

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0115927
(43) 공개일자 2023년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

B01J 31/00 (2006.01) A01N 63/50 (2020.01)

B01J 31/02 (2006.01) C12N 11/04 (2020.01)

C12N 9/04 (2006.01) C12N 9/96 (2006.01)

(52) CPC특허분류

B01J 31/003 (2013.01)

A01N 63/50 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0010400

(22) 출원일자 2023년01월26일

심사청구일자 2023년01월26일

(30) 우선권주장

1020220012348 2022년01월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중배

서울특별시 강남구 역삼로 309, 101동 1501호 (역삼동, 래미안펜타빌아파트)

탈레카 사친 반도판트

서울특별시 동대문구 안암로 84-16 (제기동)

김윤재

서울특별시 양천구 신목로 7, 101동 2104호 (신정동, 목동삼성아파트)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

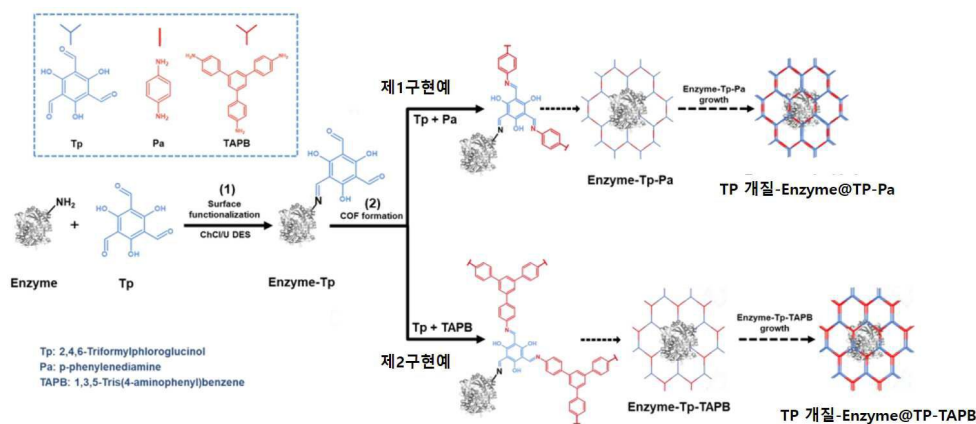
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 및 이의 제조방법

(57) 요약

효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 및 이의 제조방법이 제공된다. 이에 의하면, 타겟된 효소 및 공유결합성 유기 골격체 내 기공 크기를 고려하지 않고 공유결합성 유기 골격체의 내부에 타겟된 효소를 높은 로딩량으로 구비 시킴과 동시에 구비된 효소의 활성 상실이 최소화 또는 방지되고, 효소를 함유에도 공유결합성 유기 골격체 본래의 결정구조, 비표면적, 기공률 등에 영향이 최소화하도록 공유결합성 유기 골격체를 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B01J 31/0207 (2013.01)

B01J 31/0237 (2013.01)

C12N 11/04 (2013.01)

C12N 9/0006 (2013.01)

C12N 9/96 (2013.01)

C12Y 101/03004 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711131022

과제번호 2020R1A2C3009649

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 효소 안정화를 위한 나노효소입자 개발 및 그 응용

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

2개 이상의 알데하이드기를 갖는 제1전구체 및 2개 이상의 아민기를 갖는 제2전구체를 포함하는 공유결합성 유기 골격체 형성성분, 효소 및 용매를 혼합 및 반응시켜서 효소를 포함하는 공유결합성 유기 골격체를 제조하는 단계;를 포함하는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1전구체는 1,3,5-트리포름벤젠(1,3,5-Triformylbenzene), 2,4,6-트리포름페놀(2,4,6-triformylphenol), 2,4,6-트리포름레조르시놀(2,4,6-triformylresorcinol), 2,4,6-트리포름플로로글루시놀(2,4,6-Triformylphloroglucinol) 및 4,4',4''-(1,3,5-트리아진-2,4,6-트리일)트리스(옥실)트라이벤질알데하이드(4,4',4''-(1,3,5-triazine-2,4,6-triyl)tris(oxy))tribenzaldehyde)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하며,

상기 제2전구체는 p-페닐렌디아민, 1,3,5-트리스(4-아미노페틸)벤젠, 4,4',4''-(1,3,5-트리아진-2,4,6-트리일)트리아닐린(4,4',4''-(1,3,5-Triazine-2,4,6-triyl)trianiline), 벤젠-1,4-다이아민(benzene-1,4-diamine) 및 에틸렌 다이아민(Ethylene diamine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 효소는 트립신, 키모트립신, 펩신, 리파아제, 당산화효소, 양고추냉이 과산화효소, 티록시네이즈, 탄산무수화효소, 포름알데히드 탈수소효소, 포름산 탈수소효소, 알콜 탈수소효소, 콜레스테롤 탈수소효소, 아실레이즈, 락토네이즈, 프로테이즈, 퍼옥시데이즈, 아미노펩티데이즈, 포스파테이즈, 트랜스아미네이즈, 세린-엔도펩티데이즈, 시스테인-엔도펩티데이즈 및 메탈로엔도펩티데이즈로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 효소를 포함하는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 용매는 깊은 공용용매(deep eutectic solvent)인 것을 특징으로 하는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 용매는 깊은 공용용매(deep eutectic solvent)이며, 반응은 90℃ 이하의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

(1) 깊은 공용용매에 분산된 효소 표면을 2개 이상의 알데하이드기를 갖는 제1전구체 및 2개 이상의 아민기를 갖는 제2전구체 중 어느 일 전구체로 개질시키는 단계; 및

(2) 어느 일 전구체로 개질된 효소가 분산된 상기 깊은 공용용매에 다른 전구체를 혼합한 후 반응시켜서 효소를 포함하는 공유결합성 유기 골격체를 제조하는 단계;를 포함하는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 개질은 제1전구체의 알데하이드기와 효소의 아민기 간 공유결합을 통해 이루어지거나 또는

제2전구체의 아민기와 효소의 카르복시기 간 공유결합을 통해 이루어지는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조방법.

청구항 8

이민 기반의 공유결합성 유기 골격체; 및

상기 공유결합성 유기 골격체 내부에 포함된 효소;를 포함하는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 효소는 상기 공유결합성 유기골격체 뼈대 내 개재되는 제1효소와 기공 내부에 위치하는 제2효소를 포함하며, 상기 효소는 동일조건인 유리된 효소에 대비해 $k_{cat}/K_m(s^{-1}mM^{-1})$ 이 30% 이상인 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 효소는 공유결합성 유기 골격체의 뼈대 내 개재되어 있는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 효소는 공유결합성 유기 골격체를 이루는 뼈대와 공유결합을 이루며 개재된 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 효소는 10 ~ 60 중량%로 구비되는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체.

청구항 13

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체를 포함하는 물품.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 물품은 바이오센서, 바이오 연료전지, 필터, 이산화탄소 전환 장치용 촉매 및 안티파울링 도료 중 어느 하나인 물품.

청구항 15

당산화효소를 효소로써 구비하는 제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체를 포함하는 살균조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 기체 저장, 분리, 및 촉매반응과 같은 산업 분야에 있어서 다공성 물질에 대한 수요가 증가하여 왔다. 이러한 다공성 물질은 재질, 형태 및 크기에 있어서 매우 다양하게 개발되어왔다.
- [0003] 다공성 물질의 일 예로 골격체를 이루는 빌딩블록으로써 유기분자를 이용하는 금속 유기 골격체(MOF) 또는 공유 결합성 유기 골격체(COF)를 예시할 수 있다. 상기 금속 유기 골격체(MOF)는 결정 격자 내에 유기리간드와 금속 이온 또는 클러스터가 연속적으로 결합하여 3차원 결정성 구조를 가지는 새로운 유-무기 하이브리드 재료이다. MOF는 큰 비표면적을 보이며, 합성에 사용된 금속이온 및 유기 리간드의 종류에 따라 기공크기 및 형태가 세밀하게 조절 가능한 이점이 있다고 알려져 있다. 그러나 MOF의 경우 금속과 유기리간드 간의 결합이 이온결합임에 따라서 강한 기계적 특성을 가지기에 한계가 있다. 또한, MOF는 수분에 약한 단점이 존재함에 따라서 가장 친환경적이고 생체친화적인 용매에 해당하는 물을 기반으로 하는 각종 어플리케이션에 적용하기 어려운 문제가 있다.
- [0004] 이에 반하여 공유결합성 유기 골격체(COF)는 유기분자 간 공유결합의 형성과 분해의 반복을 통해 형성되는 다공성 결정체로서, 공유결합의 안정성 및 다공성으로 인해 다양한 분야에 적용 가능해 각광받고 있는 소재이다. 유기 골격체가 공유결합으로 이루어짐에 따라서 상술한 MOF에 대비해 더욱 큰 기계적 특성을 가지기에 유리하다. 특히, 결합의 종류에 따라 다양한 형태의 골격체를 형성할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 특히 높은 열적·화학적 안정성과 산화-환원 활성 특성을 가지고 있어 많이 연구되고 있는 물질이다.
- [0005] 한편, 최근에는 이러한 다양한 이점을 갖는 공유결합성 유기 골격체에 효소를 담지시키는 시도가 많이 이루어지고 있다. 효소가 미리 형성된 공유결합성 유기 골격체의 기공에 담지되기 위해서는 효소의 크기가 공유결합성 유기 골격체의 기공 크기보다 작아야 하므로 효소의 크기에 맞도록 공유결합성 유기 골격체가 설계되거나 미리 제조된 공유결합성 유기 골격체의 기공 크기를 변경할 수 있는 후속 공정이 요구된다. 그러나 효소의 크기를 고려해 효소를 기공 내로 도입할 수 있을 정도의 기공 크기를 갖는 공유결합성 유기 골격체의 신규설계는 많은 시간과 노력이 소요되며, 미리 제조된 공유결합성 유기 골격체에 대한 기공 크기의 조절 역시 쉽지 않은 한계점이 있다.
- [0006] 이러한 한계를 해결하기 위해서 공유결합성 유기 골격체의 제조단계에서 효소를 내재시키는 제조방법을 고려할 수 있다. 그러나 공유결합성 유기 골격체는 통상적으로 단백질의 변성온도를 훨씬 상회하는 100℃를 초과하는 높은 온도, 독성 유기용매, 산촉매, 오랜 반응시간 등 비친환경적 가혹한 조건 하에서 제조되므로 이러한 가혹한 제조조건 하에서 반응물질과 함께 투입된 효소는 불활성되기 쉬워서 최종 제조된 공유결합성 유기 골격체 내에 구비된 효소는 효소활성이 거의 상실되는 문제가 있다.
- [0007] 이에 따라서 효소의 크기에 관계 없이 효소를 공유결합성 유기 골격체 내부에 포함시킬 수 있는 효소 함유 공유결합성 유기 골격체의 제조방법에 대한 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제2021-0033589호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상기와 같은 점을 감안하여 안출한 것으로, 내포하도록 타겟된 효소 및 공유결합성 유기 골격체 내 기공 크기를 고려하지 않고 공유결합성 유기 골격체의 내부에 타겟된 효소를 높은 로딩량으로 구비시킴과 동시에 구비된 효소의 활성 상실이 최소화 또는 방지되고, 효소의 함유에도 공유결합성 유기 골격체 본래의 결정구조, 비표면적, 기공률 등에 영향이 최소화되는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조방법 및 이를 통해 제조된 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체를 제공하는데 목적이 있다.
- [0010] 또한, 본 발명은 효소가 공유결합성 유기 골격체 내 포함되는 경우에도 기질 및 생성물의 공유결합성 유기 골격체 내부 및 외부 이동이 자유로워서 효소를 통한 기질의 화학반응을 원활하게 유도시킬 수 있는 효소 매입형 공

유결합성 유기 골격체 제조방법 및 이를 통해 제조된 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체를 제공하는데 다른 목적이 있다.

[0011] 나아가, 본 발명에 따른 제조된 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체는 낮거나 높은 pH 조건 등 효소가 활성을 유지하기 어려운 가혹한 환경 하에서도 공유결합성 유기 골격체 내 효소의 활성 저하를 최소화 또는 방지할 수 있어서 살균 등 다양한 응용분야에 활용될 수 있는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체를 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상술한 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 2개 이상의 알데하이드기를 갖는 제1전구체 및 2개 이상의 아민기를 갖는 제2전구체를 포함하는 공유결합성 유기 골격체 형성성분, 효소 및 용매를 혼합 및 반응시켜서 효소를 포함하는 공유결합성 유기 골격체를 제조하는 단계를 포함하는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 제1전구체는 1,3,5-트리포밀벤젠(1,3,5-Triformylbenzene), 2,4,6-트리포밀페놀(2,4,6-triformylphenol), 2,4,6-트리포밀레조르시놀(2,4,6-triformylresorcinol), 2,4,6-트리포밀플로로글루시놀(2,4,6-Triformylphloroglucinol) 및 4,4',4''-(1,3,5-트리아진-2,4,6-트리일)트리스(옥실))트라이벤질알데하이드(4,4',4''-(1,3,5-triazine-2,4,6-triyl)tris(oxy))tribenzaldehyde)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하며,

[0014] 상기 제2전구체는 p-페닐렌디아민, 1,3,5-트리스(4-아미노페틸)벤젠, 4,4',4''-(1,3,5-트리아진-2,4,6-트리일)트리아닐린(4,4',4''-(1,3,5-Triazine-2,4,6-triyl)trianiline), 벤젠-1,4-다이아민 (benzene-1,4-diamine) 및 에틸렌 다이아민(Ethylene diamine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0015] 또한, 상기 효소는 트립신, 키모트립신, 펩신, 리파아제, 당산화효소, 양고추냉이 과산화효소, 티록시네이즈, 탄산무수화효소, 포름알데히드 탈수소효소, 포름산 탈수소효소, 알콜 탈수소효소, 콜레스테롤 탈수소효소, 아실레이즈, 락토네이즈, 프로테이즈, 펩티다제, 아미노펩티다제, 포스파타제, 트랜스아미네이즈, 세린-엔도펩티다제, 시스테인-엔도펩티다제 및 메탈로엔도펩티다제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 효소를 포함할 수 있다.

[0016] 또한, 상기 용매는 깊은 공융용매(deep eutectic solvent)일 수 있다.

[0017] 또한, 상기 용매는 깊은 공융용매(deep eutectic solvent)이며, 반응은 40℃이하의 온도에서 수행될 수 있다.

[0018] 또한, 상기 깊은 공융용매는 염화콜린(choline chloride) 및 우레아의 혼합용매일 수 있다.

[0019] 또한, (1) 깊은 공융용매에 분산된 효소 표면을 2개 이상의 알데하이드기를 갖는 제1전구체 및 2개 이상의 아민기를 갖는 제2전구체 중 어느 일 전구체로 개질 시키는 단계 및 (2) 어느 일 전구체로 개질된 효소가 분산된 상기 깊은 공융용매에 다른 전구체를 혼합한 후 반응시켜서 효소를 포함하는 공유결합성 유기 골격체를 제조하는 단계를 포함할 수 있다.

[0020] 또한, 상기 개질은 제1전구체의 알데하이드기와 효소의 아민기 간 공유결합을 통해 이루어지거나 또는 제2전구체의 아민기와 효소의 카르복시기 간 공유결합을 통해 이루어질 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 이민 기반의 공유결합성 유기 골격체 및 상기 공유결합성 유기 골격체 내부에 포함된 효소를 포함하는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체를 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 공유결합성 유기골격체 뼈대 내 개재되는 제1효소와 기공 내부에 위치하는 제2효소를 포함하며, 상기 효소는 동일조건에서 유리된 효소에 대비해 $k_{cat}/K_m(s^{-1}mM^{-1})$ 이 30% 이상, 다른 일 예로 50% 이상일 수 있다.

[0024] 또한, 상기 효소는 공유결합성 유기 골격체의 뼈대 내 개재될 수 있다.

[0025] 또한, 상기 효소는 공유결합성 유기 골격체를 이루는 뼈대와 공유결합을 이루며 개재될 수 있다.

[0026] 또한, 상기 효소는 10 ~ 60 중량%로 구비될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체를 포함하는 물품을 제공한다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 물품은 바이오센서, 바이오 연료전지, 필터, 이산화탄소 전환 장치용 촉매, 살균제 및 안티파울링 도료 중 어느 하나일 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 당산화효소를 효소로써 구비하는 본 발명에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체를 포함하는 살균조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0032] 본 발명에 의한 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조방법은 내포하도록 타겟된 효소 및 공유결합성 유기 골격체 내 기공 크기를 고려하지 않고 공유결합성 유기 골격체의 내부에 타겟된 효소를 높은 로딩량으로 구비시킴과 동시에 구비된 효소의 활성 상실이 최소화 또는 방지되고, 효소를 함유함에도 공유결합성 유기 골격체 본래의 결정구조, 비표면적, 기공률 등에 영향이 최소화하도록 공유결합성 유기 골격체를 제조할 수 있다. 또한, 효소가 공유결합성 유기 골격체 내 포함됨에도 기질 및 생성물의 공유결합성 유기 골격체 내부 및 외부 이동이 자유로워서 효소를 통한 기질의 화학반응을 원활하게 유도시킬 수 있다. 나아가, 제조된 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체가 낮거나 높은 pH 조건 등 효소가 활성을 유지하기 어려운 가혹한 환경 하에서도 공유결합성 유기 골격체 내 효소의 활성 저하를 최소화 또는 방지할 수 있어서 살균, 안티파울링, 이산화탄소 전환, 바이오 연료전지, 바이오센서 등 다양한 응용분야에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 여러 구현예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체의 제조방법을 도시한 공정흐름도,
 도 2는 본 발명의 제1구현예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체(Tp개질-GOx@Tp-Pa)의 합성 시간 별 TEM 사진 및 형상에 대한 모식도,
 도 3은 본 발명의 제1구현예에 따른 공유결합성 유기 골격체와 동종인, 본 발명의 비교예에 따른 공유결합성 유기 골격체(Tp-Pa)의 합성 시간 별 TEM 사진,
 도 4는 본 발명의 제1구현예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체에 대한 합성 개시 후 120 분 경과 시 TEM 사진,
 도 5는 본 발명의 제1구현예를 변형한 다른 구현예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체(미개질-GOx@Tp-Pa)에 대한 합성 개시 후 120 분 경과 시 TEM 사진,
 도 6은 본 발명의 제1구현예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체에 대한 합성 개시 후 4 분 경과 시 TEM 사진 및 공유결합성 유기 골격체의 결정성장 방향에 대한 설명도,
 도 7은 본 발명의 제2구현예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체(Tp개질-GOx@Tp-TAPB)의 합성 시간 별 TEM 사진 및 형상에 대한 모식도,
 도 8 및 도 9는 본 발명의 제2구현예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체에 대한 합성 개시 후 4 분 경과 시 TEM 사진 및 공유결합성 유기 골격체의 결정성장 방향에 대한 설명도,
 도 10은 본 발명의 제2구현예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체에 대한 합성 개시 후 120 분 경과 시 TEM 사진,
 도 11은 본 발명의 제2구현예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체의 합성 개시 후 90분 시점에 수소화 붕소나트륨을 처리하고, 합성 개시 후 120 분 경과 시 TEM 사진,
 도 12 및 도 13은 각각 본 발명의 제1구현예 및 제2구현예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체에 대한 HAADF-STEM 및 원소별 EDX 맵핑 사진,
 도 14는 본 발명의 제2구현예에 따른 공유결합성 유기 골격체와 동종인, 본 발명의 비교예에 따른 공유결합성

유기 골격체(Tp-TAPB)의 합성 시간 별 TEM 사진,

도 15는 본 발명의 제2구현예를 변형한 다른 구현예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체(미개질-GOx@Tp-TAPB)에 대한 합성 개시 후 120 분 경과 시 TEM 사진,

도 16 및 도 17은 각각 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 대한 분말 XRD 그래프,

도 18 및 도 19는 각각 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 대한 표면적 분석 그래프,

도 20 및 도 21은 각각 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 대한 부피 기준 공경분포도,

도 22 및 도 23은 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 대한 열 및 진동 안정성을 평가한 그래프,

도 24는 본 발명의 여러 실시예 및 비교예에 대한 pH 안정성을 평가한 그래프,

도 25는 본 발명의 여러 실시예 및 비교예에 대한 소화효소(트립신), 수소결합 억제제(우레아) 및 유기용매(아세톤)에 대한 안정성을 평가한 그래프,

도 26 및 도 27은 각각 서로 다른 박테리아에 대한 본 발명의 여러 실시예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체의 살균활성을 측정된 그래프,

도 28은 서로 다른 박테리아에 대한 본 발명의 여러 실시예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체의 살균활성을 확인한 배양결과 사진,

도 29 및 도 30은 각각 서로 다른 박테리아에 대한 본 발명의 여러 실시예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체의 재활용 횟수 별 상대적인 세포 사멸을 측정된 그래프, 그리고

도 31은 본 발명의 여러 실시예에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체의 건조 분말 사진으로써, (a)는 실시예 1에 따른 건조분말의 사진이고 (b)는 실시예 1에 따른 건조분말의 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하, 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 실시예에 대하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에 의한 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체는 2개 이상의 알데하이드기를 갖는 제1전구체 및 2개 이상의 아민기를 갖는 제2전구체를 포함하는 공유결합성 유기 골격체 형성성분, 효소 및 용매를 혼합 및 반응시켜서 효소를 포함하는 공유결합성 유기 골격체를 제조하는 단계를 포함하여 제조될 수 있다.

[0037] 상기 공유결합성 유기 골격체 형성성분은 축합 등의 공지된 반응을 통해서 공유결합성 유기 골격체를 형성하는 것으로 알려진 2종 이상의 전구체를 포함할 수 있고, 구체적으로 이민 결합으로 전구체가 유기 골격체를 형성하는 이민 기반의 공유결합성 유기 골격체를 형성하도록 2개 이상의 알데하이드기를 갖는 제1전구체와 2개 이상의 아민기를 갖는 제2전구체를 포함할 수 있다.

[0038] 이민 기반의 공유결합성 유기 골격체는 제1전구체와 제2전구체가 교호적으로 배치됨으로써 형성된 육각형 네트워크 구조를 가질 수 있고, 유기골격체는 육각형의 네트워크가 연속적으로 배열되어 벌집의 단면과 같은 형태를 가질 수 있다. 이러한 육각형 네트워크 구조를 가지는 이민 기반의 공유결합성 유기골격체는 표면적이 매우 넓고, 다공성 구조를 가짐에 따라서 기질/생성물의 유출입이 원활하고, 많은 반응 사이트를 가질 수 있어서 바이오 센서에 응용되는 경우에도 매우 우수한 감도를 가질 수 있다.

[0039] 상기 제1전구체는 이민 기반의 공유결합성 유기 골격체를 형성하는데 사용되는 공지의 전구체의 경우 제한 없이 사용될 수 있다. 이에 대한 일 예로서 상기 제1전구체는 1,3,5-트리포밀벤젠(1,3,5-Triformylbenzene), 2,4,6-트리포밀페놀(2,4,6-triformylphenol), 2,4,6-트리포밀레조르시놀(2,4,6-triformylresorcinol), 2,4,6-트리포밀플로로글루시놀(2,4,6-Triformylphloroglucinol), 2,5-퓨란디카르복스알데하이드, 1,3,5-벤젠트리카르복스알데하이드, 4-(비스(4-(5-포밀티오펜-2-일)페닐)아미노)벤조산 및 4,4',4''-(1,3,5-트리아진-2,4,6-트리일)트리스(옥실)트라이벤질알데하이드(4,4',4''-(1,3,5-triazine-2,4,6-triyl)tris(oxy)tribenzaldehyde)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

- [0041] 또한, 상기 제2전구체는 일 예로 p-페닐렌디아민, o-페닐렌디아민, 2,3-디아미노나프탈렌, 1,3,5-트리스(4-아미노페틸)벤젠, 4,4',4''-(1,3,5-트리아진-2,4,6-트리일)트리아닐린(4,4',4''-(1,3,5-Triazine-2,4,6-triyl)trianiline), 벤젠-1,4-다이아민(benzene-1,4-diamine) 및 에틸렌 다이아민(Ethylene diamine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0043] 또한, 상기 효소는 목적하는 용도의 기질을 고려해 공지된 효소의 경우 제한 없이 사용될 수 있다. 일 예로 상기 효소는 트립신, 키모트립신, 펩신, 리파아제, 당산화효소, 양고추냉이 과산화효소, 티록시네이즈, 탄산무수화효소, 포름알데히드 탈수소효소, 포름산 탈수소효소, 알콜 탈수소효소, 콜레스테롤 탈수소효소, 아실레이즈, 락토네이즈, 프로테이즈, 퍼옥시데이즈, 아미노펩티데이즈, 포스파테이즈, 트랜스아미네이즈, 세린-엔도펩티데이즈, 시스템-엔도펩티데이즈 및 메탈로엔도펩티데이즈로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 효소를 포함할 수 있다.
- [0046] *또한, 상기 용매는 상술한 공유결합성 유기 골격체 형성성분을 고려해 공유결합성 유기 골격체로 제조하는데 사용되는 공지의 용매는 제한 없이 사용될 수 있다. 다만, 통상적인 이민 기반의 공유결합성 유기 골격체를 제조하는데 사용되는 용매는 메시틸렌-다이옥세인 솔루션(Mesitylene-dioxane solution), 다이메틸 설펡사이드(DMSO), 다이옥세인(Dioxane) 등으로, 이들 용매는 독성을 갖기에 상술한 효소가 이러한 용매에 혼합될 시 효소의 활성을 저해하거나 상실시킬 우려가 있어서 공유결합성 유기 골격체를 제조하는 과정에서 효소가 투입되는 제조방법에 사용하기 적절하지 않다. 이에 따라서 사용되는 용매가 이민 기반의 공유결합성 유기 골격체를 제조하는데 사용되는 통상적인 용매인 경우 상기 효소는 상술한 공유결합성 유기 골격체 형성성분 및 용매를 혼합 후 사용되는 공유결합성 유기 골격체 형성성분의 종류를 고려해 공지의 제조조건으로 공유결합성 유기 골격체를 선 제조 후 후술하는 효소를 제조된 공유결합성 유기 골격체에 혼합할 수밖에 없다. 그러나 이 경우 공유결합성 유기 골격체에 로딩되는 효소의 양은 매우 적고, 로딩되는 효소도 효소 크기가 공유결합성 유기 골격체의 기공 크기보다 큰 경우 공유결합성 유기 골격체의 내부로 들어가기 보다는 외부 표면에 흡착되는 방식으로 로딩됨에 따라서 공유결합성 유기 골격체를 통한 효소의 지지 및 보호 효과를 달성하기에 부족할 수 있다.
- [0048] 이에 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 용매는 깊은 공용용매(deep eutectic solvent)일 수 있다. 상기 깊은 공용용매는 두 종류의 성분이 혼합되어 각 성분보다 더 낮은 녹는점을 갖는 공용혼합물을 의미하며, 이온성 액체와 물리화학적 성질이 유사하면서도 이온성 액체에 대비해 제조가 용이하고, 단가가 낮으며, 저독성인 장점이 있는 용매로 알려져 있다. 본 발명의 일 실시예에 의한 제조방법은 이러한 깊은 공용용매를 용매로 사용함으로써 공유결합성 유기 골격체 형성성분을 용해시키는 용매로써의 역할 이외에 저독성 특성으로 인해 효소가 혼합되더라도 효소의 활성 저해를 최소화하거나 방지할 수 있어서 공유결합성 유기 골격체 형성 공정 중 효소를 함께 투입하는 것이 가능해지며, 이를 통해서 선택된 공유결합성 유기 골격체 형성성분이 이루는 유기 골격체 내 기공 크기 보다 효소 크기가 큰 경우에도 유기 골격체 내부, 구체적으로 기공 내에 효소가 포함되는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체를 제조할 수 있다.
- [0049] 또한, 상기 깊은 공용용매는 공유결합성 유기 골격체 형성 시 통상적으로 별도로 함유되는 산촉매가 수행하는 수소결합 주개(hydrogen bonding donor) 기능을 수행함에 따라서 추가적인 산촉매의 생략이 가능하고, 공유결합성 유기 골격체 형성온도를 통상적인 100℃를 초과하는 온도가 아닌 효소의 변성이 발생하는 온도 미만의 온도에서 가능하도록 함으로써 산촉매 및 공유결합성 유기 골격체 형성 시 요구되는 높은 온도조건으로 인해 발생하는 효소의 침해/변성 및 이로 인한 효소활성 저하/상실을 방지하기에 유리할 수 있다.
- [0051] 한편, 깊은 공용용매를 사용 시 구현되는 내부에 효소가 포함되는 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체는 동일 조건에서 유리된 효소에 대비해 $k_{cat}/K_m(s^{-1}mM^{-1})$ 이 30% 이상, 다른 일 예로서 50% 이상일 수 있고, 이를 통해서 공유결합성 유기골격체 제조 공정 중 공유결합성 유기골격체와 함께 혼합되는 경우에도 효소활성이 우수한 효율

로 유지되는 것을 알 수 있다.

[0053] 상기 깊은 공유용매는 공지된 깊은 공유용매를 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 효소의 변성이 시작되는 온도 미만의 온도에서 액체이면서 공유결합성 유기 골격체 형성성분에 대한 용해도가 높은 것일 수 있고, 구체적으로 90℃ 이하에서 액상인 것을 사용할 수 있다. 이에 대한 일 예로 상기 깊은 공유용매는 수소결합 주개(Hydrogen bond done)와 수소결합 받개(hydrogen bond acceptor)로 이루어질 수 있고, 상기 수소결합 주개는 우레아, 티오우레아(Thiourea), 아세트아마이드(Acetamide), 벤즈아마이드(Benzamide), 글리세롤(Glycerol), 이미다졸(Imidazole), 말레산(Malonic acid), 및 글루코오스(Glucose)로 이루어진 1종 이상을 포함할 수 있다. 또한, 상기 수소 결합 받개는 염화콜린(Choline Chloride), 염화 N,N-디에틸-2-하이드록시 에탄아미늄(N,N-diethyl-2-hydroxy ethanamidium chloride), 염화테트라메틸암모늄(Tetramethylammonium chloride), 브롬화메틸트리페닐포스포늄(Methyltripheylphosphonium bromide), 염화테트라부틸암모늄(Tetrabutylammonium chloride), 염화 N-벤질-2-하이드록시-N,N-디메틸 에탄아미늄(N-benzyl-2-hydroxy-N,N-dimethyl ethanamidium chloride), 염화 테트라에틸암모늄(Tetraethylammonium chloride) 및 염화 2-아세테이트-N,N,N-트리메틸 에탄아미늄(2-Acetate-N,N,N-trimethyl ethanamidium chloride)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 구체적인 일 예로 상기 깊은 공유용매는 염화콜린(choline chloride) 및 우레아의 혼합용매일 수 있다.

[0055] 한편, 용매로써 물은 효소에 대한 침해를 유발하지 않는 점에서는 유리하나, 공유결합성 유기 골격체 형성성분 간의 공유결합을 유도하기 위한 별도의 산촉매가 여전히 포함되어야 하며, 반응 온도 역시 효소의 변성을 유발하는 온도를 초과하는 온도에서 설정이 이루어져야 함에 따라서 제조공정 중 효소의 침해 및 변성에 따른 활성 저하나 상실을 예방하기에 유리할 수 있다.

[0057] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 의하면, 상술한 2개 이상의 알데하이드기를 갖는 제1전구체 및 2개 이상의 아민기를 갖는 제2전구체를 포함하는 공유결합성 유기 골격체 형성성분, 효소 및 깊은 공유용매인 용매가 순서에 관계없이 혼합되거나, 또는 상기 용매에 효소를 먼저 혼합한 후 제1전구체와 제2전구체를 투입 및 혼합 시킨 후 제1전구체와 제2전구체 간의 공유결합을 형성하는 반응이 이루어질 수 있고, 이때 상기 반응은 구비되는 효소의 변성이 시작되는 온도를 고려해 결정할 수 있으며, 일 예로 90℃ 이하에서 수행할 수 있고, 대부분의 효소의 변성온도를 고려해 40℃ 이하, 보다 바람직하게는 20 ~ 25℃의 온도에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 반응은 1 ~ 4시간 동안 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 반응이 완료된 후 내부에 효소가 포함된 공유결합성 유기 골격체를 수득 및 분리하기 위하여 탈이온수를 반응이 완료된 혼합물에 혼합한 후 3 ~ 10℃의 온도에서 5000 ~ 20000rpm으로 3 ~ 20분간 원심분리해 내부에 효소가 포함된 공유결합성 유기 골격체를 수득한 후 탈이온수로 1회 또는 다수 회 세척한 후 버퍼용액에 분산시켜서 보관할 수 있다.

[0059] 한편, 혼합 시 효소 및 공유결합성 유기 골격체 형성성분의 혼합비율은 구체적인 효소 및 공유결합성 유기 골격체 형성성분의 종류에 따라서 변경될 수 있으나 일 예로 효소 100 중량부 대비 공유결합성 유기 골격체 형성성분을 100 내지 400 중량부 혼합할 수 있고, 이를 통해 본 발명의 목적을 달성하기에 보다 유리할 수 있다. 또한, 공유결합성 유기 골격체 형성성분 내 제1전구체와 제2전구체는 구체적인 제1전구체와 제2전구체의 분자량을 고려해 중량비가 변경될 수 있으나, 일 예로 제1전구체와 제2전구체는 1: 0.4 ~ 1.2 중량비로 혼합될 수 있으며, 이를 통해 본 발명의 목적을 달성하기에 유리할 수 있다.

[0061] 한편, 상술한 제조방법으로 제조 시 최종 수득된 공유결합성 유기 골격체 내부에 효소를 포함하나, 구비된 효소 중 일부는 기공 내부에 위치함에 따라서 로딩량을 크게 증가시키기 어렵고, 기공 내부에 위치하는 일부 효소는 공유결합성 유기 골격체와 정전기적 인력 등의 화학적 결합이나 물리적 결합된 상태임에 따라서 쉽게 공유결합성 유기 골격체에서 유출이 일어날 수 있다. 또한, 기공 내부에 위치한 일부 효소는 공유결합성 유기 골격체 자체의 본래 기공을 폐색시키도록 구비될 수 있어서 효소 없이 제조된 공유결합성 유기 골격체에 대비해 기공율이나 공경이 작게 구현될 수 있고, 이로 인해서 공유결합성 유기 골격체 내부와 외부 간에 기질/생성물의 교환이 원활하지 않을 우려가 있다.

- [0063] 이에 본 발명의 일 실시예에 의하면, 공유결합성 유기 골격체 내부에 효소의 로딩량을 크게 증가시키고 로딩된 효소의 유출을 방지하기 위하여 (1) 깊은 공융용매에 분산된 효소 표면을 2개 이상의 알데하이드기를 갖는 제1전구체 및 2개 이상의 아민기를 갖는 제2전구체 중 어느 일 전구체로 개질 시키는 단계 및 (2) 어느 일 전구체로 개질된 효소가 분산된 상기 깊은 공융용매에 다른 전구체를 혼합한 후 반응시켜서 효소를 포함하는 공유결합성 유기 골격체를 제조하는 단계를 포함하여 제조할 수 있다.
- [0064] 위와 같은 제조방법은 효소의 표면을 제1전구체 또는 제2전구체로 개질시킴에 따라서 형성되는 공유결합성 유기 골격체 뼈대 내에 효소를 개재시킬 수 있고, 이를 통해서 효소의 로딩량을 크게 증가시키고 효소의 유출을 방지하기에 유리할 수 있다. 또한, 효소가 공유결합성 유기 골격체 뼈대 내에 개재됨에 따라서 효소가 포함되지 않은 공유결합성 유기 골격체 대비해 BET 비표면적, 기공율, 공경의 저하를 최소화할 수 있음에 따라서 기질/생성물의 유출입이 보다 원활하고, 공유결합성 유기 골격체 본래의 다공성 구조를 통한 장점을 그대로 가져갈 수 있는 이점이 있다.
- [0066] 먼저 (1) 단계로서, 깊은 공융용매에 분산된 효소 표면을 2개 이상의 알데하이드기를 갖는 제1전구체 및 2개 이상의 아민기를 갖는 제2전구체 중 어느 일 전구체로 개질 시키는 단계를 수행할 수 있다.
- [0067] 구체적으로 상기 개질은 깊은 공융용매에 분산된 효소에 제1전구체 또는 제2전구체를 투입해 500 ~ 1000rpm으로 교반하면서 10 ~ 60분간 수행할 수 있다. 이때 제1전구체 또는 제2전구체는 사용되는 구체적인 전구체 종류 및 효소의 종류를 고려해 혼합비율이 결정될 수 있는데, 일 예로 효소 100 중량부에 대해 제1전구체 또는 제2전구체가 80 ~ 120 중량부로 투입될 수 있으며, 이를 통해 본 발명의 목적을 달성하기에 유리할 수 있다.
- [0069] 또한, 상기 개질은 제1전구체의 알데하이드기와 효소의 아민기 간 공유결합을 통해 이루어지거나 또는 제2전구체의 아민기와 효소의 카르복시기 간 공유결합을 통해 이루어질 수 있고, 이를 통해서 공유결합성 유기 골격체 내 개재된 효소의 유출이 방지되고, 공유결합성 유기 골격체의 기계적 강도를 온전히 가지기에 유리할 수 있다. 한편, 바람직하게는 효소를 개질시키는 전구체는 제1전구체와 제2전구체 중 크기, 일 예로 분자량 또는 탄소수가 적은 것일 수 있고, 이를 통해 전구체로 개질된 효소를 통해서 목적하는 공유결합성 유기 골격체를 형성하기에 보다 용이할 수 있다.
- [0071] 이때, 상기 개질은 깊은 공융용매에서 이루어질 수 있는데, 이를 통해서 다른 용매를 사용하는 경우에 대비해 효소 표면 상의 아민기 또는 카르복실기에 제1전구체 또는 제2전구체를 공유결합을 통해 도입시키기에 보다 유리할 수 있다.
- [0073] 다음으로 (2) 단계로서, 어느 일 전구체로 개질된 효소가 분산된 상기 깊은 공융용매에 다른 전구체를 혼합한 후 반응시켜서 효소를 포함하는 공유결합성 유기 골격체를 제조하는 단계를 수행할 수 있다.
- [0074] 이때 투입되는 다른 전구체는 (1) 단계에서 투입된 전구체 100 중량 대비 70 ~ 200 중량부로 투입될 수 있으나 구체적인 전구체들의 종류를 고려해 적절히 변경될 수 있다. 또한, 바람직하게는 다른 전구체와 함께 (1) 단계에서 투입된 전구체와 동일종류의 작용기를 갖는 동종의 전구체 또는 동일한 전구체를 함께 투입할 수 있으며 이를 통해 공유결합성 유기 골격체를 성장시키기에 보다 용이할 수 있다. 이때 (1) 단계에서 투입된 전구체와 동종 또는 동일한 전구체의 함량은 (1) 단계에서 투입된 전구체 함량의 30 ~ 70중량%일 수 있고, 이를 통해 공유결합성 유기 골격체를 보다 용이하게 형성시킬 수 있다.
- [0076] 한편, (2) 단계는 상술한 제조방법에서의 공유결합성 유기 골격체 전구체들의 형성 시 공정조건과 동일한 조건에서 수행될 수 있고, 일 예로 90℃ 이하 온도에서 수행될 수 있다. 다만 대부분의 효소의 변성 개시 온도를 고려해 40℃ 이하 온도, 보다 바람직하게는 20 ~ 25℃ 온도에서 1 ~ 4시간 동안 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 반응이 완료된 후 공유결합성 유기 골격체 뼈대 내부에 효소가 개재된 공유결합성 유기 골격체를 수득 및 분리하기 위하여 탈이온수를 반응이 완료된 혼합물에 혼합한 후 3 ~ 10℃의 온도에서 5000 ~

20000rpm으로 3 ~ 20분간 원심분리하여 공유결합성 유기 골격체를 수득한 후 탈이온수로 1회 또는 다수 회 세척한 뒤 버퍼용액에 분산시켜서 보관할 수 있다.

[0078] 상술한 본 발명의 바람직한 제조방법 및 도 1과 도 2에 의거하여 뼈대 내 효소가 개재된 공유결합성 유기 골격체 형성에 대해서 이하 구체적으로 살펴본다.

[0079] 도시된 제1구현예(도 1의 (a) 및 도 2) 및 제2구현예(도 1의 (b) 및 도 6)는 모두 효소로써 당산화효소(이하, 'GOx'라고 함)를 사용하고, 제1전구체로써 2,4,6-트리포밀플로로글루시놀(2,4,6-Triformylphloroglucinol)(이하, 'Tp'라고 함)를 사용되, 제2전구체로써 제1구현예는 p-페닐렌디아민(이하, 'Pa'라고 함), 제2구현예는 1,3,5-트리스(4-아미노페틸)벤젠(이하, 'TAPB'라고 함)로 제2전구체 종류를 다르게 사용한 예시이다.

[0081] 먼저 제1구현예(GOx@Tp-Pa)를 살펴보면, 반응이 시작되고 약 4분 후에 두께가 20 ~ 30인 얇은 섬유 형상의 GOx@Tp-Pa가 형성되며, 도 6에 도시된 것과 같이 제2전구체인 Pa가 평면에 가까움에 따라서 60분까지 z축 방향인 길이방향으로 성장을 계속하면서 꼬여서 두께가 60nm 이하의 긴 길이의 섬유 번들을 형성하게 된다. 또한, 이 시간 동안에 섬유들은 섬유 번들의 새로운 가치를 형성하기 위하여 가치를 치며 최대 60분까지 서로 교차하고 엉킨 형태를 형성하게 된다. 이러한 섬유 번들의 교차와 엉김뿐만 아니라 측면 방향으로의 성장은 120분 후 교차된 섬유번들의 네트워크에서 직경이 400 ~ 600nm인 조밀한 덩어리(clump)를 형성하게 된다. 이때 형성된 덩어리 표면은 털이 난 형상을 가지게 되며 섬유번들은 구성 섬유 간에 서로 이격되면서 짧고 털이 난 형상이 될 수 있다. 이러한 결과는 120분 때 덩어리 표면 상에 관찰되는 잔털과 같은 섬유를 통해 알 수 있듯이, 번들을 이룬 섬유 결정이 가역적 이민 결합에 기인한 재용해되고, 덩어리 표면에서 재결합되어 짧고 털이 난 것과 같은 형상의 번들로 구현된 것에 기인한다. 이러한 해석은 반응이 시작된 뒤 60분 경과 후 수소화붕소나트륨(NaBH_4) 처리를 통해 이민 결합이 비가역적인 아민 결합으로 환원된 경우 반응 시작 후 120분이 경과하더라도 덩어리가 형성되지 않는 결과를 통해 뒷받침될 수 있다.

[0082] 또한, 제1구현예와 같이 형성된 공유결합성 유기 골격체는 도 12를 통해 확인할 수 있듯이 효소가 공유결합성 유기 골격체 전 영역에 골고루 분산되어 위치하는 것을 알 수 있다.

[0084] 한편, 효소 GOx 없이 Tp 및 Pa로 형성된 공유결합성 유기골격체는 도 3에서 확인할 수 있듯이 Tp-Pa 섬유가 길이방향 및 측면 방향으로 성장하고 꼬여서 반응 시작 후 120분이 경과되었을 때 두께가 100nm를 초과하는 긴 섬유 번들을 형성하는 것을 관찰할 수 있는데, 제1구현예와 다르게 효소가 포함되지 않음에 따라서 덩어리를 형성하는 엉킴은 발생하지 않은 것을 알 수 있다.

[0086] 또한, 도 4 및 도 5를 참조하면 제1구현예(도 4)에서 관찰되는 덩어리는 알데하이드기를 갖는 제1전구체인 Tp로 개질된 효소(GOx)로부터 유래한 섬유가 매우 많은 수의 섬유 가치를 초래하고, 이것들이 반응 동안 교차하고 엉겨서 형성된 것으로 볼 수 있다. 이러한 해석은 효소를 제1전구체로 개질하지 않고 제조한 경우에 해당하는 도 5를 통해서 입증할 수 있고, 도 5에 도시된 효소를 내부에 포함하는 공유결합성 유기 골격체는 형성된 덩어리 개수가 도 4에 대비해 작고, 덩어리 한 개의 크기도 작은 것을 알 수 있다.

[0088] 또한, 알데하이드기를 갖는 제1전구체로 개질된 효소를 통해 구현된 공유결합성 유기 골격체는 미개질된 상태로 효소가 공유결합성 유기 골격체 형성성분과 함께 혼합되어 제조된 공유결합성 유기 골격체에 대비해 로딩되는 효소함량에 있어서 큰 차이를 유발하며, 일 예로 Tp로 개질된 GOx와 Pa가 반응해 형성한 공유결합성 유기 골격체는 효소 로딩량이 34.5%, 고정화 효율이 75.0%, 활성회복이 55.0%에 달하나, 달하나, 미개질된 상태의 GOx가 Tp/Pa와 혼합되어 구현된 공유결합성 유기 골격체는 효소 로딩량이 19.8%, 고정화 효율이 43.1%, 활성 회복이 28.5%에 불과해 효소 로딩량, 고정화 효율 및 활성회복에서 큰 차이가 있는 것을 알 수 있다.

- [0091] *다음으로 제2구현예(GOx@Tp-TAPB)에 대해 살펴보면, 반응이 시작된 후 4분 경과 시 도 7 및 도 8을 통해 확인할 수 있듯이 작은 GOx@Tp-TAPB 입자 용액에서 핵을 형성하고 10분 이내에 빠르게 나노 스핀들(spindle)로 조립되며, 엉기고 합체되어 반응 시작 후 60분까지 길이가 500 ~ 600nm이고 최대 폭이 130nm인 꽃 잎 모양의 구조가 형성되는 것을 확인할 수 있다. 이러한 나노 스핀들 및 그것들이 꽃 잎 모양으로 형상이 변형되는 것은 도 9에 도시된 것과 같이 비틀림각이 29.5° 로 비틀리고 덜 평면적인 제2전구체인 TAPB로 인하여 공유결합성 유기 골격체의 결정이 x축 및 y축을 따라서 충분한 측면성장이 발생한 것에 기인한 것으로 볼 수 있다.
- [0092] 한편, 엉기고 합체되는 동안에 나노 결정의 가지치기가 발생하여 새로운 꽃잎 가지를 형성하게 되는데, 새로운 꽃잎 결정의 결정학적 방향은 모체 꽃잎 결정으로부터 약간 벗어나게 되며, 그 결과 60분 경과 시 꽃잎이 방사상으로 배열되고 꽃 모양의 구조를 형성하게 된다. 이 시점까지 에피택셜 성장은 꽃잎의 길이와 최대 폭을 각각 1400nm 및 200nm까지 증가시켰다. 또한, 가깝게 인접하여 성장한 꽃잎은 그것들이 측면 성장에 기인해 융합됨에 따라서 90분 경과 시 융합된 코어를 형성하게 되며, 도 10에 도시된 것과 같이 120분 경과 시 거의 속이 빈 구형 구조를 형성하며 사라진 것을 확인할 수 있다.
- [0094] 또한, 이러한 관찰 결과는 가역적 이민 결합과 계면에서 헬름홀츠 자유에너지가 최소화되기 위한 오스트발트 숙성(Ostwald ripening)을 통해 설명되며, 구체적으로 내부 결정은 이미 결합의 가역적 반응으로 재용해되고 120분 시점에 계면의 헬름홀츠 자유에너지를 최소화하는 것에 의해 이동해 외측 계면에 재조립됨을 통하여 구의 외벽에 결정돌기가 형성될 수 있다. 이러한 해석은 이미 결합을 환원시켜서 비가역적인 아민 결합을 형성시키는 것을 통해 확인할 수 있는데, 도 11에 도시된 것과 같이 90분 시점에 수소화붕소나트륨을 처리 시 120분 시점으로 경과해도 내부 결정의 재용해 및 속인 빈 중공의 구형 구조로의 형상변형은 발생하지 않는다.
- [0096] 또한, 도 10에 도시된 것과 같이 이민의 가역적 반응에 의해 내부 결정이 재용해되고 이동해 외측 계면에 재조립되고 구의 외벽에 결정돌기가 형성되는 것은 공유결합성 유기 골격체 내 효소의 위치가 내부 보다는 외벽 쪽에 집중될 수 있음을 의미하고, 이를 통해서 효소가 용액 상의 기질과 보다 쉽게 접촉하고 더욱 많은 촉매반응에 관여할 수 있다. 한편, 도 13을 통해서 실제 효소가 내부보다는 외벽쪽에 더 높은 농도로 분포함을 확인할 수 있다.
- [0098] 한편, 제2구현예에서 효소가 포함되지 않고 Tp와 TAPB만으로 형성된 공유결합성 유기 골격체는 도 14에 도시된 것과 같이 꽃잎 모양으로 성장한 결정이 방사상으로 배열되는 것이 제2구현예에 대비해 미약하며, 이에 따라서 구형으로 성장되기 보다는 불규칙하게 배치된 꽃잎 모양이 그 모습을 그대로 가지고 있거나 가까이 인접한 꽃잎 구조끼리 융합이 발생된 구조를 가지며, 120분 경과 시점에서 꽃잎 모양의 구조에 중공이 형성된 것을 알 수 있다. 이러한 결과를 통해서 제2구현예에서 효소는 최종 구현되는 공유결합성 유기 골격체의 형상이 구형이 되도록 하는데 결정적인 영향을 미치는 인자임을 확인할 수 있다.
- [0100] 또한, 제2구현예와 같이 효소를 포함하나 효소를 Tp로 개질시키지 않고 단순 혼합해 구현된 공유결합성 유기 골격체의 경우 도 15에 도시된 것과 같이 구형이 아닌 비정형적인 형상으로 공유결합성 유기 골격체가 형성된 것을 알 수 있고, 이러한 결과를 통해서 알데하이드기를 갖는 제1전구체로 개질된 효소가 꽃잎을 방사상으로 배열시키고 결정을 성장시키는데 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다.
- [0103] *또한, 알데하이드기를 갖는 제1전구체로 개질된 효소를 통해 구현된 공유결합성 유기 골격체는 미개질된 상태로 효소가 공유결합성 유기 골격체 형성성분과 함께 혼합되어 제조된 공유결합성 유기 골격체에 대비해 로딩되는 효소함량에 있어서 큰 차이를 유발하며, 일 예로 Tp로 개질된 GOx와 TAPB가 반응해 형성한 공유결합성 유기 골격체는 효소 로딩량이 40.0%, 고정화 효율이 90%, 활성회복이 62%에 달하나, 미개질된 상태의 GOx가 Tp/TAPB와 혼합되어 구현된 공유결합성 유기 골격체(미개질-GOx@TP-TAPB)는 효소 로딩량이 24.7%, 고정화 효율 55.0%, 활성회복이 35.0%에 불과해 효소 로딩량, 고정화 효율 및 활성 회복에서 큰 차이가 있는 것을 알 수 있다.

- [0105] 상술한 본 발명의 일 실시예에 의한 제조방법으로 구현된 효소를 포함하는 공유결합성 유기 골격체는 이민 기반의 공유결합성 유기 골격체 및 상기 공유결합성 유기 골격체 내부에 포함된 효소를 포함한다.
- [0106] 본 발명의 일 실시예에 의하면 효소가 위치하는 상기 공유결합성 유기 골격체 내부는 공유결합성 유기 골격체의 기공 내부 공간 및 공유결합성 유기 골격체를 이루는 뼈대 내 일 수 있으며, 이에 따라 상기 효소는 공유결합성 유기 골격체를 이루는 뼈대 내 개재된 제1효소와 기공 내부 공간에 위치한 제2효소를 모두 포함할 수 있다. 이는 효소가 공유결합성 유기 골격체를 형성하는 형성성분들과 함께 혼합되는 경우에 공유결합성 유기 골격체를 형성하는 과정에서 효소의 일부는 공유결합성 유기 골격체 형성성분으로 개질이 이루어질 수 있고, 이로 인해서 일부 효소는 공유결합성 유기 골격체 뼈대 내에 개재되도록 내부에 구비될 수 있다.
- [0107] 한편, 공유결합성 유기 골격체 형성성분과 효소가 함께 혼합되어 제조됨에도 깊은 공유용매의 사용으로 인해 효소 활성이 저해되지 않고 반응온도가 낮아 효소의 변성이 방지됨에 따라서 공유결합성 유기 골격체에 매입된 효소는 동일조건에서 평가 시 유리된 효소에 대비해 $k_{cat}/K_m(s^{-1}mM^{-1})$ 이 30% 이상을 만족할 수 있다.
- [0109] 또한, 상술한 제조방법에서 알 수 있듯이, 효소가 제1전구체 또는 제2전구체로 개질된 상태에서 제1전구체 및 제2전구체와 공유결합을 형성함에 따라서 바람직하게는 상기 효소는 일 예로 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 전부가 공유결합성 유기 골격체의 뼈대 내 개재될 수 있다. 또한, 뼈대 내 개재된 효소는 공유결합성 유기 골격체를 이루는 뼈대와 공유결합을 이루며 개재될 수 있으며, 이를 통해서 공유결합성 유기 골격체로부터 효소의 유출이 최소화 또는 방지되며, 공유결합성 유기 골격체 내 로딩되는 효소의 함량을 크게 증가 시키기에 유리하고, 구현된 공유결합성 유기 골격체는 효소가 포함되었음에도 불구하고, 효소가 없는 동일 종류의 공유결합성 유기 골격체에 대비해 기공율, 공경, 비표면적의 변동이 최소화되어 다공성의 특성을 온전히 구비 및 발현할 수 있다.
- [0111] 이에 일 예로 공유결합성 유기 골격체 뼈대 내 효소를 포함하는 공유결합성 유기 골격체는 BET 비표면적이 284 m^2/g 이상일 수 있고, 평균공경이 1.2 ~ 1.5nm일 수 있다.
- [0113] 또한, 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 내 포함된 효소의 로딩량은 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 중량 대비 10 중량% 이상, 다른 일 예로 15중량% 이상, 또는 19중량% 이상 포함될 수 있고, 다른 일 예로 60 중량% 이하로 함유될 수 있으며, 이를 통해서 종래 효소 구비된 공유결합성 유기 골격체 대비 높은 함량으로 효소를 포함할 수 있다.
- [0115] 한편, 상술한 제1구현예에 따른 공유결합성 유기 골격체에 해당하는 Tp개질-GOx@Tp-Pa는 제2구현예에 따른 공유결합성 유기 골격체에 해당하는 Tp개질-GOx@Tp-TAPB에 대비해 제2전구체 내 아민 작용기 개수 차이로 인해서 구조적 안정성에서는 다소 떨어지나, 낮은 K_m , 더 높은 k_{cat} 및 $k_{cat}/K_m(s^{-1}mM^{-1})$ 값을 가질 수 있어서 효소가 공유결합성 유기 골격체로 둘러싸이거나 가려짐에도 효소로의 기질 전달이 덜 제한적일 수 있다. 한편 이러한 결과는 제2구현예에 따른 공유결합성 유기 골격체의 경우 1 ~ 5 μm 에 달하는 커다란 구형의 입자인데 반하여 제1구현예에 따른 공유결합성 유기 골격체의 경우 0.3 ~ 1 μm 로 상대적으로 작은 덩어리를 갖는 직경이 60nm 미만의 섬유-유사 구조로 이루어짐에 따라서 매트릭스 내 기질의 확산 경로가 더 짧은 것에 기인하는 것으로 볼 수 있다.
- [0117] 또한, 상술한 본 발명에 따른 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체는 살균, 안티파울링, 이산화탄소 전환, 바이오 연료전지, 액체 또는 가스 분리막, 바이오센서 등의 분야에 사용되는 각종 물품 및 장치에 포함될 수 있다. 일 예로 상기 물품은 도료, 촉매, 전극 등의 부재일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0118] 또한, 상기 효소가 당산화효소일 경우 자연적 살균제에 해당하는 과산화수소가 당산화효소를 통해 촉매되는 글루코오스의 산화 반응에서 생성됨에 따라서 살균조성물에 포함되어 살균조성물을 구현할 수 있다.

- [0120] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하지만, 하기 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.
- [0121] <실시예 1> - Tp개질-GOx@Tp-Pa
- [0122] 하기의 준비예를 통해서 준비된 염화콜린/우레아 깊은 공융용매 2ml에 GOx 10mg 및 Tp 10.5mg을 혼합한 후 800rpm으로 30분 간 교반시켜서 Tp로 표면이 개질된 GOx를 준비했다. 이후 Pa 8.1mg, Tp 5.5mg을 준비된 Tp로 표면이 개질된 GOx가 분산된 깊은 공융용매에 투입하고 23℃에서 120분간 교반하면서 반응시켜 공유결합성 유기 골격체를 형성시켰다. 이후 탈이온수를 투입해 4℃에서 10000rpm으로 10분간 원심분리해 Tp개질-GOx@Tp-Pa를 수득했고 탈이온수로 4회 세척한 뒤 pH 7인 100mM의 인산나트륨 버퍼용액에 분산시켜 세척된 Tp개질-GOx@Tp-Pa를 보관했다.
- [0123] *준비예
- [0124] 염화콜린 및 우레아를 1:2 몰비가 되도록 혼합한 후 60℃에서 30분간 반응시켜서 투명한 액체를 제조한 후 진공 상태로 60℃ 에서 밤새 건조시켜서 염화콜린/우레아 깊은 공융용매를 제조했다.
- [0125] <실시예 2> - Tp개질-GOx@Tp-TAPB
- [0126] 실시예 1과 동일하게 실시하여 제조하되 Pa 대신에 TABA를 16.7mg 투입해 제조된, pH 7인 100mM의 인산나트륨 버퍼용액에 분산된 Tp개질-GOx@Tp-TAPB를 수득했다.
- [0127] <실시예 3> - 미개질-GOx@Tp-Pa
- [0128] 실시예 1과 동일하게 실시하여 제조하되, GOx를 Tp로 개질시키지 않고 효소가 매입된 공유결합성 유기골격체를 제조했다.
- [0129] 구체적으로 염화콜린/우레아 깊은 공융용매 2ml에 GOx 10mg을 혼합해 30분간 800rpm으로 교반한 후 Tp 16mg 및 Pa 8.1mg을 함께 투입하고 23℃에서 120분간 교반하면서 반응시켜 미개질 GOx@Tp-Pa를 형성시켰다. 이후 탈이온수를 투입해 4℃에서 10000rpm으로 10분간 원심분리해 미개질-GOx@Tp-Pa를 수득했고 탈이온수로 4회 세척한 뒤 pH 7인 100mM의 인산나트륨 버퍼용액에 분산시켜 세척된 미개질-GOx@Tp-Pa를 보관했다.
- [0130] <실시예 4> - 미개질-GOx@Tp-TAPB
- [0131] 실시예 3과 동일하게 실시하여 제조하되 Pa 대신에 TABA를 16.7mg 투입해 제조된, pH 7인 100mM의 인산나트륨 버퍼용액에 분산된 미개질-GOx@Tp-TAPB를 수득했다.
- [0132] <비교예 1> - Tp-Pa
- [0133] 실시예 1과 동일하게 실시하여 제조하되, 효소를 포함시키지 않고 Tp-Pa 공유결합성 유기 골격체를 제조했다.
- [0134] 구체적으로 염화콜린/우레아 깊은 공융용매 2ml에 Tp 10.5mg을 혼합한 후 800rpm으로 30분 간 교반시킨 뒤 Pa 8.1mg, Tp 5.5mg을 함께 투입하고 23℃에서 120분간 교반하면서 반응시켜 Tp-Pa 공유결합성 유기 골격체를 형성 시켰다. 이후 탈이온수를 투입해 4℃에서 10000rpm으로 10분간 원심분리해 Tp-Pa 공유결합성 유기 골격체를 수득했고 탈이온수로 4회 세척한 뒤 pH 7인 100mM의 인산나트륨 버퍼용액에 분산시켜 세척된 Tp-Pa 공유결합성 유기 골격체를 보관했다.
- [0135] <비교예 2> - Tp-TAPB
- [0136] 비교예 1과 동일하게 실시하여 제조하되 Pa 대신에 TABA를 16.7mg 투입해 제조된, pH 7인 100mM의 인산나트륨 버퍼용액에 분산된 Tp-TAPB 공유결합성 유기 골격체를 수득했다.
- [0137] <실험예 1>
- [0138] 실시예 1 ~ 2 및 비교예 1 ~ 2에 따른 공유결합성 유기 골격체에 대해서 반응개시 후 4분, 10분, 20분, 60분, 90분 및 120분 시점에 TEM 사진을 촬영해 그 결과를 도 2(실시예1), 도 3(비교예1), 도 7(실시예2), 및 도 14(비교예2)에 각각 나타내었다.
- [0139] 또한, 실시예1 및 실시예 2에 따른 공유결합성 유기 골격체에 대해서 반응개시 후 4분 경과 시점 및 120분 경과 시점의 TEM 사진을 도 4(실시예1 120분), 도 6(실시예 1 4분)과 도 9(실시예 2 4분) 및 도 10(실시예 2 120

분)에 각각 나타내었다.

- [0140] 또한, 실시예 3 및 4에 따른 공유결합성 유기 골격체에 대해서 반응개시 후 120분 시점의 TEM 사진을 촬영해 그 결과를 도 5(실시예3) 및 도 11(실시예4)에 각각 나타내었다.
- [0141] 또한, 실시예 1 및 실시예 2에 따른 공유결합성 유기골격체에 대해서 Titan Cubed G2 60-300KV (FEI. Company, OR, USA)를 이용해 200kV 조건에서 HAADF-STEM and EDX 맵핑을 수행했고, 그 결과를 도 12(실시예1) 및 도 13(실시예2)에 각각 나타내었다.
- [0142] 먼저, 실시예1, 실시예3 및 비교예 1에 따른 공유결합성 유기 골격체와 관련하여, 실시예 1은 도 2 및 도 6에 도시된 것과 같이 Tp개질-GOx@Tp-Pa는 반응이 시작되고 약 4분 후에 두께가 20 ~ 30인 얇은 섬유 형상의 Tp개질-GOx@Tp-Pa가 형성되며, 도 6에 도시된 것과 같이 제2전구체인 Pa가 평면에 가까움에 따라서 60분까지 z축 방향인 길이방향으로 성장을 계속하면서 꼬여서 두께가 60nm 이하의 긴 길이의 섬유 번들을 형성하고 이 시간 동안에 섬유들이 섬유 번들의 새로운 가치를 형성하기 위하여 가치를 치며 최대 60분까지 서로 교차하고 엉킨 형태를 형성한 뒤 섬유 번들의 교차와 엉김뿐만 아니라 측면 방향으로의 성장이 계속되어 120분 경과 후 교차된 섬유 번들의 네트워크에서 직경이 400 ~ 600nm인 조밀한 덩어리(c lump)가 형성된 것을 확인할 수 있다. 이때 형성된 덩어리 표면은 털이 난 형상을 가지게 되며 섬유번들은 구성 섬유 간에 서로 이격되면서 짧고 털이 난 형상이 될 수 있다. 한편, Tp개질-GOx@Tp-Pa인 공유결합성 유기 골격체는 도 12를 통해 확인할 수 있듯이 효소가 공유결합성 유기 골격체 전 영역에 골고루 분산되어 위치하는 것을 알 수 있다.
- [0144] 한편, 도 3에서 확인할 수 있듯이 비교예 1인 GOx 없이 Tp 및 Pa로 형성된 공유결합성 유기골격체는 Tp-Pa 섬유가 길이방향 및 측면 방향으로 성장하고 꼬여서 반응 시작 후 120분이 경과되었을 때 두께가 100nm를 초과하는 긴 섬유 번들을 형성하는 것을 관찰할 수 있고 실시예 1에 대비해 효소가 포함되지 않음에 따라서 덩어리를 형성하는 엉김은 발생하지 않은 것을 알 수 있다.
- [0146] 또한, 도 4 및 도 5에서 확인할 수 있듯이, 실시예 1(도 4)에서는 다수 개의 큰 덩어리가 관찰되는 반면 실시예 3(도 5)에서는 실시예 1에 대비해 덩어리 개수가 적고, 1개 덩어리 크기도 작은 공유결합성 유기 골격체가 제조된 것을 알 수 있고, 이러한 형상적 차이는 GOx인 효소가 Tp로 개질되었는지 유무에서 기인한다는 것을 확인할 수 있다.
- [0148] 다음으로 실시예 2, 실시예 4 및 비교예 2에 따른 공유결합성 유기 골격체와 관련하여, 도 7 내지 도 9 및 도 10을 통해 확인할 수 있듯이 실시예 2에 따른 Tp개질-GOx@Tp-TAPB는 반응이 시작된 후 4분 경과 시 작은 GOx@Tp-TAPB 입자 용액에서 핵을 형성하고 10분 이내에 빠르게 나노 스핀들(spindle)로 조립되며, 엉기고 합체되어 반응 시작 후 60분까지 길이가 500 ~ 600nm이고 최대 폭이 130nm인 꽃 잎 모양의 구조가 형성되는 것을 확인할 수 있다. 또한, 엉기고 합체되는 동안에 나노 결정의 가지치기가 발생하여 새로운 꽃잎 가치를 형성하게 되는데, 새로운 꽃잎 결정의 결정학적 방향은 모체 꽃잎 결정으로부터 약간 벗어나게 되며, 그 결과 60분 경과 시 꽃잎이 방사 상으로 배열되고 꽃 모양의 구조를 형성하게 되고, 이 시점까지 에피택셜 성장은 꽃잎의 길이와 최대 폭을 각각 1400nm 및 200nm까지 증가시켰으며, 가깝게 인접하여 성장한 꽃잎은 그것들이 측면 성장에 기인해 융합됨에 따라서 90분 경과 시 융합된 코어를 형성했고 120분 경과 시 거의 속이 빈 구형 구조를 형성하며 사라진 것을 확인할 수 있다.
- [0149] 또한, 실시예 2에 따른 공유결합성 유기골격체는 도 13을 통해서 실제 효소가 내부보다는 외벽쪽에 더 높은 농도로 분포함을 확인할 수 있다.
- [0151] 한편, 도 14에 도시된 것과 같이 효소가 포함되지 않고 Tp와 TAPB만으로 형성된 비교예 2에 따른 공유결합성 유기 골격체는 실시예 2와 대비했을 때 꽃잎 모양으로 성장한 결정이 방사상으로 배열되는 것이 크게 미약했고, 구형을 형성하지 못하고 불규칙하게 배치된 꽃잎 모양이 그 모습을 그대로 가지고 있거나 가까이 인접한 꽃잎 구조끼리 융합이 발생한 구조가 관찰되었고, 120분 경과 시점에서 꽃잎 모양의 구조에 중공이 형성된 것을 알 수 있다. 이러한 관찰결과를 통해서 효소가 최종 구현되는 Tp-TAPB 공유결합성 유기 골격체의 형상이 구형이 되

도록 하는데 결정적인 영향을 미치는 인자임을 확인할 수 있다.

[0153] 또한, 도 15를 통해 알 수 있듯이 실시예 4에 따른 미개질-GOx@Tp-TAPA는 효소가 Tp로 개질되지 않고 공유결합성 유기 골격체의 제조과정 내 단순 혼합됨에 따라서 효소를 포함함에도 불구하고 구형이 아닌 비정형적인 형상으로 공유결합성 유기 골격체가 형성된 것을 알 수 있고, 이러한 결과를 통해서 실시예 2와 같이 알데하이드기를 갖는 제1전구체로 개질된 효소가 Tp-TAPB인 공유결합성 유기 골격체를 형성하는 과정에서 꽃잎을 방사상으로 배열시키고 결정을 성장시키는데 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

[0154] <실험예 2>

[0155] 실시예 1~ 실시예 2 및 비교예1 ~ 비교예 2에 따른 공유결합성 유기 골격체에 대하여 하기의 물성을 평가했다.

[0156] 1. 결정구조 분석

[0157] 필립스 X'Pert PW 3040 Powder X-ray Diffractometer (PANalytical, Almelo, Netherlands)를 이용해 Cu K α ($\lambda=1.5418\text{\AA}$) radiation, $1^\circ/\text{min}$ scan speed, and 0.04° step size 조건에서 2θ $2\sim 40^\circ$ 범위에서 분말 XRD 패턴을 측정했고, 그 결과를 각각 도 16(실시예1/비교예1) 및 도 17(실시예2/비교예2)에 나타내었다.

[0160] *도 16 및 도 17을 통해서 확인할 수 있듯이,

[0161] 비교예 1은 2θ 3.7° , 8.9° , 11.7° , 27° 에서 피크를 나타내며, 비교예 2는 2θ 5.4° , 9.4° , 11.5° , 26.9° 에서 피크를 보이는데, 실시예 1 및 실시예 2 역시 비교예 1 및 비교예 2에 대비해 피크 강도가 상대적으로 감소한 것을 제외하고 결정구조에 있어서 유의미한 차이는 없다는 것을 확인할 수 있다.

[0163] 2. BET 비표면적 및 공극 분포 측정

[0164] BET 비표면적은 각각 77K에서 질소 흡착을 통해 BET equation을 이용해 분석하였고 그 결과를 각각 도 18(실시예1/비교예1), 도 19(실시예2/비교예2) 및 표 1에 나타내었다.

[0166] *또한, 기공 직경은 NLDFT(non-local density functional theory) 모델을 사용하여 분석하였고 그 결과를 각각 도 20(실시예1/비교예1), 도 21(실시예2/비교예2) 및 표 1에 나타내었다.

표 1

[0167]	비교예1	실시예1	비교예2	실시예2
BET 비표면적 (m^2/g)	295	284	364	349
기공부피 (cm^3/g)	1.51	1.36	1.1	1.0

[0168] 도 18 내지 도 21 및 표 1을 통해 알 수 있듯이, 효소가 공유결합성 유기 골격체 뼈대 내 개재되도록 구현된 실시예1 및 실시예2의 경우 효소 없이 동일 조건으로 공유결합성 유기 골격체가 구현된 비교예 1 및 비교예 2에 대비해 BET 비표면적, 기공부피 및 공극크기에 있어서 감소가 작은 것을 알 수 있고, 이를 통해 효소가 뼈대 내 개재되었음에도 다공성 구조 변화가 최소화된 것을 알 수 있다.

[0169] <실시예 5> - 미리제조된 COF에 흡착

[0170] 비교예1과 동일하게 실시하여 제조한 Tp-Pa인 공유결합성 유기 골격체를 10mg 당산화효소(GOx)가 혼합된 2ml pH 7 100mM 인산나트륨 버퍼용액에 투입 후 23°C 에서 150분간 교반한 뒤 실시예 1과 동일하게 원심분리 및 세척하여 당산화효소가 흡착된 Tp-Pa 공유결합성 유기 골격체를 제조하였다.

[0172] <실시예 6> - 미리제조된 COF에 흡착

[0173] 비교예2와 동일하게 실시하여 제조한 Tp-TAPB인 공유결합성 유기 골격체를 10mg 당산화효소(GOx)가 혼합된 2mℓ pH 7 100mM 인산나트륨 버퍼용액에 투입 후 23℃에서 150분간 교반한 뒤 실시예 1과 동일하게 원심분리 및 세척하여 당산화효소가 흡착된 Tp-TAPB 공유결합성 유기 골격체를 제조하였다.

[0175] <비교예 3>

[0176] 실시예 1에서 사용된 것과 동일한 당산화효소(GOx) 10mg을 2mℓ pH 7 100mM 인산나트륨 버퍼용액에 혼합하여 유리된 당산화효소(GOx)를 제조하였다.

[0178] <실험예 3>

[0179] 실시예1 ~ 실시예 6 및 비교예 3에 대해 하기의 물성을 평가했다.

[0181] 1. 당산화효소 로딩량, 고정화 효율 및 활성회복

[0182] 실시예 1 ~ 실시예 6에 따른 효소로써 당산화효소를 포함하는 공유결합성 유기 골격체(COF)에 로딩된 효소의 로딩량(중량%), 고정화 효율(%) 및 활성회복(%)을 각각 다음과 같은 식 1 내지 식 3으로 계산했고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[0183] [식 1]

[0184] 효소 로딩량= 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 내 포함된 당산화효소 중량(mg)×100 / 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 중량(mg)

[0185] [식 2]

[0186] 고정화 효율 = [효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조 시 투입된 효소 중량(mg) - 제조 후 제조용액에 남아 있는 효소 중량(mg)]×100 / 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조 시 투입된 효소의 중량(mg)

[0187] [식 3]

[0188] 활성 회복 = [효소 매입형 공유결합성 유기 골격체의 효소 활성 / 효소 매입형 공유결합성 유기 골격체 제조 시 투입된 효소 투입량 기준 효소 활성] × 100

표 2

[0189]

	실시예1	실시예3	실시예5	실시예2	실시예4	실시예6
COF 종류	Tp-Pa	Tp-Pa	Tp-Pa	Tp-TAPB	Tp-TAPB	Tp-TAPB
제조공정상 특징	Tp로 개질된 GOx 투입	미개질 GOx 투입	미리 제조된 Tp-Pa 투입	Tp로 개질된 GOx 투입	미개질 GOx 투입	미리 제조된 Tp-TAPB 투입
효소 로딩량 (중량%)	34.5	19.8	0.1	40.0	24.7	1.92
고정화 효율(%)	75.0	46.1	0.27	90.0	55.0	4.8
활성회복(%)	55.0	28.5	0.2	62.0	35.0	4.3

[0190] 표 2를 통해 확인할 수 있듯이, 실시예 1 ~ 4에 따른 공유결합성 유기 골격체는 실시예 5 ~ 6에 따른 공유결합성 유기 골격체에 대비해 효소 로딩량, 고정화 효율 및 활성회복에서 크게 우수한 것을 알 수 있다.

[0191] 2. 당산화효소의 활성화도 평가

[0192] 실시예 1 ~ 실시예 2 및 비교예 3에 대해 하기의 방법을 통해서 Km, K_{cat} 및 K_{cat}/K_m을 측정 및 평가하였고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[0193] 구체적으로 인산 버퍼용액 내 분산된 시료 100 μL 를 인산나트륨 버퍼 용액(100 mM, pH 7)에 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase)(3.79 mg/mL), TMB (0.576 mg/mL), 및 글루코오스(110 mg/mL)가 혼합된 반응 혼합물 900 μL 에 투입하였다. 이후 UV-Vis 스펙트로미터(UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 655 nm에서 반응 혼합물에서 GOx로 인한 글루코오스의 가수분해로 생성되는 과산화수소가 퍼옥시다아제 하에서 TMB와 반응해 나타나는 흡광도 증가를 측정해 TMB 산화를 모니터링 하였다. GOx 활성도 1 unit은 pH 7.0에서 글루코오스 1 μmol 의 산화를 촉매하기 위한 효소의 양으로써 정의된다. 공유결합성 유기 골격체 내 GOx 총 효소 회복율은 공유결합성 유기 골격체 합성 시 사용된 GOx의 활성도를 100%로 기준해 평가했다. 한편, 글루코오스 농도를 2 ~ 150 mM 범위로 달리한 초기 반응속도로부터 효소 반응속도 파라미터를 결정하기 위하여 Lineweaver-Burk plot이 사용되었다.

표 3

[0194]

	$K_m(\text{mM})$	$K_{cat}(\text{s}^{-1})$	$K_{cat}/K_m(\text{s}^{-1}\text{Mm}^{-1})$
비교예3(유리 GOx)	18.2 ± 2.3	380.4 ± 2.0	20.9 ± 1.6
실시예1(Tp개질-GOx@TP-Pa)	28.9 ± 2.0	359.0 ± 2.4	12.4 ± 0.1
실시예2(Tp개질-GOx@TP-TAPB)	33.5 ± 2.6	354.0 ± 0.7	10.6 ± 0.6

[0195] 표 3을 통해서 확인할 수 있듯이, 실시예 1에 따른 공유결합성 유기 골격체에 해당하는 Tp개질-GOx@TP-Pa는 실시예2에 따른 공유결합성 유기 골격체에 해당하는 Tp개질-GOx@TP-TAPB에 대비해 낮은 K_m , 더 높은 k_{cat} 및 $k_{cat}/K_m(\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1})$ 값을 가지며, 효소로의 기질 전달이 덜 제한적임을 알 수 있다. 이러한 결과는 실시예2에 따른 공유결합성 유기 골격체의 경우 1 ~ 5 μm 에 달하는 커다란 구형의 입자인데 반하여 실시예1에 따른 공유결합성 유기 골격체의 경우 0.3 ~ 1 μm 로 상대적으로 작은 덩어리를 갖는 직경이 60nm 미만의 섬유-유사 구조로 이루어짐에 따라서 매트릭스 내 기질의 확산 경로가 더 짧은 것에 기인하는 것으로 볼 수 있다.

[0196] 3. 열 안정성 평가

[0197] 실시예 1 ~ 2 및 비교예 3에 대한 각각의 시료에 대하여 23 $^{\circ}\text{C}$ 및 50 $^{\circ}\text{C}$ 로 서로 다른 온도조건에서 200rpm으로 웨이킹 시키면서 인큐베이팅 하는 동안 시간에 따른 효소 활성도를 평가했다. 효소 활성도는 각각의 시료에 대한 초기 활성도를 100%로 기준했을 때 각 시간 별 측정된 효소 활성도를 상대적인 비율로 계산해 도 22 및 도 23에 나타내었다.

[0199] 도 20에서 실시예 1 및 실시예 2에 따른 공유결합성 유기 골격체는 23 $^{\circ}\text{C}$ 온도에서 200rpm으로 웨이킹 되는 환경 하에서 60일이 경과해도 초기 활성의 92% 이상을 유지하고 있으나 비교예 3의 유리 GOx의 경우 60일 경과 후 초기 활성의 64.5% 밖에 유지하고 있지 못한 것을 알 수 있다.

[0200] 또한, 도 23에서 실시예 1 및 실시예 2에 따른 공유결합성 유기 골격체는 50 $^{\circ}\text{C}$ 온도에서 200rpm으로 웨이킹 되는 환경 하에서 6시간 경과 시 초기 활성의 73.3% 수준을 유지하고 있으나 비교예 3의 유리 GOx의 경우 6시간 경과 후 초기 활성의 36.1% 밖에 유지하고 있지 못한 것을 알 수 있다.

[0201] 이러한 실험결과를 실시예 1 ~ 2에 따른 공유결합성 유기 골격체 내 효소가 열 및 진동이 가해지는 가혹한 조건에서도 효소 활성 유지에 크게 유리하다는 것을 보여준다.

[0203] 4. pH 안정성 평가

[0204] 실시예 1 ~ 2 및 비교예 3에 대한 각각의 시료를 23 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 pH 4 ~ 10인 버퍼에 투입해 인큐베이팅 후 효소활성을 측정했고, 평가 전 각각의 시료 초기 활성을 100%로 기준해 상대적인 효소 활성 비율로 계산하여 도 24 및 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0205]

	초기 효소활성 대비 상대적 효소 활성 비율(%)	
	pH 4	pH 10
비교예3 (유리 GOx)	71.1	27.9

실시예1 (Tp개질-GOx@TP-Pa)	95.3	65.8
실시예2 (Tp개질-GOx@TP-TAPB)	98.2	71.2

[0206] 도 24 및 표 4를 통해 알 수 있듯이, 실시예 1 및 실시예 2에 따른 공유결합성 유기 골격체는 비교예 3에 대비해 산성 및 알칼리 환경 하에서도 효소 안정성이 우수한 것을 알 수 있다.

[0207] 5. 소화 효소, 수소결합억제제 및 유기용매에 대한 안정성 평가

[0208] 실시예 1 ~ 2 및 비교예 3에 대한 각각의 시료에 대하여 하기 물질들에 대한 안정성을 평가했고, 평가 전 각각의 시료 초기 활성을 100%로 기준해 상대적인 효소 활성 비율로 계산하여 도 25 및 하기 표 5에 나타내었다.

[0210] 먼저 소화 효소에 대한 안정성을 평가하기 위해서 트립신 효소를 시료에 1mg/ml 농도로 처리 후 23℃에서 1시간 경과한 뒤 효소 활성을 측정하였다.

[0212] 다음으로 수소결합억제제(chaotropic agent)에 대한 안정성을 평가하기 위하여 각각의 시료를 6M 우레아에 23℃에서 30분동안 인큐베이션 한 후 효소 활성을 측정하였다.

[0214] 다음으로 유기용매에 대한 안정성을 평가하기 위하여 각각의 시료를 6M 아세톤에 23℃에서 30분동안 인큐베이션 한 후 효소 활성을 측정하였다.

표 5

	초기 효소활성 대비 상대적 효소 활성 비율(%)		
	트립신 처리	우레아 처리	아세톤 처리
비교예3 (유리 GOx)	14	1.4	4.8
실시예1 (Tp개질-GOx@TP-Pa)	85.3	48.1	69.9
실시예2 (Tp개질-GOx@TP-TAPB)	89.2	52.3	75.2

[0216] 도 25 및 표 5를 통해 알 수 있듯이, 실시예 1 및 실시예 2에 따른 공유결합성 유기 골격체는 비교예 3에 대비해 단백질 소화 효소인 트립신이 처리되었음에도 초기 활성 대비 85% 이상의 효소 활성을 유지하고 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 공유결합성 유기 골격체의 기공 크기가 트립신의 크기에 대비해 작아서 당산화효소가 트립신이 촉매하는 가수분해로부터 보호된 결과로 예상된다.

[0217] 또한, 실시예 1 및 실시예 2에 따른 공유결합성 유기 골격체는 비교예 3에 대비해 수소결합억제제인 우레아와 독성 유기용매인 아세톤이 처리되었음에도 효소 안정성이 우수하게 유지되고 있는 것을 알 수 있다. 한편, 트립신과 달리 우레아나 아세톤은 공유결합성 유기 골격체의 기공 내로 유출입이 가능함에도 실시예 1 및 실시예 2에서 효소 안정성이 우수하게 평가된 것은 공유결합성 유기 골격체 내 물리적으로 당산화 효소가 갇히게 되는 구조적 특징과 효소 표면이 공유결합성 유기 골격체 표면에 공유결합을 통해 연결되는 결합 특징으로 인해서 효소의 형태적 이동이 제한되고, 이로 인해서 변성으로부터 효소가 보호된 것으로 예상된다. 더불어 염화콜린/우레아 깊은 공용용매에서 합성되는 동안 효소가 우레아에 노출됨에도 불구하고 높은 활성도가 유지되는 것은 콜린 및 염화 이온과의 수소결합에 기인해서 염화콜린/우레아 깊은 공용용매에서 우레아 분자가 효소 쪽으로 덜 확산되고, 공유결합성 유기 골격체가 형성됨에 따라서 제공되는 보호능의 조합에 기인한 결과로 예상된다.

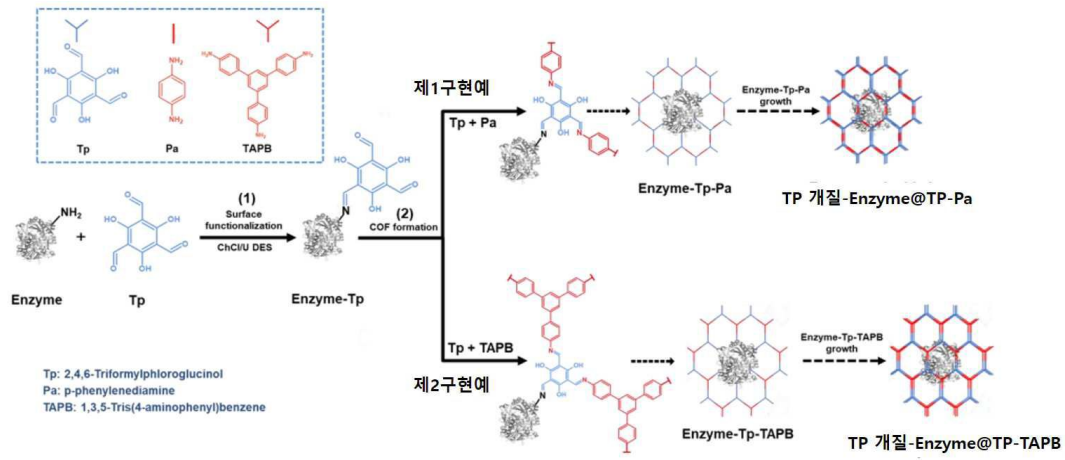
[0219] 한편, 실시예 2가 실시예 1에 대비해 안정성에서 다소 우위에 있음을 알 수 있는데, 이는 공유결합성 유기 골격체를 제조하는데 사용된 제2전구체에서 아민기의 개수에서 실시예 2가 실시예 1보다 1개 더 많은 것에서 유발된 것으로 예상된다.

[0221] 6. 살균활성 평가

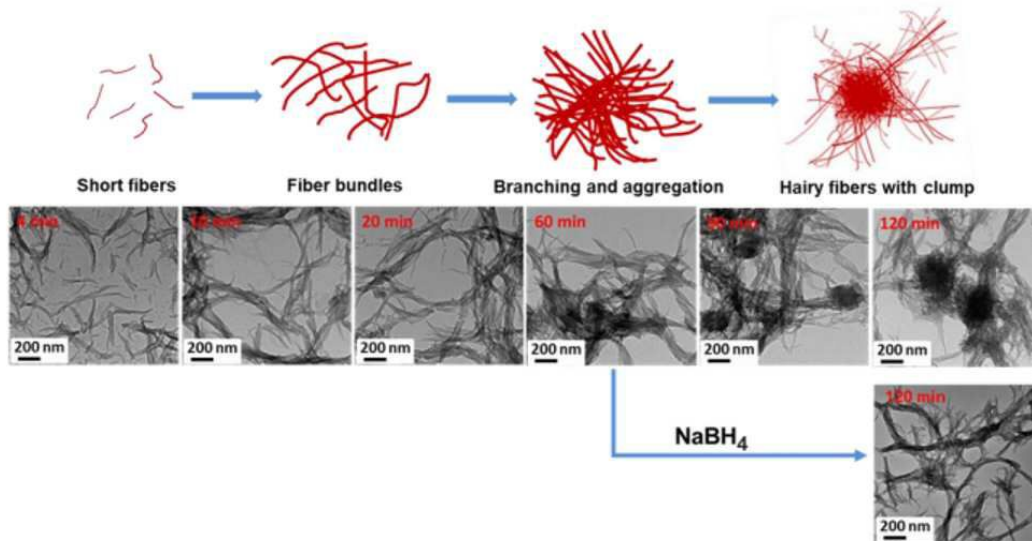
- [0222] 살균활성은 그람-양성균인 *Staphylococcus aureus* (KCTC 3881) 및 그람-음성균인 Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 2513)에 대해 평가했다. 구체적으로 LB(Luria-Bertani) 배지(50 μ L)에 현탁된 배양 전 박테리아 현탁액을 글루코오스를 0.5 % w/v로 함유한 5 mL LB(Luria-Bertani) 배지에 접종시키고, 실시예 1 및 실시예 2에 따른 시료를 각각 0.25 ~ 1 U/mL의 GOx 활성도가 되도록 투입했다. 박테리아의 배양은 37°C에서 12 시간 동안 수행했고, UV-Vis 스펙트로미터 (UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용해 600nm에서 흡광도를 측정해 박테리아 성장이 저해되는 정도를 평가하여 그 결과를 각 박테리아 세포 별로 도 26 및 도 27에 나타내었다.
- [0224] 도 26 및 도 27을 통해 확인할 수 있듯이,
- [0225] 실시예 1 및 실시예 2에 따른 공유결합성 유기 골격체 뼈대 내 개재된 GOx는 *Staphylococcus aureus* 및 *Pseudomonas aeruginosa* 2종의 박테리아에 대하여 0.75 U/mL 이상의 효소 활성도에서 99%를 초과하는 성장억제력을 발현한다는 것을 알 수 있다.
- [0227] 또한, 박테리아 배양물 100 μ L를 아가 플레이트에 옮긴 뒤 37°C에서 24 시간 동안 배양한 후 실시예 1 ~ 2에 대한 살균활성을 확인했고, 배양된 결과를 사진으로 촬영해 도 28에 나타내었다. 이때, 대조군(control)으로써 박테리아 접종 후 아무것도 투입하지 않은 것을 사용했다.
- [0229] 도 28에서 확인할 수 있듯이, 대조군과 대비해 실시예 1 및 실시예 2가 처리된 아가 플레이트에는 2종 박테리아가 완전하게 불활성된 것을 알 수 있다.
- [0231] 또한, 실시예에 따른 공유결합성 유기 골격체의 재사용성을 평가하기 위하여 4°C, 10000 rpm 조건으로 10분간 원심분리해 공유결합성 유기 골격체를 회수했고, 탈이온수로 4회 세척 후 박테리아의 성장 저해 정도를 재평가하기 위하여 신선한 박테리아 배양액에 상술한 것과 같이 동일하게 처리해 성장 저해 정도를 평가했고, 구체적으로 각 사이클 별 상대적인 박테리아 세포 사멸비율은 첫 번째 사이클에서 박테리아의 세포 사멸 수준을 100%로 기준해 계산해 각 박테리아 세포 별로 도 29 및 도 30에 나타내었다.
- [0233] 도 29 및 도 30을 통해 확인할 수 있듯이,
- [0234] 실시예 1 및 실시예 2에 따른 공유결합성 유기 골격체는 5회 재사용되는 경우에도 1회에서의 박테리아 사멸 수준에 대비해 98% 이상의 박테리아 세포 사멸 성능을 발현하는 것을 알 수 있다.
- [0236] 이상에서 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 본 발명의 사상은 본 명세서에 제시되는 실시 예에 제한되지 아니하며, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서, 구성요소의 부가, 변경, 삭제, 추가 등에 의해서 다른 실시 예를 용이하게 제안할 수 있을 것이나, 이 또한 본 발명의 사상범위 내에 든다고 할 것이다.

도면

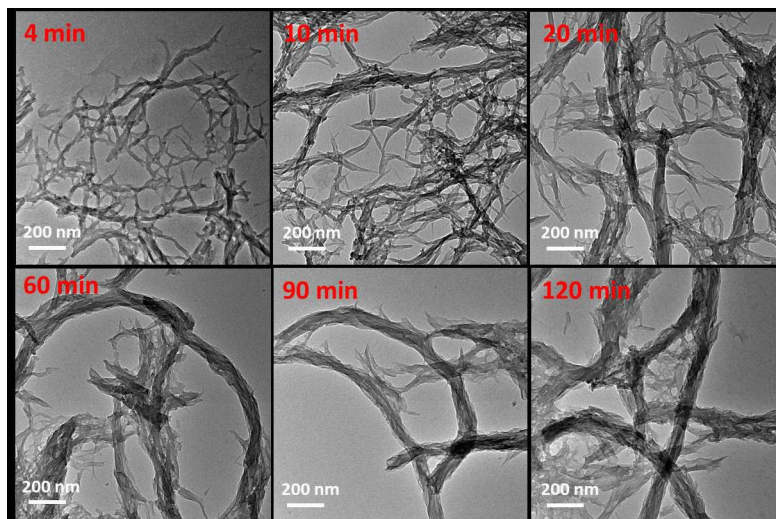
도면1



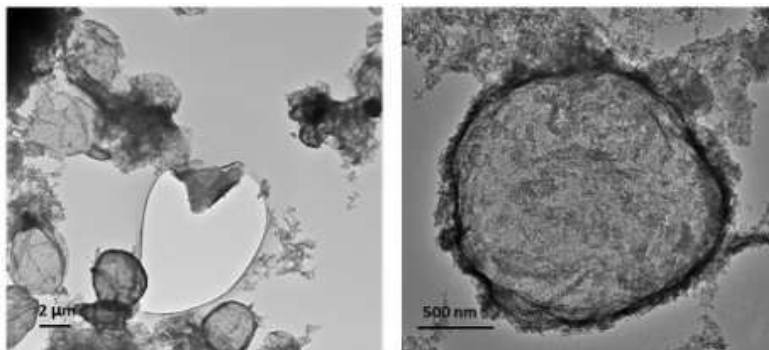
도면2



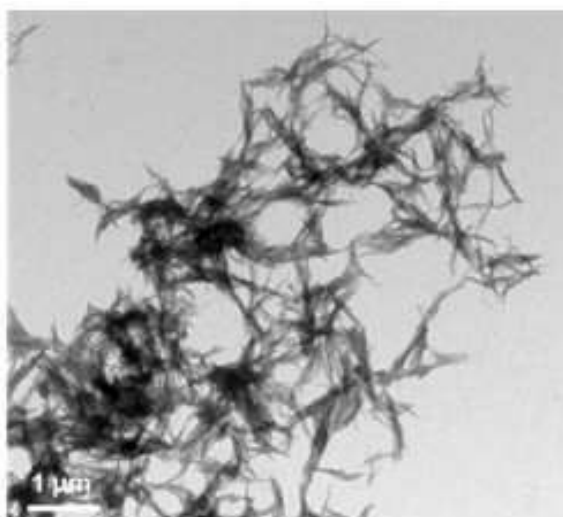
도면3



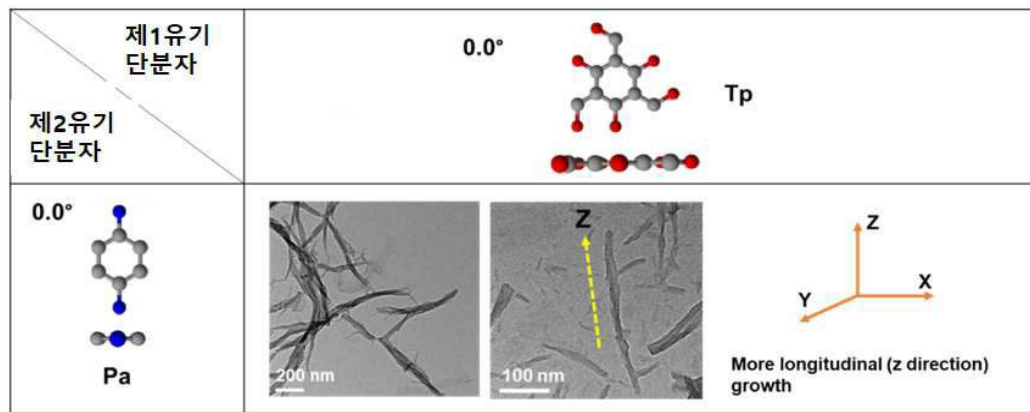
도면4



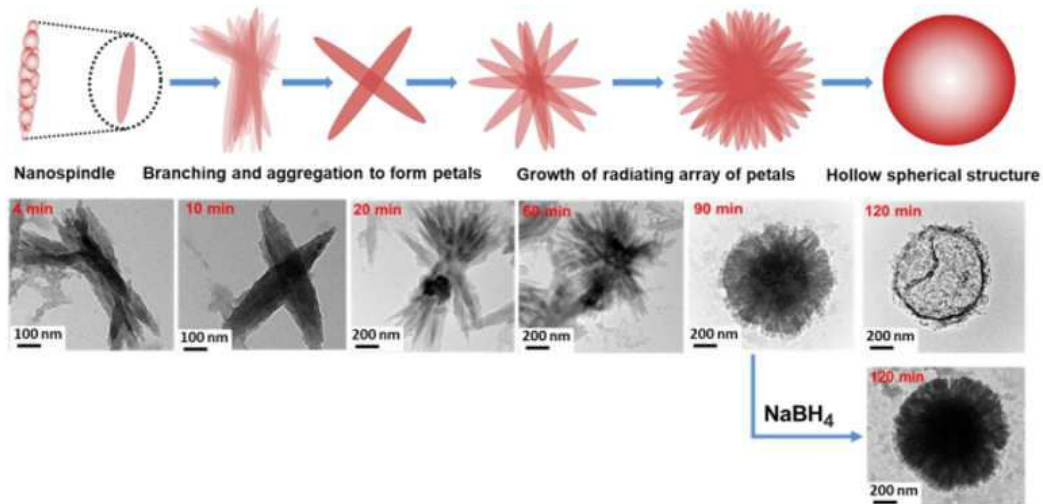
도면5



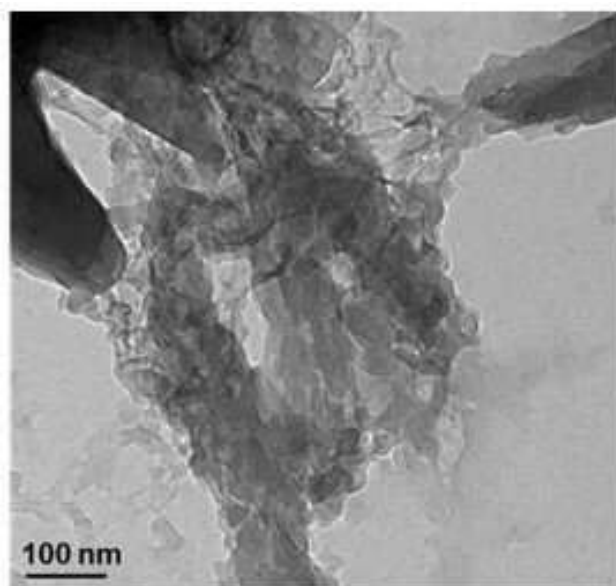
도면6



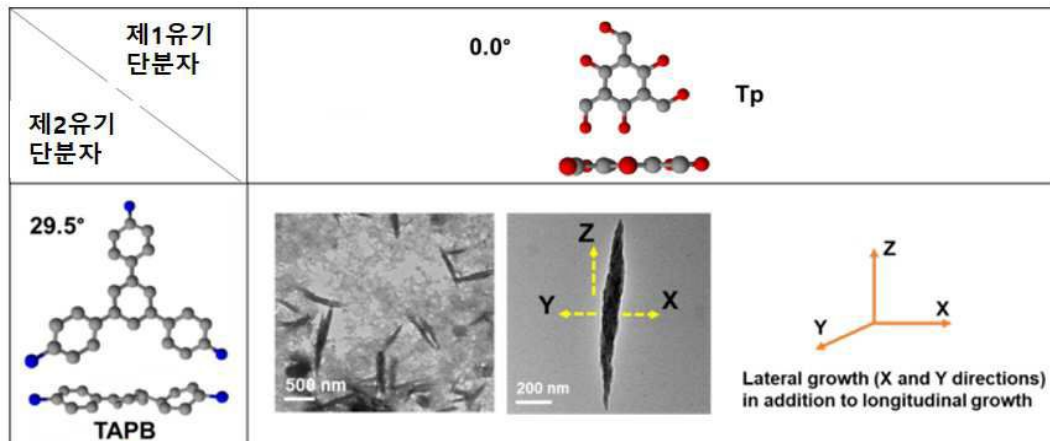
도면7



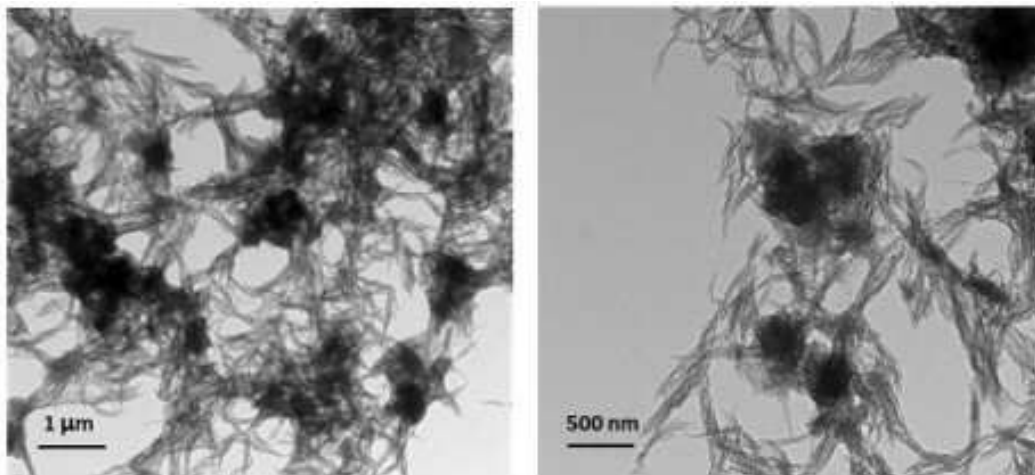
도면8



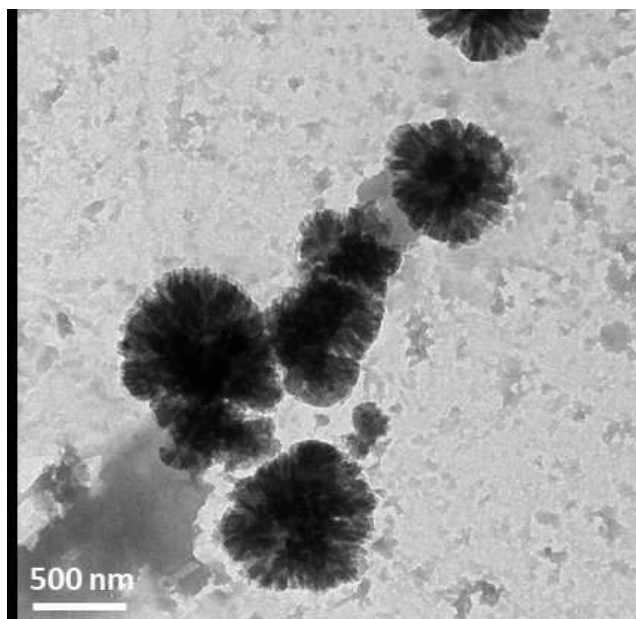
도면9



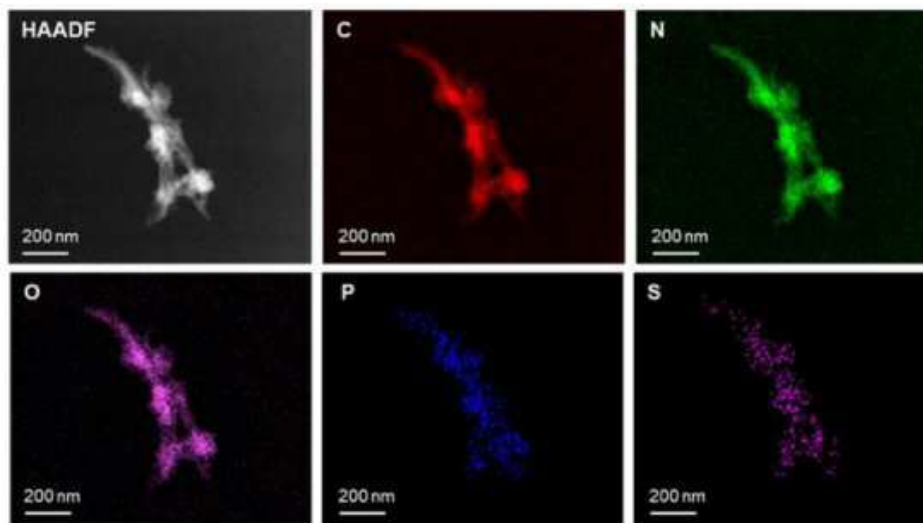
도면10



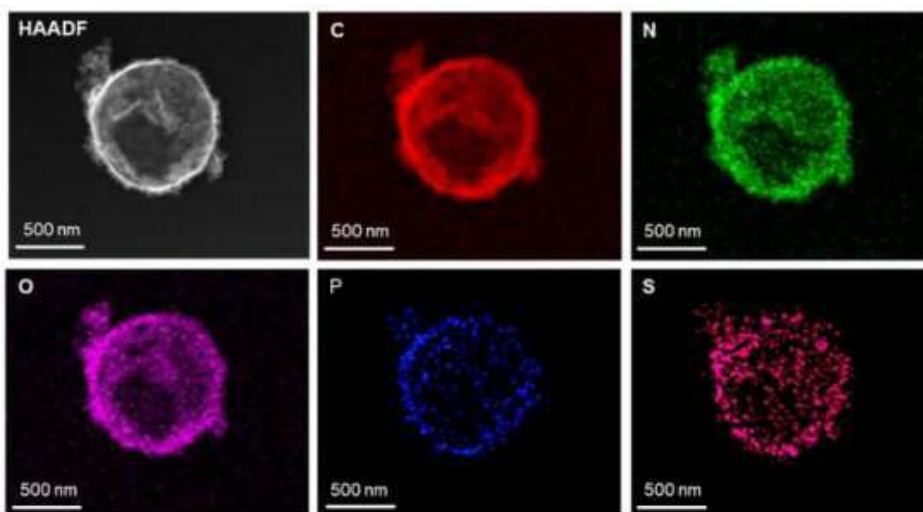
도면11



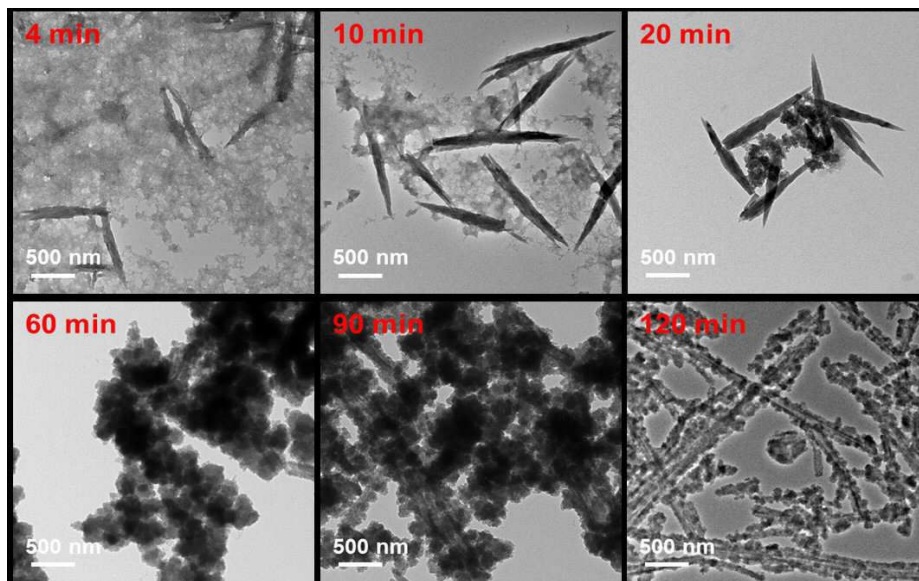
도면12



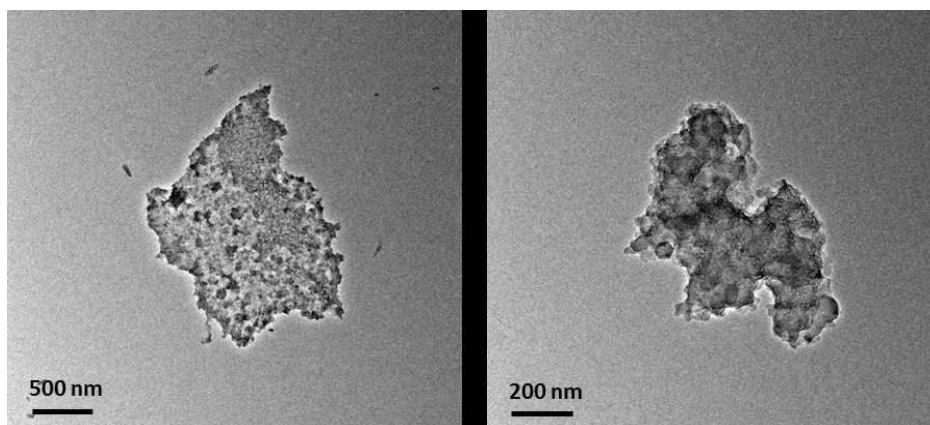
도면13



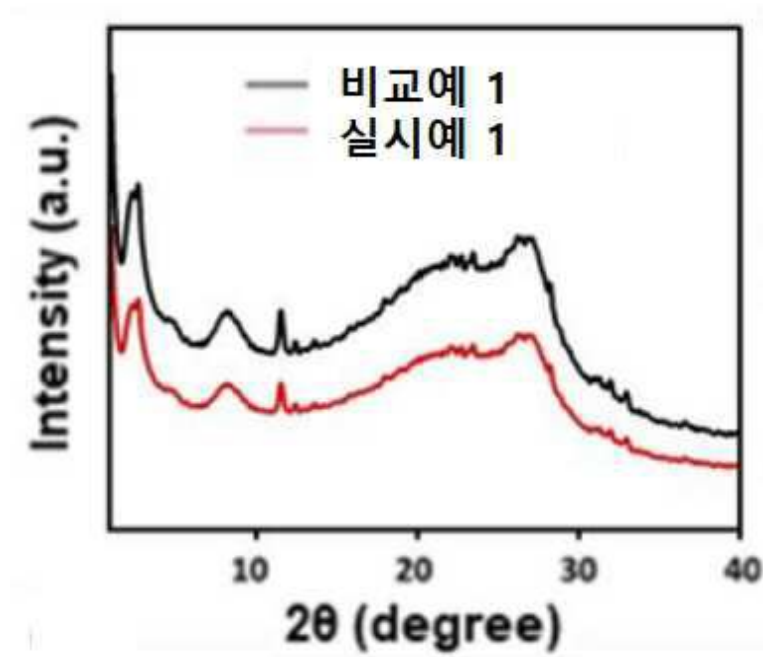
도면14



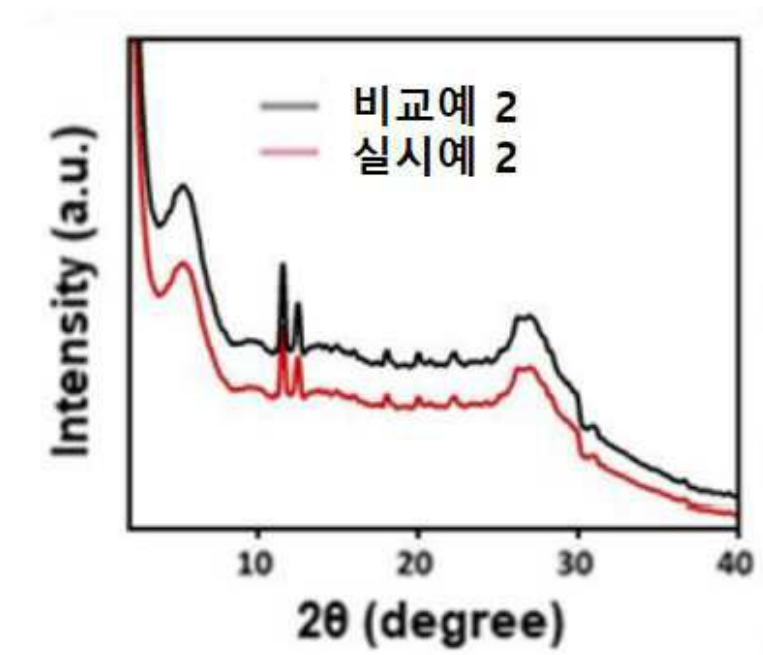
도면15



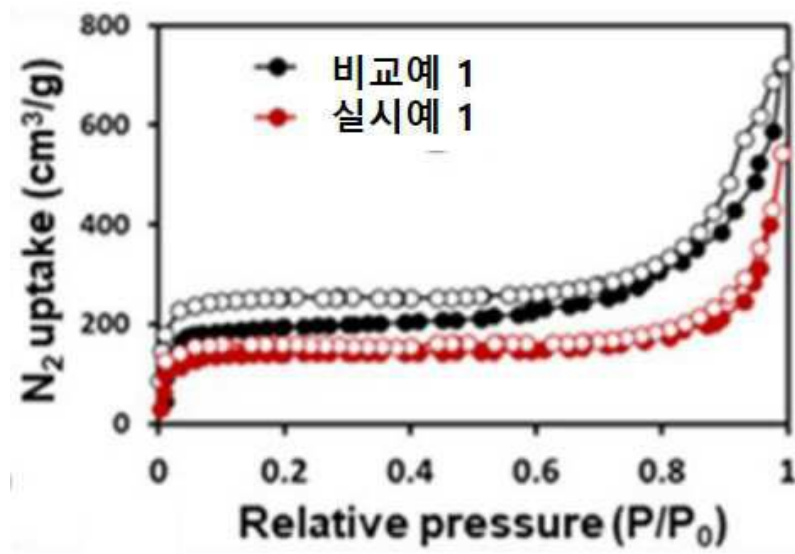
도면16



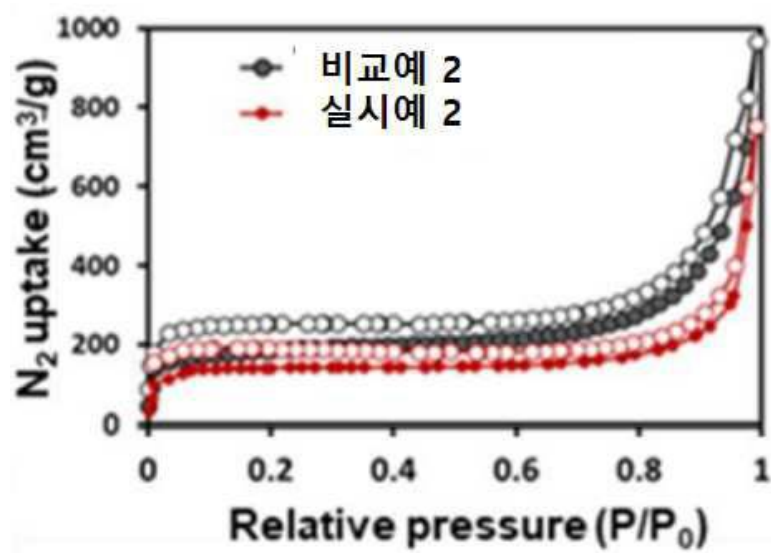
도면17



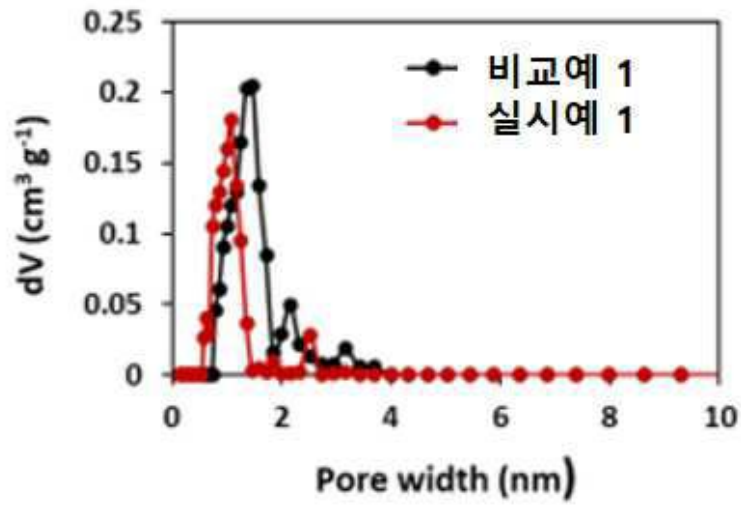
도면18



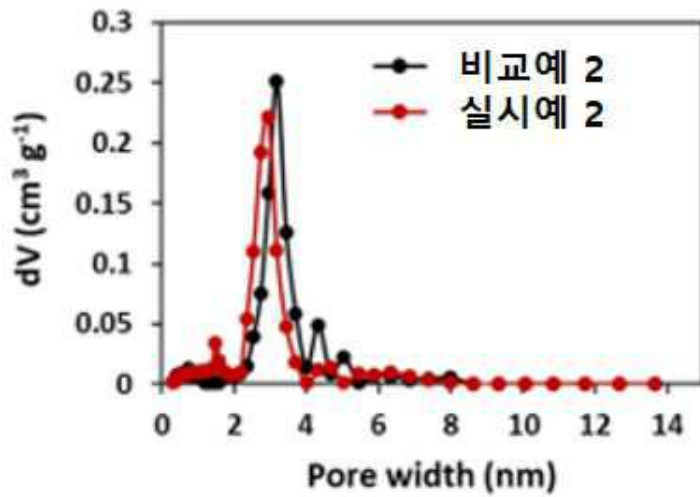
도면19



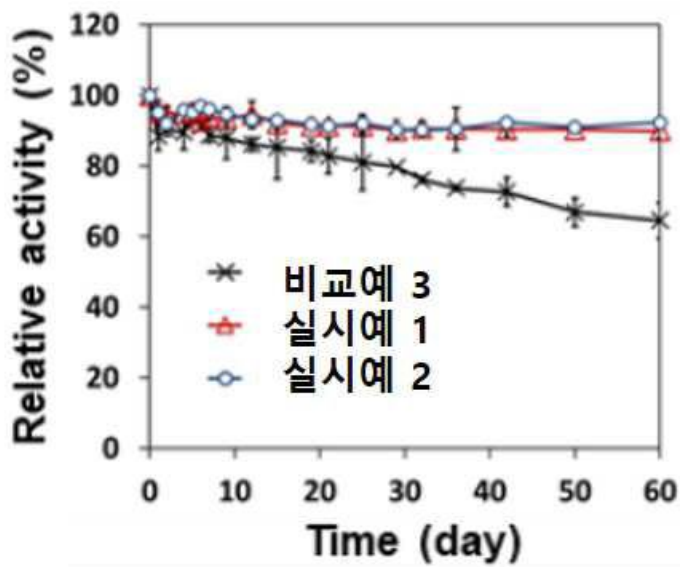
도면20



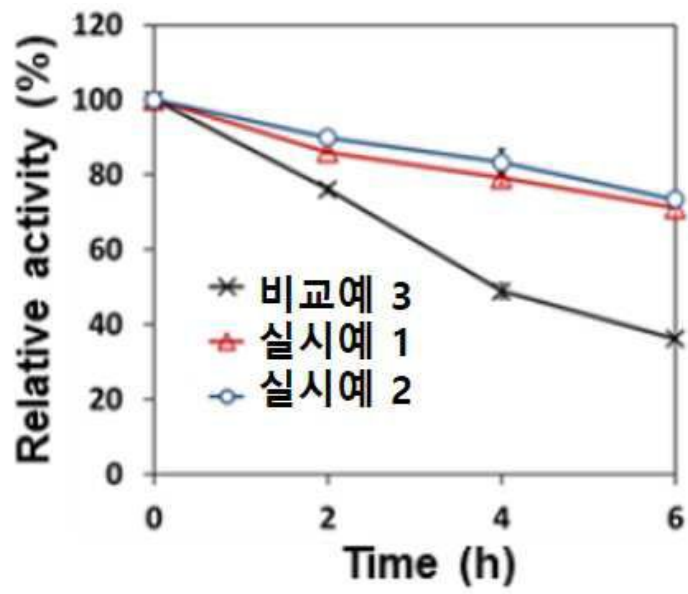
도면21



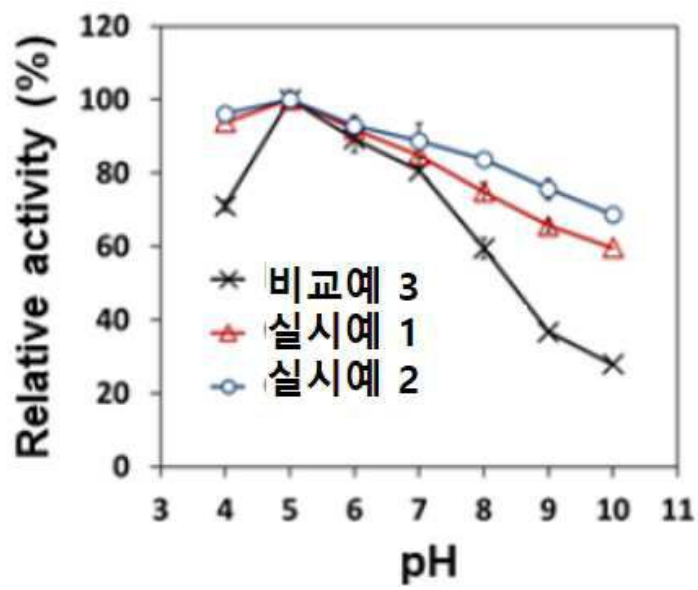
도면22



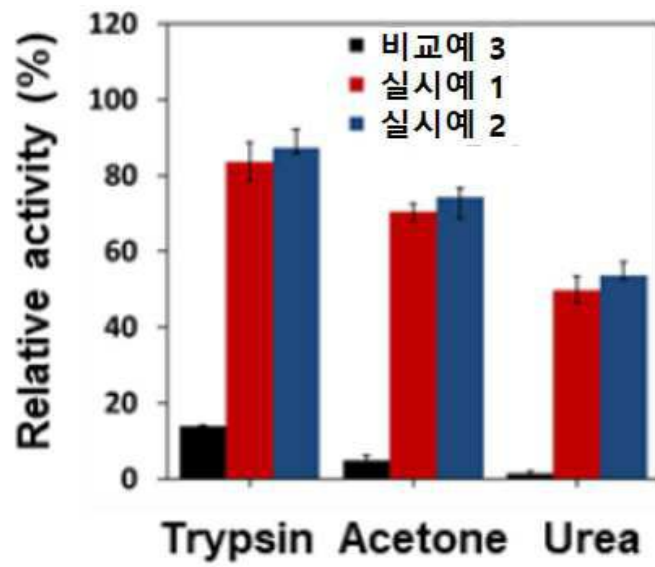
도면23



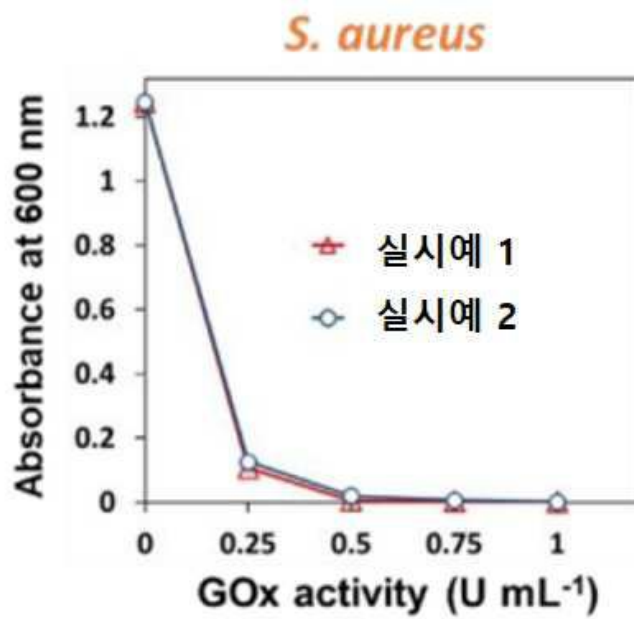
도면24



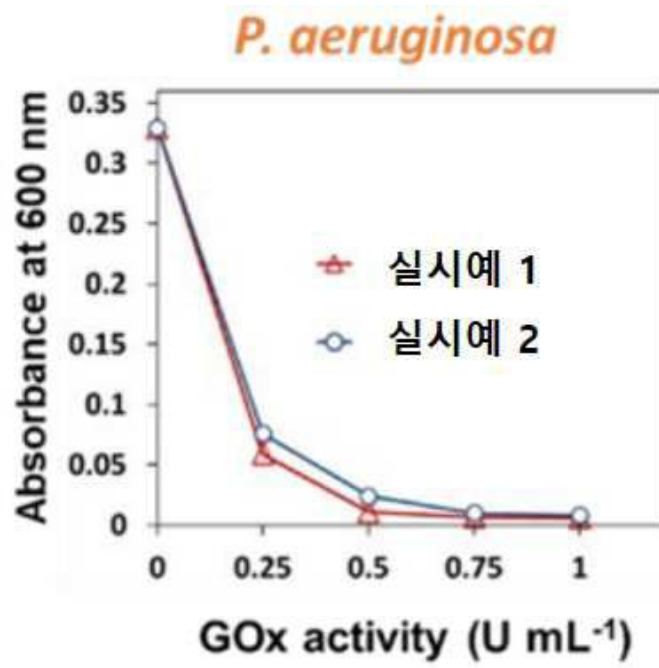
도면25



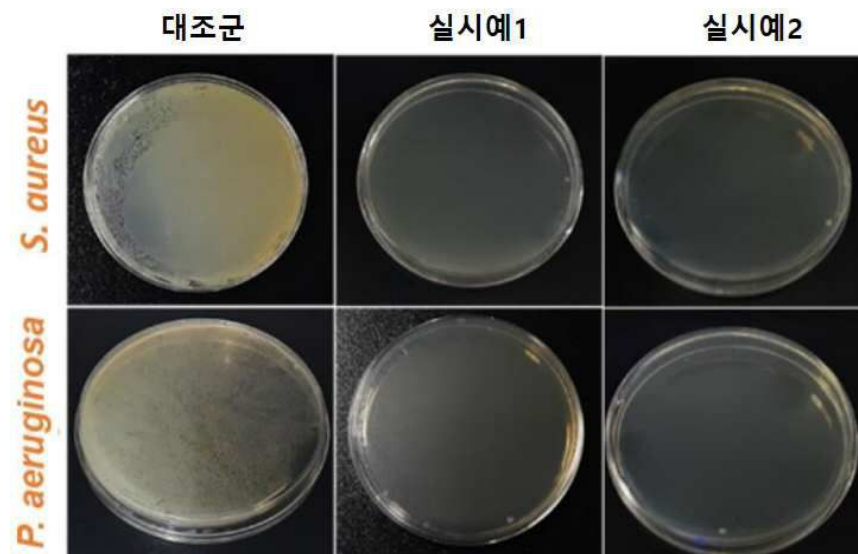
도면26



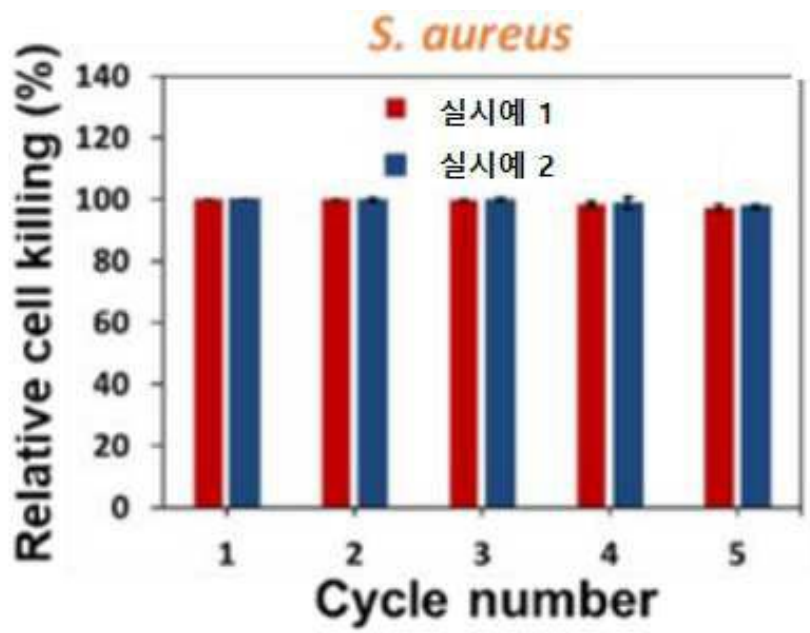
도면27



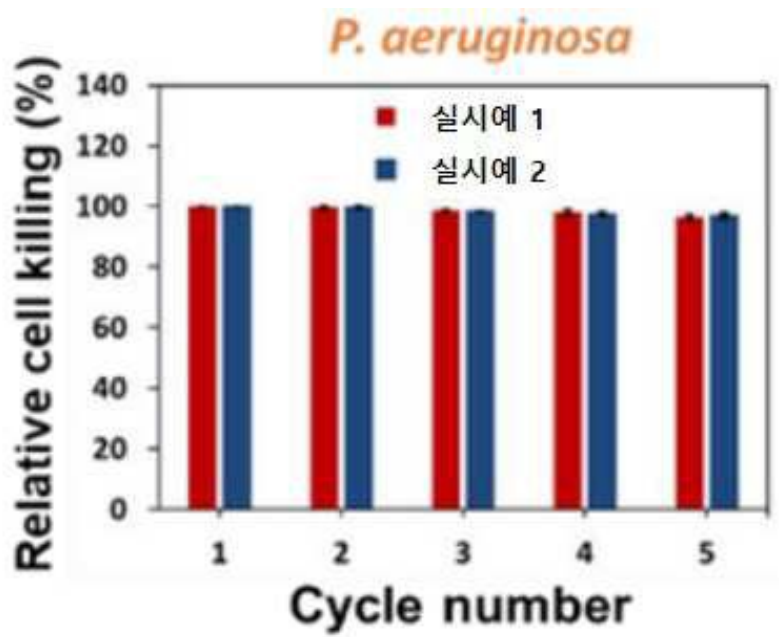
도면28



도면29



도면30



도면31

