

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0088417

(43) 공개일자 2024년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 43/16 (2006.01) A01N 59/00 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01) B01J 19/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 43/16 (2013.01)

A01N 59/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0174111

(22) 출원일자 2022년12월13일

심사청구일자 2022년12월13일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

(72) 발명자

김정완

인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 15, 230 4동 2801호(송도동, 송도 더샵 마스터뷰 23-1BL)

강수진

인천광역시 연수구 인천타워대로 251, 아트원푸르지오 오피스텔 820호(송도동)

김지민

인천광역시 부평구 원적로269번길 15, 103동 204호(산곡동, 현대아파트)

(74) 대리인

특허법인이름리온

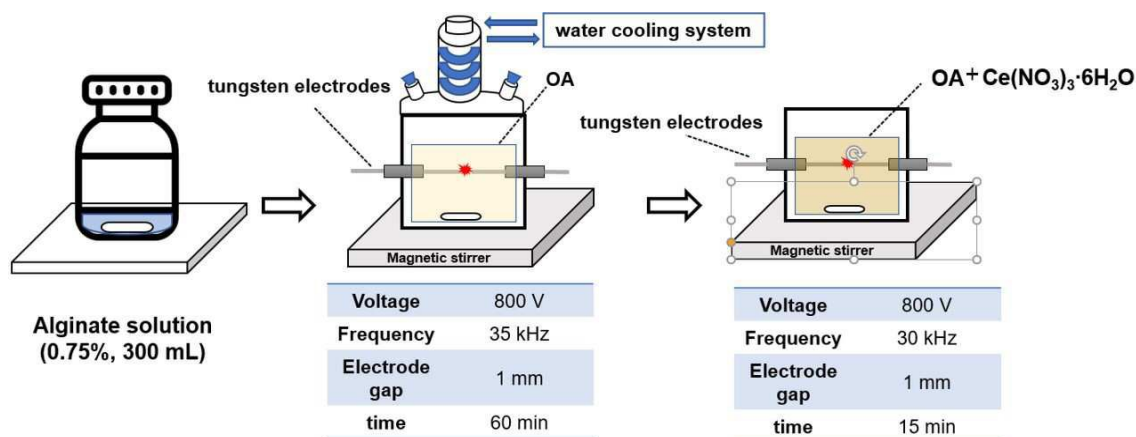
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 올리고알지네이트 나노세리아 생체복합체 및 이를 포함하는 생물막 억제 또는 방지용 조성물

(57) 요약

본 발명은 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트 및 나노세리아를 포함하는 생체복합체로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 생체복합체에 관한 것으로, 이의 항산화능과 생물막 형성 억제능을 확인한 용도에 관한 기술이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01P 1/00 (2021.08)

B01J 19/12 (2013.01)

B01J 2219/0894 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711167345

과제번호 2020R1A2C110169011

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 유체 플라즈마 공정을 이용한 생체적합성 기능성 식품산업 소재 개발 및 작용 기작

등 특성 규명

기 여 율 1/1

과제수행기관명 인천대학교

연구기간 2020.09.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트 및 나노세리아를 포함하는 생체복합체로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 생체복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 펄스 폭 1 내지 3 μ s, 주파수 25kHz 내지 45kHz로, 700 내지 900V에서 10분 내지 120분 수행되는 것인, 생체복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 올리고알지네이트와 나노세리아는 솔루션 플라즈마 공정으로 복합체가 형성된, 생체복합체.

청구항 4

제4항에 있어서,

상기 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 주파수 20kHz 내지 40kHz로 700 내지 900V에서 5분 내지 30분 수행되는 것인, 생체복합체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 생체복합체를 포함하는 생물막(biofilm) 형성 억제 또는 방지용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 올리고알지네이트는 농도가 0.5 내지 1.0% 이고, 나노세리아의 농도는 0.5 내지 7mM 인, 생물막 형성 억제 또는 방지용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 조성물은 비브리오 볼니피쿠스(*Vibrio vulnificus*), 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) 및 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 대한 생물막 형성 억제 효과가 있는, 생물막 형성 억제 또는 방지용 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 조성물은 항산화능을 갖는, 조성물.

청구항 9

i) 알지네이트를 해중합하여 올리고알지네이트를 생산하는 단계; 및

ii) 상기 i) 단계에서 생산된 올리고알지네이트와 질산 세륨이 포함된 용액을 이용하여 복합재를 생성하는 단계;를 포함하는 생체복합재 생성 방법으로서,

상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인, 생체복합재 생성 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 i) 단계에서 알지네이트의 해중합에 이용되는 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 펄스 폭 1 내지 $3\mu s$, 주파수 25kHz 내지 45kHz로, 700 내지 900V에서 10분 내지 120분 수행되는 것인, 생체복합재 생성 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 ii) 단계에서 복합재의 생성은 솔루션 플라즈마 공정으로 복합재가 생성되는 것이고,

상기 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 주파수 20kHz 내지 40kHz로 700 내지 900V에서 5분 내지 30분 수행되는 것인, 생체복합재.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 올리고알지네이트 및 나노세리아를 포함하는 생체복합재와 이의 항생물막 용도에 관한 기술이다.

배경 기술

[0003] 알지네이트는 갈조류의 세포벽에서 분리된 천연 음이온성 다당류이다. 선형 비반복 공중합체 계열에 속하는 산성 다당류이며 각 당 고리에 카르복실기를 포함하는 유일한 천연 해양 바이오 다당류이다. 1,4- β -d-만누론산(mannuronic acid, M)과 이의 C-5 에피머인 α -l-글루론산(guluronic acid, G)가 GG, MM 또는 MG로 반복되어 배열되어 있는 형태이다. 알지네이트는 가장 풍부한 해양 바이오매스이다. 또한 생체 적합성, 낮은 독성, 비교적 저렴한 비용 및 Ca^{2+} 와 같은 2가 양이온이 있는 엄격하지 않은 조건에서 젤을 형성할 수 있는 능력으로 인해, 식품 및 생물 의학 산업상 적용에서 널리 사용되어 계속 연구되고 있다.

[0004] 알지네이트는 효소 분해, 산 가수분해 및 산화 분해, 열처리, 초음파, 자외선 및 γ 선 조사를 포함한 다양한 분해 방법에 의해 해중합될 수 있다. 올리고알지네이트의 기능은 항종양 활성, 산화 방지, 면역 반응 조절, 염증 감소, 신경 보호 활성, 항균 활성 및 지질 수치 감소, 고혈압 감소, 혈당 수치 감소로 알려져 있다.

[0005] 또한, 나노세리아는 Ce^{4+}/Ce^{3+} 산화 환원 커플의 산화 환원 전위가 낮다. nCes는 주로 표면에 "산화 스위치"가 있기 때문에 뛰어난 활성 산소종(ROS) 소거 활성을 갖는 금속 산화물 기반 나노입자(NP)이다. 항산화 활성으로

인해 다양한 생물 의학 용도로 사용된다. 나노세리아는 oxidase, peroxidase, catalase, phosphatase 등을 포함하여 화학적, 물리적 방법을 포함한 다양한 방법으로 합성되었다. 그러나 종래 방법들은 위험한 화학 물질이나 고가의 장치를 사용하며 일반적으로 비효율적이었다.

[0006] 한편, SPP(Solution Plasma Process)는 Takai(2008)가 제안한 액체 플라즈마로 나노물질 합성, 표면 개질, 수처리, 유기화합물의 살균 및 해중합에 사용되는 친환경 공정이다. Takai(2008)는 유체에서 생성된 플라즈마가 기체층으로 둘러싸여 있으며 중심에 위치한 플라즈마에 의해 형성된 전자, 라디칼 및 이온이 기체층을 통해 액체상으로 이동하여 유체 내의 분자와 반응한다고 밝혔다. SPP는 용매와 용질의 조합에 따라 다양한 이온과 라디칼을 생성할 수 있다. SPP는 생물학적으로, 나노금속-바이오폴리머 복합재료 합성 : Ag, Ce & gelatin, 셀룰로오스, 키토산, 알지네이트, 수체 살균, 독성 화합물의 분해, 및 거대분자 기능성 생체재료 합성에 이용된다.

[0007] 이에, SPP 방법으로 나노세리아를 제조하기 위해, 펄스 단극 전원 공급 장치를 사용하여 0-25분 동안 30kHz의 주파수로 800V에서 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 용액에 플라즈마를 방전하여 nCes를 합성했다. 그 결과, nCes는 최대 1600 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 까지 HeLa 세포에 세포독성이 없는 히드록실 및 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼에 대해 우수한 pH 의존적 항산화 특성을 보였다.

[0008] 본 발명자들은 올리고알지네이트와 나노세리아의 항산화 활성을 향상시키기 위한 노력으로 올리고알지네이트 매트릭스에서 나노세리아의 생체복합체를 SPP를 이용하여 합성하였으며, 신규한 항생물막 용도를 밝혀 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) MubarakAli, D. et al., 2018, Arch. Biochem. Biophys., 645, 42.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트 및 나노세리아를 포함하는 생체복합체로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 생체복합체를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또다른 목적은 상기 생체복합체를 포함하는 생물막(biofilm) 형성 억제 또는 방지용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또다른 목적은 i) 알지네이트를 해중합하여 올리고알지네이트를 생산하는 단계; 및 ii) 상기 i) 단계에서 생산된 올리고알지네이트와 질산 세륨이 포함된 용액을 이용하여 복합체를 생성하는 단계;를 포함하는 생체복합체 생성 방법으로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 생체복합체 생성 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속 하는 기술 분

야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

- [0016] 본 발명자들은 유체플라즈마를 이용한 올리고알지네이트를 제조하고, 나노세리아의 항산화능을 증대시키기 위하여 제조된 올리고알지네이트 용액에 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 를 가한 뒤 유체플라즈마 공정을 거쳐 올리고알지네이트-나노세리아 생체복합재를 제조하였다. 이로써 올리고알지네이트 기지체(matrix)에 나노세리아가 잘 분산된 나노복합재는 올리고알지네이트 혹은 나노세리아 각각 보다 크게 향상된 항산화능을 보였으며 여러 균에 대하여 항생물막 기능을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 따라서, 본 발명은 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트 및 나노세리아를 포함하는 생체복합재로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 생체복합재를 제공한다.
- [0018] 본 명세서에 있어서 용어 "생체복합재"는 "biocomposite"과 동일한 의미를 가지며, 올리고알지네이트가 매트릭스로 이용되며, 나노세리아가 결합한 복합재를 의미한다.
- [0019] 본 명세서에 있어 '솔루션 플라즈마(Solution Plasma Process, 'SPP') 공정 방법'이란 '용액 플라즈마 공정'과 동일한 의미로 사용되며, 수중에서 플라즈마 방전에 의해 생성된 다양한 이온과 라디칼로 짧은 반응 시간에 매우 효율적으로 용액 내 분자의 화학적 변화를 촉진한다. 본 방법은 화학 물질의 개입 없이 생체 적합성 화합물의 합성 및 분해를 위한 손쉬운 원뿔 공정으로 생물학적 안전성을 보장한다.
- [0020] 본 명세서에 있어서 '해중합'은 다당류 형태인 알지네이트를 올리고알지네이트로 생성하기 위한 과정을 의미한다.
- [0021] 일실시예에 있어서, 상기 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 펄스 폭 1 내지 $3\mu\text{s}$, 주파수 25kHz 내지 45kHz로, 700 내지 900V에서 10분 내지 120분 수행되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 펄스 폭 1.5 내지 $2.5\mu\text{s}$, 주파수 30kHz 내지 40kHz로, 700 내지 900V에서 30분 내지 90분 수행되는 것일 수 있고, 본 발명의 일실시예에서는 펄스 폭 $2\mu\text{s}$, 주파수 35kHz로, 800에서 60분 수행하였다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 올리고알지네이트의 해중합이 효율적으로 일어나지 않을 수 있다.
- [0022] 단극성 전원장치를 사용했을 때에는 양극성 전원장치를 사용할 때와는 달리 반응이 빠르게 진행되어 본 발명에서는 단극성 전원장치로 60 분간 혹은 그 이상 처리했을 때 알지네이트 분자량이 10 kDa 이하로 감소되는 반면 양극성 전원장치로 60분간 처리했을 때는 분자량이 200 kDa 정도로 감소될 수 있음을 확인하였다. 즉, 단극성 전원장치를 이용하는 경우가 더욱 우수하게 해중합 될 수 있음을 확인하여, 본 발명에서는 단극성 전원장치를 이용하였다.
- [0024] 일실시예에 있어서, 상기 올리고알지네이트와 나노세리아는 솔루션 플라즈마 공정으로 복합재가 형성된 것일 수 있다.
- [0025] 일실시예에 있어서, 상기 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 주파수 20kHz 내지 40kHz로 700 내지 900V에서 5분 내지 30분 수행되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 주파수 25kHz 내지 35kHz로 750 내지 850V에서 10분 내지 20분 수행되는 것일 수 있고, 본 발명의 일실시예에서는 주파수 30kHz로 800V에서 15분 수행하였다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 올리고알지네이트와 나노세리아의 복합재가 효율적으로 형성되지 않을 수 있다.
- [0027] 본 발명은 또한, 상기 생체복합재를 포함하는 생물막(biofilm) 형성 억제 또는 방지용 조성물을 제공한다.
- [0028] 본원의 상기 '생물막'은 미생물이 분비한 세포외 다량체 기질(Extracellular Polymeric Matrix)과 증식한 박테리아로 구성된 입체적 구조물을 말한다. 대부분의 박테리아가 표면에 밀착하여 증식할 수 있는데, 이런 경우 단일막을 형성하거나, 응집체를 형성하거나 또는 상기의 생물막을 형성한다. 상기 생물막을 생체조직을 포함하는 거의 모든 종류의 교체 표면에 형성될 수 있다.
- [0029] 이러한 생물막은 주위에서 흔히 접할 수 있는 생체, 의학 및 산업 환경에서 흔히 발견된다. 생체에서 서식할 수 있는 병원성 박테리아의 경우 숙주의 상피세포, 뼈, 치아, 및 혈관내벽 등을 포함하는 각종 조직/기관 및 각종 인공 삽입 보형물(catheter, implant), 각종 의학기구/장비/설비 등에 생물막을 형성할 수 있다. 생물막이 형성

되면 박테리아는 가혹한 환경에서도 잘 견디는 것은 물론, 항생제 및 면역세포에 대하여 강한 저항력을 가지기 때문에 제거가 매우 어려우며, 만성 염증 질환의 원인이 되기도 하며, 물체의 경우 부식(microbiologically induced corrosion)을 유발한다. 최근 보고에 의하면, 전체 감염성 질환의 65% 정도가 생물막 형성이 주요인으로 알려져 있다 (Ymele-Leki and Ross, 2007, Applied and Environmental Microbiology 73(6):1834-41). 따라서 박테리아에 의한 부식 방지 또는 병원성 박테리아에 의한 감염의 방지/치료 또는 질환의 예방/치료에 있어, 생물막 형성의 제어는 매우 중요하다.

- [0030] 본원의 생물막 형성 억제 또는 방지용 조성물은 박테리아에 의한 생물막 형성의 제어가 필요한 곳이면, 가정, 환경, 의료 및 산업 분야에 걸쳐 폭넓게 사용될 수 있다. 한 구현예에서는 예를 들면, 각종 의학기구, 의학장비, 의학 시설/설비와 같은 물건은 물론 상피세포, 뼈, 치아, 및 혈관내벽 등을 포함하는 각종 생체 조직/기관과 같은 생체조직 및 생체에 적용되는 각종 인공 삽입 보형물에 사용될 수 있다.
- [0031] 본원의 생물막 형성 억제 또는 방지용 조성물은 가정, 산업, 의학, 및 환경분야에서의 구체적인 목적에 맞추어 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들면 생체는 물론, 각종 장비, 기구의 세척을 위해, 표적으로 하는 박테리아에 의한 생물막 형성의 저해 및/또는 방지에 유효한 양의 상기 조성물을 포함하는 액체형태, 분무형태 또는 고체형태로 제조될 수 있으며, 목적에 따라 추가의 성분 예를 들면 이온 제한하는 것은 아니나, 계면활성제, 세정제, 계 균제, 살균제, 항생제, 곰팡이제거제, 산도조절제, 염료, 색소와 같은 것을 포함할 수 있다.
- [0032] 일실시예에 있어서, 상기 올리고알지네이트는 농도가 0.5 내지 1.0% 이고, 나노세리아의 농도는 0.5 내지 7mM 일 수 있으며, 바람직하게는 올리고알지네이트는 농도가 0.7 내지 0.8%이고, 나노세리아의 농도는 1 내지 5 mM 일 수 있다. 구체적인 일실시예에서는 올리고알지네이트 농도 0.75%, 나노세리아는 5mM을 이용하였다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 효과적인 생물막 형성 억제가 일어나지 않을 수 있다.
- [0033] 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 비브리오 볼니피쿠스(Vibrio vulnificus), 스태필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus) 및 녹농균(Pseudomonas aeruginosa)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 대한 생물막 형성 억제 효과가 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 항산화능을 갖는다. 구체적인 일실시예에서, DPPH, 수산화라디칼 소거 활성 분석, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 활성 분석, H₂O₂ 라디칼 소거 활성 분석을 수행한 결과, 생체복합제는 나노세리아나 올리고알지네이트 각각을 이용한 경우보다 소거 활성이 더 높은 것을 확인하였다.
- [0035] 본원의 생물막 형성 억제 또는 방지용 조성물의 경우 표적으로 하는 박테리아의 종류에 따라, 생물막 형성의 방지 또는 저해에 효과적인 항생제와 상기 생체복합제를 포함하는 수용액 또는 현탁액으로 제조될 수 있다. 다른 구현예에서는 파우더, 코팅제, 스프레이, 분배형타입, 액체에 투입할 수 있는 캡슐/타블렛형태 등으로 제조될 수 있다. 이들 조성물은 음이온성, 비이온성, 양쪽 이온성 및 생물학적 계면활성제 및 이들의 혼합물과 같은 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0036] 본원의 조성물은 생물막 형성의 방지 또는 저해에 효과적인 양으로 사용될 수 있다. 효과적인 양은 생물막을 형성하는 박테리아의 종류, 처리하는 표면의 종류 및 그 면적, 및 목적하는 생물막 형성의 감소 정도, 처리 시점 등을 포함하는 조건에 맞추어 결정될 수 있으며, 당업자라면 본원의 기재 및 표적 박테리아의 생물막 형성에 관한 지식을 근거로 적절한 농도를 선택할 수 있을 것이다. 예를 들면 실시예에 기재된 생물막 형성 측정 방법으로 측정 시 처리 전과 비교하여 목적에 따라, 생물막 형성이 약 100 %, 약 95 % 이상, 약 90 % 이상, 약 85 % 이상, 약 80 % 이상, 약 75 % 이상, 약 70 % 이상, 약 65 % 이상, 약 50 % 이상, 약 45 % 이상, 약 40 % 이상, 약 35 % 이상, 약 30 % 이상, 약 25 % 이상, 약 20 % 이상의 감소에 필요한 양을 일컫는 것일 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명은 또한, i) 알지네이트를 해중합하여 올리고알지네이트를 생산하는 단계; 및 ii) 상기 i) 단계에서 생산된 올리고알지네이트와 질산 세륨이 포함된 용액을 이용하여 복합체를 생성하는 단계;를 포함하는 생체복합체 생성 방법으로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 생체복합체 생성 방법을 제공한다.
- [0038] 일실시예에 있어서, 상기 i) 단계에서 알지네이트의 해중합에 이용되는 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 펄스 폭 1 내지 3 μ s, 주파수 25kHz 내지 45kHz로, 700 내지 900V에서 10분 내지 120분 수행되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 펄스 폭 1.5 내지 2.5 μ s, 주파수 30kHz 내지 40kHz로, 700 내지 900V에서 30분 내지 90분 수행되는 것일 수 있고, 본 발명의 일실시예에서는 펄스 폭 2 μ s, 주파수 35kHz로, 800에서 60분

수행하였다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 올리고알지네이트의 해중합이 효율적으로 일어나지 않을 수 있다.

[0039]

일실시예에 있어서, 상기 ii) 단계에서 복합재의 생성은 솔루션 플라즈마 공정으로 복합재가 생성되는 것이고, 상기 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 주파수 20kHz 내지 40kHz로 700 내지 900V에서 5분 내지 30분 수행되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 주파수 25kHz 내지 35kHz로 750 내지 850V에서 10분 내지 20분 수행되는 것일 수 있고, 본 발명의 일실시예에서는 주파수 30kHz로 800V에서 15분 수행하였다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 올리고알지네이트와 나노세리아의 복합재가 효율적으로 형성되지 않을 수 있다.

발명의 효과

[0041]

본 발명에 따른 올리고알지네이트 및 나노세리아를 포함하는 생체복합재는 항산화능이 뛰어나며, 생물막 억제 또는 방지에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043]

도 1은 본 발명의 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 형성 방법에 대한 개략도이다.

도 2는 0.6% 올리고알지네이트와 /1, 3, 5 mM 나노 세리아 복합재 형성시의 UV-Vis Spectra 결과이다.

도 3은 0.8% 올리고알지네이트와 /1, 3, 5 mM 나노 세리아 복합재 형성시의 UV-Vis Spectra 결과이다.

도 4는 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 FT-IR 분석 결과이다.

도 5는 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 XPS 분석 결과이다.

도 6은 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 SEM 분석 결과이다.

도 7은 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 DLS 분석 결과이다.

도 8은 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 제타 포텐셜 분석 결과이다.

도 9는 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 TEM 분석 결과이다.

도 10은 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 항산화 활성 확인 결과이다. (A) DPPH, (B) $\cdot$ OH scavenging activity, (C) $\cdot$ O₂ scavenging activity, (D) H₂O₂ radical scavenging activity 결과이다.

도 11은 올리고알지네이트 나노세리아 복합재 농도별 세포 생존력을 확인한 결과이다.

도 12는 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 *V. vulnificus* 생물막 억제 확인 결과이다.

도 13은 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 *S. aureus* 생물막 억제 확인 결과이다.

도 14는 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 *P. aeruginosa* 생물막 억제 확인 결과이다.

도 15는 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 *P. aeruginosa* 생물막 억제 확인 결과이다.

도 16은 올리고알지네이트 나노세리아 복합재의 *E. coli* 생물막 억제 확인 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044]

이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0046]

[준비예]

[0047]

본 연구의 생물막 저해 테스트에 대장균 (*E. coli*), 황색 포도상구균 (*S. aureus*), 비브리오 패혈증균 (*V. vulnificus*)과 녹농균 (*P. aeruginosa*)이 사용되었다. 모든 균주는 Luria Bertani (LB) 한천배지에 37 °C, 18 시간 전배양하였고, 대장균과 황색 포도상구균은 1.0% 포도당이 함유된 Tryptic Soy Broth (TSB)에, 녹농균은 Tryptic Soy Broth에, 비브리오 패혈증균은 2.0% NaCl을 포함하는 Heart Infusion (HI) 배지에 37 °C, 18 시간

동안 220 rpm으로 진탕배양 하였다. 모든 배양 배지는 BD Biosciences Advanced Bioprocessing (USA) 과 Difco (USA) 그리고 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다.

실시예 1

[0049] SPP에 의한 올리고알지네이트 나노세리아 복합체의 제조

[0050] 올리고알지네이트 나노세리아 복합체를 제조하기 위하여 우선, 0.75% 알지네이트를 SPP를 이용하여 1시간 동안 올리고알지네이트로 해중합하였다. 그런 다음 $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ 가 포함된 OA 용액에서 15분 동안 플라즈마를 방출 하여 OA/nCe 생체 복합체를 합성했다(도 1).

[0051] 구체적으로, OA 합성을 위해 알지네이트(0.75%, w/v; 알긴산나트륨염, 71238; Sigma-Aldrich, USA)을 3차 증류수에 용해시켰다. 테플론 반응기(500 ml)에 알지네이트 용액(300 mL)을 첨가하고, 직경 2mm의 텅스텐 전극(Alfa Aesar, USA)을 반응기 내부에 1mm의 간격을 두어 나란히 배열하였다. 단극(unipolar) 펄스 전원 공급 장치(EnerPulse 10HV, Korea)를 사용하여 고전압에서 플라즈마를 생성시켰고, 이 때 발생하는 열은 물 냉각기(TRC-2000, Yescool, Korea)를 사용하여 식혀, 공정 중 발생하는 열로 인한 용액 손실을 방지하였다. 농도 0.75%(w/v)의 알지네이트는 수중에서 800V의 전압, 2 μ s의 펄스 폭 및 35kHz의 주파수에서 60분동안 플라즈마 방전되었다.

[0052] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 알지네이트 용액은 플라즈마 방전 전에 무색이었고 방전 시간이 증가함에 따라 열은 노란색에서 밝은 갈색으로 변했다. 합성된 올리고 알지네이트는 하루간 덤프리지 (DF8520, ilShin BioBase, Korea)에 동결시킨 후, 동결 건조기 (TFD8503, ilShin BioBase, Korea)를 사용하여 동결 건조 시켰다.

[0053] 올리고 알지네이트-나노세리아 복합체를 생성하기 위하여 300 ml의 3차 증류수에 5 mM의 질산 세륨 ($Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$)과 동결 건조된 0.8% (w/v)의 올리고 알지네이트를 녹인 후, 반응기에 1 mm의 간격을 둔 두 텅스텐 전극을 사용하여 800 V, 30 kHz에서 15분간 플라즈마를 방전시켰다. 생물복합체를 제조하기 위해서 5 ml의 올리고 알지네이트-나노세리아 생물복합체를 페트리디쉬 (35 X 10 mm)에 담아 덤프리지 (DF8520, ilShinBioBase, Korea)에 하루간 동결시킨 후, 동결건조기 (TFD8503, ilShinBioBase, Korea)를 사용하여 동결 건조 시켰다. 이후, 30 분간 자외선 (265 nm)을 조사하여 가교 결합 시켰다.

[0055] UV-Vis 분광광도법

[0056] 올리고알지네이트-나노세리아 생물복합체내의 나노세리아의 형성은 분광광도계 (UV-1280, SHIMADZU, Japan)를 사용하여 확인하였다. 측정하기에 앞서 1 ml의 3차 증류수로 blank를 설정하였으며, 200 ~ 700 nm의 파장대에서 자외선-가시광선 스펙트럼을 측정하였다. 올리고알지네이트-나노세리아 생물복합체 용액은 3차 증류수로 6배 희석한 후 측정하였으며, 그래프는 UV Probe 2.70 소프트웨어 프로그램을 사용하여 작성하였다.

[0057] 그 결과, 도 2 및 도 3은 각각 0.6%, 0.8% 농도의 OA에서 1, 3, 5mM $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ 의 UV-Vis 스펙트럼 결과이다. 각각의 농도에서 모두 260-264 nm에서 피크가 관찰되어 OA의 존재를 나타냈다. 또한, 독특한 피크가 366-368 nm에서 관찰되어 nCe의 합성을 확인하였다. 아울러, 방전 시간이 증가함에 따라 용액의 색상이 더 어두워진 것을 확인하였다. 이러한 결과로 올리고알지네이트 매트릭스에서 나노세리아의 형성을 확인하였다.

실시예 2

[0059] 올리고알지네이트 나노세리아 복합체의 특성 확인

[0060] 올리고알지네이트 나노세리아 복합체의 특성을 확인하기 위하여 FT-IR Analysis, XPS Analysis, SEM Analysis, DLS Analysis, Zeta potential Analysis, TEM Analysis를 수행하였다.

[0062] FT-IR Analysis

[0063] 플라즈마 방전 중 올리고 알지네이트와 올리고알지네이트-나노세리아의 화학 구조의 변화 유무를 푸리에 변환 적외선 분광법 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR)으로 분석하였다. 5 ml의 생물복합재를 페트리 디쉬 (35 X 10 mm)에 담은 후, 덩프리지 (DF8520, IIShinBioBase, Korea)에 하루간 얼린다. 동결건조기 (TFD8503, IIShinBioBase, Korea)에 이틀간 동결 건조 시킨 후, 자외선 (265 nm)을 30분간 조사하여 가교 결합을 유도하였다. 동결 건조된 3D 스캐폴드가 담긴 페트리디쉬를 FT-IR기기에 올려 놓고 800 - 4,000 cm^{-1} 의 범위에서 인천대학교 공동기기원의 VERTEX 80V HYPERION 2000 (Bruker, USA)을 사용하여 측정하였다.

[0064] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 생물복합재의 FTIR 분석은 올리고알지네이트의 케미컬 구조에 특별한 변화가 없음을 확인하였다.

[0066] XPS Analysis

[0067] 올리고알지네이트_나노세리아 생물복합재 내의 Ce^{3+} 와 Ce^{4+} 의 우세도를 파악하기 위하여 PHI 5000Versa Probe II (ULVAC-PHI, Japan)을 사용하여 XPS 분석을 시행하였다. 생물복합재를 생성하기 위하여 5 ml의 생물복합재 용액을 페트리 디쉬 (35 x 10 mm)에 담고, 덩프리지 (DF8520, IIShinBioBase, Korea)에 하루 냉동한 후에 동결 건조기 (TFD8503, IIShinBioBase, Korea)에 이틀간 동결 건조시킨 후, 30 분간 자외선 (265 nm)을 조사하여 가교 결합을 유발하였다. 이렇게 형성된 3D 스캐폴드 자체를 분석에 사용하였다.

[0068] Biocomposite의 XPS 분석은 OA 매트릭스에서 Ce^{3+} 및 Ce^{4+} 로 나노세리아의 보급을 보여 OA 매트릭스가 nCe의 2가 상태를 방해하지 않음을 확인하였다.

[0070] SEM Analysis

[0071] 생성된 생물복합재의 3차원적 구조는 인천대학교 공동기기원의 JSM-7800F (JEOL, Japan)을 통해서 얻을 수 있었다. 시료를 준비하기 위해서, 5 ml의 올리고알지네이트_나노세리아 시료를 페트리 디쉬 (35 x 10 mm)에 담고, 초저온냉동고 (DF8520, IIShinBioBase, Korea)에 하루 동안 냉동한 후에 동결 건조기 (TFD8503, IIShinBioBase, Korea)를 이용하여 이틀간 동결 건조를 시켰다. 30 분간 자외선 (265 nm)을 조사하여 생물복합재의 가교 결합을 유도한 후, 이렇게 형성된 3D 스캐폴드를 사용하여 SEM, EDS 분석 및 맵핑을 하였다.

[0072] SEM을 통해 확인해 본 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 생물복합재는 나노세리아 입자가 박혀 있고 잘 분포된 기공이 거의 없는 시트형 구조를 가졌다. 또한, EDS 맵핑 분석은 2.59%의 나노세리아가 생물복합재에 존재함을 나타냈다.

[0074] 동적 광산란(Dynamic light scattering, DLS) 분석

[0075] 생물복합재 입자의 유체역학적 크기는 zetasizer (Malvern Panalytical, UK) 기기를 사용하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 측정하였다. 시료 준비를 위하여, 5 ml의 올리고알지네이트-나노세리아 시료 5 ml를 페트리디쉬 (35 x 10 mm)에 담은 후, 초저온냉동고 (DF8520, IIShinBioBase, Korea)에서 16 시간 냉동한 후, 이틀간 동결건조기 (TFD8503, IIShinBioBase, Korea)를 사용하여 동결건조시켰다. 자외선 (265 nm)으로 가교된 생물복합재를 10 ml의 3차 증류수에 용해시킨 다음 10배 희석시켜 DLS로 분석하였다.

[0076] DLS 분석 결과는 도 7 및 하기 [표 1]과 같다.

표 1

	0.8% OA	0.8% OA/1 mM nCe	0.8% OA/3 mM nCe	0.8% OA/5 mM nCe
평균 직경	68.0 $\pm$ 8.0 nm	236.4 $\pm$ 16.3 nm	327.8 $\pm$ 8.4 nm	347.5 $\pm$ 12.7 nm
크기 범위	40.6 $\pm$ 4.3 ~ 365.5 $\pm$ 77.4nm	88.6 $\pm$ 7.5 - 696.8 $\pm$ 62.1 nm	133.4 $\pm$ 22.0 - 810.3 $\pm$ 72.3 nm	219.1 $\pm$ 18.6 - 541.8 $\pm$ 46.0 nm

[0078] 종합하면, 올리고알지네이트 자체보다 나노세리아의 혼입에 의해 생물복합재의 입자크기가 커짐을 알 수 있었다.

Zeta potential Analysis

동결건조된 올리고 알지네이트-나노세리아 생물복합체를 10 ml의 3차 증류수로 용해시킨 다음, 10배 희석하여 zetasizer (Malvern Panalytical, UK)를 이용하여 제타전위를 측정하였다. 평균값과 표준편차는 ZS XPLOER 소프트웨어를 사용하여 얻었다.

제타 포텐셜 분석 결과는 도 8 및 하기 [표 2]와 같다.

올리고알지네이트 나노세리아 생물복합체의 제타전위를 측정하였다. 생체복합체의 제타전위의 절대값이 커지면 서, 이는 생체복합체 용액이 콜로이드 분산과 관련하여 보다 안정되었음을 확인하였다.

표 2

	0.8% OA	0.8% OA /1 mM nCe	0.8% OA/3 mM nCe	0.8% OA/5 mM nCe
Zeta-Potential	-32.21 ± 1.46 mV	-40.33 ± 1.13 mV	-40.11 ± 0.85 mV	-45.12 ± 1.35 mV

TEM Analysis

올리고알지네이트-나노세리아 복합체 내의 나노세리아 입자의 형태와 크기는 인천대학교 공동기기원의 투시전자 현미경 (TEM; Talos F200X, Thermo-Fisher Scientific, USA)를 사용하여 분석하였다. 올리고알지네이트-나노세리아 복합체 5 ml를 페트리디쉬 (35 x 10 mm)에 넣어 초저온냉동고 (DF 8520, IlShinBioBase, Korea)에 16 시간 넣어 냉동시킨 후, 이틀간 동결건조기 (TFD8503, IlShinBiobase, Korea)를 사용하여 동결 건조를 하였다. 동결 건조된 생물복합체로부터 나노세리아를 추출하기 위해서, 생물복합체를 1 ml 순수 에탄올 (Sigma Aldrich, USA)에 용해시킨 다음 15분간 초음파 분쇄기 (Powersonic 405, Hwashin, Korea)로 처리하였다. 이후, 0.45 µm 시린지 필터 (RephiLe, USA)를 사용하여 나노 입자를 회수한 후, 카본 그리드에 나노 입자를 올려 하루 동안 건조시킨 다음 나노 입자의 형태 및 크기를 분석하였다.

TEM 분석 결과는 도 9 와 같다. TEM 분석결과 나노세리아 입자가 평균 직경이 21.6 ± 10.0nm인 큐빅 구조를 갖는 것으로 나타났다. 나노세리아 입자의 약 50%는 직경이 21-30 nm 범위에 있었다.

실시예 3

올리고알지네이트 나노세리아 복합체의 항산화 효능 확인

다양한 라디칼에 대한 항산화 효과를 알기 위해 다양한 항산화 시험을 수행하였다.

DPPH 소거 활성 분석

올리고알지네이트 나노세리아의 항산화 활성은 수정된 DPPH 방법을 사용하여 평가하였다. 0.5 ml의 DPPH(0.5mM) 용액을 0.5 ml의 0 - 5.0 mg/ml의 생물복합체 용액과 혼합하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 암실에서 인큐베이션하였다. DPPH의 탈색은 분광광도계(SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, USA)를 이용하여 517 nm에서 측정하였으며, (1)식을 사용하여 억제율을 계산하였다.

$$\frac{A_c - A_s}{A_c}$$

억제율 % = $\frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$ 식 (1),

여기서 Ac는 DPPH 용액 대조군의 흡광도이고 As는 샘플의 흡광도이다.

수산기 라디칼 소거 활성 분석

[0099] 수산기 라디칼 소거 활성은 디옥시리보핵산 방법으로 분석하였다. 2.8 mM 2-deoxy-2-ribose (Sigma Aldrich, USA), 0.1 mM 인산염 완충액 (pH 7.4), 20 μ M FeCl₃ (Sigma Aldrich, USA), 100 μ M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma Aldrich, USA), 500 μ M H₂O₂ (OCI Company Ltd., Korea), 100 μ M ascorbic acids (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)과 0 - 4.1 mg/ml의 생물복합제 용액을 섞어서 총 1 ml의 반응액을 만들었다. 37 °C에서 1 시간 반응 후, 0.8 ml의 반응액과 1.5 ml 의 1% thiobarbituric acid (TBA; Sigma Aldrich, USA), 200 μ l 의 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS; Sigma Aldrich, USA)와 2.8% trichloroacetic acid (TCA; Sigma Aldrich, USA)을 혼합 후, 90°C에서 20 분간 인큐베이션 하였다. 충분히 식힌 후, OD₅₃₂를 분광광도계(SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, USA)를 사용하여 측정하였고, 상기 식 (1)을 사용하여 억제율을 계산하였다.

[0101] 슈퍼옥사이드(superoxide) 라디칼 소거 활성 분석

[0102] 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼($\cdot O_2^-$) 소거능은 광원법으로 분석하였다. 1.5 ml 반응 혼합물 (0-2.5 mg/ml 생물복합제; 0.1 M EDTA; 0.0015% 시안화나트륨; 0.12mM 리보플라빈; 1.5 mM NBT; 67 mM 인산 완충액, pH 7.8)에 15분간 백색광을 조사하였고 NBT의 변색을 분광광도계 (UV-1280, Shimadzu, Japan)를 사용하여 530nm 에서 흡광도를 측정하였다. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거율은 상기 식 (1)을 이용하여 측정하였다.

[0104] 과산화수소 (H₂O₂) 라디칼 소거 분석

[0105] 50 mM 인산염 완충용액 (pH 7.4) 에 과산화수소수 (2 mM)을 첨가하여 시약을 제조하였다. 100 μ l의 생물복합제 용액과 300 μ l의 50 mM 인산염 완충용액 (pH 7.4)를 혼합한 후, 위의 과산화수소수 (2 mM) 600 μ l를 가하였다. 이 반응액을 15분간 상온에서 방치한 후, 분광광도계 (UV-1280, Shimadzu, Japan)를 사용하여 230nm 에서 흡광도를 측정하였다. 과산화수소 (H₂O₂) 라디칼 소거율은 상기 식 (1)을 이용하여 측정하였다.

[0107] DPPH 라디칼 소거 활성 분석 결과, 올리고알지네이트-나노세리아의 소거 효과는 75.1%이었으며, 동량의 나노세리아 (64.5%)나 올리고알지네이트 (60.4%) 의 소거 효과보다 높은 것으로 확인되었다. 수산기 라디칼 소거 활성 분석 결과, 올리고알지네이트-나노세리아의 소거 효과는 88.8%이었으며, 이는 동량의 나노세리아 (50.8%)와 올리고알지네이트 (76.7%)의 소거 효과 보다 높았다. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 활성 분석 결과, 올리고알지네이트-나노세리아의 소거 효과는 79.1 %로, 동량의 올리고알지네이트 (34.0%) 보다 높았다. 그러나, 이는 동량의 나노세리아의 소거 효과 (83.0%) 보다 낮았다. 과산화수소 라디칼 소거 활성 분석 결과, 올리고알지네이트-나노세리아의 소거 효과는 100.0 %이었으며, 나노세리아 (35.2 %) 와 올리고알지네이트 (56.8 %) 보다 높았다.

[0109] 종합하면, 도 10에 나타난 바와 같이, 0.8% 올리고알지네이트와 5mM 질산 γ -세륨을 이용하여 합성한 생체복합제는 나노세리아나 올리고알지네이트보다 DPPH와 과산화수소 라디칼 소거활성이 더 높게 나타났다. 올리고알지네이트와 유사하지만 나노세리아보다 훨씬 높은 수산기 라디칼 소거 활성; 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 활성은 나노세리아와 유사하지만 올리고알지네이트보다 훨씬 높았다. 종합하면, 이러한 결과로 올리고알지네이트-나노세리아 생체복합제가 항산화제로서의 그 능력이 크게 향상되었음을 확인하였다.

실시예 4

[0111] 올리고알지네이트 나노세리아 복합제의 세포 독성 효과 확인

[0112] HEK293 세포를 이용하여 세포 독성을 확인하였다.

[0113] 생물복합제의 세포 독성은 WST-1 방법으로 확인하였다. HEK 293 cells (1x10⁴ cells/well)을 96-well plate에 10% 소태아혈청과 1%의 페니실린, 스트렙토마이신이 함유된 MEM 배지 (1.5 g/L NaHCO₃, C₅H₁₀NaO₃, C₃H₃NaO₃; 100 μ l)와 함께 분주 후, 37 °C로 맞춰진 CO₂ 인큐베이터 (CCL-170B-8, ESCO, Singapore)에서 24 시간 배양

하였다. 24시간 후, 10 μ l EZ-Cytox 용액 (DoGenBio, Korea)을 각 well에 첨가하여 4시간 동안 추가로 배양하고 마이크로플레이트 리더기(SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 (%)은 아래의 식을 통해서 구하였다. 이때, Ac는 생물복합제 대신 PBS(phosphate buffer saline) 완충액을 첨가한 용액의 흡광도이고, Ab는 세포 없이 MEM 배지만 첨가한 용액의 흡광도이다.

[0114] 세포 독성 (%) = $((As - Ab) / (Ac - Ab)) \times 100 \dots \dots \dots$ 식(2)

[0115] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 올리고알지네이트/나노세리아의 생물 복합제는 1200 μ g/ml까지 HEK293 세포에 전혀 독성이 없었고, 생물복합제의 추정된 LD₅₀ 값은 1995.3 μ g/ml이었다. 따라서, 생물복합제가 다양한 응용 분야에 안전함을 확인하였다.

실시예 5

[0117] 올리고알지네이트 나노세리아 복합제의 항생물막 효과 확인

[0118] 다양한 병원균 (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. vulnificus* 와 *S. aureus*) 에 대한 올리고알지네이트-나노세리아 생물복합제의 생물막 형성 저해 효과는 보로실리케이트 시험관을 사용하여 분석하였다. *E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. vulnificus* 및 *S. aureus* 등의 세균을 1.0% 포도당이 함유된 Tryptic Soy Broth (TSB) 배지 (*E. coli*, *S. aureus*), TSB 배지 (*P. aeruginosa*), 혹은 2.0% NaCl이 포함된 Heart Infusion (HI) 배지 (*V. vulnificus*)에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 전배양 하였다. 각 세균의 배양액을 위의 배지를 사용하여 OD₆₀₀ = 0.6이 되도록 희석한 다음 생물복합제 (800 μ g/ml)와 1.0% 포도당이 함유된 600 μ l의 Tryptic Soy Broth (TSB) 배지 (*E. coli*, *S. aureus*), TSB 배지 (*P. aeruginosa*), 혹은 2.0% NaCl이 포함된 Heart Infusion (HI) 배지 (*V. vulnificus*)에 6 μ l 씩 접종하였다. 이 접종액을 37 $^{\circ}$ C에서 12-48 시간 정치배양한 후, 접종액을 제거하고 증류수로 수세한 다음 형성된 생물막을 건조시켰다. 1.0% 크리스탈바이올렛 염료 700 μ l를 가하여 10분간 염색한 후에 염료를 제거하고 3차 증류수로 2회 세척한 다음 DMSO (SigmaAldrich, USA) 700 μ l를 가하여 완전히 용해시킨 다음 분광 광도계(SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생물막 형성 저해율 (%)은 아래의 식을 통하여 계산하였다. 이때, A_c는 생물복합제를 첨가하지 않은 배양액에서 형성된 생물막의 흡광도이고, A_s는 생물복합제를 첨가한 배양액에서 형성된 생물막의 흡광도이다. 또한, A₀는 균을 접종 및 배양하지 않은 경우에 해당한다.

[0119] 저해율 (%) = $\left(\frac{A_s - A_0}{A_c - A_0} \right) \times 100 \dots \dots \dots$ 식 (3)

[0121] *V. vulnificus*

[0122] *V. vulnificus* 에 대한 올리고알지네이트-나노세리아 생물복합제의 생물막 저해 효과는 보로실리케이트 시험관을 사용하여 분석하였다. *V. vulnificus*를 2.0% NaCl이 포함된 Heart Infusion (HI) 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 전배양 하였다. 이 배양액을 위의 배지를 사용하여 OD₆₀₀ = 0.6이 되도록 희석한 다음 생물복합제 (800 μ g/ml)와 2.0% NaCl이 포함된 600 μ l의 Heart Infusion (HI) 배지에 6 μ l 접종하였다. 이 접종액을 37 $^{\circ}$ C에서 48 시간 정치배양한 후, 접종액을 제거하고 증류수로 수세한 다음 형성된 생물막을 건조시켰다. 1.0% 크리스탈바이올렛 염료 700 μ l를 가하여 10분간 염색한 후에 염료를 제거하고 3차 증류수로 2회 세척한 다음 DMSO (SigmaAldrich, USA) 700 μ l를 가하여 완전히 용해시킨 다음 분광광도계 (SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생물막 형성 저해율 (%)은 식 (3)을 사용하여 계산하였다.

[0123] 올리고알지네이트 나노세리아 복합제의 항생물막 활성에 대한 예비 조사는 치명적인 패혈증을 일으키는 해양 병원체인 *V. vulnificus*의 biofilm 형성을 거의 50%까지 억제할 수 있음을 확인하였다. 구체적으로, 도 12 및 하기 [표 3]에 나타난 바와 같이, 생물막 형성은 병원체의 성장에 영향을 미치지 않으면서 억제되었다. *V. vulnificus* 생물막 형성은 0.8 OA/5 nCe(800 μ g/ml)에 의해 49.0%로 감소되었다.

표 3

	Growth (OD ₆₀₀)	Biofilm formation (%)
Positive Control (P.C)	1.46 ± 0.12	100.0
0.8% OA/1 mM nCe	1.53 ± 0.08	76.3 ± 15.8
0.8% OA/3 mM nCe	1.56 ± 0.05	57.2 ± 11.0
0.8% OA/5 mM nCe	1.58 ± 0.02	49.0 ± 5.1

S. aureus

*S. aureus*에 대한 올리고알지네이트-나노세리아 생물복합재의 생물막 저해 효과는 보로실리케이트 시험관을 사용하여 분석하였다. 1.0% 포도당이 함유된 Tryptic Soy Broth (TSB) 배지에 *S. aureus*를 접종하여 37 °C에서 16 시간 전배양 하였다. 이 배양액을 위의 배지를 사용하여 OD₆₀₀ = 0.6이 되도록 희석한 다음 생물 복합재 (800 µg/ml)와 1.0% 포도당이 함유된 600 µl의 Tryptic Soy Broth (TSB) 배지에 6 µl 씩 접종하였다. 이 접종액을 37 °C에서 24 시간 정치배양한 후, 접종액을 제거하고 증류수로 수세한 다음 형성된 생물막을 건조시켰다. 1.0% 크리스탈바이올렛 염료 700 µl를 가하여 10분간 염색한 후에 염료를 제거하고 3차 증류수로 2회 세척한 다음 DMSO (SAMCHUN, Korea) 700 µl를 가하여 완전히 용해시킨 다음 분광광도계 (SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생물막 형성 저해율 (%)은 식(3)을 사용하여 계산하였다.

그 결과, 도 13 및 하기 [표 4]에 나타난 바와 같이, 0.8 OA/5 nCe(800 µg/ml)를 첨가했을 때 24.7%의 생물막이 형성되어, 높은 항생물막 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

표 4

Sample	Growth (OD ₆₀₀)	Biofilm formation (%)
Positive Control (P.C)	0.90 ± 0.12	100.0 ± 6.9
0.8% OA/1 mM nCe	1.58 ± 0.21	49.9 ± 4.2
0.8% OA/3 mM nCe	1.73 ± 0.05	32.5 ± 3.6
0.8% OA/5 mM nCe	1.09 ± 0.04	24.7 ± 0.1

P. aeruginosa

*P. aeruginosa*에 대한 올리고알지네이트-나노세리아 생물복합재의 생물막 형성 저해 효과는 보로실리케이트 시험관을 사용하여 분석하였다. *P. aeruginosa*를 TSB 배지에 접종하여 37 °C에서 16시간 전배양 하였다. 이 세균의 배양액을 위의 배지를 사용하여 OD₆₀₀ = 0.6이 되도록 희석한 다음 생물 복합재 (800 µg/ml)가 첨가된 TSB 배지에 6 µl 접종하였다. 이 접종액을 37 °C에서 12-24 시간 정치배양한 후, 접종액을 제거하고 증류수로 수세한 다음 형성된 생물막을 건조시켰다. 1.0% 크리스탈바이올렛 염료 700 µl를 가하여 10분간 염색한 후에 염료를 제거하고 3차 증류수로 2회 세척한 다음 DMSO (SigmaAldrich, USA) 700 µl를 가하여 완전히 용해시킨 다음 분광광도계 (SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생물막 형성 저해율 (%)은 식 (3)을 사용하여 계산하였다.

그 결과, 도 14 및 15 및 하기 [표 5]에 나타난 바와 같이, 0.8 OA/5 nCe(800 µg/ml)를 첨가했을 때 10 시간 및 24 시간 배양 후 각각 47.8% 와 37.8%의 생물막이 형성되어, 높은 항생물막 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

표 5

	10 h incubation		24 h incubation	
	Growth (OD ₆₀₀)	Biofilm formation (%)	Growth (OD ₆₀₀)	Biofilm formation (%)
Positive Control (P.C)	1.34 ± 0.06	100.0 ± 8.6	1.47 ± 0.23	100.0

0.8% OA/1 mM nCe	1.32 ± 0.04	64.2 ± 4.04	1.56 ± 0.14	81.4 ± 7.6
0.8% OA/3 mM nCe	1.34 ± 0.04	50.8 ± 3.89	1.37 ± 0.17	47.5 ± 7.1
0.8% OA/5 mM nCe	1.39 ± 0.01	47.8 ± 11.91	1.35 ± 0.25	37.8 ± 11.4

[0133] *E. coli*

[0134] *E. coli*에 대한 올리고알지네이트-나노셀리아 생물복합체의 생물막 형성 저해 효과는 보로실리케이트 시험관을 사용하여 분석하였다. *E. coli*를 1.0% 포도당이 함유된 Tryptic Soy Broth (TSB) 배지에 접종하여 37 °C에서 16시간 전배양 하였다. 이 세균의 배양액을 위의 배지를 사용하여 OD₆₀₀ = 0.6이 되도록 희석한 다음 생물 복합재 (800 µg/ml)와 1.0% 포도당이 함유된 600 µl의 Tryptic Soy Broth (TSB) 배지에 6 µl씩 접종하였다. 이 접종액을 37 °C에서 24 시간 정지배양한 후, 접종액을 제거하고 증류수로 수세한 다음 형성된 생물막을 건조시켰다. 1.0% 크리스탈바이올렛 염료 700 µl를 가하여 10분간 염색한 후에 염료를 제거하고 3차 증류수로 2회 세척한 다음 DMSO (SigmaAldrich, USA) 700 µl를 가하여 완전히 용해시킨 다음 분광광도계 (SpectraMax 340PC384, Molecular Devices, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생물막 형성 저해율 (%)은 식 (3)을 사용하여 계산하였다.

[0135] 그 결과, 도 16 및 하기 [표 6]에 개시된 바와 같이, *E.coli*에 대해서는 항생물막 효과가 나타나지 않았다.

표 6

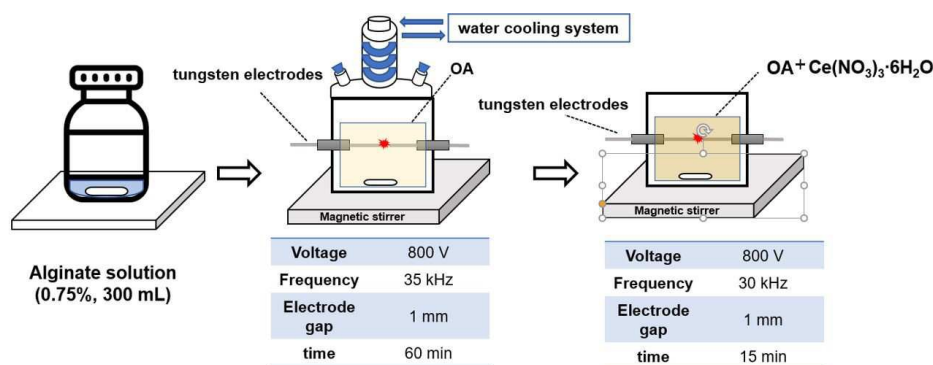
[0136]

	Growth (OD ₆₀₀)	Biofilm formation (%)
Positive Control (P.C)	1.47 ± 0.23	100.0 ± 5.0
0.8% OA/1 mM nCe	1.56 ± 0.14	85.91 ± 14.26
0.8% OA/3 mM nCe	1.37 ± 0.17	95.56 ± 16.73
0.8% OA/5 mM nCe	1.35 ± 0.25	102.91 ± 13.23

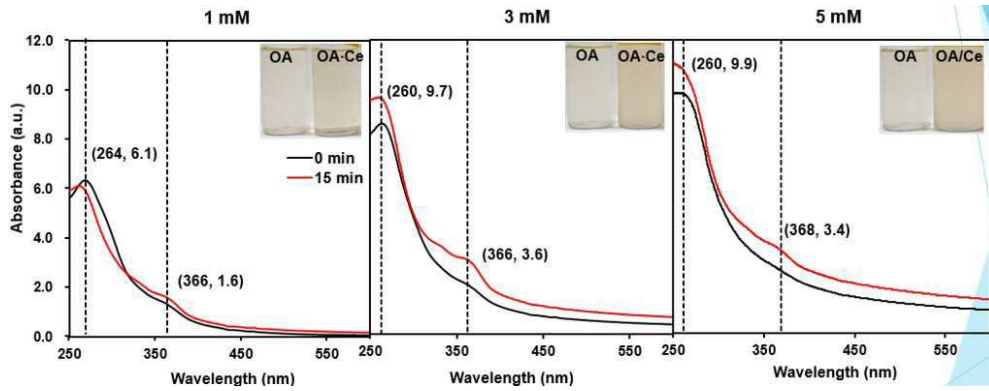
[0137] 이상, 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였지만, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

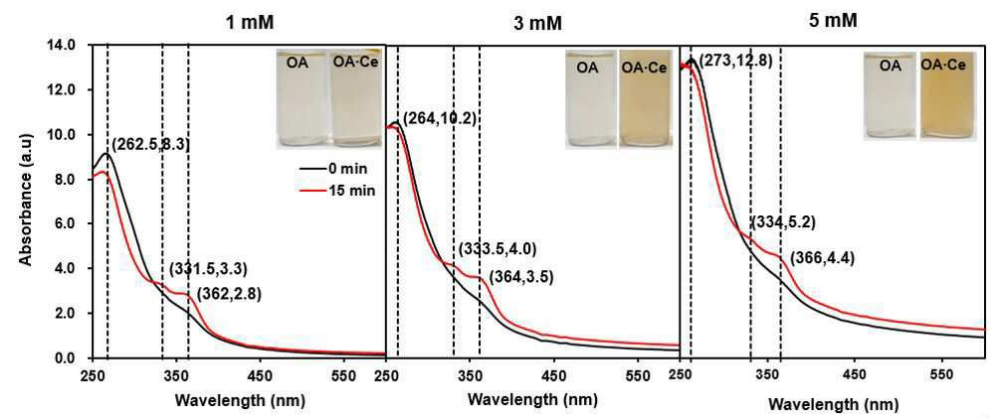
도면1



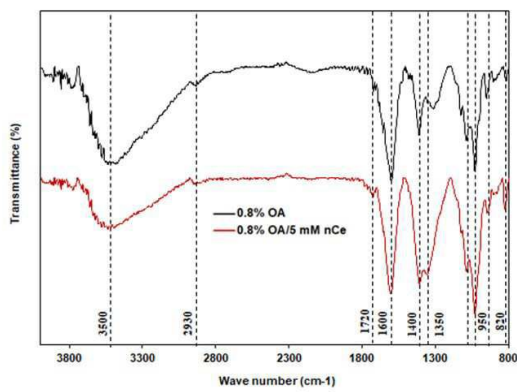
도면2



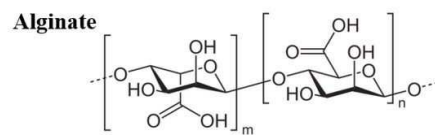
도면3



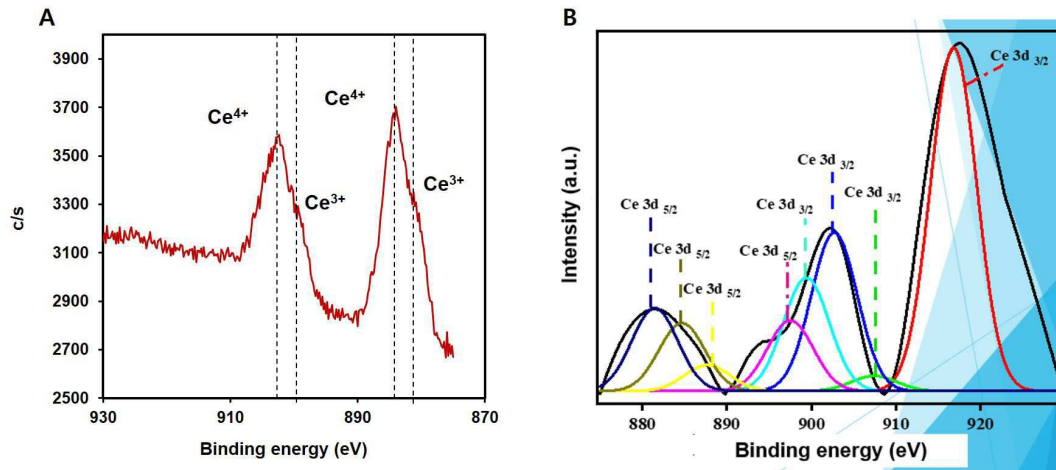
도면4



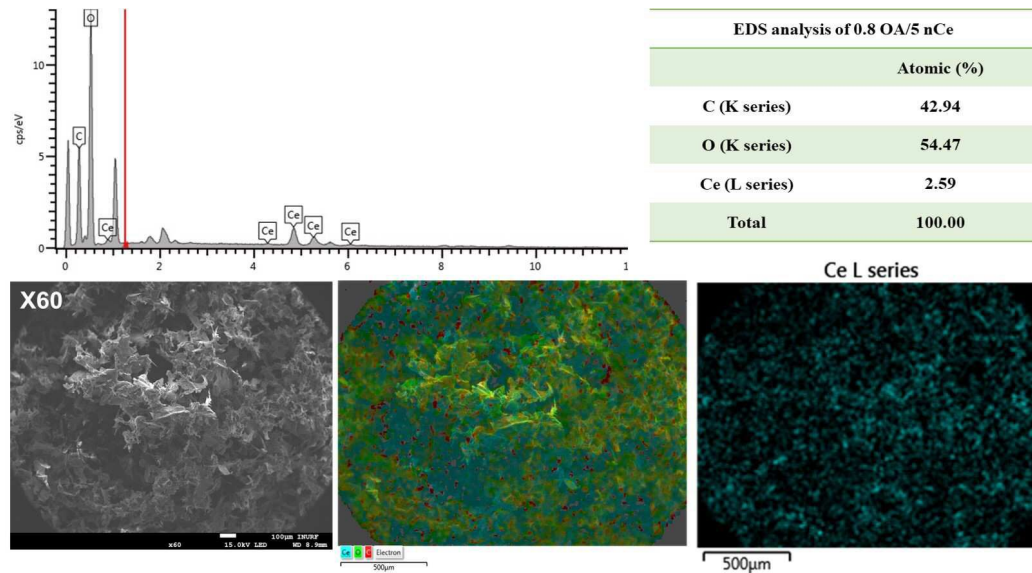
Wave number (cm ⁻¹)	
820 – 950	C-O-C bonds
1350 ~ 1400	C-H bonds
1600	C-C bonds
1720	C=O bonds
2983	C-H bonds
3500	O-H bonds



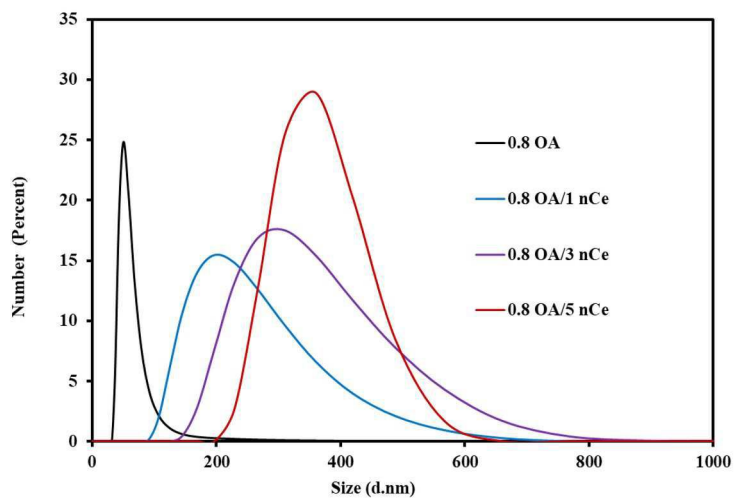
도면5



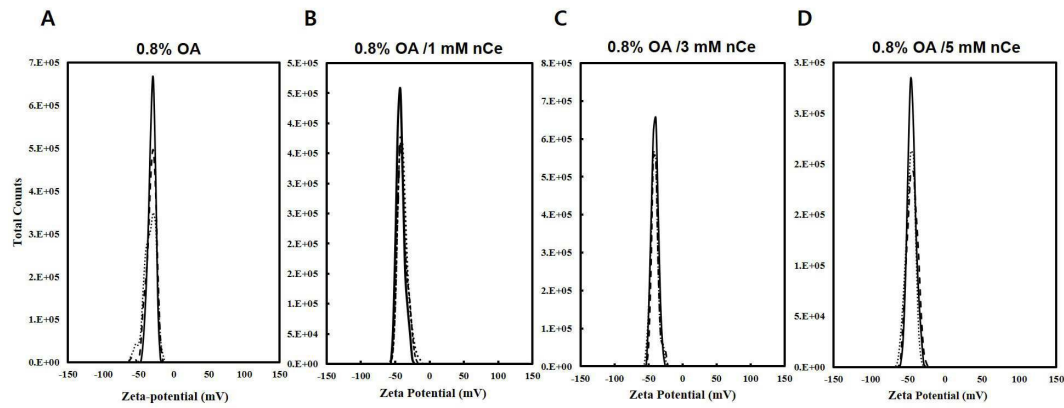
도면6



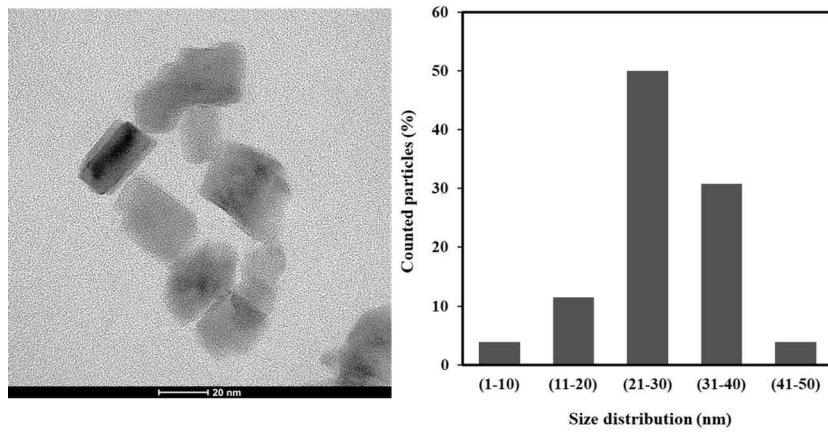
도면7



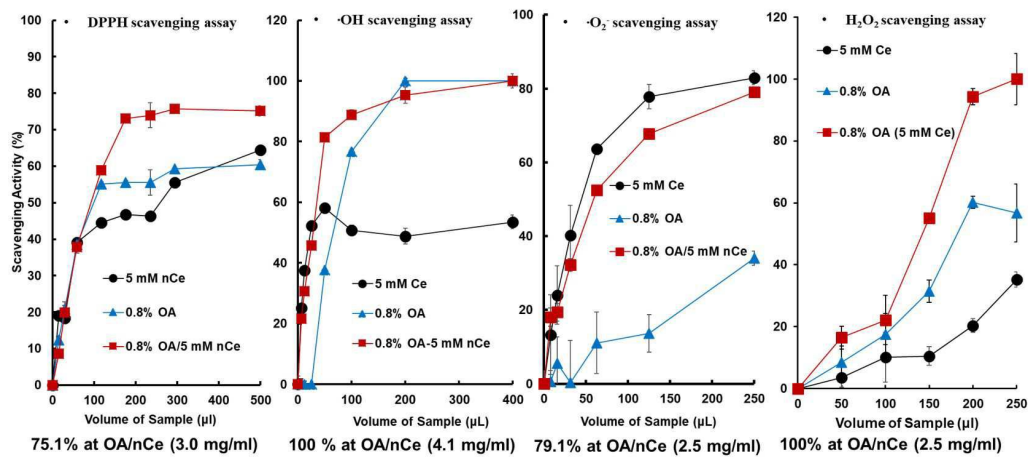
도면8



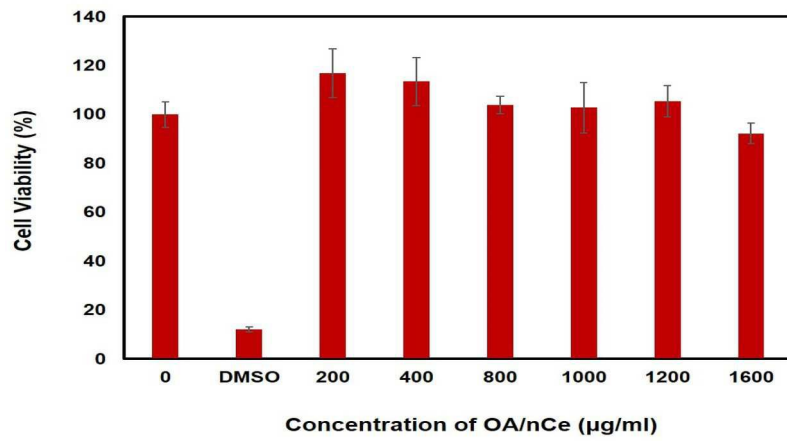
도면9



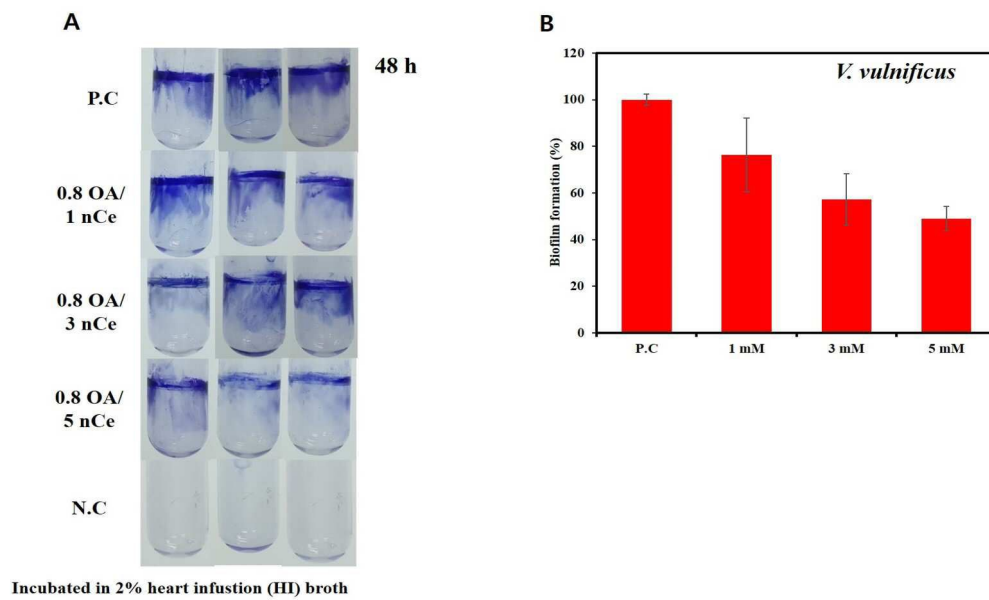
도면10



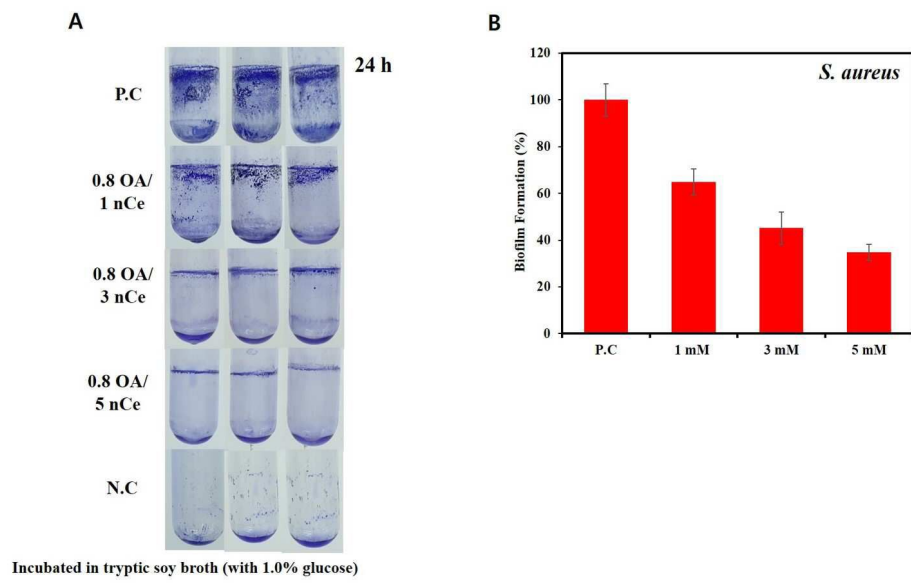
도면11



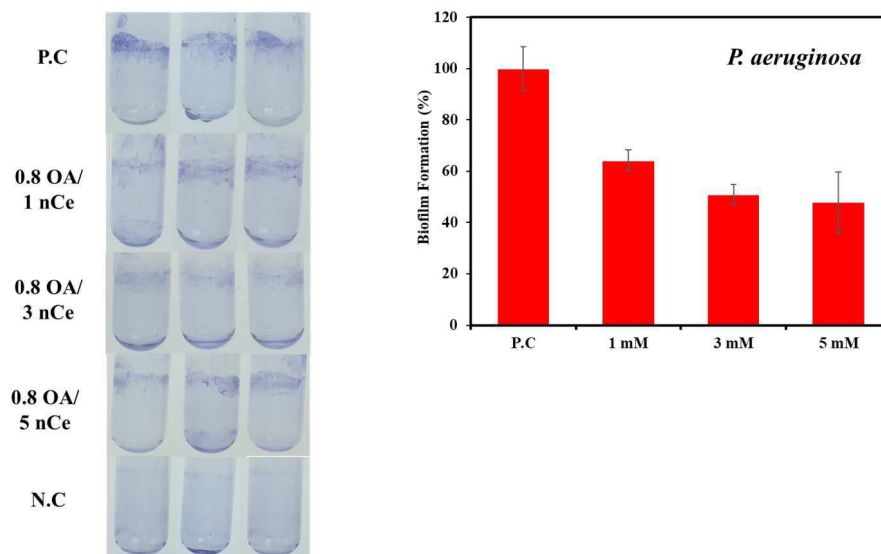
도면12



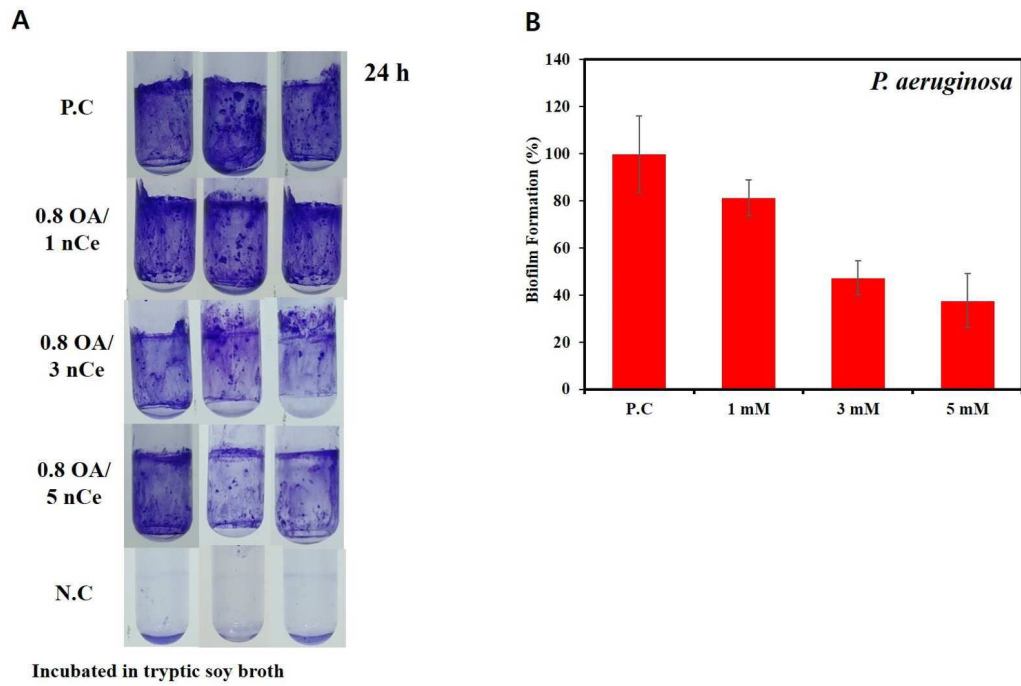
도면13



도면14



도면15



도면16

