



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0131745
(43) 공개일자 2017년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 3/00 (2006.01) A23L 1/304 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01) A61K 8/19 (2006.01)
C01G 7/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 3/00 (2013.01)
A23L 33/16 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0061507

(22) 출원일자 2016년05월19일

심사청구일자 2016년05월19일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

양덕춘

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842 111동 301호 (보라동, 현대모닝사이드2차아파트)

김연주

경기도 성남시 분당구 동판교로 275 107동 801호 (삼평동, 풍성신미주아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 15 항

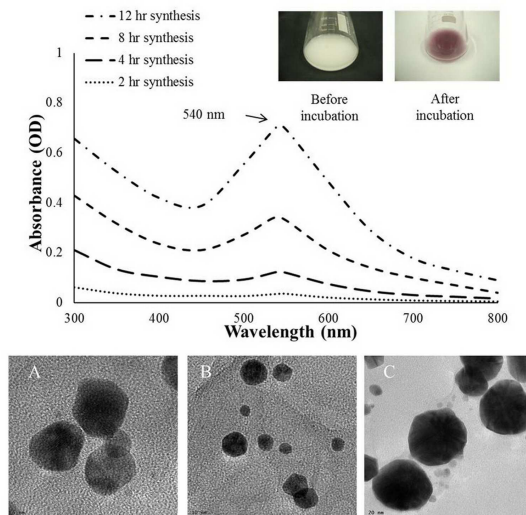
(54) 발명의 명칭 락토바실러스 속 미생물을 이용한 금 나노입자의 제조방법 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 미생물을 이용한 금 나노입자의 제조방법 및 이의 이용에 관한 것으로, 구체적으로 락토바실러스 속 미생물 또는 이의 배양물과 금 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는 금 나노입자의 제조방법, 상기 미생물 또는 이의 배양물을 포함하는 금 나노입자 제조용 조성물, 상기 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자, 상기 나노입자를 포함하는 향산화용 약학 조성물, 식품 조성물, 및 화장품 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 락토바실러스 속 미생물 또는 이의 배양물과 금 전구체를 반응시켜 제조한 금 나노입자는 우수한 항산화 활성을 나타내므로, 약학 조성물, 식품 조성물, 화장품 조성물 등의 다양한 분야에서 널리 사용될 수 있다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

A61K 33/24 (2013.01)

A61K 8/19 (2013.01)

C01G 7/00 (2013.01)

C01P 2004/64 (2013.01)

(72) 발명자

조수아 마커스

경기도 용인시 기흥구 서천동 애지원 인삼 소재은행

람야 매티알라칸

경기도 용인시 기흥구 서천동 애지원 인삼 소재은행

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 313038-03-3-SB010

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농식품관련 유용미생물을 활용한 고부가가치 제품개발

연구과제명 한국형 토종 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ0120342016

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린

연구과제명 Probiotic 유래 재조합 효소를 이용한 희귀유용사포닌 대량생산 및 ginsenoside nanoconjugate 최적생산 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2016.01.04 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 미생물 또는 이의 배양물과 금 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는, 금 나노입자의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 금속 전구체는 HAuCl_4 인 것인, 금 나노입자의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 반응은 10 내지 40°C 에서 수행되는 것인, 금 나노입자의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 반응은 10 내지 72시간 동안 수행되는 것인, 금 나노입자의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 반응에 사용되는 금 전구체의 농도는 0.01 내지 100 mM인 것인, 금 나노입자의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 미생물은 락토바실러스 김치쿠스(*Lactobacillus kimchicus*) DCY51^T인 것인, 금 나노입자의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 반응액을 원심분리하여 금 나노입자를 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 금 나노입자의 제조방법.

청구항 8

락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 미생물 또는 이의 배양물을 포함하는, 금 나노입자 제조용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 미생물은 락토바실러스 김치쿠스(*Lactobacillus kimchicus*) DCY51^T인 것인, 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된, 금 나노입자.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 금 나노입자의 모양은 구의 형태인 것인, 금 나노입자.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 금 나노입자의 크기는 1 내지 50 nm인 것인, 금 나노입자.

청구항 13

제10항의 금 나노입자를 포함하는, 항산화용 약학 조성물.

청구항 14

제10항의 금 나노입자를 포함하는, 항산화용 식품 조성물.

청구항 15

제10항의 금 나노입자를 포함하는, 항산화용 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 미생물을 이용한 금 나노입자의 제조방법 및 이의 이용에 관한 것으로, 구체적으로 락토바실러스 속 미생물 또는 이의 배양물과 금 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는 금 나노입자의 제조방법, 상기 미생물 또는 이의 배양물을 포함하는 금 나노입자 제조용 조성물, 상기 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자, 상기 나노입자를 포함하는 항산화용 약학 조성물, 식품 조성물, 및 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 금속 나노입자는 입자 크기의 분포가 균일하고, 표면의 개질이 쉬우며, 우수한 안정성을 나타내는 등의 구체적이고 특별한 특징 덕분에 다양한 과학 분야 특히, 의생명과학 및 공학 분야에서 많은 관심을 받고 있다(Mody VV, J. Pharm. Bioall. Sci., 2010;2:282.; Moritz M, Chem. Eng. J., 2013;228:596-613.; Iravani S. ISRN., 2014;2014.). 특히, 의료 분야에서는 나노스케일의 자기를 이용한 의료영상 및 바이오센서, 유전자 타겟 및 약물 전달 등에 적용된다.

[0003] 일반적으로 금속 나노입자의 제조에는 화학적 합성방법, 물리적 제조방법 등이 이용되고 있으며, 화학적 합성방법은 비교적 공정이 간단하나 비용이 많이 들고 시약의 독성 등이 문제시 되고 있다. 또한, 물리적 방법은 나노입자의 크기를 제어하기 어렵고, 고가의 제조 설비가 요구되는 등의 문제점 때문에 효과적인 금속 나노입자의 제조가 어렵다는 단점이 있다. 따라서, 값이 저렴하고, 제조 방법이 간단하며, 독성이 없고, 위생적이고, 환경 친화적인 금속 나노입자의 제조방법에 대한 연구가 절실한 실정이다.

[0004] 이와 같은 이유로, 최근에는 미생물을 이용한 친환경적이며 안정적인 나노입자의 합성 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 미생물을 통한 생물학적 합성방법은 입자의 직경이 고른 나노입자의 합성이 가능하며, 미생물의 표면 또는 내부에 존재하는 환원물질에 의해 금속이온을 환원시키기 때문에 별도의 환원제 등의 화학물질을 사용하지 않아 친환경적, 경제적 및 인체에 무해한 방법으로 금속 나노입자를 제조할 수 있다는 장점이 있다.

[0005] 관련하여, 바르가배아 인디카(*Bhargavaea indica*), 스트렙토마이세스 마이크로플라버스(*Streptomyces microflavus*) 등의 미생물은 각각 꽃모양, 나노삼각형모양의 금 나노입자를 합성하며, 나노입자의 합성에 경제적이고 환경 친화적인 제조 수단으로 이용될 수 있음이 공지된바 있다(Singh P, Artif Cells Nanomed Biotechnol., 2015;1-6.; Nejad MS, IET Nanobiotechnol., 2016;10:33-8.). 또한, 락토바실러스 델브루키(*Lactobacillus delbruecki*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 민덴시스(*Lactobacillus mindensis*) 등을 포함하는 서로 다른 락토바실러스(*Lactobacillus*) 종을 이용하여 은 나노입자를 생합성하거나 생물학적으로 이용하는 방법 등이 개발된 바 있다. 그러나, 락토바실러스 종을 이용하여 금 나노입자를 제조하는 방법과 그것을 생물학적으로 이용하는 방법 등은 알려진 바 없었다. 또한, 미생물을 이용한 생산이기 때문에 반응이 느리다는 점, 미생물의 생장조건과 전구체 재료 물질의 농도 조절이 어렵다는 점 등 또한 금속 나노입자 생합성의 문제점이었다.

[0006] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 미생물을 이용한 효율적인 금속 나노입자의 제조방법을 개발하기 위해 예의 노력 연구한 결과, 락토바실러스 속 미생물인 락토바실러스 김치쿠스(*Lactobacillus kimchicus*) DCY51^T는 우수한 금 나노입자 제조능을 가지며, 상기 미생물에 의해 제조된 금 나노입자는 매우 우수한 항산화 활성을 가짐을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 미생물 또는 이의 배양물과 금 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는, 금 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 락토바실러스 속 미생물 또는 이의 배양물을 포함하는, 금 나노입자 제조용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 제조방법에 의해 제조된, 금 나노입자를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자를 포함하는, 항산화용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자를 포함하는, 항산화용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자를 포함하는, 항산화용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 하나의 양태는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 미생물 또는 이의 배양물과 금 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는, 금 나노입자의 제조방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 락토바실러스 속 미생물 또는 이의 배양물은 우수한 금 나노입자 제조활성을 가지므로, 이를 이용한 본 발명의 금 나노입자의 제조방법은 화학적 합성방법 및 물리적 합성방법에 비해 친환경적이며 안정적으로 금 나노입자를 제조할 수 있어, 다양한 산업에 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0015] 이하, 본 발명의 금 나노입자의 제조방법을 상세히 설명한다.
- [0016] 본 발명의 용어, "락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 미생물"은 락토바실러스 속에 포함되는 하나 이상의 미생물을 의미한다. 상기 락토바실러스 속 미생물은 금 나노입자 제조활성을 가지는 한 제한은 없으나, 구체적으로 락토바실러스 델브루키(*Lactobacillus delbrueckii*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 민덴시스(*Lactobacillus mindensis*), 락토바실러스 오도라티토푸이(*Lactobacillus odoratitofui*), 락토바실러스 파라콜리노이드(*Lactobacillus paracollinoides*), 락토바실러스 시밀리스(*Lactobacillus similis*) 및 락토바실러스 김치쿠스(*Lactobacillus kimchicus*)일 수 있으며, 구체적으로 락토바실러스 김치쿠스, 더욱 구체적으로 락토바실러스 김치쿠스 DCY51^T일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명에서, 상기 "락토바실러스 김치쿠스 DCY51^T"는 "DCY51^T 균주" 또는 "DCY51^T"와 동일한 의미로 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 용어, "배양물"은 미생물을 배양한 다음 수득한 산물을 의미한다. 상기 배양물은 미생물을 포함하는 형태 및 상기 미생물을 포함하는 배양액에서 원심분리 등으로 미생물을 제거한 형태도 모두 포함하는 개념이다.
- [0019] 본 발명의 용어, "금 나노입자"는 금으로 이루어진, 크기가 1~100nm인 초미세 입자로, 작은 크기에 기인하는 특이하고도 다양한 성질을 보이는 입자를 의미한다.
- [0020] 본 발명의 금 나노입자의 제조에는 다양한 금 전구체를 사용할 수 있고, 구체적인 예로, 금 나노입자의 제조에는 테트라클로로금산 (III) 수화물(hydrogen tetrachloroaurate (III) hydrate, HAuCl₄·3H₂O), 테트라클로로금산 (III) (HAuCl₄), NaAuCl₃ 및 AuCl₃로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 제조방법에서, 반응 온도는 금 나노입자 제조에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명의 반응 온도는 락토바실러스 속 미생물 또는 이의 배양물이 금속 나노입자를 제조할 수 있는 한 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 5 내지 50℃, 더욱 구체적으로 10 내지 40℃일 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명의 제조방법에서, 반응 시간은 금속 나노입자 제조에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명의 반응 시간은 락토바실러스 속 미생물 또는 이의 배양물이 금속 나노입자를 제조할 수 있는 한 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 1 내지 100시간 더욱 구체적으로는 10 내지 72시간일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명의 제조방법에서, 금 전구체의 농도는 금 나노입자의 제조에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명의 금

전구체의 농도는 락토바실러스 속 미생물 또는 이의 배양물이 금 나노입자를 제조할 수 있는 한 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 0.001 내지 1000 mM, 더욱 구체적으로는 0.01 내지 100 mM일 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명의 제조방법은 락토바실러스 속 미생물 또는 이의 배양물과 금 전구체의 반응액을 원심분리하여 금 나노입자를 회수하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 락토바실러스 김치쿠스 DCY51^T가 포함된 배양액에 1 mM의 테트라클로로금 산 (III) 수화물(hydrogen tetrachloroaurate (III), HAuCl₄·3H₂O)을 넣고 30℃에서 최대 12시간 동안 배양하여 금 나노입자를 제조하였다. 이후, 상기 반응 혼합액을 원심분리하여 세포 펠렛을 수득하였고, 이를 초음파처리한 후, 불순물을 제거하고 건조함으로써 금 나노입자의 분말을 수득하였다(실시예 2 및 도 3a).

[0026] 본 발명의 다른 하나의 양태는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 미생물 또는 이의 배양물을 포함하는, 금 나노입자 제조용 조성물을 제공한다.

[0027] 이때, 상기 "락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 미생물", "배양물" 및 "금 나노입자"의 정의는 전술한 바와 같다.

[0028] 본 발명의 락토바실러스 속 미생물 또는 이의 배양물은 우수한 금 나노입자 제조활성을 가지므로, 이를 포함하는 본 발명의 조성물은 친환경적이며 안전한 금 나노입자를 제조하는 데에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 제조방법에 의해 제조된, 금 나노입자를 제공한다.

[0030] 이때, 상기 "금 나노입자"의 정의는 전술한 바와 같다.

[0031] 본 발명의 금 나노입자는 의료용, 생물학적 분석용, 연료용, 전자부품 재료의 용도로 사용될 수 있으며, 또한, 크기나 형태, 표면의 화학적 특성 또는 응집상태를 변화시킴으로써, 입자의 광학적, 전자적 특성을 조절할 수 있다.

[0032] 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자의 모양은 원삼각형 (truncated triangle), 삼각형, 정사각형, 오각형, 육각형, 구형 또는 나노바 (nanobar)일 수 있으며, 구체적으로 구형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 또한, 상기 금 나노입자의 크기는 0.1 내지 100 nm, 구체적으로 1 내지 50 nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, FE-TEM을 통해 확인한 결과, 금 나노입자는 구의 형태를 가지며, 평균 크기는 약 10 - 20 nm임을 확인하였다(도 3a 및 4). 또한, 상기 금 나노입자는 균체의 세포막 주변에 분포하고, 일부는 세포외부로 방출됨을 확인하였다(도 3b).

[0035] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자를 포함하는, 항산화용 약학 조성물을 제공한다.

[0036] 이때, 상기 "금 나노입자"의 정의는 전술한 바와 같다.

[0037] 본 발명의 용어, "항산화"는 유해한 프리라디칼(free radical)을 제거하는 것을 의미하며, 상기 프리라디칼에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 현상을 의미한다.

[0038] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 상기 금 나노입자는 전구체인 금염(HAuCl₄·3H₂O)보다 우수한 라디칼 소거 활성을 가짐을 확인하였고, 이러한 활성은 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다(도 9). 이는, 본 발명의 금 나노입자는 의약 또는 식품 등의 다양한 분야에서 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0039] 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자는 항산화 활성을 나타내므로, 이들을 유효성분으로 포함하는 항산화용 약학 조성물은 활성산소로 인해 발생하는 질환들을 예방, 개선 및 치료하기 위한 목적으로 사용될 수 있다.

[0040] 상기 활성산소로 인해 발생하는 질환들은 특별히 이에 제한되지는 않으나, 구체적으로 동맥경화증, 루게릭병, 파킨슨병, 알츠하이머, 근위축색경화증 및 헌팅톤병을 포함하는 퇴행성 신경질환, 심근경색, 협심증, 관상동맥 질환, 허혈성 심장질환을 포함하는 심혈관 질환, 뇌졸중을 포함하는 허혈성 뇌질환, 당뇨병, 위염 및 위암을 포함하는 소화기계 질환, 노화, 암, 백혈병, 노화, 류마티스 관절염, 간염, 아토피성 피부염 등 다양한 질환을 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로 활성산소에 의해 발생하는 노화일 수 있다.

- [0041] 본 발명의 약학 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0042] 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 항산화용 약학 조성물에 포함된 상기 금 나노입자의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 구체적으로 0.01 내지 20 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.
- [0044] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1인당 약 0.1 ng 내지 약 100 mg/kg, 구체적으로 1 ng 내지 약 10 mg/kg로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자를 포함하는, 항산화용 식품 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자는 항산화 활성을 나타내므로, 활성산소로 인해 발생하는 질환의 예방 또는 개선을 도모할 수 있는 식품의 형태로 제조되어 섭취할 수 있다.
- [0048] 이때, 상기 식품에 포함되는 상기 금 나노입자의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 식품 조성물의 총 중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%, 더욱 구체적으로 0.1 내지 1 중량%로 포함될 수 있다. 식품이 음료인 경우에는 100ml를 기준으로 1 내지 10g, 더욱 구체적으로 2 내지 7g의 비율로 포함될 수 있다.
- [0049] 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조

미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(돌신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용된다.

[0050] 한편, 상기 금 나노입자를 포함하는 항산화용 식품 조성물을 이용하여 활성산소로 인해 발생하는 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품을 제조할 수 있다.

[0051] 상기 용어, "기능성 식품(functional food)"이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 활성산소로 인해 발생하는 질환의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.

[0052] 구체적인 예로, 상기 식품 조성물을 이용하여 활성산소로 인해 발생하는 질환을 예방 또는 개선시킬 수 있는 가공식품을 제조할 수 있다. 이런 가공식품에는 예들 들어, 과자, 음료, 주류, 발효식품, 통조림, 우유가공식품, 육류가공식품, 국수 등을 포함한다. 과자는 비스킷, 파이, 케익, 빵, 캔디, 젤리, 껌, 시리얼(곡물푸레이크 등의 식사대용식품류 포함) 등을 포함한다. 음료는 음용수, 탄산음료, 기능성이온음료, 주스(예들 들어, 사과, 배, 포도, 알로에, 감귤, 복숭아, 당근, 토마토 주스 등), 식혜 등을 포함한다. 주류는 청주, 위스키, 소주, 맥주, 양주, 과실주 등을 포함한다. 발효식품은 간장, 된장, 고추장 등을 포함한다. 통조림은 수산물 통조림(예들 들어, 참치, 고등어, 꽂치, 소라 통조림 등), 축산물 통조림(쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 칠면조 통조림 등), 농산물 통조림(옥수수, 복숭아, 파일애플 통조림 등)을 포함한다. 우유가공식품은 치즈, 버터, 요구르트 등을 포함한다. 육류가공식품은 돈까스, 비프까스, 치킨까스, 소세지, 탕수육, 너겟류, 너비아니 등을 포함한다. 밀봉포장생면 등의 국수를 포함한다. 이 외에도 상기 조성물은 레토르트식품, 스프류 등에 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자를 포함하는, 항산화용 화장품 조성물을 제공한다.

[0054] 상기 금 나노입자를 포함하는 항산화용 화장품 조성물은 활성산소로 인하여 유발되는 피부의 노화를 예방 또는 개선시킬 수 있는 기능성 화장품의 제조에 사용될 수 있다.

[0055] 상기 용어, "기능성 화장품(cosmedical, cosmeceutical)"이란 화장품에 의약품의 전문적인 치료기능이 도입되어, 일반 화장품과 달리 생리활성적인 효능, 효과가 강조된 전문적인 기능성을 갖는 제품으로서, 피부의 미백에 도움을 주는 제품, 피부 주름개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태우거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품 중에서 보건복지부령이 정하는 화장품을 의미한다.

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 기능성 화장품은 다양한 기능성 화장품 중에서 항산화 활성을 나타내어 피부노화 방지에 도움을 주는 제품을 의미하고, 구체적으로 상기 금 나노입자를 유효성분으로 포함하는 피부 노화방지용 기능성 화장품이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않고, 상기 피부 노화방지용 기능성 화장품에 포함되는 상기 금 나노입자의 함량 역시 특별히 제한되지 않는다.

[0057] 본 발명의 피부 노화방지용 기능성 화장품은 상기 금 나노입자를 유효성분으로 포함하고, 통상적으로 사용되는 화장료를 추가로 함유할 수 있는데, 예를 들면 수용성 스킨제제화를 위하여 글리세롤, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 솔비톨, 폴리에틸렌글리콜, 카르복시비닐 폴리머, 잔탄검, 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 하이드록시메틸셀룰로오스, 로커스트빈검, 알란토인, 카라기난 등을 첨가할 수 있으며; 점도와 경도조절제로 밀납, 파라핀 왁스, 스테아릴알콜, 카르나우바 왁스, 칸데릴라 왁스 및 칼슘스테아레이트, 알루미늄스테아레이트, 아연스테아레이트, 위치하젤(witchhazel) 등을 사용할 수 있고; 자외선 흡수제로 부틸메톡시디벤조일메탄, 옥틸메톡시신나메이트 등을 사용할 수 있으며; 안료로는 이산화티탄, 미립자 이산화티탄, 카울린, 나이론 파우더, 탈크, 세리사이트, 마이카, 폴리메틸메타크릴레이트 등의 제질 안료와 황색산화철, 흑색산화철, 적색산화철, 울트라마린, 산화크롬, 수산화크롬 등의 착색안료를 사용할 수 있고; 보습제로 1,3-부틸렌글리콜, 농글리세린, 에틸렌글리콜 등과 키틴, 키토산, 히아론산, 하이알루로닌산, 젖산, 글리콜산 등의 천연보습 물질들을 이용할 수 있으며; 방부제로 파라옥시안식향산 에스테르류, 이미다졸리디닐우레아 등을 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 상기한 성분들을 제품특성에 따라 1종 또는 2종이상 혼용 배합할 수도 있다.

[0058] 본 발명의 기능성 화장품은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니

다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0059] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0060] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0061] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0062] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0063] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0064] 본 발명의 락토바실러스 속 미생물 또는 이의 배양물과 금 전구체를 반응시켜 제조한 금 나노입자는 우수한 항산화 활성을 나타내므로, 약학 조성물, 식품 조성물, 화장품 조성물 등의 다양한 분야에서 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 16s rRNA 유전자 서열 분석을 토대로 계통분류도이며, 락토바실러스 김치쿠스(*Lactobacillus kimchicus*) DCY51^T 균주와 락토바실러스 속에 속하는 균주간의 계통분류 관계를 보여준다. 양측을 가리키는 검은색 원은 최대-간절 유연관계에서 회수된 것임을 의미한다. 1000 복제(replication)를 기반으로 한 부트스트랩 값(Bootstrap values, >50%)은 분기 지점에 표시하였고, 스케일바(Scale bar)는 뉴클레오티드(nucleotide) 위치당 0.005 치환을 나타낸다. 페디오코커스 이노피나투스(*Pediococcus inopinatus*) (AJ271383) DSM 20285^T 는 그룹에 포함되지 않았다.

도 2는 DCY51^T 균주의 콜로니 형태를 보여주는 이미지로서, 37℃에서 48시간 동안 MRS 아가(agar)에서 배양한 모습이다.

도 3a는 시간-의존적 UV-Vis 스펙트럼과 본 발명의 금 나노입자의 TEM 이미지이다. 상기 금 나노입자는 구 형태를 나타내며, A는 5 nm, B는 10 nm 및 C는 20nm의 크기를 갖는 금 나노입자의 모습이다.

도 3b는 락토바실러스 김치쿠스 균주내에서 생산 및 축적된 금 나노입자의 균주내 분포를 나타내는 TEM 이미지이다.

도 4는 본 발명의 금 나노입자의 형태, 분포 및 순도를 보여주며, A는 본 발명의 금 나노입자의 EDX 스펙트럼, B는 상기 금 나노입자 용액의 TEM 이미지, C는 금 원소(적색으로 표시)의 분포를 보여주는 원소 매핑 결과이다.

도 5는 본 발명의 금 나노입자의 X-선 회절 패턴을 보여준다.

도 6은 본 발명의 금 나노입자의 선택 영역 전자 회절선택 영역 전자 회절(Selected Area Electron Diffraction; SAED) 패턴을 보여준다.

도 7은 본 발명의 금 나노입자의 강도에 대한 입자 크기 분포 프로필을 보여준다.

도 8은 본 발명의 금 나노입자의 FT-IR 스펙트럼이다.

도 9는 본 발명의 금 나노입자 및 이의 전구체 금염의 항산화 활성을 보여주며, A는 DPPH 소거 활성, B는 서로 다른 농도에서 나타내는 DPPH 소거 활성을 퍼센트로 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- [0067] **실시예 1. 금 나노입자 생합성 미생물의 특징 확인**
- [0068] 김치에서 분리한 락토바실러스 김치쿠스(*Lactobacillus kimchicus*) DCY51^T의 특징을 확인하기 위하여, 유전적 변이, 생화학적 특성 및 유전체 DNA의 G+C 몰%(mole%) 함량을 분석하였다.
- [0069] 구체적으로, 상기 균주의 유전체 DNA는 시중에서 구입 가능한 유전체 DNA 추출 키트(Core Bio System)를 이용하여 수득하였다. 상기 유전체 DNA에서 분리한 16S rRNA 유전자를 공지된 보편적인 박테리아 프라이머 세트인 27F, 518F, 800R 및 1512R를 이용하여 증폭하였고(Singh P, J Nanomater., 2015.; Wang C, Artif Cells Nanomed Biotechnol., 2015:1-6.; Singh P, Enzyme Microb Technol. 2016;86:75-83.), 정제된 상기 PCR 생성물의 염기서열은 Genotech (Daejeon, Korea)에서 분석하였다.
- [0070] 이후, 관련 분류군의 16S rRNA 유전자 염기서열은 GenBank 데이터베이스 및 EzTaxon-e 서버에서 확인하였다. 관련 분류군의 다중 정렬은 ClustalX 소프트웨어를 통해 수행하였고, 공백은 BioEdit 프로그램을 이용하여 수정하였다. 진화적 거리는 Kimura's two-parameter 모델을 이용하여 계산하였으며, 계통발생 나무는 MEGA6 프로그램을 이용한 neighbor-joining 및 최대-가산결 알고리즘(maximum-parsimony algorithm)을 이용하여 구성하였다. 부트스트랩 값(Bootstrap values)은 1000개의 복제품을 기초로 평가하였다. 표준 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열과 DCY51^T 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열의 비교는 EzTaxon-e 서버를 이용하여 수행하였다.
- [0071] 그 결과, 본 발명의 균주는 김치에서 분리된 그람-양성의 세균인 락토바실러스 김치쿠스 DCY51^T와 100%의 유사성을 나타냄을 확인하였다(Liang ZQ, Int J Syst Evol Microbiol., 2011;61:894-7.). 또한, DCY51^T 균주는 락토바실러스 오도라티토푸이(*Lactobacillus odoratitofui*) YIT 11340^T (97.18%), 락토바실러스 파라콜리노이드(*Lactobacillus paracollinoides*) DSM 15502^T (96.97%), 및 락토바실러스 시밀리스(*Lactobacillus similis*) JCM 2765^T (96.93%)와 높은 16S rRNA 유전자 유사도를 나타냄을 확인하였다.
- [0072] 또한, 도 1에서 볼 수 있듯이, 상기 균주의 16S rRNA 유전자 서열(1499 bp, NCBI accession number EU678893)을 기반으로 한 계통분류 분석을 통해, 본 발명의 DCY51^T 균주는 락토바실러스 속에 속함을 확인하였다. 계통분류도에 나타난 동일한 무리는 최대-간결 알고리즘을 통해 나타내었고, 기존에 공지된 바와 같이(Liang ZQ, Int J Syst Evol Microbiol., 2011;61:894-7.), DCY51^T 균주의 DNA G+C 함량은 39.7 몰%임을 확인하였다.
- [0073] 아울러, 도 2에서 볼 수 있듯이, MRS 아가에서 배양한 콜로니의 형태를 확인한 결과, 상기 균주의 콜로니는 흰색의 불록한 원형이고, 전체 가장자리는 매끈하고 빛나는 것을 확인하였다.
- [0074] 한편, 락토바실러스 김치쿠스 DCY51^T의 16S rRNA 유전자 서열은 NCBI에 accession number EU678893로 공지되었다. 또한, 상기 균주는 Korean Collection for Type Cultures (KCTC 12976) 및 Japan Collection for Microorganism (JCM 15530) culture collection center에 기탁되었다.
- [0075] **실시예 2. 균주를 이용한 금 나노입자의 합성 방법**
- [0076] 상기 락토바실러스 김치쿠스 DCY51^T를 이용하여 금 나노입자를 합성하였다.
- [0077] 구체적으로, 아가 미디어(agar media)에서 활성화시킨 상기 균주를 MRS 배지 용액에 접종하였고, 37℃에서 120 rpm으로 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 접종한 배양 용액 25 mL을 8000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 바이오매스(biomass, 균체)를 수득하였고, 이를 금 나노입자의 세포 내 합성에 사용하였다. 수득한 상기 바이오매

스를 증류수로 행군 뒤, 15 mL의 증류수에 재현탁하였다. 필터로 여과되어 멸균된 1 mM의 테트라클로로금산(III) 수화물(hydrogen tetrachloroaurate (III), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)을 상기 현탁액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 30 °C에서 배양하였으며, 색이 변할 때까지 암조건의 200 rpm에서 교반하였다. 금 나노입자의 세포 내 합성 여부는 상기 반응 혼합물의 색 변화를 관찰함으로써 판단하였다. 배양이 완전히 끝난 후, 상층액을 제거하기 위하여 상기 반응 혼합액을 5000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 이후, 수득한 세포 펠렛을 초음파처리하여 증류수로 행구었고, 5000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 금 나노입자는 17,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 수득하였다. 수득한 상기 금 나노입자의 분순물을 제거하기 위하여, 메탄올 및 증류수로 행구었다. 이후, 하룻밤 동안 자연 건조하여 금 나노입자의 분말을 수득하였다.

[0078] 그 결과, 도 3에서 볼 수 있듯이, 반응을 진행하기 전의 배지의 색은 물에 바이오매스를 현탁한 색인 황색-백색을 나타내는 반면에, 테트라클로로금산(III) 수화물($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)을 첨가한 이후에는 반응 혼합액의 색이 짙은 보라색으로 바뀌는 것을 확인하였다. 또한, 추가의 12시간 동안 배양하여도, 색 변화가 관찰되지 않음을 확인함으로써, 상기 금 나노입자는 락토바실러스 김치쿠스 DCY51^T 균주에 의해 12시간 이내에 합성됨을 확인하였다.

[0079] 실시예 3. 균주에 의해 합성된 금 나노입자의 특성 분석

[0080] 실시예 3-1. 금 나노입자의 존재 확인

[0081] 금 나노입자는 빛의 특정 파장과 상호작용함에 따라 특정한 광학 특성을 나타낸다. 이에, UV-Vis 스펙트럼 분석을 통해 반응 혼합액의 분획물의 흡광 스펙트럼을 분석함으로써 생합성된 금 나노입자의 존재를 확인하였다.

[0082] 구체적으로, 상기 분획물을 UV-Vis 분광광도계(UV-Vis. Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences)를 이용한 300 - 800 nm의 범위에서 확인하였다. 1 cm의 경로 길이를 갖는 석영 큐벳에 상기 분획물을 200 μL 의 부피로 두어 스펙트럼을 분석하였다.

[0083] 그 결과, 도 3a에서 볼 수 있듯이, 시간 의존적인 UV-Vis의 스펙트럼을 통해, ~ 540 nm에서 흡광도의 메인 피크가 관찰됨을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 반응 혼합물에서 금 나노입자가 형성되고 있음을 알 수 있었다.

[0084] 실시예 3-2. 금 나노입자의 형태, 분포 및 순도 확인

[0085] 상기 금 나노입자의 형태, 분포 및 순도를 확인하기 위하여, 각각 전계 방출 투과 전자 현미경(Field Emission Transmission Electron Microscopy; FE-TEM), 에너지 분산 X선 분광법(Energy Dispersive X-ray spectroscopy; EDX), 선택 영역 전자 회절(Selected Area Electron Diffraction; SAED), 및 200 kV에서 작동하는 JEM-2100F (JEOL) 기기의 원소 매핑(elemental mapping)을 수행하였다.

[0086] 구체적으로, 금 나노입자의 형태 및 구조를 파악하기 위하여, FE-TEM을 수행하였다. FE-TEM의 샘플은 일부 정제된 금 나노입자 펠렛 용액의 방울을 탄소-코팅된 구리 그리드 위에 두고, 60°C의 오븐에서 건조하여 준비하였다.

[0087] 이후, 상기 금 나노입자의 분포를 분석하기 위하여 EDX를 수행하였고, 금의 상대적인 함량을 통해 금 나노입자의 순도(% Au)를 파악하기 위하여 원소 매핑을 이용하였고, 원자의 회절 패턴은 선택 영역(SAED)에서 확인하였다.

[0088] 그 결과, 도 3a의 A 내지 C에서 볼 수 있듯이, 락토바실러스 김치쿠스 DCY51^T 균주에 의해 합성된 금 나노입자의 평균 크기는 약 10 - 20 nm임을 확인하였다.

[0089] 또한, 락토바실러스 김치쿠스 균주내에서 생산된 금 나노입자가 균체 외부로 방출되는지 아니면 균체내에 축적되는지를 확인하고, 만일, 균체내에 축적되면 어떠한 위치에 축적되는지를 확인하기 위하여, 락토바실러스 김치쿠스 균주를 대상으로 넓은 범위에서 FE-TEM을 수행하였다.

[0090] 그 결과, 도 3b에서 보듯이, 락토바실러스 김치쿠스 균주내에서 생산된 금 나노입자는 상기 균주의 세포막 주변에 위치하고, 일부는 상기 균주의 외부로 방출됨을 알 수 있었다.

[0091] 한편, 도 4의 A에서 볼 수 있듯이, 생합성된 금 나노입자의 EDX 스펙트럼은 2.3 keV에서 가장 높은 광흡수 대역 피크를 나타냄을 확인하였고, 이는 나노크기의 금 입자의 피크와 동일한 특징을 나타냄을 확인하였다.

[0092] 아울러, 도 4의 B 및 C에서 볼 수 있듯이, 전자 이미지에서도 금 원소가 분포함을 선명하게 볼 수 있었으며, 금 나노입자 중에서도 우세한 원소임을 확인하였으며, 구의 형태를 가짐을 확인하였다.

[0093] **실시예 3-3. 금 나노입자의 결정 구조 확인**

[0094] 상기 금 나노입자의 결정 구조를 확인하기 위하여, X-선 회절(X-Ray Diffraction; XRD) 분석을 수행하였다.

[0095] 구체적으로, X-선 회절기기(D8 Advance, Bruker, Germany)를 이용하여 수행하였다. 상기 기기는 40 kV 및 40 mA, 1.54의 CuK α 방사, 6° /분의 스캔 비율, 0.02° 의 스텝 크기, 20 - 80° 의 2 θ 범위에서 작동하였다.

[0096] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, 상기 금 나노입자는 20 - 80° 범위의 2 θ 스펙트럼 값에서 강한 회절 패턴을 보임을 확인하였다. 이는, 결정화된 금 나노입자의 회절 패턴과 동일함을 확인하였다(Singh P, Artif Cells Nanomed Biotechnol., 2015:1-6.). 네 개의 특징적인 피크는 브래그 반사(Bragg's reflection)의 (111), (200), (220) 및 (311) 격자면의 금 원소의 회절 피크를 나타냄을 확인하였다. 가장 넓은 피크는 38.29° (2 θ)에서 측정되었으며, 이는 (111) 면과 상응하였다. 세 개의 추가적인 브래프 피크는 44.51° (2 θ), 64.67° (2 θ) 및 77.71° (2 θ)에서 관찰되었으며, 이는 (200), (220) 및 (311) 면과 상응함을 확인하였다. 이러한 세 개의 격자면에서 측정된 강도는 (111) 면에서 측정된 것보다 낮음을 확인하였고, 나노입자는 주로 (111)에서 기인한 것임을 알 수 있었다.

[0097] 또한, 도 6에서 볼 수 있듯이, 금 나노입자의 평균 직경을 셰러 방정식(Scherrer equation)으로 측정한 결과, 평균 결정의 크기는 약 13 nm임을 확인하였고, 선택 영역의 전자 회절(selected area electron diffraction; SAED) 패턴은 나노입자의 (111) 패턴임을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 본 발명의 금 나노입자는 자연에서 결정으로 존재하며, 면심 입방 구조를 가짐을 알 수 있었다.

[0098] **실시예 3-4. 금 나노입자의 크기 확인**

[0099] 상기 금 나노입자의 크기를 확인하기 위하여, 동적광산란(Dynamic Light Scattering; DLS) 분석을 수행하였다.

[0100] 구체적으로, 상기 금 나노입자의 크기 분포 프로파일은 동적광산란(Dynamic Light Scattering; DLS, DLS-Photal, Otsuka Electronics, Japan) 기술을 이용하여 확인하였으며, 유체역학적 직경(Z-average) 및 다분산지수(polydispersity index; PDI)는 25°C에서 분석하였다. 표준으로서, 1.3328의 굴절지수, 0.8878의 점도 및 78.3의 유전율을 갖는 순수 물의 분산매체를 사용하였다.

[0101] 그 결과, 도 7에서 볼 수 있듯이, 금 나노입자의 Z-average 직경은 335.9 nm이며, PDI 0.159를 가짐을 확인하였다.

[0102] **실시예 3-5. 금 나노입자의 상호작용 분석**

[0103] 상기 금 나노입자가 환원되는데 필요한 유기 분자가 무엇인지 확인하고, 또한 상기 금 나노입자는 균주에 의해 분비된 물질 중에서 어떤 단백질과 상호작용 하는지 확인하기 위하여 푸리에 변환-적외선(Fourier Transform-Infrared; FT-IR) 분광 분석을 수행하였다.

[0104] 구체적으로, 퍼킨-엘머(Perkin-Elmer) FT-IR 분광 광도계를 이용하였다. 금 나노입자 분말을 건조한 뒤, 4 cm⁻¹의 해상도에서 4000 - 4500 cm⁻¹의 범위를 갖는 스펙트럼으로 스캐닝하여 분석하였다.

[0105] 그 결과, 도 8에서 볼 수 있듯이, 상기 금 나노입자는 여러 특징적인 피크를 나타냄을 확인하였다. 3422.71, 2351.53, 및 1048.49 cm⁻¹에서 나타난 밴드는 각각 아민(primary amines; N-H), 카복시산(carboxylic acids)의 C=O 결합, 알데히드(aldehydes), 케톤, 및 C-O 결합의 스트레치 진동(stretching vibrations)에 의한 것임을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 상기 잔기들은 금 나노입자의 캐핑 층(capping layer)을 형성하고, 이를 통해 나노입자끼리의 응집이 방지됨을 알 수 있었다.

[0106] **실시예 3-6. 금 나노입자의 안정성 확인**

[0107] 상기 금 나노입자의 안정성을 확인하기 위하여, 서로 다른 시간 동안 실온에서 보관한 반응 용액의 흡광도를 측정하였다.

[0108] 구체적으로, UV-Vis 분광광도계에서 흡광도에 유의적인 변화가 관찰되지 않으면, 안정성이 있는 것으로 판단하였다. 상기 균주를 이용하여 금 나노입자를 제조하였고, 한달 후에 상기 용액의 UV-Vis 스펙트럼을 분석하였다.

[0109] 그 결과, UV-Vis 스펙트럼에서, 흡광도 피크에 대해 큰 차이는 발견되지 않음을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 금 나노입자는 제조 후 한 달 이후에도 안정성을 유지하고 있음을 확인하였다.

[0110] 실시예 4. 금 나노입자의 항산화 활성 분석

[0111] 락토바실러스 김치쿠스 DCY51^T를 이용하여 제조한 금 나노입자의 항산화 활성을 DPPH 소거 방법을 통해 분석하였다.

[0112] 구체적으로, 20 μ L의 금 나노입자를 포함하는 반응용액을 80% 메탄올에 포함된 180 μ L의 1 mM DPPH와 혼합하였다. 반응 혼합물을 실온의 암조건에서 30분 동안 초음파 처리한 후, 상층액을 원심분리를 통해 수득하였고, UV-Vis를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, IC₅₀을 얻기 위하여, 서로 다른 농도의 금 나노입자 (10, 100, 250, 500 μ g/mL)를 이용하였다.

[0113] 라디칼 소거 활성은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다:

$$[(Absorbance_{control} - Absorbance_{sample}) / Absorbance_{control}] \times 100.$$

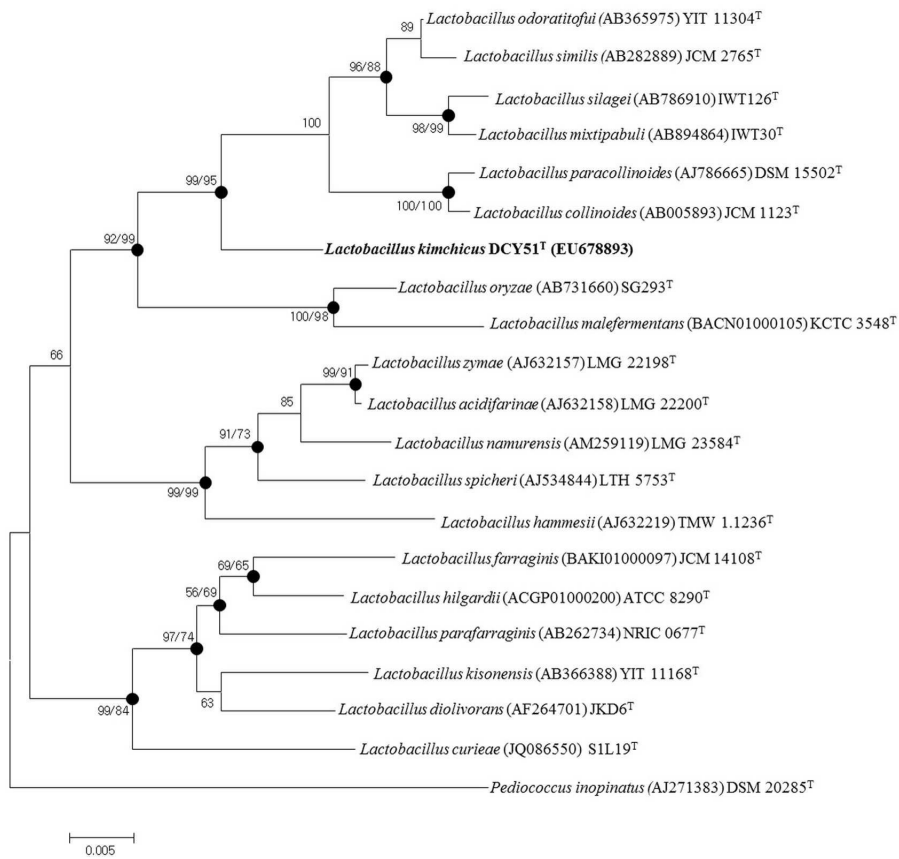
[0115] 이때, 상기 식에서 $Absorbance_{sample}$ 은 금 나노입자가 포함된 DPPH 용액의 흡광도, $Absorbance_{control}$ 는 금 나노입자가 포함되지 않은 DPPH 용액의 흡광도를 지칭한다. 금 나노입자가 포함되지 않은 DPPH 메탄올 용액을 표준 물질로 사용하였고, 수용성 메탄올 용액(80%)은 블랭크(blank)로 사용하였으며, 항산화물질인 갈산을 양성 대조군으로 사용하였다. 모든 실험은 독립적으로 세 번 수행하였고, 값은 이의 평균과 표준오차로 나타내었다.

[0116] 그 결과, 도 9의 A에서 볼 수 있듯이, 본 발명의 금 나노입자는 라디칼 소거 활성을 가짐을 확인하였다. 이러한 활성은 농도 의존적으로 증가하였고, 전구체인 염(HAuCl₄·3H₂O) 보다 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다. 합성된 금 나노입자의 가장 낮은 농도(10 μ g/mL)에서 라디칼 소거 활성은 15.85 ± 0.49 이었고, 이러한 활성은 농도가 증가함에 따라 500 μ g/mL에서 60 ± 1.82 까지 증가하였다. 그래프를 통해 IC₅₀ 값을 산출하였으며, 이는 233.75 μ g/mL임을 확인하였다(도 9의 B). 상기 결과를 통해, 본 발명의 금 나노입자는 의약 또는 식품 등의 다양한 분야에서 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0117] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예 및 실험예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

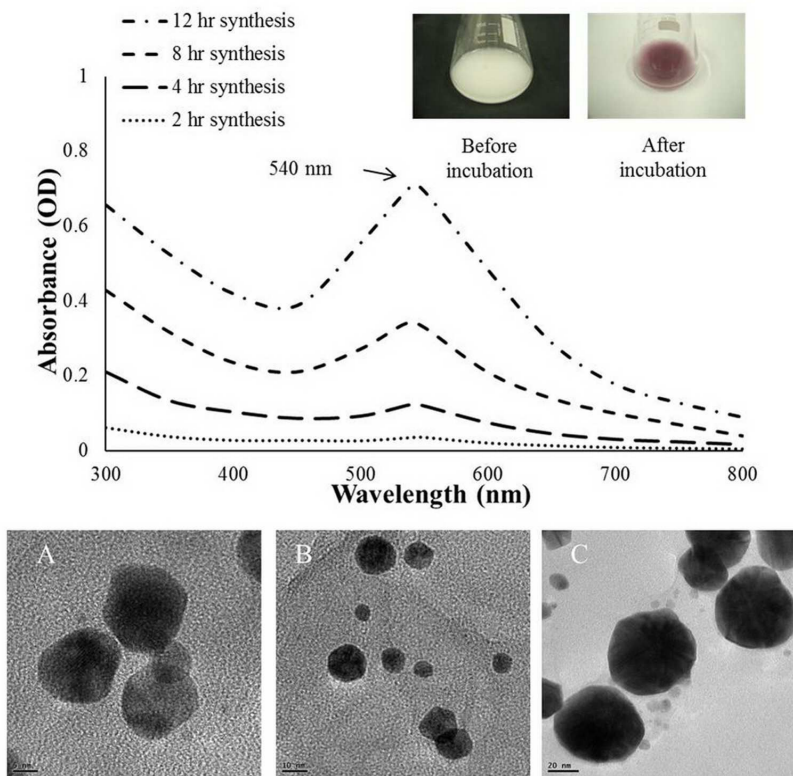
도면1



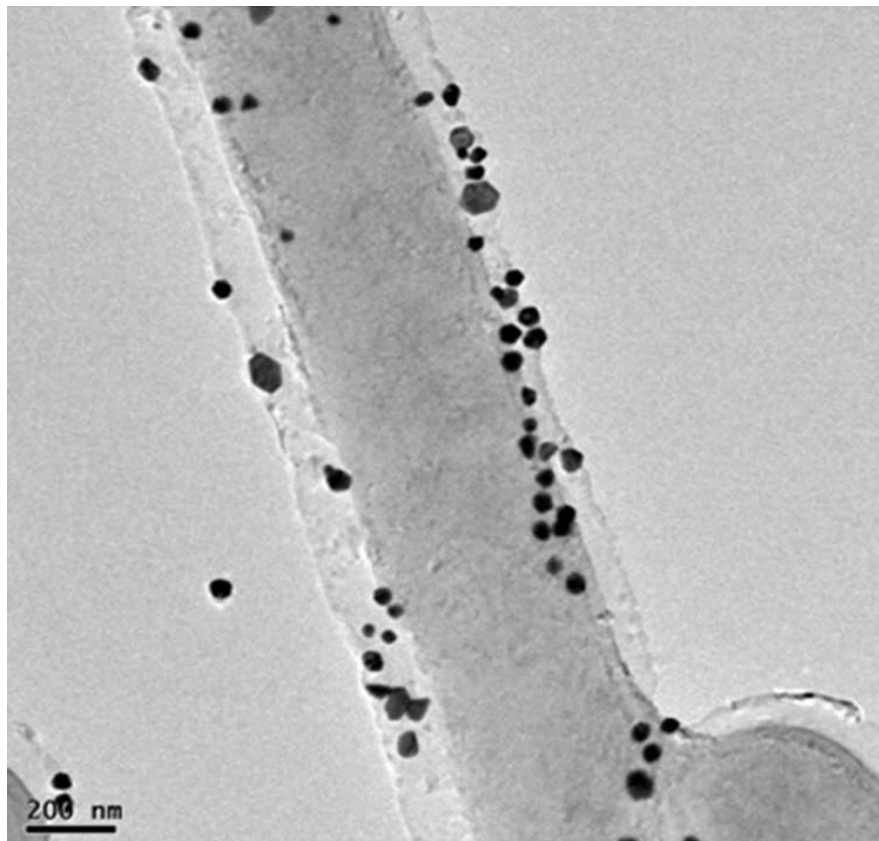
도면2



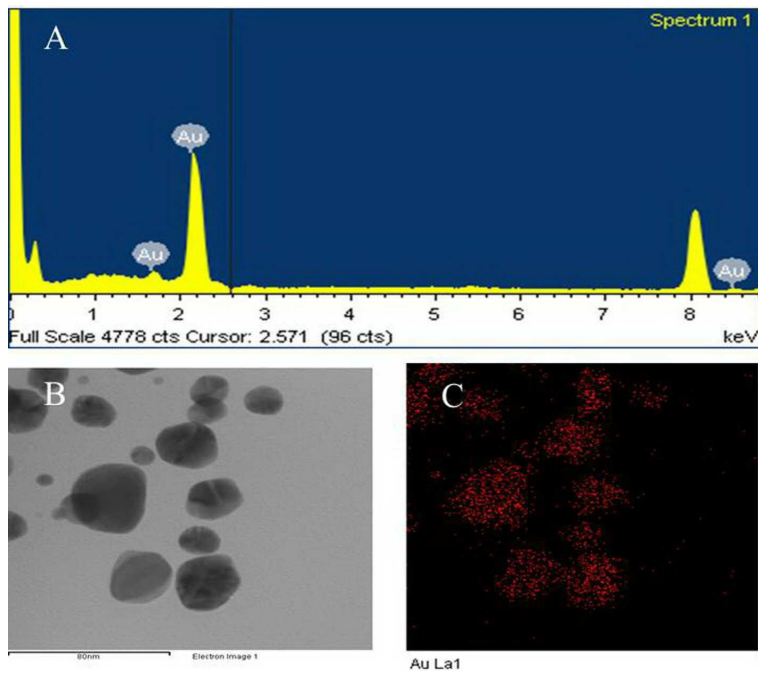
도면3a



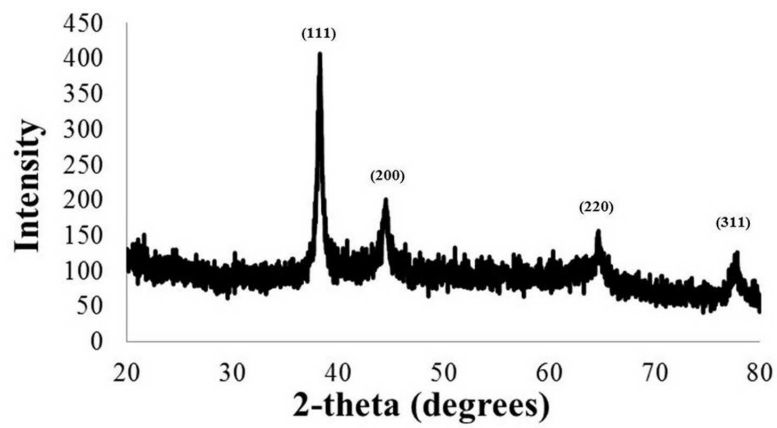
도면3b



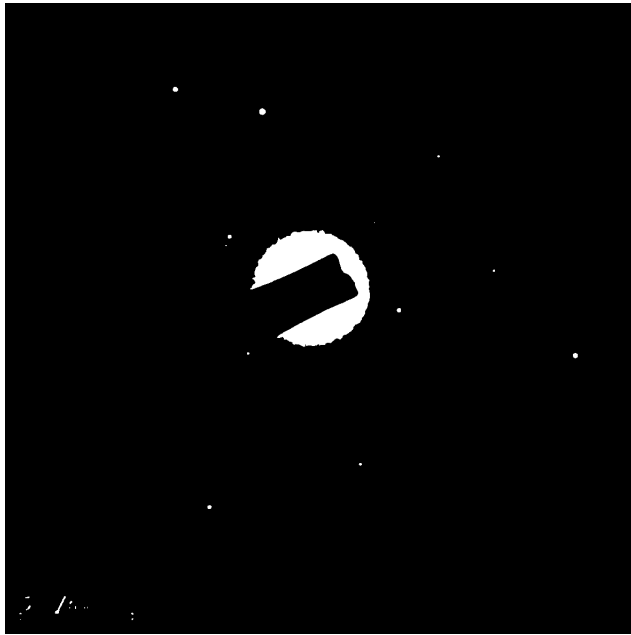
도면4



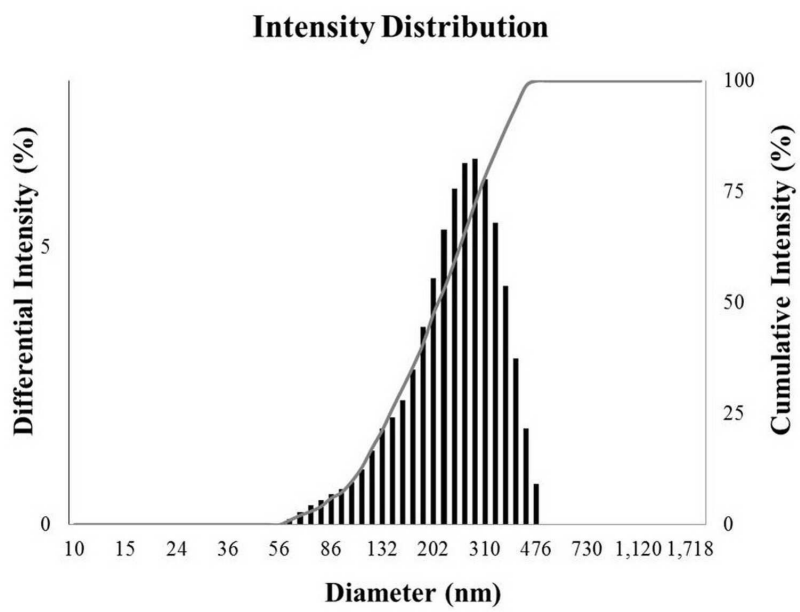
도면5



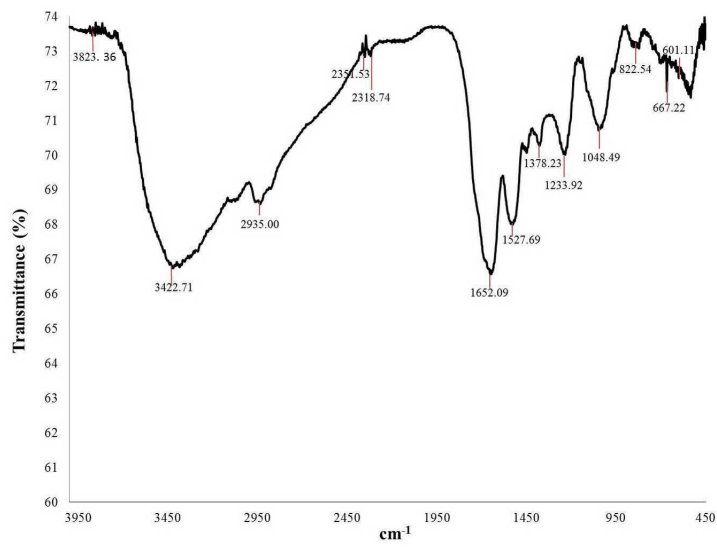
도면6



도면7



도면8



도면9

