

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0065481

(43) 공개일자 2021년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 1/02 (2006.01) A23L 3/358 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 1/0221 (2013.01)

A23L 3/358 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0154268

(22) 출원일자 2019년11월27일

심사청구일자 2019년11월27일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

안동준

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

이상엽

서울특별시 양천구 목동중앙북로 38, 목동롯데캐슬위너아파트 109동 1305호

조용호

서울특별시 동대문구 무학로 44길 47-7, 지하1층 B1호(제기동)

(74) 대리인

특허법인리체

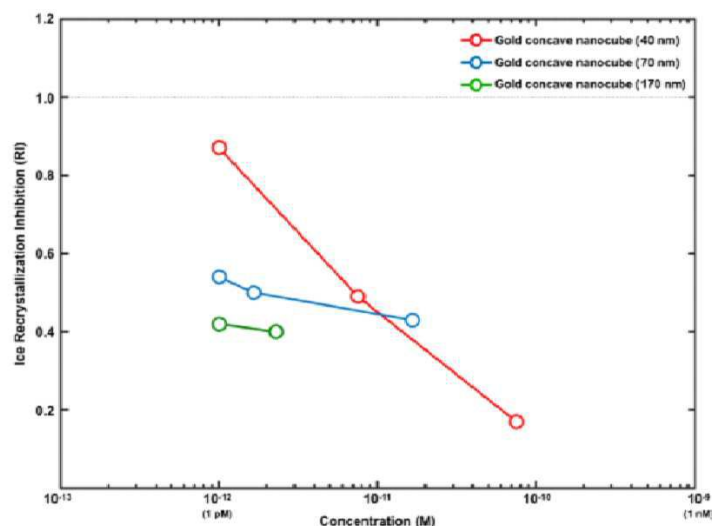
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 결빙 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 적어도 일부분이 오목한 금 나노 구조체를 포함함으로써, 얼음 재결정 억제 효과가 우수하여, 세포 동결 보존 시, 세포의 생존율을 높일 수 있으며, 식품의 동결에 사용시에도 그 식품의 식감을 유지할 수 있도록 하는 결빙 억제용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도30



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/206 (2013.01)

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

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 일부분이 오목한 금 나노 구조체를 포함하는 결빙 억제용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 구조체는 적어도 일면이 오목한 부위를 갖는 것으로서, 사면체, 육면체, 팔면체, 십면체, 십이면체, 이십면체, 사육면체(tetrahexahedron), 육팔면체(hexoctahedron), 마름모십이면체, 원통형, 안장형 또는 캡형인, 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 구조체는 적어도 일면이 오목한 부위를 갖는 것으로서, 구조체는 적어도 일면이 오목한 부위를 갖는 것으로서, 사면체, 육면체, 팔면체, 십면체, 십이면체, 이십면체, 사육면체(tetrahexahedron), 육팔면체(hexoctahedron) 또는 마름모십이면체인, 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 구조체는 크기가 10nm 내지 1000nm인, 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 오목한 부위의 표면 곡률의 절대값이 $0.1 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ 내지 $5 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ 인, 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 구조체는 그 표면이 개질되어 친수성이 증가된 것인, 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 세포 또는 조직 동결용 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 식품 동결용 조성물.

청구항 9

청구항 7의 조성물 존재 하에 대상 세포 또는 조직을 영하의 온도에 노출시키는 단계를 포함하는 세포 또는 조직의 동결 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 결빙 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 저온보호제 (cryoprotective agent) (CPA)는 용액에 존재할 때 0℃ 아래의 온도에 노출된 용액에서 얼음 결정 형성을 감소 또는 저해시킬 수 있는 화합물이다. 현재의 CPA는 소분자 (종종 침투성 CPA로서 지칭됨), 합성 폴리머, 및 동결방지제 단백질을 포함한다.

[0004] 장기 이식은 현재 생존율, 삶의 질, 및 비용 효과의 면에서 말기 장기 부전에 대한 최선의 치료법이다. 불행하게도, 장기 이식물의 공급과 수요 사이에 가파른 간격이 존재하며, 이는 쇠약하게 하는 질환을 갖는 환자가 오랜 기간 대기 시간에 걸쳐 낮은 삶의 질을 겪게 만드는 중대한 의료 장벽 중 하나이다. 장기의 뚜렷한 결여는 신뢰할 수 있는 보존 방법의 부재로부터의 상당한 폐기물로 인한 것이다. 실제로, 폐, 췌장, 및 심장의 50% 초과가 사망한 기증자로부터 수확되지 않은 채로 남는다.

[0005] 장기를 적절하게 보존하기 위해서, 장기를 보존 용액으로 씻어서 혈액을 제거하고 장기를 안정화시켜야 한다. 보존 용액 중에 안정화시킨 후에도, 기증자로부터의 제거 후에 장기 할당, 수송, 및 이식에 이용가능한 시간은 제한적이다 (~6-12 시간). 이러한 작은 시간은 대부분의 장기가 지역 환자에게로 가는 것을 초래하며, 그 이유는 원격 환자 매치는 종종 제한된 시간 안에 확인될 수 없기 때문이다. 이러한 부족의 결과로서 및 사람의 장기의 판매를 금지하는 거의 모든 나라에 존재하는 법에도 불구하고, 불법 장기 거래 및 인신 매매가 증가하여 수요를 공급해 왔다.

[0006] 장기 보존에서 사용되는 현재의 침투성 CPA는 일반적으로 특히 에틸렌 글리콜, 1,2-프로판디올, 디메틸 술폭시드, 포름아미드, 글리세롤, 수크로스, 락토스, 및 D-만니톨을 포함한다. 장기 보존 온도에서 얼음 결정 성장을 감소 또는 저해시키기 위해서, 침투성 CPA의 유효 농도는 매우 높아야 한다 (60% 이상이 종종 요구된다). 그러한 높은 농도에서 이들 화합물은 그들이 보존하려고 시도하는 조직에 독성일 수 있고, 이식 전 가온 (warming) 시에 CPA의 대량 제거는 비가역적인 세포사를 초래할 수 있다.

[0007] 얼음 결정 형성을 감소 또는 저해시키는데 사용되는 기타 CPA는 합성 폴리머 및 동결방지제 단백질을 포함한다. 침투성 CPA와 유사하게, 이들 각각은 그들의 결점을 갖는다. 예를 들어, 합성 폴리머는 세포 막을 침투할 수 없다. 따라서, 합성 폴리머 CPA는 오직 세포의 얼음 형성만을 제어할 수 있다. 생물 샘플을 효과적으로 보존하기 위해서, 얼음 결정 형성은 세포 내부 및 외부 둘다에서 제어되어야 한다. 자연적으로-발생하는 동결방지제 단백질, 예컨대 어류, 식물, 또는 곤충에서 단리된 단백질은 얼음 형성을 방지하는데 고도로 효과적이지만, 현재 이용가능한 동결방지제 단백질은 순도가 낮고 엄청나게 비싸다. 부가적으로, 생물 샘플을 보존하기 위한 동결방지제 단백질의 사용은 면역원성의 잠재적 공급원을 도입한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1681973호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 결빙 억제용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 세포의 생존률을 높이기 위한 세포 또는 조직 동결용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 식품의 동결 시에도 식감을 유지할 수 있는 식품 동결용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 1. 적어도 일부분이 오목한 금 나노 구조체를 포함하는 결빙 억제용 조성물.

[0015] 2. 위 1에 있어서, 상기 구조체는 적어도 일면이 오목한 부위를 갖는 것으로서, 사면체, 육면체, 팔면체, 십면체, 십이면체, 이십면체, 사육면체(tetrahexahedron), 육팔면체(hexoctahedron), 마름모십이면체, 원통형, 안장형 또는 캡형인, 조성물.

[0016] 3. 위 1에 있어서, 상기 구조체는 적어도 일면이 오목한 부위를 갖는 것으로서, 구조체는 적어도 일면이 오목한 부위를 갖는 것으로서, 사면체, 육면체, 팔면체, 십면체, 십이면체, 이십면체, 사육면체(tetrahexahedron), 육팔면체(hexoctahedron) 또는 마름모십이면체인, 조성물.

[0017] 4. 위 1에 있어서, 상기 구조체는 크기가 10nm 내지 1000nm인, 조성물.

[0018] 5. 위 1에 있어서, 상기 오목한 부위의 표면 곡률의 절대값이 $0.1 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ 내지 $5 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ 인, 조성물.

[0019] 6. 위 1에 있어서, 상기 구조체는 그 표면이 개질되어 친수성이 증가된 것인, 조성물.

[0020] 7. 위 1 내지 6 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 세포 또는 조직 동결용 조성물.

[0021] 8. 위 1 내지 6 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 식품 동결용 조성물.

[0022] 9. 위 7의 조성물 존재 하에 대상 세포 또는 조직을 영하의 온도에 노출시키는 단계를 포함하는 세포 또는 조직의 동결 방법.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 조성물은 얼음 재결정 억제 효과가 우수하다. 이에, 이를 통해 세포 동결 보존 시, 세포의 생존률을 높일 수 있으며, 식품의 동결에 사용시에도 그 식품의 식감을 유지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1 내지 3은 금속 나노 구조체의 결빙 억제 시뮬레이션 결과이다.

도 4는 금 나노큐브를 제조하는 개략도이다.

도 5는 제조된 금 나노큐브, 금 나노캡, 금 구형 입자의 스펙이다.

도 6은 제조된 금 나노큐브의 SEM, TEM 이미지이다.

도 7은 제조된 금 나노큐브의 크기를 나타낸 것이다.

도 8은 제조된 금 나노큐브의 흡수 스펙트럼이다.

도 9는 제조된 금 나노큐브의 사진이다.

도 10은 제조된 금 나노큐브의 입자 크기 분포이다.

도 11은 제조된 금 나노캡의 현미경 이미지이다.

도 12는 제조된 금 나노캡의 농도 및 입자 크기 분포를 나타낸 것이다.

도 13은 금 구형 입자를 제조하는 개략도 및 제조된 금 구형 입자의 현미경 이미지이다.

도 14는 금 나노큐브의 표면 개질에 의해 화합물의 선프하이드릴 피크가 사라지는 것을 나타내는 FTIR 결과이다.

도 15 내지 17은 표면 개질에 의해 금 나노큐브의 흡수 스펙트럼에 변화가 일어남을 나타낸 것이다.

도 18은 금 나노큐브가 HSC-3 세포 내부로 삽입되는 것을 확인할 수 있는 이미지이다.

도 19 내지 26은 금 나노구조체의 얼음 재결정 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 27은 얼음 재결정 억제 효과를 수치화하는 개략도이다.

도 28 내지 32는 금 나노구조체의 얼음 재결정 억제 효과의 수치화 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0029]

본 발명은 결빙 억제용 조성물에 관한 것이다.

[0030]

얼음 결정은 얼음 재결정화를 통해 성장할 수 있는데, 이는 작은 얼음 결정으로부터 더 큰 얼음 결정으로 성장하는 과정을 의미하고, 이 성장은 오스왈드 숙성 (Ostwald ripening) 메커니즘을 따라 일어난다. 오스왈드 숙성 (Ostwald ripening)은 상온 및 결정 사이 표면 에너지 차이로 인한 압력으로 인해 용해-확산-재동결 또는 승화-확산-응축 메커니즘으로 진행될 수 있다. 다시 말하자면, 얼음 결정의 성장은 얼음끼리 붙어서 성장하는 것이 아니라, 작은 얼음 결정이 결정 사이에서 용해되어 큰 얼음 결정 쪽으로 확산된 후 큰 얼음 결정의 일부가 되어 재동결되면서 일어나게 된다.

[0031]

결빙 억제는 얼음이 형성되지 않도록 하거나 얼음 형성 속도를 늦추거나, 얼음의 재결정화가 되지 않도록 하거나, 얼음 재결정화 속도를 늦추거나, 얼음 결정의 크기를 작게 유지하는 작용을 의미한다.

[0032]

본 발명의 결빙 억제용 조성물은 적어도 일부분이 오목한 금 나노 구조체를 포함한다.

[0033]

도 2에 예시된 바와 같이, 적어도 일부분이 오목한 금 나노 구조체는 얼음 결정 성장면과 접하는 경우에 그 오목한 부위와 맞닿은 면은 얼음이 성장하지 않고 액상 물층이 형성되고, 오목한 부위의 외부로 얼음이 밀려나면서 해당 부분에 결빙 억제 효과가 나타날 수 있다.

[0034]

금 나노 구조체는 적어도 일면이 오목한 부위를 갖는 것으로서, 오목한 부위를 가지면 적어도 그 부분에서는 결빙 억제 효과가 나타날 수 있으므로, 적어도 일면의 적어도 일부가 오목한 부위를 갖는 것이면 되고, 오목한 부위는 일면 이상, 전체면 이하에 존재할 수 있다.

[0035]

금 나노 구조체는 예를 들면 사면체, 육면체, 팔면체, 십면체, 십이면체, 이십면체, 사육면체 (tetrahexahedron), 육팔면체(hexoctahedron), 마름모십이면체, 원통형, 안장형(saddle) 또는 캡형 등의 구조를 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036]

금 나노 구조체는 예를 들면 크기가 10nm 내지 1000nm일 수 있고, 구체적으로 20nm 내지 800nm, 보다 구체적으로 40nm 내지 700nm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 금 나노 구조체가 다면체인 경우 상기 크기는 한 변의 길이일 수 있고, 캡형인 경우 상기 크기는 지름일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 금 나노 구조체가 다면체인 경우 크기는 20nm 내지 200nm일 수 있고, 캡형인 경우 크기는 10nm 내지 1000nm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037]

금 나노 구조체는 예를 들면 오목한 부위의 표면 곡률의 절대값이 $0.1 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ 내지 $5 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ 일 수 있고, 구체적으로 $0.3 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ 내지 $3 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038]

금 나노 구조체는 그 표면에 작용기로서 트리메틸암모늄클로라이드세틸기, 또는 트리메틸암모늄브로마이드 세틸기를 가지는 것일 수 있다.

[0039]

또한, 금 나노 구조체는 표면이 개질되어, 친수성, 소수성 또는 양쪽성 작용기를 가질 수 있다. 그러한 경우에 결빙 억제 효과가 감소 또는 증가되어 결빙을 보다 세밀하게 조절할 수 있다.

[0040]

친수성 작용기는 예를 들면 히드록시기, 카르복시기, 아미노기, 카르보닐기, 포스페이트기, 암모늄기, 에스테르기, 이미드기, 티오이미드기, 케토기, 에터기, 인덴기, 설포닐기, 폴리에틸렌글리콜기 등을 들 수 있고, 소수성 작용기는 예를 들면 C1 내지 C30의 알킬기, C3 내지 C30의 사이클로알킬기, C6 내지 C30의 아릴기, C2 내지 C30의 헤테로아릴기, 할로젠기, C1 내지 C30의 에스테르기, 할로젠 함유기 등을 들 수 있고, 양쪽성 작용기는 예를 들면 히드록시C1-C10알킬기, 쓰레오닌을 포함하는 펩타이드 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아

니다.

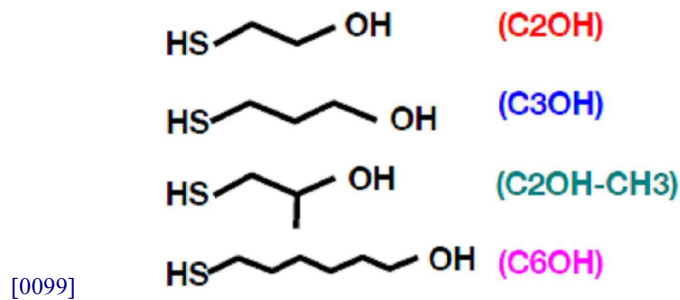
- [0041] 상기 작용기들은 예를 들어, 상기 친수성, 소수성 또는 양쪽성 작용기 및 말단에 -SH 작용기를 갖는 화합물로 금 나노 구조체 표면을 개질시켜 금 나노 구조체 표면에 형성된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 세포 또는 조직 동결용 조성물에 관한 것이다.
- [0044] 세포 또는 조직의 동결 보존하면, 이후 사용하고자 할 때 동결된 세포 또는 조직을 녹이는 과정에서 얼음 재결정화는 세포막을 손상시키고 세포 탈수를 진행시킴으로 인해 세포 및 조직에 손상을 입힌다. 저온 환경에 사는 유기체들은 얼음 재결정화로 인해 더 쉽게 손상을 받을 수 있다.
- [0045] 본 발명의 조성물은 통상 보존을 위해 동결하여 사용하는 모든 세포가 그 적용대상이 될 수 있으며, 예를 들면 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.
- [0046] 또한 조직으로는 마찬가지로 보존을 위해 동결하여 사용하는 모든 조직이 그 적용대상이 될 수 있으며, 예를 들면, 각막, 신장, 심장, 소장, 췌장, 폐, 간 등 모든 조직이 제한없이 사용될 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 상기 조성물 존재 하에 대상 세포 또는 조직을 영하의 온도에 노출시키는 단계를 포함하는 세포 또는 조직의 동결 방법에 관한 것이다.
- [0049] 상기 조성물 존재 하에 대상 세포 또는 조직을 동결시키는 경우에, 이후 해동시에 얼음 재결정을 저해하여 세포 또는 조직이 손상되는 것을 방지할 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 식품 동결용 조성물, 그리고 상기 조성물 존재 하에 식품을 영하의 온도에 노출시키는 단계를 포함하는 식품의 동결 방법에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명의 조성물은 모든 냉동 식품에 적용될 수 있으며, 이를 사용하면 해동시에 그 음식의 식감이 방지되는 것을 최소화 할 수 있다.
- [0054] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.
- [0056] **실시예**
- [0057] **1. 시뮬레이션**
- [0058] 입자의 표면 형태에 따른 얼음성장 차이를 알아보기 위해 전산모사 시뮬레이션을 진행하였다. 소재는 오목한 면을 갖는 정육면체 금 나노입자와 볼록한 면을 갖는 구형 금 나노입자를 사용하였다(도 1).
- [0059] 그 결과, 오목한 면을 갖는 정육면체 금 나노입자는 그 오목한 부위와 맞닿은 면은 얼음이 성장하지 않고 액상 물층이 형성되고, 오목한 부위의 외부로 얼음이 밀려나면서 해당 부분에 결빙 억제 효과가 나타났지만, 구형 금 나노입자는 그렇지 않았다(도 2, 3).
- [0061] **2. 금 나노 구조체의 제조**
- [0062] **(1) 오목한 면을 갖는 금 나노큐브(Gold Concave Nanocube (AuCC))**
- [0063] 제조에 사용된 재료는 하기와 같다.
- [0064] - Sodium borohydride (NaBH_4), $\geq 98.0\%$

- [0065] - Gold(III) chloride hydrate (HAuCl_4), $\geq 99.9\%$
- [0066] - Cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) 용액, 25 wt% in H_2O
- [0067] - Silver nitrate (AgNO_3), 99.9999%
- [0068] - Hydrochloric acid solution (HCl), 1.0 N
- [0069] - L-Ascorbic acid, $\geq 99\%$
- [0070] 제조를 위해 10 mM NaBH_4 0.60 ml를 물에 녹인 후 냉장고에 넣어 차갑게 만들었다. 이후 시드 형성을 위해 10 mM HAuCl_4 0.25 ml와 100 mM CTAC 10.00 ml를 섞은 뒤, 만들어둔 NaBH_4 를 빠르게 섞고, 1분 저은 후 2시간 방치하였다. 이후, 성장 용액(Growth solution) 제조를 위해 10 mM HAuCl_4 0.50 ml, 10 mM AgNO_3 0.10 ml, 1.0 M HCl 0.20 ml, 100mM ascorbic acid 0.10 ml를 섞었다.
- [0071] 이후 만들어진 시드를 $x1/10$ 에서 $x1/10^4$ 까지 희석한 후 0.1 ml 를 만들어 놓은 성장 용액에 첨가하였다. 반응이 끝날 때까지 방치한 뒤, 원심분리기로 세척하였다(3000 rpm, 10 min)(도 4).
- [0072] 시드의 농도를 희석하여 성장시킴으로써 다양한 크기의 금 나노큐브를 만들 수 있다. 구체적으로, 동일한 양의 성장액을 시드용액에 도포하면, 성장액의 골드이온이 시드 표면에 붙으면서 나노큐브로 성장하게 되고, 이는 시드의 개수에 따라, 예를 들어, 개수가 적을수록 한 개의 시드에 붙는 골드이온이 증가하여 더 큰 크기의 금 나노큐브가 만들어진다. 상기 방법으로 도 5에 기재된 스펙의 나노큐브를 제조하였다.
- [0073] 제조된 나노큐브는 오목한 면을 가지는 것을 확인할 수 있고(도 6), 그 크기 및 흡수 스펙트럼은 도 7 내지 9와 같았다.
- [0074] 그리고 AuCC40(크기 40nm)는 4.54×10^{10} 입자/ml, AuCC70(크기 70nm)는 1.00×10^{10} 입자/ml, AuCC170(크기 170nm)는 13.79×10^8 입자/ml의 농도로 얻어졌으며, 그 입자 크기 분포는 도 10과 같았다.
- [0076] **(2) 금 나노캡(Au Cap)**
- [0077] 제조에 사용된 재료는 하기와 같다.
- [0078] - Tetraethyl orthosilicate (TEOS), $\geq 99.999\%$
- [0079] - Ammonium hydroxide solution (NH_4OH), ~25% NH_3 basis
- [0080] - Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), $\geq 99.9\%$
- [0081] - Clean glass (2.5x 2.5 cm)
- [0082] - Gold plate, 5 inch radius
- [0083] - Hydrofluoric acid solution (HF), 35%
- [0084] 6.34 g Ethanol과 1.86 g TEOS를 섞은 뒤, 미리 만들어놓은 16 g Ethanol + 2.64 g NH_4OH 용액에 한 방울씩 첨가하여 반응시키고, 반응 24시간 뒤 원심분리기로 세척하여(3000 rpm, 30 min) 실리카 비드를 제조하였다. 이후, 5 mg/ml 실리카 용액을 clean glass 기판(2.5 cm x 2.5 cm) 위에 0.10 ml 떨어뜨린 뒤 말렸다. 이후, Metal ion DC/RF sputtering 장비를 이용하여 금을 이온화하여 기판 위에 20 nm 두께로 쌓았다. Sonication을 통해 기판 위에 올려 있는 실리카 입자를 떼어내고, 5% HF 용액을 섞어 내부에 있는 실리카 입자를 녹여내어 바깥의 금 나노캡 입자만 남겼다.
- [0085] 상기 방법으로 지름 500 nm 크기의 금 나노캡 입자를 제조하였고, TEOS 용액의 양을 줄여서 더 작은 크기의 나노캡 입자를 제조하였다(도 5). 반대로 TEOS 용액의 양을 늘리면 더 큰 크기의 나노캡 입자를 만들 수 있다.
- [0086] 제조된 나노캡은 오목한 면을 가지는 것을 확인할 수 있고(도 11), Au Cap100(크기 100nm)는 2.36×10^8 입자/ml, Au Cap500(크기 500nm)는 2.60×10^8 입자/ml의 농도로 얻어졌으며, 그 크기 분포는 도 12와 같았다.

- [0088] (3) 볼록한 면을 갖는(오목한 면을 갖지 않는) 금 구형 입자(Spherical Gold Nanoparticle(AuNS))
- [0089] 제조에 사용된 재료는 하기와 같다.
- [0090] - Gold(III) chloride hydrate (HAuCl_4), $\geq 99.9\%$
- [0091] - Sodium citrate tribasic dihydrate, $\geq 99.0\%$
- [0092] 1.0 g HAuCl_4 를 50 ml 탈이온수에 녹였다. 이후 0.5 g sodium citrate를 5 ml 탈이온수에 녹였다. 제조된 HAuCl_4 용액을 120 °C 에서 끓을 때까지 가열하였다. 용액이 끓으면 준비한 sodium citrate 용액을 첨가한 뒤, 10분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 용액은 실온까지 식힌 후 0.20 μm filtering하여 냉장보관하였다(도 13).
- [0093] 제조된 입자는 볼록한 구형 입자임을 확인할 수 있다(도 13).

[0095] (4) 표면 개질

- [0096] (1)에서 제조된 크기 40, 70, 100nm의 금 나노큐브의 표면을 개질하였다.
- [0097] 금 나노큐브는 CTAC를 사용하여 제조된 것인 바, 그 표면에 트리메틸암모늄클로라이드세틸기를 가지는 것이고, 이를 하기 화합물과 각각 반응시켜 표면 개질된 금 나노큐브를 얻었다.



- [0101] 도 14를 참조하면, 반응에서 티올의 설프하이드릴기가 금 입자와 Au-S 결합을 이루기 때문에, FTIR 측정시에 표면이 개질되어 설프하이드릴 피크가 사라지는 것을 확인할 수 있다.
- [0102] 또한, 표면 개질되면서 금 입자 표면의 SPR(Surface Plasmonic Resonance) 효과에 의해 흡수 스펙트럼에 변화가 일어나고, 표면적이 넓을 수록 변화폭이 더 크게 일어남을 확인하였다(도 15 내지 17).

[0104] 3. 세포 내부로의 삽입 가부 확인

- [0105] AuCC40이 HSC-3 세포 내부로 삽입 가능한지를 확인하였다.
- [0106] 구체적으로, 합성한 4.54×10^9 입자/ml 농도의 AuCC40 100 μl 를 살아있는 세포(HSC-3) 배지에 첨가한 뒤 약 2시간 동안 반응시키면, 나노 사이즈의 큐브입자들이 세포막에 끼어들어가 최종적으로 세포 내부까지 침투하게 된다. 끼어들어간 금 큐브입자들은 산란 효과로 인해 광학현미경으로 관측이 가능하다.
- [0107] 그 결과, 세포 내부에 금 나노큐브가 삽입되는 것을 확인하였다(도 18).

[0109] 4. 결빙 억제 효과 평가

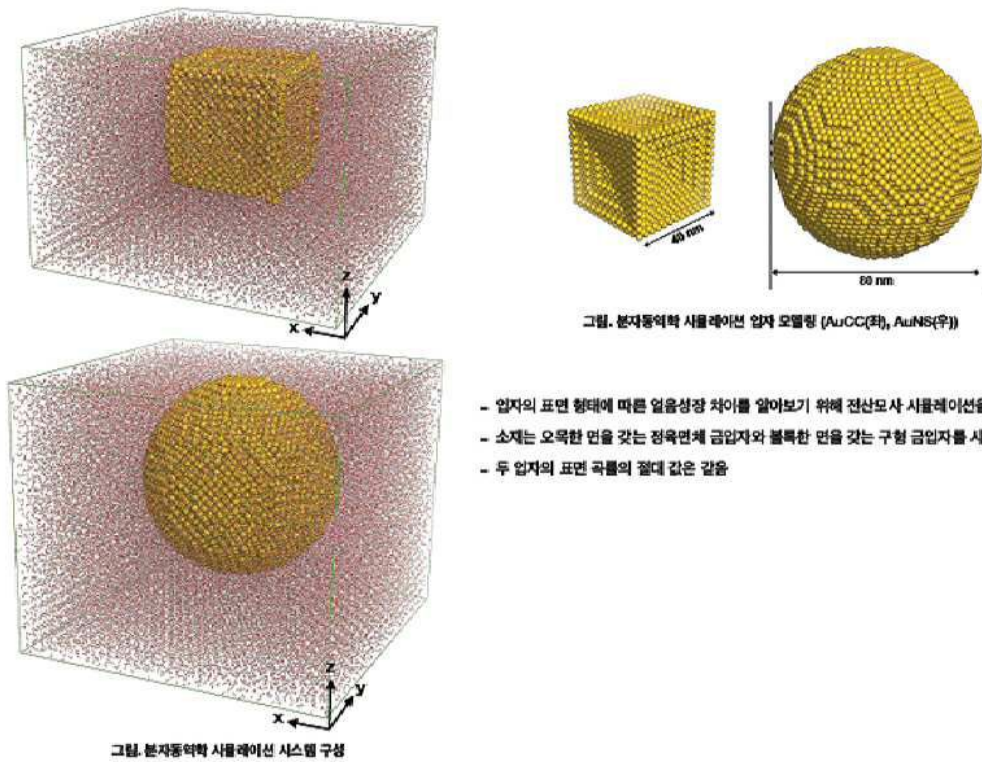
- [0110] 결빙억제 효과를 얼음의 재결정화 억제효과를 관측하여 평가하였다. 얼음은 급속 냉각 직후 매우 작은(수 마이크로미터) 얼음 도메인을 가지며, 시간이 지남에 따라 재결정화 현상에 의해 얼음 도메인의 크기가 커진다. 이를 정량화 하고자 splat method와 액체 질소를 이용하여 급속 냉각을 시킨 후 30분 동안 -6°C 온도에 노출시켜

얼음 도메인의 면적을 측정하였다. Splat method는 얼음 재결정화 억제 관측을 위한 정형화된 냉각 방법으로, 높이 1.5m 상공에서 물방울을 액체질소로 급속 냉각된 기관에 떨어뜨려 얇은 막 형태로 얼음을 형성시켰다.

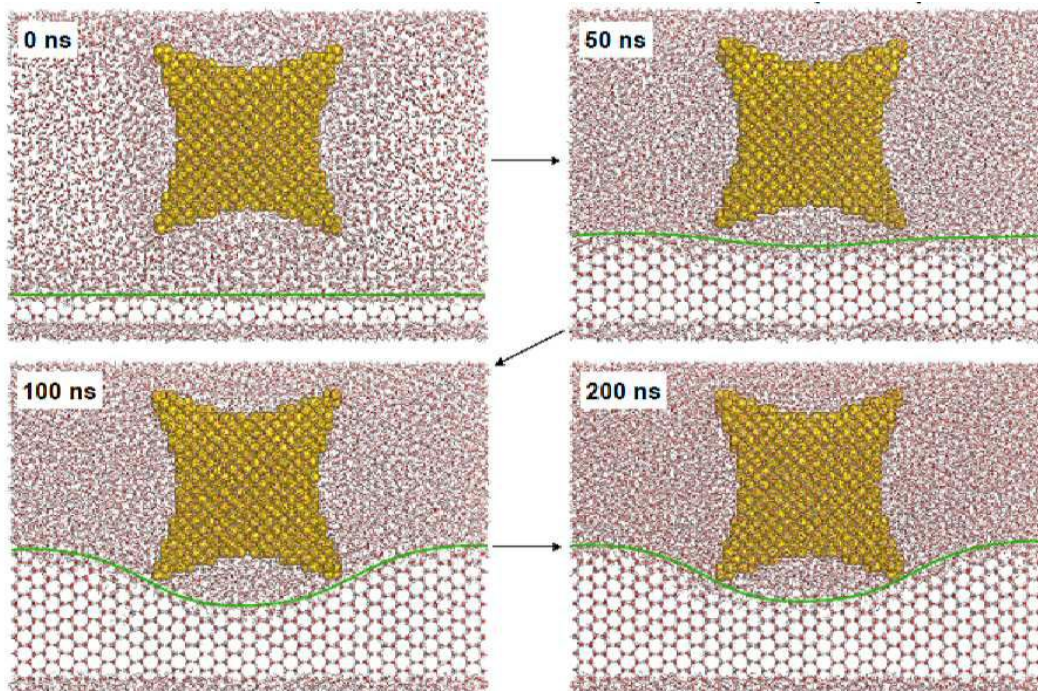
- [0111] 도 19는 6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)로 개질된 AuCC40 7.54×10^{-11} M, 도 20은 6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)로 개질된 AuCC40 7.54×10^{-12} M, 도 21은 6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)로 개질된 AuCC40 7.54×10^{-13} M, 도 22는 6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)로 개질된 AuCC40 7.54×10^{-14} M, 도 23은 6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)로 개질된 AuNS80 1.66×10^{-11} M, 도 24는 6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)로 개질된 AuNS80 1.66×10^{-12} M, 도 25는 6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)로 개질된 AuNS80 1.66×10^{-13} M, 도 26은 6-Mercapto-1-hexanol(C6OH)로 개질된 AuNS80 1.66×10^{-14} M의 결빙 억제 효과를 나타낸 것이다.
- [0112] 이를 참조하면 친수성 작용기가 개질된 소재는 얼음의 재결정화를 억제하는 효과를 보이며, 소재의 형태와 크기에 따라 얼음의 재결정화 정도가 다른 것을 확인할 수 있다.
- [0113] 또한, 이 결과를 도 27에 기재된 방법에 따라 수치화하였다.
- [0114] 구체적으로, 크기가 큰 얼음 도메인을 10개 이상 선정하고, ImageJ 프로그램의 particle analysis 툴을 사용하여 면적을 계산하였다. 그 중, 면적이 큰 상위 10개의 얼음의 면적 평균을 구하고, 같은 샘플에 대해 3번 이상 동일하게 면적 계산을 하여 최종 평균값을 사용하였다. RI 값은 (소재를 넣은 물의 얼음 평균면적)/(순수한 물의 얼음 평균면적)로 순수한 물과 비교하여 값을 도출하였다. RI 값이 0에 가까우면 얼음 평균 면적이 매우 작다는 것으로서, 결빙 억제 성능이 뛰어나다는 것이다.
- [0115] 그 결과는 도 28, 29에 나타내었다. 이를 참고하면, AuCC의 경우 RI 값이 매우 작아 결빙 억제 성능이 뛰어나지만, AuNS의 경우는 그 보다 훨씬 큰 RI 값을 나타냈다.
- [0116] 또한, 도 30에는 AuCC, 도 31에는 표면 개질한 AuCC, 도 32에는 AuCap의 RI 수치화 결과를 나타내었다.
- [0117] 도 30을 참고하면, 제조시에 첨가하는 금 시트 양이 적을수록 큰 입자가 만들어지므로, 입자의 크기를 키우면 고농도로 입자를 얻어내기 어렵지만, 각 크기의 입자가 모두 결빙 억제 효능을 나타내는 것을 확인할 수 있다.
- [0118] 도 31을 참고하면, 표면 개질을 하지 않은 경우(CTAC), 그리고 C6OH로 표면 개질한 경우에 결빙 억제 효능이 가장 우수함을 확인할 수 있다.
- [0119] 도 32를 참고하면, AuCap의 경우 물과 비슷한 RI 값이 나타났다. 이는 AuCap은 기관 상에 스퍼터링 방법으로 제조하기 때문에 용액 안에서 입자 합성하는 방법에 비해 농도가 낮아, 우수한 RI 값을 나타내기에는 농도가 충분하지 않았기 때문인 것으로 판단된다.

도면

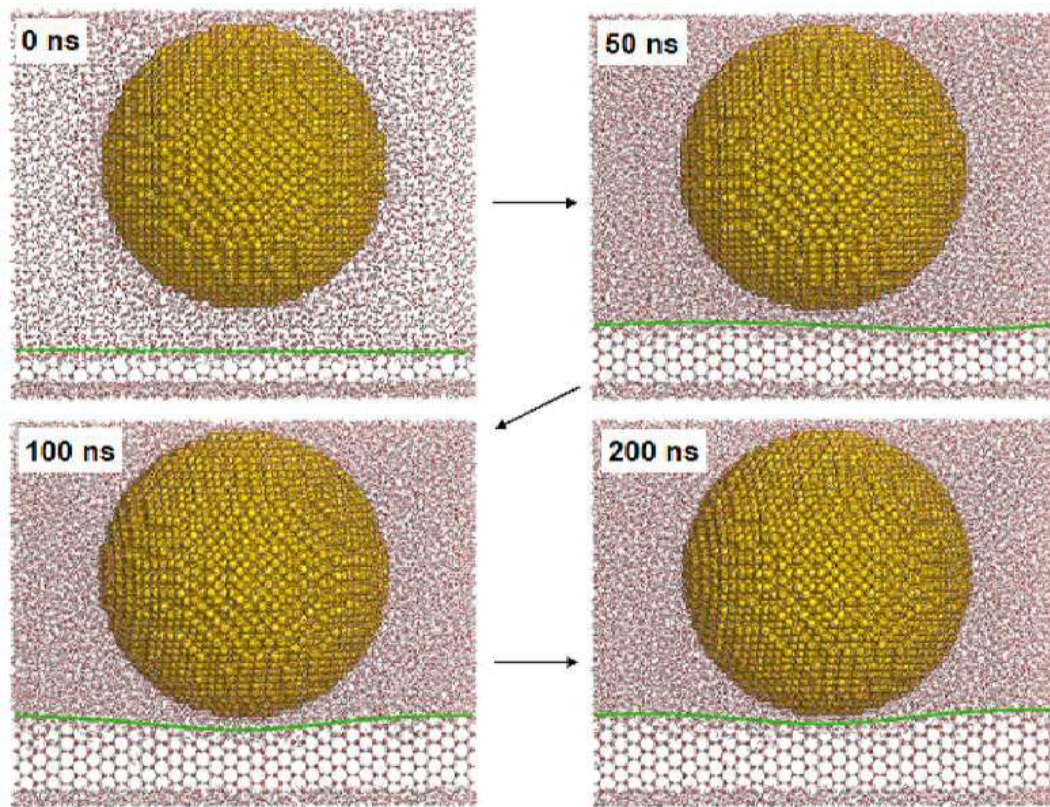
도면1



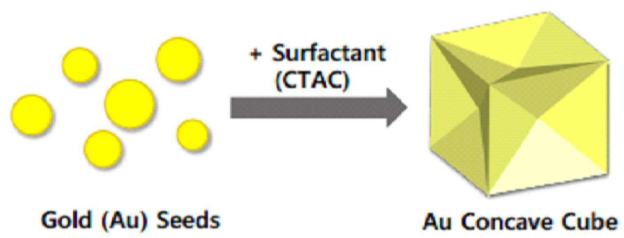
도면2



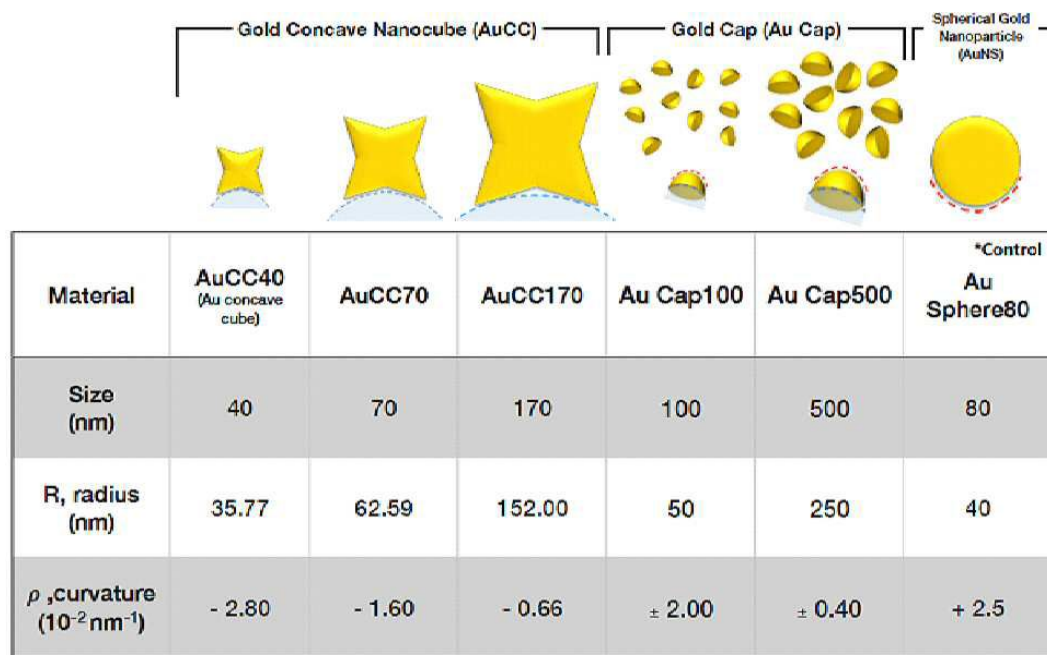
도면3



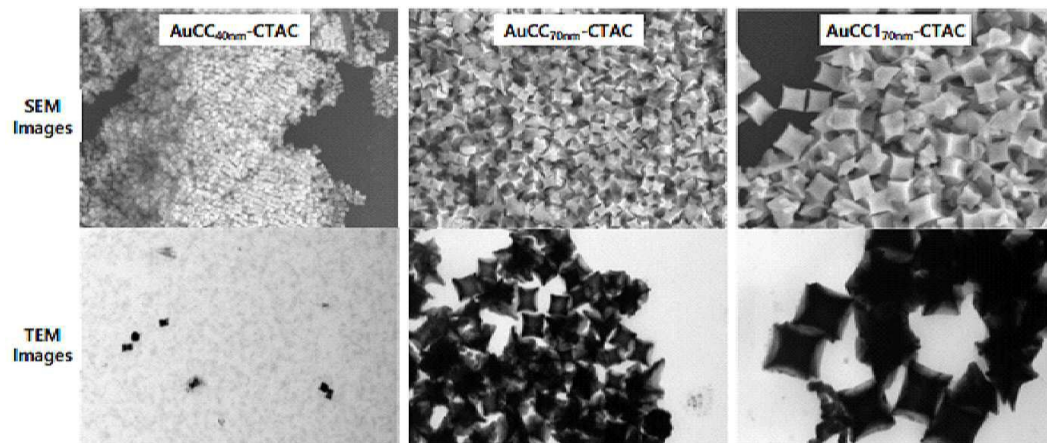
도면4



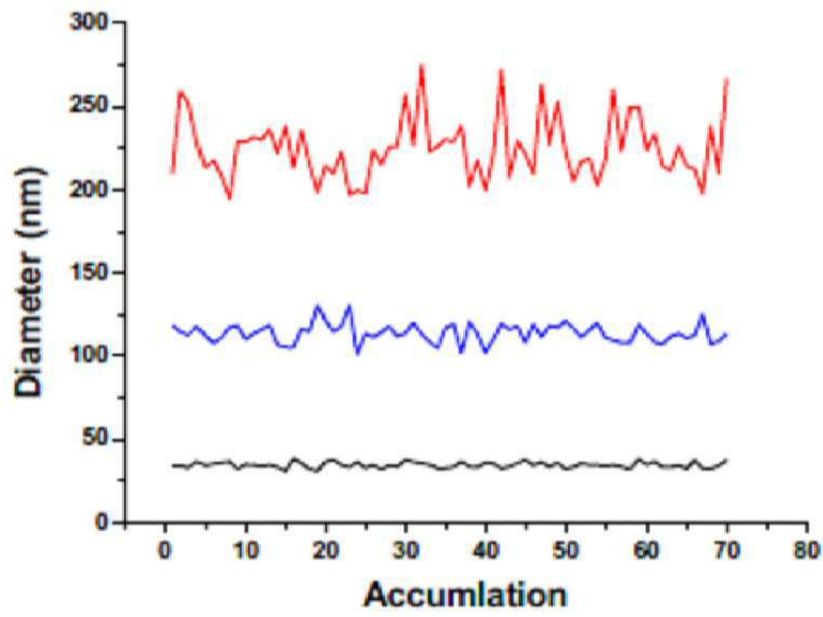
도면5



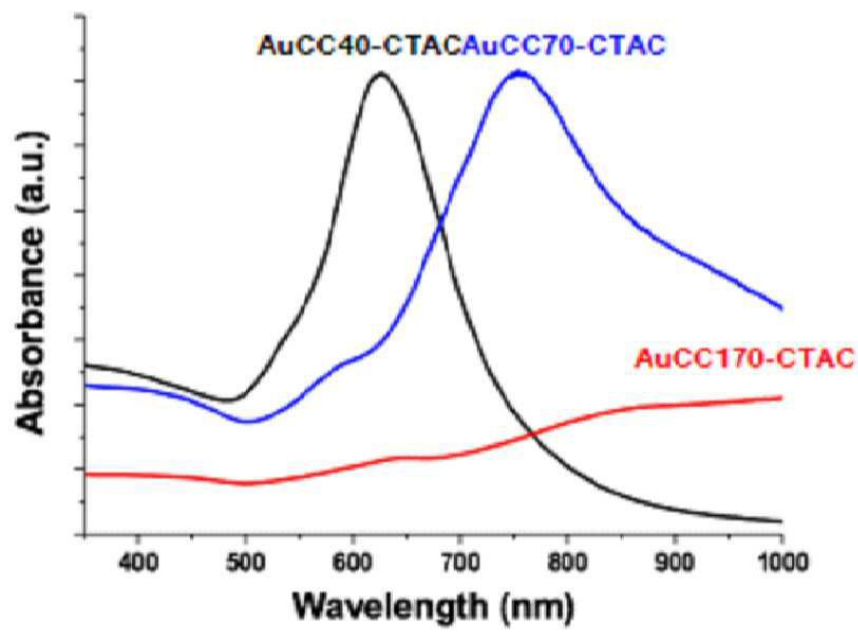
도면6



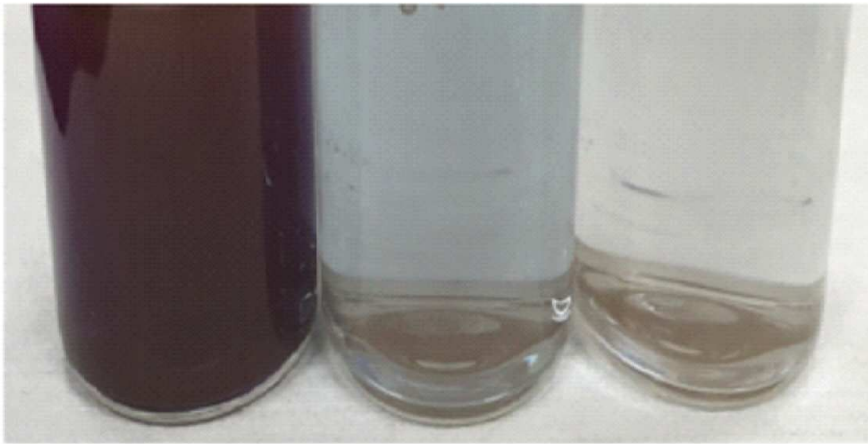
도면7



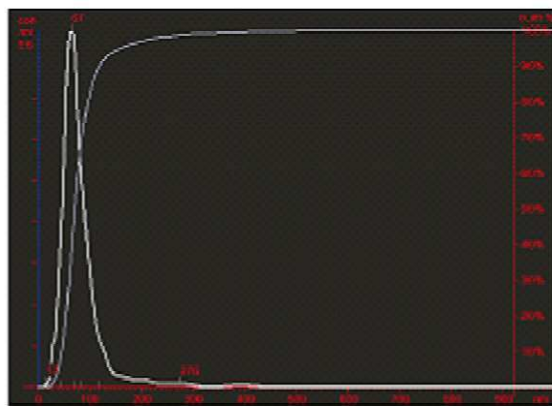
도면8



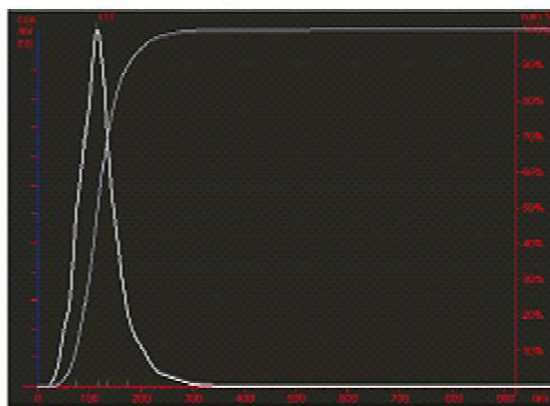
도면9



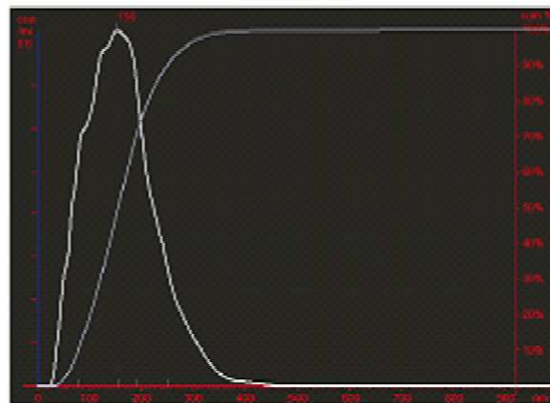
도면10



AuCC40

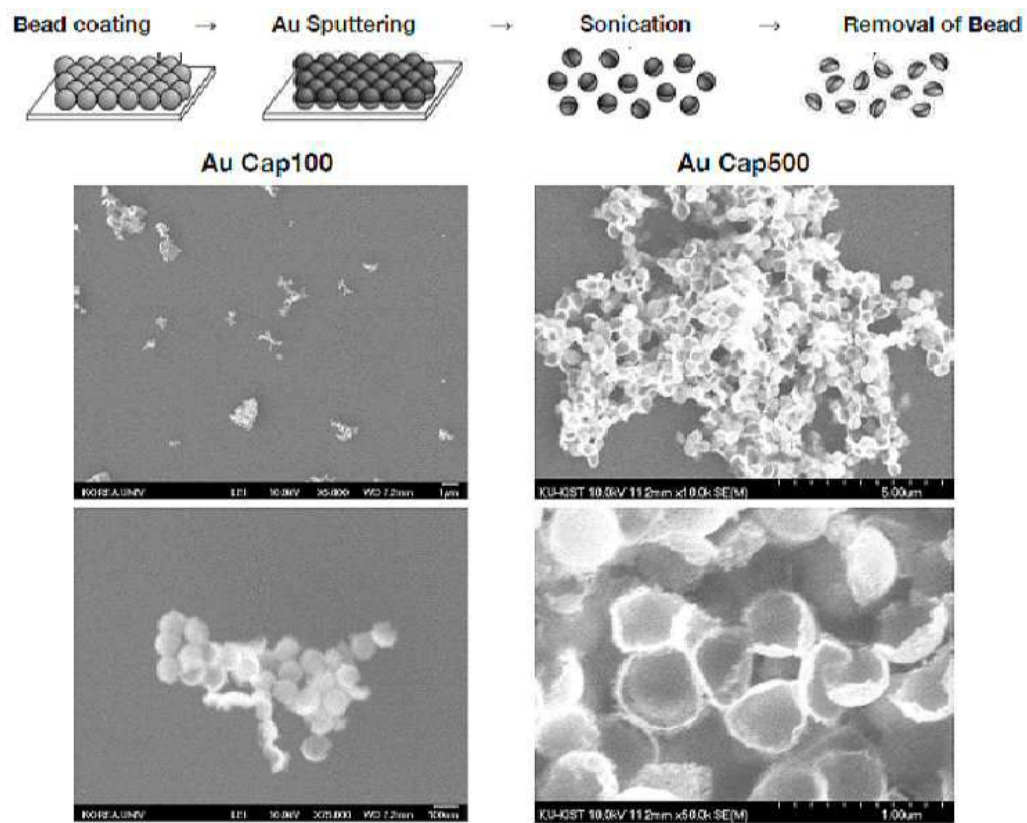


AuCC70

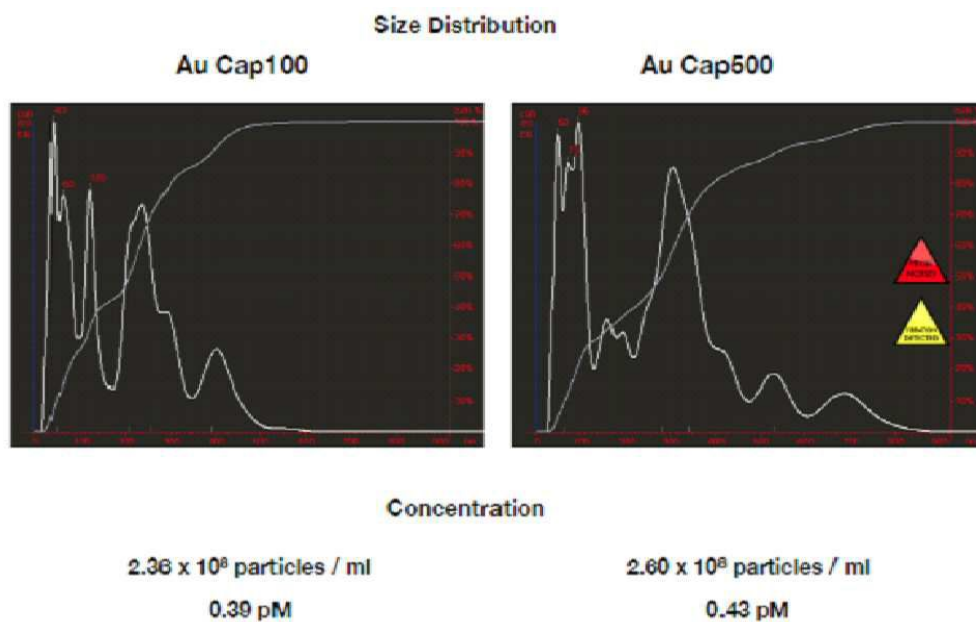


AuCC170

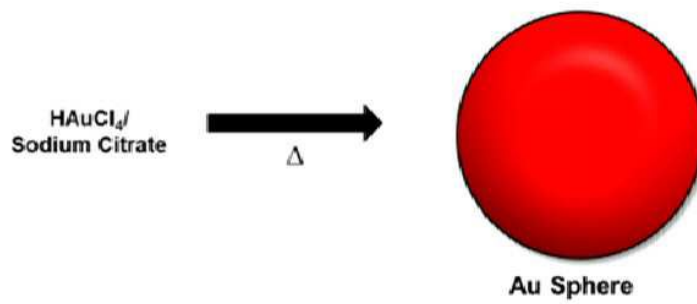
도면11



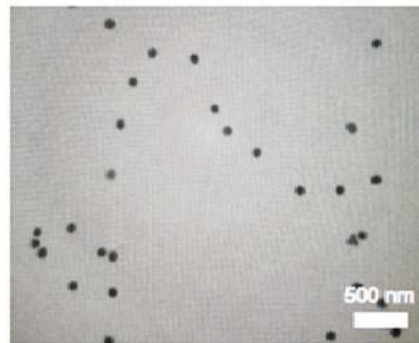
도면12



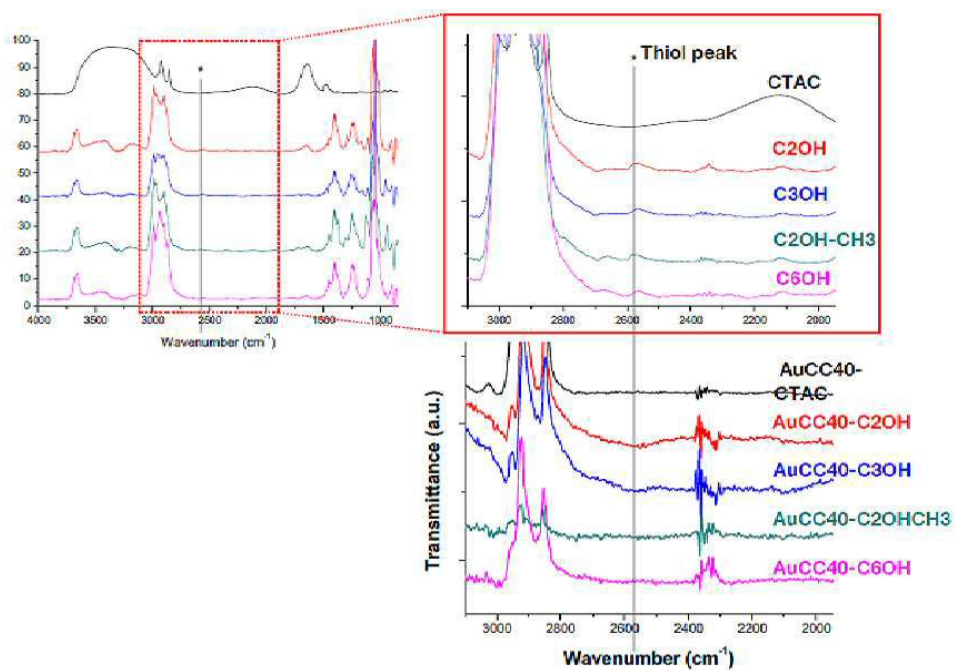
도면13



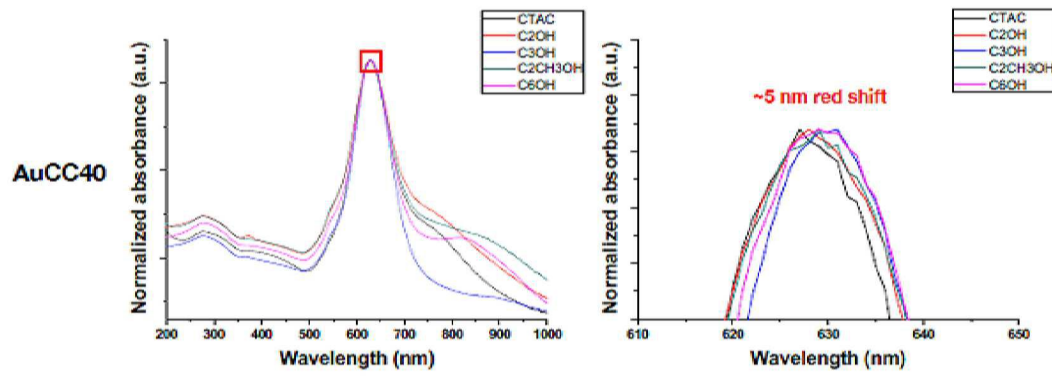
- Frens method : reductant & capping agent 역할을 동시에 할 수 있는 citrate를 사용함



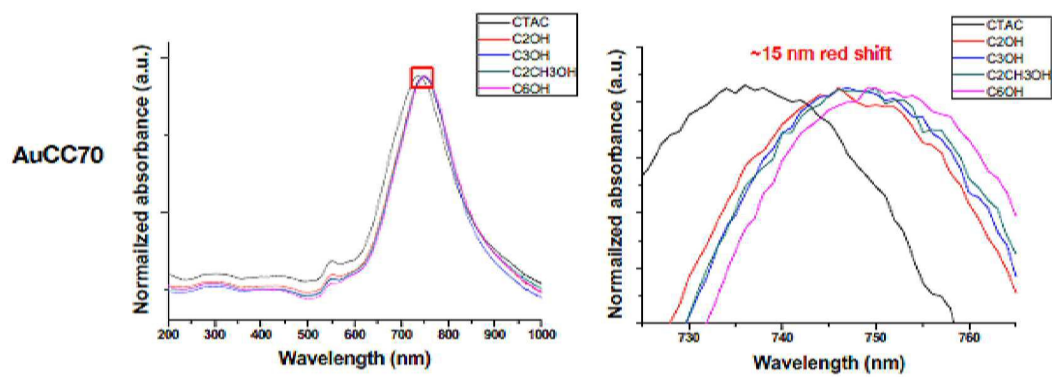
도면14



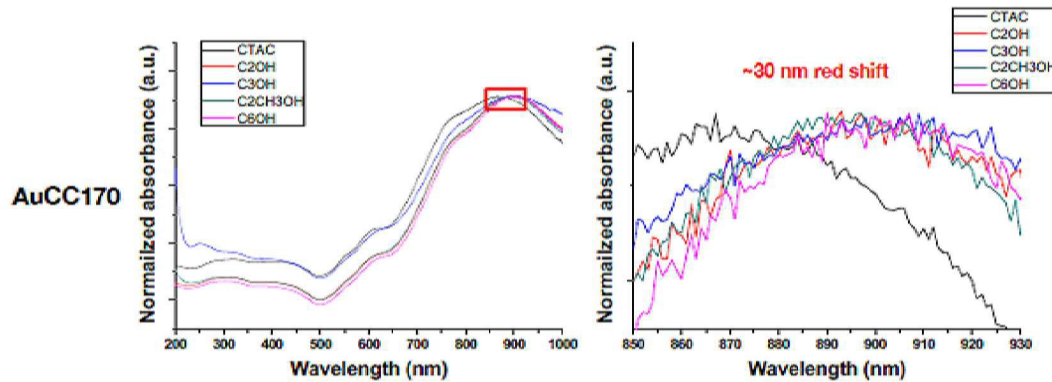
도면15



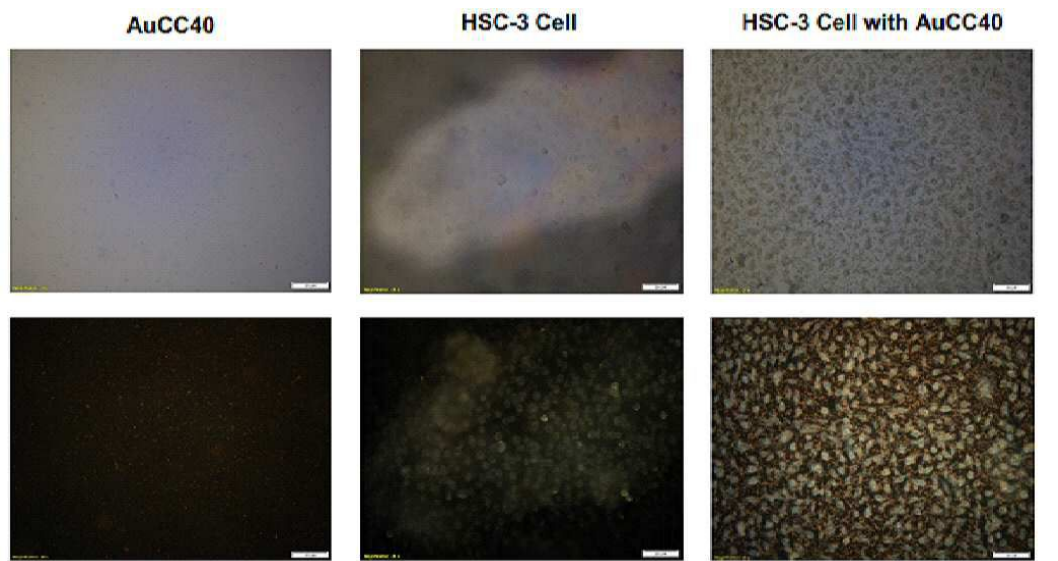
도면16



도면17

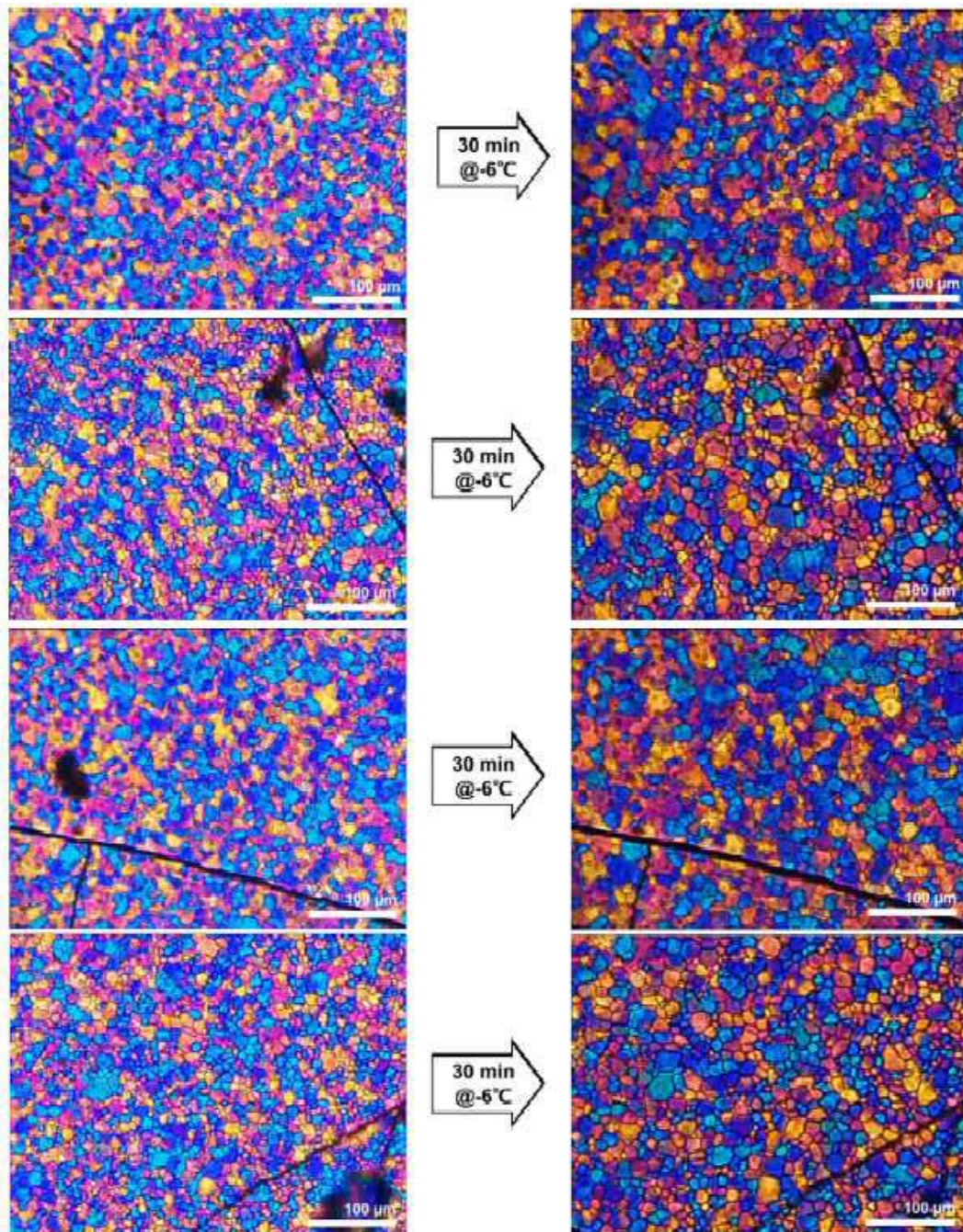


도면18

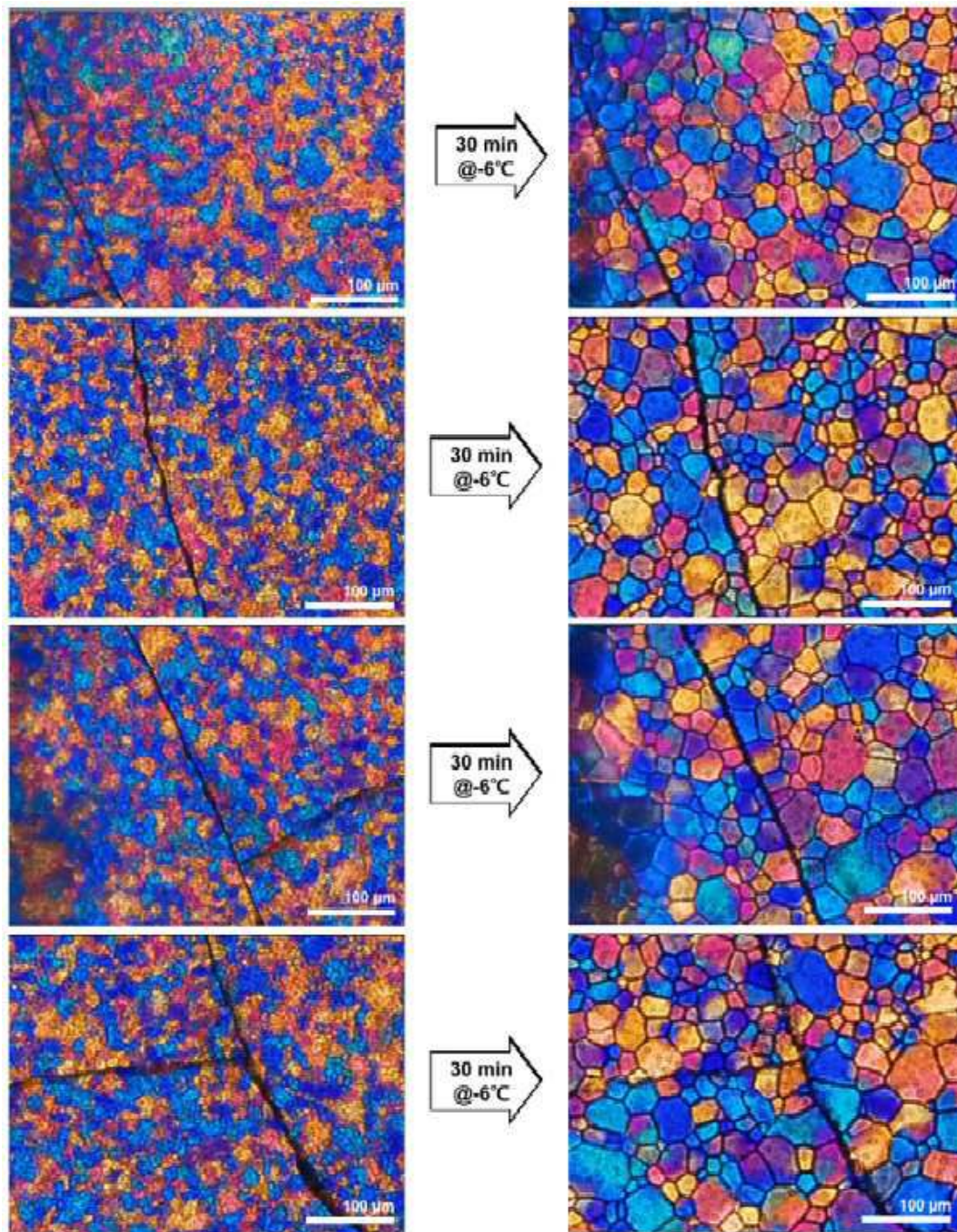


Magnification: 40x

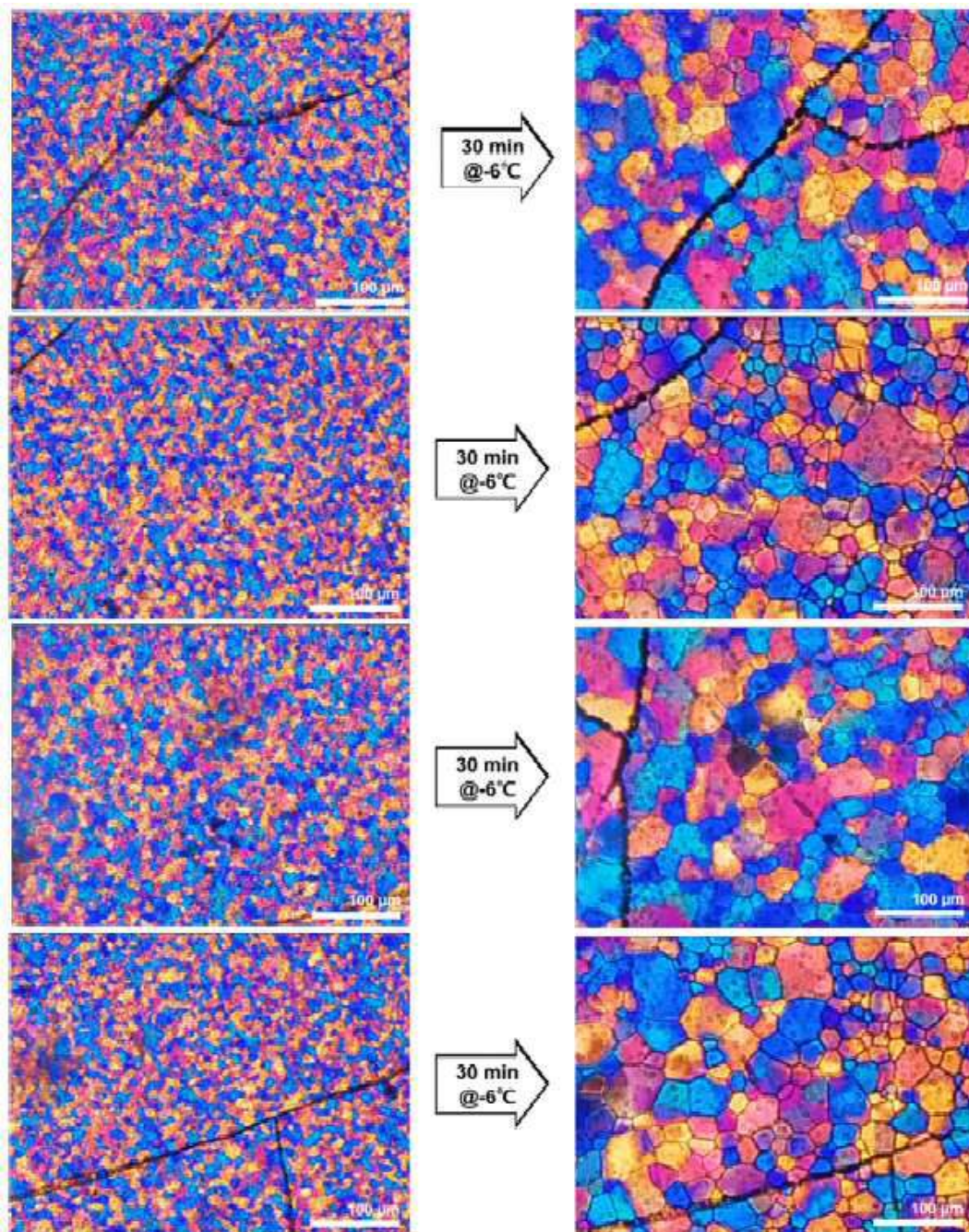
도면19



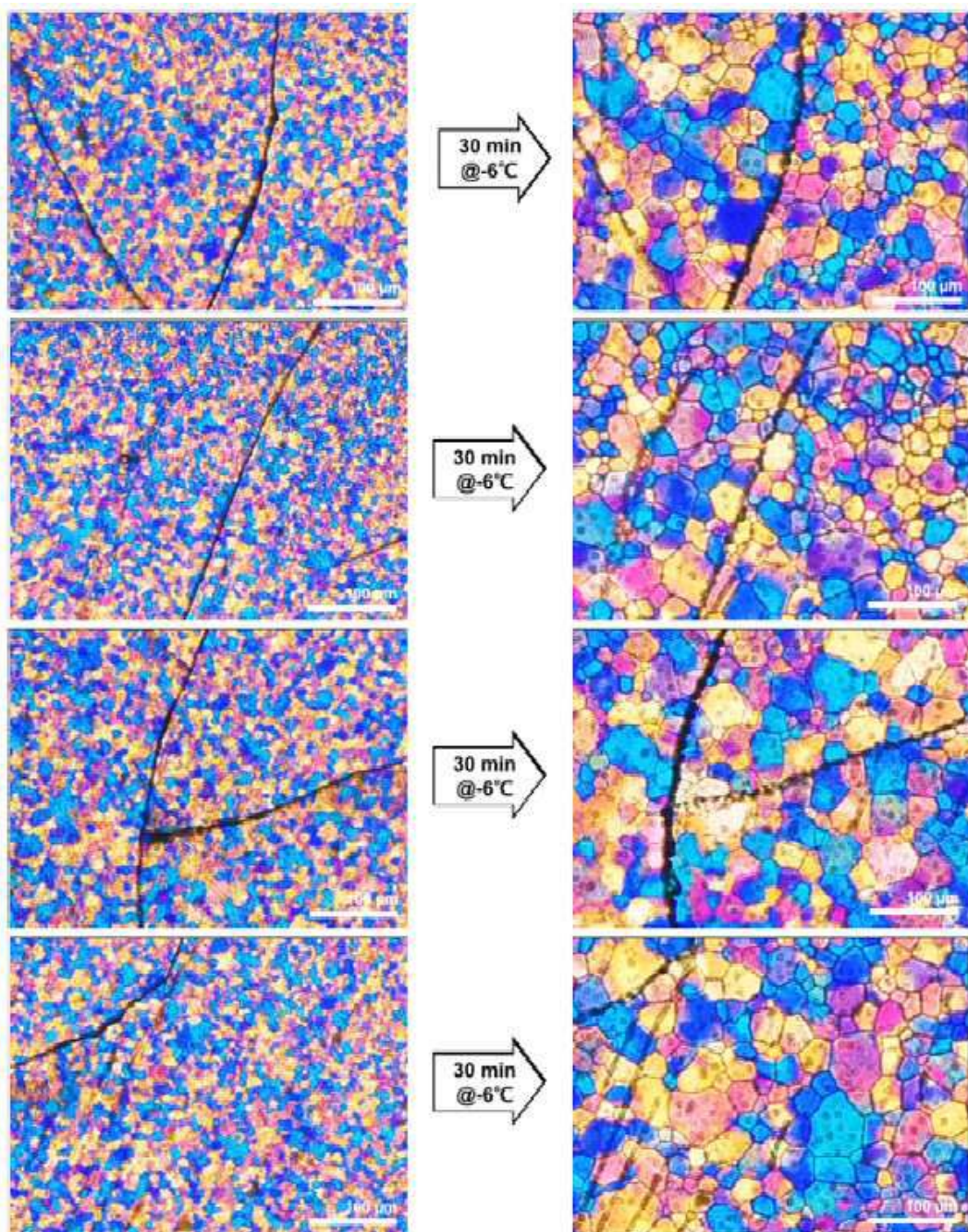
도면20



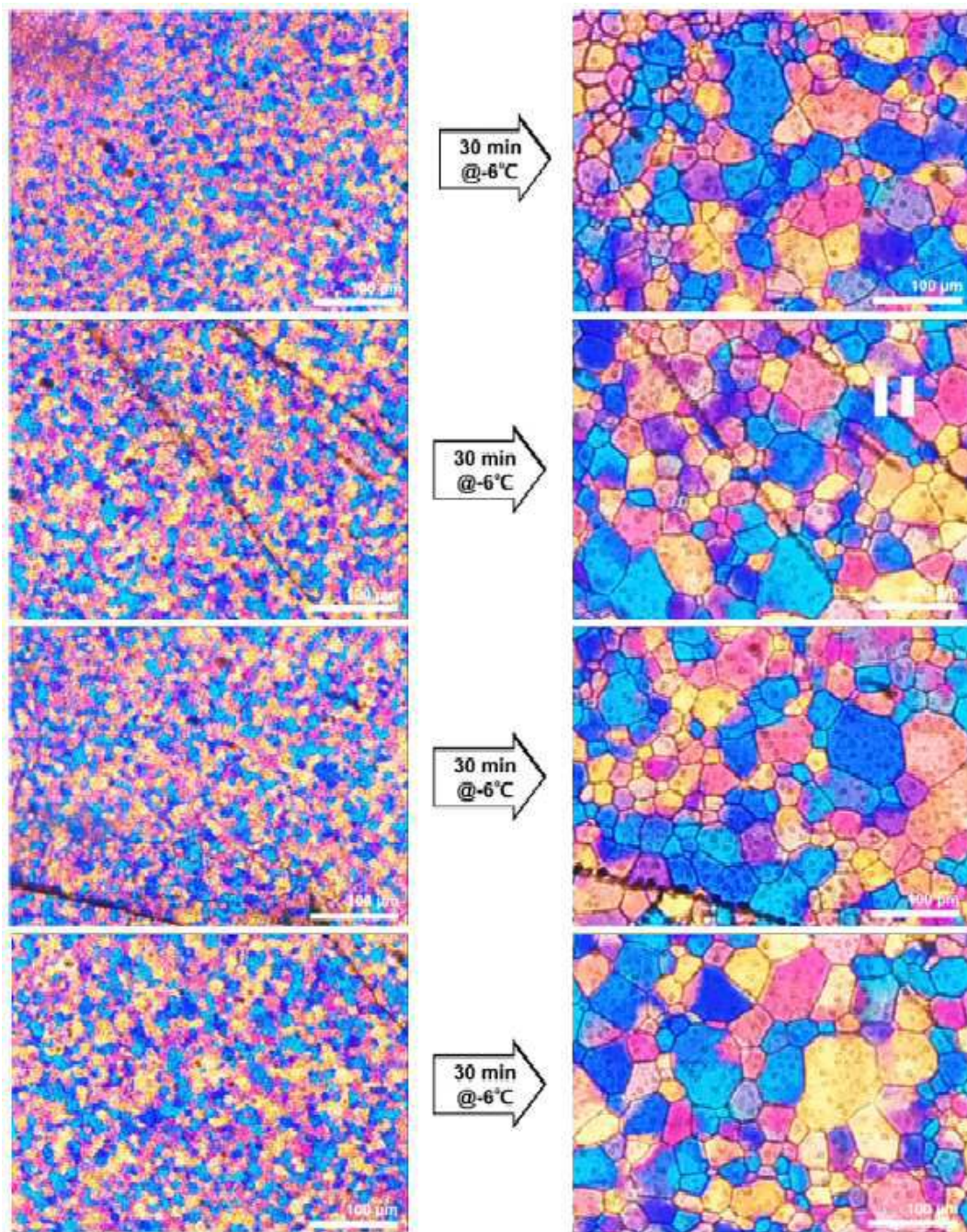
도면21



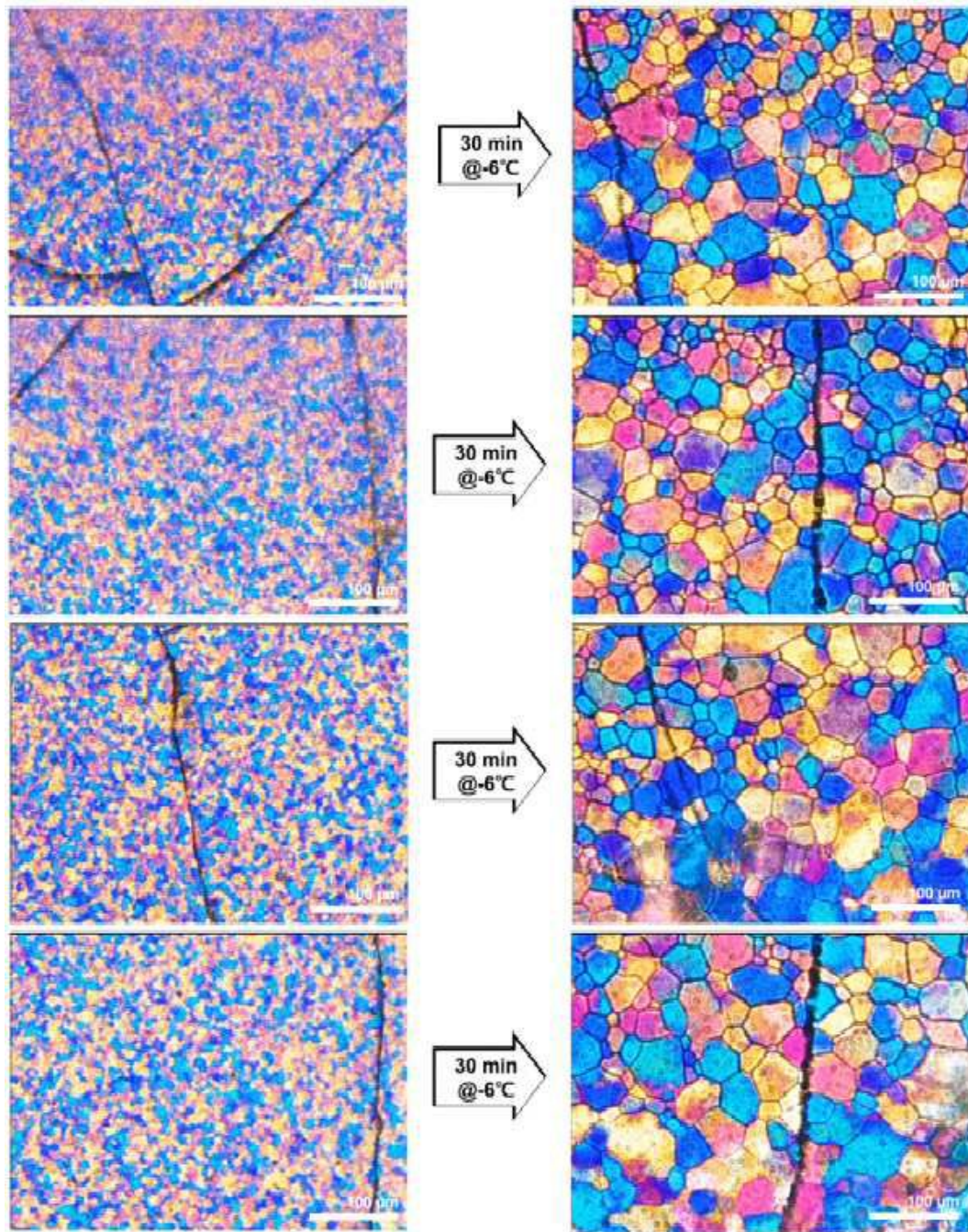
도면22



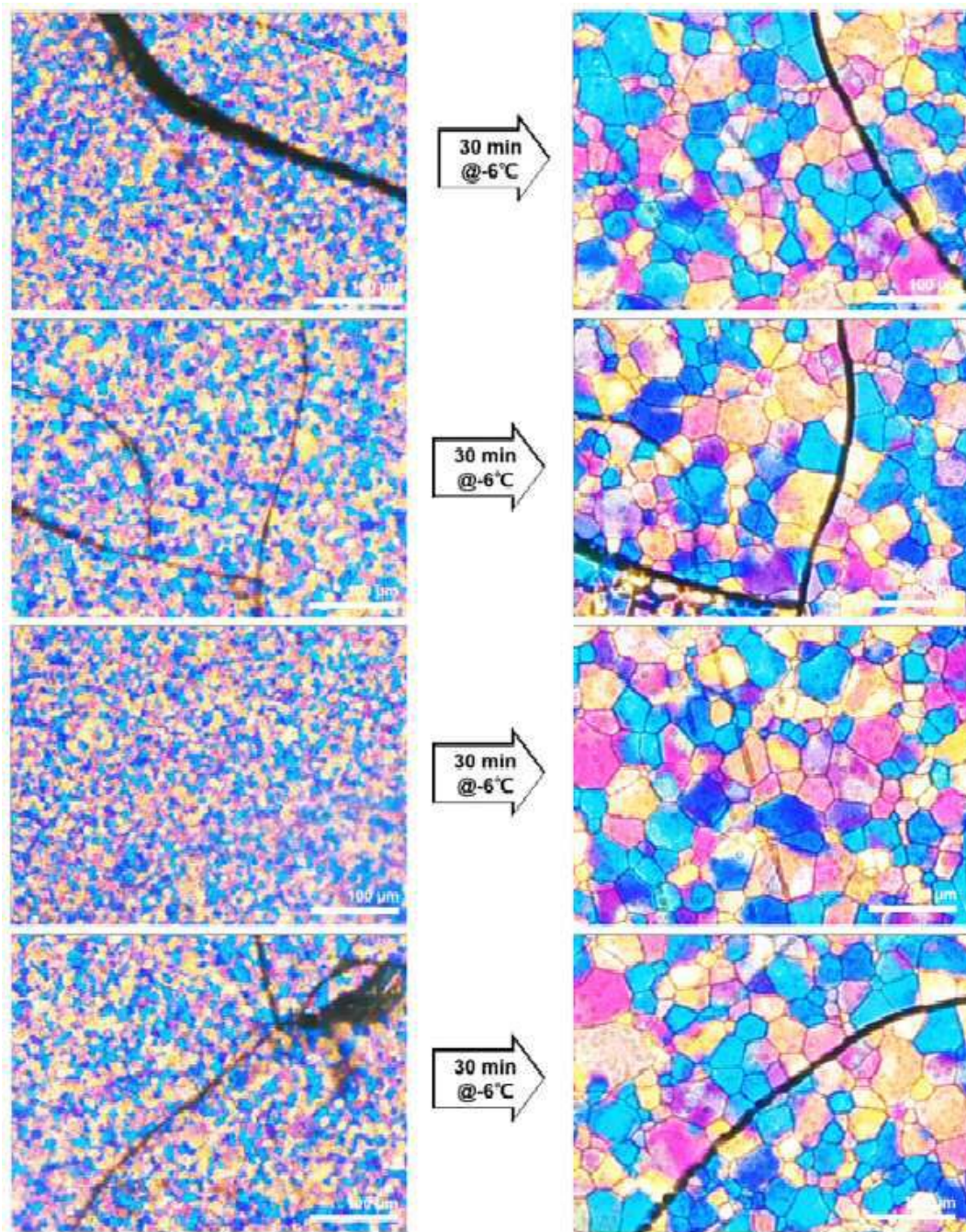
도면23



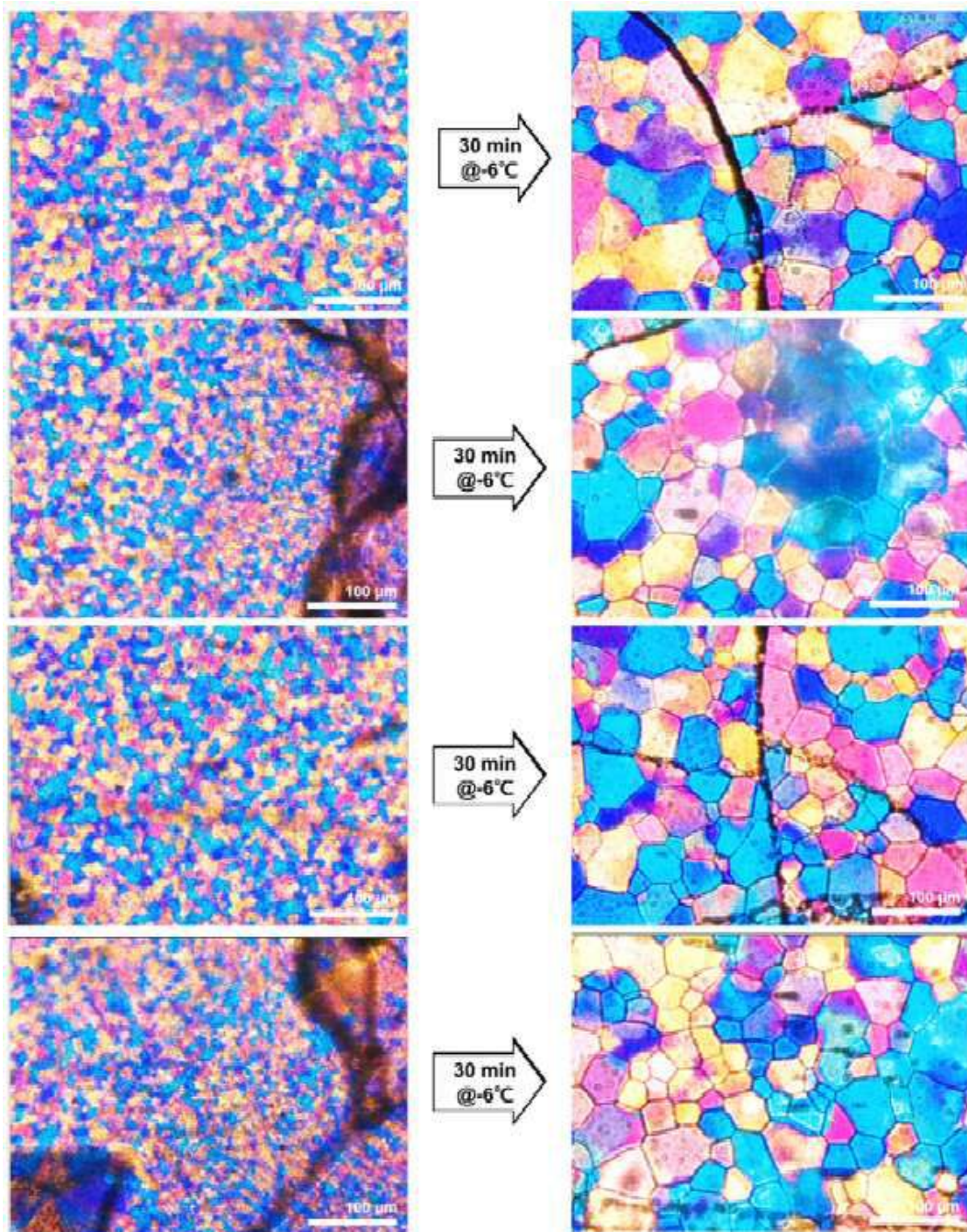
도면24



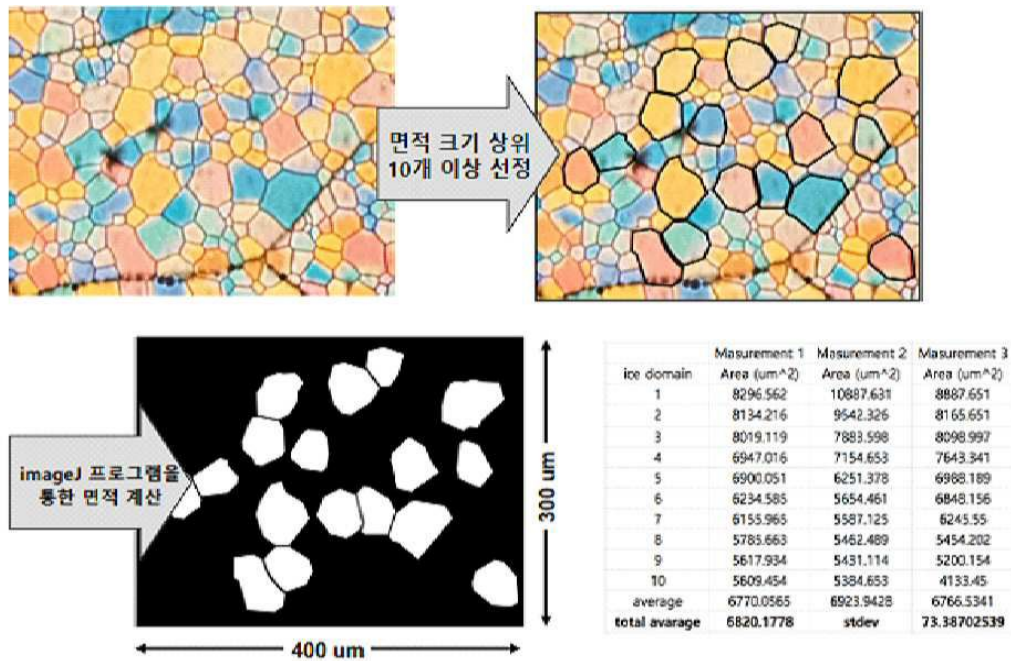
도면25



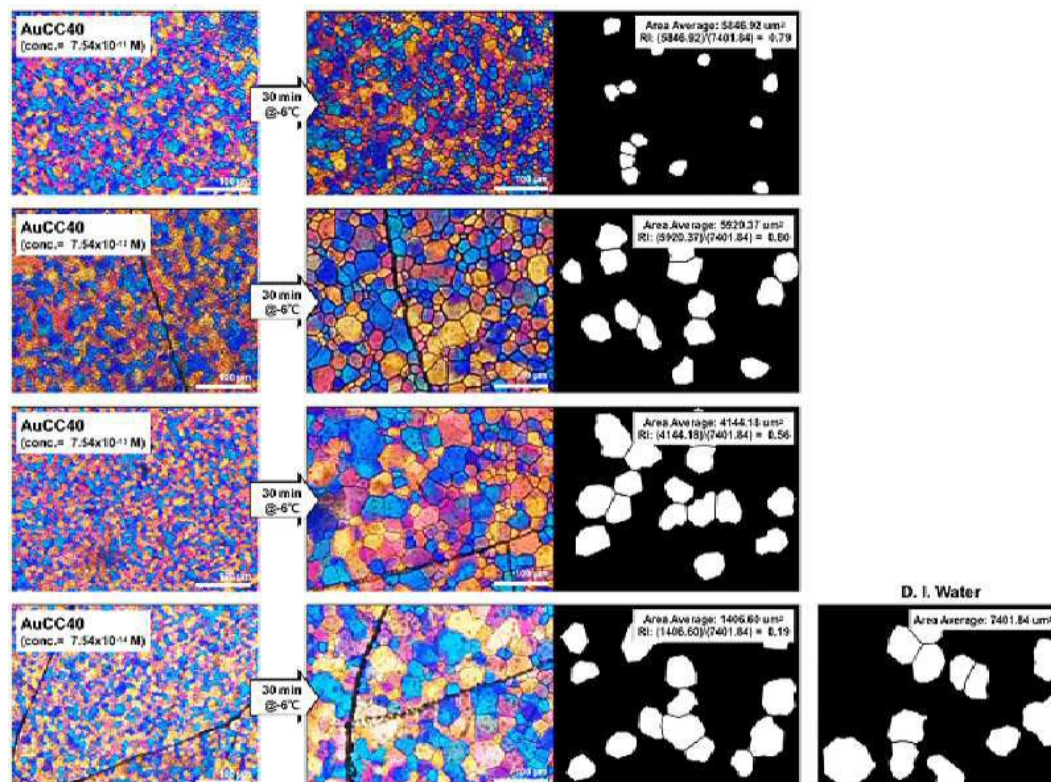
도면26



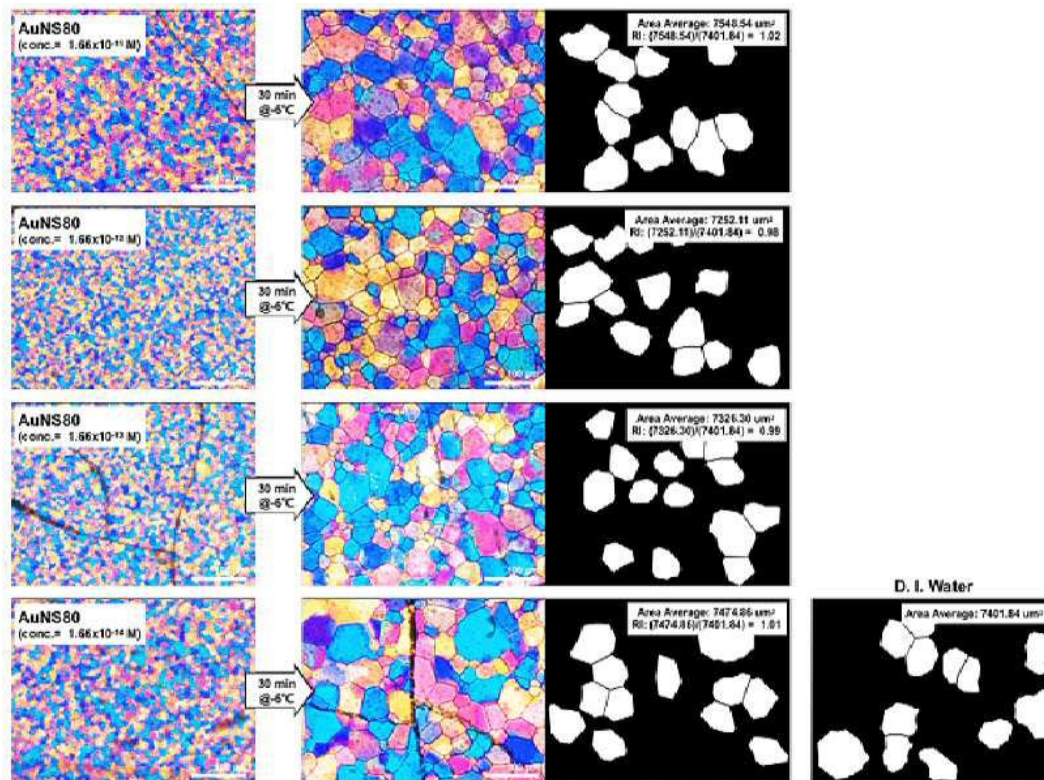
도면27



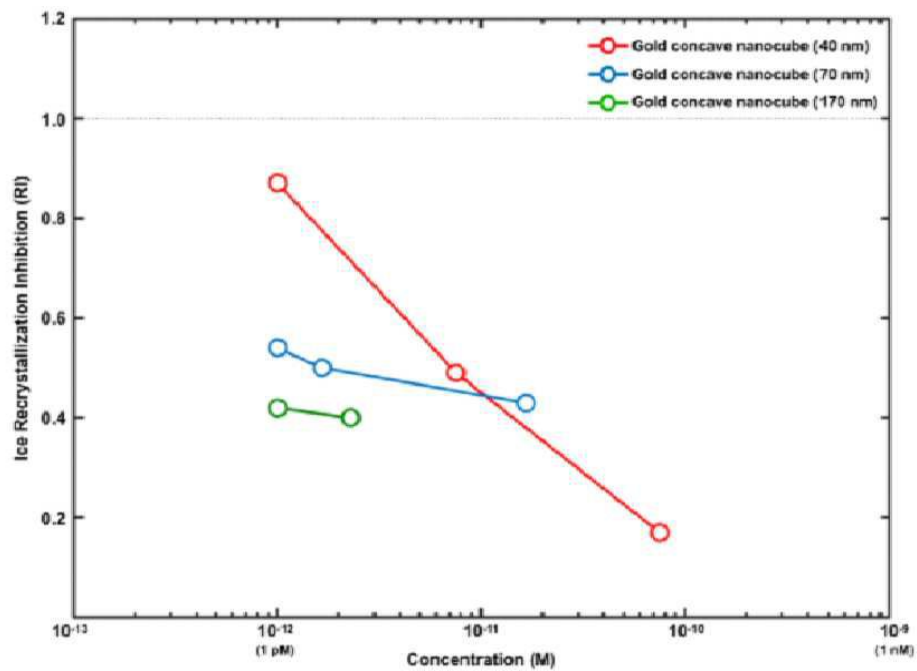
도면28



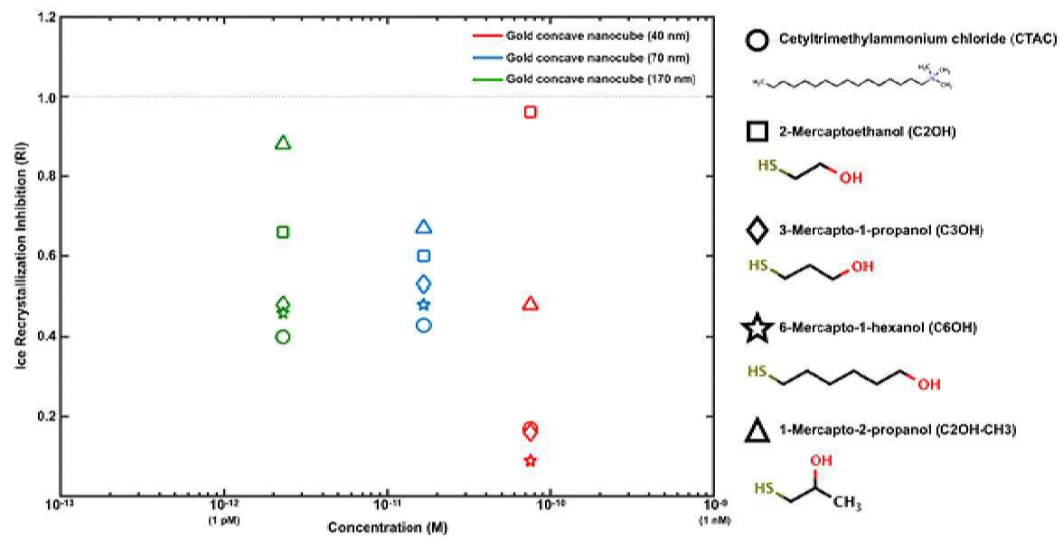
도면29



도면30



도면31



도면32

