

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0107887 (43) 공개일자 2018년10월04일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01N 1/02 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01) C09K 3/18 (2006.01) (52) CPC특허분류 A01N 1/0221 (2013.01) A23L 3/3526 (2013.01) (21) 출원번호 10-2017-0036759 (22) 출원일자 2017년03월23일 심사청구일자 없음		(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교) 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암 동5가) (72) 발명자 곽민석 부산광역시 남구 분포로 113, 228동 104호(용호동, 엘지메트로시티) 김학준 부산광역시 남구 용소로 45 자연과학관 1층 5407 호(대연동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 두호특허법인

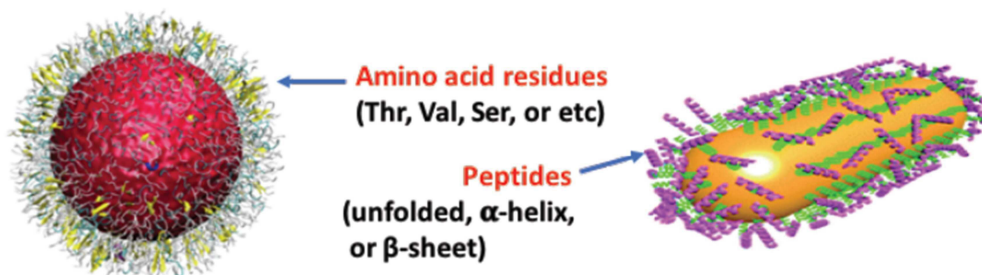
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **결빙 제어용 펩타이드 표면 개질된 나노입자**

(57) 요약

본 발명은 결빙 제어용 펩타이드 표면 개질된 나노입자에 관한 것으로, 나노입자; 및 상기 나노입자 표면에 결합되는 아미노산 또는 펩타이드;를 포함함으로써, 독성을 가지지 않아 생체시료에 적용할 수 있고, 합성이 간편하고, 유전공학적으로 특정 아미노산의 조성을 높일 수 있으며, 고농도 사용 시 침전이 발생하지 않으며, 얼음 결정과 상호작용하여 빙결 및 해빙을 조절할 수 있고, 냉동시 얼음의 생성속도를 느리게하여 세포의 손상을 최소화시킬 수 있고, 냉해동과정에서 세포사멸을 최소화시킬 수 있으며, 생체 시료의 해빙 시 손상을 최소화시킬 수 있는, 결빙 제어용 펩타이드 표면 개질된 나노입자에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 7/06 (2013.01)

C09K 3/18 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/25 (2013.01)

C07K 2319/01 (2013.01)

(72) 발명자

안동준

서울특별시 서초구 효령로68길 81, 102동 403호(서초동, 서초자이아파트)

임동권

서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 112동 202호(대치동, 대치삼성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345248582

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원

연구과제명 구형단백질의 모델이 되는 나노입자 라이브러리와 표면 물성에 따른 세포상호작용

기 여 율 1/2

주관기관 부경대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016952972

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래소재디스커버리지원

연구과제명 DNA 나노구조체 기반 결빙제어 소재 개발

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.12.29 ~ 2017.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

나노입자; 및 상기 나노입자 표면에 결합되는 아미노산 또는 펩타이드;를 포함하는, 기능성 나노입자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 나노입자는 콜로이드성 나노입자인, 기능성 나노입자.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 나노입자는 금인, 기능성 나노입자.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 아미노산은 쓰레오닌, 발린 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 기능성 나노입자.

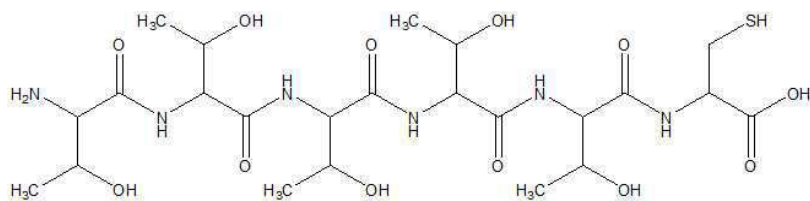
청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 아미노산은 쓰레오닌인, 기능성 나노입자.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는, 기능성 나노입자:

[화학식 1]



청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 기능성 나노입자는 세포투과성 펩타이드를 더 포함하는, 기능성 나노입자.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 기능성 나노입자를 포함하는 기능성 식품.

청구항 9

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 기능성 나노입자를 포함하는 결빙 조절용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 얼음 결정의 형성 및 분해를 조절할 수 있는 기능성 나노입자에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 얼음의 결정은 일정 크기 이상이 되면 생체 시료에 손상을 주기 때문에, 저온 환경이 요구되는 생체 시료 보관 산업에서는 얼음 결정 형성에 의한 피해를 막기 위한 다양한 시도들이 이루어지고 있다.

[0003] 화학약품을 사용하는 동결보존제 (부동액, DMSO 등)을 많이 사용하고 있으나, 이는 생체 내에서 독성을 나타내므로 생체 시료에 적용하기 어렵다.

[0004] 동결보존제를 대체하기 위해 다양한 결빙방지 단백질 (Antifreeze protein, 이하 AFP)이 개발되고 있으나, 결빙방지 단백질은 미생물, 어류, 곤충 등 다양한 생물이 생체 내에서 발현되는 것으로, 특정 아미노산의 조성을 높이면 구조의 변형을 초래할 수 있다는 문제점이 있다. 또한, 고농도의 단백질을 생체 시료에 사용 시 단백질이 침전될 수 있는 문제점이 있다.

[0005] 따라서, 보다 효과적이고 전술한 문제점이 발생하지 않는 얼음 결빙을 조절할 수 있는 물질의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2014-49634호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 화학약품을 사용하는 동결보존제의 생체 시료에 대한 독성 발생 문제가 없는 기능성 나노입자 및 조성물의 제공을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 합성이 간편하고, 유전공학적으로 특정 아미노산의 조성을 높일 수 있으며, 고농도 사용 시 침전이 발생하지 않는 기능성 나노입자 및 조성물의 제공을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 얼음 결정과 상호작용할 수 있는 기능성 나노입자 및 조성물의 제공을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 냉동시 얼음의 생성속도를 느리게하여 세포의 손상을 최소화시킬 수 있는 기능성 나노입자 조성물의 제공을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 가시광선 또는 근적외선의 흡수가 가능하여 세포 내부에서부터 얼음 결정의 용해속도 조절이 가능하며, 냉해동과정에서의 세포사멸을 최소화시킬 수 있는 기능성 나노입자 및 조성물을 제공을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 저온보관 시료의 해빙 시 생체 시료의 손상을 최소화할 수 있는 기능성 나노입자 및 조성물의 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 1. 나노입자; 및 상기 나노입자 표면에 결합되는 아미노산 또는 펩타이드;를 포함하는, 기능성 나노입자.

[0014] 2. 위 1에 있어서, 상기 나노입자는 콜로이드성 나노입자인, 기능성 나노입자.

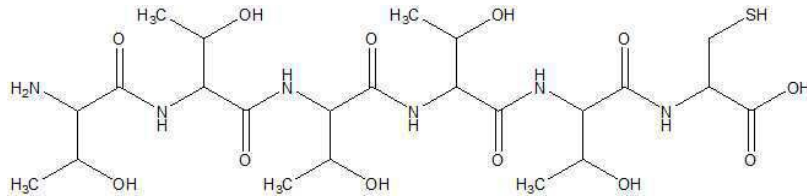
[0015] 3. 위 1에 있어서, 상기 나노입자는 금인, 기능성 나노입자.

4. 위 1에 있어서, 상기 아미노산은 쓰레오닌, 발린 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 기능성 나노입자.

5. 위 1에 있어서, 상기 아미노산은 쓰레오닌인, 기능성 나노입자.

6. 위 1에 있어서, 상기 펩타이드는 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는, 기능성 나노입자:

[화학식 1]



7. 위 1에 있어서, 상기 기능성 나노입자는 세포투과성 펩타이드를 더 포함하는, 기능성 나노입자.

8. 위 1 내지 7 중 어느 한 항의 기능성 나노입자를 포함하는 기능성 식품.

9. 위 1 내지 7 중 어느 한 항의 기능성 나노입자를 포함하는 결빙 조절용 조성물.

발명의 효과

본 발명의 일 실시예에 따르면, 화학약품을 사용하는 동결보존제의 생체 시료에 대한 독성 문제가 발생하지 않는 기능성 나노입자 및 조성물을 제공할 수 있다.

또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 합성이 간편하고, 유전공학적으로 특정 아미노산의 조성을 높일 수 있으며, 농도 사용 시 침전이 발생하지 않는 기능성 나노입자 및 조성물을 제공할 수 있다.

또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 얼음 결정과 상호작용할 수 있는 기능성 나노입자 및 조성물을 제공할 수 있다.

또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 냉동시 얼음의 생성속도를 느리게하여 세포의 손상을 최소화시킬 수 있는 기능성 나노입자 및 조성물을 제공할 수 있다.

또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 기능성 나노입자 및 조성물을 세포에 가하면, 가시광선 또는 근적외선을 조사하여 세포 내부에서부터 열을 결정의 용해가 가능하므로, 냉해동 과정에서 세포사멸을 최소화시킬 수 있는 기능성 나노입자 및 조성물을 제공할 수 있다.

또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 저온보관 시료의 해빙 시 생체 시료의 손상을 최소화할 수 있는 기능성 나노입자 및 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 기능성 나노입자의 일 실시예를 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 기능성 나노입자가 있는 경우 얼음 결정의 성장이 억제되고 얼음의 결빙 온도가 낮아지는 것을 나타낸 것이다.

도 3은 결빙방지 단백질에서 얼음 결정과 상호작용하는 아미노산의 개수와 배열에 따라 온도이력 (Thermal hysteresis, TH)이 변화하는 것을 나타낸 것이다.

도 4는 해빙 시 얼음의 재결정화가 방지된 것을 나타낸 것이다.

도 5는 세포 투과성 아미노산서열이 나노입자 표면에 존재하는 경우 세포 안팎으로 얼음의 결빙 및 해빙에 영향을 줄 수 있다는 것을 나타낸 것으로, 사진은 세포 내로 본 발명의 기능성 나노입자가 들어간 것을 나타낸 전자현미경 사진이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 쓰레오닌으로 표면이 개질된 금 나노입자를 합성한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시에 따라 합성한 기능성 나노입자로 얼음 결정 성장 실험한 결과를 나타낸 것으로, 그 결과 본 발명의 기능성 나노입자가 얼음 결정의 성장을 방해하는 것을 나타냈다.

도 8은 나노입자의 결빙 제어 효과의 세포 실험을 나타낸 것으로, 구체적으로, mESC cell에 DMSO 또는 쓰레오닌이 결합된 20 nm 금 나노입자 또는 40 nm 금 나노입자를 가하였을 때, 급속 해동 과정에서의 세포사멸효과, 빛을 조사하여 해동한 조건에서의 세포사멸효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명은 결빙 제어용 펩타이드 표면 개질된 나노입자에 관한 것으로, 나노입자; 및 상기 나노입자 표면에 결합되는 아미노산 또는 펩타이드;를 포함함으로써, 독성을 가지지 않아 생체시료에 적용할 수 있고, 합성이 간편하고, 유전공학적으로 특정 아미노산의 조성을 높일 수 있으며, 고농도 사용 시 침전이 발생하지 않으며, 얼음 결정과 상호작용하여 빙결 및 해빙을 조절할 수 있고, 냉동시 얼음의 생성속도를 느리게하여 세포의 손상을 최소화시킬 수 있고, 냉해동과정에서 세포사멸을 최소화시킬 수 있으며, 생체 시료의 해빙 시 손상을 최소화시킬 수 있는, 결빙 제어용 펩타이드 표면 개질된 나노입자에 관한 것이다.
- [0032] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0033] 본 발명은 나노입자 및 상기 나노입자 표면에 결합되는 아미노산 또는 펩타이드를 포함하는 기능성 나노입자를 제공한다.
- [0034] 나노입자는 90% 이상이 5 μ m 이하, 바람직하게는 2 μ m 이하, 보다 바람직하게는 1 μ m 이하, 더욱 더 바람직하게는 0.5 μ m 이하의 평균입경을 가지는 입자를 의미하며, 플라즈몬 나노입자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 나노입자는 금속 착염의 묽은 용액을 환원시켜 제조할 수 있으며, 구체적으로 환원반응, 핵형성개시 반응, 핵성장 반응 등의 과정을 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 나노입자는 콜로이드성 나노입자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 나노입자는 도 1의 모식도에 나타나 있는 바와 같이, 원형 또는 막대형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 나노입자는 금 또는 은 중 적어도 하나 또는 이들의 합금일 수 있으며, 구체적으로, 나노입자는 금일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 상기 나노입자가 금일 경우, 본 발명의 기능성 나노입자는 가시광선, 또는 근적외선 영역의 빛의 흡수가 가능하기 때문에 세포의 해동 시 빛을 조사하여 세포내부에서부터 얼음이 녹는 과정을 조절할 수 있다. 이를 통해 세포의 해동과정에서 세포의 손상을 최소화시킬 수 있다.
- [0040] 아미노산은, 예를 들어, 알라닌, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글라이신, 히스티딘, 이소류신, 라이신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 피롤라이신, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 쓰레오닌, 셀레노시스테인, 발린, 트립토판, 티로신 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 아미노산은 쓰레오닌, 발린 및 세린 중 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 쓰레오닌, 발린 및 세린은 결빙 방지 펩타이드의 주요 아미노산 성분으로, 얼음과의 상호작용이 더욱 효과적으로 일어나게 되며, 얼음과의 상호작용이 다른 아미노산에 비해 더 뛰어나 얼음 결정이 성장하는 것을 더욱 세밀하고 효과적으로 조절 (특히, 방지)할 수 있다.
- [0043] 또한, 나노입자와의 결합력 또한 우수하여 기능성 나노입자로 제조가 용이하다.
- [0044] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 아미노산이 나노입자 표면에 개질되어 본 발명의 기능성 나노입자로 사용되면, 얼음과 상호작용할 수 있는 표면적이 기하급수적으로 증가하여 얼음 결정의 성장, 형성, 해빙 등의 조절 능력이 상기 아미노산을 단독으로 사용한 경우에 비하여 현저히 증가할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 아미노산은 쓰레오닌일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 쓰레오닌이 결합된 본 발명의 기능성 복합체는 냉동 시 세포 내에서 얼음 생성속도를 느리게 하여 세포의 손상을 최소화시킬 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 쓰레오닌, 발린 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산을 포함할 수 있으며, 상기 펩타이드에 포함되는 쓰레오닌, 발린 및 세린의 개수에는 제한이 없다. 예컨대, 쓰레오닌, 발린 및 세린 중 적어도 하나를 1 내지 수천개로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

다.

[0048] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 쓰레오닌, 발린 및 세린 중 적어도 하나를 연속으로 또는 이격적으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 쓰레오닌, 발린 및 세린의 적어도 2개 또는 전부를 포함하는 혼합서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

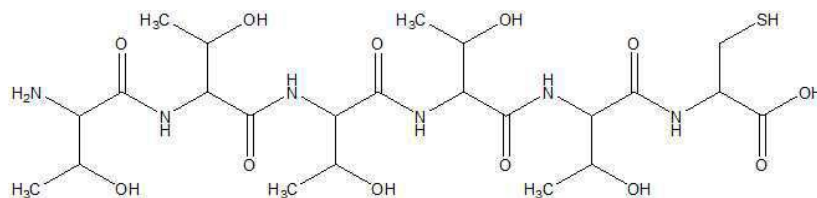
[0050] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 쓰레오닌 및 시스테인을 포함하는 펩타이드일 수 있다. 펩타이드에 포함되는 시스테인은 폴리에틸렌 글라이콜 등의 스페이서 (spacer) 물질로 연결되는 경우도 포함한다. 예컨대, 상기 연결은 펩타이드와 시스테인 사이에 폴리에틸렌 글라이콜이 위치하는 경우일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 5개의 쓰레오닌이 연속으로 결합되어 있고, 상기 5개의 쓰레오닌의 말단에 시스테인이 결합되어 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 펩타이드의 경우 얼음 결정의 비등방성 성장을 유도하여, 얼음 결정의 성장을 방해할 수 있다(도 6 및 7). 또한, 냉동 보관된 세포의 해동 시 손상을 최소화시킬 수 있다 (도 8).

[0054] [화학식 1]



[0055]

[0056] 또한, 본 발명에서, 펩타이드는 어떤 동물, 식물, 곤충, 미생물 등에서 발견되는 분자 또는 인위적으로, 자연적으로 합성된 분자를 의미하며, 물의 결빙점을 비속일적으로 감소시키는 펩타이드이다.

[0057] 본 발명에서, 펩타이드는 얼음과 결합하여 얼음 결정의 성장을 막는 특징을 가진 단백질로, 결빙방지 폴리펩타이드 (anti-freezing peptides, AFPs), 결빙방지 당단백질, 결빙방지 글리코펩타이드 (anti-freezing glycopeptides, AFGP), 열 이력 폴리펩타이드 등일 수 있다.

[0058] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 북극 및 남극환 내의 지방을 포함해서 지구의 극지 지방의 물에서 사는 냉혈 수생 극지 어류 중에서 생산되는 결빙 방지 펩타이드; 극지 규조, 당근 및 민들레를 비롯한 다양한 고등 식물에서 생산되는 결빙 방지 펩타이드; 곤충, 세균, 어류 등 다양한 종에서 생산되는 결빙 방지 펩타이드;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 FfIBP, NgIBP, Type III AFP 등의 결빙방지 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 1차 또는 2차 구조를 가지는 것일 수 있다. 예컨대, 알파 헬릭스, 베타 시트, 이들의 반복 또는 조합의 구조를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 상기 결빙방지 폴리펩타이드 (anti-freezing peptides, AFPs), 결빙방지 당단백질, 결빙방지 글리코펩타이드 (anti-freezing glycopeptides, AFGP) 또는 열 이력 폴리펩타이드의 아미노산 서열 일부 또는 전부를 변형하거나, 상기 아미노산 서열의 처음, 중간 또는 말단에 다른 아미노산을 추가로 결합하는 등을 통해 변형될 수 있으며, 상기 변형은 얼음과의 상호작용 목적 범위 내에서 이루어질 수 있다.

[0062] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 친화성 태그에 융합될 수 있다. 친화성 태그로, 이로 제한되지 않으나, His-tag, 폴리펩티드 A 태그, 아비딘/스트렙타비딘, 폴리펩티드 G, 글루타티온-S-트랜스페라제, 디히드로 폴레이트 환원효소(DHFR), 녹색 형광 폴리펩티드(GFP), 폴리아르기닌, 폴리시스테인, c-myc, 칼모듈린 결합 폴리펩티드, 인플루엔자바이러스 헤마글루티닌, 말토스 결합 단백질(MBP), 히알루론산 (HA) 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0063] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 상기 펩타이드 내 하나 이상의 아미노산 잔기가 변형된 펩타이드일 수 있다. 하나 이상의 변형(들)은 생체내 또는 시험관내 화학적 유도체화, 예를 들어 아세틸화 또는 카르복실화; 글리코실화; 탈글리코실화; 인산화, 예를 들어 포스포티로신, 포스포세린 및 포스포쓰레오닌; 동일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 자연발생 L-아미노산, 자연발생 L-아미노산 및 비-자연발생 합성 아미노산 동일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 펩타이드는 N-말단 및/또는 C-말단에 봉쇄기가 도입된 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 봉쇄기는 N-말단 및/또는 C-말단을 보호하고 안정화하는데 적합한 화학 치환체로, N-말단의 알킬화 또는 아실화로 도입된 분지 또는 비분지 알킬기 및 아실기; 에스테르 또는 케톤-형성 알킬기를 포함하는 C-말단 봉쇄기로, 예를 들어 저급(C1 내지 C6) 알킬기, 예를 들어 메틸, 에틸 및 프로필, 및 아미드-형성 아미노기; 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 아미드-형성 아미노기로는 1차 아민(-NH₂), 및 모노- 및 디-알킬아미노기 등을 들 수 있으며, 모노- 및 디-알킬아미노기로는 메틸아미노, 에틸아미노, 디메틸아미노, 디에틸아미노, 메틸에틸아미노 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 나노입자와 결합되는 펩타이드의 적합한 농도는 용도에 따라 변할 수 있으며, 예컨대 약 1 ppb 내지 약 1 ppt (즉, 약 1 µg/L 내지 약 1 mg/L)의 범위일 수 있다.
- [0068] 상기 펩타이드들은 나노입자와의 결합력 또한 우수하여 기능성 나노입자로 사용될 경우 얼음과 상호작용할 수 있는 표면적이 기하급수적으로 증가하여 결정의 성장, 형성, 해빙 등의 조절 능력이 상기 펩타이드들을 단독으로 사용한 경우에 비하여 현저히 우수해질 수 있다.
- [0069] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 나노입자와 아미노산 또는 펩타이드와의 결합은 나노입자 표면과 아미노산 또는 펩타이드와의 화학적 결합을 포함할 수 있다. 상기 나노입자는 표면이 개질된 것일 수 있다. 예컨대, 나노입자와 아미노산 또는 펩타이드와의 결합은 카르복시산으로 개질한 다음 아미노산 또는 펩타이드로 환원시켜 직접 나노입자에 아미노산 또는 펩타이드를 결합시키는 것일 수 있다.
- [0070] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 나노입자와 아미노산 또는 펩타이드와의 결합은 링커에 의한 결합일 수 있다. 링커에 의한 결합은 링커를 나노입자에 결합시킨 다음, 상기 링커와 아미노산 또는 펩타이드를 결합시킴으로써 나노입자와 아미노산 또는 펩타이드를 결합시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예컨대, 링커는 시스테인, o-linker일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0071] 본 발명의 기능성 나노입자는 나노입자 표면에 아미노산 또는 펩타이드가 결합됨으로써 얼음과 상호작용이 가능하게 되어 얼음 결정의 형성을 억제, 지연, 방지 등의 기능을 수행할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 기능성 나노입자에 포함되는 아미노산 또는 펩타이드의 개수 및 배열에 따라 온도이력현상이 증가하는 것으로 나타났다 (도 3).
- [0073] 따라서, 나노입자가 형성되는 과정에서 아미노산 또는 펩타이드의 수를 조절하여 기능성 나노입자의 면적, 크기, 모양 등을 조절함으로써 얼음과의 결합력, 결합 면적 등을 조절하여 얼음 결정 형성 시간, 방지, 해빙 시간 등을 보다 더 세밀하게 조절할 수 있다.
- [0074] 또한, 본 발명의 기능성 나노입자는 화학약품을 사용하지 않아 동결보존제 (부동액, DMSO 등)의 생체 시료에 대한 독성문제를 발생시키지 않는다. 따라서, 곤충, 포유류, 파충류, 어류 등의 세포 등 다양한 생체 시료에 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0075] 또한, 저온 환경에서 보관된 생체 시료는 해빙 시 얼음 재결정화로 인하여 세포 손상의 위험이 있으나, 본 발명의 기능성 나노입자를 생체 시료에 첨가하여 저온 환경에 보관 후 세포를 해빙시킬 때 발생하는 얼음의 재결정화를 방지하여 생체 시료의 손상을 최소화할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 기능성 나노입자를 사용할 경우, 얼음의 재결정화가 방지되는 것으로 나타났다 (도 4).
- [0077] 또한, 본 발명의 기능성 나노입자는 세포 내부로 진입할 수 있어 (도 5), 세포의 해동 시 빛을 빛을 조사하여 생체 시료 내부에서부터 얼음의 해동을 조절할 수 있고, 이를 통해 냉동 보관 후 해동 시 발생할 수 있는 생체

시료의 손상을 최소화시킬 수 있다 (도 8).

- [0078] 생체 시료는 포유동물세포, 곤충세포, 어류세포, 식물세포, 진핵세포 또는 원핵세포 동일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 기능성 나노입자는 얼음 결정 성장으로 인한 세포 손상을 실질적으로 감소시킬 수 있어, 혈액 및 혈액 제품, 치료제, 폴리펩티드 약물, 바이오어세이 시약 및 백신 등 민감한 생체 시료의 보관에 적합할 수 있다.
- [0080] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 기능성 나노입자는 세포투과성 펩타이드를 더 포함할 수 있다.
- [0081] 세포투과성 펩타이드가 본 발명의 기능성 나노입자에 더 포함됨으로써, 세포 내로 기능성 나노입자를 전달하여 세포 안팎의 얼음 결정화 등 물-얼음 거동에 영향을 미침으로써 세포의 결빙을 조절할 수 있다.
- [0082] 세포 투과성 펩타이드는 일종의 신호 펩타이드 (Signal Peptide)이며, 예로 TAT 단백질에 존재하는 11개 아미노산 서열의 b-galactosidase (120 kDa) 단백질, 초파리의 단백질에서 유래한 Antennapedia (Penetratin), HSV-1 바이러스로부터 유래된 VP22, Simian Virus 40 large antigen T로부터 유래한 Pep-1 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0083] 또한, poly Arginine, poly Lysine 과 같이 단순히 Arginine, Lysine 과 같은 양이온성 아미노산이 반복적으로 여러 개가 연결된 펩타이드가 포함될 수 있으나, 이제 제한되지 않는다.
- [0084] 예컨대, 세포투과성 펩타이드로 Hph-1, Vectocell, Lactoferrin, Sim-2, LPIN3, 2IL-1a, dNP2 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0085] 본 발명의 기능성 나노입자는 식품에 도입되거나, 또는 식품과 접촉되어 얼음 결정 성장 및/또는 형성을 감소 또는 억제할 수 있고, 이를 통해 야채류를 포함하는 냉동 식품의 질감, 맛, 및 유효 저장수명을 향상시킬 수 있다. 그리고 본 발명의 기능성 나노입자는 식품을 포함하는 물체나 물질의 결빙 또는 과냉각과 관련된 얼음 결정 형성을 억제 및/또는 감소시킬 수 있다.
- [0086] 따라서, 본 발명은 다른 양태로 기능성 나노입자를 포함하는 기능성 식품을 제공한다.
- [0087] 본 발명의 기능성 식품은 상기 기능성 나노입자를 포함함으로써 이런 얼음 결정 성장 과정이 감소되거나, 또는 심지어 완전히 방지되거나, 또는 적어도 최소화될 수 있다.
- [0088] 식품은 저지방 스프레드, 마요네즈, 요구르트, 제과소, 마가린, 재구성 과일, 잼, 과일 제조물, 과일소, 리플, 과일 소스, 과일 스튜, 커피 표백제, 인스턴트 과일 디저트, 당과(예를 들어, 마쉬멜로우), 감자 베이스 식품 (예를 들어, 칩, 프렌치 프라이 및 크로켓), 가공 식품(예를 들어, 캐서롤 및 스튜) 및 파인푸드(예를 들어, 셀러드 드레싱을 비롯한 드레싱; 케찹, 비네그레트 드레싱 및 수프) 동일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0089] 또한, 식품은 음료, 생고기, 요리된 고기, 생 가공류 제품, 요리된 가공류 제품, 생 해산물 제품, 요리된 해산물 제품을 포함하는 생, 가공된 또는 저온살균된 식품[생 또는 요리된 고기, 가공류 및 해산물 제품], 소시지, 프랑크푸르트, 바로 먹을 수 있는 음식, 파스타 소스, 저온살균된 수프, 매리네이드, 수중유 에멀전, 유중수 에멀전, 치즈 스프레드, 가공 치즈, 유제품 디저트, 향을 가한 밀크, 크림, 발효된 유제품, 치즈, 버터, 응축 밀크 제품, 치즈 스프레드, 저온살균된 액체 난, 아이스크림 믹스, 대두 제품, 저온살균된 액체 난, 당과 제품, 과일 제품, 및 지방 베이스 또는 물-함유 소를 채운 식품 동일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0090] 또한, 식품은 빵, 케이크, 파인 베이커리 및 도우와 같은 제과 제품일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0091] 본 발명의 기능성 식품은 기능성 나노입자가 상기 식품 전체에 혼입된 형태 및/또는 식품의 표면에 적용된 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0092] 본 발명의 기능성 식품은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리, 바 등 다양한 형태로 제조될 수 있으며, 가공 식품뿐만 아니라 가공되지 않은 식품의 형태로도 제조될 수 있다.
- [0093] 본 발명의 기능성 식품은 본 발명의 목적 범위 내에서 식품 제조 시 통상적으로 첨가되는 성분을 더 포함할 수 있으며, 예컨대, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0094] 상기 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리

톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0095] 상기 향미제로서 타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드A, 글리시르히진 등) 등의 천연 향미제 및 사카린, 아스파탐 등의 합성 향미제를 더 포함할 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0096] 상기 외에 본 발명의 기능성 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0097] 그 밖에 본 발명의 기능성 식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨 가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 기능성 식품 조성물 100 중량부 당 0.01~0.20 중량부의 범위로 첨가될 수 있다.
- [0098] 그 외의 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에는, 원료의 전체중량에 대하여 0.0001 내지 30중량%, 바람직하게는 0.0001 내지 10 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 5 중량%의 양으로 첨가 될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로 조절할 수 있다.
- [0099] 본 발명의 기능성 식품은 안정제를 더 포함할 수 있다. 안정제로는 폴리펩티드, 예를 들어 젤라틴; 식물 추출물, 예를 들어 아라비아 검, 가티 검, 카라야 검, 트레거캔스 검; 종자 검, 예를 들어 로커스트빈 검, 구아 검, 타라검, 피실리움씨 검, 모과씨 검 또는 타마린드씨 검; 곤약 만난; 해초 추출물, 예를 들어 아가, 알가네 이트, 카라게난 또는 푸르셀레란; 펙틴, 예를 들어 저급 메톡실 또는 고급 메톡실-타입 펙틴; 셀룰로오스 유도체, 예를 들어 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 미세결정 셀룰로오스, 메틸 및 메틸에틸 셀룰로오스, 또는 히 드록실프로필 및 히드록시프로필메틸 셀룰로오스; 및 미생물 검, 예를 들어 텍스트란, 크산탄 또는 β -1,3-글루 칸; 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0100] 또한, 본 발명의 기능성 식품은 당분, 예를 들어 수크로오스, 프럭토스, 텍스트로스, 락토스, 옥수수시럽, 당 알코올; 또는 다른 원료들, 예를 들어 색소와 향료 등을 함유할 수 있다.
- [0101] 본 발명의 기능성 나노입자는 DMSO를 사용하여 세포를 냉동 및 해동한 경우와 비교할 때 더욱 많은 수의 세포가 해동 후 살아있는 것으로 나타났다 (도 8). 따라서, 본 발명은 또 다른 양태로 생체 시료 (예컨대, 생물학적 세포 또는 이의 추출물 등)의 냉동 보관에 효과적인 기능성 나노입자를 포함하는 결빙 조절용 조성물을 제공한다.
- [0102] 생체 시료는 박테리아 세포, 효모 세포, 식물 세포, 동물 세포, 곤충 세포, 파충류 세포, 어류 세포, 포유동물 세포, 아세포 샘플 및 세포 추출물 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0103] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 생체 시료는 포유동물 세포일 수 있으며, 난모세포, 배아, 백혈구, 적혈구, 혈 소판, 체장섬 및 간세포 등의 광범위한 타입의 세포; 피부 조직, 골수 조직, 각막 조직 및 다른 광범한 타입의 조직; 그리고 간, 신장, 심장, 뇌, 폐, 췌장, 비장, 난소 및 위 등 광범위한 타입의 장기;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0104] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 박테리아 등의 미생물, 동물, 식물, 곤충 등의 연조직은 본 발명의 조성물의 존재 하에 냉동 또는 해동될 때 더 적은 손상을 나타낼 수 있으며, 상기 조성물의 첨가는 냉동 전과 후의 해동시 세포 완전성이 중요하거나 바람직한 상황 (예를 들어, 조직 배양물 기탁)에서 유용할 수 있다. 즉, 냉동-해동 과정으로 인한 고유 특성 또는 고유 형태의 손실을 최소화시킬 수 있다.
- [0105] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따를 때, 기능성 나노입자를 포함하는 조성물은 얼음 결정의 성장을 억제할 수 있고, 이를 통해 생체 시료 (예컨대, 세포)의 냉동 및 해동 시 생존률을 크게 향상시킬 수 있다 (도 8).
- [0106] 본 발명의 조성물은 고체, 반고체, 유체, 기체 등 다양한 형태일 수 있다. 예컨대, 유체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0107] 본 발명의 조성물은 생물학적 체제를 보존하는데 유용하다고 공지된 전해질 용액에 포함되는 염, 당, 이온 및 다른 영양물의 광범한 혼합물 중 어느 것을 더 함유할 수 있다. 이들은 조직 배양 배지, 장기 관류액 등을 포함 한다.
- [0108] 또한, 본 발명은 본 발명의 기능성 나노입자를 포함하는 화장료 조성물 또는 피부과용 체제를 제공한다.

- [0109] 화장료 조성물이나 국소 피부과용 제제에 본 발명의 기능성 나노입자를 포함시킴으로써, 극명한 기후- 및 날씨-유도 온도 강하에 의해 세포 효소의 최적 온도가 손실됨으로써 세포 및 세포의 공간에서 세포 생리학에 변화가 야기되어 손상되는 추위로 인한 피부 구조 및 세포 손상을 예방 또는 개선시킬 수 있다
- [0110] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 피부 구조 및 세포 손상은 추위, 바람 및/또는 UV 광에 의해 유도된 피부 손상, 피부 홍반 및 피부가 당기는 느낌 및 증가된 감각 감수성, 온도-민감성 피부, 환경 스트레스(온도 변화 및 UV 빛, 흡연, 스모그, 반응성 산소 종, 자유 라디칼로 인한)로 인한 피부, 입술 및 코와 구강 점막 그리고 피부 부속기관들의 부정적인 변화를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0111] 또한, 본 발명의 조성물, 화장료 조성물 및 국소 피부과용 제제는 당업자에게 공지된 안정제, 유화제, 계면활성제 및 다른 첨가제 중 적어도 하나를 더 포함할 수 있다.
- [0112] 다른 첨가제로 항부패제, 항산화제, 변색 방지제, 향미생물제, 에멀전 안정화제 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0113] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- [0114] **실시예**
- [0115] **실시예 1 쓰레오닌이 표면개질된 금 나노입자 (20 nm)의 합성**
- [0116] 20 nm 직경의 금 나노입자 용액 (Abs = 1.0 at 520 nm) 1 ml에 쓰레오닌 펩타이드 (쓰레오닌 5개의 말단에 시스테인이 결합되어 있는 펩타이드; 화학식 1) 80 μ l (1.0 mg/ml)를 가하여 상온에서 12시간 동안 shake 한다. 원심분리 (12000 rpm/15분)를 통해 상층액을 제거하고, 바닥에 가라앉은 침전물에 증류수 1ml를 가하여 나노입자를 재분산 시킨다. 합성된 나노입자의 분석결과는 도 6에 나타냈다.
- [0117] 얼음 결정 성장 실험을 실시한 결과 비등방성의 얼음 결정 성장 형태가 관찰되었다. 이는 나노입자에 의한 얼음 결정 성장의 방해효과로 인한 결과이다 (결과: 도 7).
- [0118] **실시예 2 쓰레오닌이 표면개질된 금 나노입자 (50 nm)의 합성**
- [0119] 50 nm 직경의 금 나노입자 용액 (Abs = 1.0 at 530 nm) 1 ml에 쓰레오닌 펩타이드 (쓰레오닌 5개의 말단에 시스테인이 결합되어 있는 펩타이드) 80 μ l (1.0 mg/ml)를 가하여 상온에서 12시간 동안 shake 한다. 원심분리 (12000 rpm/15분)를 통해 상층액을 제거하고, 바닥에 가라앉은 침전물에 증류수 1ml를 가하여 나노입자를 재분산 시킨다. 합성된 나노입자의 분석결과는 도 6에 나타내었다. 얼음 결정 성장 실험을 실시한 결과 비등방성의 얼음 결정 성장 형태가 관찰되었다. 이는 나노입자에 의한 얼음 결정 성장의 방해효과로 인한 결과이다 (결과: 도 7).
- [0120] **실시예 3 쓰레오닌이 표면개질된 막대형 금 나노입자 (폭 10 nm, 길이 35 nm)의 합성**
- [0121] 막대형 금 나노입자 용액 (Abs = 1.0 at 780 nm) 1 ml에 쓰레오닌 펩타이드 (쓰레오닌 5개의 말단에 시스테인이 결합되어 있는 펩타이드) 80 μ l (1.0 mg/ml)를 가하여 상온에서 12시간 동안 shake 한다. 원심분리 (12000 rpm/15분)를 통해 상층액을 제거하고, 바닥에 가라앉은 침전물에 증류수 1ml를 가하여 나노입자를 재분산 시킨다. 합성된 나노입자의 분석결과는 도 6에 나타내었다.
- [0122] 얼음 결정 성장 실험을 실시한 결과 비등방성의 얼음 결정 성장 형태가 관찰되었다. 이는 나노입자에 의한 얼음 결정 성장의 방해효과로 인한 결과이다 (결과: 도 7).
- [0123] **실시예 4. 온도이력현상 확인**
- [0124] 실시예 1 내지 3에서 제작한 기능성 나노입자를 물에 넣은 실험군과 상기 나노입자를 물에 넣지 않은 대조군을 0℃이하의 온도 조건으로 얼렸다.
- [0125] 그 결과, 대조군에서는 어는점과 녹는점이 0℃로 동일하였으나, 기능성 나노입자가 포함된 물에서는 상기 나노입자가 얼음의 결정과 결합하여 결정의 설장을 방해함으로써 어는점과 녹는점이 달라지는 것을 확인하였다. 즉, 실험군에서 온도이력현상이 관찰되었으며, 이로부터 본 발명의 기능성 나노입자가 얼음 결정의 성장을 방해하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0126] **실시예 5. 나노입자의 결빙 제어 효과 (세포 실험)**

[0127] **1. 세포 배양 방법**

[0128] mESC cell은 DMEM/high glucose, 200 mM L-glutamine, 1 % Penicillin/Streptomycin, 15 % FBS, HEPES (pH 7.3), MEM Nonessential Amino Acids, 1000 U/ml media를 사용하였으며, 2일마다 계대 배양하였다. mESC cell을 계대 배양하기 위해서 0.1 % Gelatin을 60cm culture dish에 37℃, 5% CO₂, 3시간 이상 코팅한 후 사용하였다. TC1 cells은 DMEM-High glucose, 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin에서 배양하였으며, 3일마다 계대 배양하였다.

[0129] **2. Cell Freezing and Thawing 실험**

[0130] mESC은 1ml PBS로 washing 한 후, 0.4 ml의 0.25% Trypsin을 첨가하였다. 1분 후 배양액 3.6 ml를 첨가하여 중화하였다. 1,200 rpm, 5 분 동안 원심분리 후, media를 조심스레 제거하였다. 0.5 ml Freezing media (70 % DMEM/high glucose, 20% FBS, 10% DMSO)로 cell pellet에 섞은 후, cryovial로 옮겼다. Cryovial은 Freezing container에 넣은 후, -80℃ Deep freezer에서 2일간 저장하였다. 2일 후, Deep freezer에서 cell stock vial을 꺼낸 후, 37℃에서 1분간 급속 해동시킨 후, 1 ml의 media를 첨가하였다. 1,200 rpm, 5 분 동안 원심분리 후, 배양액을 제거하였다. 4 ml의 media로 cell을 섞은 후, 60 cm culture dish에서 첨가한 후 배양하였다.

[0131] TC1 cell은 1ml PBS로 washing 한 후, 2 ml의 0.25% Trypsin을 첨가하였다. 1분 후 배양액 2 ml를 첨가하여 중화하였다. 1,200 rpm, 5 분 동안 원심분리 후, media를 조심스레 제거하였다. 0.5 ml Freezing media (90% FBS, 10% DMSO)로 cell pellet (2x10⁵)에 섞은 후, cryovial로 옮겼다. Cryovial은 Freezing container에 넣은 후, -80℃ Deep freezer에서 2일간 저장하였다. 2일 후, Deep freezer에서 cell stock vial을 꺼낸 후, 37℃에서 1분간 급속 해동시킨 후, 4.5 ml의 media를 첨가하였다. 1,200 rpm, 5 분 동안 원심분리 후, 배양액을 제거하였다. 2 ml의 media로 cell을 섞은 후, 6 well culture plate에서 첨가한 후 배양하였다. 상기 실험에서 10% DMSO를 대신하여 10% 20 nm (또는 10% 40 nm) Poly threonine5-AuNP로 Cell Freezing을 하였다 (도 5). 도 5에 나타난 바와 같이, Freezing 시 세포 내부로 Poly threonine5-AuNP가 침투된 것을 확인할 수 있다.

[0132] **3. 빛을 이용한 해동과정**

[0133] 37℃에서 1분간 급속 해동시키는 방법이 아닌, 0℃에서 520 nm laser(10 mw/cm²)을 가하여 서서히 해동시킨 후, 4.5 ml의 media를 첨가하였다. 1,200 rpm, 5 분 동안 원심분리 후, 배양액을 제거하였다. 2 ml의 media로 cell을 섞은 후, 6 well culture plate에서 첨가한 후 배양하였다 (결과: 도 8).

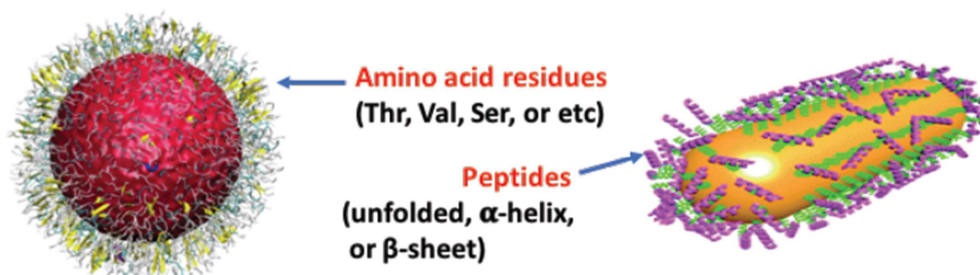
[0134] **4. Cell Staining 실험**

[0135] mESC cell은 2일간 배양한 후, media를 제거하였다. PBS를 이용하여 1번 또는 3번 cell을 washing 하였다. Trypan blue와 PBS를 이용하여 0.2 % 또는 0.1%로 만든 후, 60 cm culture dish에 첨가한 후, 현미경을 이용하여 cell을 확인하였다.

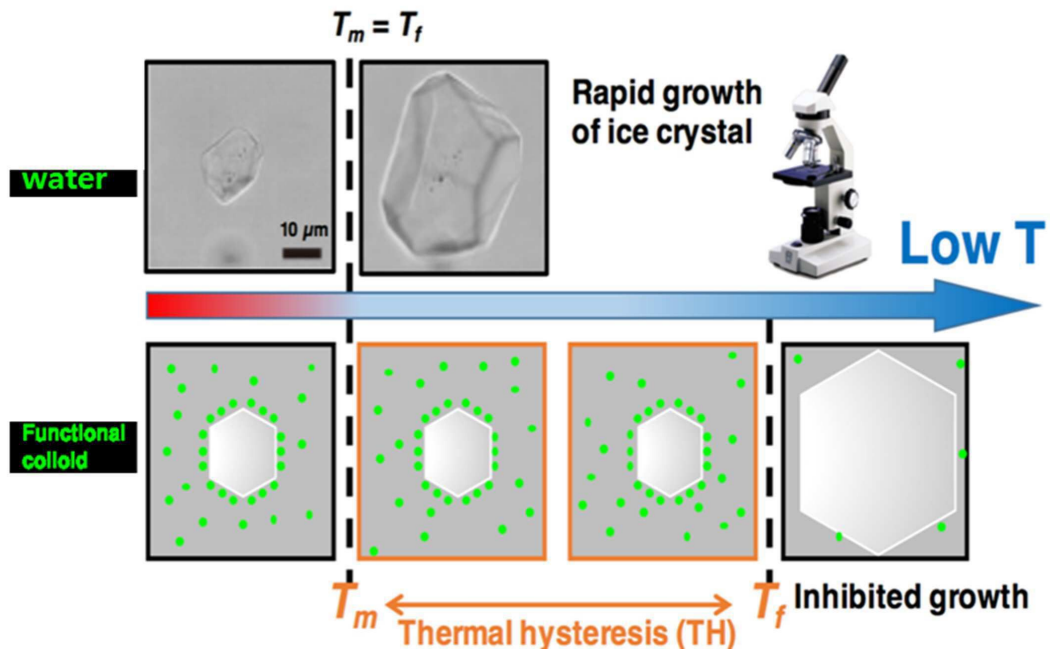
[0136] TC1 cell은 2일간 배양한 후, media를 제거하였다. PBS를 이용하여 cell을 washing 하였다. 4 % Paraformaldehyde/sucrose로 10분간 cell을 고정시킨 후, 0.5 % crystal violet용액으로 30분간 염색하였다. 30분 후, 6 well culture plate를 흐르는 물을 이용하여 염색용액을 제거하였다. Cell 상태는 현미경을 이용하여 확인하였다. 살아있는 세포들의 군수를 비교한 결과 DMSO를 사용하여 세포를 냉동 해동한 경우와 비교하여 20nm 또는 40 nm 금 나노입자를 가한 경우에 더욱 많은 수의 세포가 살아 있음을 확인하였다 (결과: 도 8).

도면

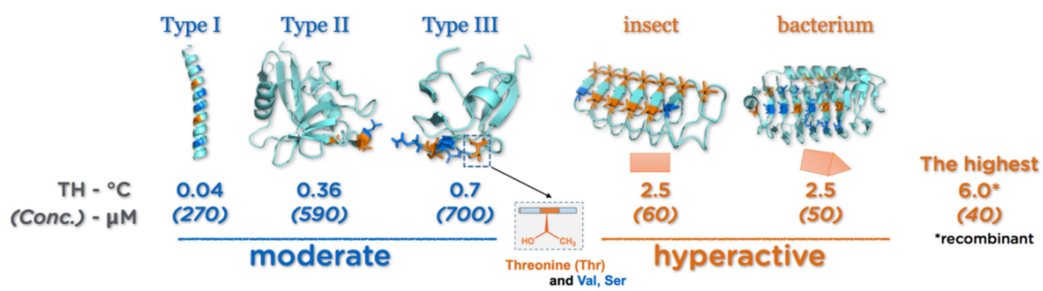
도면1



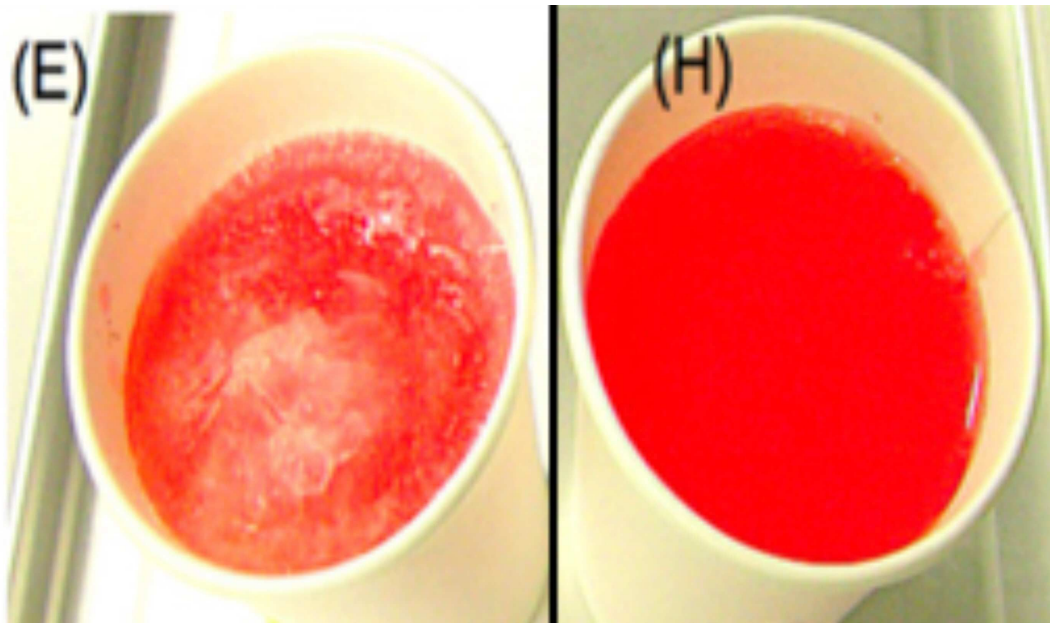
도면2



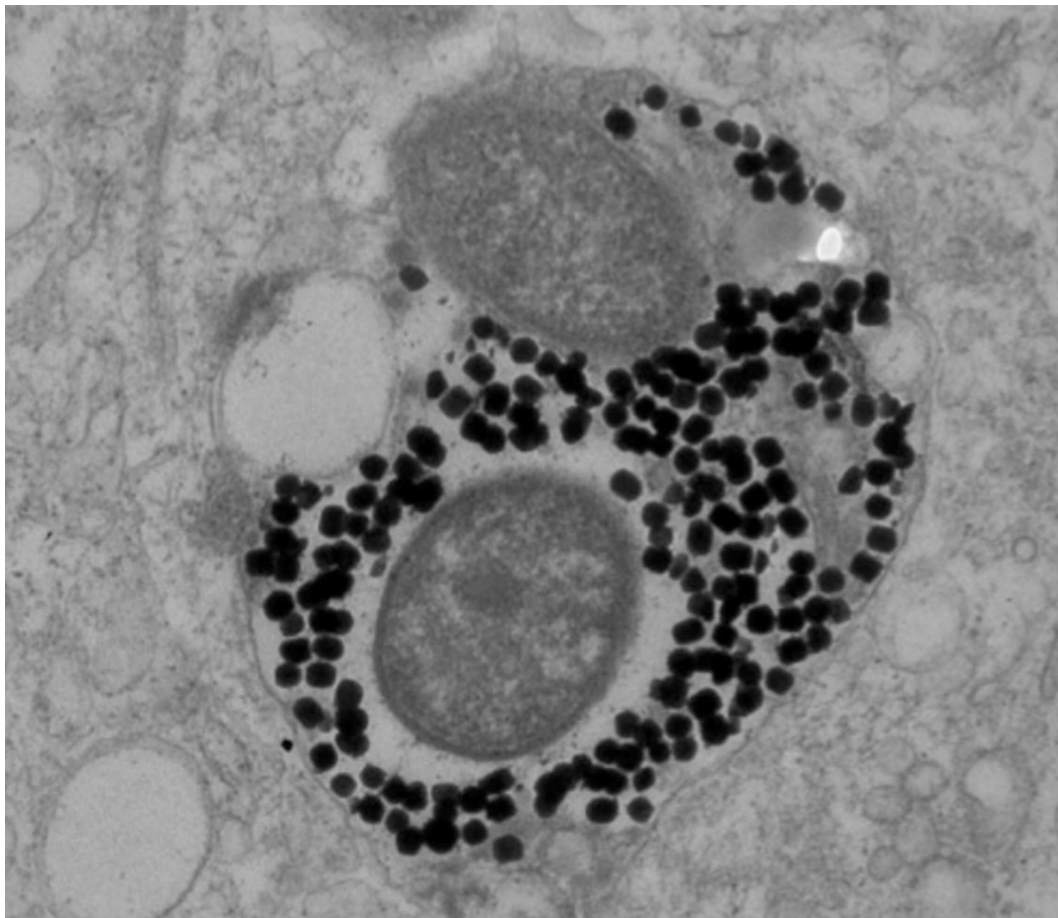
도면3



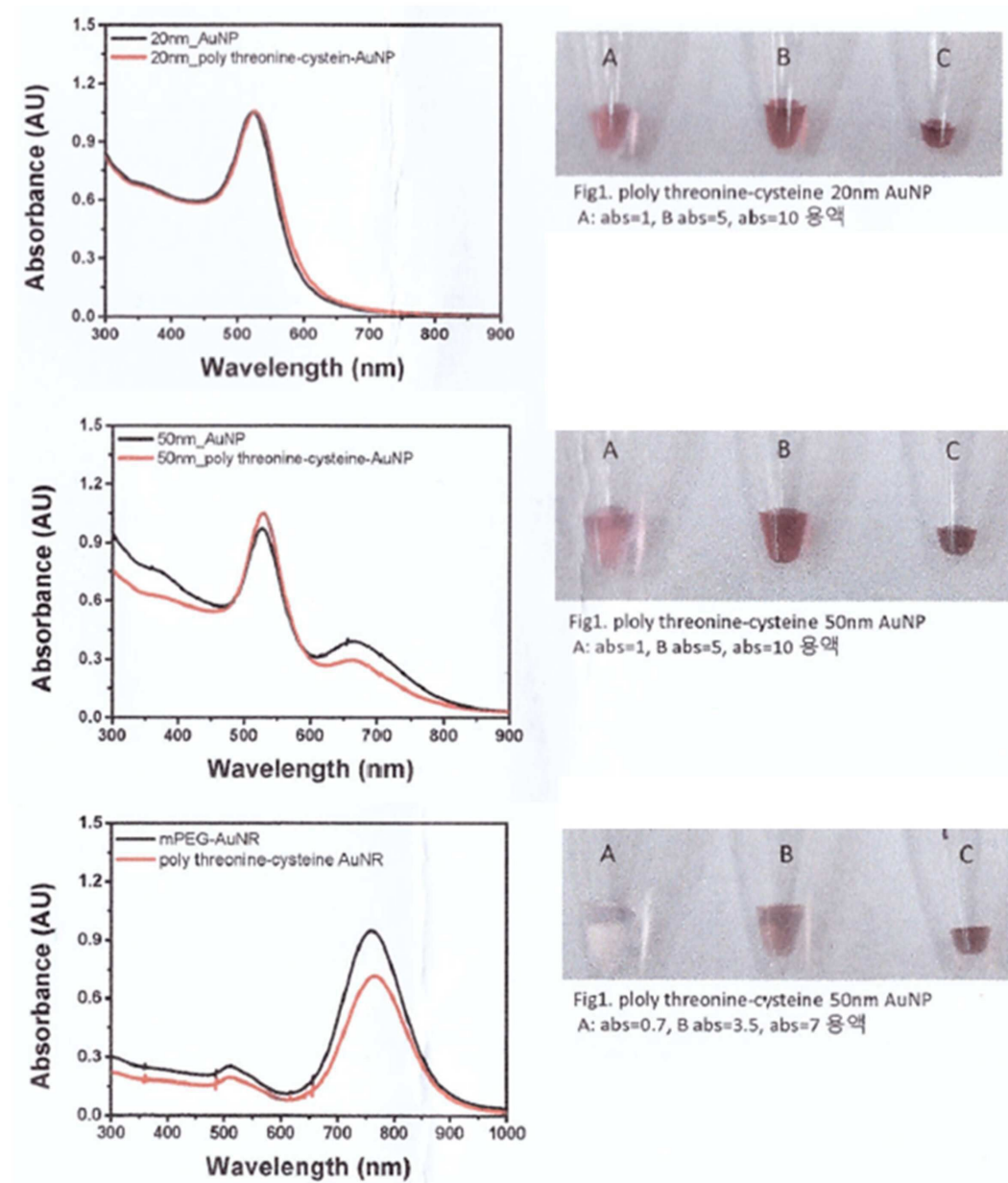
도면4



도면5

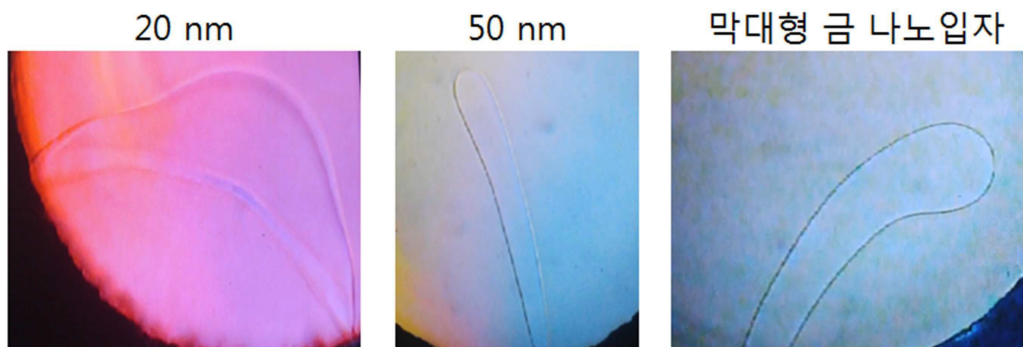


도면6



도면7

쓰레오닌 결합된 금 나노입자의 TH 실험 결과



도면8

