품(에멀전류, 크림류 등)에 활용
- 나노복합체 기반 항균/항산화 천연소재의 산업화
 - ① 시장규모: 총 54조 1,004억원/년 (식품 보존료, 화장품 보존료, 화장품 미백소재, 여성갱년기 건강기능식품) → 해당시장 진출이후 0.1% 시장점유시 541억원/년 매출확보 가능
(주) 다인소재의 국내 파트너사(식품분야 260개, 화장품분야 100여개 업체) 및 해외법인을 적극 활용하여 국내외 시장점유 및 매출달성에 기여할 예정)
 - ② 사업화 계획 1단계: (주)다인소재의 국내 파트너사 중 소스류, 장류 및 중성차류 제조업체 / 기능성 천연화장품 제조업체에 제품 제안
 - ③ 사업화 계획 2단계: (주)다인소재의 중국 및 베트남법인을 통한 천연보존료 수출검토
 - ④ 사업화 계획 3단계: 업체의 필요사항에 맞춘 제품의 커스터마이징 및 법적 인허가 추진

2) 추가 연구의 필요성

- 개발된 나노복합체, 나노에멀전 및 멀티나노소재의 제형화 기술 개발
- 멀티나노소재의 다양한 제형화를 위한 제조 기술 개발 및 안정성에 대한 추후 연구 필요
- 멀티나노소재의 기능성 성분 방출 특성 제어 연구 필요
- 나노소재 제조하기위해 사용된 여러 제조방법들(desolvation, antisolvent, coprecipitation, microfluidics 등)은 식품, 사료, 화장품 등 에멀전, 유화 등을 주요 공정으로 사용하는 기업과 공동연구 활용 계획

3) 타 연구에의 응용

- 기능성 물질의 생체접근성 및 생체이용률 증진을 위한 멀티나노소재 응용

4) 기술이전

- 분지텍스트린을 나노캐리어로 사용한 천연 항균/항산화 소재 나노복합체 최초 개발
- 로즈마리추출물이 내포된 분지텍스트린 복합 소재 제조 기술을 산업체로 기술이전 시행
- 동물성 단백질 (오브알부민, 인간혈청알부민 등) 적용 나노복합체 연구결과는 동물유래 원료로서 고가인 점을 고려하여 식품보다는 의약품, 영양보조제, 기능성 화장품 등의 산업에 기술이전 시도 예정
- 식물성 단백질 (제인, soy protein isolate 등) 적용 나노복합체 연구결과는 식물유래 원료로서 저가인 점을 고려하여 식품, 식품첨가물, 화장품 등의 산업에 기술이전 시행

5) 기타성과 (추가 정량성과 확보)

- 식품이나 의약품을 통해 체내로 들어간 나노복합체 성분이 어떻게 체내 단백질과 결합을 하는 메커니즘을 규명하는 SCI 논문 투고 예정
- 나노소재 제조를 위해 사용된 여러 제조방법들(desolvation, antisolvent, coprecipitation, microfluidics 등)은 기술의 개량, 최적화 관점에서 특허출원 및 SCI 논문 투고 예정
- 토복령 코어소재 및 나노소재의 효능평가 결과에 대한 특허출원 및 SCI 논문 투고 예정
- 시너지 효과를 내는 원료소재 복합물의 나노소재 개발에 대한 지적재산권 확보

붙임. 참고문헌

- C.A. Kozłowski, W. Sliwa, The use of membranes with cyclodextrin units in separation processes: Recent advances, *Carbohydrate Polymers*, 74, pp. 1–9, 2008
- E. N. Frankel, S. W. Huang, R. Aeschbach, E. Prior, Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (1), pp. 131–135, 1996
- F. Devlieghere, A. Vermeulen, J. Debevere, Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables, *Food Microbiology*, 21, pp.703–714, 2004
- J. M. Visanji, D. G. Thompson, P. J. Padfield, Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels, *Cancer Lett.*, 237(1), pp130–136, 2006
- J. Pitha, J. Milecki, H. Fales, L. Pannell, K. Uekama, Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 29, pp. 73–82, 1986
- L. Salvia-Trujillo, A. Rojas-Graü, R. Soliva-Fortuny, O. Martín-Belloso, Physicochemical characterization and antimicrobial activity of foodgrade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils, *Food Hydrocolloids*, 43, pp. 547–556, 2015
- N. Aoki, M. Nishikawa, K. Hattori, Synthesis of chitosan derivatives bearing cyclodextrin and adsorption of p-nonylphenol and bisphenol A, *Carbohydrate Polymers*, 52, pp. 219–223, 2003
- P. A. Belinky, M. Aviram, B. Fuhrman, M. Rosenblat, J. Vaya, The antioxidative effects of the isoflavan glabridin on endogenous constituents of LDL during its oxidation, *Atherosclerosis*, 137, pp. 49–61, 1998
- T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans, Formation and stability of nano-emulsions, *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, pp. 303–318, 2004
- Y. Masamoto, H. Ando, Y. Murata, Y. Shimoishi, M. Tada, K. takahata, Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(3), pp631–634, 2003
- Z. Wang, S. Luo, Z. Wan, C. Chen, X. Zhang, B. Li, G. Huang, L. Chen, Z. He, Z. Huang, Glabridin arrests cell cycle and inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma by suppressing braf/MEK signaling pathway, *Tumour Biol.*, 37(5), pp5837–5846, 2016

부록. 특허기술 가치평가

1. 특허 제10-1902846호

평가용도	성과분석용
------	-------

기술가치평가서

Technology Valuation Report
for Assessment, Valuation & Appraisal of Technology

「글라브리딘-제인 복합체 나노입자, 이의 제조방법 및 이의 용도」
(출원번호 10-2017-0098224, 등록번호 10-1902846)

2019. 1.

평가자 심재홍 (이학박사)
이동수 (경제학박사)
김경호 (경영학박사)
조대식 (이학박사)
조병일 (변리사)

농업기술실용화재단 이사장



1. 본 평가서는 평가용도 외로 사용할 수 없으며, 농업기술실용화재단은 본 평가서를 기초로 한 행위결과에 대하여 어떠한 책임도 부담하지 아니합니다.
2. 본 평가서에서 사용된 가정들은 향후 업체의 기술이전 이후 사업환경의 변화 및 기술을 적용하는 경영진이나 기술인력 등의 능력에 영향을 받으며, 이에 따라 그 평가결과가 변동될 수 있습니다.

I. 기술가치평가

1. 평가결과

기술가치평가액	78.71백만 원
----------------	------------------

평가요약
<p>(1) 평가목적</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px 0;"> <p>본 평가는 고부가가치식품기술개발사업에서 국가 R&D 연구비를 통해 개발된 특허권을 기술이전 하는데 따른 특허기술의 가치를 금액으로 산정하는 것이며, 동 평가의 주요 목적은 특허기술의 성과분석 자료로 활용하는 데 있다.</p> </div> <p>(2) 평가대상기술</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px 0;"> <p>본 평가기술은 “글라브리딘-제인 복합체 나노입자, 이의 제조방법 및 이의 용도” 에 관한 것으로 본 평가 기술의 IPC 분류는 A61K(의약품, 치과용 또는 화장품 제제)에 해당하며, 본 평가대상 기술제품은 농림축수산식품업종 분류 0794(조미료 및 식품 첨가물 제조업)으로 분류된다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 출원번호(출원일) : 10-2017-0098224(2017/08/02) ○ 등록번호(등록일) : 10-1902846(2018/09/20) ○ 출 원 인 : 명지대학교 산학협력단 ○ 발 명 자 : 최신식, 라작 </div>

(3) 평가방법

본 평가대상기술의 직접 시장자료는 확인되지 않았고, 본 평가에서는 평가 대상기술의 가치를 금액으로 환산하기 위하여 수익접근법 및 로열티공제법을 동시에 검토하였으며, 최종적으로 시장사례, 기업재무정보 및 평가서의 용도 등을 고려하여 로열티공제법을 적용하였다. 본 평가의 평가기준일은 2019년 1월 1일로 설정하였다.

(4) 평가의 주요 조건 및 가정

본 평가에서 사용한 로열티공제법은 제3자로부터 라이선스 되었을 때 지급하여야 하는 로열티를 기술소유자가 부담하지 않음으로써 절감된 로열티 지불액을 추정하여 현재가치로 환산하는 방법으로, 경제적 수명동안 평가대상기술로부터 발생하는 로열티 수입의 현재가치 합계로 기술의 가치를 산정한다. 기술의 가치 산정을 위한 세부 변수 및 가정은 “기술가치평가 실무 가이드(산업통상자원부, 2017.12)” 및 “농식품 기술가치평가 모델(농업기술실용화재단, 2014.12)”, “농식품기술가치평가 핵심변수 DB(농업기술실용화재단, 2016.11)” 에 의거 추정하였으며, 이들 변수를 추정하기 위한 세부 가정은 본 평가서 본문에서 자세하게 기술하였다.

(5) 평가결과 요약

주요 변수	추정치 또는 결과
기술의 경제적 수명(Technology life)	8년
로열티율(Royalty rate)	3.64%
할인율(Discounted rate)	14.04%
기술의 가치	78.71백만 원

(6) 종합의견

평가대상기술은 제인 단백질을 이용해 안정적인 글라브리딘 나노 복합체를 생성하였으며 초기 연구를 통해 나노 입자가 글라브리딘 보다 생리 작용이 향상되었음을 증명하였다. 당 기술을 적용한 제품의 시판까지는 일부 안전성, 독성, 상용화 대상 선정 등 많은 과정이 남아있지만 생체내에서의 흡수성이 떨어지는 유효 물질의 이용 가능성을 넓혔다는 측면에서 산업적 응용성이 높다고 판단된다.

기술의 주 응용 분야인 식품 보존료(제)는 나노기술이 강점을 보이는 분야중 하나이다. 소비자들은 오염이나 감염에 안전하며 친환경적이고 천연물 유래 보존료가 첨가된 식품을 선호한다. 식품보존료의 경우 항미생물성을 가지는 물질을 나노기술에 접목하여 항미생물 물질의 불활성 방지와 원하는 농도의 분출 조절을 통해 향상된 보존료 제조가 가능하다. 이러한 기술 적용은 무분별한 물질 사용을 억제함과 동시에 기존에는 사용이 어려웠던 물질들의 응용성을 높이고 있으며 분출 시기나 농도 조절을 통해 효율성을 높였다는 장점을 가진다.

평가대상특허의 권리범위는 권리범위의 적정성은 전체적으로 보통인 것으로 판단되며, 분쟁 발생시 금반언원칙에 의한 균등론이 완전히 배제되는 것은 아니라고 판단되기에 권리범위의 광협성은 전체적으로 우수한 수준으로 평가된다. 또한 평가대상특허는 침해발견 용이성 및 침해입증의 용이성은 우수 수준, 제3자의 회피가능성은 다소 낮은 수준인 것으로 평가된다.

평가대상기술은 식품첨가제 중 천연보존료 시장에 적용 가능하다. 현존하는 보존료 시장규모에 대한 공식적인 수치는 부재한 상태이기 때문에 본 보고서는 보존료로 사용될 수 있는 성분에 대한 개별 생산, 판매액과 수입 자료를 토대로 보존료 시장에 대한 규모 추정을 실시하였다. 이후 본 기술제품이 침투할 수 있는 천연보존료 시장의 개략적인 규모를 파악하고 그 시장에서 동 기술이 점유할 수 있는 시장점유율을 적용하여 산출하였다.

다인소재의 시장 점유율을 그대로 동 기술 적용제품의 점유율로 적용하기 보다는 상황을 고려할 필요가 있다. 각 업체 별 주력 제품이 다름을 고려할 때 다인소재가 주력으로 삼고 있는 보존료 시장(특히 천연 보존료 시장)에서 다인소재의 시장 장악력은 상당히 높을 것으로 예상된다. 따라서 다인소재의 영업력(시장 장악력), 제품의 높은 차별성(천연 보존료 중 높은 수용성을 가짐), 구매처의 니즈(수용성 천연 보존료) 등을 고려하면 동 기술은 시장에서 긍정적인 반응을 얻을 수 있을 것이라 판단된다.

2. 특허 제10-1796677호

평가용도	성과분석용
------	-------

기술가치평가서

Technology Valuation Report
for Assessment, Valuation & Appraisal of Technology

「에스트로겐과 유사한 작용 효과를 갖는 청미래덩굴 뿌리 추출물」
(출원번호 10-2016-0100573, 등록번호 10-1796677)

2019. 1.

평가자 심재홍 (이학박사)
이동수 (경제학박사)
채용우 (농업경제학박사)
조대식 (식품공학박사)
조병일 (변리사)

농업기술실용화재단 이사장



1. 본 평가서는 평가용도 외로 사용할 수 없으며, 농업기술실용화재단은 본 평가서를 기초로 한 행위결과에 대하여 어떠한 책임도 부담하지 아니합니다.
2. 본 평가서에서 사용된 가정들은 향후 업체의 기술이전 이후 사업환경의 변화 및 기술을 적용하는 경영진이나 기술인력 등의 능력에 영향을 받으며, 이에 따라 그 평가결과가 변동될 수 있습니다.

I. 기술가치평가

1. 평가결과

기술가치평가액	239.44백만 원
----------------	-------------------

평가요약
<p>(1) 평가목적</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px 0;"> <p>본 평가는 고부가가치식품기술개발사업에서 국가 R&D 연구비를 통해 개발된 특허권을 기술이전 하는 데 따른 특허기술의 가치를 금액으로 산정하는 것이며, 동 평가의 주요 목적은 특허기술의 성과분석 자료로 활용하는데 있다.</p> </div> <p>(2) 평가대상기술</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px 0;"> <p>본 평가기술은 “에스트로겐과 유사한 작용 효과를 갖는 청미래덩굴 뿌리추출물”에 관한 것으로 본 평가 기술의 IPC 분류는 A61K(의약품, 치과용 또는 화장품 제제)에 해당하며, 본 평가대상 기술제품은 농림축수산식품업종분류 0795(건강기능식품 제조업)으로 분류된다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 출원번호(출원일) : 10-2016-0100573(2016/08/08) ○ 등록번호(등록일) : 10-1796677(2017/11/06) ○ 출 원 인 : ㈜다인소재 ○ 발 명 자 : 최태호, 한샘, 윤태미, 김진용 </div>

(3) 평가방법

본 평가대상기술의 직접 시장자료는 확인되지 않았고, 본 평가에서는 평가 대상기술의 가치를 금액으로 환산하기 위하여 수익접근법 및 로열티공제법을 동시에 검토하였으며, 최종적으로 시장사례, 기업재무정보 및 평가서의 용도 등을 고려하여 로열티공제법을 적용하였다. 본 평가의 평가기준일은 2019년 1월 1일로 설정하였다.

(4) 평가의 주요 조건 및 가정

본 평가에서 사용한 로열티공제법은 제3자로부터 라이선스 되었을 때 지급하여야 하는 로열티를 기술소유자가 부담하지 않음으로써 절감된 로열티 지불액을 추정하여 현재가치로 환산하는 방법으로, 경제적 수명동안 평가대상기술로부터 발생하는 로열티 수입의 현재가치 합계로 기술의 가치를 산정한다. 기술의 가치 산정을 위한 세부 변수 및 가정은 “기술가치평가 실무가이드(산업통상자원부, 2017.12)” 및 “농식품 기술가치평가 모델(농업기술실용화재단, 2014.12)”, “농식품기술가치평가 핵심변수 DB(농업기술실용화재단, 2016.11)” 에 의거 추정하였으며, 이들 변수를 추정하기 위한 세부 가정은 본 평가서 본문에서 자세하게 기술하였다.

(5) 평가결과 요약

주요 변수	추정치 또는 결과
기술의 경제적 수명(Technology life)	7년
로열티율(Royalty rate)	3.31%
할인율(Discounted rate)	19.81%
기술의 가치	239.44백만 원

(6) 종합의견

평가대상기술은 여성 갱년기 증상 완화 및 골다공증 예방에 유효한 물질을 식물 추출물에서 분리한 뒤 당 물질의 활성을 검증한 결과를 보고하고 있다. 일부 결과는 아직 원자료(raw data)이며 검증중이지만, 보고된 결과와 선행연구 결과를 고려하면 건강기능식품의 주요 대상인 여성 갱년기 장애 및 골다공증 증상 완화에 새로운 제품으로의 개발 가능성이 높다고 판단된다.

관련 물질이 천연물 유래이며 이는 phytoestrogen의 특징에 부합한다는 점, 동물 여성호르몬 수용체와 결합한다는 점, 골다공증 증상 완화에 활성을 가진다는 점, 기존의 isoflavone과는 다른 구조를 가진다는 점 등은 새로운 물질로의 시장 진입에 긍정적으로 작용할 것으로 생각된다. 향후 연구는 새로운 물질의 활성을 기존 물질과 비교하여 상대적 활성을 측정하고 관련 물질의 농도가 최적이 되는 재배법과 추출법 확립과 같은 경제적 접근이 필요하다.

평가대상특허의 청구항에는 PBP(Product By Process) 구성요소가 존재하고, 이 또한 심사과정 중 한정보정 된 것으로 균등론을 적용받는데 한계가 있어 보인다. 즉 제3자가 평가대상특허에서 사용한 추출물을 활용하더라도 특허권자는 청구항에 기재된 추출용매를 사용해 추출한 것인지를 입증해야 하는 부담감이 있으며, 입증자료를 확보하는 것 또한 용이하다고 볼 수 없다. 따라서 평가대상특허는 물건발명의 특성상 침해발견 용이성은 높다 볼 수는 있겠으나, 침해입증의 용이성은 보통 수준, 제3자의 회피가능성은 다소 높은 수준인 것으로 평가된다.

동 기술은 천연물질이면서 여성갱년기 장애 및 골다공증 증상완화에 새로운 제품으로 개발가능성이 높은 것으로 종합적으로 평가되어, 기존 원료들과 차별성이 존재하는 것으로 여겨진다. 따라서, 기존 6개 개별인정형 원료들이 경합하는 가운데 청미래덩굴 추출물 이용 기술은 원재료로서 새로운 제품에 사용될 가능성이 높다고 판단하여 기존 원료들이 개발된 단계에서 보였던 점유율을 적용하는데 무리가 없을 것이다.

본 평가에서는 기존의 건강기능식품 원료들 중 개별인정형 6개(회화나무열매 추출물 포함)에 대한 점유율과 매출액을 검토하여 시장점유율을 가정하였으며, 이를 적용하여 평가대상기술의 향후 매출액 및 최종 기술가치를 산출하였다.

3. 특허 제10-1749497호

평가용도	성과분석용
------	-------

기술가치평가서

Technology Valuation Report
for Assessment, Valuation & Appraisal of Technology

「섬기린초에서 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백
또는 피부 과색소성 질환의 예방 및 개선용 조성물」
(출원번호 10-2016-0137607, 등록번호 10-1749497)

2019. 1.

평가자 심재홍 (이학박사)
이동수 (경제학박사)
김경호 (경영학박사)
조대식 (이학박사)
안창우 (변리사)

농업기술실용화재단 이사장



1. 본 평가서는 평가용도 외로 사용할 수 없으며, 농업기술실용화재단은 본 평가서를 기초로 한 행정결과에 대하여 어떠한 책임도 부담하지 아니합니다.
2. 본 평가서에서 사용된 가정들은 향후 업체의 기술이전 이후 사업환경의 변화 및 기술을 적용하는 경영진이나 기술인력 등의 능력에 영향을 받으며, 이에 따라 그 평가결과가 변동될 수 있습니다.

I. 기술가치평가

1. 평가결과

기술가치평가액	179.30백만 원
---------	------------

평가요약
<p>(1) 평가목적</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>본 평가는 고부가가치식품기술개발사업에서 국가 R&D 연구비를 통해 개발된 특허권을 기술이전 하는 데 따른 특허기술의 가치를 금액으로 산정하는 것이며, 동 평가의 주요 목적은 특허기술의 성과분석 자료로 활용하는 데 있다.</p> </div>
<p>(2) 평가대상기술</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>본 평가기술은 “섬기린초에서 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 또는 피부 과색소성 질환의 예방 및 개선용 조성물”에 관한 것으로 본 평가 기술의 IPC 분류는 A61K(의약품, 치과용 또는 화장품 제제)에 해당하며, 본 평가대상 기술제품은 농림축수산물식품업종분류 0215(농산물 가공 세제, 화장품 및 광택제 제조업)으로 분류된다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 출원번호(출원일) : 10-2016-0137607(2016/10/21) ○ 등록번호(등록일) : 10-1749497(2017/06/15) ○ 출 원 인 : 주식회사 다인소재, 한국화학연구원 ○ 발 명 자 : 최태호, 윤태미, 김진용, 이진아, 김진철, 최경자, 최용호, 장경수, 부 투투이 </div>

(3) 평가방법

본 평가대상기술의 시장자료는 확인되지 않았고, 본 평가에서는 평가대상기술의 가치를 금액으로 환산하기 위하여 수익접근법 및 로열티공제법을 동시에 검토하였으며, 최종적으로 시장사례, 기업재무정보 및 평가서의 용도 등을 고려하여 로열티공제법을 적용하였다. 본 평가의 평가기준일은 2019년 1월 1일로 설정하였다.

(4) 평가의 주요 조건 및 가정

본 평가에서 사용한 로열티공제법은 제3자로부터 라이선스 되었을 때 지급하여야 하는 로열티를 기술소유자가 부담하지 않음으로써 절감된 로열티 지불액을 추정하여 현재가치로 환산하는 방법으로, 경제적 수명동안 평가대상기술로부터 발생하는 로열티 수입의 현재가치 합계로 기술의 가치를 산정한다. 기술의 가치 산정을 위한 세부 변수 및 가정은 “기술가치평가 실무 가이드(산업통상자원부, 2017.12)” 및 “농식품 기술가치평가 모델(농업기술실용화재단, 2014.12)”, “농식품기술가치평가 핵심변수 DB(농업기술실용화재단, 2016.11)” 에 의거 추정하였으며, 이들 변수를 추정하기 위한 세부 가정은 본 평가서 본문에서 자세하게 기술하였다.

(5) 평가결과 요약

주요 변수	추정치 또는 결과
기술의 경제적 수명(Technology life)	6년
로열티율(Royalty rate)	3.45%
할인율(Discounted rate)	13.50%
기술의 가치	179.30백만 원

(6) 종합의견

평가대상기술은 섬기린초를 이용한 기술로 우리나라 고유식물인 섬기린초를 사용하여 유효 물질을 발명할 경우 우리나라가 독자적으로 활용할 수 있다는 장점을 가진다. 천연물 유래 물질이라는 장점, 독점적으로 물질을 공급받을 수 있다는 점, 현재 상용화되는 다수의 물질들의 일부 단점만 극복하더라도 시장에 긍정적 신호를 줄 수 있다는 점 등은 특히 본 발명이 가지는 장점이라 할 수 있다.

평가대상특허의 권리범위는 심사과정을 거쳐 권리범위가 축소되었지만, 이러한 구성의 한정은 선행기술과 대비되는 구성을 한정하는 보정으로 파악되고, 실제 피부 미백에 효과가 있는 화합물에 대해 특허권의 권리범위로 포함하고 있는바, 권리범위의 적정성은 전체적으로 높은 수준으로 평가된다. 화합물의 구조를 변형하거나 작용기를 일부 치환하는 경우 본래 화합물의 갖는 피부 미백 활성이 감소하거나 소실될 수 있으며, 여러 화합물 중에서 피부 미백 효과가 가장 우수한 성분을 동정한 것에 본 발명의 특징이 있는바, 제3자가 특허침해를 회피하여 실시할 가능성은 낮은 것으로 사료된다. 평가대상특허의 화합물의 사용 여부는 침해발견 용이성은 매우 쉬운 수준이고, 침해입증의 용이성도 매우 쉬운 수준으로 평가된다.

평가대상기술이 침투하려 하는 미백 원재료 시장에는 이미 다양한 성분들이 화장품 기능성 원재료로 인정을 받아 사용되고 있다. 따라서 동 기술을 이용하여 생산한 미백 성분의 경우 그 효과성을 인정받고 소비자에게 차별성을 전달하는데 있어 많은 노력이 필요하기 때문에 기업은 초기에 해당 제품을 적극적으로 수용하지 않을 가능성이 높다. 또한, 국내 화장품 기업의 경우 중국에 많은 제품을 수출하고 있는데, 중국 화장품 시장의 경우 새로운 기능성 원재료를 인정받기가 매우 까다롭기 때문에 중국 수출 모델의 경우 새로운 성분을 추가하지 않는 경우가 많다. 이 경우 내수용과 수출용을 따로 제작하지 않기 때문에 많은 미백 화장품의 경우 중국에서 인정받지 못하는 미백 성분을 사용하지 않을 가능성이 높을 것으로 평가된다.

동 기술은 미백 기능성 화장품에 적용 가능하다. 현존하는 미백 화장품 원재료 시장규모에 대한 공식적인 수치는 부재한 상태이다. 따라서 본 기술제품에 대한 수요는 국내 업체의 기능성 화장품의 시장규모를 조사한 후 미백 화장품 시장규모를 파악하고, 그 시장 중 원재료 시장의 규모를 추정한 후 동 기술적용 제품의 시장점유율을 적용하여 산출하였다.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.