(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0044599
(43) 공개일자 2021년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09K 5/20 (2006.01) *A01N 1/02* (2006.01)
A23L 3/37 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C09K 5/20 (2013.01)
A01N 1/0221 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0127972
(22) 출원일자 2019년10월15일
심사청구일자 2019년10월15일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이승우
서울특별시 중랑구 숙선옹주로 6-9, 101동 1101호(묵동, 묵동자이아파트1단지)
안동준
서울특별시 서초구 효령로68길 81, 102동 403호(서초동, 서초자이아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리체

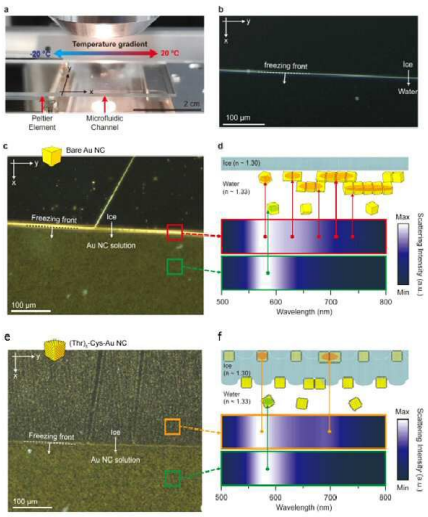
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **펩티드가 결합된 금 나노입자를 포함하는 항-동결 조성물**

(57) 요 약

발명은 얼음 결정의 하나 이상의 면과 면 접촉이 가능한 하나 이상의 면을 포함하는 코어, 상기 코어의 하나 이상의 면에 결합되고 $(Thr)_n$-, $(Ala)_n$-, $(Ser)_n$-, 또는 $(Gly)_n$-을 포함하는 올리고펩티드를 포함하고, 물에서 콜로이드 형태로 존재할 수 있는, 결빙 제어용 다면체 형상의 나노 구조체에 관한 것으로, 상기 n은 2 내지 7의 정수이다.

대 표 도 - 도11



(52) CPC특허분류
A23L 3/37 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/206 (2013.01)
(72) 발명자
임동권
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 112동 202호
이재원
서울특별시 성북구 고려대로 39, 402호 (안암동2가)
이상엽
서울특별시 양천구 목동중앙북로 38, 목동롯데캐슬위너아파트 109동 1305호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017M3D1A1039421
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	미래소재 디스커버리 사업
연구과제명	DNA 기반 결빙제어소재 개발 및 평가 (1세부)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

얼음 결정의 하나 이상의 면과 평면 접촉이 가능한 하나 이상의 평면을 포함하는 코어; 및 상기 코어의 하나 이상의 평면에 결합되어 있고 $(Thr)_n$-, $(Ala)_n$-, $(Ser)_n$-, 또는 $(Gly)_n$-을 포함하는 올리고펩티드를 포함하는 나노 구조체로서, 상기 나노 구조체는 물에서 콜로이드 형태로 존재할 수 있는, 결빙 제어용 다면체 형상의 나노 구조체: 상기 n은 2 내지 7의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 코어는 사면체, 깎은 사면체, 육면체, 깎은 육면체, 팔면체, 깎은 팔면체, 십면체, 십이면체, 이십면체, 사육면체, 육팔면체, 또는 마름모십이면체인, 나노 구조체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 코어는 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt), 팔라듐(Pd), 알루미늄(Al), 구리(Cu), 산화철(Fe_3O_4), 또는 이산화규소(SiO_2), 또는 이들 중 적어도 2가지를 포함하는 합금으로 제조된, 나노 구조체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 코어는 금(Au), 백금(Pt), 철(Fe), 산화철(Fe_3O_4), 규소(Si), 또는 이산화규소(SiO_2), 또는 이들 중 적어도 2가지를 포함하는 합금으로 제조된, 나노 구조체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 n은 3 내지 6인, 나노 구조체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 올리고펩티드는 $(Thr)_n$-, 또는 $(Ala)_n$-을 포함하는, 나노 구조체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 코어의 직경은 50 nm 내지 100 nm인, 나노 구조체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 평면에는 nm^2 당 0.07 내지 0.25개의 올리고펩티드가 결합된, 나노 구조체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 코어는 육면체, 또는 팔면체인, 나노 구조체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 코어는 금(Au)인, 나노 구조체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 n은 5인, 나노 구조체.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 평면에는 nm^2 당 0.1 내지 0.2개의 올리고펩티드가 결합된, 나노 구조체.

청구항 13

제1항에 있어서, 얼음의 재결정화를 억제하여 결빙을 제어하는, 나노 구조체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 나노 구조체를 포함하는, 결빙 제어용 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 나노 구조체를 포함하는, 세포 동결용 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 나노 구조체를 포함하는, 식품 동결용 조성물.

청구항 17

얼음 결정의 하나 이상의 면과 평면 접촉이 가능한 하나 이상의 평면을 포함하는 코어; 및 상기 코어의 하나 이상의 평면에 결합되어 있고 $(Thr)_n$-, $(Ala)_n$-, $(Ser)_n$-, 또는 $(Gly)_n$-을 포함하는 올리고펩티드를 포함하고, 물에서 콜로이드 형태로 존재할 수 있는, 결빙 제어용 다면체 형상의 나노 구조체를 용매에 첨가하는 단계를 포함하는, 결빙 제어 방법: 상기 n은 2 내지 7의 정수이다.

청구항 18

얼음 결정의 하나 이상의 면과 평면 접촉이 가능한 하나 이상의 평면을 포함하는 코어; 및 상기 코어의 하나 이상의 평면에 결합되어 있고 $(Thr)_n$-, $(Ala)_n$-, $(Ser)_n$-, 또는 $(Gly)_n$-을 포함하는 올리고펩티드를 포함하고, 물에서 콜로이드 형태로 존재할 수 있는, 결빙 제어용 다면체 형상의 나노 구조체를 세포를 포함하는 용액에 첨가하는 단계를 포함하는, 세포 동결 보존 방법: 상기 n은 2 내지 7의 정수이다.

청구항 19

얼음 결정의 하나 이상의 면과 평면 접촉이 가능한 하나 이상의 평면을 포함하는 코어; 및 상기 코어의 하나 이상의 평면에 결합되어 있고 $(Thr)_n$-, $(Ala)_n$-, $(Ser)_n$-, 또는 $(Gly)_n$-을 포함하는 올리고펩티드를 포함하고, 물에서 콜로이드 형태로 존재할 수 있는, 결빙 제어용 다면체 형상의 나노 구조체를 식품에 처리하는 단계를 포함하는, 식품 동결 보존 방법: 상기 n은 2 내지 7의 정수이다.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 펩티드가 결합된 금 나노입자를 포함하는 항-동결 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 항동결 단백질 (antifreeze protein, AFP) 및 항동결 당단백질 (antifreeze glycoprotein, AFGP) (이하 통칭하여 "AF(G)P라" 함)의 얼음 결정 성장 억제 효과는 당해 기술 분야의 통상의 기술자에게 항 동결 활성을 나타내는 기전을 이해하고 이를 이용하는 것에 영감을 주었고, 이에 따라 통상의 기술자가 광범위한 변형된 용도로 AF(G)P를 이용할 수 있게 되었다. 규칙적으로 배열된, 특정 서열을 갖는 AF(G)P는 얼음 결정에 부착하여 성장하는 얼음 결정의, AF(G)P가 박힌 영역 사이에 형성되는 마이크로 또는 나노 굴곡은 물 분자가 결정화되는 것을 열역학적으로 더 어렵게 만든다.

[0004] 기전에 관한 이론이 확립되어 있지는 않지만, 두가지 원인이 AF(G)P의 얼음 부착에 관련된 것으로 예상된다. 연구의 초기 단계에서, 가장 일반적으로는 수소 결합이 이론적인 근거로서 제안되었다. 모든 아미노산에는 카보닐기와 아민기가 존재하기 때문에, AF(G)P의 카보닐기 및 아민기가 물 분자와 수소 결합을 두루 형성할 수 있어,

직관적인 설명이 가능하다. 하이드록실기가 다수 존재하는 폴리(비닐 알코올) (PVA) 및 그래핀 옥사이드 (GO)와 같은 인공적인 동결 방지제는 얼음 결정 저해의 관점에서 수소 결합의 중요성을 뒷받침한다.

[0005] 그러나 수소 결합에만 의존한 설명으로는 AF(G)P에서 일치하지 않는 경우들이 발견되었다 (Sonnichsen, F. D.; DeLuca, C. I.; Davies, P. L.; Sykes, B. D. Refined solution structure of type III antifreeze protein: hydrophobic groups may be involved in the energetics of the protein-ice interaction. *Structure* **1996**, *4*, 1325-1337.; Chao, H.; Houston, M. E.; Hodges, R. S.; Kay, C. M.; Sykes, B. D.; Loewen, M. C.; Davies, P. L.; Sonnichsen, F. D. A diminished role for hydrogen bonds in antifreeze protein binding to ice. **1997** *Biochemistry*, *36*, 14652-14660.; Zhang, W.; Laursen, R. A. Structure-function relationships in a type I antifreeze polypeptide the role of threonine methyl and hydroxyl groups in antifreeze activity. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34806-34812.; Haymet, A. D. J.; Ward, L. G.; Harding, M. M. Winter flounder "“antifreeze”proteins: synthesis and ice growth inhibition of analogues that probe the relative importance of hydrophobic and hydrogen-bonding interactions. *J. Am. Chem. Soc.***1999**, *121*, 941-948.; Yang, C.; Sharp, K. A. Hydrophobic tendency of polar group hydration as a major force in type I antifreeze protein recognition. *Proteins* **2005**, *59*, 266-274.; Wierzbicki, A.; Dalal, P.; Cheatham III, T. E.; Knickelbein, J. E.; Haymet, A. D. J.; Madura, J. D. Antifreeze proteins at the ice/water interface: three calculated discriminating properties for orientation of type I proteins. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1442-1451.; Nutt, D. R.; Smith, J. C. Dual function of the hydration layer around an antifreeze protein revealed by atomistic molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13066-13073.; Smolin, N.; Daggett, V. Formation of ice-like water structure on the surface of an antifreeze protein. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 6193-6202.; Mochizuki, K.; Molinero, V. Antifreeze Glycoproteins Bind Reversibly to Ice Via Hydrophobic Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4803-4811.). 예를 들어, Thr 및 Ser으로 구성된 올리고펩티드는 Ser 대비 Thr의 비가 높은 경우에 얼음 성장을 더 효과적으로 저해할 수 있는 것으로 나타났다 (Chao, H.; Houston, M. E.; Hodges, R. S.; Kay, C. M.; Sykes, B. D.; Loewen, M. C.; Davies, P. L.; Sonnichsen, F. D. A diminished role for hydrogen bonds in antifreeze protein binding to ice. **1997** *Biochemistry*, *36*, 14652-14660.; Zhang, W.; Laursen, R. A. Structure-function relationships in a type I antifreeze polypeptide the role of threonine methyl and hydroxyl groups in antifreeze activity. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34806-34812.). Thr이 Ser에 비하여 더 소수성을 띄기 때문에, 수소 결합의 관점에서 보면 논리에 맞지 않는다. 이러한 결과는 AF(G)P의 소수성 역시얼음에 결합하는 것에 기여하고, 결과적으로 얼음 성장을 억제하게 됨을 의미한다. 얼음 성장 억제에서 소수성 및 친수성의 이중성이 중요한지 여부는 양친매성 당고분자(glycopolymer)를 사용함으로써 확인되었다. 이러한 실증적인 관찰뿐 아니라, 최근 수치적 시뮬레이션을 통한 이론적 뒷받침이 진행되고 있다.

[0006] 얼음 성장을 억제시키기 위한 다른 중요한 요인은 이러한 양친매성 모이어티의 표면 구조이다. 통상적으로 AF(G)P는 평면적 배열을 갖고, 이에 따라 얼음과 AF(G)P의 상호작용을 촉진한다. 지금까지 개발된 대부분의 소분자, 고분자 또는 거대분자 인공 동결방지제는 이러한 평면적인 구조 없이 사용되었다. 이러한 분자적 동결방지제의 일반적인 장점은 얼음 성장 저해의 목적에 잘 부합하는 이들의 화학적 모이어티의 다양성, 다목적성 및 생산 과정의 비용 대비 효율성에 있는 것으로 보인다. 적합한 마이크로/나노물질의 부재는 기하학적으로 정의되지 않은 분자적 동결방지제를 사용하도록 하고, 이는 결과적으로 얼음 성장을 억제하기 위하여 상대적으로 고농도의 동결방지제를 사용하도록 만든다.

[0007] 한편, 금 콜로이드성 나노입자의 합성 및 활용은 지난 20년간 현저하게 진전되어 왔다. 고도로 균일하게, 다양한 형태의 금을 생산하기 위한 다양한 합성 경로가 개발됨에 따라, 금 콜로이드는 생물 의학적 치료/센서, 플라스모닉스, 광학 물질, 광전자공학, 태양 에너지 전환, 및 많은 다른 활용 분야에서 관심을 끌고 있다. 이러한 발전의 상당수는 금 콜로이드성 플라스몬 효과의 장점 (즉, 국소 표면 플라스몬 공명 (LSPR))에 주로 초점이 맞추어져 있다.

[0008] 그러나 금 나노입자의 모양 및 크기를 모두 정확하게 제어할 수 있는 능력은 LSPR 효과의 조절뿐만 아니라 얼음과 동결방지제 분자 모이어티 사이의 나노스케일의 계면간 상호작용의 개선에도 이용될 수 있을 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) EP2565200A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 일 목적은 결빙을 제어할 수 있는 물질 및/또는 이를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은, 세포의 생존률을 높이기 위한 동결 보존용 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 식품의 동결 시에도 식감을 유지할 수 있는 식품 동결 보존용 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 1. 얼음 결정의 하나 이상의 면과 평면 접촉이 가능한 하나 이상의 평면을 포함하는 코어; 및 상기 코어의 하나 이상의 평면에 결합되어 있고 $(Thr)_n$-, $(Ala)_n$-, $(Ser)_n$-, 또는 $(Gly)_n$-을 포함하는 올리고펩티드를 포함하는 나노 구조체로서, 상기 나노 구조체는 물에서 콜로이드 형태로 존재할 수 있는, 결빙 제어용 다면체 형상의 나노 구조체: 상기 n은 2 내지 7의 정수이다.

[0016] 2. 항목 1에 있어서, 상기 코어는 사면체, 깎은 사면체, 육면체, 깎은 육면체, 팔면체, 깎은 팔면체, 십면체, 십이면체, 이십면체, 사육면체 (tetrahexahedron), 육팔면체 (hexoctahedron), 또는 마름모십이면체인, 나노 구조체.

[0017] 3. 항목 1에 있어서, 상기 코어는 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt), 팔라듐(Pd), 알루미늄(Al), 구리(Cu), 산화철(Fe_3O_4), 또는 이산화규소(SiO_2), 또는 이들 중 적어도 2가지를 포함하는 합금으로 제조된, 나노 구조체.

[0018] 4. 항목 1에 있어서, 상기 코어는 금(Au), 백금(Pt), 철(Fe), 산화철(Fe_3O_4), 규소(Si), 또는 이산화규소(SiO_2), 또는 이들 중 적어도 2가지를 포함하는 합금으로 제조된, 나노 구조체.

[0019] 5. 항목 1에 있어서, 상기 n은 3 내지 6인, 나노 구조체.

[0020] 6. 항목 1에 있어서, 상기 올리고펩티드는 $(Thr)_n$-, 또는 $(Ala)_n$-을 포함하는, 나노 구조체.

[0021] 7. 항목 1에 있어서, 상기 코어의 직경은 50 nm 내지 100 nm인, 나노 구조체.

[0022] 8. 항목 1에 있어서, 상기 평면에는 nm^2 당 0.07 내지 0.25개의 올리고펩티드가 결합된, 나노 구조체.

[0023] 9. 항목 1에 있어서, 상기 코어는 육면체, 또는 팔면체인, 나노 구조체.

[0024] 10. 항목 1에 있어서, 상기 코어는 금(Au)인, 나노 구조체.

[0025] 11. 항목 1에 있어서, 상기 n은 5인, 나노 구조체.

[0026] 12. 항목 1에 있어서, 상기 평면에는 nm^2 당 0.1 내지 0.2개의 올리고펩티드가 결합된, 나노 구조체.

[0027] 13. 항목 1에 있어서, 얼음의 재결정화를 억제하여 결빙을 제어하는, 나노 구조체.

[0028] 14. 항목 1 내지 13 중 어느 하나의 나노 구조체를 포함하는, 결빙 제어용 조성물.

[0029] 15. 항목 1 내지 13 중 어느 하나의 나노 구조체를 포함하는, 세포 동결용 조성물.

[0030] 16. 항목 1 내지 13 중 어느 하나의 나노 구조체를 포함하는, 식품 동결용 조성물.

[0031] 17. 얼음 결정의 하나 이상의 면과 평면 접촉이 가능한 하나 이상의 평면을 포함하는 코어; 및 상기 코어의 하나 이상의 평면에 결합되어 있고 $(Thr)_n$-, $(Ala)_n$-, $(Ser)_n$-, 또는 $(Gly)_n$-을 포함하는 올리고펩티드를

포함하고, 물에서 콜로이드 형태로 존재할 수 있는, 결빙 제어용 다면체 형상의 나노 구조체를 용매에 첨가하는 단계를 포함하는, 결빙 제어 방법: 상기 n은 2 내지 7의 정수이다.

[0032] 18. 얼음 결정의 하나 이상의 면과 평면 접촉이 가능한 하나 이상의 평면을 포함하는 코어; 및 상기 코어의 하나 이상의 평면에 결합되어 있고 $(Thr)_n$-, $(Ala)_n$-, $(Ser)_n$-, 또는 $(Gly)_n$-을 포함하는 올리고펩티드를 포함하고, 물에서 콜로이드 형태로 존재할 수 있는, 결빙 제어용 다면체 형상의 나노 구조체를 세포를 포함하는 용액에 첨가하는 단계를 포함하는, 세포 동결 보존 방법: 상기 n은 2 내지 7의 정수이다.

[0033] 19. 얼음 결정의 하나 이상의 면과 평면 접촉이 가능한 하나 이상의 평면을 포함하는 코어; 및 상기 코어의 하나 이상의 평면에 결합되어 있고 $(Thr)_n$-, $(Ala)_n$-, $(Ser)_n$-, 또는 $(Gly)_n$-을 포함하는 올리고펩티드를 포함하고, 물에서 콜로이드 형태로 존재할 수 있는, 결빙 제어용 다면체 형상의 나노 구조체를 식품에 처리하는 단계를 포함하는, 식품 동결 보존 방법: 상기 n은 2 내지 7의 정수이다.

발명의 효과

[0035] 본 발명에 따른 물질 및/또는 이를 포함하는 조성물을 이용함으로써 얼음의 재결정화를 억제하고, 결빙을 제어할 수 있다. 이를 통해 세포 동결 보존 시, 세포의 생존률을 높일 수 있으며, 식품의 동결 시에도 식감을 유지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1a (a)는 금 콜로이드의 합성 방법을 나타낸 것이고, (b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 방법으로 제조된 금 나노입자의 길이 (L) 및 종횡비 (aspect ratio)에 따른 분포를 확인한 결과이고, 도 1b (a)는 사면체와 깎은 사면체, (b)는 육면체와 깎은 육면체, (c)는 팔면체와 깎은 팔면체이다.

도 2 (a)는 금 나노입자의 형태에 따른 투과 전자 현미경 및 주사 전자 현미경 이미지를 나타낸 것이고, (b)는 금 나노구체의 대용량 (200 mL) 합성 배스의 사진 및 이에 상응하는 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 나타낸 것으로, 소용량 (20 mL)과 대용량 (200 mL) 합성에서 피크가 실질적으로 차이가 나지 않음을 보여주며, (c)는 티올기로 매개된, 금 콜로이드의 표면에 올리고펩티드를 부착하는 방법을 나타낸 것이다.

도 3 (a)는 시뮬레이션 모델을 나타낸 것으로, 2mer, 5mer 및 7mer의 올리고펩티드는 각각 0.60 nm, 1.00 nm, 및 1.40 nm로 하였고, (b) 내지 (d)는 아무 것도 부착되지 않은 금 콜로이드와 올리고펩티드가 결합된 금 콜로이드의 흡수 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4 (a)는 올리고펩티드의 형광 정량을 위한 표준 농도 곡선이고 (b)는 분리된 올리고펩티드로부터 수득된 형광의 강도를 나타낸 그래프이다.

도 5 (a)는 시뮬레이션 모델을 나타낸 것이고, (b)는 올리고펩티드 밀도에 따른 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브의 LSPR 소광 피크 이동을 계산한 결과이다.

도 6 (a)는 정제수 및 금 나노큐브 용액으로부터 얼음 결정의 재결정화의 시간에 따른 MLGS을 나타낸 그래프이고, (b)는 정제수 (1행), 아무 것도 결합되지 않은 금 나노큐브 서스펜션 (2행), $(Thr)_5$-Cys- (3행), $(Ser)_5$-Cys- (4행), $(Ala)_5$-Cys- (5행), 및 $(Gly)_5$-Cys- (6행) 결합된 금 나노입자 서스펜션으로부터의 재결정화 얼음의 DFOM 이미지이다.

도 7은 정제수 (1행), 아무 것도 결합되지 않은 금 나노큐브 서스펜션 (2행), $(Thr)_5$-Cys- (3행), $(Ser)_5$-Cys- (4행), $(Ala)_5$Cys- (5행), 및 $(Gly)_5$-Cys- (6행) 결합된 금 나노입자 서스펜션로부터 수득한 BFPOM 이미지이다.

도 8 (a)는 정제수, 아무 것도 결합되지 않은 금 나노큐브 서스펜션, $(Thr)_5$-Cys-, $(Ser)_5$-Cys-, $(Ala)_5$-Cys-, 및 $(Gly)_5$-Cys-결합된 금 나노입자의 얼음 알갱이의 시간에 따른 평균 반지름의 세제곱 값을 나타낸 그래프이고 (b) 각각의 나노입자에 상응하는 DFOM 이미지이다.

도 9 (a)는 $(Thr)_n$-Cys- 결합된 금 나노큐브의 농도에 따른 30분 동안의 재결정화된 얼음 도메인의 MLGS 값을

나타낸 그래프이고, (b)는 $(Thr)_n$-Cys-결합된 금 나노큐브에서 n이 각각 2, 5, 및 7일 때 재결정화된 얼음의 DFOM 이미지이다.

도 10 (a)는 올리고펩티드 농도에 따른 재결정화된 얼음의 MLGS를 나타낸 그래프이고, (b)는 각각 1, 10, 100, 250, 500, 및 1000 μM (왼쪽에서 오른쪽, 및 위에서 아래 방향 순서)을 함유하는 재결정화되는 얼음 결정의 DFOM 이미지이다.

도 11 (a)는 단일 결정성 얼음의 방향성 성장을 위해 사용된 냉각 장치를 촬영한 사진이고, (b)는 (a)를 이용하여 촬영한, 성장하는 단일 결정성 얼음의 DFOM 이미지이고, (c)는 아무 것도 결합되지 않은 금 나노큐브를 함유하는 용액에서 성장하는 얼음 결정의 DFOM 이미지이고, (d)는 아무 것도 결합되지 않은 금 나노큐브가 무작위로 축적된 물-얼음 계면과 아무 것도 결합되지 않은 금 나노큐브가 균일하게 분산된 초냉각된 물에서 선택적으로 촬영한 DF 현미경 산란 스펙트럼이고, (e)는 $(Thr)_5$-Cys-결합된 금 나노큐브를 함유하는 용액에서 성장하는 얼음 결정의 DFOM 이미지이고, (f)는 $(Thr)_5$-Cys-결합된 금 나노큐브의 얼음 및 초냉각된 물 영역에서 촬영한 DF 현미경 산란 스펙트럼이다.

도 12는 도 11 (b)에 상응하는 시간 흐름에 따른 BFPOM 이미지이다.

도 13 (a)는 시뮬레이션 모델을 나타낸 것이고, (b) 내지 (e)는 $(Thr)_5$-Cys-결합된 금 나노큐브 및 이의 클러스터의 수치적으로 시뮬레이션된 DF 산란 스펙트럼이다.

도 14는 얼음 및 물에서 분산된 금 나노큐브의 DF 산란을 FDTD 계산한 그래프이다.

도 15 (a)는 ZrAc의 DIS 활성을 간단히 나타낸 그림이고, (b)는 0 및 10초에서 20 mg/ml의 ZrAc을 함유하는 방향성을 가지고 성장하는 얼음을 촬영한 사진이고, (c)는 정제수, 0.20 nM의 $(Thr)_5$-Cys-금 나노큐브, 및 20 mg/ml의 ZrAc에 대하여 수크로오스 보조된 DIS 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 16 (a)는 아무 것도 결합되지 않은 금 나노큐브 (1행) 및 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브 (2행 내지 5행)에 대한 얼음 성장을 시간에 따라 시뮬레이션한 것을 촬영한 사진이고, (b)는 얼음 성장 중에 아무 것도 결합되지 않은 금 나노입자, 및 $(Thr)_5$-Cys-, $(Ser)_5$-Cys-, $(Ala)_5$-Cys-, 및 $(Gly)_5$-Cys- 결합된 금 나노입자의 z축 방향 이동을 시간에 따라 나타낸 그래프이고, (c)는 umbrella sampling 시뮬레이션으로부터 수득한, 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브의 자유 에너지 변화를 계산한 그래프이고, (d)는 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브의 수소 결합 수명을 계산한 결과이다.

도 17은 $(Thr)_5$-Cys- 결합된 금 나노큐브의 AA MD 시뮬레이션 중 (a) 시작 시점 (0 s) 및 (b) 종료 시점 (300 ns)에서의 형태를 나타낸 것이다.

도 18 (a)는 다양한 밀도를 가진 $(Thr)_n$-Cys-결합된 금 나노큐브에 대한 AA MD 모델을 나타낸 것이고, (b)는 다양한 n 및 올리고펩티드 밀도에 대한 $(Thr)_n$-Cys-결합된 금 나노큐브의 z축 이동을 시간에 따라 나타낸 그래프이다.

도 19 (a)는 금 콜로이드의 모양에 따른 물과 얼음 경계면 사이의 접촉을 나타낸 그림이고, (b)는 $(Thr)_5$-Cys-결합된 금 나노구체, 나노팔면체, 및 나노큐브에 대한 재결정화된 얼음의 시간에 따른 MLGS 및 가장 큰 입자의 성장 속도를 나타낸 그래프이고, (c) $(Thr)_5$-Cys- 결합된 금 나노구체, 및 나노큐브의 일반적인 배열에 관한 얼음 결정 성장을 시뮬레이션한 사진이다.

도 20 (a)는 상이한 초냉각 온도에서 정제수, 0.2 nM 또는0.6 nM의 $(Thr)_5$-Cys-결합된 금 나노구체 서스펜션 조건에서 얼음 결정의 성장 속도 및 (b) 정제수, 0.2 nM 또는0.6 nM의 $(Thr)_5$-Cys-결합된 금 나노구체 서스펜션 조건에서 시간에 따른 단일 얼음 결정의 GFOM 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이제 본 발명은 첨부된 도면을 참조로 하기에서 더욱 충분히 기술될 것이며, 그러나 본 발명의 전부가 아닌 단지 일부의 구체예가 예시된다. 실제로, 이들 발명은 많은 다양한 형태로 구체화될 수 있으며, 본원에 제시된 구체예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 단수 형태는 달리 명

확하게 지시하지 않는 한 복수한 대상을 포함한다.

[0039] “열 이력현상”은 동결 온도와 용융 온도가 상이하게 되는 현상을 의미한다. 물에 핵 형성제가 존재하는 경우, 동결 온도와 용융 온도가 실질적으로 동일하다. 그러나 핵 형성제가 존재하지 않거나 핵 형성제가 항동결 단백질인 경우, 동결 온도가 용융 온도보다 더 낮게 형성된다.

[0040] “얼음 재결정화”는 작은 얼음 결정으로부터 더 큰 얼음 결정으로 성장하는 과정을 의미하고, 오스왈드 숙성(Ostwald ripening)은 상온 및 결정 사이 표면 에너지 차이로 인한 압력에서 발생하는 이러한 재결정화를 의미하며, 융해-확산-재동결 또는 승화-확산-응축 메커니즘으로 진행될 수 있다.

[0041] 동결 보존 시, 녹이는 과정에서 얼음 재결정화는 세포 막을 손상시키고 세포 탈수를 진행시킴으로 인해 세포 및 조직에 손상을 입힌다. 저온 환경에 사는 유기체들은 얼음 재결정화로 인해 더 쉽게 손상을 받을 수 있기 때문에, AFP 또는 AFGP가 발달되었다. AF(G)P는 얼음 표면에 부착되어 얼음이 성장하는 것을 억제하기 때문에, 얼음 재결정화가 문제가 되는 분야에서 첨가제로서 활용되었다. 본 발명에서는 AF(G)P로부터 유래된 펩티드를 이용한 동결 제어용 물질을 개발하였으며, 특히 AF(G)P 유래 펩티드의 공간적 배치가 항-동결 효과에 큰 영향을 미침을 입증함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0042] 본 발명에서 “항동결 단백질”, “항-동결 단백질” 또는 “AFP”는 상호 교환적으로 사용 가능하고, “항동결 당단백질”, “항-동결 당단백질” 또는 “AFGP”는 상호 교환적으로 사용 가능하며, AFP 및 AFGP를 통합하여 “AF(G)P”로 지칭한다. AF(G)P는 다양한 동물, 식물, 곰팡이 및 박테리아에서 발견되며, 이들 단백질은 얼음 결정에 결합함으로써 얼음의 성장 및 재결정화를 억제하는 것으로 알려졌다. 이러한 AF(G)P의 성질은 저온에서 생물학적 시료를 보존하는 데에 이용되어 왔다. 최근의 연구에 따르면, AF(G)P는 해당 유형에 따라 얼음에 결합하기 위한 특수한 형태의 3차 구조를 갖는데, 얼음과 접촉하는 방향에는 Thr이 다수 존재하고, 보조적으로 Ala이 존재하는 것으로 알려졌다.

[0043] 본 발명에서 사용하는 용어 “항동결”, “항-동결”, “동결 제어”, “결빙 제어”, “동결 억제” 및 “결빙 억제”는 상호 교환적으로 사용 가능하고, 어는점을 낮추거나, 얼음이 형성되지 않도록 하거나 얼음 형성 속도를 늦추거나, 얼음의 재결정화가 되지 않도록 하거나, 얼음 재결정화 속도를 늦추거나, 얼음 결정의 크기를 작게 유지하는 작용을 의미한다.

[0044] 본 발명에서 사용하는 용어 “콜로이드”는 미시적으로 분산된 가용성 입자 또는 불용성 입자가 다른 물질에 부유되어 있는 혼합물, 또는 분산된 물질을 의미한다. 용매와 용질이 하나의 상을 갖는 용액과 달리, 콜로이드는 분산상 및 연속상을 갖는다.

[0045] 본 발명에서 사용하는 용어 “올리고펩티드”, "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 상호교환적으로 사용되고, 펩티드 결합을 통해 공유결합된 아미노산 잔기로 구성된 중합체 화합물을 지칭한다. 본 발명에서는 공지의 기술을 통해 합성된 펩티드를 이용할 수 있다. 펩티드의 합성 방법은, 화학적 방법, 또는 생물학적 방법일 수 있고, 화학적 방법은, 예를 들어, 용액상 방법; tert-butyloxycarbonyl (Boc)/benzyl (Bzl) 전략 및 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)/tert-butyl (t -Bu) 전략을 포함하는 고체상 방법 (Kent SBH, Mitchell AR, Engelhard M, Merrifield RB (1979) Mechanisms and prevention of trifluoroacetylation in solid-phase peptide synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 76(5):2180-2184); 레진에 첫번째 아미노산을 고정화시키고 서열 순서대로 펩티드 사슬을 연장시키는 방법; 또는 마이크로파를 이용한 방법일 수 있고, 생물학적 방법은 미생물을 이용한 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명에서 사용하는 용어 “평면 접촉” 또는 “면 접촉”은 상호교환적으로 사용 가능하며, 면과 면이 접촉할 때 그 경계에 실질적으로 평면이 형성되는 경우를 의미하고, 선 접촉 또는 점 접촉, 또는 경계에 곡면이 형성되는 곡면 접촉의 경우와 구분하여 사용된다. 본 발명의 나노 구조체는 얼음 결정 면과 평면적으로 접촉이 가능한 하나 이상의 평면을 갖는데, 해당 면에는 소수성 작용기 또는 친수성 작용기를 갖거나, 소수성 작용기 및 친수성 작용기를 갖는 아미노산 잔기가 노출되어 있다. 상기 평면 접촉이 가능한 다면체로서 사면체, 깎은 사면체, 육면체, 깎은 육면체, 팔면체, 깎은 팔면체, 십면체, 십이면체, 이십면체, 사육면체, 육팔면체, 또는 마름모십이면체일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 다면체는 육면체 또는 팔면체이다.

[0047] 본 발명에서 사용하는 용어 “깎은 (truncated) 다면체”는 아르키메데스 다면체 중 하나로서, 다면체의 꼭지점을 깎아서 만든 다면체를 의미한다 (도 1b).

[0048] 본 발명에서 사용하는 용어 “코어”는 나노 구조체의 기본 골격을 이루는 부분을 의미한다. 코어는 세포 또는

신체에 독성이 없거나, 독성이 실질적으로 없거나, 독성이 적은 원소를 이용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 코어는, 예를 들어, 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt), 팔라듐(Pd), 알루미늄(Al), 구리(Cu), 산화철(Fe_3O_4), 또는 이산화규소(SiO_2), 또는 이들 중 적어도 2가지를 포함하는 합금으로 제조될 수 있고, 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 코어는 금(Au), 백금(Pt), 철(Fe), 산화철(Fe_3O_4), 규소(Si), 또는 이산화규소(SiO_2), 또는 이들 중 적어도 2가지를 포함하는 합금으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 코어는 금으로 제조된다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 코어의 직경은 150 nm 이하, 10 nm 내지 140 nm, 20 nm 내지 130 nm, 30 nm 내지 120 nm, 40 nm 내지 110 nm, 50 nm 내지 100 nm, 60 nm 내지 90 nm, 또는 75nm이나, 본 발명에 따른 나노 구조체가 콜로이드 형태로 용액에서 부유될 수 있다면 상기 범위로 제한되지 않는다. 통상의 기술자는 사용되는 코어의 재료, 밀도, 및 형상 등을 고려하여 콜로이드 특성을 가질 수 있도록 직경을 조절할 수 있다. 다만, 코어의 직경이 10 nm 미만인 경우, 동결 제어 효과가 발생되지 않을 수 있다.

[0050] 본 발명에서 사용하는 용어 “직경”은 다면체에서 마주보는 면 사이의 최단거리를 의미하고, 나노 구조체가 구형인 경우, 지름을 의미한다.

[0051] 본 발명에 따른 나노 구조체는 코어 및 상기 코어에 결합된 올리고펩티드를 포함한다. 상기 올리고펩티드는 소수성 작용기를 갖는 아미노산, 예를 들어 His, Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Leu, 또는 Met일 수 있고, 친수성 작용기를 갖는 아미노산, 예를 들어, Arg, Ser, Thr, Tyr, Cys, Asp, Glu일 수 있으며, 소수성 및 친수성 작용기를 갖는 아미노산, Thr일 수 있다.

[0052] 본 발명의 일 실시예에서, 코어에 결합되는 올리고펩티드는 $(Thr)_n$, $(Ala)_n$, $(Gly)_n$ 및 $(Ser)_n$로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하고, 일 실시예에서 상기 올리고 펩티드는 $(Thr)_n$, 또는 $(Ala)_n$이다: 상기 n은 1 내지 8의 정수, 2 내지 7의 정수, 3 내지 6의 정수, 또는 5이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 달리 설명하지 않는 한, 본 발명에서 올리고펩티드는 N 말단에서 C 말단으로 서열을 기재한다. 예를 들어, $(Thr)_5$-는 (N-말단) Thr - Thr - Thr - Thr - Thr - (C-말단)을 의미하고, C 말단에 결합된 추가의 아미노산을 통하여, 또는 직접 본 발명의 나노 구조체에 결합되어 있는 것을 의미한다.

[0053] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 올리고펩티드는 AF(G)P의 구조적 특성을 이용하여 $(Thr)_5$이 결합된 금 나노입자 (nanoparticles, NPs)를 제조하였으며, 이에 더하여 친수성 또는 소수성 작용기의 역할을 확인하기 위하여, Thr에서 $-CH_3$가 H로 치환된 $(Ser)_5$, Thr에서 -OH가 H로 치환된 $(Ala)_5$, 및 Thr에서 -CH3 및 -OH가 모두 H로 치환된 $(Gly)_5$이 결합된 금 나노입자를 각각 제조하였다. 특히, 상기 올리고펩티드를 코어에 결합시키기 위하여 C-말단에 Cys가 더 포함될 수 있으나, 그 외에도 당해 기술 분야에서 알려진, 코어 표면에 올리고펩티드를 결합시키기 위한 구성이 추가될 수 있다.

[0054] 본 발명의 일 실시예에서, 코어에 결합된 올리고펩티드는 nm^2 당 최대 0.07개 내지 0.25개, 0.075개 내지 0.23개, 0.1개 내지 0.2개, 또는 0.13개 내지 0.17개로 결합될 수 있으나, 올리고펩티드의 길이, 또는 서열과 같은 올리고펩티드의 특성에 따라 변경될 수 있다. 얼음 계면과의 결합력은 단위 면적 당 결합된 올리고펩티드의 수, 및 물과 상호작용할 수 있는 작용기 (소수성 기 및 친수성 기)의 수에 상관된다.

[0055] 본 발명은 실질적으로 동일한 직경을 가진 구 형태의 나노 구조체에 비하여 얼음 재결정화 억제 효과가 높음을 확인하였다. 또한, 얼음이 톱니 모양이나 바늘 모양이 아닌 끝이 뭉뚝한 형태로 형성되도록 하는 효과를 갖는다.

[0056] 얼음 결정이 톱니 형상 또는 바늘 형상을 갖는 경우, 세포 또는 식품을 동결하여 저장할 때, 세포막 및/또는 세포벽이 파괴되어 세포의 생존률이 낮아지고 식품의 식감이 떨어지는 문제가 발생한다. 그러나 본 발명에 따른 나노 구조체를 포함하는 조성물을 첨가하는 경우, 상기와 같이 형성되는 얼음은 방향성이 없이 성장하게 되므로, 세포 동결 보존 시 세포의 생존률을 높일 수 있고, 식품의 동결 보존 시 식감을 유지할 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 발명에 따른 나노 구조체는 통상의 결빙 제어를 위한 원료로서 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 세포 및 식품의 동결에 사용하는 것도 적합하다.

[0057] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 결빙 제어용 조성물은 얼음 결정의 하나 이상의 면과 평면 접촉이 가능한 하나 이상의 평면을 포함하고, 사면체, 깎은 사면체, 육면체, 깎은 육면체, 팔면체, 깎은 팔면체, 십면체,

십이면체, 이십면체, 사육면체, 육팔면체, 또는 마름모십이면체 형태의 코어; 및 상기 코어의 하나 이상의 평면에 결합되어 있고 $(Thr)_n$-, $(Ala)_n$-, $(Ser)_n$-, 또는 $(Gly)_n$-을 포함하는 올리고펩티드를 포함하는 나노 구조체를 포함한다. 본 발명의 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 결빙 제어용 조성물에 포함된 코어는 사면체, 깎은 사면체, 육면체, 깎은 육면체, 팔면체, 깎은 팔면체, 십면체, 십이면체, 이십면체, 사육면체, 육팔면체, 및 마름모십이면체로 구성된 군으로부터 선택된 두 가지 이상의 형태이다.

[0058] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 세포 동결 보존용 조성물을 이용하여 동결 보존할 수 있는 세포는 원핵 세포; 진핵 세포; 미생물; 동물 세포; 암 세포, 정자; 난자; 성체 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 역분화 줄기 세포를 포함하는 줄기 세포; 제대혈, 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 포함하는 혈액 세포; 신장 세포, 간 세포, 및 근육 세포를 포함하는 조직 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명에 따른 나노 구조체를 용매에 첨가함으로써 결빙을 제어하는 방법, 본 발명에 따른 나노 구조체를 세포를 포함하는 용액에 첨가하는 단계를 포함하여 세포를 동결 보존하는 방법, 및 본 발명에 따른 나노 구조체를 식품에 처리하는 단계를 포함하여 식품을 동결 보존하는 방법을 제공한다.

[0060] 본 명세서에서 수치가 범위로 기재되어 있는 경우, 해당 범위 내에 있는 모든 수치가 본 발명에 개시된 것으로 본다.

[0061] 통상의 기술자는 “약”이 불가피하게 사용되어야 하는 경우를 이해할 것이며, 본 명세서에서 용어 “약”은 오차 범위 내의 수치를 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0062] 본 발명에서 사용하는 용어 “실질적으로 동일”는 오차범위 내에서 동일하거나, 인지할 수 없는 정도의 차이가 있는 경우를 의미한다. 본 발명에서 사용하는 용어 “실질적으로 없다”, “실질적으로 없는” 또는 이와 유사한 의미의 표현은, 0 또는 오차 범위 내에 0이 포함되는 경우, 또는 통상의 기술자가 인식하기에 무시할 수 있는 경우를 지칭한다.

[0064] **실시예**

[0065] **실시예 1. 방법**

[0066] **1.1 금 콜로이드의 합성**

[0067] 금 콜로이드 (금 나노구체(Au nanospheres; NSs), 금 나노큐브 (Au nanocubes, NCs), 및 금 나노팔면체 (Au nanooctahedra, NOs))를 꼭지점/모서리의 선택적 에칭과 함께 시드-매개법 (시드 mediated method)을 통해 합성하였다. 먼저, 금 나노막대 (Au nanorods, NRs)를 은-원조 방법 (silver-assisted methods)을 이용하여 합성하였다 (도 1). 금 나노막대를 위한 금 시드는 10 mM 소듐 보로하이드라이드 300 μL를 10 mM $HAuCl_4$ 125 μL 및 100 mM 헥사데실트리메틸암모늄 보로마이드 (hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB) 5 mL을 함유하는 용액에 주입하여 제조하였다. 그 후, 100 mM CTAB 200 mL, 10 mM $HAuCl_4$ 10 mL, 10 mM 은 나이트레이트 1.8 mL, 100 mM L-아스코르브산 1.14 mL, 및 240 μL의 시드 용액 1.14 mL을 순차로 첨가하여 금 나노막대를 성장시켰다. 1분간 부드럽게 교반한 후, 2시간동안 두었다.

[0068] 균일한 나노구체 시드를 수득하기 위하여, 금 나노막대를 2 OD (optical density)로 함유하는 50 mM CTAB 수용액에 60 μM $HAuCl_4$를 주입함으로써 금 나노막대의 양 말단을 선택적으로 에칭하였다. 40 ℃에서 4시간동안 부드럽게 교반한 후, 에칭된 금 나노막대를 100 mM 세틸피리디늄 클로라이드 (cetylpyridinium chloride, CPC)에 재현탁시켰다. 20 mL의 10 mM CPC, 350 μL의 10 mM $HAuCl_4$, 4.5 mL의 100 mM 아스코르브산, 및 1 OD 값의 에칭된 금 나노막대 1 mL을 혼합하여 에칭된 금 나노막대를 오목한 마름모꼴의 12면체 (concave rhombic dodecahedra, CRD)로 성장시켰으며, 60 μM $HAuCl_4$ 수용액과 40 ℃에서 4시간동안 부드럽게 교반함으로써 나노구체로 에칭하였다. 에칭된 CRD 5 mL을 시드로 사용하여 CDR 성장 후 꼭지점/모서리 에칭을 2회 반복함으로써 나노구체 시드를 균일하게 하였다.

[0069] 이들 나노구체 시드를 사용하여 금 나노구체, 금 나노큐브 및 금 나노팔면체를 제조하였다. 금 나노구체는 상기의 CRD 성장 및 에칭 방법 후에, 에칭된 CRD 2 mL을 시드로 사용하여 제조하였다. 금 나노큐브는 5 mL의 100 mM CPC, 500 μL의 100 mM KBr, 100 μL의 10 mM $HAuCl_4$, 150 μL의 100 mM 아스코르브산, 및 1 OD값의 나노구체 시드 500 μL를 혼합하고 1시간동안 반응시켜 제조하였다. 금 나노팔면체는 100 μL의 10 mM $HAuCl_4$, 13 μL의

100 mM 아스코르브산, 및 1 OD값의 나노구체 시드 500 μL을 5 mL의 100 mM CPC에 첨가하고 1시간동안 부드럽게 교반하여 제조하였다.

[0071] **1.2 금 콜로이드에 올리고펩티드의 융합**

[0072] 금 콜로이드에 항동결 올리고펩티드를 융합시키기 위하여, C-말단 시스테인 (Cys)의 유사-공유결합 (pseudocovalent bond)을 이용하였다. 정제수(DI water)에 분산된 상기 방법으로 제조된 금 콜로이드를 과량의 올리고펩티드와 혼합하고 30분간 배양하여 완전히 덮이도록 하였다. 배양 후, 3회 원심분리를 통해 과량의 올리고펩티드를 제거하고 수중 0.01 wt.% 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate, SDS)에 재분산시켰다.

[0074] **1.3 금 콜로이드성 분산의 수치모의 (Numerical simulation)**

[0075] 금 콜로이드의 분산 특성을 이론적으로 예측하기 위하여, 상업적으로 이용 가능한 소프트웨어 패키지인 FDTD (2014 CST Microwave Studio)를 이용하였다. 금의 유전율은 Johnson, P. B.; Christy, R. W. Optical constants of the noble metals. Phys. Rev. B 1972, 6 (12), 4370-4379에 기초하였고, 올리고펩티드의 두께는 단량체 수치에 따라 0.60 nm 내지 1.40 nm로 하였다. 이 두께는 올리고펩티드의 구조(conformation)에 따라 결정하였으며, 이는 전원자 (AA) 분자 동역학 (MD) 시뮬레이션으로 계산하였다. 암시야 현미경 스펙트럼 분석 (도 11)을 반영하기 위하여, 금 콜로이드의 분산 횡단면 (nm^2) 스펙트럼을 수치적으로 계산하였다. 올리고펩티드가 부착되지 않은 금 콜로이드 및 올리고펩티드가 부착된 금 콜로이드의 흡수 횡단면 (nm^2) 스펙트럼을 도 3b-d에 나타난 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 설명하기 위해 계산하였다.

[0076] 금 콜로이드의 UV-Vis 흡수 스펙트럼 상의 올리고펩티드 두께의 효과를 이론적으로 정량하기 위하여, LSPR 소광 피크의 이동을 상이한 두께를 가진 올리고펩티드 층의 굴절률의 함수로서 수치적으로 시뮬레이션하였다. 그 후, 수치적인 시뮬레이션을 위해 사용된 굴절율을 하기의 유효 매질 이론 (Maxwell-Garnett 근사)을 이용하여 올리고펩티드와 상관시켰다:

$$\left(\frac{\varepsilon_{eff}-\varepsilon_h}{\varepsilon_{eff}+2\varepsilon_h}\right)=\delta_i\left(\frac{\varepsilon_i-\varepsilon_h}{\varepsilon_i+2\varepsilon_h}\right)$$

[0077]

[0078] 상기 ε_{eff}, ε_i, ε_h, 및 δi는 각각 매질의 유효 유전 상수, 함유물의 유효 유전 상수, 호스트의 유효 유전 상수, 및 함유물의 용적분율이다. 함유물 및 호스트 매질은 각각 올리고펩티드 및 물(ε_h =1.33)로 하였다. 올리고펩티드의 유전 상수는 McMeekin, T. L.; Groves, M. L.; Hipp, N. J. Refractive indices of amino acids, proteins, and related substances; American Chemical Society: Washington, DC, 1964로부터 얻었다.

[0080] **1.4 금 콜로이드에 부착된 올리고펩티드의 정량**

[0081] 금 콜로이드상에 부착된 올리고펩티드를 실험적으로 정량하기 위하여, 올리고펩티드를 $NaBH_4$로 환원시켜 분리하고 티올-선택적 검출기 매개 형광측정법 (Lee, H. E.; Ahn, H. Y.; Mun, J.; Lee, Y. Y.; Kim, M.; Cho, N. H.; Chang, K.; Kim, W. S.; Rho, J.; Nam, K. T. Amino-acid-and peptide-directed synthesis of chiral plasmonic gold nanoparticles. *Nature* **2018**, *556* (7701), 360-365.)을 수행하였다. 먼저, 올리고펩티드로 개질된 금 콜로이드를 3회 원심분리하고 0.01 wt% SDS에 재현탁시켜 결합되지 않은 올리고펩티드를 완전히 제거하였다. 금 콜로이드로부터 올리고펩티드를 분리하기 위하여, 25 μL의 100 mM $NaBH_4$를 75 μL의 올리고펩티드로 개질된 금 콜로이드에 첨가하였다. 실온에서 5분간 배양하고, 용액을 다시 원심분리하여 금 콜로이드와 방출된 올리고펩티드를 분리하였다. 자유 분산된 올리고펩티드를 함유하는 상등액을 밤새 배양하여 남은 $NaBH_4$를 비활성화시켰다.

[0082] 분리된 올리고펩티드를 티올 검출 형광 검출기 (Thiol detection assay kit, Cayman Chemical, 700340)를 사용

하여 정량하였다. 올리고펩티드를 티올 검정 완충액 (100 mM Potassium Phosphate, 1 mM EDTA, pH 7.4)에서 형광 티올 검출기와 1:1로 혼합하고, 실온에서 5분동안 배양시킴으로써 검출기가 티올기와 반응하여 형광 신호가 방출되도록 하였다. 형광은 380 nm의 여기 파장 및 480 내지 520 nm의 방출 파장에서 관찰하였다. 마지막으로, 분리된 올리고펩티드의 농도는 표준 곡선 (도 4)을 기준으로 하여 측정된 형광 강도로부터 계산하였다.

[0084] **1.5 얼음 재결정화 억제(ice recrystallization inhibition, IRI) 특성**

[0085] 스플랫 분석법 (splat assay) 및 수크로오스 샌드위치 분석법을 동시에 수행하여 얼음 재결정화 정도를 확인함으로써 IRI 활성을 분석하였다 (Mitchell, D.E.; Clarkson, G.; Fox, D.J.; Vipond, R.A.; Scott, P.; Gibson, M.I. Antifreeze protein mimetic metallohelices with potent ice recrystallization inhibition activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (29), 9835-9838.; (9) Budke, C.; Heggemann, C.; Koch, M.; Sewald, N.; Koop, T. Ice recrystallization kinetics in the presence of synthetic antifreeze glycoprotein analogues using the framework of LSW theory. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (9), 2865-2873.). 올리고펩티드로 개질된 금 콜로이드를 원심분리하고 정제수에 재분산시킴으로써, 특성을 파악하기 전에 잔존한 유기 리간드에 의한 작용을 완전히 제거하였다. 스플랫 분석법을 통해 IRI 활성을 시험하기 위하여, 10 μL의 시료를 1.5 m 높이에서 -70 ℃로 기 냉각된 커버글라스 표면에 물방울을 떨어뜨려 얇은 얼음막을 형성하도록 하였다. 얇은 얼음 막이 형성된 유리 커버글라스를 -20 ℃의 펠티에 냉각기 (Peltier cooler)로 옮기고, 유리 커버글라스의 온도를 -6 ℃까지 5 ℃/min의 속도로 천천히 승온시킨 후, 이 온도에서 시료를 어닐링하였다. 얼음이 재결정화되는 30분동안, 암시야 광학 현미경 (Dark-field optical microscopy, DFOM) 이미지를 촬영하였다. 이들 DFOM 이미지를 재결정화된 얼음의 입자 크기를 확인하기 위해 개발한 코드로 정량하였다. 보이는 계에서 가장 큰 10개의 얼음 결정을 선정하고 이들의 평균 직경을 구하여 IRI 활성을 측정하였다. 3번의 독립된 실험으로부터의 평균 값을 통해 평균 최대 입자 크기 (mean largest grain size, MLGS)를 산출하였다.

[0086] 수크로오스 샌드위치 검정으로 IRI 활성을 특징짓기 위하여, 45 wt%의 수크로오스 존재 하에 시료를 2개의 커버글라스 사이에 끼우고 펠티에 냉각기에 위치시켰다. -50 ℃까지 시료를 냉각시킨 후에, 펠티에 냉각기의 온도를 10 ℃/min의 속도로 -8 ℃까지 승온시켰다. 그 후, 시료를 해당 온도에서 30분간 어닐링하였다. IRI 활성을 측정하기 위하여, DFOM 이미지를 5분마다 촬영하고 얼음 결정의 반경을 상기 개발한 코드를 이용하여 측정하였다. 시간에 따른 평균 얼음 결정 반경의 세제곱을 계산하여 IRI 활성을 정량하였다. 3회의 독립된 실험을 하였으며, 그 결과로부터 평균 값을 도출하였다.

[0088] **1.6 단일 결정 얼음의 방향적 성장**

[0089] 먼저, 슬라이드 글라스 상에 양면 테이프를 붙이고 위에 커버 글라스를 위치시킴으로써 유리 미세유체 채널을 제조하였다. 그 후, 이 채널에 정제수를 주입하고 투명한 매니큐어액으로 봉인하였다. 공간적으로 온도(T) 구배를 유도하기 위하여, 채널의 일단은 -20 ℃의 펠티에 냉각기 상에 위치시키고, 타단은 실온 (15 ~ 20 ℃)에 위치시켰다. 이러한 조건 하에서, 단일 결정 얼음-물 계면이 펠티에 냉각기와 실온 구역 사이에 형성되었다.

[0091] **1.7 수크로오스 존재 하에서의 동역학적 얼음 형상 (dynamics ice shaping, DIS) 분석**

[0092] DIS 활성을 확인하기 위하여, 얼음 결정의 형상을 수크로오스 수용액에서 관찰하였다. 먼저, 45 wt% 수크로오스 용액에 용해된 시료를 두개의 커버 글라스 사이에 위치시키고 50 ℃로 냉각시켰다. 그 후, 시료를 0.5 ℃/min의 속도로, 얼음이 거의 남지 않을 때까지 승온시킨 후, 시료를 -0.1 ℃/min의 속도로 냉각시키면서 얼음 결정의 성장을 유도하였다. DFOM 이미지를 냉각 10분 후에 촬영하였다.

[0094] **1.8 열 이력현상 (thermal hysteresis, TH)적 특성**

[0095] 시료의 TH 활성을 확인하기 위하여, 단일 얼음 결정의 성장 속도를 다양한 과냉각 온도에서 모니터링 하였다. 시료를 주문 제작한 나노리터 삼투압계를 사용하여 -50 ℃까지 빠르게 냉각시켜 다결정질의 얼음 결정을 제조하였다. 그 후, 단일 얼음 결정이 남을 때까지 천천히 승온시켰다. 단일 얼음 결정의 크기가 4분 이상 유지된다면, 해당 온도를 융점으로 설정하였다. 그 후, 온도를 표적 온도까지 낮추고 얼음 결정의 성장 속도를

4분 동안 모니터링하였다. TH는 융점과 얼음 결정의 성장이 관찰되는 온도 사이의 차이로 측정하였다 (성장 속도 > 0 μm/min).

[0097] **1.9 전원자 분자 동역학 (All atom molecular dynamics, AA MD) 시뮬레이션**

[0098] AA MD 시뮬레이션은 CHARMM36 역장을 이용하여 GROMACS v5.1.4로 수행하였다 (Abraham, M.J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Pall, S.; Smith, J.C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1*, 19-25.; Huang, J.; MacKerell Jr, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34* (25), 2135-2145.). 올리고펩티드의 구조는 MarvinSketch를 사용하여 제작하였고, 파라미터는 CGenFF를 사용하여 유도하였다 (Vanommeslaeghe, K.; MacKerell, A. D. Automation of the CHARMM general force field (CGenFF) I: bond perception and atom typing. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52* (12), 3144-3154.) 얼음의 실제 용융점(*Tm*) (272.2 K)을 고려하여, TIP4P/ICE 물 모델을 사용하였다 (Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81* (8), 3684-3690.). 금 나노큐브는 665 금 원자들로 구성되도록 설계하였다(즉, 2 nm의 한 변의 길이). CHARMM-Metal 역장은 무기 계면에서 생체분자들 간의 상호작용을 설명한다 (Abascal, J. L.; Sanz, E.; Garcia Fernandez, R.; Vega, C. A potential model for the study of ices and amorphous water: TIP4P/Ice. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122* (23), 234511.). 다양한 크기와 모양의 금 콜로이드를 Materials Studio (Accelrys Inc., San Diego, CA, 2011)에서 나노클러스터 제조기를 사용하여 제조하였다. 모든 MD 시스템은 평형 및 생산 가동을 위해 각각 Berendsen 및 Parrinello-Rahman 알고리즘을 사용하여 1 bar에서 유지하였다 (Heinz, H.; Vaia, R. A.; Farmer, B. L.; Naik, R. R. Accurate simulation of surfaces and interfaces of face-centered cubic metals using 12-6 and 9-6 Lennard-Jones potentials. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (44), 17281-17290.; Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52* (12), 7182-7190.). 이웃 리스트 (Neighbour list)는 컷-오프 반경 1.2 nm로 Verlet 컷-오프 방식을 사용하여 만들었고, 각 단계마다 갱신하였다. 결합 길이를 제한하기 위하여 LINCS 알고리즘을 사용하였다 (Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J.; Fraaije, J. G. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18* (12), 1463-1472.). 모든 시뮬레이션은 2 fs의 시간 단계로 도약적분 (leap-frog integrator)을 사용하여 수행하였다. 정전기적 상호작용은 1.2 nm의 컷오프로 PME를 사용하여 계산하였다 (Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089-10092.).

[0099] 2 nm의 금 나노큐브, 5 nm의 금 나노구체, 및 5 nm의 금 나노큐브를 각각 665, 3925 및 7813개의 금 원자를 이용하여 제조하였고, 올리고펩티드를 금 나노입자의 표면에 약 2.5 펩티드/nm^2로 균일하게 부착하였다. 이에 따라, 60, 196 및 375개의 올리고 펩티드가 2 nm의 금 나노큐브, 5 nm의 금 나노구체, 및 5 nm의 금 나노큐브에 각각 부착되었다.

[0100] 연속적인 얼음 성장 시스템을 2 nm의 금 콜로이드에 대해 10.8 nm x 10.4 nm x 8.6 nm의 방, 5 nm의 금 콜로이드에 대해 14.7 nm x 14.9 nm x 13.0 nm의 방에서 설계하였다. 얼음 성장을 위해 시드 얼음을 넣어주고 고정된 무질서한 물 분자를 사용하여 아래방향으로 얼음이 성장하는 것을 억제하였다.

[0101] GROMACS 및 MDAnalysis20의 도구를 수소 결합 수명 분석을 평가하는 데에 사용하였다. 올리고펩티드와 물/얼음 분자 사이의 수소 결합에 대한 수명은 298 내지 300 나노구체 계산 시간의 기간에 통합되었다. 아민, 카르보닐, 및 하이드록실기와 같은 올리고펩티드의 기능성 모이어티로부터 모든 수소 결합의 가능성을 계산하였다. PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrodinger, LLC)을 시뮬레이션 결과를 시각화하는 데에 사용하였다.

[0103] **1.10 펩티드가 결합된 금 콜로이드의 결합 에너지 계산을 위한 AA MD 시뮬레이션**

[0104] 펩티드가 결합된 금 콜로이드와 얼음 결정 사이의 결합 에너지 (즉, 자유 에너지 변화)를 계산하기 위하여, 본 발명자는 풀링 시스템 (pulling system) (umbrella sampling simulation)을 수치적으로 시뮬레이션 하였다. 이

를 위해, 금 입자, 얼음 표면 및 액체 물 층을 함유하는 총 200,000 개의 원자를 갖는 10 x 10 x 12 nm^3의 시스템 박스를 제작하였다. Z-축의 반응 배위를 만들기 위하여, 금 입자를 1000 kJ/mol nm^2의 힘 상수의 DMP에서 풀링 코드를 사용하여 얼음 계면으로부터 500 ps동안 약 4 nm 당겼다. 그 후, 1 Å으로 시료 윈도우의 공간을 정의하고 40 umbrella sampling 윈도우를 추출하였다. 각각의 윈도우를 1 ns동안 평형을 맞추었고, 10 나노구체 생산 실행을 수행하였다. PMF (potential of mean force)를 GROMACS 패키지에서 WHAM 도구를 이용해 수득하였다. PMF 최대 에너지 상태 및 최저 에너지 상태 사이의 차이로서 곡선으로부터 결합 자유 에너지를 계산하였다.

[0106] **실시예 2. 결과 및 논의**

[0107] **2.1 항동결 금 콜로이드의 합성**

[0108] 상이한 형태의, 매우 균일한 금 나노입자를 충분히 높은 수득율 및 확장성을 가지고 합성하였다. 도 2a는 본 발명에서 사용된 금 나노입자의 SEM(scanning electron microscopy) 및 TEM (transmission electron microscopy) 이미지를 나타낸다. 얼음 성장 및 재결정화의 억제에 두 계면 간의 접촉의 효과를 조사하기 위하여, 금 나노입자가 75 nm로 동일한 크기이면서 나노구체, 나노팔면체, 및 나노큐브를 갖도록 합성하였다. 다각형의 금 콜로이드의 성장 및 그 후 꼭지점의 선택적 에칭을 통해 매우 균일한 금 콜로이드를 충분히 많은 양으로 수득하였다 (도 2b). 금 나노구체의 LSPR은 합성 배치를 20 mL에서 200 mL까지 확장한 후에도 유지하였고 (도 2b의 오른쪽 그림에서 UV-Vis 흡수 스펙트럼), 이는 본 발명에서의 금 콜로이드의 합성 방법의 수득율 및 확장성을 뒷받침한다.

[0109] 상기 제조된 금 나노입자에 시스테인의 티올기와 금 사이의 유사 공유결합을 통해 올리고펩티드를 결합시켰다. AF(G)P 및 얼음 사이 계면 간의 상호 작용의 완벽한 이론적 근거는 파악하기 어렵지만, 선형으로, 규칙적으로 배열된 친수성 및 소수성을 갖는 기능성 모이어티 (예를 들어, Thr)가 얼음 성장 및 재결정화 억제에 관여하는 것으로 알려졌다 (Doxey, A. C.; Yaish, M. W.; Griffith, M.; McConkey, B. J. Ordered surface carbons distinguish antifreeze proteins and their ice-binding regions. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 852-855.; Garnham, C. P.; Campbell, R. L.; Davies, P. L. Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 7363-7367.; Davies, P. L. Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 548-555.; Meister, K.; Lotze, S.; Olijve, L. L.; DeVries, A. L.; Duman, J. G.; Voets, I. K.; Bakker, H. J. Investigation of the ice-binding site of an insect antifreeze protein using sum-frequency generation spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1162-1167.; Dolev, M. B.; Braslavsky, I.; Davies, P. L. Ice-binding proteins and their function. *Annu. Rev. Biochem.* **2016**, *85*, 515-542.; Hudait, A.; Odendahl, N.; Qiu, Y.; Paesani, F.; Molinero, V. Ice-nucleating and antifreeze proteins recognize ice through a diversity of anchored clathrate and icelike motifs. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4905-4912.). 여러 개의 수소 결합 및 소수성 위치를 제공하는 올리고펩티드는 금 나노입자 상에 직접적으로 결합되었다 (도 2c). 상이한 서열을 갖는 Cys-말단의 (*C'*) 올리고펩티드를 이용하여 N 말단-C 말단 순서로 $(Thr)_n$-Cys, $(Ser)_n$-Cys, $(Ala)_n$-Cys, 및 $(Gly)_n$-Cys를 포함하여 다양한 모이어티들의 얼음 성장에의 영향을 조사하였으며, 각각의 상이한 올리고펩티드 서열에서 얼음 성장 저해를 비교하기 위하여 n을 5로 고정하였다. 또한, $(Thr)_n$-Cys에 대하여 n이 2, 5 및 7일 때 얼음에의 결합 및 결과적인 얼음 성장 억제에 대한 n의 효과를 조사하였다. 도 2c에 기재된 각각의 올리고펩티드들의 형태는 AA MD 시뮬레이션으로부터 결정되었다. 이들 합성된 올리고펩티드가 결합되기 전에, 얼음과의 상호작용에의 부작용을 회피하기 위하여 합성 과정 동안에 금 나노입자의 표면에 형성된 유기 리간드를 거의 제거하였다.

[0110] 반응물을 혼합한 후에, 올리고펩티드를 유사 공유결합을 통해 자발적으로 결합시켰다. 이러한 합성된 올리고펩티드의 금 나노입자 상의 결합은 UV-Vis 흡수 스펙트럼으로 측정된, LSPR 소광에 대한 적색편이된 피크를 통해 결합 과정 동안 모니터링하였다. 이들 LSPR 피크 편이는 수회의 시뮬레이션 결과에서 모두 동일하게 나타났다 (유한 차분 시간 영역(finite-difference time-domain, FDTD)법, 도 3).

[0111] 올리고펩티드의 이러한 결합은 LSPR 소광 피크가 더 이상 편이되지 않을 때까지 계속 진행하였다. 이는 올리고펩티드가 금 나노입자에 최대치로 결합된 것임을 의미하며, 본 발명자는 이들 금 나노입자로 얼음 성장을 저해시키기 위해 최대치를 사용하였다.

[0112] n 값을 5로 고정하고, 펩티드가 완전히 결합된 후, 금 나노입자의 모양이나 올리고펩티드 서열과 무관하게 거의 일관된 LSPR 소광 피크의 적색편이가 관찰되었다. 반면, 더 긴 올리고펩티드가 결합된 금 나노튜브의 LSPR 소결 피크는 더 짧은 올리고펩티드가 결합된 경우에 비하여 더 많은 적색편이가 발견되었다 (도 3d).

[0113] 그 후, 올리고펩티드를 금 나노입자로부터 화학적으로 분리시켜서 계수함으로써, 결합된 올리고펩티드 밀도를 정량하였다 (도 4). 5mer인 경우, 결합된 올리고펩티드의 수 (즉, $(Thr)_5$-Cys)는 금 나노입자의 모양 및 펩티드 서열과 무관하게 금 나노입자 표면 nm^2 당 0.13~0.17개로 거의 일정하였다. 이 결과는 올리고펩티드 결합 후 LSPR 소광 피키의 적색편이가 거의 일정한 정도로 나타나는 것과 일치한다. Thr에 대한 n 값이 증가되는 경우, 금 나노입자에 결합되도록 접근 가능한 올리고펩티드의 수가 감소된다. 2mer에서 7mer로 올리고펩티드의 길이가 길어질 때, 금 나노입자 표면 nm^2 당 올리고펩티드의 수는 약 0.23에서 약 0.075로 감소되었다. 더 긴 올리고펩티드에 대해, 정전기적 척력 및 입체 장애가 더 중요해지고, 결과적으로 금 나노입자에 결합할 수 있는 올리고펩티드의 최대 밀도가 감소되었다. 더 긴 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브의 더 많이 적색편이된 LSPR 소광 피크 (도 3)는, 비록 상대적으로 더 낮은 표면 밀도를 갖지만, 이론적 예측과 일치하였으며 (도 5), 이는 더 긴 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브에 대한 LSPR 편이가 더 짧은 올리고 펩티드가 결합된 경우에 비하여 올리고펩티드 밀도의 증가에 더 민감함을 보여준다.

[0115] **2.2 항동결 금 콜로이드의 얼음 재결정화 억제**

[0116] 다음으로, 올리고펩티드가 결합된 금 나노입자의 얼음 재결정화 억제 (ice recrystallization inhibition, IRI) 효과를 확인하였다 (도 6). 이를 위해, IRI의 정량 측정에 대한 표준인 스플랫 분석법 (즉, 비-평형, 급속 냉각)을 수행하였다 (Voets, I. K. From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials. *Soft Matter* **2017**, *13*, 4808-4823.; Biggs, C. I.; Bailey, T. L.; Graham, B.; Stubbs, C.; Fayter, A.; Gibson, M. I. Polymer mimics of biomacromolecular antifreezes. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1546.; Wu, S.; Zhu, C.; He, Z.; Xue, H.; Fan, Q.; Song, Y.; Francisco, J.S.; Zeng, X.C.; Wang, J. Ion-specific ice recrystallization provides a facile approach for the fabrication of porous materials. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15154.). 구체적으로, 정제수 물방울을 냉각 단계(- 70 ℃)에 위치시킴으로써 얼음 절편을 제작하였다. 그 후, 암시야(dark field, DF) 모드에서 광학 현미경 (OM)을 사용하여 재결정화된 얼음 입자 크기의 공간적 분포를 확인하였다. DFOM 이미지에 기초하여, 재결정화된 얼음 도메인의 평균 최대 입자 크기 (MLGS)를 조사하여 IRI 특성을 도출하였다. 스플랫 분석법으로 야기되는 거짓 양성을 회피하기 위하여, 스플랫 방법으로부터 관찰되는 IRI 특성을 이중으로 확인하기 위하여 수크로오스 샌드위치 분석을 수행하였다.

[0117] 오스왈드 숙성과 유사하게 (Gibson, M. I. Slowing the growth of ice with synthetic macromolecules: beyond antifreeze(glyco) proteins. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1141-1152.; Budke, C.; Heggemann, C.; Koch, M.; Sewald, N.; Koop, T. Ice recrystallization kinetics in the presence of synthetic antifreeze glycoprotein analogues using the framework of LSW theory. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 2865-2873.; Budke, C.; Dreyer, A.; Jaeger, J.; Gimpel, K.; Berkemeier, T.; Bonin, A. S.; Nagel, L.; Plattner, C.; DeVries, A. L.; Sewald, N.; Koop, T. Quantitative efficacy classification of ice recrystallization inhibition agents. *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 4285-4294.), 재결정화는 30분 간의 어닐링 시간 동안 얼음 입자 크기가 계속적으로 증가되도록 한다 (시간 흐름에 따른 MLGS, 도 6a 및 이에 상응하는 도 6b의 1번째 줄 DFOM 이미지). 30분간 어닐링된 후, 약 89 μm의 MLGS가 관찰되었다. 개질되지 않은 0.2 nM 농도의 금 나노큐브는 얼음 재결정화에 거의 영향을 미치지 않았다 (도 6a, 도 6b의 2번째 줄). 각각의 얼음 알갱이는, 도 7의 BFPOM에서 확인되는 바와 같이, 단일 결정형을 갖는다. 붉은색 크랙은 응집 및 기질과 성장하는 단일 결정 얼음 사이의 아무 것도 결합하지 않은 금 나노큐브로부터 유래되었다. 이러한 결과는 올리고펩티드가 결합되지 않은 금 나노큐브와 재결정화되는 얼음 결정 사이에 결합력이 거의 없음을 보여준다.

[0118] 반면, 올리고펩티드가 결합된 금 나노튜브를 첨가하는 경우, 동일 농도 (0.2 nM)에 대하여 얼음 알갱이 재결정화는 현저하게 억제되었다. $(Thr)_5$-Cys, $(Ser)_5$-Cys, $(Ala)_5$-Cys, 및 $(Gly)_5$-Cys와 같은 상이한 올리고펩티드가 결합된 금 나노튜브의 IRI 특성은 도 6a에서 각각 녹색, 빨간색, 주황색, 및 보라색으로 표시하였고, 이에 상응하는 DFOM 이미지는 도 6b에 나타내었다. $(Thr)_5$-Cys가 결합된 금 나노튜브에서 MLGS가 현저하게 감소하였고, 다른 5mer 올리고펩티드에 비하여 IRI에서 높은 효과를 나타내었다. $(Ser)_5$-Cys 및 $(Gly)_5$-Cys이 결합된 금 나

노튜브의 경우, IRI 활성이 거의 나타나지 않은 반면 (MLGS: 85 내지 87 μm), $(Ala)_5$-Cys 결합된 금 나노튜브는 중간 정도의 IRI 활성을 나타내었다 (MLGS: 약 55 μm).

[0119] Ser 및 Gly과 비교하여, Thr은 추가적으로 메틸기를 가지고 있기 때문에 더 소수성을 나타내는 한편, 하이드록실기를 가지고 있기 때문에 Ala에 비하여 더 친수성을 갖는다. 종합적으로, Thr은 Ser, Ala, 및 Gly과 비교하여 소수성 및 친수성에서 더 균형을 맞추고 있다. 이러한 관점에서, $(Thr)_5$의 하이드록실기와 메틸기가 모두 얼음에 결합하는 것에 기여함을 알 수 있다. 수크로오스 샌드위치 분석 결과는 $(Ser)_5$-Cys, $(Ala)_5$-Cys, 및 $(Gly)_5$-Cys가 결합된 금 나노큐브와 극명하게 대조되는 $(Thr)_5$-Cys 결합된 금 나노큐브에 대한 상이한 IRI 효과를 뒷받침한다 (도 8).

[0120] 또한, 예를 들어, 프로필렌 글리콜, 디메틸 설폭사이드 (DMSO), 에틸렌 글리콜 (EG), 및 글리세롤과 같은 유기 분자 동결방지제의 속일적인 특성과 달리, 감소된 MLGS의 경향은 $(Thr)_5$-Cys이 결합된 금 나노큐브의 농도에 따라 약 0.15 nM부터는 점차적으로 포화되는 것으로 나타났다 (도 9a 및 b). 상기에서 언급된 바와 같이, 금 나노큐브와 결합된 $(Thr)_5$-Cys의 밀도는 금 나노큐브 nm^2 당 약 0.13이었고, 올리고펩티드가 결합된 금 콜로이드의 농도가 0.2 nM일 때 금 나노큐브에 결합된 $(Thr)_5$-Cys 총 농도는 약 0.87 μM이었다. 0.87 μM의 $(Thr)_5$-Cys이 금 나노큐브에 결합되지 않고 정제수에 자유 분산된 경우, IRI 활성은 전혀 관찰되지 않았다 (도 10). IRI는 자유 분산된 $(Thr)_5$-Cys가 100 μM 초과의 농도일 때 나타났으며, 농도가 증가함에 따라 IRI 활성 역시 증가하였다. IRI를 나타내기 위한 최소한의 분자 농도는 금 나노큐브에 결합된 $(Thr)_5$-Cys일 때에 비하여 10^2배 높게 나타났고, 이는 금 나노큐브의 평평한 면에 결합된 항동결 모이어티가 얼음 결정의 성장에 더 큰 영향을 미치고, 결과적으로 얼음의 재결정화를 더 잘 억제함을 보여준다.

[0121] 또한, 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브의 Thr 단량체 수가 IRI에 미치는 영향을 평가하였다 (도 9a, 및 4b). 5mer가 7mer에 비하여 효과가 좋은 것으로 나타났다. 이는 5mer Thr (금 나노큐브 nm^2 당 약 0.13)이 7mer Thr (금 나노큐브 nm^2 당 약 0.075)에 비하여 금 나노큐브에 더 쉽게 결합된다는 사실에 기인하는 것일 수 있다. 결합된 올리고펩티드가 훨씬 작은 수임에도 불구하고, $(Thr)_5$가 결합된 금 나노큐브가 $(Thr)_2$가 결합된 금 나노큐브(금 나노큐브 nm^2당 약 0.23)에 비하여 더 높은 IRI를 나타냈는데, $(Thr)_5$-Cys- 결합된 금 나노큐브가 $(Thr)_2$-Cys- 결합된 금 나노큐브에 비하여 더 많은 Thr 함량을 가질 수 있기 때문인 것으로 보인다. 이러한 결과는 하기의 분자동력학 시뮬레이션 결과와 잘 맞아 떨어졌다.

[0122] 금 나노큐브와 $(Thr)_5$-Cys- 결합된 금 나노큐브 사이의 얼음 결합성에서 이러한 큰 차이는 녹는점보다 크게 낮은 온도에서 급속하게 냉각할 때가 아닌, 녹는점에 근사한 온도에서 얼음을 연속적으로 그리고 천천히 결정화시키는 (재결정화 제외) 환경에서도 확인된다. 이를 위해, 본 발명자는 도 11a에 도시된 바와 같은 냉각 단계를 사용하였다. 특히, 펠티에 장치를 이용하여 온도를 국소적으로 - 20 ℃ 미만으로 낮추고, 다른 한쪽은 15~20 ℃으로 유지시켰다. 이런 방식으로 - 20 ℃부터 실온까지 4cm의 공간적인 온도 구배를 유도하였다. 상기 장비에 위치시킨 유리 미세유체 채널에 정제수를 투입하여 - 20 ℃에서 실온까지 영역에서 단일 결정형 얼음의 점진적인 성장을 유도하였다 (도 11b). 단색 명시야 편광 광학 현미경 (bright field polarized optical microscope, BFPOM) 이미지 (도 12)와 함께 입자 경계의 부재 (도 11b)는 성장하는 얼음의 단결정성을 입증한다.

[0123] 단일 결정성 얼음의 이러한 방향성 성장 동안, 금 나노큐브는 성장하는 얼음 결정으로부터 밀려나서 물과 얼음의 경계면에 무작위로 축적되었다 (도 11c, d). 반면, $(Thr)_5$-Cys-결합된 금 나노큐브는 성장하는 결정성 얼음에 끌려 들어갔다 (도 11e, f). 특히, $(Thr)_5$-Cys 결합된 금 나노큐브는 성장하는 얼음 결정에서 균일하게 분포됨을 확인하였다. 이러한 관점에서, AF(G)P 유래의 올리고펩티드 $(Thr)_5$는 얼음과 금 나노큐브의 계면간 접촉을 개선하여 IRI 효과를 증진시키는 핵심적인 역할을 하는 것으로 보인다. DFOM 이미지에서와 같이, 단량체 및 이량체의 $(Thr)_5$-Cys 결합된 금 나노큐브는 성장하는 얼음에 균일하게 분산되는 반면, 아무 것도 결합되지 않은 단량체부터 오량체에 걸친 금 나노큐브의 다양한 클러스터 모티프는 물/얼음 계면에 무작위로 응집되었다 (도 11, 도 13, 및 도 14).

[0124] $(Thr)_5$-Cys가 금 나노큐브 상에 불규칙하게 배열되었다는 사실은 AF(G)P의 항동결 모이어티와 대조된다. AF(G)P

의 항동결 모이어티의 규칙성은 얼음의 결정성과 효과적으로 부합된다 (Garnham, C. P.; Campbell, R. L.; Davies, P. L. Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 7363-7367.; Meister, K.; Lotze, S.; Olijve, L. L.; DeVries, A. L.; Duman, J. G.; Voets, I. K.; Bakker, H. J. Investigation of the ice-binding site of an insect antifreeze protein using sum-frequency generation spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1162-1167.; Hudait, A.; Odendahl, N.; Qiu, Y.; Paesani, F.; Molinero, V. Ice-nucleating and antifreeze proteins recognize ice through a diversity of anchored clathrate and icelike motifs. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4905-4912.; Nutt, D. R.; Smith, J. C. Dual function of the hydration layer around an antifreeze protein revealed by atomistic molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13066-13073.). 이와 같이, AF(G)P는 얼음 결정의 특정 평면과 결합할 수 있는 반면, AF(G)P가 결합된 금 나노큐브는, (Thr)*5*-Cys의 불규칙적인 공간상 배열로 인하여, 모든 얼음 결정 평면에 결합할 수 있다. AF(G)P가 결합된 금 나노큐브의 이러한 비특이적 결합은 단일 결정성 얼음의 평형-유사 방향성 성장 하에서 역동적인 얼음 형성 (dynamic ice shaping, DIS)의 부재로 확인할 수 있다: 성장하는 얼음과 물 사이의 경계선 (즉, 도 11e의 freezing front)은 초냉각된 곳에서 실온 영역으로 균등하게 성장한다. 반면 특정 얼음 평면 (즉, 프리즘 평면)에 결합하는 것으로 알려진 지르코늄 아세테이트(ZrAc)는 상응하는 얼음 결정 평면의 성장을 선택적으로 억제하여, DIS 결과, 물과 성장하는 얼음 사이의 경계면에서 톱니 모양이 형성되도록 한다 (도 15a-b). 수크로오스가 첨가된 DIS 분석은 본 발명에 따른 AF(G)P가 결합된 금 나노큐브에서 DIS의 부재를 보여준다 (도 15c). 성장하는 얼음의 뾰족한 돌출부는 세포나 조직을 파괴시킬 수 있기 때문에 (Ishiguro, H.; Rubinsky, B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology* **1994**, *31*, 483-500.; Wang, J. H. A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during lowtemperature preservation. *Cryobiology* **2000**, *41*, 1-9.), 전방향성으로 얼음 성장을 억제하는 것은 동결방지제를 사용하는 생물 의학적인 적용에서 장점으로 작용할 수 있다.

[0125] 상기와 같은, 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브와 성장하는 얼음의 계면에서의 개선된 상호작용을 MD 시뮬레이션을 통해 이론적으로 확인하였다. 도 11에서의 실제 실험 조건을 반영하도록 AA 시뮬레이션을 사용하였다. 도 16a에 도시된 바와 같이 아래에서 위쪽으로 성장하는 계속적인 얼음 성장 시스템을 설계하였다. 금 나노큐브는 성장하는 얼음 결정의 가장 빠른 성장 표면(1 1 2 0)으로 알려져 있는 2차 프리즘 평면(a secondary prism plane)에 위치시켰다. 성장하는 얼음 결정과 금 나노큐브 사이의 적절한 공간 (1 nm)을 통해 자유 접촉을 계속적으로 유도하면서 얼음-시딩 효과를 최소화할 수 있었다. 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브를 모방하기 위하여 $(Thr)_5$-Cys, $(Ser)_5$-Cys, $(Ala)_5$-Cys, 및 $(Gly)_5$-Cys 서열을 갖는 올리고펩티드를 금 나노큐브에 무작위로 부착시켰다. 아무 것도 부착되지 않은 금 나노큐브와 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브를 각각 268 K에서 300 ns동안 연속적인 얼음 성장 동안 관찰하였다.

[0126] 실험 결과와 마찬가지로, 아무 것도 부착되지 않은 금 나노큐브는 성장하는 얼음 결정에 의해 계속적으로 위쪽으로 밀려났으나, 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브는 얼음 결정에 직접적으로 흡수되어 얼음 성장을 강하게 저해하였다 (도 16a). 이와 같이, $(Thr)_5$-Cys- 결합된 금 나노큐브의 직접적인 흡수로 인해 저해된, 성장하는 얼음 평면은 더 굴곡지게 되어 Kelvin 효과가 유도되었다. 그러나 다른 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브는 268 K에서 성장하는 얼음 결정에 덜 흡수되었고, 유의미한 곡면 없이 평평한 동결면이 유지되었다. 사실, $(Thr)_5$-Cys 결합된 금 나노큐브의 z축 방향 이동은 거의 온전했고 (300 ns 동안 0.04 nm 이동), 이는 아무 것도 결합되지 않은 금 나노큐브(300 ns 동안 1.2 nm 이동) 또는 $(Ser)_5$-Cys/$(Gly)_5$-Cys 결합된 금 나노큐브(300 ns 동안 1.0 내지 1.2 nm 이동 이동)와 현저한 차이를 나타낸다. 한편, $(Ala)_5$-Cys 결합된 금 나노큐브는 300 ns 동안 0.8 nm의 보통의 이동을 나타냈다. 이러한 MD 시뮬레이션으로부터의 예측은 IRI 실험 결과와 잘 맞아 떨어졌다 (도 6). (Thr)*5*-Cys 결합된 금 나노큐브가 성장하는 얼음에 완전히 흡수되는 것은 온도를 268 K 에서 263 K로 낮춤으로써 일어났다 (도 17).

[0127] 또한 5mer-Thr/-Ser/-Ala/-Gly 올리고펩티드-결합된 금 나노큐브와 얼음 물 분자 사이의 결합 동안 자유 에너지 변화 (ΔG_{bind}) 및 수소 결합 수명을 측정하였다 (도 16c 및 d). IRI/얼음 결합성에 대한 실험적 분석 및 z축 방향의 이동에 대한 이론적 분석과 마찬가지로, 금 나노큐브 상의 Thr 어셈블리는 성장하는 얼음 결정에 흡수되는 동안 가장 큰 자유 에너지 감소 및 가장 긴 수소 결합 수명을 보여주었다: ΔG_{bind} 및 수소 결합 수명은 Thr, Ala, Ser 및 Gly 순서였다. 성장하는 얼음에 올리고펩티드가 결합된 금 나노큐브가 직접적으로 흡수되는 것은

수소 결합 및 소수성 잔기의 상호작용으로 인해 얼음의 성장을 상승적으로 억제함을 확인하였다.

[0128] MD 시뮬레이션을 통해, z축 방향 이동에서 n이 IRI에 미치는 영향을 확인하였다 (도 18). 금 나노큐브 상에 결합된 올리고펩티드의 표면 밀도를 고정하였을 때, $(Thr)_5$-Cys가 $(Thr)_2$-Cys 및 $(Thr)_7$-Cys에 비하여 현저한 효과를 나타내었다. 또한, $(Thr)_5$-Cys의 개수를 절반으로 한 경우에도 더 나은 성능을 보였다. 이러한 결과는 실험 결과와 완전히 일치한다.

[0130] **2.3 IRI 특성에 금 콜로이드 형태의 효과**

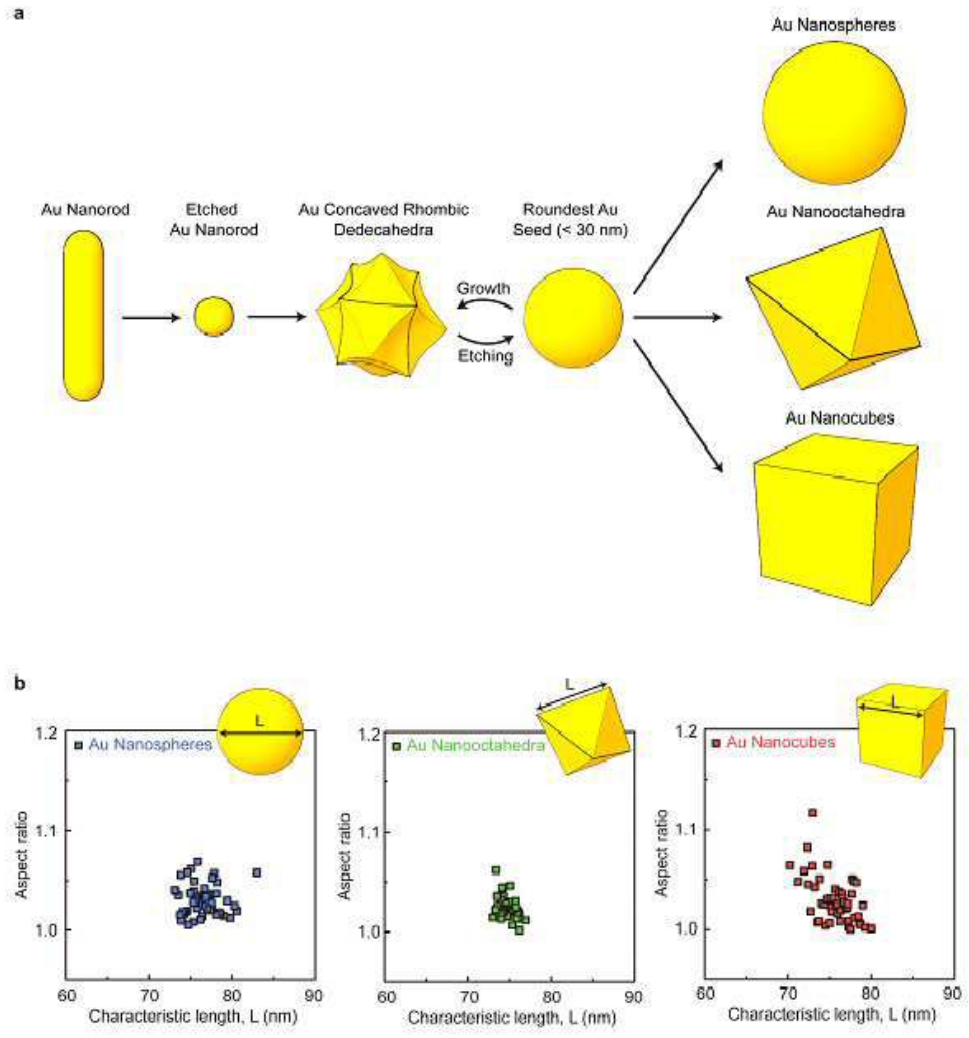
[0131] 금 콜로이드 모양이 IRI 효과에 미치는 영향을 평가하였다 (도 19). 상이한 형상의 금 콜로이드는 성장하는 얼음과 올리고 펩티드 어셈블리 간의 계면 접촉을 조절할 수 있다 (도 19a). 금 나노구체, 나노팔면체민 나노큐브의 크기는 75 nm로 모두 동일하고, $(Thr)_5$-Cys- 결합된 금 나노입자의 농도는 0.2 nM로 고정하였다. 도 19b에 도시된 바와 같이, IRI 효과는 금 나노큐브, 금 나노팔면체 및 금 나노구체의 순서로 낮아졌다. 이러한 실험 결과는 점 접촉에 비하여 면 접촉 시 성장하는 얼음과 $(Thr)_5$-Cys-결합된 금 콜로이드 사이의 계면 상호작용에 유리함을 설명한다.

[0132] 대규모의 AA MD 시뮬레이션을 통해 금 콜로이드 형태의 IRI 효과에 대한 영향을 더 입증하였다. $(Thr)_5$-Cys가 결합된 금 나노구체와 금 나노큐브 사이의 얼음 성장 저해를 비교하였다 (도 19c 및 d). MD 시뮬레이션에서 금 나노구체와 금 나노큐브는 동일한 공간에 균일하게 배치하였다. 268 K에서 100 ns동안의 연속적인 얼음 성장에서, 금 나노큐브 사이의 성장하는 얼음의 굴곡의 반경은 금 나노구체 사이보다 더 작게 나타났다. 이러한 현상은 금 나노큐브가 성장하는 얼음 결정에 금 나노구체에 비하여 더 잘 접촉할 수 있기 때문에 나타난다. 이와 같이, 금 나노큐브의 면 접촉은 금 나노구체의 점 접촉에 비하여 동결 제어에 유리하게 작용하는데, 이는 성장하는 얼음의 곡률 반경을 감소시킴으로써 Kelvin 효과를 통해 동결 온도를 더 크게 감소시기기 때문이다. $(Thr)_5$-Cys 결합된 금 나노큐브는 0.6 nM를 넘어서면서 0.01 ℃의 열 이력현상 (thermal hysteresis, TH)을 유도하기 시작하는 반면, 금 나노구체는 그렇지 않다 (도 20). 따라서, 콜로이드성 동결 방지제의 형태가 IRI 효과를 증폭시키는 중요한 역할을 함을 알 수 있다.

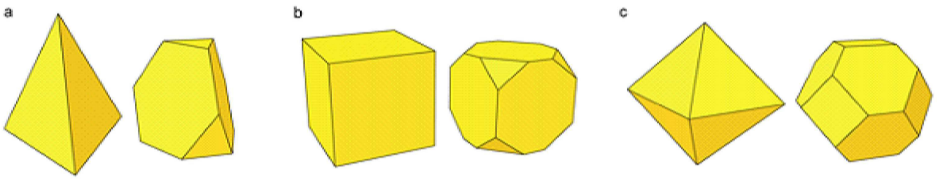
[0134] 예를 들어, 청구항 구성 목적을 위해, 이하 기재되는 청구항은 어떤 식으로든 이의 문자 그대로의 언어보다 좁게 해석되어선 안 되고, 따라서 명세서로부터의 예시적 구현예가 청구항으로 읽혀서는 안 된다. 따라서, 본 발명은 예시로서 기재되었고, 청구항의 범위에 대한 제한이 아님이 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명은 하기 청구항에 의해서만 제한된다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 발행된 특허, 특허 출원, 서적 및 저널 논문은 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 각각 포함된다.

도면

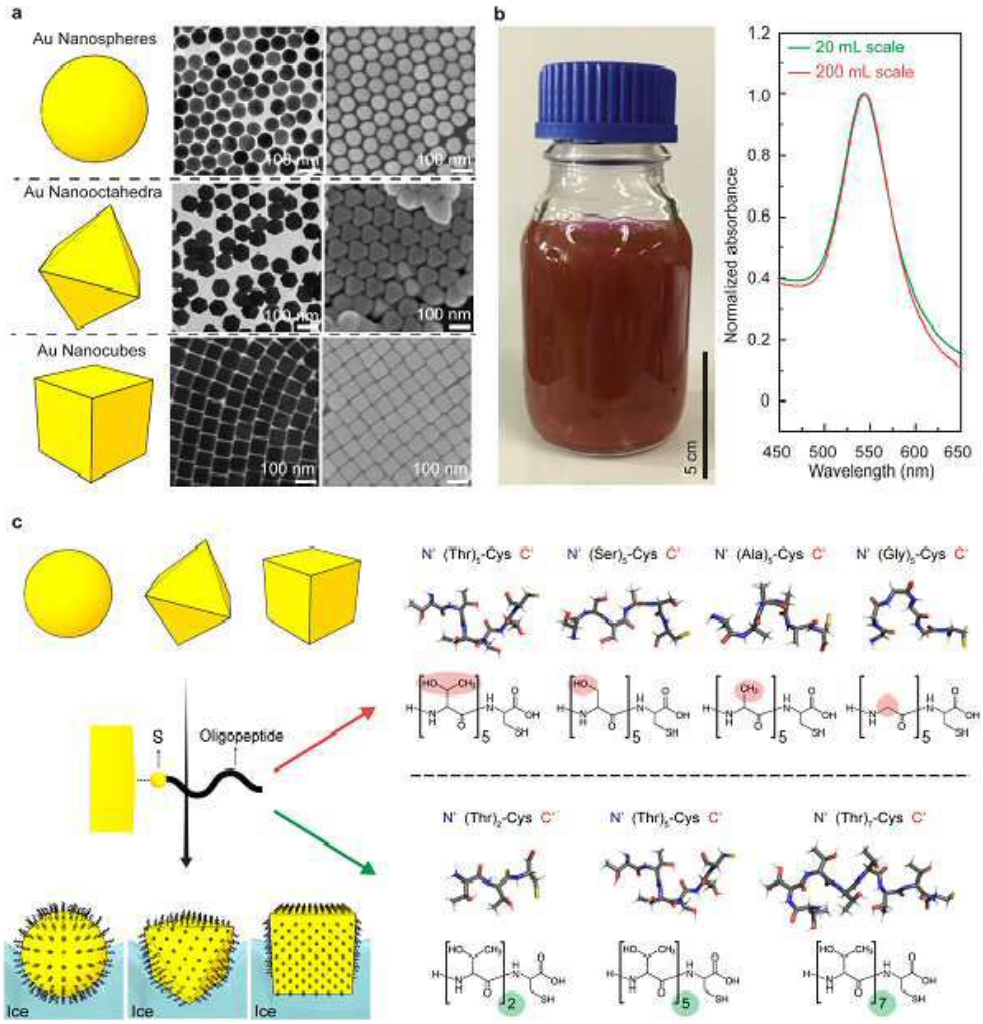
도면1a


a
Au Nanospheres
Au Nanorod
Etched
Au Nanorod
Au Concaved Rhombic
Dedecahedra
Roundest Au
Seed (< 30 nm)
Growth
Etching
Au Nanooctahedra
Au Nanocubes
b
L
Au Nanospheres
Au Nanooctahedra
Au Nanocubes
Aspect ratio
1.2
1.1
1.0
60
70
80
90
Characteristic length, L (nm)

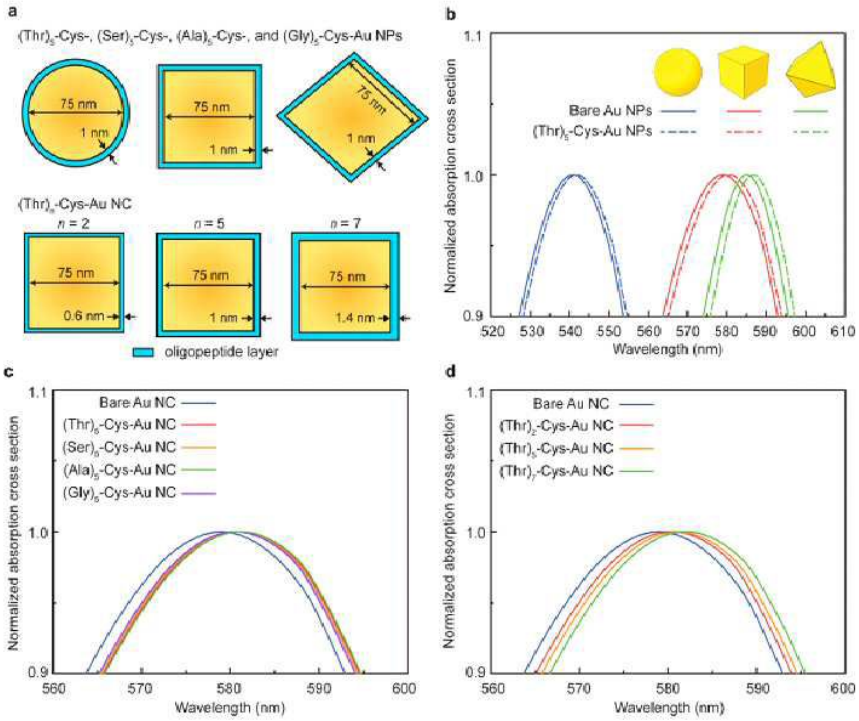
도면1b


a
b
c

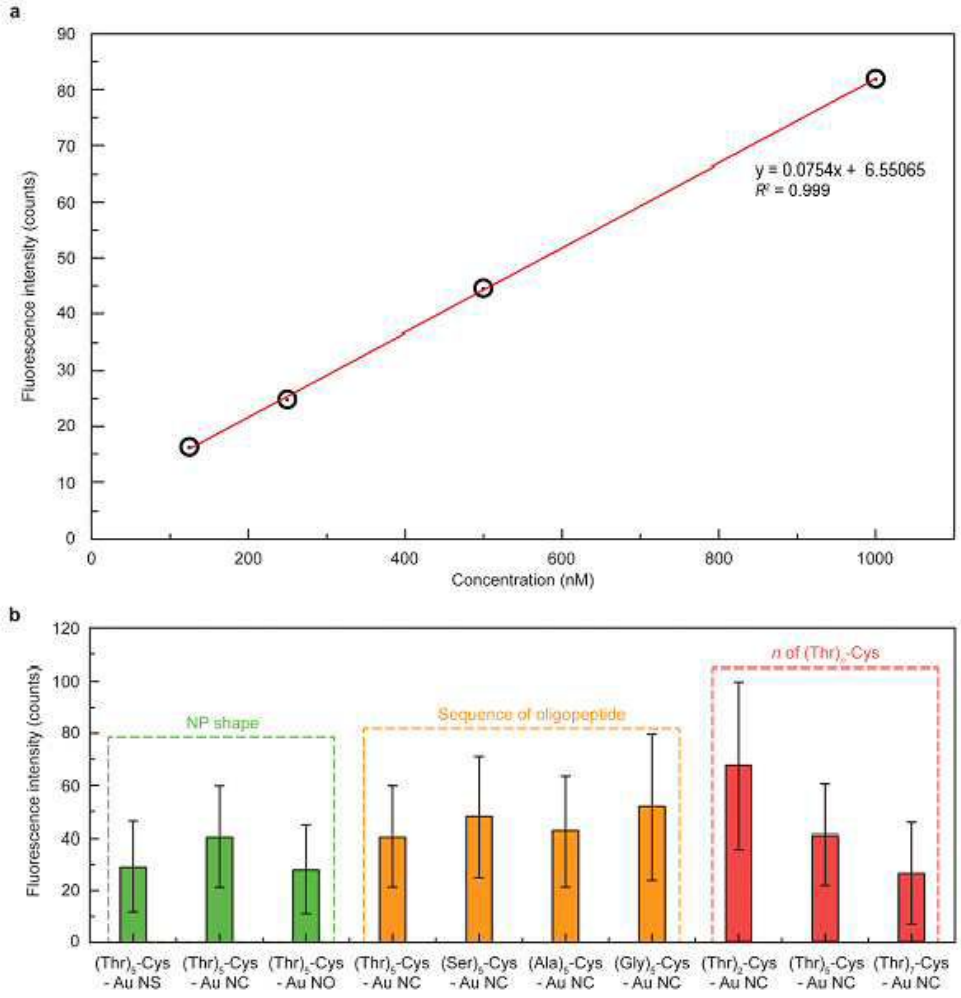
도면2


a
Au Nanospheres
Au Nanooctahedra
Au Nanocubes
100 nm
b
5 cm
20 mL scale
200 mL scale
Normalized absorbance
Wavelength (nm)
c
S
Oligopeptide
Ice
N' (Thr)2-Cys C'
N' (Ser)5-Cys C'
N' (Ala)5-Cys C'
N' (Gly)5-Cys C'
N' (Thr)2-Cys C'
N' (Thr)5-Cys C'
N' (Thr)7-Cys C'

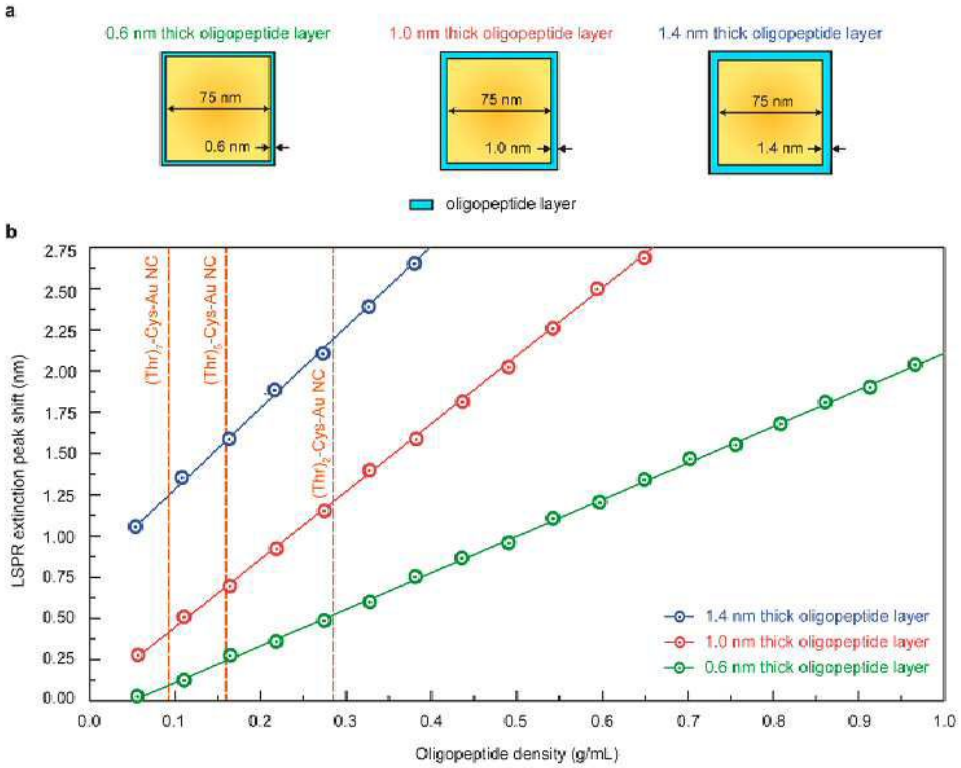
도면3


a
(Thr)5-Cys-, (Ser)5-Cys-, (Ala)5-Cys-, and (Gly)5-Cys-Au NPs
75 nm
1 nm
(Thr)n-Cys-Au NC
n = 2
n = 5
n = 7
0.6 nm
1.4 nm
oligopeptide layer
b
Bare Au NPs
(Thr)5-Cys-Au NPs
Normalized absorption cross section
Wavelength (nm)
c
Bare Au NC
(Thr)5-Cys-Au NC
(Ser)5-Cys-Au NC
(Ala)5-Cys-Au NC
(Gly)5-Cys-Au NC
d
Bare Au NC
(Thr)2-Cys-Au NC
(Thr)5-Cys-Au NC
(Thr)7-Cys-Au NC

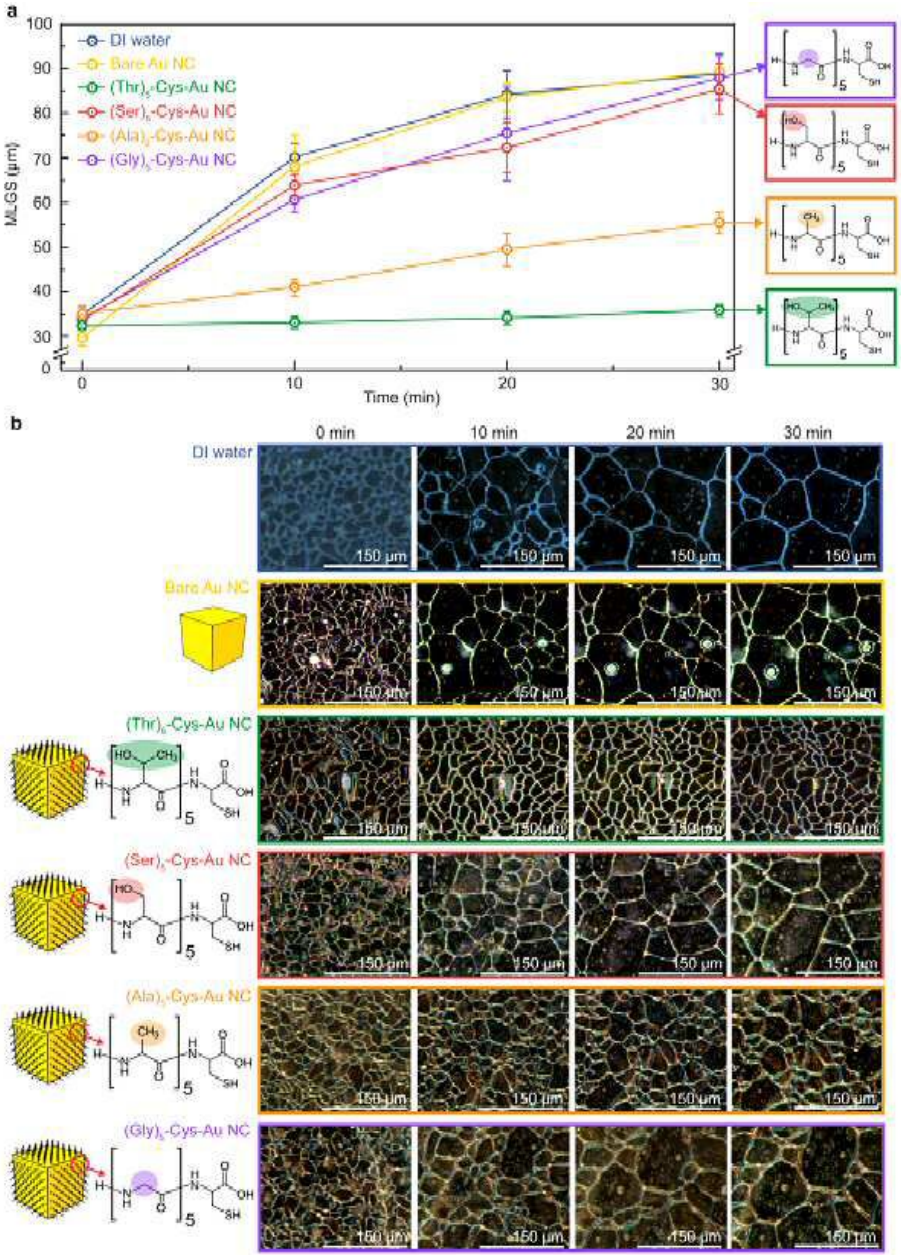
도면4


a
Fluorescence intensity (counts)
Concentration (nM)
y = 0.0754x + 6.55065
R² = 0.999
b
Fluorescence intensity (counts)
NP shape
Sequence of oligopeptide
n of (Thr)n-Cys
(Thr)6-Cys - Au NS
(Thr)6-Cys - Au NC
(Thr)6-Cys - Au NO
(Thr)6-Cys - Au NC
(Ser)6-Cys - Au NC
(Ala)6-Cys - Au NC
(Gly)6-Cys - Au NC
(Thr)12-Cys - Au NC
(Thr)9-Cys - Au NC
(Thr)7-Cys - Au NC

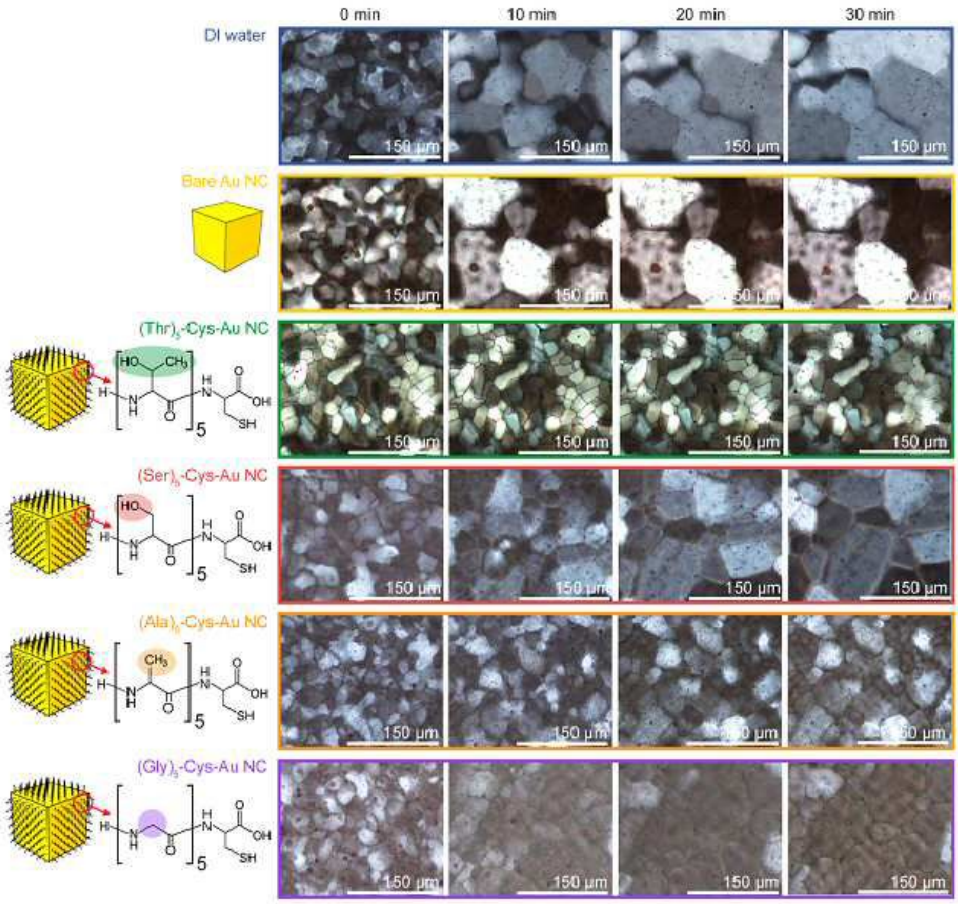
도면5


a
0.6 nm thick oligopeptide layer
1.0 nm thick oligopeptide layer
1.4 nm thick oligopeptide layer
75 nm
0.6 nm
1.0 nm
1.4 nm
oligopeptide layer
b
LSPR extinction peak shift (nm)
Oligopeptide density (g/mL)
(Thr)2-Cys-Au NC
(Thr)5-Cys-Au NC
(Thr)9-Cys-Au NC
1.4 nm thick oligopeptide layer
1.0 nm thick oligopeptide layer
0.6 nm thick oligopeptide layer

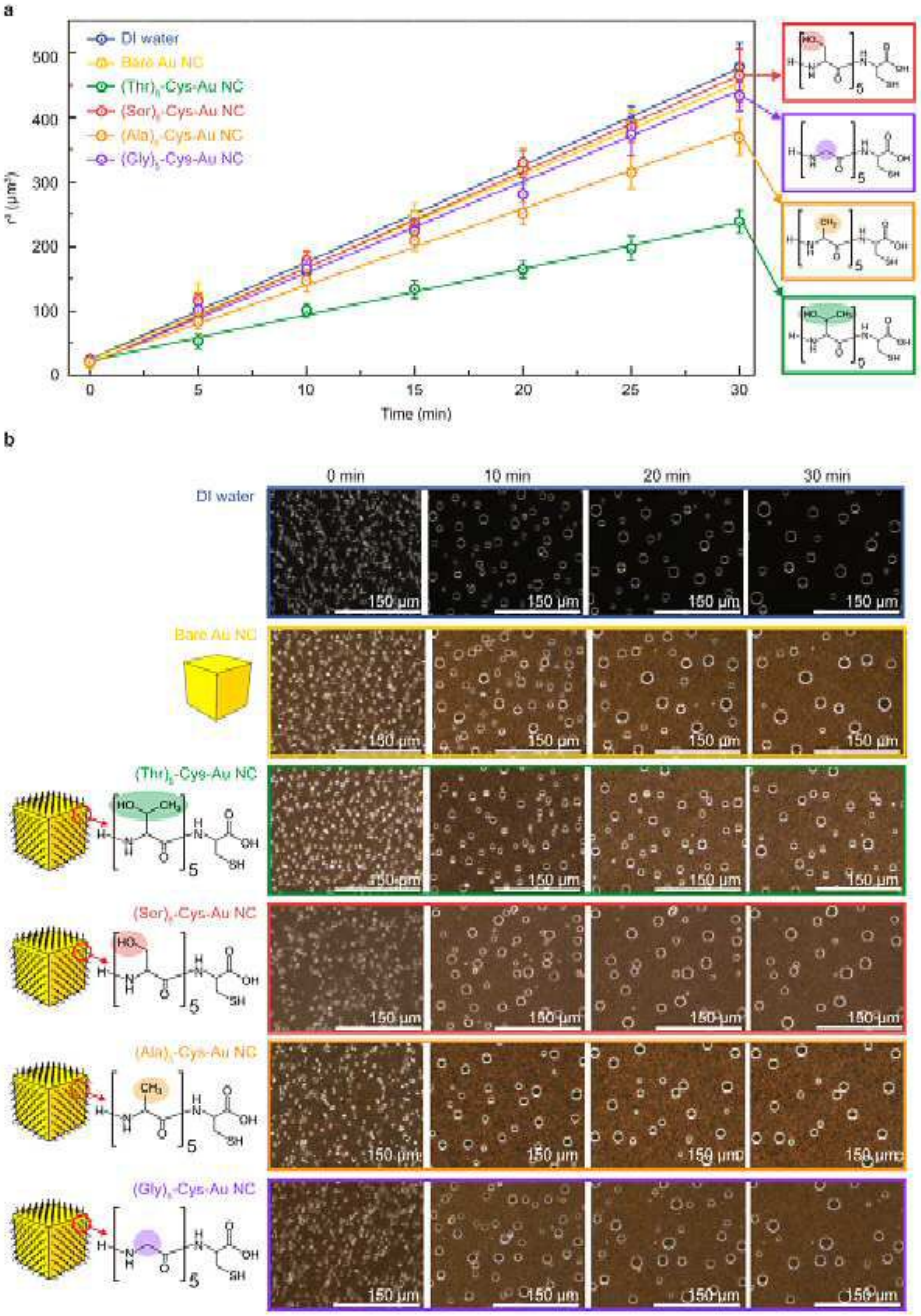
도면6


a
DI water
Bare Au NC
(Thr)5-Cys-Au NC
(Ser)5-Cys-Au NC
(Ala)5-Cys-Au NC
(Gly)5-Cys-Au NC
ML-GS (μm)
Time (min)
b
0 min
10 min
20 min
30 min
150 μm

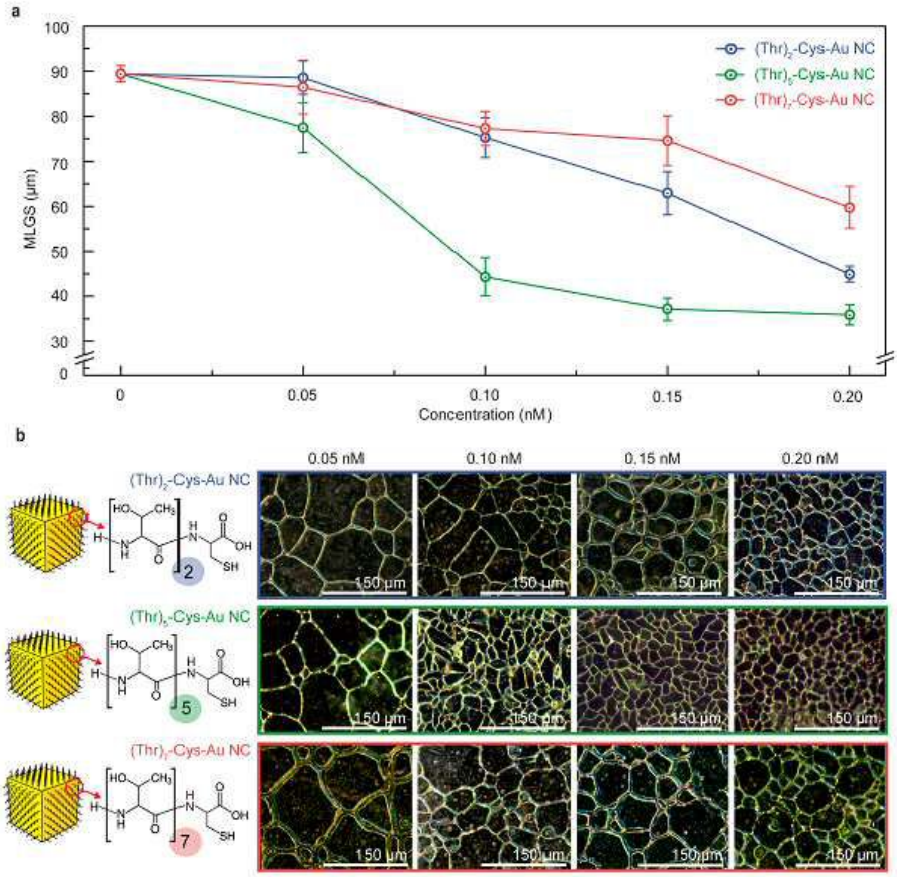
도면7


0 min
10 min
20 min
30 min
DI water
Bare Au NC
(Thr)5-Cys-Au NC
(Ser)5-Cys-Au NC
(Ala)5-Cys-Au NC
(Gly)5-Cys-Au NC
150 μm

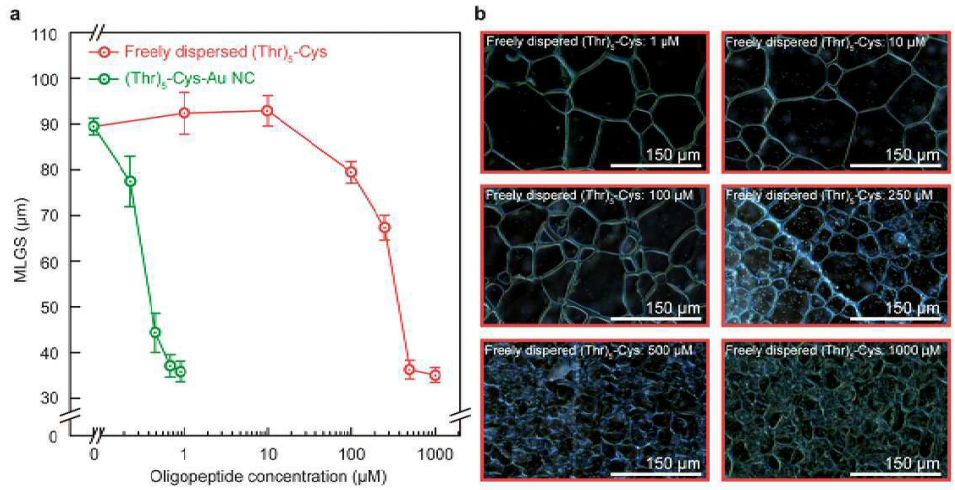
도면8


a
DI water
Bare Au NC
(Thr)5-Cys-Au NC
(Ser)5-Cys-Au NC
(Ala)5-Cys-Au NC
(Gly)5-Cys-Au NC
r² (μm²)
Time (min)
b
0 min
10 min
20 min
30 min
DI water
Bare Au NC
(Thr)5-Cys-Au NC
(Ser)5-Cys-Au NC
(Ala)5-Cys-Au NC
(Gly)5-Cys-Au NC
150 μm

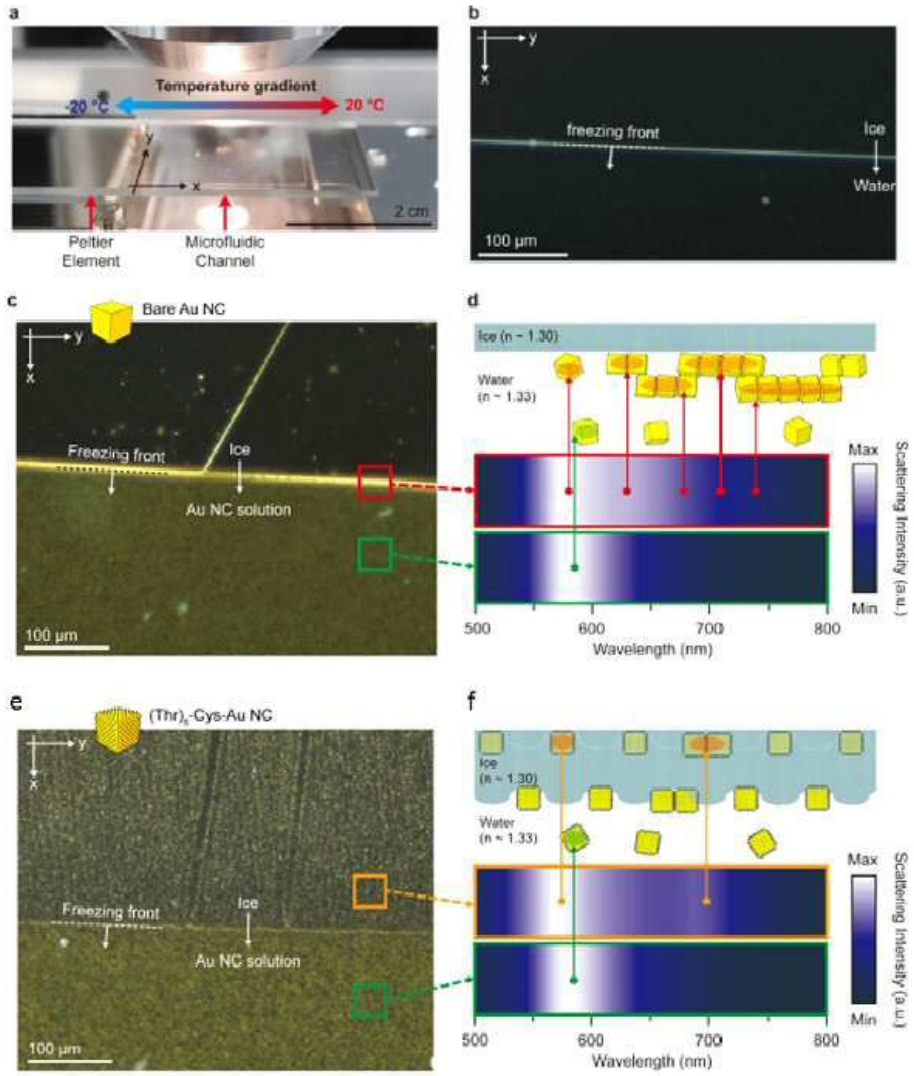
도면9


a
MLGS (μm)
Concentration (nM)
(Thr)2-Cys-Au NC
(Thr)5-Cys-Au NC
(Thr)7-Cys-Au NC
b
0.05 nM
0.10 nM
0.15 nM
0.20 nM
150 μm

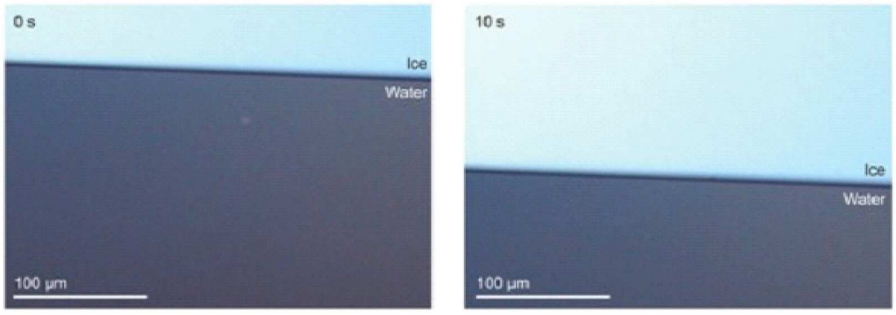
도면10


a
Freely dispersed (Thr)5-Cys
(Thr)5-Cys-Au NC
MLGS (μm)
Oligopeptide concentration (μM)
b
Freely dispered (Thr)5-Cys: 1 μM
Freely dispered (Thr)5-Cys: 10 μM
Freely dispered (Thr)5-Cys: 100 μM
Freely dispered (Thr)5-Cys: 250 μM
Freely dispered (Thr)5-Cys: 500 μM
Freely dispered (Thr)5-Cys: 1000 μM
150 μm

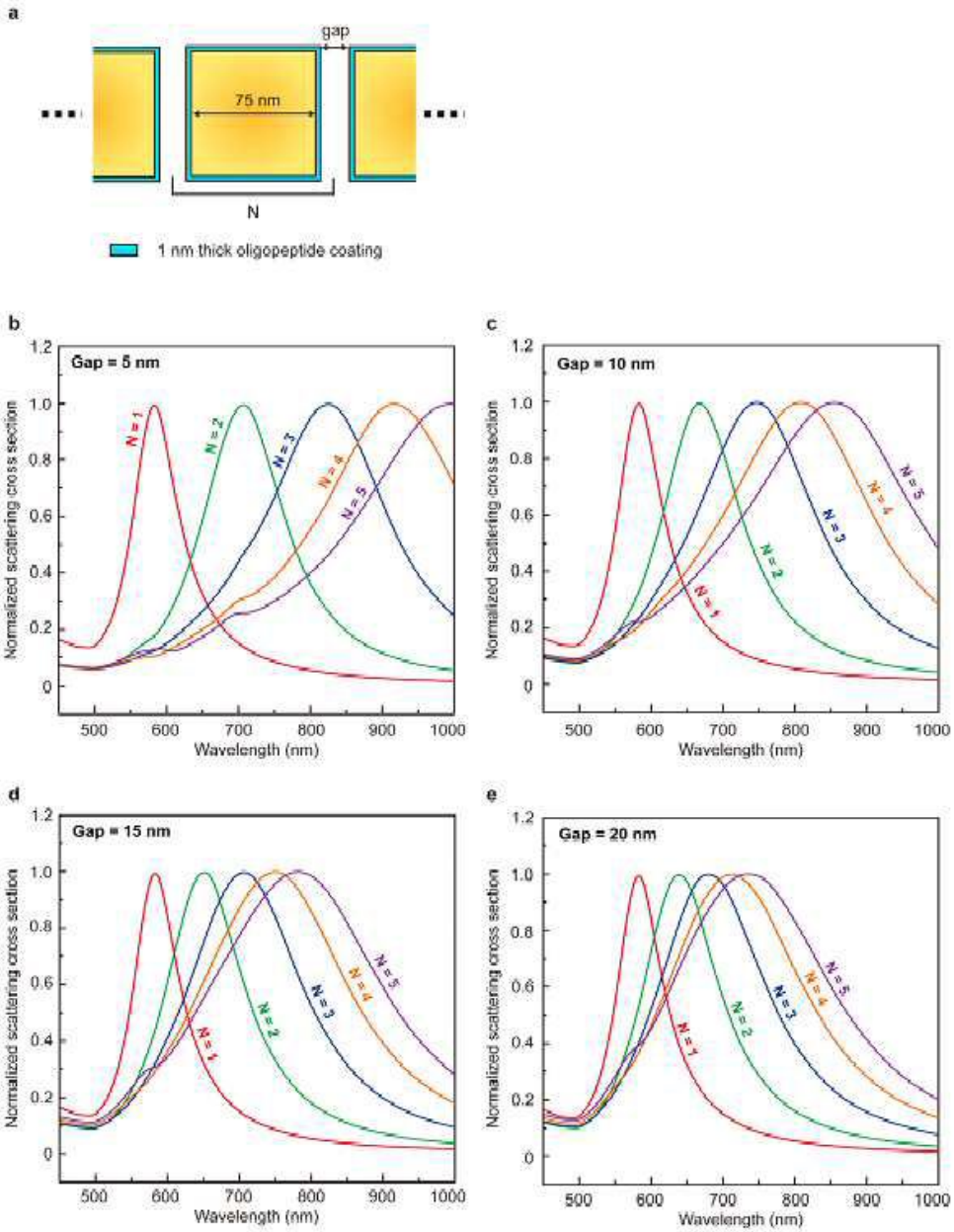
도면11


a
Temperature gradient
-20 °C
20 °C
y
x
2 cm
Peltier Element
Microfluidic Channel
b
y
x
freezing front
Ice
Water
100 μm
c
Bare Au NC
y
x
Freezing front
Ice
Au NC solution
100 μm
d
Ice (n ~ 1.30)
Water (n ~ 1.33)
Max
Min
Scattering Intensity (a.u.)
500
600
700
800
Wavelength (nm)
e
(Thr)6-Cys-Au NC
y
x
Freezing front
Ice
Au NC solution
100 μm
f
Ice (n ~ 1.30)
Water (n ~ 1.33)
Max
Min
Scattering Intensity (a.u.)
500
600
700
800
Wavelength (nm)

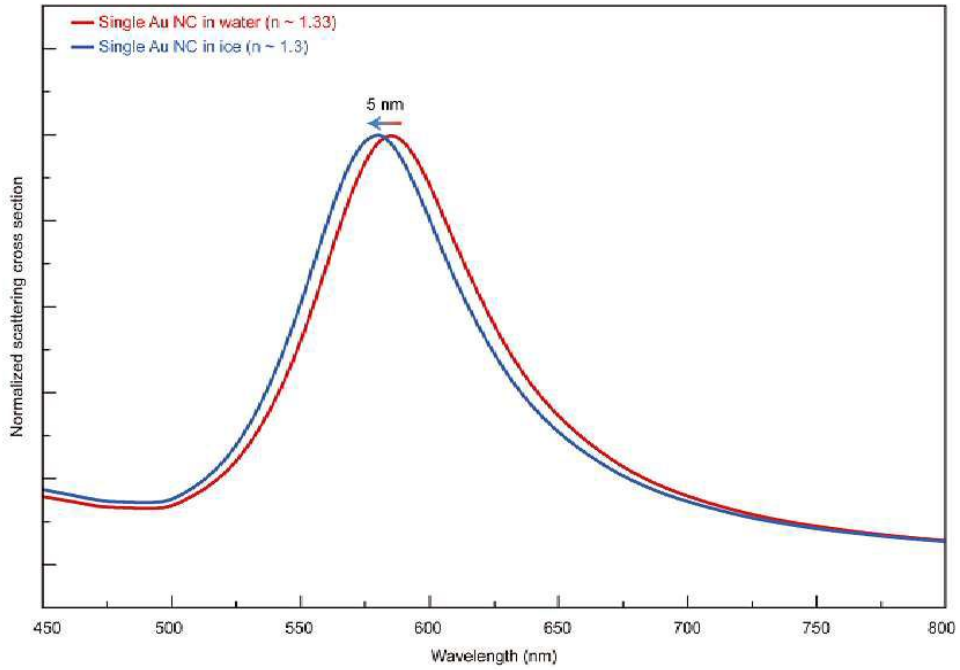
도면12


0 s
Ice
Water
100 μm
10 s
Ice
Water
100 μm

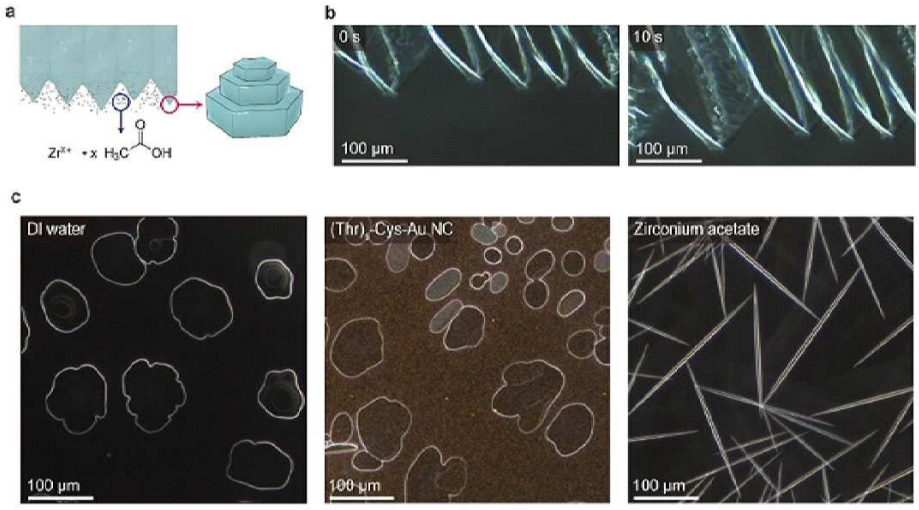
도면13


a
gap
75 nm
N
1 nm thick oligopeptide coating
b
Gap = 5 nm
c
Gap = 10 nm
d
Gap = 15 nm
e
Gap = 20 nm
Normalized scattering cross section
Wavelength (nm)
N = 1
N = 2
N = 3
N = 4
N = 5

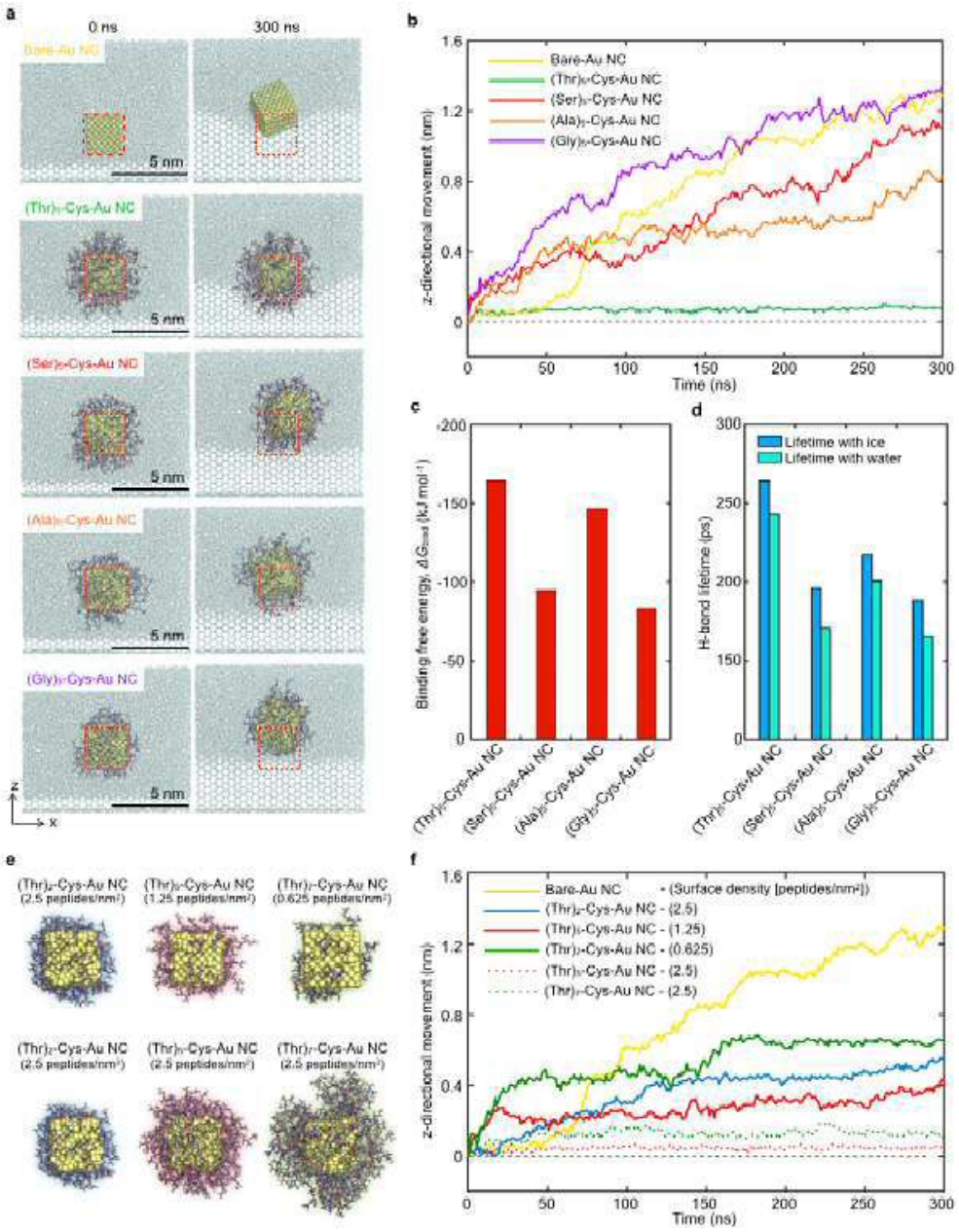
도면14


Single Au NC in water (n ~ 1.33)
Single Au NC in ice (n ~ 1.3)
5 nm
Normalized scattering cross section
450
500
550
600
650
700
750
800
Wavelength (nm)

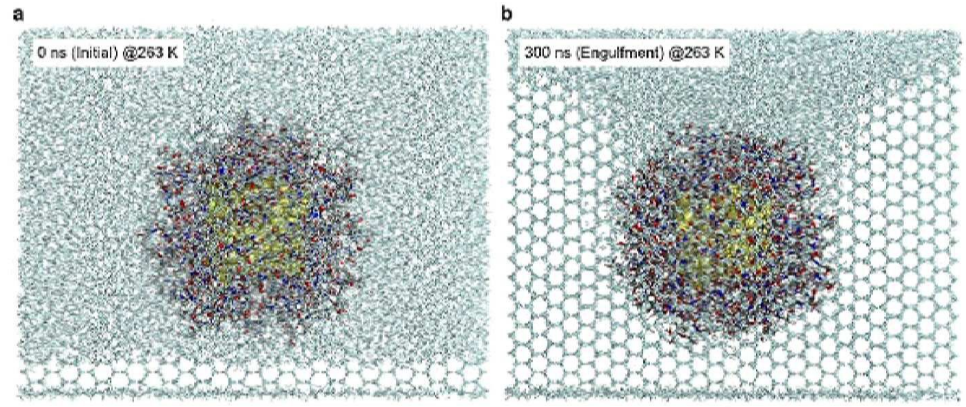
도면15


a
b
0 s
10 s
100 μm
100 μm
c
DI water
(Thr)$_x$-Cys-Au NC
Zirconium acetate
100 μm
100 μm
100 μm

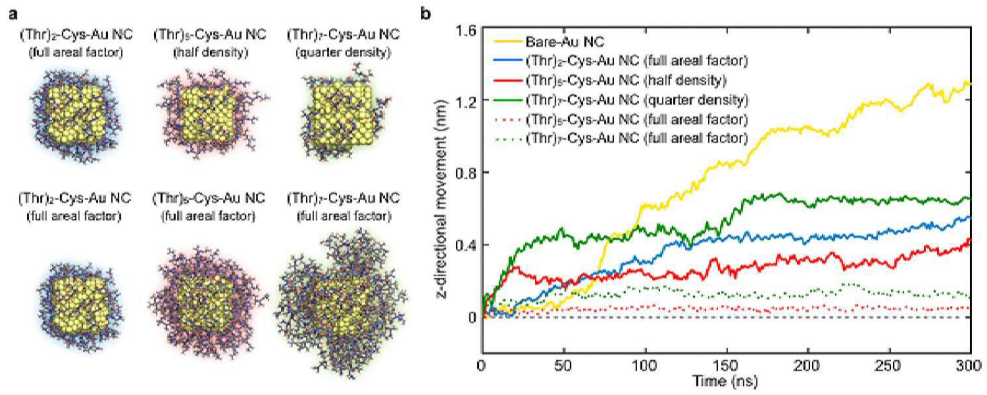
도면16


a
0 ns
300 ns
Bare-Au NC
(Thr)6-Cys-Au NC
(Ser)6-Cys-Au NC
(Ala)6-Cys-Au NC
(Gly)6-Cys-Au NC
5 nm
b
Bare-Au NC
(Thr)6-Cys-Au NC
(Ser)6-Cys-Au NC
(Ala)6-Cys-Au NC
(Gly)6-Cys-Au NC
z-directional movement (nm)
Time (ns)
c
Binding free energy, ΔGbind (kJ mol-1)
d
Lifetime with ice
Lifetime with water
H-bond lifetime (ps)
e
(Thr)2-Cys-Au NC (2.5 peptides/nm2)
(Thr)6-Cys-Au NC (1.25 peptides/nm2)
(Thr)7-Cys-Au NC (0.625 peptides/nm2)
f
Bare-Au NC
(Thr)2-Cys-Au NC - (2.5)
(Thr)6-Cys-Au NC - (1.25)
(Thr)7-Cys-Au NC - (0.625)
(Thr)6-Cys-Au NC - (2.5)
(Thr)7-Cys-Au NC - (2.5)
(Surface density [peptides/nm2])
z-directional movement (nm)
Time (ns)

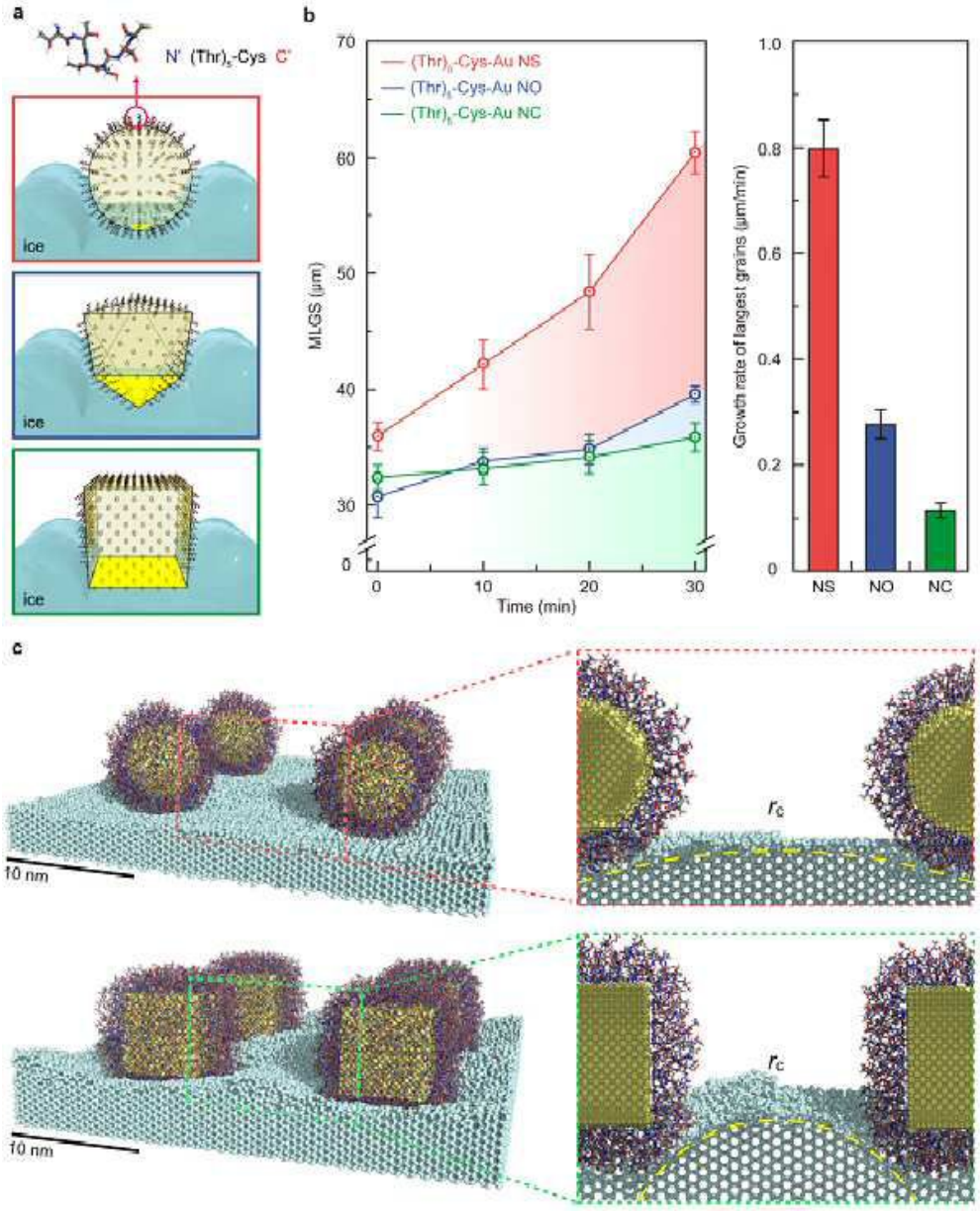
도면17


a
0 ns (Initial) @263 K
b
300 ns (Engulfment) @263 K

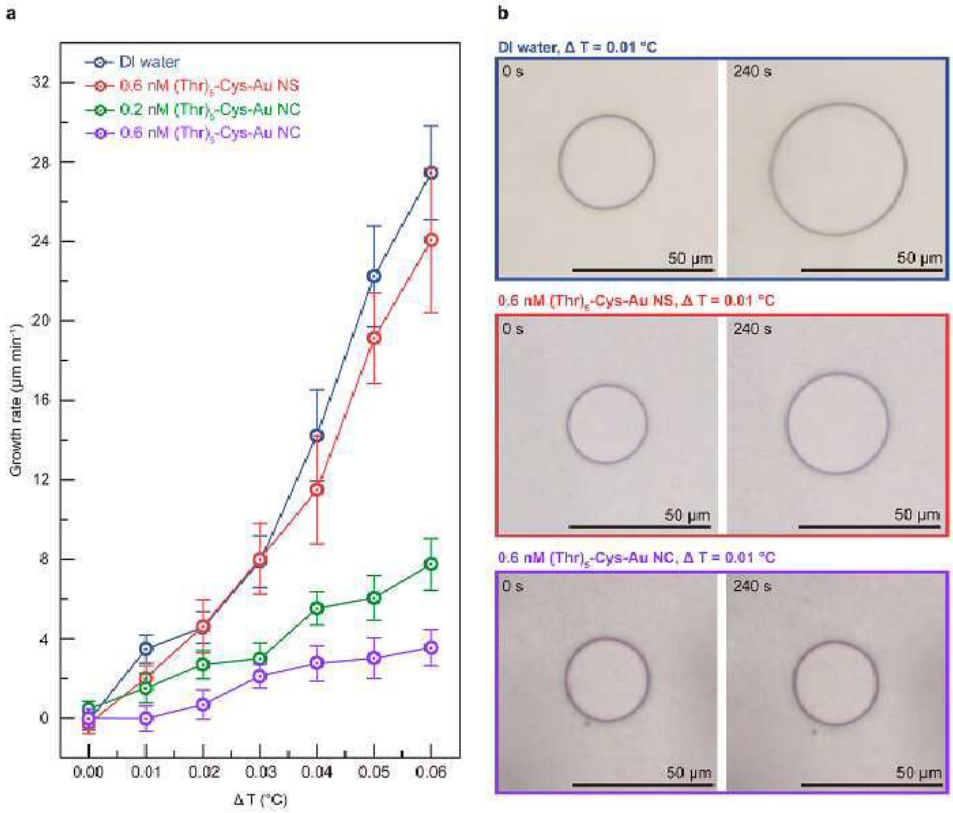
도면18


a
(Thr)2-Cys-Au NC (full areal factor)
(Thr)5-Cys-Au NC (half density)
(Thr)7-Cys-Au NC (quarter density)
(Thr)5-Cys-Au NC (full areal factor)
(Thr)7-Cys-Au NC (full areal factor)
b
Bare-Au NC
(Thr)2-Cys-Au NC (full areal factor)
(Thr)5-Cys-Au NC (half density)
(Thr)7-Cys-Au NC (quarter density)
(Thr)5-Cys-Au NC (full areal factor)
(Thr)7-Cys-Au NC (full areal factor)
z-directional movement (nm)
Time (ns)

도면19


a
N' (Thr)5-Cys C'
ice
ice
ice
b
(Thr)10-Cys-Au NS
(Thr)5-Cys-Au NO
(Thr)5-Cys-Au NC
MLGS (μm)
Time (min)
Growth rate of largest grains (μm/min)
NS
NO
NC
c
10 nm
rc
10 nm
rc

도면20


a
DI water
0.6 nM (Thr)5-Cys-Au NS
0.2 nM (Thr)5-Cys-Au NC
0.6 nM (Thr)5-Cys-Au NC
Growth rate (μm min-1)
ΔT (°C)
b
DI water, Δ T = 0.01 °C
0.6 nM (Thr)5-Cys-Au NS, Δ T = 0.01 °C
0.6 nM (Thr)5-Cys-Au NC, Δ T = 0.01 °C
0 s
240 s
50 μm