(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0040120
(43) 공개일자 2025년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A23L 33/16 (2016.01) *A61K 33/24* (2019.01)
A61K 9/14 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C02F 3/34 (2017.01) *C07K 7/06* (2006.01)
B82Y 5/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0122295
(22) 출원일자 2023년09월14일
심사청구일자 2023년09월14일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
홍순호
울산광역시 남구 굴화4길 20, 112동 601호 (무거동, 굴화주공1차아파트)
강성구
울산광역시 울주군 범서읍 장검길 88, 109동 2301호 (울산 문수산 더샵)
쿠마라벨 아쇼크쿠마르
울산광역시 남구 신복로5번길 15-1, 201호 (무거동)
(74) 대리인
특허법인태백

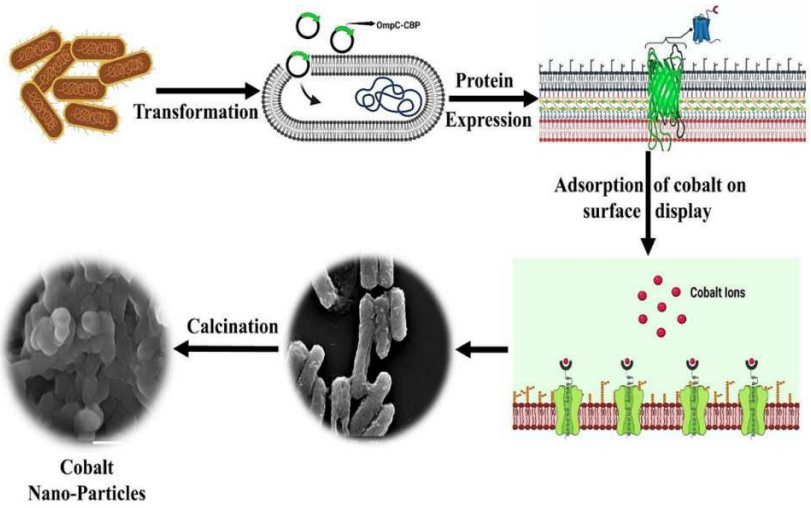
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **세포 표면 디스플레이를 이용한 나노 입자 합성 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 세포 표면 디스플레이를 이용한 나노 입자 합성 및 이의 용도에 관한 것으로, 일부 절단된 OmpC의 C-말단은 대장균의 CSD (cell surface display)에 표시된 두 개의 서로 다른 코발트 결합 펩타이드 (CBP; Co binding peptides)의 결합 특성을 향상시키고 코발트 산화물 나노입자의 합성을 강화하기 위해 코발트 흡착 시스템을 구축하기 위해 이 작업에서 앵커링 모티프로 사용되었고, 많은 분야에서 중요한 실제적 중요성과 상대적으로 생산이 단순하고 항암 요법과 같은 주요 생물학적 용도에 적용 가능할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 33/16 (2016.08)
A61K 33/24 (2022.01)
A61K 9/14 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C02F 3/34 (2013.01)
C07K 7/06 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/1584 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711180394
과제번호 2020R1A2C1008840
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 선택적 리튬흡착 펩타이드 기반의 폐배터리 및 폐수 중 리튬 회수시스템 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415189102
과제번호 P0023727
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술진흥원
연구사업명 중견기업-지역혁신얼라이언스지원
연구과제명 지역 이차전지 중견기업 맞춤형 고급연구인력 양성 플랫폼 구축
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2023.04.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 코발트 흡착 또는 제거용 재조합 발현벡터.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 링커 (linker)로 OmpC (outer membrane protein C)와 결합된 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 링커는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 OmpC (outer membrane protein C)는 C-말단 8번째 루프가 절단된 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

청구항 1에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 미생물은 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 코리네 박테리아, 리스테리아 모노싸이토제네스 및 스트랩코커스로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 7

청구항 1의 재조합 벡터 또는 청구항 5의 형질전환 미생물을 포함하는 코발트 흡착 또는 제거용 조성물.

청구항 8

청구항 1의 재조합 벡터 또는 청구항 5의 형질전환 미생물을 폐수 또는 해수에 처리하는 단계를 포함하는 코발트 흡착 또는 제거방법.

청구항 9

코발트가 결합된 청구항 5의 형질전환 미생물을 포함하는 나노입자 (nanoparticle).

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 나노입자는 400 내지 900 ℃에서 열처리된 것을 특징으로 하는 나노입자 (nanoparticle).

청구항 11

청구항 9의 나노입자를 유효성분으로 포함하는 암 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 암 질환은 유방암, 피부암, 대장암, 간암, 폐암, 혈액암, 육종암 및 뇌암으로 이루어

진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 13

청구항 9의 나노입자를 유효성분으로 포함하는 암 질환 개선 또는 예방용 건강기능식품 조성물.

청구항 14

1) 청구항 5의 재조합 미생물을 8 내지 16시간 배양하는 단계;

2) 상기 1) 단계의 배양 후, 70 내지 90 ℃에서 20 내지 30시간 동안 원심분리하는 단계;

3) 상기 2) 단계의 원심분리 후, -100 내지 -60 ℃에서 동결 건조시키는 단계; 및

4) 상기 3) 단계에서 동결 건조 후, 400 내지 900 ℃에서 열처리하는 단계;를 포함하는 청구항 9의 나노입자 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포 표면 디스플레이를 이용한 나노 입자 합성 및 이의 용도를 제공한다.

배 경 기 술

[0002] d-블록 (d-block) 전이 금속인 코발트는 주로 아크릴 및 세라믹 산업에서 사용된다. 그 구성 성분은 하이드로포르밀화 (hydroformylation), 가스화 (gasification) 및 열분해 반응을 비롯한 다양한 화학 공정에서 전극 촉매로 자주 사용된다. 야금 및 페인트, 배터리, 전기 도금 및 전자 제품과 같이 코발트가 사용되는 여러 산업 분야가 있는데, 배터리 산업에 대한 세계적 수준의 막대한 수요로 인해 코발트 채굴량은 1995-2005년 동안 연간 계속해서 증가하고 있다.

[0003] 코발트 나노입자를 만드는 모든 방법은 물리적, 화학적, 물리화학적 및 생물학적 범주로 나눌 수 있다. 합성은 다양한 솔루션을 요구하는 고유한 문제를 제시한다. 마이크로 에멀젼 기술은 크기, 모양, 입자 크기 분포 및 화학 조성과 같은 특성을 향상시키기 위해 나노 입자를 생성하기 위해 만들어졌다. 많은 마이크로에멀젼 기술의 매개변수를 미세 조정하는 능력은 이러한 기술의 주요 판매 포인트이다. 식물 추출물, 적녹조류 추출물을 사용하여 평균 크기가 80 nm이고 산화된 코발트의 면심 입방정 결정상을 갖는 코발트 나노입자를 제조하였다. 우수한 콜로이드 및 침강 안정성을 가진 나노입자는 미생물학적 과정을 활용하여 대량으로 합성될 수 있다. 구리, 티타늄, 아연, 알긴산염, 금, 마그네슘 및 은 나노입자는 만들어질 수 있는 많은 유형 중 일부에 불과합니다. 리튬이온 배터리, 가스 센서, 자기 저장 장치 및 수퍼 커패시터는 모두 수명이 가장 긴 산화코발트 (Co_3O_4) 단계를 사용한다.

[0004] 코발트 나노입자는 연료 전지, 촉매, 의학, 마이크로 전자 공학, 표적 치료 및 약물 전달을 포함하여 여러 잠재적 응용 분야를 가지고 있다. 코발트 나노구조의 자기 극성은 나노입자를 표적 약물 전달을 위한 운반체로 사용하는 새로운 방법을 가능하게 하기 때문에 중요하다. 크기와 특수한 물리화학적 특징으로 인해 코발트 나노입자는 광범위한 화학물질에 대한 센서로 큰 잠재력을 가지고 있다. 많은 연구가 이미 코발트에 내성이 있는 균주에 초점을 맞추었지만, 산화코발트 나노입자의 미생물 생산에 관한 문헌은 드물어서, 유전적으로 변형된 균주를 활용한 산화코발트 나노입자 생성에 대한 연구가 계속 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 KR 10-1874236(2018.06.27. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 코발트 흡착 또는 제거용 재조합 발현벡터를 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터 또는 상기 형질전환 미생물을 포함하는 코발트 흡착 또는 제거용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터 또는 상기 형질전환 미생물을 폐수 또는 해수에 처리하는 단계를 포함하는 코발트 흡착 또는 제거방법을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 코발트가 결합된 상기 형질전환 미생물을 포함하는 나노입자 (nanoparticle) 및 이의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노입자를 유효성분으로 포함하는 암 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노입자를 유효성분으로 포함하는 암 질환 개선 또는 예방용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 코발트 흡착 또는 제거용 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터 또는 상기 형질전환 미생물을 포함하는 코발트 흡착 또는 제거용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터 또는 상기 형질전환 미생물을 폐수 또는 해수에 처리하는 단계를 포함하는 코발트 흡착 또는 제거방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 코발트가 결합된 상기 형질전환 미생물을 포함하는 나노입자 (nanoparticle)를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 나노입자를 유효성분으로 포함하는 암 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 나노입자를 유효성분으로 포함하는 암 질환 개선 또는 예방용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 1) 상기 재조합 미생물을 8 내지 16시간 배양하는 단계; 2) 상기 1) 단계의 배양 후, 70 내지 90 ℃에서 20 내지 30시간 동안 원심분리하는 단계; 3) 상기 2) 단계의 원심분리 후, -100 내지 -60 ℃에서 동결 건조시키는 단계; 및 4) 상기 3) 단계에서 동결 건조 후, 400 내지 900 ℃에서 열처리하는 단계;를 포함하는 상기 나노입자 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 세포 표면 디스플레이를 이용한 나노 입자 합성 및 이의 용도에 관한 것으로, 일부 절단된 OmpC의 C-말단은 대장균의 CSD (cell surface display)에 표시된 두 개의 서로 다른 코발트 결합 펩타이드 (CBP; Co binding peptides)의 결합 특성을 향상시키고 코발트 산화물 나노입자의 합성을 강화하기 위해 코발트 흡착 시스템을 구축하기 위해 이 작업에서 앵커링 모티프로 사용되었고, 많은 분야에서 중요한 실제적 중요성과 상대적으로 생산이 단순하고 항암 요법과 같은 주요 생물학적 용도에 적용 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 CSD (cell surface display)에 의한 산화코발트 나노입자의 미생물 합성의 개략도를 나타낸다.

도 2는 pBAD30에서 OmpC (outer membrane protein C)와 융합된 코발트 결합 펩티드의 플라스미드 구성을 나타낸다.

도 3은 최상의 펩타이드 디스플레이 환경을 결정하기 위해 pBAD30 (OmpC-CBPs)을 포함하는 균주를 0.01~1% 범위

의 다양한 양의 아라비노스로 유도시켜 확인한 데이터를 나타낸다.

도 4는 농도가 다른 코발트에 대한 CBP (Co binding peptides)의 특이성을 확인한 데이터를 나타낸다.

도 5는 세포 표면에 흡착된 코발트 분석 및 FE-SEM and EDS 데이터를 나타낸다.

도 6은 다양한 온도 (400 ℃, 500 ℃, 600 ℃ 및 700 ℃)에서 코발트의 하소된 샘플을 확인한 데이터를 나타낸다.

도 7은 다양한 온도 (400 ℃, 500 ℃, 600 ℃ 및 700 ℃)에서 하소된 나노입자로부터 Co_3O_4의 항암 평가한 데이터로, 각 선 그래프는 5회 실험의 평균값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0025] 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 코발트 흡착 또는 제거용 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0026] 상기 서열번호 2의 아미노산 서열은 하기와 같다.

[0027] [서열번호 2] : TGEHEAV

[0028] 상기 펩타이드는 링커 (linker)로 OmpC (outer membrane protein C)와 결합될 수 있다.

[0029] 상기 링커는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있다.

[0030] 상기 서열번호 3의 아미노산 서열은 하기와 같다.

[0031] [서열번호 3] : AEAAAKA

[0032] 상기 OmpC (outer membrane protein C)는 C-말단 8번째 루프가 절단된 것일 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, “벡터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA 분자를 의미한다.

[0034] 본 발명에서 있어서, “발현 벡터”는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 앰피실린 (ampicilin), 카나마이신 (kanamycin), G418, 블레오마이신 (Bleomycin), 하이그로마이신 (hygromycin), 클로람페니콜 (chloramphenicol), 아프라마이신 (apramycin)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.

[0035] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.

[0038] 상기 미생물은 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 코리네 박테리아, 리스테리아 모노싸이토제네스 및 스트랩코커스로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 용어 "형질전환"이란, 유전자조작 기법을 사용하여 외부로부터 도입된 핵산을 포함하는 플라스미드 또는 유전체에 의해 숙주세포 (원핵 및 진핵생물, 동물세포 및 식물세포)의 유전형질이 변화되는 현상을 의미하며, 용어 "형질전환체"란 외부로부터 도입된 플라스미드 유전자 또는 유전체 DNA가 세포분열을 반복 하더라도 안정적으로 유전자를 보유하며, 안정적으로 유전자의 발현을 유지하는 세포를 의미한다. 상기 형질전환을 수행

하기 위하여는, 핵산을 유기체, 세포, 조직, 기관 또는 핵산내로 도입하는 어떤 방법도 사용될 수 있고, 바람직하게는 당해 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 효모의 형질전환 방법에는 전기장치를 이용하는 전기충격유전자전달법(electroporation)과 세포벽의 일부를 제거하여 형질전환하는 스페로플라스팅법(spheroplasting) 방법이 널리 사용되나, 특별히 이에 한정되지는 않는다.

[0041] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터 또는 상기 형질전환 미생물을 포함하는 코발트 흡착 또는 제거용 조성물을 제공한다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터 또는 상기 형질전환 미생물을 폐수 또는 해수에 처리하는 단계를 포함하는 코발트 흡착 또는 제거방법을 제공한다.

[0045] 또한, 본 발명은 코발트가 결합된 상기 형질전환 미생물을 포함하는 나노입자 (nanoparticle)를 제공한다.

[0046] 상기 나노입자는 400 내지 900 ℃에서 열처리된 것일 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 상기 나노입자를 유효성분으로 포함하는 암 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0049] 상기 암 질환은 유방암, 피부암, 대장암, 간암, 폐암, 혈액암, 육종암 및 뇌암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0051] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 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, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 투여량이 0.01 mg/kg 내지 200 mg/kg, 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0055] 또한, 본 발명은 상기 나노입자를 유효성분으로 포함하는 암 질환 개선 또는 예방용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0056] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착

색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0057] 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0058] 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0059] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0060] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 유효성분은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명은 1) 상기 재조합 미생물을 8 내지 16시간 배양하는 단계; 2) 상기 1) 단계의 배양 후, 70 내지 90 ℃에서 20 내지 30시간 동안 원심분리하는 단계; 3) 상기 2) 단계의 원심분리 후, -100 내지 -60 ℃에서 동결 건조시키는 단계; 및 4) 상기 3) 단계에서 동결 건조 후, 400 내지 900 ℃에서 열처리하는 단계;를 포함하는 상기 나노입자 제조방법을 제공한다.

[0064] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0066] **[실시예 1] 박테리아 균주 및 배지**

[0067] 박테리아 균주는 대장균 DH5α (Enzynomics)를 사용하였다. 균주는 항생제 (100 mg/L ampicillin)로 처리된 LB 배지 (10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L bacto-yeast extracts, in addition to 10 g/L NaCl)에서 250 rpm의 활발한 진동과 함께 37 ℃에서 성장을 유지했다.

[0069] **[실시예 2] CBPs (Co binding peptides) 결합 CSD (cell surface display)구축**

[0070] 플라스미드를 표시하는 코발트 결합 펩타이드 (CBPs)는 SacI 및 XbaI 제한 효소를 사용하여 pBAD30 플라스미드를 기반으로 구성되었다. 펩타이드는 CSD의 안정성을 위해 추가 링커 (서열번호 3: AEAAAKA)를 사용하여 C-말단 8번째 루프 993rd bp에서 절단된 OmpC에 융합시켰다. CBP는 18aa인 2개의 펩티드 CP (서열번호 1: GMVPSGASTGEHEAVELR)와 CP의 단편인 7aa를 갖는 CF (서열번호 2: TGEHEAV)로 구성되어있었다. 시스템의 발현은 pBAD30 ARA_프로모터의 제어하에 있었다 (도 2).

[0071] 중요한 유전자의 복제본을 더 많이 만들기 위해 펩티드 서열이 있는 올리고뉴클레오티드를 사용했다. 유전자 구성 및 프라이머는 표 1에 나타내었다.

표 1

Strain/Plasmid	Relevant genotype/property	source
***E. coli* strains**		
DH5α	MSDS_CP010_DH5α Chemically Competent *E. coli*	Enzynomics
Plasmids		
pBAD30	Amp^R	NEB[a]
pBADCP	pBAD30 containing OmpC-CBP	This work
pBADCF	pBAD30 containing OmpC-CBF	This work

[a]New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.

[0072]

[0073] PCR은 Expand High Fidelity PCR 및 Gradient PCR 시스템을 갖춘 캘리포니아주 Hercules에 있는 Bio-Rad Laboratories의 T100 Thermal Cycler로 수행되었다. 화학적으로 적격인 대장균 균주인 DH5α는 추가 실험을 수행하기 위해 플라스미드를 사용하여 형질전환되었다.

[0075] **[실시예 3] SDS-PAGE 발현 평가**

[0076] LB 배지를 사용하여 밤새 균주를 성장시킨 다음 배양물을 LB 배지에 100배 희석했다. OD600 (600 나노미터에서의 광학 밀도)이 0.5에 도달하면 0에서 1 %까지 다양한 양의 아라비노스를 배양 배지에 첨가하고 6시간 동안 배양했다. 온도는 더 높은 발현과 흡착을 위해 최적화되었다. SDS-PAGE 연구는 0.05 %의 아라비노스가 더 높은 흡착을 선호하는 더 큰 발현을 가짐을 나타냈다.

[0078] **[실시예 4] 생물 흡착 및 코발트 (Co) 분석의 배치 (Batch) 실험**

[0079] 100 mg/L 암피실린이 풍부한 LB 배지를 밤새 사용하여 37 ℃에서 pBAD30을 포함하는 재조합 균주를 생산했다. 전날 밤 배양액을 새 LB 배지에 100배 희석하고 광학 밀도 또는 OD600이 0.5에 도달할 때까지 성장시켰다. 0.05 % 아라비노스는 세포에 보조적이었고, 균주는 6시간 동안 30 ℃에서 유지되었다. 이어서 균주를 원심분리하고 코발트 금속 클로라이드 (cobalt metal chloride) 0.25 mM 내지 2 mM의 농도로 2시간 동안 30 ℃, 250 rpm으로 인큐베이션하였다. 세포 표면에 결합된 Co를 회수하기 위해 진탕기에서 30 ℃, 250 rpm에서 30분 동안 0.1 M HCl로 처리하기 전에 분리물을 0.85 %(w/v) 식염수로 두 번 헹구었다. 예측된 오염 물질을 사용하여 펩티드의 선택성을 테스트했다. 의도적으로 오염된 폐수에서 발견된 각 원소 (망간, 코발트 및 니켈)의 농도는 0.25 mM ~ 2 mM이었다. LB 배지에 사용된 금속은 동일한 방법을 사용하여 회수되었다. ICP-OES (Agilent Technologies)를 사용하여 대장균 DH5α를 대조군으로 포함한 가장 정밀한 재조합 균주의 흡착을 조사했다.

[0081] **[실시예 5] 코발트 나노입자의 특성 평가**

[0082] 코발트는 다양한 온도 (400 ℃, 500 ℃, 600 ℃ 및 700 ℃)에서 하소 과정을 통해 생체흡착을 수행하여 회수하였다. 하소 과정은 아라비노스로 유도된 세포에서 금속 염화물 용액을 12시간 동안 배양한 후 시작되었다. 그런 다음 세포를 유도된 코발트와 함께 80 ℃에서 24시간 동안 수조 후 금속 결합된 CBPs 세포 펠렛을 수집하기 위해 원심분리를 진행했다. 펠릿은 -80 ℃에서 동결 건조된 후 다른 온도의 용광로에서 소성되었다. 그런 다음 머플로에 의해 소성된 산화물 샘플을 XRD, FE-SEM, EDS, FTIR 및 라만 분광법과 같은 다양한 특성화 실험을 사용하여 분석했다.

[0084] **[실험예 1] 코발트 결합 도메인의 전산 모델링**

[0085] 이전에는 펩타이드 CP (GMVPSGASTGEHEAVELR)가 1 mM 농도의 염화코발트 ($CoCl_2$)에서 ≥1000 μmol/g DCW의 Co 흡착을 보였다고 보고되었다. 코발트 결합 코어를 파악하기 위해 컴퓨터 모델링을 수행했다. 코발트에 대한 더 큰 흡착 친화성을 위해 펩타이드 CP를 해부하는 다음 실험으로 생물정보학 기구를 사용하였다. 펩타이드 C와 그 단편 펩타이드 CF (코발트 조각)(TGEHEAV)에 대해 더 알아보기 위해 정교한 실험을 사용했다.

[0087] **[실험예 2] 코발트 결합 펩타이드 디스플레이 시스템 구축**

[0088] OmpC를 앵커링 모티프로 사용하여 세포막 외부에 코발트 결합 펩타이드 (CP & CF)를 표시함으로써 재조합 대장균에서 코발트를 회수할 수 있었다. CBP와 Truncated OmpC를 결합하여 993 bp에서 계획을 수행했다. 아라비노스 프로모터는 만들어진 pBAD30-OmpC-CP 및 pBAD30-OmpC-CF 플라스미드를 제어했다. 대부분의 경우, 이종 단백질이 대장균에서 발현될 때 메타볼릭 라이어빌리티 (metabolic liability)를 유발하는데, 이것은 재조합 플라스미드의 단백질 발현, 세포 성장 및 안정성이 모두 감소됨을 의미하고, 성장과 발현을 위한 최적의 조건을 찾는 것이 중요했다.

[0090] **[실험예 3] Co 흡착 조건의 최적화**

[0091] 가능한 최상의 펩타이드 디스플레이를 초래하는 환경을 결정하기 위해 pBAD30 (OmpC-CBPs)을 포함하는 균주를 0.01~1 % 범위의 다양한 양의 아라비노스로 유도하는 것이 필요했다. SDS-PAGE를 사용하여 4개의 CBP 각각에 존재하는 단백질의 양을 분석했다. OmpC-CBP의 크기는 대략 37 kDa에 해당했다. 온도가 OmpC의 발현에 상당한 영향을 미치기 때문에, 4개의 별개의 재조합 균주가 다양한 온도에서 확인했다. 30 ℃의 온도에서 발현은 두 균주 모두 눈에 띄게 높았다. pBAD30 (OmpC-CBPs)의 발현은 30 ℃의 온도 (도 3B)와 6시간 동안 사용된 0.05 %의 아라비노스 농도에서 가장 잘 달성되었다 (도 3A 및 도 3C).

[0092] 재조합 펩타이드 Ompc-CBPs를 발현시킨 후 원심분리를 이용하여 세포를 추출하였다. 코발트 회수 시험을 위해 세포를 증류수로 헹구었다. 코발트 회수는 온도가 30 ℃이고 노출 시간이 30분일 때 가장 잘 달성되었다. 세포를 사용하여 pH 7에서 다양한 양의 $CoCl_2$ 용액 (0.25mM-2mM)에서 코발트를 추출할 수 있었다. 또한 ICP-OES를 사용하여 펩타이드의 특이성을 조사했다. 1 mM에서 Co의 최대 흡착은 각각 플라스미드 pBAD-CBP-CP 및 pBAD-CBP-CF를 포함하는 균주에 대해 ~910 μmol/g DCW 및 ~1360 μmol/g DCW였다 (도 3D). 중간 농도가 0.25 mM에서 2 mM로 증가함에 따라 공동 흡착이 향상되었다. 데이터는 OmpC-CF가 Co에 대해 가장 높은 흡착 용량을 가짐을 나타냈다. 특히, OmpC-CP는 OmpC-CF로 알려진 조각으로 부서졌다. 재조합 플라스미드가 없으면 야생형 대장균 DH5α는 펩타이드가 표시된 세포보다 흡착률이 낮았다.

[0094] **[실험예 4] 선택성 분석**

[0095] 폐수 오염 물질 (Co, Ni, Mn 및 Li)에서 0.25 mM에서 2 mM 범위의 농도로 금속으로 오염된 폐수에서 재조합 균주의 환경 적용 가능성 및 펩타이드의 선택성을 평가했다. 두 재조합 균주 모두 다음 순서로 CBP에 대한 금속 선택성을 나타냈다: Co > Ni > Mn > Li. 리튬은 세포나 펩타이드에 영향을 미치지 않았기 때문에 데이터에 포함되지 않았다. 이 특이성 조사에서 CBP-CF는 다른 금속 이온보다 코발트에 대해 더 큰 흡착 용량과 특이성을 갖는 것으로 밝혀졌다. Ni에 대한 친화력이 낮고 Mn에 대한 친화력이 거의 없는 CBP-CF와 달리 데이터는 CBP-CP가 Mn 및 Ni에 대해 약간의 선호도를 가지며, Co가 그 뒤를 따른다는 것을 확인했다. 따라서 CBP-CF는 코발트에 매우 특이적인 것을 확인했다 (도 4A 및 도 4B).

[0097] **[실험예 5] 세포 표면에 흡착된 코발트 분석**

[0098] pBAD30-OmpC-CF 플라스미드를 포함하는 재조합 균주는 각각 흡착된 금속 원소 및 구조 결정의 육안 검사를 위해 Co 흡착 후 EDS 및 FE-SEM로 조사하였다. 흡착된 후 세포를 검사하기 위해 세포를 헹구고 동결건조하여 FE-SEM 연구에 사용했다 (도 5A). FE-SEM 후, EDS 평가는 균주에서 코발트의 징후를 나타냈다. 고용량의 1 mM 코발트

용액으로 코발트를 회수한 후 재조합 대장균 (OmpC-CBPs)의 표면에서 나노입자가 검출되었다. 이것은 FE-SEM 및 EDS의 놀라운 발견으로, 코발트 나노입자의 크기가 30~60 nm 범위이고 주로 세포벽에 부착되어 있음을 확인했다. 코발트 결합 부위가 결여된 야생형 대장균 DH5α의 세포벽은 나노입자를 생성하지 않았다. 그러나 재조합 대장균의 FE-SEM 스캔은 재조합 박테리아에서 빛나는 코발트 염 나노입자를 보여줬다. 코발트 회수 조사에 따르면, 재조합 대장균의 세포벽은 표면에 코발트 이온에 대한 여러 결합부위를 가지고 있었고, 세포벽에 연결된 나노입자가 다수 발견되었다. 이는 나노입자가 세포벽의 상피세포 광물화를 통해 생성되었음을 알 수 있었다. 세포벽의 이온은 반응하여 무기 화합물을 형성하며, 이는 용액에서 침전되었다. 세포벽에는 작은 영역에 고농도의 금속 이온을 만드는 결합 부위가 있었다. 이러한 작은 영역은 국부적으로 이온을 축적하고 높은 표면 범위 수준을 높여 이온 클러스터를 악화시켜 세포벽에 형성되는 고체 나노입자를 형성할 수 있음을 알 수 있었다.

[0099] FE-SEM은 코발트 용액 (0.25mM-2mM)으로 코발트 회수 후 재조합 대장균의 표면 지형을 보기 위해 사용되었다. 다만, 0.25 mM에서 볼 수 있는 나노입자가 만들어지는 위치를 찾기가 어렵웠다. 그러나 세포에 고농도 (1 mM 이상)의 용액을 처리하면 세포 표면에 나노입자가 나타났다. 코발트 농도를 높이면 더 많은 나노입자가 세포벽에 달라붙게 되는 것을 확인했다. 세포 표면에 달라붙는 코발트의 양은 용액에 함유된 코발트의 양과 밀접한 관련이 있는 것을 확인했다. 용액에 더 많은 코발트 이온이 있을 때 재조합 세포도 더 많은 코발트 이온을 보유하는 것을 확인했다. 이 때문에 코발트 이온의 수가 증가하면 나노입자가 더 쉽게 형성될 수 있었다.

[0101] **[실험예 6] 코발트 나노입자의 특성화**

[0102] OmpC-CF에서 회수된 코발트 이온은 회수된 금속을 특성화하고, 특성을 확인하기 위해 별도의 열처리 (400 ℃, 500 ℃, 600 ℃ 및 700 ℃)에서 머플 가열 시스템으로 처리했다. 샘플은 더 높은 온도에서 산화물로 변했다. 산화물 나노입자를 회수하여 다른 온도에서 처리하고 FE-SEM, EDS, XRD, FTIR 및 라만 분광법으로 분석했다.

[0103] (1) FE-SEM 및 EDS

[0104] 주사 전자 현미경 (FE-SEM)은 산화된 사물의 모양을 설명하고 연구하는 데 사용된다. SEM을 사용하여 만들어진 분말의 모양이나 형태를 찾았다. 코발트 침전 입자는 다양한 크기와 모양으로 구성되어 있으며 모이면 구형의 공처럼 보였다. 대부분의 입자는 거의 둥글고 크기가 60~150 nm였다 (도 5B).

[0105] 이 그룹 중 일부는 매우 크고 작은 입자가 많이 모여 있는 반면, 다른 그룹은 작은 그룹이었다. 입자의 배열이 빡빡하더라도 제품의 모든 그룹에 틈과 작은 구멍이 있었다. 이것은 제품이 나노입자와 미세입자로 구성되어 있어 패턴이 고르지 않게 보인다는 것을 확인했다. SEM 사진은 또한 Co_3O_4 샘플의 다공성을 보기 위해 사용되었다. 샘플의 깊은 벌크에서 표면까지 입자 배열에 공극이 있는 것으로 보이며 형태는 고르지 않은 나노 입자 배열이었다. 많은 입자가 큰 응집체에서 분리되므로 수집된 하소 샘플은 나노 및 마이크로 크기의 입자를 캡슐화했다. 이 입자들은 외부에서 내부로 가는 모양을 가지고 있었고, 이것은 두께가 몇 마이크로미터에 불과하고 입자 사이에 충분한 공간이 있는 미세 구조를 생성했다.

[0106] 500 ℃에서 열처리된 나노입자 샘플의 EDS 스펙트럼은 (도 5B)에 나와 있었다. EDS 스펙트럼은 합성된 Co_3O_4 샘플이 대부분 Co 및 O 성분으로 구성되어 있음을 보여줬다. O의 첫 번째 스펙트럼 펙은 0.5 keV에서, Co는 6.931 keV에서 Co $K_{\alpha 1}$에서, Co $K_{\beta 1}$에서는 7.649 keV에서 나타냈다. Co_3O_4의 이론적 값에 해당하는 약 3/3.97의 Co/O 원자 비율로 제품에 코발트와 산소 원소가 존재했다. 사진은 Co_3O_4 나노입자의 순도가 매우 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0108] (2) XRD (X-ray Diffraction)

[0109] Xpert 3 모델 및 Cu Kα 방사선과 함께 X선 회절(XRD) 사용 (지름 = 1.54 A°) 결정 구조는 (2Θ) 10 ° 내지 90 ° 범위에서 분류되었다. 도 6A는 코발트 산화물 필름이 다결정 (polycrystalline)임을 보여줬다. Co_3O_4 샘플 (400 ℃, 500 ℃, 600 ℃ 및 700 ℃)은 31.4, 36.8, 38.3, 44.9, 59.3 및 65.3에서 전형적인 회절 피크를 나타내며, 이는 각각 3차원 스피넬 Co_3O_4 상의 220, 311, 222, 400, 511 및 440 결정 구조에 해당하며, 결정형 Co_3O_4의 생성을 의미하는 것을 알 수 있었다.

[0111] (3) FT-IR 분광법

[0112] 별개의 온도에서 하소된 입자는 산화된 코발트 나노입자의 작용기의 이동을 설명하기 위해 FT-IR로 실험했다 (도 6B). 흡수된 물 분자의 각도 왜곡은 1623 cm^{-1}의 밴드와 연결되어 있었다. C-O 신축 진동은 1023 cm^{-1}에서 피크를 발생시켰다. 2371 cm^{-1}에서 피크는 금속 산화물의 열 어닐링 동안 공기로부터 받은 CO_2의 불규칙한 진동 (C=O) 때문이었다. 모든 산화물 샘플의 FTIR 스펙트럼은 순수한 코발트 산화물 (pure cobalt oxide; PCO)과 동일한 독특한 피크를 가지며, 이는 유사한 화학적 결합 특성을 나타냈다. 566 cm^{-1} 및 665 cm^{-1}의 작은 밴드는 Co_3O_4 스피넬 매트릭스에서 각각 OB3 (B - Co^{3+}in an octahedral site) 및 ABO (A-Co^{2+}in a tetrahedral site) 진동임을 확인했다.

[0114] (4) 라만 분광법

[0115] 라만 분광법을 이용하여 산화된 코발트의 특성을 조사하였다. 이 접근법은 산화된 코발트 나노입자의 형태학적 및 구조적 변화에 민감하여 촉매 조성을 결정하는 데 유용하다 (도 6C). Co_3O_4 스피넬은 스펙트럼이 466 cm^{-1}, 508 cm^{-1} 및 672 cm^{-1}에서 세 개의 뚜렷한 피크를 가지므로 발견되었다. F2g 라만 진동 모드는 508 cm^{-1}의 피크에 기인한 반면, Eg 진동 및 A1g 진동 모드는 각각 466 cm^{-1} 및 672 cm^{-1}의 피크에 할당되었다. 1350 cm^{-1}의 작은 피크는 D 밴드에 속했다. D 밴드는 k-point phonons의 A1g 대칭 모드에 할당되었다.

[0117] **[실험예 7] 나노입자의 항암성 평가**

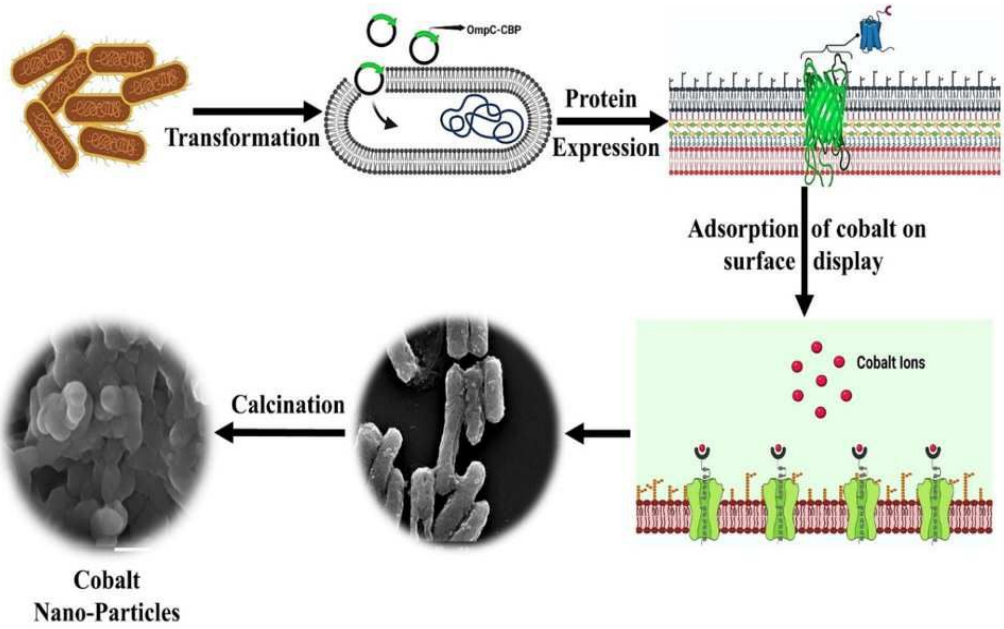
[0118] 400 ℃, 500 ℃, 600 ℃ 및 700 ℃)에서 하소에 의해 OmpC-CF로부터 합성된 코발트 산화물 나노입자는 세포독성에 대해 MTT 분석에 의해 조사되었다. 먼저, 100 μl 성장 배지에서 4T1 종양 (삼중 음성 마우스 유방암 세포주)의 $1x10^4$ 세포/well로 96-웰 플레이트에서 배양하고, Co_3O_4 나노입자를 농도별로 처리했다 (0.78125 μg/ml, 1.5625 μg/ml, 3.125 μg/ml, 3.125 ㎍/ml, 6.25㎍/ml, 12.5㎍/ml, 25㎍/ml, 50㎍/ml 및 100㎍/ml). 처리된 세포를 37 ℃, 5% CO_2에서 하루 동안 배양하였다. IC_{50}(억제 농도)은 처리되지 않은 세포와 처리된 세포 간의 생존력 차이를 기반으로 계산되었다. 양성 대조군의 생존율은 ~98%였다. 세포 증식은 400 ℃에서 열처리된 샘플로 Co_3O_4에 의해 (~70% - ~75%) 억제되었다 (도 7). 700 ℃에서 하소된 산화코발트는 100 ㎍/ml에서도 60 %의 생존율을 보였으나, 낮은 농도에서는 거의 100에 가까운 높은 평균 증식률을 보였다. 600 ℃에서 용광로 처리한 샘플은 낮은 농도의 Co_3O_4에서 100 %의 더 높은 생존율을 보여주고 높은 농도 (100 ㎍/ml)의 Co_3O_4에서는 2 %의 세포사멸률을 나타냈다. 500 ℃에서 용광로 처리된 CBPs 세포에서 회수된 코발트는 진행성 세포 사멸 결과가 세포 독성에 유리함을 보여줬다. 0.78125 μg의 낮은 억제 농도에서 80 %의 증식률은 다른 샘플이 59 μg/ml의 IC_{50}으로 달성하지 못한 100 μg에서 증식률의 35 %로 점차 감소했다. IC_{50}을 달성하려면 400 ℃는 최대 670 μg/ml, 600 ℃는 최대 116 μg/ml, 700 ℃는 최대 110 μg/ml가 필요했다. 따라서, 500 ℃에서 합성된 샘플은 다른 모든 샘플에 비해 암세포 독성의 성질을 가지고 있음을 확인했다.

[0120] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

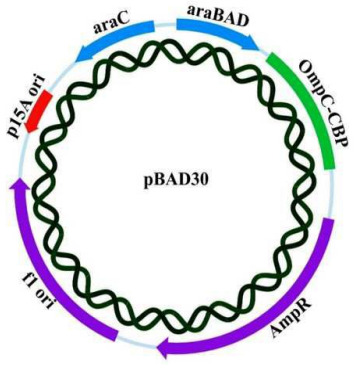
[0121] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

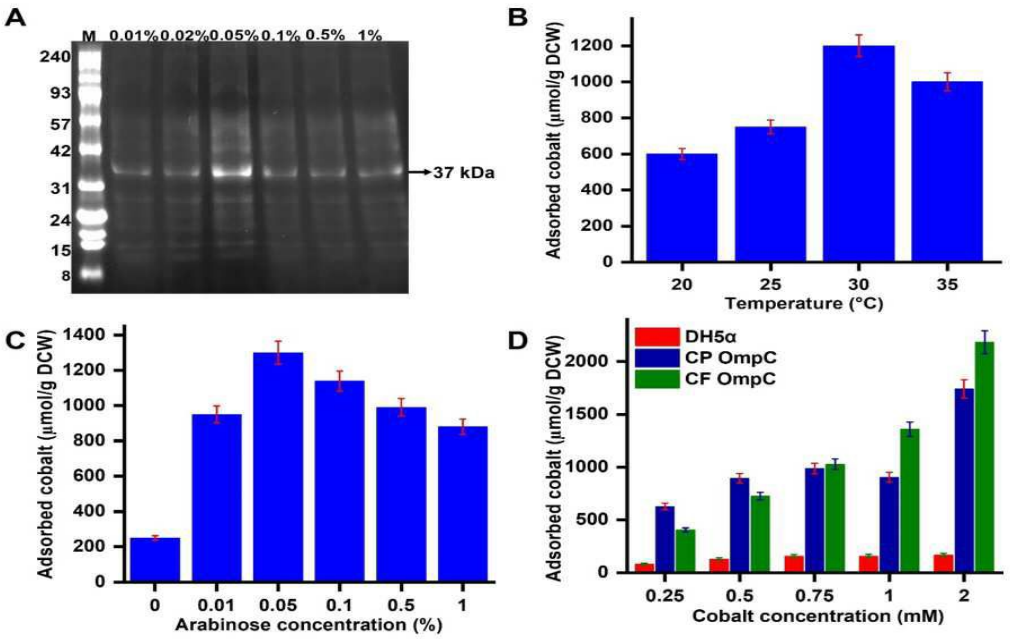
도면1


OmpC-CBP
Transformation
Protein
Expression
Adsorption of cobalt on surface display
Cobalt Ions
Calcination
Cobalt
Nano-Particles

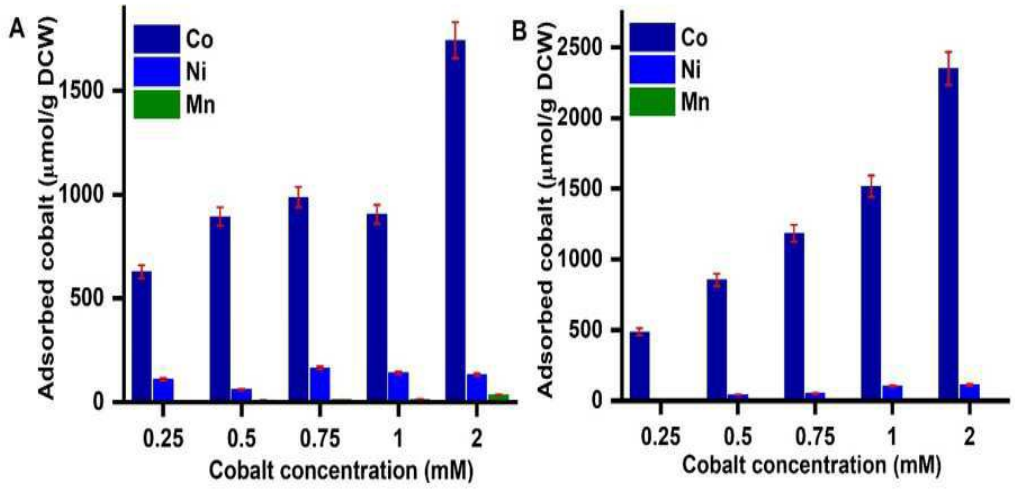
도면2


araC
araBAD
OmpC-CBP
p15A ori
pBAD30
f1 ori
AmpR

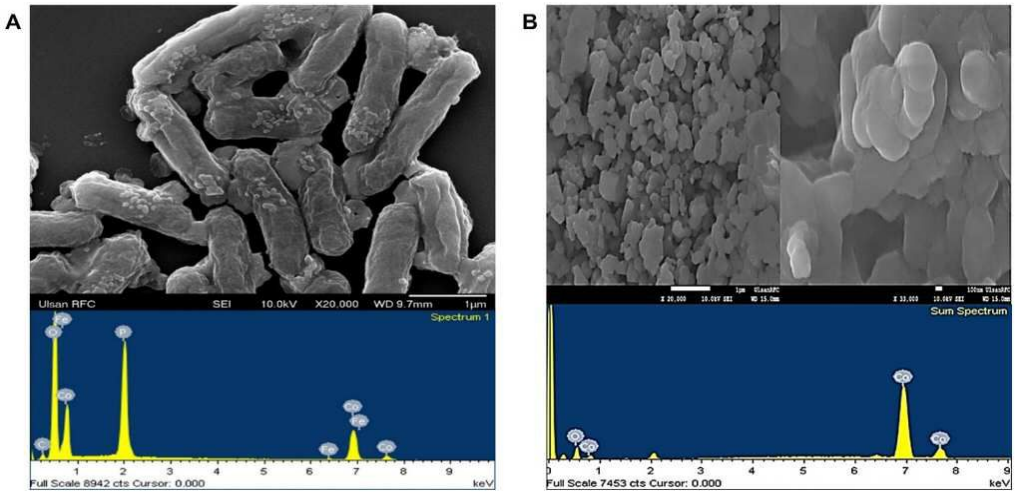
도면3


A
M 0.01% 0.02% 0.05% 0.1% 0.5% 1%
240
93
57
42
31
24
15
8
37 kDa
B
Adsorbed cobalt (μmol/g DCW)
Temperature (°C)
C
Arabinose concentration (%)
D
DH5α
CP OmpC
CF OmpC
Cobalt concentration (mM)

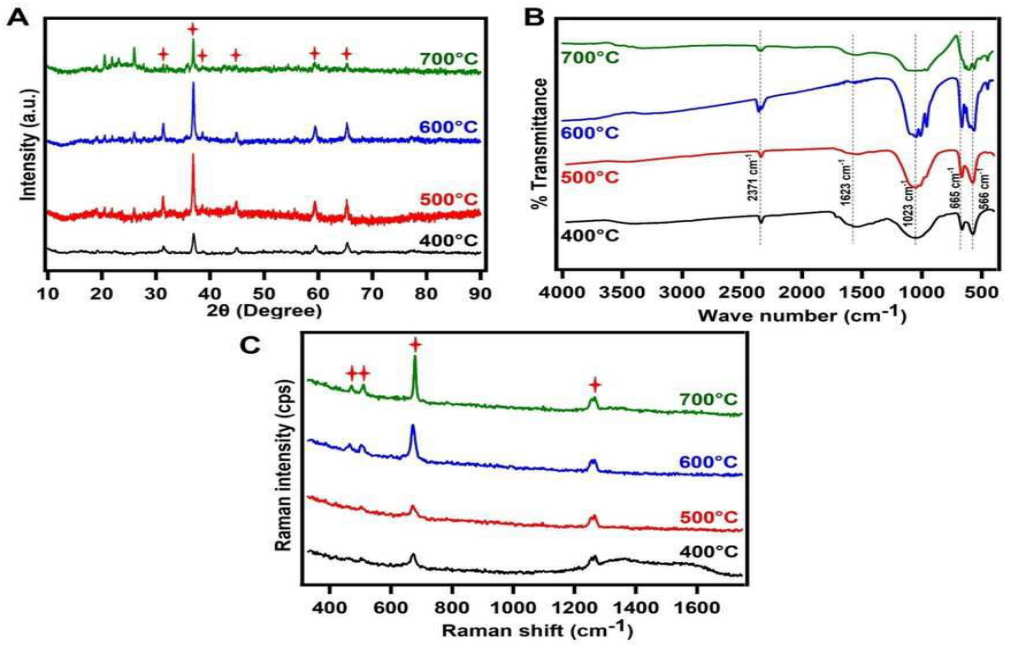
도면4


A
Co
Ni
Mn
Adsorbed cobalt (μmol/g DCW)
Cobalt concentration (mM)
B

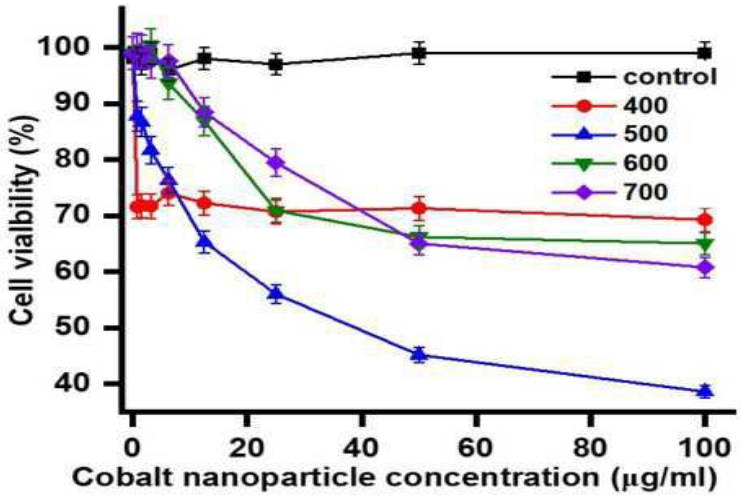
도면5


A
Ulsan RFC SEI 10.0kV X20.000 WD 9.7mm 1μm
Spectrum 1
Full Scale 8942 cts Cursor: 0.000
keV
B
Sum Spectrum
Full Scale 7453 cts Cursor: 0.000
keV

도면6


A
Intensity (a.u.)
700°C
600°C
500°C
400°C
2θ (Degree)
B
% Transmittance
700°C
600°C
500°C
400°C
2371 cm-1
1623 cm-1
1023 cm-1
665 cm-1
566 cm-1
Wave number (cm-1)
C
Raman intensity (cps)
700°C
600°C
500°C
400°C
Raman shift (cm-1)

도면7


100
90
80
70
60
50
40
Cell viability (%)
0
20
40
60
80
100
Cobalt nanoparticle concentration (μg/ml)
control
400
500
600
700

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.