(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0127916
(43) 공개일자 2013년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 11/00 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0044480
(22) 출원일자 2013년04월22일
심사청구일자 2013년04월22일
(30) 우선권주장
1020120046689 2012년05월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김중배
서울특별시 강남구 역삼2동 래미안펜타빌@ 101동 1501호
홍성길
서울특별시 성북구 안암동5가 고려대학교 화공생명공학과
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **작용기에 결합된 효소를 포함하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

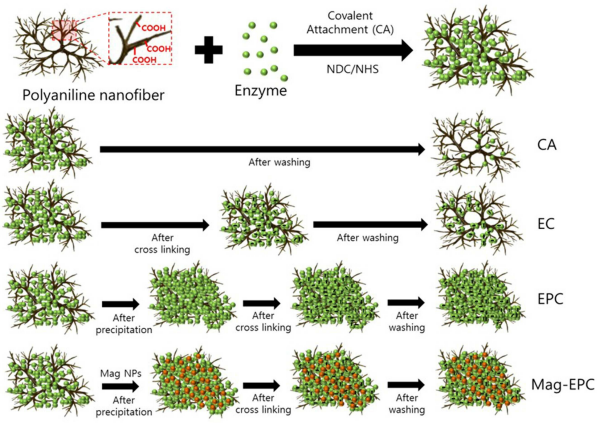
본 발명은 작용기에 결합된 효소를 포함하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체, 그 제조방법 및 그 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 작용기에 결합된 효소를 포함하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체 및 이의 제조방법은 종래에 비해 현저하게 많은 양의 효소가 매트릭스 담지 및 고정될 수 있을 뿐만 아니라 외부 충격으로부터 고정된 효소가 쉽게 유출되지 않으므로 장기간이 경과한 후에도 그 안정성이 유지된다.

또한 섬유의 표면에 효소와 공유결합을 수행하는 작용기에 의해 효소가 결합하게 되므로 보다 안정하게 고정화될 수 있다.

나아가 자성분리가 가능하므로 용매에서 쉽게 복합체를 분리해 낼 수 있을 뿐만 아니라 종래의 효소-3차원 네트워크 구조의 나노섬유 매트릭스 복합체보다 표면적이 증가하고 효소 담지량도 증가하여 효소 활성이 증가되는 효과를 가진다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011K000833
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신기술 융합형 성장동력사업
연구과제명	고활성, 고안정 나노-단백질 원천기술 개발 및 ELISA에서의 응용
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.07.01 ~ 2012.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20118510020020-11-1-000
부처명	지식경제부
연구사업명	에너지국제공동연구사업
연구과제명	이산화탄소의 전환 공정 개발을 위한 효소 고정화 및 안정화
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교산학협력단
연구기간	2011.12.01 ~ 2012.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

표면에 작용기가 형성된 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스; 및

상기 작용기에 결합된 효소를 포함하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 작용기는 자성나노입자와 결합하는 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체.

청구항 3

제 1항 또는 제2항에 있어서,

상기 작용기는 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기 및 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 자성나노입자는 Fe2O3, Fe3O4, CoFe2O4, MnFe2O4, FePO4, Fe(PO4)2, Fe 및 Fe3C로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체.

청구항 5

제 2항에 있어서,

상기 자성나노입자는 표면에 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기 및 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 작용기를 함유하는 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체.

청구항 6

제1항 또는 2항에 있어서,

상기 효소는 탄산무수화효소, 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 페록시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체.

청구항 7

(1) 작용기가 형성된 3차원 네트워크 섬유를 합성하는 단계;

(2) 상기 작용기와 효소를 결합시켜 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체를 제조하는 단계;

(3) 상기 작용기와 결합된 효소의 유출을 방지하기 위하여 상기 매트릭스에 석출화제를 첨가하는 단계; 및

(4) 상기 효소들 간의 가교결합을 형성하기 위하여 가교결합제를 첨가하여 효소집적체를 형성하는 단계를 포함하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 (3)단계에서 매트릭스에 석출화제와 함께 자성나노입자를 첨가하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체의 제조방법.

청구항 9

제 7항 또는 제 8항에 있어서,

상기 작용기는 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기, 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체의 제조방법.

청구항 10

제7항 또는 제8항에 있어서,

상기 효소는 탄산무수화효소, 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 페록시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체의 제조방법.

청구항 11

제 7항 또는 8항에 있어서,

상기 3차원 네트워크 섬유를 형성하기 위해 사용되는 파이버는 폴리비닐알콜, 폴리아크릴로니트릴, 나일론, 폴리에스테르, 폴리우레탄, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 셀룰로우즈, 키토산, 폴리락틱산, 폴리락틱-co-글리콜산, 폴리글리콜산 폴리카프로락톤, 콜라겐, 폴리피롤, 폴리아닐린 및 폴리(스티렌-co-무수말레산)으로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체의 제조방법.

청구항 12

제 7항 또는 8항에 있어서,

상기 석출화제는 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알콜, 아세톤, PEG, 암모늄 설페이트, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 설페이트, 포타슘 포스페이트 및 이들의 수용액을 단독 또는 혼합하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체의 제조방법.

청구항 13

제 8항에 있어서,

상기 자성나노입자는 Fe203, Fe304, CoFe204, MnFe204, FePO4, Fe(PO4)2, Fe, 및 Fe3C로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체.

청구항 14

제 8항에 있어서,

상기 자성나노입자는 표면에 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기 및 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 작용기를 함유하는 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체의 제조방법.

청구항 15

제 7항 또는 8항에 있어서,

상기 가교결합제는 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르알데하이드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르) 및 디애시드 클로라이드로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 작용기에 결합된 효소를 포함하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로 보다 상세하게는 표면에 작용기가 부착되어 효소를 보다 안정적으로 고정화하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 친환경 생촉매인 효소의 선택성은 효소결합 면역흡착 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR), 혈당센서, 제약공정 등의 광범위한 분야에서 성공적으로 사용되고 있으며, 최근에는 이산화탄소 포집, 바이오연료전지, 바이오센서, 단백질 가수분해, 방오(antifouling) 등 다양한 분야에서 그 응용이 제안되고 있다. 하지만 효소 자체의 불안정성으로 인해 이러한 효소의 다양한 응용이 많은 제한을 받고 있다.

[0003] 효소의 공통적인 문제인 불안정성을 해결하기 위해 종래에 3차원 네트워크 구조를 갖는 섬유에 효과적으로 효소를 고정하기 위한 여러 가지 방법들이 제안되어 왔으며 그 방법들에는 운반물 결합, 가교결합 그리고 흡착 등이 제안되어 왔다. 그러나 1990년대 후반부터 나노테크놀로지의 발전과 나노바이오테크 전자기기 요구의 증가로 인하여 새로운 효소 고정화 방법이 필요하게 되었고 그들의 여러 결과들이 발표되었다. 그리고 이를 통하여 나노구조 물질의 발전에 따른 효소 고정화는 바이오센서, 바이오 연료전지, 효소컬럼, 정량분석법(ELISA), 바이오정화기기, Antifouling용 도료(방오제), 결정성 이부프로펜 제조 등의 활용에서 충분한 관심을 받고 있다.

[0004] 그런데 3차원 네트워크 구조의 파이버에 대한 효소 고정화가 상업화 되기 위하여 달성하여야 할 목표로는 얼마나 효소의 안정성을 유지할 수 있는지와 높은 전기적 수행을 나타낼 수 있는지가 중요한 열쇠 중에 하나이다.

그 결과 다양한 나노구조 물질이 고려되었는데 구체적으로 높은 표면적을 가진 나노세공성 물질, 전기방사 나노섬유 그리고 나노입자와 같은 나노구조 물질의 사용으로 효소가 고정화 되었을 때 떨어져 나오는 것을 방지하여 효소 담지량을 극대화시키는 방법이 모색되었다.

[0005] 한편, 다공성 실리카를 이용한 효소 고정화 방법은 효소 흡착방법과 효소 흡착 후 가교결합 방법이 있다. 공극을 가지고 있는 세공성 실리카 안에 효소를 단순 흡착시키는 방법과 흡착 후 효소 간에 가교 결합하는 방법은 흡착 후 효소간의 가교 결합하는 방법이 안정성 측면에서는 단순 흡착에 비해 좋은 결과를 보여주지만 흡착되는 효소의 양이 비슷하기 때문에 활성에 있어서 그 차이는 거의 없다.

[0006] 또한 고정화되는 효소의 양을 늘리기 위하여 종래 3차원 네트워크 구조의 파이버에 사용했던 효소코팅은 표면에 존재하는 작용기를 이용하여 효소와 공유결합시킨 후 가교결합제를 이용하 여 효소코팅을 하는 방법이었다. 그러나 상기 방법은 효소의 고정량에 한계가 있을 뿐 아니라, 효소가 변성되는 문제가 발생하였다.

[0007] 더불어 3차원 네트워크 구조의 섬유에 흡착, 석출 그리고 가교결합을 진행하는 효소고정화 방법이 제시되었지만, 이 방법은 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 표면에 작용기가 섬유 양끝에 하나씩만 존재해 흡착된 효소의 지지력이 약해 지속적인 효소 활성의 감소가 나타나는 문제가 발생하였다.

[0008] 결국, 종래의 3차원 네트워크 구조의 파이버 혹은 종래의 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스에 효소를 고정하는 방법은 모두 수율이 너무 낮을 뿐 아니라 장기간 사용할 경우 안정성이 크게 떨어지게 된다. 또한 이러한 종래의 방법은 고정화된 효소의 분리?회수가 쉽지 않아 경제성의 측면에서 약점을 가져 상업화하는데 지극히 곤란한 문제가 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 작용기가 부착된 3차원 네트워크 섬유를 포함하는 다공성 매트릭스에 현저하게 많은 효소를 안정적으로 고정화시킬 수 있고, 동시에 손쉽게 자성분리가 가능한 것으로서, 작용기에 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체는

[0011] 표면에 작용기가 형성된 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스; 및

[0012] 상기 작용기에 결합된 효소를 포함한다.

[0013] 또한 상기 작용기는 자성나노입자와 결합하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한 상기 작용기는 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기 및 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한 상기 자성나노입자는 Fe203, Fe304, CoFe204, MnFe204, FePO4, Fe(PO4)2, Fe 및 Fe3C로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0016] 또한 상기 자성나노입자는 표면에 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기 및 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 작용기를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 또한 상기 효소는 탄산무수화효소, 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 페록시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소로 구성되는

군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체의 제조방법은

[0019] (1) 작용기가 형성된 3차원 네트워크 섬유를 합성하는 단계;

[0020] (2) 상기 작용기와 효소를 결합시켜 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체를 제조하는 단계;

[0021] (3) 상기 작용기와 결합된 효소의 유출을 방지하기 위하여 상기 매트릭스에 석출화제를 첨가하는 단계; 및

[0022] (4) 상기 효소들 간의 가교결합을 형성하기 위하여 가교결합제를 첨가하여 효소집적체를 형성하는 단계를 포함한다.

[0023] 또한 상기 (3)단계에서 상기 매트릭스에 석출화제와 함께 자성나노입자를 첨가하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 또한 상기 작용기는 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기, 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0025] 또한 상기 효소는 탄산무수화효소, 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 페록시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0026] 또한 상기 3차원 네트워크 섬유를 형성하기 위해 사용되는 파이버는 폴리비닐알콜, 폴리아크릴로니트릴, 나일론, 폴리에스테르, 폴리우레탄, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 셀룰로우즈, 키토산, 폴리락틱산, 폴리락틱-co-글리콜산, 폴리글리콜산 폴리카프로락톤, 콜라겐, 폴리피롤, 폴리아닐린 및 폴리(스티렌-co-무수말레산)으로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0027] 또한 상기 석출화제는 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알콜, 아세톤, PEG, 암모늄 설페이트, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 설페이트, 포타슘 포스페이트 및 이들의 수용액을 단독 또는 혼합하여 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0028] 또한 상기 자성나노입자는 Fe203, Fe304, CoFe204, MnFe204, FePO4, Fe(PO4)2, Fe, 및 Fe3C로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0029] 또한 상기 자성나노입자는 표면에 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기 및 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 작용기를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0030] 또한 상기 가교결합제는 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르알데하이드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르) 및 디애시드 클로라이드로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 작용기에 결합된 효소를 포함하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체 및 이의 제조방법은 종래에 비해 현저하게 많은 양의 효소가 매트릭스 담지 및 고정될 수 있을 뿐만 아니라 외부 충격으로부터 고정된 효소가 쉽게 유출되지 않으므로 장기간이 경과한 후에도 그 안정성이 유지된다.

[0032] 또한 섬유의 표면에 효소와 공유결합을 수행하는 작용기에 의해 효소가 결합하게 되므로 보다 안정하게 고정화될 수 있다.

[0033] 나아가 자성분리가 가능하므로 용매에서 쉽게 복합체를 분리해 낼 수 있을 뿐만 아니라 종래의 효소-3차원 네트워크 구조의 나노섬유 매트릭스 복합체보다 표면적이 증가하고 효소 담지량도 증가하여 효소 활성이 증가되는 효과를 가진다.

[0034] 따라서, 종래의 효소 고정화 방법에 비해 향상된 효소집적도와 안정성을 기반으로 한, 본 발명의 작용기로 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체를 이산화탄소 저감, 바이오센서, 바이오 연료전지, 효소 컬럼, 정량분석법(ELISA), 바이오 정화기기, Antifouling용 도료(방오제), 결정성 이부프로펜 제조 연구에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 표면에 카르복실기를 함유하는 폴리아닐린 나노섬유의 제조 공정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 섬유 매트릭스에 효소를 고정화시키는 공정을 나타내는 모식도이다.

도 3은 도 1의 카르복실기를 함유하는 폴리아닐린 나노섬유의 FTIR 결과 및 SEM 사진이다.

도 4는 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스에 고정화된 탄산무수화효소의 SEM 및 TEM 사진이다.

도 5는 카르복실기를 함유하는 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스에 고정화된 탄산무수화효소의 초기 활성을 비교한 그래프이다.

도 6은 카르복실기를 함유하는 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스에 고정화된 탄산무수화효소의 상온 교반 조건에서의 안정성을 비교한 그래프이다.

도 7은 작용기의 결합 유무에 따라 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스에 고정화된 탄산무수화효소의 상온 교반 조건에서의 안정성을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이에 본 발명자들은 효소를 안정적으로 고정화시킴과 동시에 자성분리가 가능한 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체 및 이의 제조방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 작용기에 결합된 효소를 포함하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체 및 이의 제조방법을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0037] 탄산무수화효소는 내부에 아연 이온을 포함하고 있는 효소로 이산화탄소를 중탄산염이온으로 전화하는데 탁월한 능력을 가지고 있다. 효소입자 하나가 초당 103~106개의 이산화탄소 분자를 전환하는 뛰어난 능력을 가지고 있다. 따라서 학계에서는 생물학적 이산화탄소 저감연구의 훌륭한 후보 물질로 거론되었다.

[0038] 상술한 바와 같이 3차원 네트워크 구조의 섬유에 효과적으로 효소를 고정하는 방법은 모두 수율이 낮을 뿐만 아니라 장기간 사용할 경우 안정성이 크게 떨어지게 되어 이를 상업화하기는 지극히 곤란한 문제가 있었다. 또한 섬유의 표면에 효소와 공유결합을 수행하는 작용기가 존재하지 않는 경우에는 효소의 고정화가 이루어지지 않을 뿐 더러, 이루어진다 하여도 결합의 안정성이 떨어지는 문제가 있었다.

[0039] 본 발명의 한 특징에 따른 작용기에 결합된 효소를 포함하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체는

[0040] 표면에 작용기가 형성된 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스; 및

[0041] 상기 작용기에 결합된 효소를 포함한다.

[0042] 또한 상기 작용기는 자성나노입자와 결합하는 것을 특징으로 한다.

[0043] 또한 상기 작용기는 바람직하게는 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기 및 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0044] 또한 상기 자성나노입자는 Fe203, Fe304, CoFe204, MnFe204, FePO4, Fe(PO4)2, Fe, Fe3C로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0045] 또한 상기 자성나노입자는 표면에 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기, 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 작용기를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0046] 상기 자성나노입자가 결합됨으로 인해 효소를 안정적으로 고정화시킬수 있음과 동시에 자성분리가 가능하다.

[0047] 또한 상기 효소는 탄산무수화효소, 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 페록시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0048] 이렇게 본 발명에 따른 작용기로 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체로 인해 작용기로 결합된 효소를 보다 안정적으로 고정화시키면서, 자성나노입자로 인해 자성분리가 동시에 일어나게 된다.

[0049] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체의 제조방법은

[0050] (1) 작용기가 형성된 3차원 네트워크 섬유를 합성하는 단계;

[0051] (2) 상기 작용기와 효소를 결합시켜 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체를 제조하는 단계;

[0052] (3) 상기 작용기와 결합된 효소의 유출을 방지하기 위하여 상기 매트릭스에 석출화제를 첨가하는 단계; 및

[0053] (4) 상기 효소들 간의 가교결합을 형성하기 위하여 가교결합제를 첨가하여 효소집적체를 형성하는 단계를 포함한다.

[0054] 상기 작용기는 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기, 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0055] 한편 상기 작용기에서 카르복실기는 아닐린과 2-아미노벤조산 혹은 3-아미노벤조산이 반응하여 형성하는 것이 바람직하며, 그 함량은 상기 아닐린 100중량부에 대하여 상기 2-아미노벤조산(2-aminobenzoic acid) 혹은 3-아미노벤조산은 50~2000중량부인 것이 바람직하다.

[0056] 또한 상기 (3)단계에서 상기 매트릭스에 석출화제와 함께 자성나노입자를 첨가하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0057] 이를 통해 종래의 복합체의 제조방법에 비하여 현저하게 많은 양의 효소가 매트릭스에 담지 및 고정될 수 있을 뿐만 아니라 외부충격으로부터 고정된 효소가 쉽게 유출되지 않으므로 장기간 경과한 경우에도 그 안정성이 유지된다. 특히 상기 작용기로서 결합시켜 보다 안정적으로 효소를 고정시킬 수 있다.

[0058] 또한 상기 효소는 탄산무수화효소, 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 페록시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0059] 본 발명에 사용되는 파이버는 방사 시 3차원 네트워크가 형성되어 섬유와 섬유사이에 공극이 형성할 수 있는 것이면 종류의 제한 없이 사용될 수 있으며 섬유의 폴리비닐알콜, 폴리아크릴로니트릴, 나일론, 폴리에스테르, 폴리우레탄, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 셀룰로우즈, 키토산, 폴리락틱산, 폴리락틱-co-글리콜산, 폴리글리콜산 폴리카프로락톤, 콜라겐, 폴리피롤, 폴리아닐린 및 폴리(스티렌-co-무수말레산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 비용 및 효율을 고려하여 폴리아닐린 섬유를 사용하는 것이 유리하나 이에 제한되지 않는다.

[0060] 섬유를 제조하기 위한 방사의 종류 역시 섬유와 섬유간에 3차원 네트워크 구조를 갖는 것이면 통상의 중합 및/또는 방사공정을 활용할 수 있고, 전기방사, 용융방사 등을 모두 사용할 수 있다. 섬유의 직경 역시 나노섬유, 마이크로 섬유에 모두 적용될 수 있으나, 후술하는 효소집합체의 크기와 섬유와 섬유 사이에 형성되는 공극의 크기를 고려할 때 나노섬유를 사용하는 것이 보다 유리할 수 있다. 하지만, 탄소나노튜브의 경우 이를 섬유로 제작한다 하더라도 3차원 네트워크를 형성할 수 없으므로 본 발명의 범위에 속하지 않는다.

[0061] 본 발명의 일구현 예에 따른 다공성 매트릭스는 3차원 네트워크 섬유를 일부 또는 전부를 포함하여 구성될 수 있으며, 이 때 다공성은 3차원 네트워크를 형성하는 섬유와 섬유간의 공간(공극)을 의미한다.

[0062] 본 발명의 섬유는 3차원상의 네트워크를 형성하며 이를 통해 파이버 매트릭스 구조를 가질 수 있게 되며, 상기

매트릭스 구조는 섬유가 복잡하게 얽힌 무정형의 구조일 수 있다.

[0063] 한편, 본 발명의 파이버 매트릭스는 그 표면에 상기 효소와 공유결합될 수 있는 어떠한 작용기(예: 아미노기)를 실질적으로 포함하고 있는 섬유에도 적용될 수 있으므로, 파이버의 표면과 효소간에 공유결합으로 결합된 것이 아니라 섬유의 표면 또는 섬유와 섬유간에 형성되는 공극(공간) 사이에 흡착하게 된다. 따라서, 단순히 효소가 매트릭스의 표면에 흡착된 상태에서 수세 등의 외부충격이 가해지는 경우 흡착된 효소 중 대부분이 매트릭스에서 떨어져나가게 되므로 결과적으로 효소의 고정화율이 현저하게 감소하게 되는 것이다.

[0064] 다음 (3) 단계로서 상기 매트릭스의 공극내부에 흡착된 효소들의 유출을 방지하기 위하여 상기 매트릭스에 석출화제를 첨가(enzyme precipiatation)한다. 흡착된 효소는 그 크기가 매우 작으므로 육안으로 거의 관찰되지 않는다. 이에 상기 흡착된 효소를 석출시키기 위하여 상기 매트릭스에 석출화제를 첨가하는 경우 흡착된 효소들이 서로 뭉치게 되어 그 크기가 커지게 되어 결국 섬유의 표면 또는 섬유와 섬유간에 형성되는 공극(공간) 사이에서 석출하게 된다. 이 때 사용될 수 있는 석출화제는 효소의 활성에 거의 영향을 미치지 않으면서 효소를 석출시킬 수 있는 것이면 종류의 제한없이 사용될 수 있지만 바람직하게는 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알콜, 아세톤, PEG, 암모늄 설페이트, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 설페이트, 포타슘 포스페이트 및 이들의 수용액을 단독 또는 혼합한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 한편, 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, (3) 단계에서 석출화제와 함께 자성나노입자를 첨가할 수 있다. 실제적인 응용을 위해서는 경제성 재고를 위한 효소의 재사용이 이루어져야 하는데, 분리가 어려워 경제성이 떨어지는 문제가 있었다. 이에 자성나노입자를 투입하면 종래의 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체에 비하여 손쉬운 자성분리가 가능해졌고, 자성나노입자를 첨가함으로써 효소의 담지량이 더 증가하는 결과를 가져온다. 즉, 현저하게 많은 양의 효소가 매트릭스에 담지 및 고정될 수 있을 뿐 아니라 외부충격으로부터 고정된 효소가 쉽게 유출되지 않으므로 장기간 경과한 경우에도 그 안정성이 유지된다. 또한, 자성을 이용한 손쉬운 분리가 가능한 장점을 가진다.

[0066] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 상기 자성나노입자의 첨가단계는 효소첨가보다 이전 또는 함께 첨가하거나 (2) 단계와 (3) 단계 사이, 또는 (4) 단계에서 에 첨가할 수도 있으나, 바람직하게는 후술하는 (4)단계의 가교결합제 첨가 이전에 석출화제와 함께 자성나노입자를 투입하면, 효소와 잘 섞이게 되어 자성나노입자끼리 뭉치는 것을 방지 할 수 있다.

[0067] 사용가능한 자성나노입자는 효소의 활성을 저해하지 않으면서 자성을 가져 자석 등을 통해 복합체를 분리할 수 있는 것이면 제한 없이 사용될 수 있으며, Fe를 포함하는 산화물, 합금 역시 자성을 띄면 포함될 수 있다. 특히 바람직하게는 상기 자성나노입자는 Fe203, Fe304, CoFe204, MnFe204, FePO4, Fe(PO4)2, Fe, 및 Fe3C로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0068] 또한 상기 자성나노입자는 표면에 카르복실기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 알데히드기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기 및 아이오드기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 작용기를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0069] 자성나노입자의 투입량은 나노섬유의 질량 대비 0.5배 ~ 10배의 질량이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] 한편, 사용될 수 있는 자성나노입자의 입경은 바람직하게는 1 ~ 1,000nm 사이의 입자일 수 있으며, 보다 바람직하게는 20 ~ 200nm를 갖는 것이 자성분리 및 효소활성 증가에 더욱 유리하다.

[0071] 다음, (4) 단계로서 상기 효소들간의 가교결합을 형성하기 위하여 가교결합제를 첨가하여 효소집적체를 형성한다. 구체적으로 섬유와 섬유사이에 형성된 공극(공간)의 크기에 비하여 석출된 효소의 크기가 상대적으로 작으므로 수세 등의 외부충격에 의하여 석출된 효소가 공극의 외부로 유출될 수 있다. 그러나, 가교결합제를 첨가하여 석출된 효소와 효소간에 가교결합을 형성하는 경우 가교결합된 효소들이 집합체를 형성하게 되고 상기 형성된 효소 집합체는 공극 내부를 거의 채우게 된다. 그 결과 공극의 입구보다 형성된 효소 집합체의 크기가 더 커지게 되므로 가교결합된 효소 집합체는 수세 등의 외부충격에 의해서도 쉽게 공극의 외부로 유출되지 않게 된다. 그 결과 시간이 경과하여도 상기 공극 내부에 효소 집합체가 위치하게 되므로 섬유와 효소간의 공유결합과 같은 직접적인 결합관계가 형성되지 않는다 하더라도 효소 집합체가 섬 유 매트릭스 내부에 장기간 구비될 수 있는 것이다. 또한 효소-3차원 네트워크 섬유 매트릭스간에 형성된 복합체는 종래의 복합체에 비하여 고정된 효소의 양이 월등하게 많기 때문에 이를 이산화탄소 저감에 활용하는 경우에도 그 성능이 종래의 복합체를 사용

하는 경우에 비하여 현저하게 개선될 수 있는 것이다.

[0072] 한편, 석출화제를 처리한 후 가교결합제를 첨가하는 것이, 가교결합제만 첨가하는 경우에 비하여 그 효과가 현저하게 증진된다. 이는 효소의 흡착 후 가교결합제를 첨가하는 경우 섬유와 섬유간에 형성된 공극의 내부를 상당부분 채우지 못하게 되거나 가사 이를 채웠다 하더라도 효소들의 농도는 주위 농도와 같아지게 된다. 주위와 같은 농도의 효소가 가교결합을 하여 나노섬유안의 공극에서 공극의 입구보다 더 큰 덩어리를 이루지 못하여 수세과정에서 가교결합된 효소가 외부로 유출되는 경우가 발생할 확률이 높다. 하지만 본 발명의 경우 효소의 흡착 후 석출을 통해 효소들이 강제적으로 나노섬유 안의 공극을 더욱 조밀하게 메우게 되며 공극에 채워진 효소들은 가교결합을 통해 큰 덩어리를 이루기 때문에 병목현상 혹은 ship in a bottle 현상으로 수세과정에서 손실이 효소코팅 보다 덜하게 되는 것으로 예상된다.

[0073] 나아가, 섬유의 표면에 효소와 공유결합할 수 있는 작용기가 거의 없는 폴리아닐린나노섬유 등의 경우 섬유의 표면에 효소가 고정화되기 매우 어렵다. 하지만, 본 발명에서는 섬유의 표면에서 석출된 효소들이 가교결합되어 섬유의 표면을 감싸는 쉘을 형성하게 되므로 마치 핫도그와 같이 섬유와 효소간에 공유결합이 실질적으로 형성되지 않는 경우에도 섬유의 표면에 많은 양의 효소가 쉘을 형성하여 고정화될 수 있다.

[0074] 본 발명에 사용될 수 있는 가교결합제는 효소의 활성을 저해하지 않고서 효소간에 가교결합을 형성할 수 있는 것이면 종류의 제한없이 사용될 수 있지만 바람직하게는 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르알데하이드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르) 및 디애시드 클로라이드로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 화합물을 포함하여 사용할수 있으며, 보다 바람직하게는 글루타르알데하이드를 사용할 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니며 당업계에 공지된 가교결합제를 제한없이 사용하는 것은 당업자에게 자명한 것이다.

[0075] 한편, 상기 (4) 단계 이후 바람직하게는 상기 효소-3차원 네트워크 섬유 매트릭스 복합체를 수세하여 첨가된 가교결합제 및 석출화제를 제거하는 공정을 더 수행할 수 있다. 상기 수세단계를 거치면서 통상의 제조방법으로 제조된 매트릭스 복합체의 경우 공극사이에 고정된 효소가 상당부분 공극 밖으로 유출되지만, 본 발명에 의해 제조된 효소-3차원 네트워크 섬유 매트릭스 복합체는 공극 내부에 형성된 효소 집합체의 크기가 공극의 입구보다 크게 되므로 상기 효소 집합체는 수세공정에도 불구하고 외부로 유출되지 않고 공극의 내부에 고정될 수 있게 되는 것이다.

[0076] 본 발명의 바람직한 일구현 예에 따르면, 3차원 네트워크 섬유를 포함하는 다공성 매트릭스; 상기 매트릭스의 공극내부에 담지되며 직경이 공극의 입구 크기보다 큰 가교결합된 효소 집적체; 및 상기 3차원 네트워크 섬유의 표면을 둘러싼 효소를 포함하는 쉘을 포함하는 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체를 제공한다.

[0077] 결국, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 작용기로 결합된 효소를 포함하는 효소-3차원 네트워크 섬유 매트릭스 복합체는 섬유와 섬유간에 형성된 공극에서 외부로 유출되지 않을 정도로 상기 공극의 내부에 형성된 효소 복합체의 크기가 충분히 크게 되므로 종래의 효소 고정화 방법에 비하여 현저하게 많은 양의 효소가 매트릭스에 고정되어 복합체를 형성할 수 있게 된다. 다시 말해 섬유와 섬유간에 형성된 공극에서 외부로 유출되는 통로인 공극의 입구의 크기보다 공극 내부에 형성된 효소 복합체의 크기가 더 크게 되어 결국 수세 등의 외부 자극이 있는 경우에도 효소 복합체가 상기 공극의 내부에 구비될 수 있게 되며, 이는 효소와 매트릭스간에 직접적인 결합관계가 형성되지 않고서도 상기 복합체가 장기간 유지될 수 있게 되는 것이다. 특히 작용기가 결합되어 보다 많은 양의 효소가 보다 안정적으로 고정되게 된다.

[0078] 또한, 효소를 고정화하는 단계에서 자성나노입자를 함께 고정화하면 자성분리가 가능한 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유매트릭스 복합체를 합성할 수 있게 된다. 효소 사이사이로 자성나노입자가 위치하여 자석을 이용하여 손쉬운 분리와 재사용이 가능하게 되는 것이다.

[0079] 나아가, 섬유의 표면에 효소와 공유결합할 수 있는 작용기가 거의 없는 폴리아닐린나노섬유 등의 경우 섬유의 표면에 효소가 고정화되기 매우 어렵다. 하지만, 본 발명에서는 섬유의 표면에서 석출된 효소들이 가교결합되어 섬유의 표면을 감싸는 쉘을 형성하게 되므로 마치 핫도그와 같이 섬유와 효소간에 공유결합이 실질적으로 형성되지 않는 경우에도 섬유의 표면에 많은 양의 효소가 쉘을 형성하여 고정화될 수 있다.

[0080] 최종적으로 본 발명에서 제조된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체에서 사용된 섬유의 양에 대한 고정된 효소의 양으로 표현할 수 있는데, 종래의 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체가 사용된 파이버 1g 당 효소 20,000 ~ 50,000unit가 고정되는데 반하여, 본원발명의 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체는 파이버 1g 당 효소 300,000 ~ 400,000unit가 고정될 수 있으므로 고정된 효소의 양이 비약적

으로 증가하게 되는 것이다.

[0081] 따라서, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 효소-3차원 네트워크 섬유 매트릭스 복합체를 이산화탄소 저감, 바이오 센서, 바이오 연료전지, 효소컬럼, 단백질 가수분해장치, ELISA 장치 및 단백질 가수분해장치 등에 사용하는 경우 종래의 매트릭스 복합체를 사용하는 경우에 비하여 그 성능을 현저하게 개선시킬 수 있다.

[0082] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0083] <제조예: 표면에 카르복실기가 형성된 3차원 네트워크 구조의 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스의 제조>

[0084] 도 1과 같은 방법으로 카르복실기가 함유된 3차원 네트워크 구조의 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스를 제조하였다(carboxylated polyaniline nanofiber, cPANF).

[0085] 구체적으로 효소고정화를 위한 전기전도성 나노섬유 폴리아닐린 나노섬유는 산화제인 ammonium persulfate를 개시제로 하여 산화 중합을 통해 제조하였다. 산화중합은 ammonium persulfate의 양을 조절하여 폴리아닐린의 과성장을 막아 주는 rapidly mixing reaction 방법을 사용하였다. Ammonium persulfate를 1M HCl 용액에 0.1 M이 되도록 녹여 준비하였다. 그리고 아닐린 100 중량부에 대하여 3-아미노벤조산을 5~2000 중량부까지 변화를 주어 혼합한 용액을 준비한다. 상기 아닐린과 3-아미노 벤조산 혼합 용액 1.5 ml를 1 M HCl 8.5 ml에 넣고 50℃에서 30분간 잘 섞어 준다. 준비한 ammonium persulfate 용액 10 ml을 아닐린, 3-아미노벤조산과 HCl이 섞인 10 ml 용액에 넣고 잘 섞어주었다. 잘 섞인 용액을 24시간동안 실온에서 200rpm으로 교반시켜주었다. 이렇게 중합과정이 끝난 후 용액을 centrifuge down하여 상등액을 버린 후 DI용액을 넣어준 후 잘 교반하여 씻어주는 과정을 여러 번 거친 후 4℃ 에서 보관하였다. 제조된 폴리 아닐린 나노섬유는 과성장을 막기 위해 ammonium persulfate의 양을 조절하여 합성되었다. 나노섬유는 서로서로 산호처럼 복잡하게 연결되어 3차원 네트워크 구조를 형성하고 아닐린의 농도에 따라 나노섬유의 바깥가지 부분의 공극뿐만 아니라 안쪽에서 많은 공극을 가지고 있다. 나노섬유의 공극(섬유와 섬유간에 형성된 공간)은 효소 고정화에서 큰 역할을 한다.

[0086] **비교예**

[0087] **<비교예 1> 효소 공유결합을 이용한 효소고정방법(Covalent attachment, CA)에 따라 작용기로 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체를 제조**

[0088] 효소 공유결합을 이용한 효소고정화 방법(Covalent attachment, CA)에 따라 탄산무수화효소-3차원 네트워크 구조의 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스 복합체를 제조하였다. 구체적으로 상기 제조예에서 제조된 카르복실기를 함유하는 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스에 효소가 쉽게 결합할 수 있도록 카르복실기를 치환하는 EDC-NHS 반응을 진행시킨다. 구체적으로 2mg을 10ml의 증류수에 분산시키고, 2ml의 EDC (10mg/ml), 4ml의 NHS (50mg/ml), 4ml의 100mM MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 버퍼(pH6.0)와 혼합하여 총 20ml의 혼합 용액을 만든다. 이후 상온에서 1시간 동안 교반시키고 원심분리를 통해 수세한다. 이후 100 mM PB buffer (pH 7.6)에 녹인 탄산무수화효소(Carbonic anhydrase, CA)용액 10 mg/ml 1 ml를 넣어 2시간동안 150 rpm으로 교반시켜 효소와 폴리아닐린 나노섬유 간의 공유결합을 유도한다. 그 뒤 탄산무수화효소를 공유결합시킨 매트릭스 복합체를 포함하는 용액을 100mM Tris buffer pH 7.6를 이용해 30분 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 다시 100 mM PB를 이용하여 씻어주었다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4 ℃에서 보관하여 작용기로 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체(CA)를 제조하였다.

[0089] **<비교예 2> 효소 가교결합방법(Enzyme crosslinking, EC)에 따라 작용기로 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체를 제조**

[0090] 효소 가교결합방법(Enzyme crosslinking, EC)에 따라 탄산무수화효소-3차원 네트워크 구조의 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스 복합체를 제조하였다. 구체적으로 상기 제조예에서 제조된 카르복실기를 함유하는 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스에 효소가 쉽게 결합할 수 있도록 카르복실기를 치환하는 EDC-NHS 반응을 진행시킨다. 구체적으로

2mg을 10ml의 증류수에 분산시키고, 2ml의 EDC (10mg/ml), 4ml의 NHS (50mg/ml), 4ml의 100mM MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 버퍼(pH6.0)와 혼합하여 총 20ml의 혼합 용액을 만든다. 이후 상온에서 1시간 동안 교반시키고 원심분리를 통해 수세한다. 이후 100 mM PB buffer (pH 7.6)에 녹인 탄산무수화효소(Carbonic anhydrase, CA)용액 10 mg/ml 1 ml를 넣어 2시간동안 150 rpm으로 교반시켜 효소와 폴리아닐린 나노섬유 간의 공유결합을 유도한다. 그 뒤 가교결합제로서 12.5%의 글루타르알데하이드 100㎕를 첨가하여 용액속의 글루타르알데하이드의 농도가 0.5% v/v가 되도록 하였다. 그 뒤 가교결합제의 충분한 반응을 위하여 4℃의 냉장고에서 17시간 동안 반응시켰다. 그 뒤 매트릭스 복합체를 포함하는 용액을 100mM Tris buffer pH 7.6를 이용해 30분 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 다시 100 mM PB를 이용하여 씻어주었다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4 ℃에서 보관하여 작용기로 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체(EC)를 제조하였다.

[0091] **<비교예 3> 효소흡착, 석출화 및 가교결합방법(Enzyme adsorption, precipitation, and crosslinking, EAPC)에 따라 탄산무수화효소-3차원 네트워크 구조의 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스 복합체를 제조**

[0092] 후술하는 실시예 1, 2의 카르복실기를 통한 효소과 3차원 네트워크 섬유 매트릭스의 결합효과를 비교하기 위해 작용기가 없는 폴리아닐린 나노섬유를 이용하여 탄산무수화효소-3차원 네트워크 구조의 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스 복합체를 제조하였다. 이 방법은 폴리아닐린 나노섬유에 작용기가 없기 때문에 흡착, 석출 후 가교결합(Enzyme adsorption, precipitation, and crosslinking, EAPC) 방법을 통해 합성하였다.

[0093] 구체적으로 상기 제조예에서 제조된 3-아미노벤조산없이 합성된 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스를 수세한 후 10mg/ml CA 용액과 혼합한 후 흡착이 잘되도록 2시간 동안 150rpm에서 교반하였다. 그 뒤 석출화제로서 용액속에 암모늄설페이트용액 농도가 55%v/v가 되도록 하였다. 효소의 석출이 용이하도록 하기 위해 실온에서 150 rpm으로 30 분동안 교반시켰다. 그 뒤 가교결합제로서 25%v/v의 글루타르알데하이드를 첨가하여 용액속의 글루타르알데하이드의 농도가 0.5%가 되도록 한다. 그 뒤 가교결합제의 충분한 반응을 위하여 4℃의 냉장고에서 17시간 동안 반응시켰다. 그 뒤 매트릭스 복합체를 포함하는 용액을 100mM Tris buffer pH 7.6를 이용해 30분 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 다시 100 mM PB를 이용하여 씻어주었다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4 ℃에서 보관하여 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체(EAPC)를 제조하였다.

[0094] **실시예**

[0095] **<실시예 1> 효소 석출화 코팅(Enzyme precipitate coating, EPC)에 따라 작용기로 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체를 제조**

[0096] 도 2의 EPC에 따라 탄산무수화효소-3차원 네트워크 구조의 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스 복합체를 제조하였다. 구체적으로 상기 제조예에서 제조된 카르복실기를 함유하는 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스에 효소가 쉽게 결합할 수 있도록 카르복실기를 치환하는 EDC-NHS 반응을 진행시킨다. 구체적으로 2mg을 10ml의 증류수에 분산시키고, 2ml의 EDC (10mg/ml), 4ml의 NHS (50mg/ml), 4ml의 100mM MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 버퍼(pH6.0)와 혼합하여 총 20ml의 혼합 용액을 만든다. 이후 상온에서 1시간 동안 교반시키고 원심분리를 통해 수세한다. 이후 100 mM PB buffer (pH 7.6)에 녹인 탄산무수화효소(Carbonic anhydrase, CA)용액 10 mg/ml 1 ml를 넣어 2시간동안 150 rpm으로 교반시켜 효소와 폴리아닐린 나노섬유 간의 공유결합을 유도한다. 그 뒤 석출화제로서 용액 속에 암모늄설페이트용액 농도가 55%v/v가 되도록 하였다. 효소의 석출이 용이하도록 하 기 위해 실온에서 150 rpm으로 30 분동안 교반시켰다. 그 뒤 가교결합제로서 12.5%v/v의 글루타르알데하이드를 첨가하여 용액속의 글루타르알데하이드의 농도가 0.5%가 되도록 한다. 그 뒤 가교결합제의 충분한 반응을 위하여 4℃의 냉장고에서 17시간동안 반응시켰다. 그 뒤 매트릭스 복합체를 포함하는 용액을 100mM Tris buffer pH 7.6를 이용해 30분 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 다시 100 mM PB를 이용하여 씻어주었다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4 ℃에서 보관하여 작용기로 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체(EPC)를 제조하였다.

[0097] **<실시예 2> 효소 석출화 코팅(Enzyme precipitate coating, EPC)에 따라 자성분리 가능한 작용기로 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체를 제조**

[0098] 도 2의 Mag-EPC (Magnetically separable EPC)에 따라 효소-3차원 네트워크 구조의 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스 복합체를 제조하였다. 구체적으로 상기 제조예에서 제조된 카르복실기를 함유하는 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스에 효소가 쉽게 결합할 수 있도록 카르복실기를 치환하는 EDC-NHS 반응을 진행시킨다. 구체적으로 2mg을 10ml의 증류수에 분산시키고, 2ml의 EDC (10mg/ml), 4ml의 NHS (50mg/ml), 4ml의 100mM MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 버퍼(pH6.0)와 혼합하여 총 20ml의 혼합 용액을 만든다. 이후 상온에서 1시간 동안 교반시키고 원심분리를 통해 수세한다. 이후 100 mM PB buffer (pH 7.6)에 녹인 탄산무수화효소(Carbonic anhydrase, CA)용액 10 mg/ml 1 ml를 넣어 2시간동안 150 rpm으로 교반시켜 효소와 폴리아닐린 나노섬유 간의 공유결합을 유도한다. 그 뒤 석출화제로서 용액속에 암모늄 설페이트용액 농도가 55%v/v가 되도록 하는 동시에 유체역학적 직경(hydrodynamic diameter)이 50nm인 자성나노입자 5mg을 혼합한뒤, 이 용액을 효소가 있는 용액에 첨가하였다. 효소의 석출이 용이하도록 하기 위해 실온에서 150 rpm으로 30 분동안 교반시켰다. 그 뒤 가교결합제로서 25%v/v의 글루타르알데하이드를 첨가하여 용액속의 글루타르알데하이드의 농도가 0.5%가 되도록 한다. 그 뒤 가교결합제의 충분한 반응을 위하여 4℃의 냉장고에서 17시간동안 반응시켰다. 그 뒤 매트릭스 복합체를 포함하는 용액을 100mM Tris buffer pH 7.6을 이용해 30분 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 다시 100 mM PB를 이용하여 씻어주었다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4 ℃에서 보관하여 자성분리 가능한 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체(Mag-EPC)를 제조하였다.

[0099] **<실험예 1> 카르복실기가 형성된 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체에 대한 FTIR 및 SEM 분석**

[0100] 제조예를 통해 제조된 카르복실기가 형성된 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체의 FTIR 및 SEM 분석을 실시하였고, 이의 결과는 도 3에 나타냈다. 다만, 이때의 합성은 다양한 비율로 진행되었다.

[0101] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이 그 결과 aniline과 3-aminobenzoic acid의 비율이 0.5: 0.5로 3-aminobenzoic acid의 함량이 1/2이 되어야 카복실작용기가 FTIR로 확인이 되었다. 또한 aniline과 3-aminobenzoic acid의 비율이 0.05:0.95의 경우에 가장 높은 카복실작용기의 형성이 확인되었지만, 이 경우는 부분적으로 섬유 매트의 형성이 진행되지 않음이 확인 되었다.

[0102] **<실험예 2> 작용기로 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체에 대한 SEM 및 TEM 분석**

[0103] 비교예 1, 2 및 실시예 1, 2를 통해 제조된 각각의 탄산무수화효소-3차원 네트워크 구조의 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스 복합체에 대한 SEM 및 TEM 분석을 진행하였다.

[0104] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, CA와 EC의 경우에는 효소 고정화량이 많이 않기 때문에 아무런 처리도 하지 않은 카르복실기가 있는 폴리아닐린 나노섬유(carboxylated polyaniline nanofiber, cPANF)와 두께가 거의 동일한 것을 알 수 있다. 반면에 효소 고정화량이 많은 EPC의 경우는 두께가 많이 두꺼워진 것을 확인할 수 있으며, 자성나노입자가 함께 고정화된 Mag-EPC는 자성나노입자를 확인할 수 있다.

[0105] **<실험예 3> 작용기로 결합된 효소-3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 복합체에 대한 효소활성 및 안정성 측정**

[0106] 상기 비교예 1, 2 및 실시예 1, 2를 통해 제조된 각각의 탄산무수화효소-3차원 네트워크 구조의 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스 복합체의 효소활성을 UV spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 구체적으로 우선 CA, EC 방법은 10mM PB buffer에 0.1mg/ml로 희석하고, EPC 방법은 0.005mg/ml로 희석시켜 준비하였다. 그리고 60mM p-nitrophenyl acetate (pNA)를 포함하는 acetonitrile 용액을 준비한다. 그리고 pNA용액 50ul와 EA, EAC, EAPC 샘플을 각각 50ul, 그리고 10mM PB (pH7.6) 900ul를 혼합하여 348nm에서 UV spectrophotometer에서 흡광도를 측정하고, 도 5는 효소의 초기 활성을 계산하고 비교한 그래프이다. EPC 방법은 CA, EC 방법에 비해 효소 고정화량이 많아 초기 활성이 월등히 높음을 알 수 있고, 이 그래프에서 자성나노입자가 첨가될 경우 (Mag-EPC), 첨가하지 않은 경우 (EPC) 보다 초기 활성이 높아짐을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 첨가된 자성나노입자가 효소 고정화량의 증대에 도움을 줌을 알 수 있다.

[0107] 도 6는 UV spectrophotometer을 이용한 CA, EC, EPC 그리고 Mag-EPC의 상온 교반 조건에서의 안정성을 비교한

그래프이다. 실온에서 100 mM PB 안에서 200 rpm으로 교반시켜 주면서 그 활성을 측정한 그래프로서 50일 후에 CA와 EC의 활성이 각각 초기 활성 대비 0.66 % 그리고 17.1 %인 반면, EPC와 Mag-EPC는 각각 그 초기 활성의 79.2%, 80.0%를 유지하는 것을 볼 수 있다.

[0108] 한편 도 5 및 도 6에서 covalent attachment (CA)는 작용기화된 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 표면에 효소를 공유결합 만으로 결합하는 단계, enzyme coating (EC)는 작용기화된 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 표면에 효소를 공유결합 시킨 뒤에 가교결합제로 글루타알데히드(glutaraldehyde)를 이용해 효소를 가교결합 시키는 단계, enzyme precipitate coating (EPC)는 작용기화 된 3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 표면에 효소를 공유결합 시킨 뒤에 석출화제로 암모늄설페이트(ammonium sulphate)와 가교결합제로 글루타알데히드(glutaraldehyde)를 이용해 효소를 석출 및 가교결합 시키는 단계, magnetic enzyme precipitate coating (Mag-EPC)는 작용기화 된3차원 네트워크 구조의 섬유 매트릭스 표면에 효소를 공유결합 시킨 뒤에 석출화제로 암모늄설페이트(ammonium sulphate)와 가교결합제로 글루타알데히드(glutaraldehyde)를 이용해 효소와 자성나노입자를 석출 및 가교결합 시키는 단계를 의미하는 것으로, 총 4가지 종류의 실험이 진행 된 것을 의미한다.

[0109] 이러한 결과들은 폴리아닐린 나노섬유에 탄산무수화효소의의 다른 고정화 전략에 의해 설명될 수 있다. CA, EC 등은 폴리아닐린 나노섬유에 높은 담지량을 이루어 낼 수 없을 뿐만 아니라 고정화된 효소들이 안정선 실험을 하는 동안 폴리아닐린 나노섬유표면에서 쉽게 떨어진다. 반면에 카르복실기를 작용기로 하거나, 여기에 자성나노입자가 결합되어 효소가 고정화되는 EPC 및 Mag-EPC의 경우 폴리아닐린 나노섬유 안의 공극에 효소 집합체가 꽉 찰 수 있어서 높은 담지량을 보여주고, 또한 석출과정에서 꽉 들어찬 효소 집합체들은 CA, EC에 비해 효율적인 가교결합이 가능해져 폴리아닐린 나노섬유 밖으로 쉽게 유출되지 않아 안정성이 크게 향상된다. 이를 통해 본 발명의 효소-3차원 네트워크 구조의 폴리아닐린 나노섬유 매트릭스 복합체를 사용한 이산화탄소의 저감 연구는 크게 개선될 것이 예상된다.

표 1

[0110]

	CA	EC	EPC	Mag-EPC
uM/s/mg PANF	2.9	1.0	105.9	153.2

[0111] 위 표는 각 방법에 따른 효소의 초기 활성이 나타낸다.

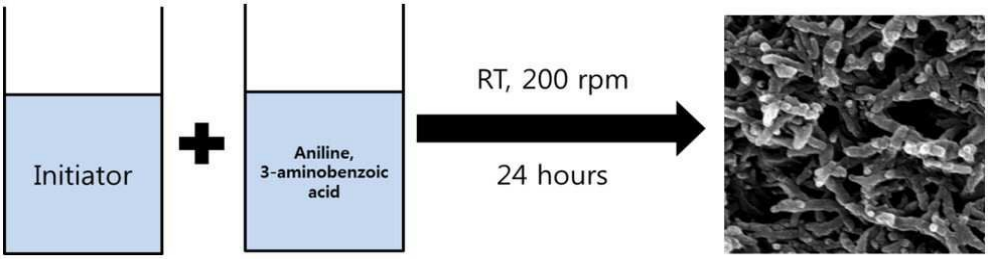
[0112] **<실험예 4> 작용기가 결합됨으로 인해 향상되는 탄산무수화효소의 안정적 고정화 여부**

[0113] 도 7에서 알 수 있는 바와 같이 작용기가 없는 폴리아닐린 나노섬유 표면에 흡착, 석출 및 가교결합(EAPC) 방법을 통한 탄산무수화효소는 약 25일이 지난 후 활성이 급격하게 감소하기 시작하여 50일이 되는 시점에서 51%의 초기활성을 나타낸다. 반면 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 작용기가 있는 폴리아닐린 나노섬유에 효소를 효소석출화 코팅(EPC) 방법으로 탄산무수화효소를 고정화 할 경우 50일이 되는 시점에서 80%의 초기 활성을 유지하고, 자성나노입자가 함께 고정화된 효소 석출화 코팅(Mag-EPC) 방법으로 탄산무수화효소를 고정화 할 경우는 50일이 되는 시점에서 79%의 초기 활성을 유지하며, 그 이후에도 효소 활성의 급격한 감소는 나타나지 않았다. 이를 통해서 지지체와 효소집적체 간의 직접적인 결합의 존재는 효소의 활성 유지에 큰 도움을 주는 사실을 알 수 있다.

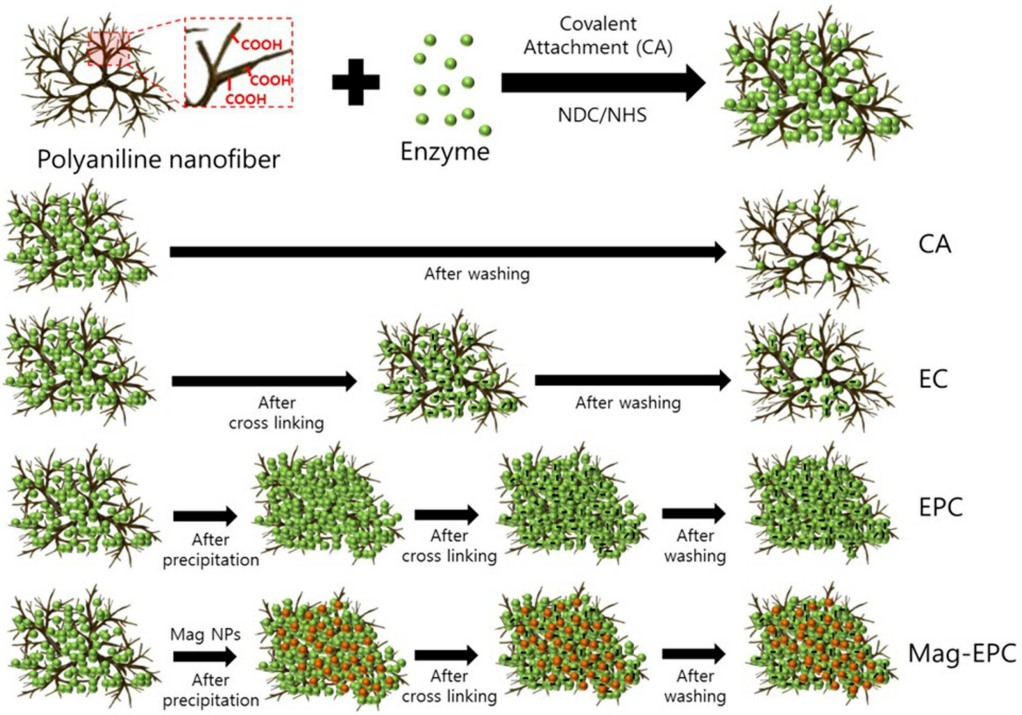
[0114] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

도면

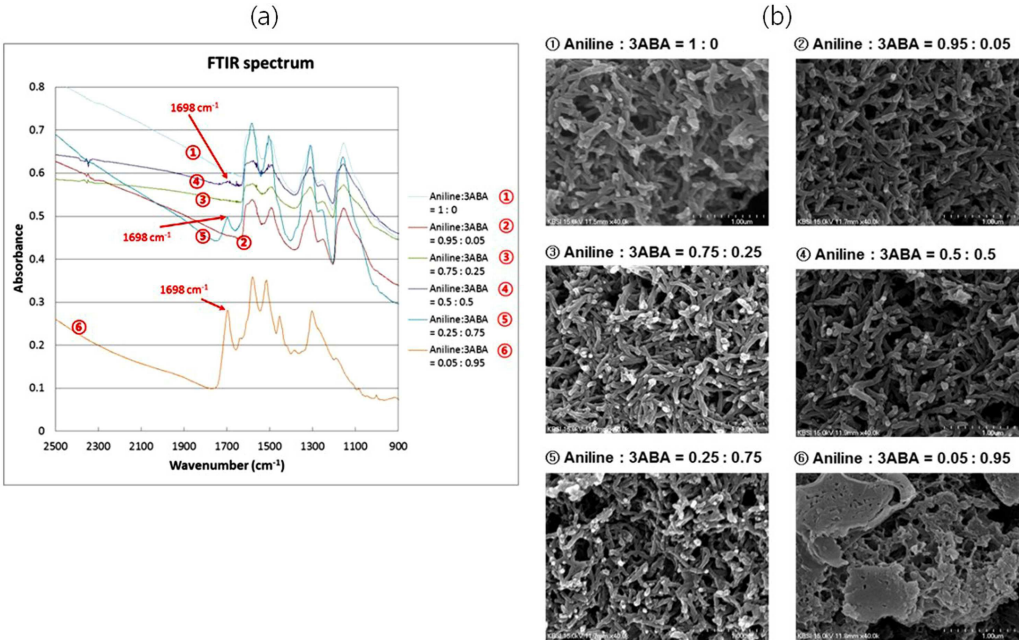
도면1


Initiator
Aniline, 3-aminobenzoic acid
RT, 200 rpm
24 hours

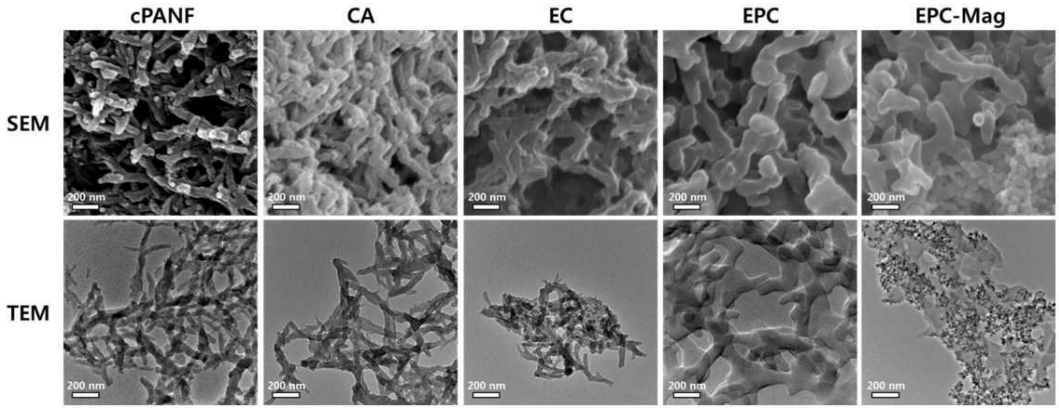
도면2


COOH
COOH
COOH
Polyaniline nanofiber
Enzyme
Covalent Attachment (CA)
NDC/NHS
After washing
CA
After cross linking
After washing
EC
After precipitation
After cross linking
After washing
EPC
Mag NPs
After precipitation
After cross linking
After washing
Mag-EPC

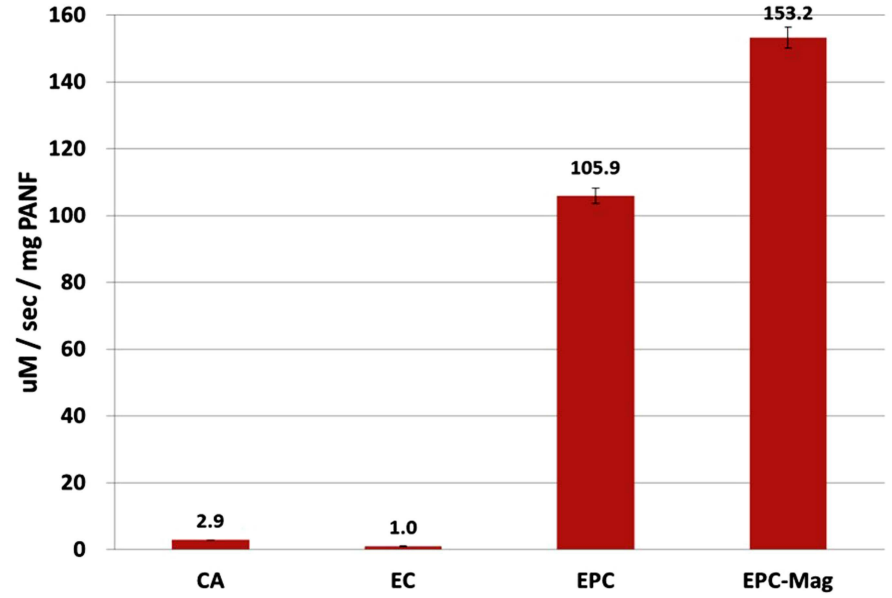
도면3


(a)
FTIR spectrum
Absorbance
Wavenumber (cm-1)
1698 cm-1
1698 cm-1
1698 cm-1
Aniline:3ABA = 1 : 0
Aniline:3ABA = 0.95 : 0.05
Aniline:3ABA = 0.75 : 0.25
Aniline:3ABA = 0.5 : 0.5
Aniline:3ABA = 0.25 : 0.75
Aniline:3ABA = 0.05 : 0.95
(b)
① Aniline : 3ABA = 1 : 0
② Aniline : 3ABA = 0.95 : 0.05
③ Aniline : 3ABA = 0.75 : 0.25
④ Aniline : 3ABA = 0.5 : 0.5
⑤ Aniline : 3ABA = 0.25 : 0.75
⑥ Aniline : 3ABA = 0.05 : 0.95

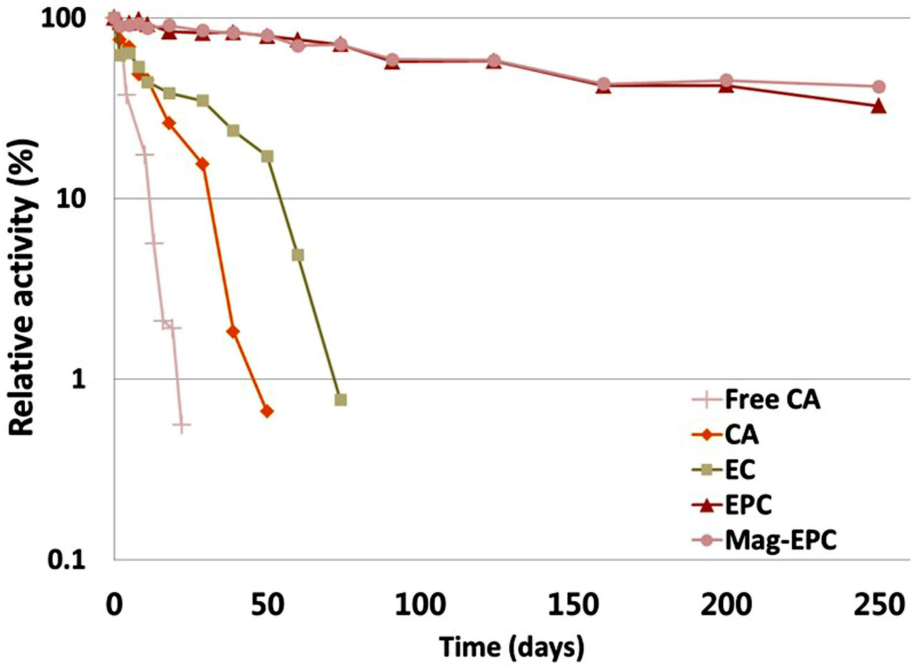
도면4


cPANF
CA
EC
EPC
EPC-Mag
SEM
TEM
200 nm

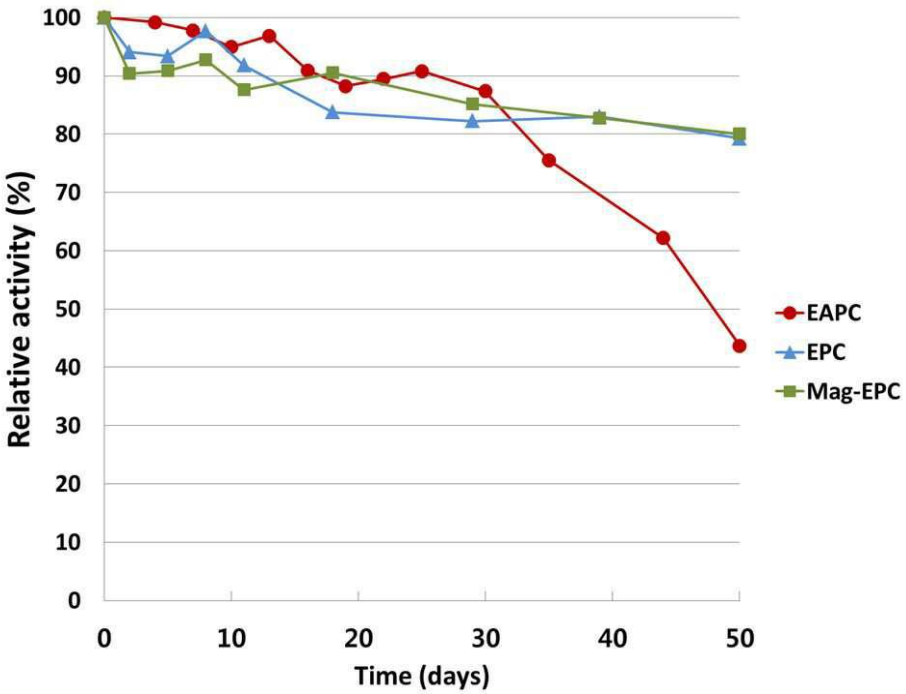
도면5


160
140
120
100
80
60
40
20
0
uM / sec / mg PANF
2.9
1.0
105.9
153.2
CA
EC
EPC
EPC-Mag

도면6


100
10
1
0.1
Relative activity (%)
0
50
100
150
200
250
Time (days)
Free CA
CA
EC
EPC
Mag-EPC

도면7


Relative activity (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
Time (days)
EAPC
EPC
Mag-EPC