(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0101031
(43) 공개일자 2011년09월15일

(51) Int. Cl.
C12N 9/00 (2006.01) *B01J 23/42* (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0073937
(22) 출원일자 2010년07월30일
심사청구일자 2010년07월30일
(30) 우선권주장
1020100019834 2010년03월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
김진홍
서울특별시 은평구 진관동 14번지 은평뉴타운 상림마을 805동 701호
(74) 대리인
특허법인다나

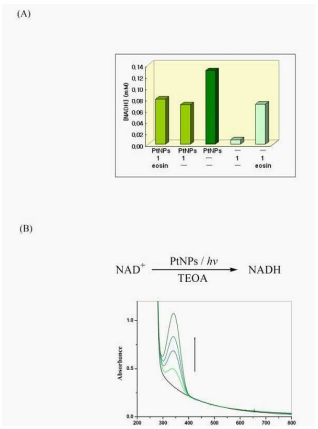
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 백금 나노입자를 사용한 산화환원효소 보조인자 광재생 방법

(57) 요 약

본 발명은 (a) 산화환원효소 반응기에 산화형의 산화환원효소 보조인자 및 백금(Pt) 나노입자를 첨가하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 반응기에 광 조사하는 단계를 포함하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법에 관한 것으로서, 산화환원매개체인 백금 나노입자 존재 하에 광반응으로 환원형의 산화환원효소 보조인자로 변환시켜 광화학적으로 재생하는 방법에 관한 것이며, 산화환원효소 보조인자를 이용하는 다양한 생촉매 반응의 효율을 높이는데 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345076114
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 교육과학기술부
연구사업명 우수연구센터육성사업
연구과제명 바이오 선택성 나노구조체 연구
기여율 3/5
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2008.03.01 ~ 2011.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20090087304
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 교육과학기술부
연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구지원)
연구과제명 생체효소 대체 금속화합물의 촉매반응과 생체물질과 전자전달반응
기여율 2/5
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2009.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 산화형의 산화환원효소 보조인자에 백금(Pt) 나노입자를 첨가하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 혼합물에 광 조사하는 단계를 포함하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)의 산화형의 산화환원효소 보조인자가 NAD^+, $NADP^+$, FAD^+ 및 FMN^+로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)에서, 전자 도우너(electron donor)를 추가로 첨가하는 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자 광화학적 재생방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 전자 도우너가 트리에탄올아민인 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)의 백금 나노입자를 1 유니트 이상의 농도로 첨가하는 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법:

단, 여기에서 1 유니트는 92.5 μM의 Pt 원자를 함유하는 것을 의미한다.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 단계 (a)의 백금 나노입자를 2 유니트 내지 4 유니트의 농도로 첨가하는 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)의 pH를 7 이상으로 조절하는 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)의 광이 가시광선인 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)가 완충액 중에서 수행되는 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법.

청구항 10

산화형 산화환원효소 보조인자 및 백금 나노입자를 포함하는 반응기; 및

광 조사 장치

를 포함하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생장치.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 방법으로 재생된 산화환원효소 보조인자를 사용하여 효소를 환원시키는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 (a) 산화형의 산화환원효소 보조인자에 백금(Pt) 나노입자를 첨가하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 혼합물에 광 조사하는 단계;를 포함하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법에 관한 것으로서, 산화환원매개체인 백금 나노입자 존재 하에 광반응으로 환원형의 산화환원효소 보조인자로 변환시켜 재생하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 SRC/ERC program of MOST/KOSEF (R11-2005-008-000-0) 및 National Research Foundation of Korea Grant funded by the Korean Government (2009-0087304)의 지원에 의한 결과물이다.

배 경 기 술

[0003] 화석 연료가 점차 고갈됨에 따라 대체 에너지원을 찾으려는 시도가 다양하게 행해지고 있다. 예컨대, 광화학 시스템을 사용하여 복사 전자기에너지를 환원력을 갖는 형태의 화학 에너지, 즉 NADH로 전환시키려는 시도가 있다.

[0004] 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD) 및 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADP)는 세포에서 발견되는 중요한 조효소이며, NADH, NADPH는 각각 NAD 및 NADDP의 환원 형태이다.

[0005] NAD는 세포호흡에서의 해당과정과 TCA 회로에 사용되며, NADH에 저장된 환원 잠재력은 전자전달계를 거치면서 ATP로 전환되거나 동화반응(anabolism)에 사용된다. NADPH는 환원력을 제공하여 지방산과 핵산 합성과 같은 동화작용에 사용된다. NADP는 광합성 초기반응, 즉 물의 광분해반응에서 중요한 산화제로 작용하여 NADPH를 형성한다. NADPH는 광합성의 캘빈회로에 환원력을 제공한다.

[0006] FAD 및 FMN은 플라빈 효소군의 보결분자단의 일종으로, 생체내 산화환원계에서 수소 및 전자전달에 관여한다. FAD는 리보플라빈 아데닌 디뉴클레오티드라고도 하며, 리보플라빈과 2개의 인산기, 아데노신의 화합물로 이루어

진 뉴클레오티드이고, FMN은 리보플라빈 인산이라고도 하며, 리보플라빈의 인산에스터에 상당한다. FAD 및 FMN은 생체의 산화환원계에서 수소 및 전자전달을 하는 중요 물질이다. 플라빈 효소군의 조효소로 작용하고, 기질로부터 전자수용체로의 전자전달에 관여한다.

[0007] 자연계의 광합성 과정은 녹색식물의 세포에 있는 엽록체에서 이루어지게 되는데, 명반응에서 O_2가 생성되고, 암반응을 통해 포도당이 합성되고 물이 생성된다. 보다 구체적으로는, 틸라코이드의 막에는 엽록소와 전자전달계가 있어 명반응이 일어나는데, 명반응은 다시 물의 광분해와 광인산화반응의 두 단계로 나눌 수 있다. 물의 광분해 과정은 엽록소에 흡수된 빛 에너지에 의해 물이 분해되는 것으로 전자(e^-)와 수소이온, 산소를 만들어낸다. 광인산화과정은 엽록소가 흡수한 빛 에너지를 화학에너지로 전환시켜 ATP를 만들어내는 과정으로서, 빛 에너지가 엽록소에 흡수되면 엽록소가 흥분하여 전자를 방출하게 되는데, 이 전자가 전자전달계를 거치면서 ATP를 만들어낸다. 또 광인산화 과정에서 $NAHPH_2$도 함께 만들어지는데 이들은 암반응에 사용된다. 암반응은 엽록체의 스트로마에서 일어나는 반응으로 명반응에서 생성된 ATP와 $NADPH_2$를 이용해 이산화탄소로부터 포도당을 합성한다.

[0008] 자연계의 광합성을 모방한 시스템은 보통 광감작제, 전자전달(electron relay), 촉매의 세 가지 독립적 구성요소를 함유한다.

[0009] NADH/NADPH는 많은 산화환원 효소에 의해 수행되는 다양한 생물학적 반응에서 보조인자(cofactor)로 사용된다. NADH/NADPH의 광촉매 생산(photocatalytic production)은 태양에너지 전환 및 인공 광합성과 관련되어 있어 많은 연구가 이루어져 왔다. 생물학적 반응을 위해 화학량론적 양으로 사용되는 보조인자는 광범위하게 응용하기 위해서는 많은 비용이 소요되기 때문에, 태양 에너지 포집(capture) 및 변환을 효율적으로 수행하기 위한 NADH 및 NADPH 재생 시스템의 개발이 필요하다. 또한, 가시광선은 총 태양 에너지의 46%에 이르기 때문에 가시광선-추진성 시스템을 개발하기 위한 노력이 계속되어 왔다.

[0010] 가시광선에 의한 NADH/NADPH 광 생성을 위한 세 가지 구성요소를 포함하는 시스템의 예로써, 집광 무기염료(light-harvesting inorganic dye)를 전자 도우너의 존재 하에 전자 전달/촉매 쌍으로서의 메틸 비올로젠(methyl viologen) 및 데하이드로제나아제(dehydrogenase)와 커플시키는 시스템을 들 수 있다.

[0011] 그러나, NADH/NADPH의 비-효소적 광화학 재생을 위한 시도는 거의 없었고, 광감작제로서의 $Ru(bpy)_3^{2+}$의 존재 하에, 단핵성 Rh 복합체가 전자 전달 및 수소음이온 이전(hydride transfer) 촉매로서 사용된 예가 있을 뿐이다. 보다 실용적 응용을 위해 필요한 모든 구성요소를 함께 집합시키기 위하여, 광감작제, 산화환원 매개체, 촉매 또는 효소의 공동-고정에 대한 연구도 진행된 바 있다. 예컨대, 광감작제 CdS 입자에 고정된 하이드로제나아제(hydrogenase)가 NADH를 생성한다는 연구결과가 발표되었다. 그러나, 이러한 통합적 시스템의 경우 보통 균질(homogeneous) 시스템에 비하여 더 활성이 낮다는 문제점이 있다.

[0012] 또한, 국내 공개 특허 제2010-0011160호에는 금속 나노입자를 이용한 산화환원효소 보조인자의 전기화학적 재생 방법에 관하여 개시되어 있으나, 루테늄 II 복합체 등과 같은 1차 산화환원 매개체가 추가로 필요한 단점이 있고, 재생 수율이 만족할 만큼 좋지 못하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로써, 산화환원효소 보조인자의 효율적 광화학적 재생을 위한 시스템을 제공하기 위하여, 백금(Pt) 나노입자(Pt NanoParticle, PtNP)를 도입함으로써 상기 문제들을 해결할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 우수한 광감작제, 전자전달 및 촉매의 활성을 갖는 백금(Pt) 나노입자를 사용함으로써, 산화환원효소 보조인자를 광화학적으로 재생하는 방법을 제공한다. 본 발명의 백금(Pt) 나노입자 용액에 전자 도우너 존재

하, 가시광선을 조사하면, 산화형의 산화환원효소 보조인자가 환원형으로 우수한 수율로 전환됨을 밝혀 본 발명을 완성하였다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 백금 나노입자 및 광 조사를 이용한 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법에 관한 것으로, 상기 백금 나노입자가 산화환원효소 보조인자를 이용하는 다양한 생촉매 반응의 효율을 높이는데 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0016] 특히, 기존의 전기화학적 재생방법에 비해 본 발명의 광화학적 재생방법은 NADH 재생 수율이 3배 이상 우수한 결과를 나타내었다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1의 (A)는 0.2 mM의 NAD^+, 0.4 M 의 TEOA, 0.15 M 인산 완충액(pH = 7.0), 25 ℃에서 12시간 광 조사 후 NADH의 생성 정도를 측정한 결과이다[PtNP: 1 유니트 (92.5 μM Pt atoms); 1: 0.01 mM $[Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$; eosin: 0.05 mM].

도 1의 (B)는 PtNP 1 유니트 0.2 mM의 NAD^+, 0.4 M 의 TEOA, 0.15 M 인산 완충액(pH = 7.0), 25 ℃에서 0, 3, 6, 9, 12 시간 광 조사(λ> 400 nm) 후 NADH의 UV-vis 흡수 스펙트럼 측정 결과이다.

도 2의 (A)는 0.2 Mm의 NAD^+, 0.4 M의 TEOA, 0.15 M 인산 완충액(pH = 7.0) 에서 PtNP 농도에 따른 광화학적 NADH 형성 속도를 측정한 결과이다[PtNP, 1 유니트: ■, 2 유니트: ●, 3 유니트: ▲, 4 유니트: ▼].

도 2의 (B)는 0.2 Mm의 NAD^+, 0.4 M의 TEOA, 12시간 동안의 시간당 PtNP에 대한 전환수를 나타낸 것이다. 상기 전환수는 PtNPs의 양에 대해 2800 Pt 원자를 포함하는 나노입자를 가정 하에 계산되었다.

도 3은 PtNP 1 유니트 0.2 mM의 NAD^+, 0.4 M 의 TEOA, 0.15 M 인산 완충액에서 9 시간 광 조사(λ> 400 nm) 후의 pH가 NADH의 광재생에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

도 4의 (A)는 PtNP 1 유니트 0.2 mM의 NAD^+, 0.15 M 인산 완충액에서 TEOA의 농도에 따른 NADH 생성 정도를 측정한 결과이다.

도 4의 (B)는 PtNP 1 유니트 0.2 mM의 NAD^+, 0.4 M 의 TEOA, 0.15 M 인산 완충액(pH = 7.0)에서 NAD^+의 농도에 따른 NADH 생성 속도를 측정한 결과이다[0.1 Mm: ■, 0.2 mM: ▲, 0.3 mM: ●].

도 5는 PtNP, NAD^+ 및 TEOA간 전자 전달 관계를 도시한 것이다.

도 6은 흡수스펙트럼 변화 측정 결과를 도시한 것으로서, (A)는 [1 유니트의 PtNP, 0.01 mM의 $Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$, 0.05 mM 에오신, 0.2 mM NAD^+ 및 0.4 M TEOA]인 경우, (B)는 [1 유니트의 PtNP, 0.01 mM의 $Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$, 0.2 mM NAD^+ 및 0.4 M TEOA]인 경우의 결과이다.

도 7은 4 유니트의 PtNP를 첨가한 후 및 첨가하지 아니한 경우 0.5 μM 에오신의 형광 스펙트럼 측정 결과를 도시한 것으로서, 여기 파장은 524 nm이다.

도 8은 0, 3, 6, 9 및 12시간째에, (A)는 2 유니트의 PtNP, (B)는 3유니트의 PtNP를 첨가한 경우의 흡수스펙트럼의 변화를 측정한 결과이다(0.15M 인산 완충액 중의 0.2 mM NAD^+ 및 0.4 M TEOA 조건임).

도 9는 광 조사 0, 3, 6, 9, 12시간 후, 0.15 M 인산 완충액 중의 1 유니트 PtNP, 0.2 mM NAD^+, 및 0.4 M TEOA로 이루어진 시스템에서 재생된 NADH의 광 재생에 pH가 미치는 역할을 측정한 것이다.

도 10은 TEOA의 농도에 따른 NADH 재생에 있어서의 흡수스펙트럼 변화를 측정한 결과이다[(A)은 200 mM인 경우

이고, (B)는 300 mM인 경우임].

도 11은 Au 나노입자를 이용한 NADH 재생에 있어서 흡수스펙트럼 변화를 측정한 결과이다

도 12는 Pd 나노입자를 이용한 NADH 재생에 있어서 흡수스펙트럼 변화를 측정한 결과이다.

도 13은 PtNP를 사용한 전기화학적 NADH 생성 정도를 측정한 결과이다.

도 14는 전자 도우너인 EDTA 1 mM에 따른 NADH 재생에 있어서의 흡수스펙트럼 변화를 측정한 결과이다.

도 15는 전자 도우너인 트리에틸아민(triethylamine, Et_3N) 400 mM에 따른 NADH 재생에 있어서의 흡수스펙트럼 변화를 측정한 결과이다.

도 16은 전자 도우너인 소디움 포르메이트(Na-formate) 100 mM에 따른 NADH 재생에 있어서의 흡수스펙트럼 변화를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 하기 2단계를 포함하여 이루어지는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생방법을 제공한다.

[0020] 단계 (a): 산화형의 산화환원효소 보조인자에 백금(Pt) 나노입자를 첨가하는 단계

[0021] 단계 (b): 상기 단계 (a)의 혼합물에 광 조사하는 단계.

[0022] 본 발명에서, 단계 (a)는 산화형의 산화환원효소 보조인자에 백금 나노입자를 첨가하는 단계이다.

[0023] 본 발명의 환원의 대상이 되는 산화형의 산화환원효소 보조인자는 니코틴아미드 보조인자인 NAD^+(nicotinamide adenine dinucleotide), $NADP^+$ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 또는 플라빈 보조인자인 FAD^+ (flavin adenine dinucleotide), FMN^+(flavin mononucleotide)일 수 있으며, 바람직하게는 NAD^+일 수 있다.

[0024] 본 발명에서, 상기 단계 (a)의 산화환원효소 반응기에 전자 도우너(electron donor)를 추가로 첨가할 수 있으며, 상기 전자 도우너로는 트리에탄올아민 등이 바람직하다.

[0025] 또한, 본 발명에서 상기 산화환원효소 반응기에 첨가되는 백금 나노입자의 농도는 1유니트 이상 (여기에서 1유니트는 92.5 μM의 Pt 원자를 함유하는 것을 의미함)의 농도로 첨가하는 것이 바람직하며, 보다 구체적으로는 2 유니트 내지 4 유니트의 농도로 첨가할 수 있다.

[0026] 본 발명에서, 상기 단계 (a)에서의 pH를 7 이상으로 조절하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 pH를 7 내지 10으로 조절할 수 있다.

[0027] 본 발명에서, 상기 단계 (a)의 혼합물에 조사되는 광은 가시광선일 수 있다.

[0028] 본 발명에서, 상기 단계 (a)의 경우 완충액 중에서 수행되는 것이 바람직하며, 완충액으로는 특히 인산 완충액, Tris 완충액, 암모늄 포스페이트 완충액 또는 MES 완충액이 사용될 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명에서, 단계 (a)의 혼합물에 광 조사를 하기 전에 혼합물로부터 공기를 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 예컨대 이베큐에이션(evacuation)을 통해 공기를 제거할 수 있다.

[0030] 본 발명에서, 반응 조건이 호기성 또는 혐기성 조건이냐에 관계없이 산화환원효소 보조인자의 광재생이 가능하다.

[0031] 본 발명에서, 백금 나노입자는 단독으로 광흡수 유니트로 작용할 수 있다. 구체적으로 백금 나노입자는 전자 전달/촉매뿐만 아니라 광감작제로도 작용할 수 있으며, 가시광선 하에서 광전자를 포집할 수 있다.

[0032] 본 발명은 또한 산화형 산화환원효소 보조인자 및 백금 나노입자를 포함하는 반응기; 및 광 조사 장치를 포함하는 산화환원효소 보조인자의 광화학적 재생장치에 관한 것이다.

[0033] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 산화환원효소 보조인자를 사용하여 효소를 환원시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의하여 재생된 NADH의 기능을 확인하기 위하여, 알파-글루타메이트(α-glutamate)의 L-글루타메이트로의 전환율을 살펴본 결과, 본 발명의 재생된 NADH에 의하여 L-글루타메이트가 생성됨을 확인할 수

있었다 (하기 실시예 8 참조).

[0034] 상기 전환 가능한 효소로는 글루타메이트, 포르메이트 데하이드로게나아제(formate dehydrogenase) 또는 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나아제(glucose-6-phosphate dehydrogenase) 등을 들 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0035] 약어 정의:

[0036] NAD: 니코틴 아데닌 디뉴클레오티드(Nicotinamide Adenine Dinucleotide)

[0037] NADP: 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)

[0038] FAD: 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 (flavin adenine dinucleotide)

[0039] FMN: 플라빈 모노뉴클레오티드 (flavin mononucleotide)

[0040] PtNP: 백금 나노입자 (Platinium nanoparticle)

[0041] TEOA: 트리에탄올아민 (triethanolamine)

[0042] Cp*: 펜타메틸사이클로펜타디에닐(pentamethylcyclopentadienyl)

[0043] bpy: 2,2'-비피리딘(bipyridine)

[0044] 이하, 본 발명의 구체적인 구성과 작용을 실시예를 통해 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예로 제한되는 것은 아니다.

[0045] **[실시예]**

[0046] [시약 준비]

[0047] (1) 물을 MilliQ 정제 시스템으로 정제하였다. 모든 시약들은 Aldrich에서 구입하여 사용하였고, 추가 정제를 실시하였다.

[0048] (2) $[Cp^*Rh(bpy)]^{2+}$를 공지 방법에 따라 제조하였다.

[0049] **제조예 1. Pt 나노입자의 제조**

[0050] PtNP는 포타시움 테트라클로로플라티네이트(potassium tetrachloroplatinate, K_2PtCl_4)를 폴리비닐피롤리돈(MW=10k)으로 환원시켜 제조하였다.

[0051] 보다 구체적으로, K_2PtCl_4 열수 혼합물(11.5 mM, 120 mL)을 폴리피닐피롤리돈 (3 g)과 4시간 동안 반응시켰다. 상기 반응은 90 내지 100 ℃에서 4시간 동안 교반하여 반응시켰으며, 반응 후 용액은 진한 갈색 내지 검정색을 나타냈다.

[0052] 여기에서, 1 유니트의 PtNP 용액은 92.5 μM의 Pt 원자를 함유하는 것을 의미한다.

[0053] **비교제조예 1. Au 나노입자의 제조**

[0054] Au 나노입자는 H_2AuCl_4를 폴리비닐피롤리돈(MW=10k)으로 환원시켜 제조하였다.

[0055] 보다 구체적으로, H_2AuCl_4(11.5 mM, 120 mL)을 폴리피닐피롤리돈(3 g)과 4시간 동안 반응시켰다. 상기 반응은 90 내지 100 ℃에서 4시간 동안 교반하여 반응시켰으며, 반응 후 용액은 적색을 나타냈다.

[0056] **비교제조예 2. Pd 나노입자의 제조**

[0057] Pd 나노입자는 K_2PdCl_4를 폴리비닐피롤리돈(MW=10k)으로 환원시켜 제조하였다.

[0058] 보다 구체적으로, K_2PdCl_4(11.5mM, 120mL)을 폴리피닐피롤리돈(3 g)과 4시간 동안 반응시켰다. 상기 반응은 90 내지 100 ℃에서 4시간 동안 교반하여 반응시켰으며, 반응 후 용액은 옅은 검정색을 나타냈다.

[0059] **실시예 1. Pt 나노입자의 크기 및 분포 관찰**

[0060] 상기 기재된 방법에 따라 제조된 Pt 나노입자의 크기 및 분포를 TEM 및 동적광산란기(dynamic light scattering instrument, Malvern, Zetasizer Nano ZS)로 측정하였다. 나노입자의 크기는 5 ± 2 nm였고, 원형에 가까운 형상을 가지고 있었다.

[0061] **실시예 2. UV-vis 스펙트럼 및 TEM 영상**

[0062] UV-vis 스펙트럼을 Hewlett Packard 8458 분광광도계로 측정하였다. 투과전자현미경(TEM) 영상은 JEOL 2010FX 전자현미경(200 kV에서 작동)으로 관찰하였다. 투과 스펙트럼을 Perkin-Elmer LS55 형광 분광광도계를 이용하여 수집하였다.

[0063] UV-vis은 340 nm에서 NADH의 농도를 측정하기 위하여 실시하였고, 형광영상의 경우 에오신의 형광이 백금 나노입자에 의해 소광되는 것을 보여주기 위하여 실시한 것이다.

[0064] **실시예 3. NADH 광화학적 재생 측정**

[0065] NADH의 광화학적 재생반응의 경우, 25℃에서 1유니트의 PtNP, 0.4 M 의 TEOA 및 0.2 mM의 NAD^+ 존재 하에 0.15 M 인산완충액(1 mL, pH 5-9) 중에서 실시되었다. 자성 교반기 및 스톱퍼가 장착된 3 mL 유리 큐벳(바이알)에서 광반응을 시켰다.

[0066] 모든 구성성분을 포함하는 샘플(1 mL)을 큐벳에 넣고 반응하였고, 공기가 제거된 반응은 이베큐에이션(evacuation)을 반복하여 공기가 제거된 샘플을 제조하고 Ar 플러싱(flushing)을 실시하였다. 420 nm 컷오프 필터가 장착된 330 W Xe 램프를 광원으로 사용하였다. NADH의 생성은 340nm(ε =6220 $cm^{-1}M^{-1}$)에서의 UV 흡광도를 측정하여 결정하였다.

[0067] 실온에서, 인산 완충액 중의 에오신/PtNP/$[Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$/TEOA의 조건에서 NAD^+를 광화학적으로 환원시킨 경우, 420nm 컷오프 필터로 12시간 조사한 후에, NAD^+가 NADH로 40% 정도 변환된 것으로 나타났다(도 1의 (A) 및 도 6의(A) 참조). 광화학 반응은 에오신이 없는 상태에서도 일어났으나, 비슷한 양의 NADH(36%)가 얻어졌다(도 6의(B) 참조). 상기 결과를 통해 PtNP가 단독으로 광-흡수 유니트로 작용할 수 있다는 점을 알 수 있다.

[0068] 한편, $[Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$과 에오신이 제거된 상태에서도 광분해 동안 340nm 근처에서 명백한 스펙트럼 변화가 있었고, 동일한 조건 하에서 59% NADH가 생성되었다(도 1 참조). 상기 결과를 통해 TEOA를 소비하여 가시광선-추진성 전자 흐름(visible light-driven electron flow)이 PtNP로부터 NAD^+로 생긴다는 점 및 PtNP가 단독으로 전자 전달/촉매뿐만 아니라 광감작제로도 작용할 수 있다는 점을 알 수 있다.

[0069] PtNP 및 TEOA가 시스템으로부터 모두 제거된 경우, NADH의 광감성(photosensitized) 형성이 관찰되지 않았다. 이는 에오신의 형광이 PtNP에 의해 퀀칭(소광)되나(도 7 참조), 여기된 에오신(excited eosin)으로부터의 에너지 전달(energy transfer)이 NADH의 수율을 향상시키지는 않는다는 점에 주의하여야 한다.

[0070] 1 유니트의 PtNP (1 유니트의 PtNP 용액은 92.5 μM의 Pt 원자를 함유함) 및 0.01 mM의 $[Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$의 광촉매 활성을 비교하기 위하여, NAD^+ 환원을 위한 $[Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$와의 반응 및 $[Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$/에오신과의 반응을 TEOA 존재 하에 실시해 보았다. 그 결과 전자의 경우 4%, 후자의 경우 36%의 NADH가 생성되었다.

광여기된 에오신의 경우 그 에너지를 $[Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$로 전달하는 활성을 나타냈으나, $[Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$을 단독 사용한 경우 생성된 NADH의 양은 무시할 수 있을 정도로 작았다(도 1의 (A) 참조). 상기 결과를 통해, PtNP가 $[Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$/에오신 보다 광에너지를 변환하고 NADH를 생성하는 광촉매 시스템으로서 보다 활성이 좋음을 알 수 있다.

[0071] 비교제조예 1에서 제조된 Au 나노입자 및 비교제조예 2에서 제조된 Pd 나노입자의 경우에는 동일한 조건에서 NADH의 양에 있어서 미세한 변화만이 관찰될 뿐이었다(도 11 및 도 12 참조).

[0072] 분자체 산소(molecular oxygen)은 화학적 또는 전기화학적으로 환원된 메틸 비올로젠(methyl viologen) 또는 $[Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$과 쉽게 반응하는 것으로 알려져 있다. 또한, 산소가 존재하는 경우 수율이 급격히 제한되는데, 이는 수소 광재생에 있어서 Pt 입자의 탈분극 및 환원 전달체의 재산화(reoxidation of a reduced relay)에 기인하는 것으로 보인다. 광여기된 PtNP에 O_2가 미치는 영향을 알아보기 위하여, PtNP/TEOA로 NADH 재생정도를 호기 상태 및 혐기 상태 하에서 측정해 보았다. 그 결과, NADH의 형성율에는 큰 차이가 없었고, 이는 광반응이 산소에 무감각하고, PtNP의 활성화된 표면이 NAD^+ 및 TEOA의 존재 하에서 O_2에 대해 낮은 친화력을 가지고 있다는 점을 알 수 있다. 본 발명의 재생방법의 경우, 호기성 및 혐기성 조건에 상관없이 우수한 재생효율을 나타내는 것으로 나타났다.

[0073] **비교예 1. NADH 전기화학적 재생 측정**

[0074] 상기 실시예 3에서 사용한 조건과 동일한 농도의 1유니트 PtNP (92.5 μM)와 0.2 mM NAD^+ 조효소, 0.1 mM의 $Cp^*Rh(bpy)(H_2O)]^{2+}$를 사용하여 전기화학적으로 -0.8V에서 12시간 반응을 하였을 때, 수율이 18%로 나왔다(도 13 참조). 이는 동일 농도의 PtNP와 조효소를 사용한 NADH 광화학적 재생 수율인 59% 보다 훨씬 떨어지는 결과이다.

[0075] **실시예 4. PtNP의 농도에 따른 NADH의 광생성율 측정결과**

[0076] NADH 광생성 초속도(initial rate) PtNP의 농도에 의존적인 것으로 나타났다 (도 2의 (A) 및 도 8 참조). PtNP의 양을 1에서 4유니트로 증가시키는 경우, NADH 형성을 위한 초속도가 증가하였으며, 12시간까지 조사한 후 얻어진 최종 수율은 59%에서 86%까지 증가하였다. 증가곡선은 PtNP의 농도가 저농도일 때에는 선형이었으나, 고농도에서는 곡선으로 나타났는데, 이는 제한기질(limiting substrate) 때문인 것으로 보인다.

[0077] PtNP의 농도가 3 유니트 이상인 경우 일정한 수율을 나타냈으며, 이는 광화학 단계가 전환한계(turnover-limiting)이 되었음을 의미한다. 최대변환율은 86%였으며, PtNP가 3 유니트일 때 최대변환율을 나타냈다. 1 유니트의 PtNP를 사용한 경우 59%의 수율을 나타냈으며, 이는 5 nm의 Pt 나노입자가 2800 Pt 원소를 함유한다고 가정할 때 1시간 당 ~300 턴오버에 상응한다. 예상한 바와 같이, 전환수(turnover number)는 PtNP 농도가 증가함에 따라 감소하였다(도 2의 (B) 참조).

[0078] **실시예 5. pH에 따른 NADH 광생성 정도 측정**

[0079] 인산 완충액의 pH를 조절하여 pH 조건을 각각 5.6, 6.0, 7.0, 8.0, 9.1로 조절하였다. 각각 다른 pH를 가지는 용액을 사용하여 NADH의 생성 정도를 측정하였다(도 3 참조).

[0080] pH가 7.0일 때 NADH 재생 수율이 최대였고, pH가 8.0 및 9.1인 경우에도 현저한 양의 NADH가 생성되었다(도 9 참조). 수소 농도가 더 높을 때 NADH 생성이 현저히 저해됨을 알 수 있다. 산성 pH 조건에서 NADH의 생성 속도의 감소는 덜 효율적인 전자 도우너로 변환되는 TEOA의 양성화(protonation)의 결과인 것으로 보인다.

[0081] **실시예 6. TEOA의 농도가 NADH 재생에 미치는 영향**

[0082] TEOA의 농도 의존성 실험을 한 결과는 도 4의 (A)에 도시한 바와 같다.

[0083] 1 유니트의 PtNP 존재 하에서 TEOA의 농도가 증가함에 따라 NADH 생성도 증가하였다. TEOA의 농도를 0.2 내지 0.4 M로 한 경우, 9시간 후 NADH 전환은 36 내지 55%로 나타났다(도 10 참조). TEOA의 산화단계가 또한 율속단계임을 알 수 있다.

[0084] **비교예 2. 다른 전자 도우너가 NADH 재생에 미치는 영향**

[0085] 전자 도우너로 TEOA 대신 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA), 트리에틸아민(triethylamine, Et_3N), 소디움 포르메이트(Na-formate)를 사용하고, 농도를 각각 1, 400, 100 mM으로 한 경우, 12시간 반응 후의 NADH 생성양이 극미량인 것으로 확인되었다(도 14 ~ 16 참조). 수율은 각각 3, 2, 5% 정도였다.

[0086] **실시예 7. NAD^+ 농도에 따른 NADH 재생 속도 측정**

[0087] PtNP의 표면이 촉매 반응에 필요하다면, NAD^+의 농도가 증가하여 일정 수준 이상이 되는 경우 표면이 기질로 포화되기 때문에 (재생)속도에 영향이 없을 것이다. 실험 결과 (재생)속도는 0.2 mM NAD^+ 이상인 경우 일정한 값으로 나타났으며, 0차 반응을 상기시켰다(도 4의 (B) 참조).

[0088] 상기 모든 실험 결과를 종합해 보면, NAD^+의 가시광선-추진성 환원에는 PtNP 및 TEOA가 유용함을 알 수 있다(도 5 참조). 광여기된 PtNP는 NAD^+ 및 TEOA를 각각 환원시키거나 산화적 퀀칭(소광)을 시킬 수 있다. 광-추진성 PtNP는 전하 분리(charge separation)를 유도할 수 있고, 여기된 전자는 환원을 위하여 NAD^+로 전달되며, 가전자대 정공(valence band hole)이 TEOA에 의해 환원적으로 소기된다. 결과적으로, PtNP가 가시광선 하에서 광전자(incident photon)를 포집할 수 있다는 점을 알 수 있다.

[0089] **실시예 8. 생성된 NADH를 사용한 효소반응**

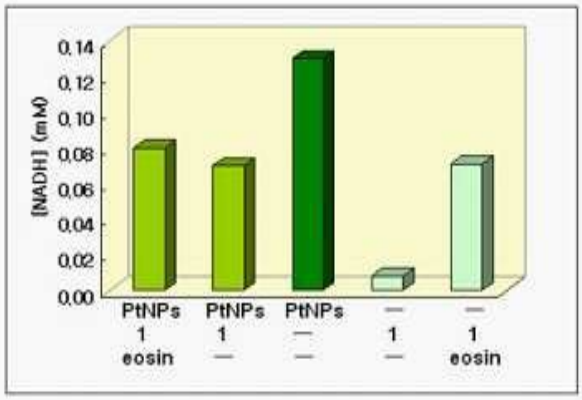
[0090] 상기 반응 조건(PtNP, NAD, TEOA, pH =7)에 5 mM 알파-글루타메이트(α-glutamate), 80 mM 암모늄 포스페이트(ammonium phosphate), 2 유니트 글루타메이트 데하이드로게나아제(glutamate dehydrogenase)를 사용하여 9시간 광 반응한 결과 변환(conversion)이 85% 얻어졌다. 반응 결과물은 L-글루타메이트로 HPLC를 사용하여 분석하였다(컬럼은 길이 150 mm ODS-3V이고, 0.08% 인산수용액으로 분리하였고, 210 nm에서 검출하였다).

[0091] 다른 효소, 즉 포르메이트 데하이드로게나아제(formate dehydrogenase), 글루코즈-6-포스페이트 데하이드로게나아제(glucose-6-phosphate dehydrogenase)과의 반응도 가능하다.

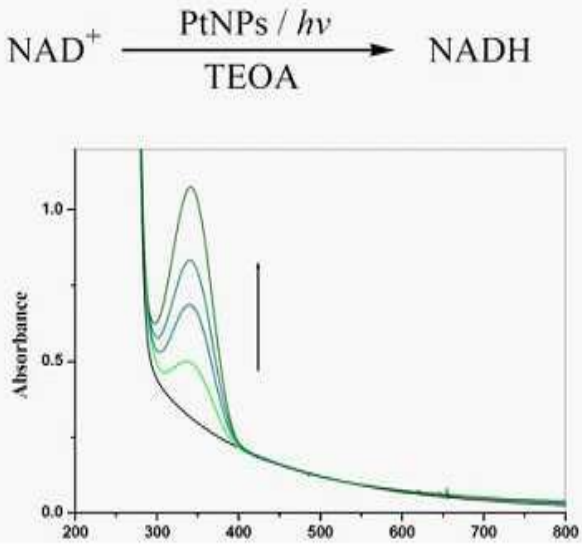
도면

도면1

(A)

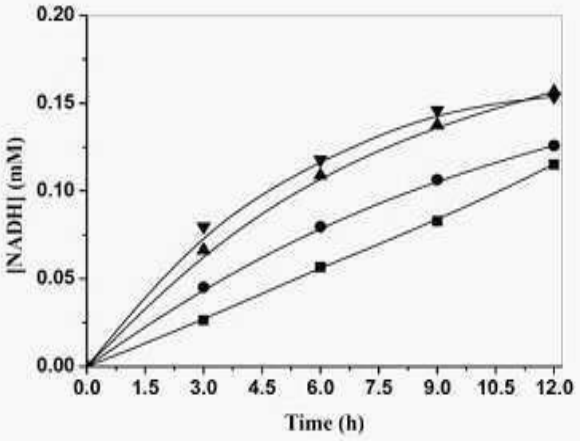

[NADH] (mM)
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
PtNPs
1
eosin
PtNPs
1
—
PtNPs
—
—
—
1
—
1
eosin

(B)

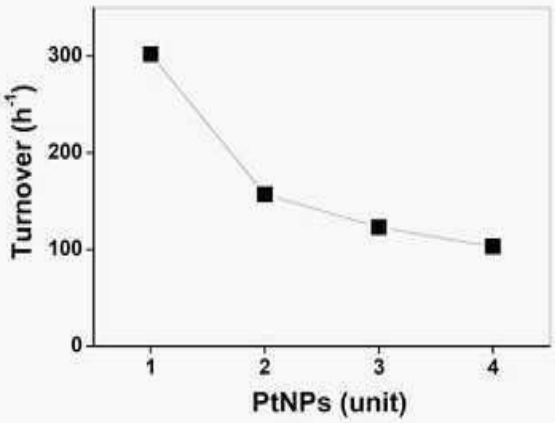

NAD+
PtNPs / hv
TEOA
NADH
Absorbance
1.0
0.5
0.0
200
300
400
500
600
700
800

도면2

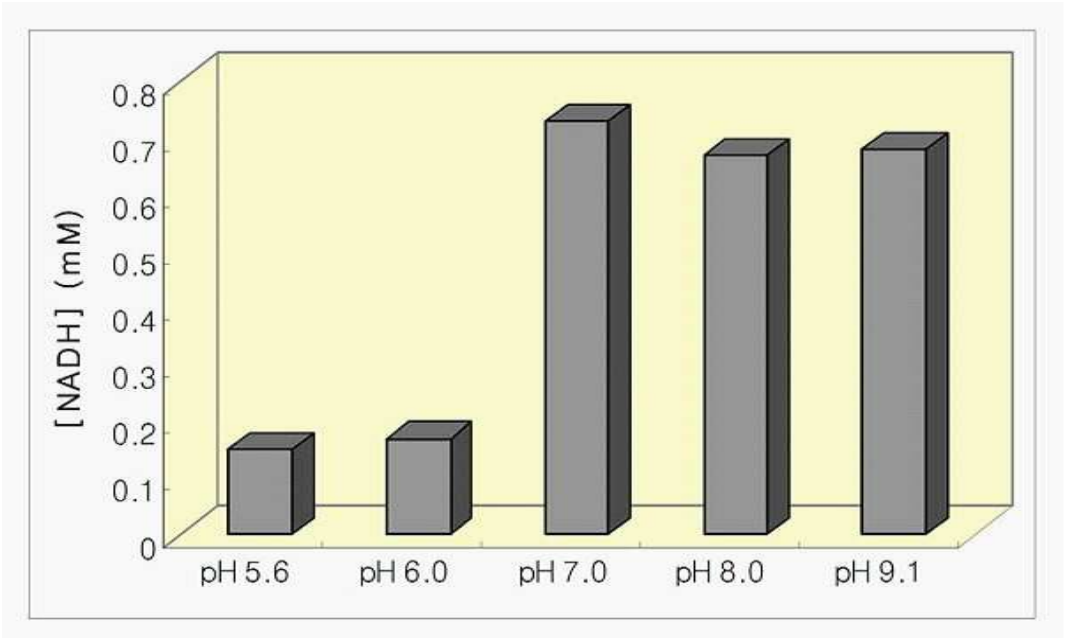
(A)


[NADH] (mM)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.0
1.5
3.0
4.5
6.0
7.5
9.0
10.5
12.0
Time (h)

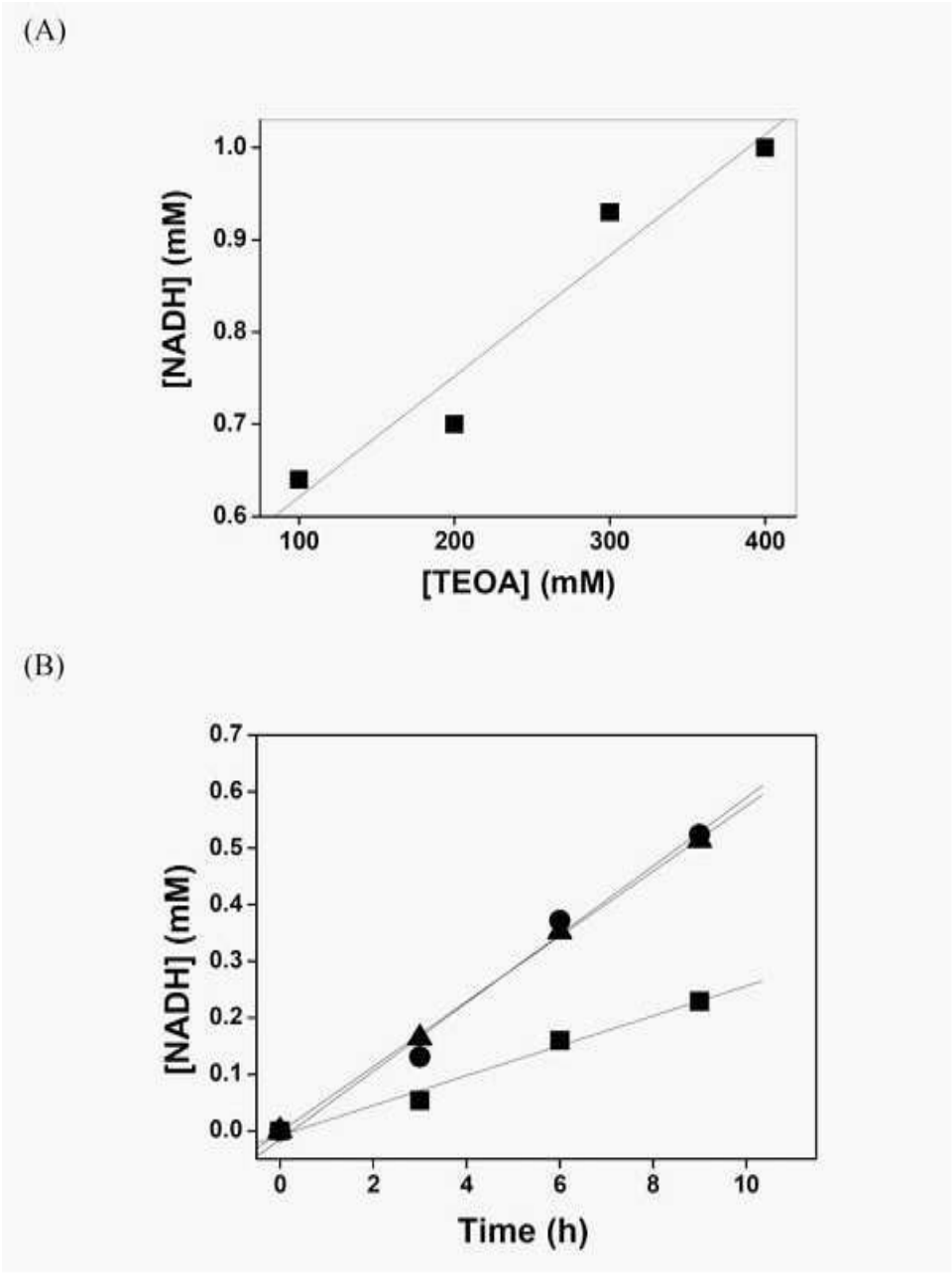
(B)


Turnover (h^{-1})
300
200
100
0
1
2
3
4
PtNPs (unit)

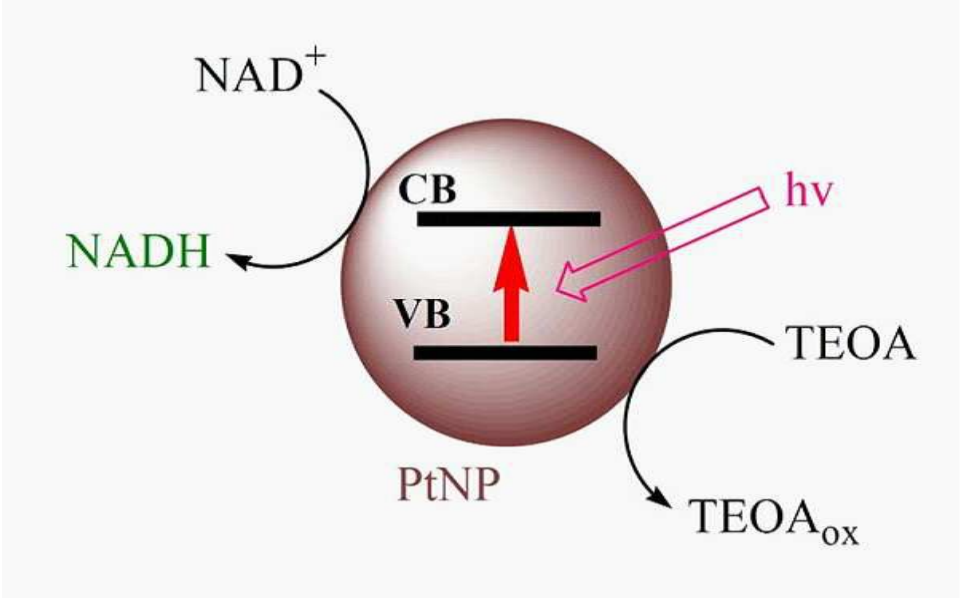
도면3



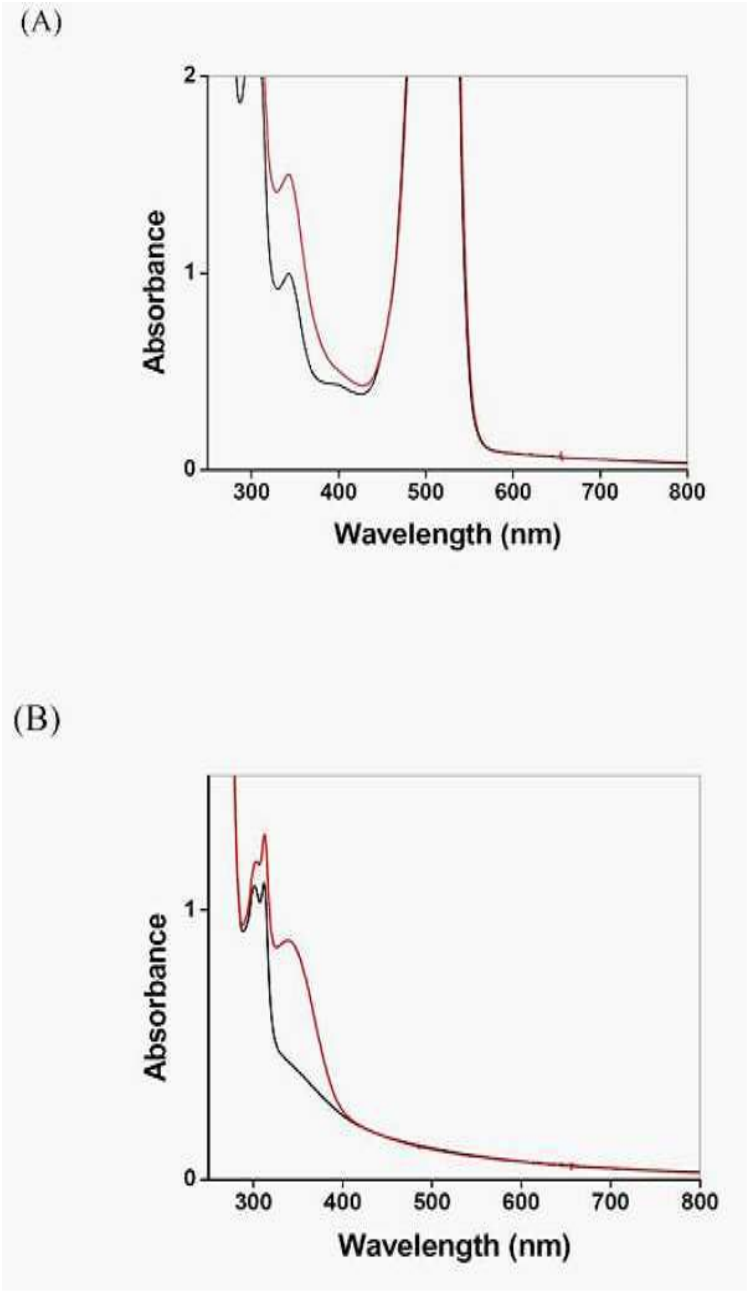
도면4


(A)
[NADH] (mM)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
100
200
300
400
[TEOA] (mM)
(B)
[NADH] (mM)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
2
4
6
8
10
Time (h)

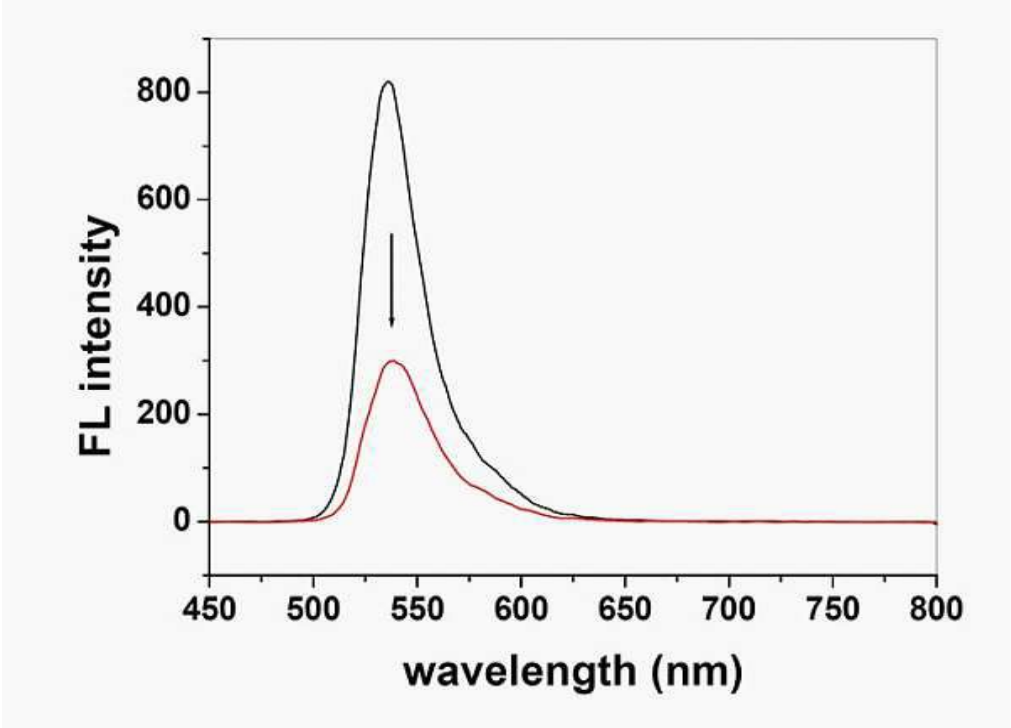
도면5



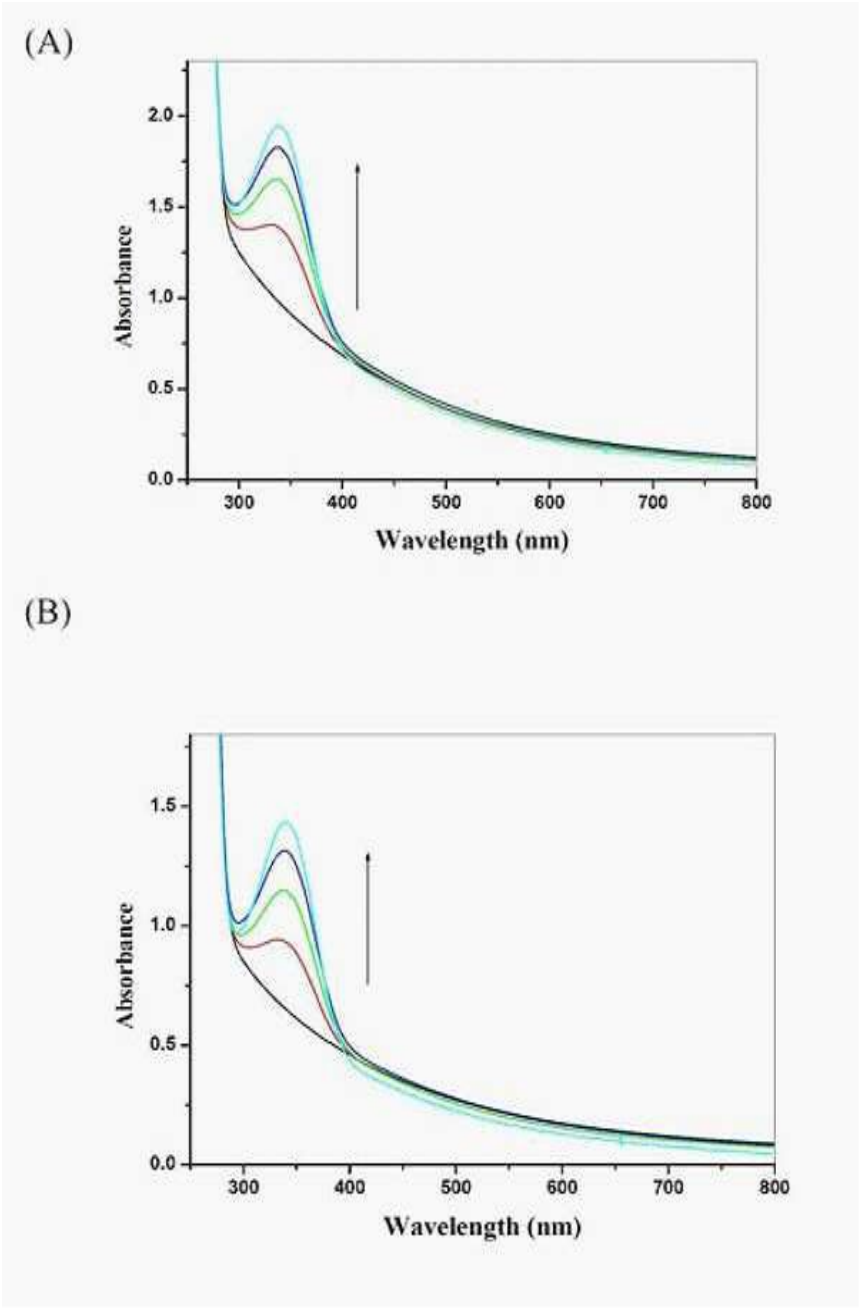
도면6


(A)
Absorbance
2
1
0
300
400
500
600
700
800
Wavelength (nm)
(B)
Absorbance
1
0
300
400
500
600
700
800
Wavelength (nm)

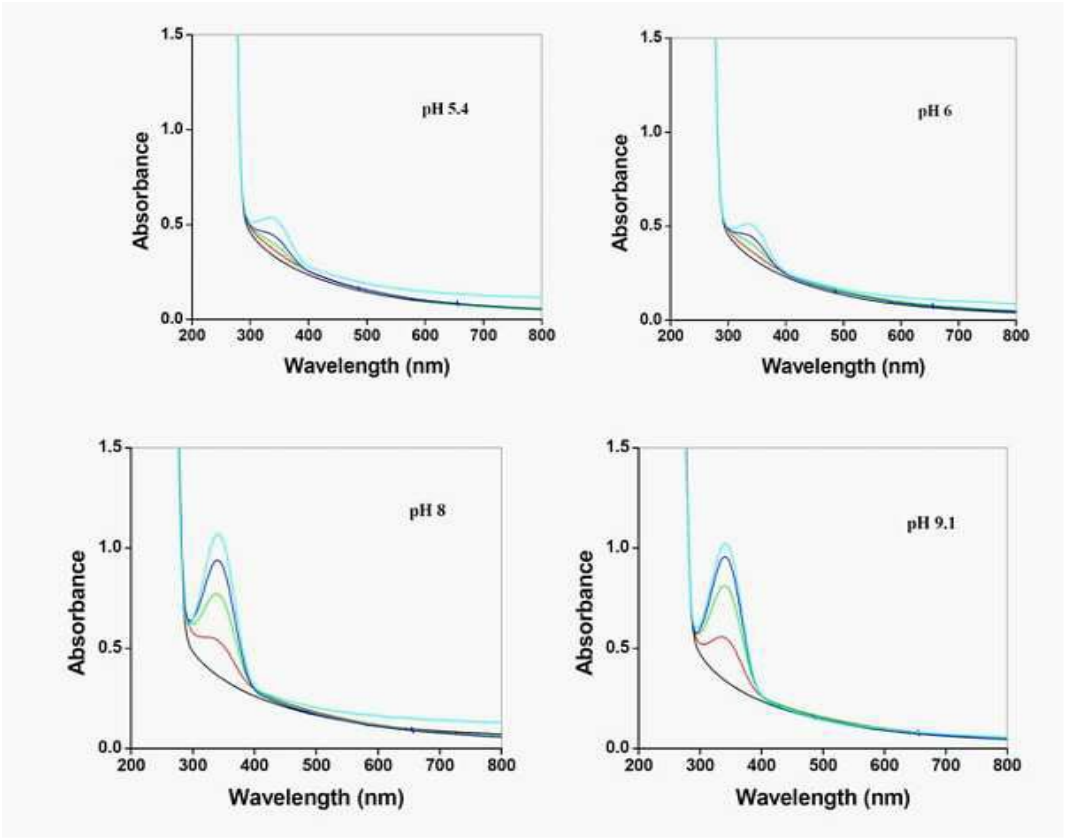
도면7


FL intensity
800
600
400
200
0
450
500
550
600
650
700
750
800
wavelength (nm)

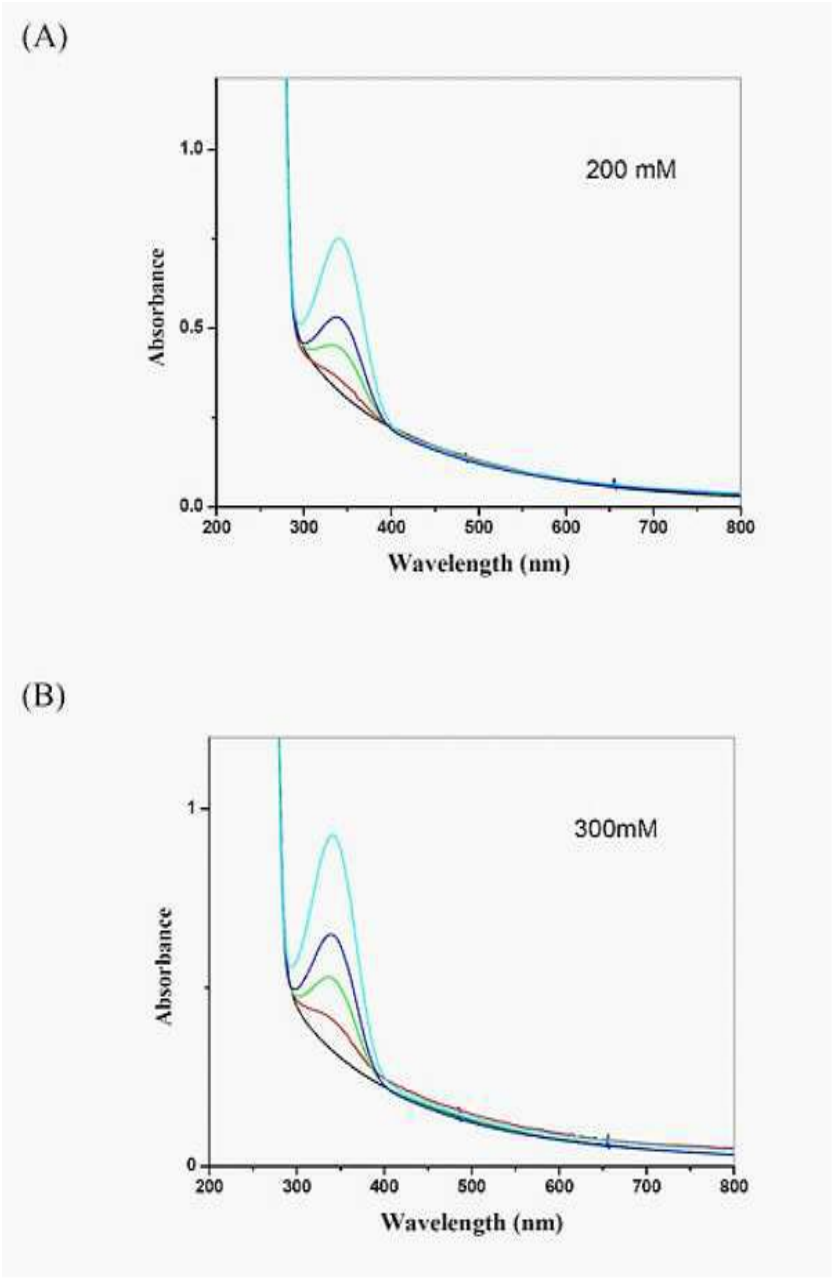
도면8



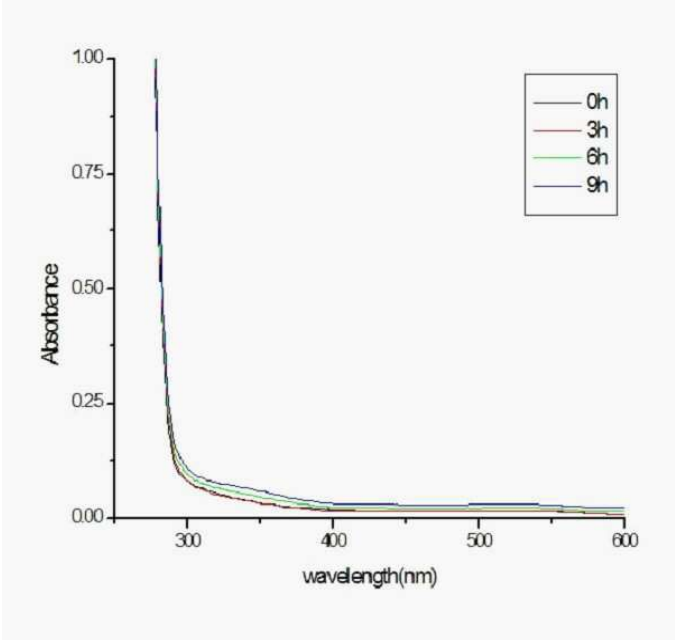
도면9


pH 5.4
pH 6
pH 8
pH 9.1
Absorbance
Wavelength (nm)
0.0
0.5
1.0
1.5
200
300
400
500
600
700
800

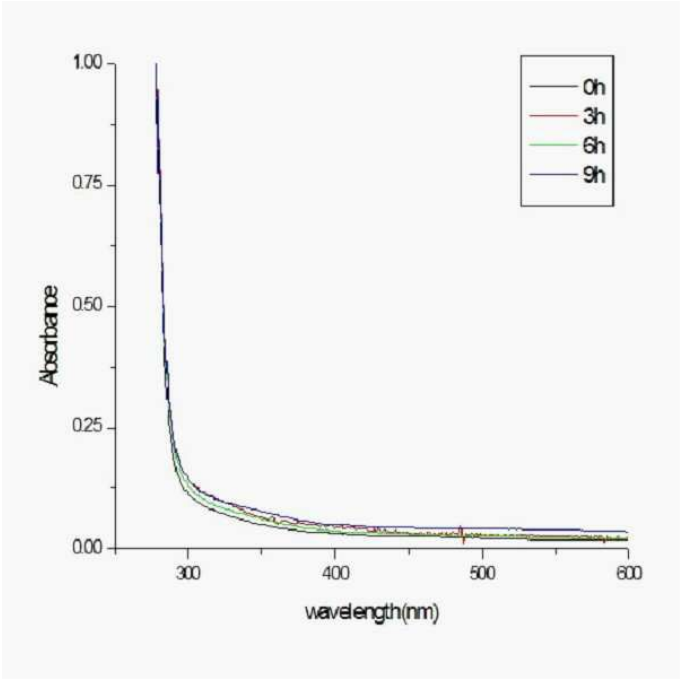
도면10


(A)
200 mM
Absorbance
Wavelength (nm)
(B)
300mM
Absorbance
Wavelength (nm)

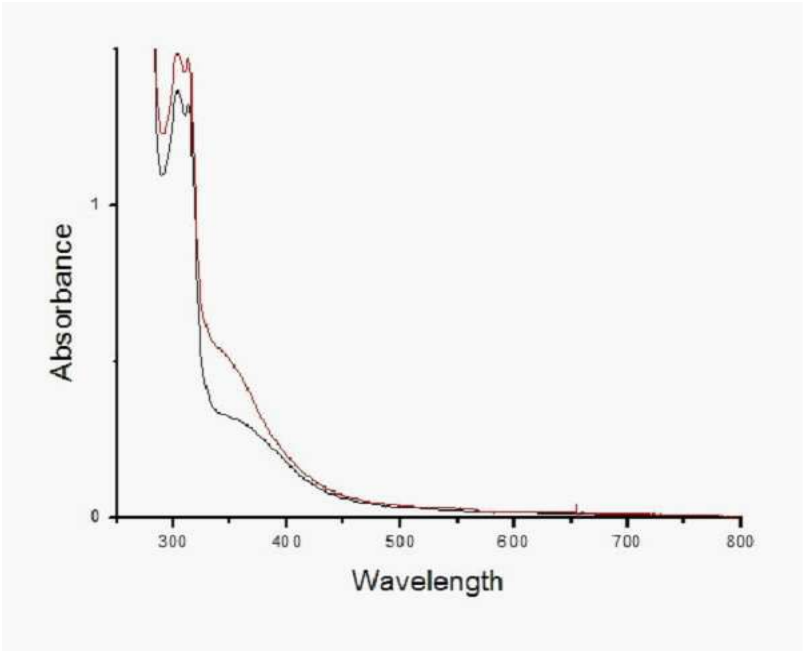
도면11


1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Absorbance
300
400
500
600
wavelength(nm)
0h
3h
6h
9h

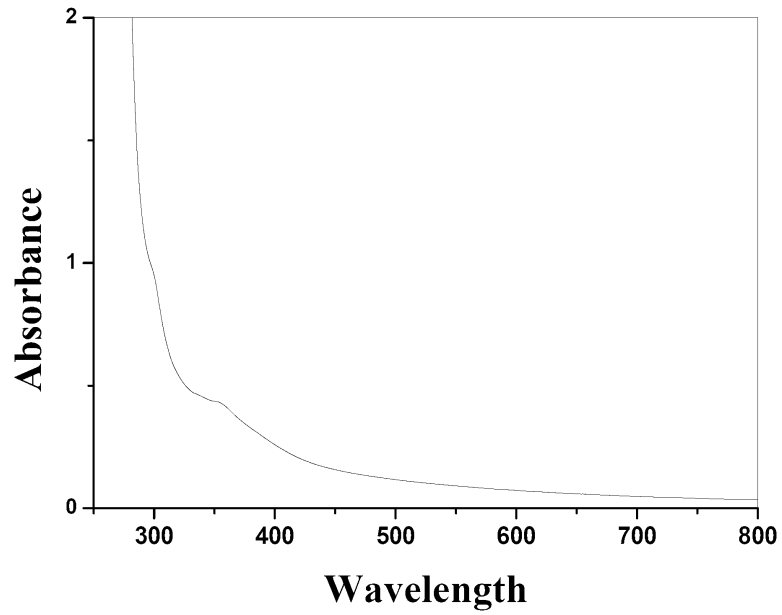
도면12


1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Absorbance
300
400
500
600
wavelength(nm)
0h
3h
6h
9h

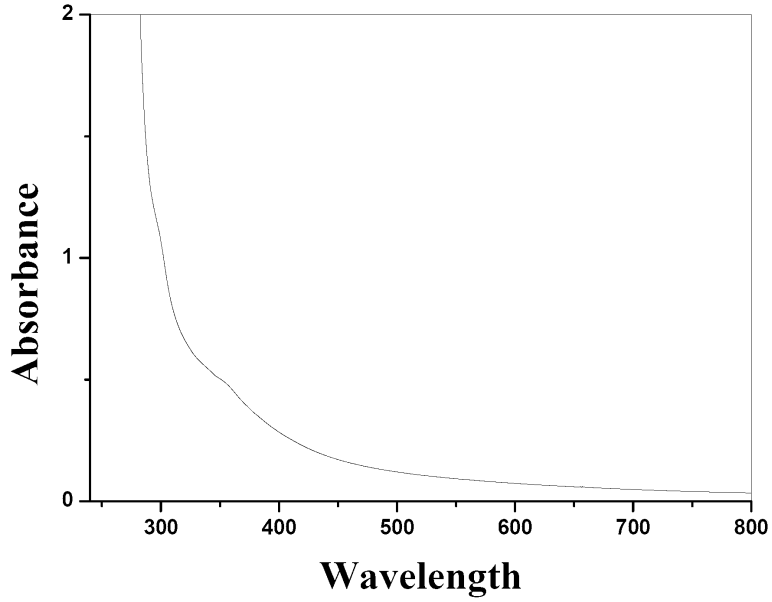
도면13


Absorbance
1
0
300
400
500
600
700
800
Wavelength

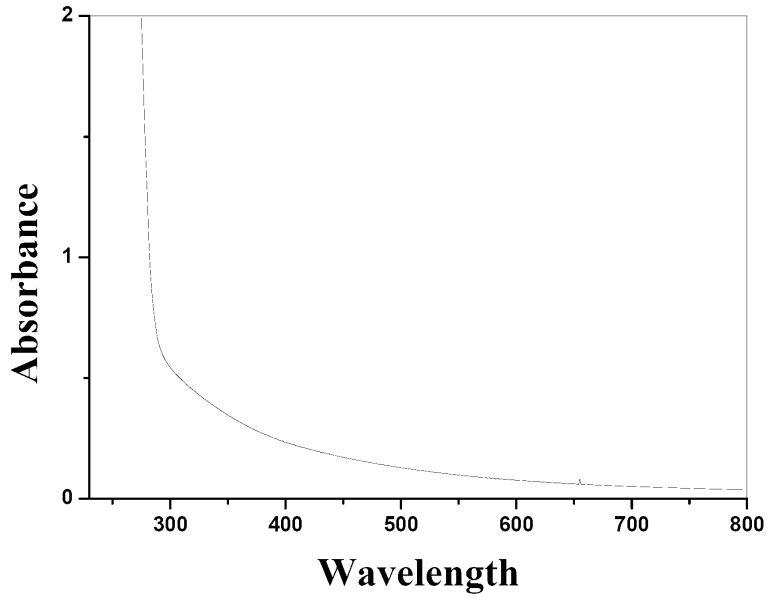
도면14


Absorbance
2
1
0
300
400
500
600
700
800
Wavelength

도면15


Absorbance
Wavelength
0
1
2
300
400
500
600
700
800

도면16


Absorbance
Wavelength
0
1
2
300
400
500
600
700
800