



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0040166
(43) 공개일자 2019년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 17/14 (2006.01) C01B 33/18 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 17/14 (2013.01)
C01B 33/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0041488(분할)
(22) 출원일자 2019년04월09일
심사청구일자 2019년04월09일
(62) 원출원 특허 10-2017-0106285
원출원일자 2017년08월22일
심사청구일자 2017년08월22일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
이석중
서울특별시 성북구 성북로4길 52, 209동 1616호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 단백질 및 효소 안정화용 다공성 실리카 담지체, 이의 제조방법 및 용도

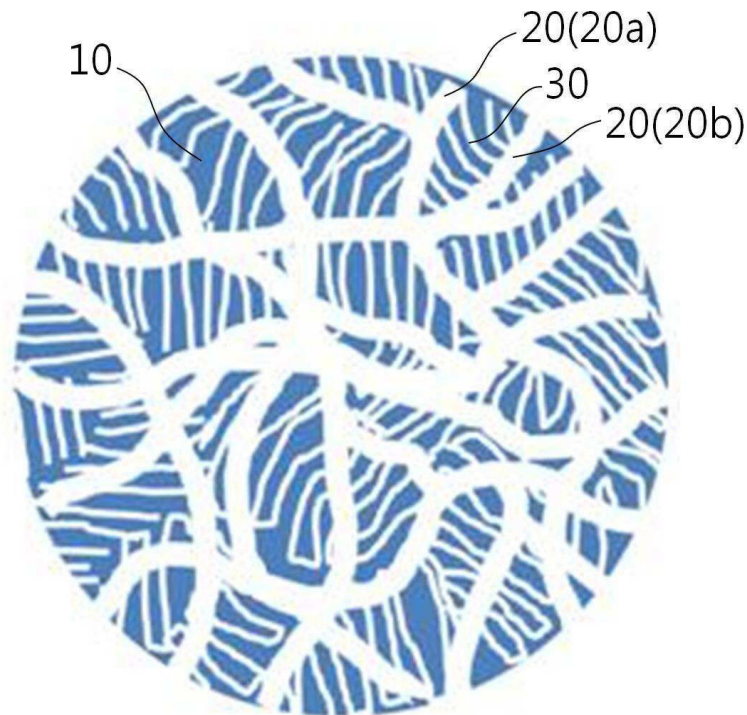
(57) 요약

본 발명은 단백질 및 효소 안정화용 다공성 실리카 담지체, 이의 제조방법 및 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 실리카 담지체는 인체에 무해하고 단백질 및 효소와 반응하지 않는 실리카를 기반으로 하며, 다양한 크기의 단백질 및 효소의 크기에 따라 맞춤형 공간을 제공할 수 있어 단백질 및 효소의 기능을 그대로 유지

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



한 채널 안정화시킬 수 있으며, 또한 다양한 크기의 채널들을 통해 기질의 접근이 용이하여 효소의 반응이 효과적으로 수행될 수 있다.

본 발명에 따른 실리카 담지체의 제조방법을 이용하면, 효소가 담지되어 안정화되는 주채널 또는 중공부, 및 상기 주채널 또는 중공부에 연결되어 기질이 용이하게 주입 및 유동될 수 있는 부채널 또는 채널부 등 다양한 기공들을 구비한 담지체를 용이하게 제작할 수 있으며, 이를 통해 효소 및 단백질을 효과적으로 안정화시킬 수 있는 담지체를 제공할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 11/14 (2013.01)

C01P 2004/32 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1D1A1A09918637

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 능성 포피린의 배위고분자 불균일 촉매 및 차세대 분자전자소재 응용

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

본체;

상기 본체 내부에 형성되어 단백질 또는 효소가 담지되는 중공부; 및

각각 상기 중공부와 소통되어 기질이 주입되어 유동하는 다수의 채널부;를 포함하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 중공부는 구형으로 형성되고,

다수의 상기 채널부는 상기 중공부를 중심으로 원호 방향을 따라 소정의 간격으로 이격 배치되는 것을 특징으로 하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체.

청구항 3

제1항에 있어서,

다수의 상기 채널부 중 적어도 2개 이상은 서로 다른 횡단면적을 갖도록 형성된 것을 특징으로 하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 채널부의 직경은 5 내지 30 nm인 것을 특징으로 하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체.

청구항 5

(a) 에탄올, 메탄올, 프로판올로 이루어진 군에서 선택되는 유기용매를 증류수 및 암모니아 수용액과 혼합 및 교반하여 제1 혼합용액을 제조하는 단계;

(b) 실리카 전구체와 탄소 전구체를 혼합 및 교반하여 제2 혼합용액을 제조하는 단계;

(c) 상기 제1 혼합용액에 실리카 전구체를 첨가 및 교반한 후, 상기 제2 혼합용액을 첨가 및 교반하여 본체 내부에 서로 다른 밀도를 가지는 2중 입자를 수득하는 단계; 및

(d) 상기 수득한 입자를 탄산염 용액에 첨가한 후 가열, 건조 및 하소시켜, 본체 내부에 중공부 및 상기 중공부와 소통되는 다수의 채널부가 형성된 다공성 입자를 수득하는 단계;를 포함하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 실리카 전구체와 탄소 전구체의 혼합비는 1:0.4-0.8인 것을 특징으로 하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 실리카 전구체는 테트라에틸 오쏘실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS)이고,

상기 탄소 전구체는 옥타데실트리메톡시실란(octadecyltrimethoxysilane, C18TMS)인 것을 특징으로 하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 제조방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 탄산염 용액의 농도는 0.3 내지 0.8 M인 것을 특징으로 하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 제조방법.

청구항 9

제1항에 따른 실리카 담지체에 단백질 또는 효소를 담지하는 단계;를 포함하는 단백질 및 효소의 안정화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단백질 및 효소 안정화용 다공성 실리카 담지체, 이의 제조방법 및 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 효소는 모든 생체 기작에 있어서 직접적 촉매 작용을 하거나 정보전달을 하는 물질로서, 그 종류 및 효과가 다양하므로, 의학, 식품, 섬유 등 여러 분야에서 광범위하게 사용되어 왔다.

[0003] 이에, 최근에는 이러한 효소 또는 단백질의 다양한 성질의 활용을 위해 많은 연구들이 진행되고 있으나, 상온(혹은 36 °C 이상의 높은 온도) 및 공기 중, 위산 (pH=2) 등과 같은 극한 조건에서 매우 불안정하기 때문에 효소 및 단백질의 활용은 극히 제한적이라는 한계가 있다.

[0004] 이러한 문제해결의 일환으로 산업적으로 이용되는 고정화 방법 또는 화학적 변형 방법의 적용 및 개선이 진행되고 있는데, 현재까지 이러한 효소 또는 단백질을 고정화 또는 안정화시키는 방법으로 알려진 예는 다음과 같다.

[0005] 미국특허 제4,556,554호는 효소를 기능성 폴리머에 고정 및 결합시키는 방법에 의해 고정화된 효소를 함유하는 피지 억제용 화장료 조성물을 개시하고 있다. 상기 특허에서 제시하는 고정화 방법은 일반적인 고정화 방법으로서, 실제 문제해결을 위한 특징적인 방법을 제시하지 못하고 있다.

[0006] 또한, T. Masunaga 등(IFSCC, Yokohama, A205, p483-501)에 단백분해효소에 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)등을 화학 결합시켜 안정도 및 자극도를 개선하는 방법을 제안하고 있다. 이 방법은 장기간 보존하는데 문제가 있으며, 제조방법 또한 복잡하다.

[0007] 미국특허 제5,230,891호는 텍스트란, 알긴산, 카라게닌 등의 폴리사카라이드와 삼염화시아누르(cyanuric trichloride)를 반응시켜 트리아진-링이 결합된 폴리사카라이드를 얻고, 이를 프로테아제와 반응시켜 프로테아제를 안정화시키는 방법을 언급하고 있다. 그러나 이러한 방법은 여전히 제조방법이 복잡한 문제를 해소하지는 못하였다.

[0008] 유럽특허 제0,803,257 A2호와 일본특허공개 평 4-141097호에 각각 다당류산화에 의한 단백질결합방법으로 효소를 안정화시키고, 이를 의약품 기구의 개선, 반응기 표면의 흡착억제 등에 포괄적으로 응용한 것이 개시되어 있으나, 안정도의 제시가 미비하여 화장품 등과 같은 외용제로서의 직접적인 응용에는 무리가 있다.

[0009] 대한민국등록특허 제10-0283848호는 베타-1,6-분지 베타-1,3 글루칸에 효소 또는 단백질을 결합하여 화장품에 적합한 안정화 효소를 제안하고 있다. 이 방법은 글루칸의 분자량, 3차구조 등 구조적 다양성에 의존하여 안정화 반응의 변화가 매우 심하며 따라서 산업적으로 균일한 안정화 효소를 제조하는 데에 단점을 가지고 있다.

[0010] 이처럼, 효소 또는 단백질을 안정화시키기 위해 산업적으로 이용되는 고정화 방법 또는 화학적 변형 방법의 적용 및 개선에 대한 많은 연구들이 진행되어 왔으나, 전술한 바와 같은 다양한 문제점을 내포하고 있으며, 특히 극한 조건에서 효소 및 단백질의 기능을 그대로 유지한 채 안정화시키기 위한 근본적인 해결방안을 제시한 연구는 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명에서는 인체에 무해하고, 다양한 크기의 단백질 및 효소의 크기에 따라 맞춤형 공간을 제공함으로써 단백질 및 효소의 기능을 그대로 유지한 채 안정화시킬 수 있는 단백질 및 효소 안정화용 다공성 실리카 담지체, 이의 제조방법 및 용도를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0013] 본체; 및 각각 상기 본체 내부에 적어도 2개 이상이 서로 교차하고, 단백질 또는 효소가 주입되어 담지되는 다수의 주채널;을 포함하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체를 제공한다.
- [0014] 본 발명에 따르면, 상기 주채널은 만곡된 형상으로 형성되는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명에 따르면, 상기 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체는 서로 다른 2개의 상기 주채널을 서로 연결하고, 기질이 주입되어 유통하는 다수의 부채널;을 더 포함할 수 있다.
- [0016] 이때, 상기 부채널은 상기 주채널보다 직경이 작게 형성된 것일 수 있다.
- [0017] 또한, 상기 주채널의 직경은 5 내지 30 nm이고, 상기 부채널의 직경은 1 내지 10 nm일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0019] 본체; 상기 본체 내부에 형성되어 단백질 또는 효소가 담지되는 중공부; 및 각각 상기 중공부와 소통되어 기질이 주입되어 유통하는 다수의 채널부;를 포함하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체를 제공한다.
- [0020] 본 발명에 따르면, 상기 중공부는 구형으로 형성되고, 다수의 상기 채널부는 상기 중공부를 중심으로 원호 방향을 따라 소정의 간격으로 이격 배치되는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따르면, 다수의 상기 채널부 중 적어도 2개 이상은 서로 다른 횡단면적을 갖도록 형성된 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명에 따르면, 상기 채널부의 직경은 5 내지 30 nm일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0024] (a) 비이온성 폴리머 및 무기 첨가제를 증류수와 염산의 혼합용액에 첨가하고 1차 교반 과정을 수행하는 단계; (b) 상기 1차 교반 용액에 유기 첨가제를 첨가하여 2차 교반 과정을 수행하는 단계; 및 (c) 상기 2차 교반 용액에 실리카 전구체를 첨가 후 가열, 건조 및 하소시켜 본체 내부에 적어도 2개 이상이 서로 교차하는 다수의 주채널이 형성된 다공성 입자를 수득하는 단계;를 포함하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 제조방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명에 따르면, (d) 세틸트리메틸암모늄브로마이드(CTAB) 또는 세틸트리메틸암모늄클로라이드(CTAC)와 NaOH 또는 KOH의 혼합용액에 상기 수득한 다공성 입자를 첨가한 후 가열, 건조 및 하소시켜 서로 다른 2개의 상기 주채널을 서로 연결하는 다수의 부채널이 형성된 다공성 입자를 수득하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따르면, 상기 비이온성 폴리머는 플루로닉 123, 플루로닉 F123 및 플루로닉 F68로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따르면, 상기 무기 첨가제는 염화칼륨, 염화마그네슘, 염화나트륨, 염화리튬, 염화칼슘 및 염화세슘으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따르면, 상기 유기 첨가제는 테트라메틸벤젠, 테트라에틸벤젠, 자일렌 및 톨루엔으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 이때, 상기 유기 첨가제의 농도는 0.50 mM 이하일 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따르면, 상기 실리카 전구체는 테트라에틸 오쏘실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS)일 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

- [0032] (a) 에탄올, 메탄올, 프로판올로 이루어진 군에서 선택되는 유기용매를 증류수 및 암모니아 수용액과 혼합 및 교반하여 제1 혼합용액을 제조하는 단계; (b) 실리카 전구체와 탄소 전구체를 혼합 및 교반하여 제2 혼합용액을 제조하는 단계; (c) 상기 제1 혼합용액에 실리카 전구체를 첨가 및 교반한 후, 상기 제2 혼합용액을 첨가 및 교반하여 본체 내부에 서로 다른 밀도를 가지는 2중 입자를 수득하는 단계; 및 (d) 상기 수득한 입자를 탄산염 용액에 첨가한 후 가열, 건조 및 하소시켜, 본체 내부에 중공부 및 상기 중공부와 소통되는 다수의 채널부가 형성된 다공성 입자를 수득하는 단계;를 포함하는 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 제조방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명에 따르면, 상기 (b) 단계에서 실리카 전구체와 탄소 전구체의 혼합비는 1:0.4-0.8일 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따르면, 상기 실리카 전구체는 테트라에틸 오쏘실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS)이고, 상기 탄소 전구체는 옥타데실트리메톡시실란(octadecyltrimethoxysilane, C18TMS)일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따르면, 상기 탄산염 용액은 $MgCO_3$, $CaCO_3$, K_2CO_3 또는 Na_2CO_3 용액일 수 있다. 이때, 상기 탄산염 용액의 농도는 0.3 내지 0.8 M일 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0037] 상기 실리카 담지체에 단백질 또는 효소를 담지하는 단계;를 포함하는 단백질 및 효소의 안정화 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명에 따른 실리카 담지체는 인체에 무해하고 단백질 및 효소와 반응하지 않는 실리카를 기반으로 하며, 다양한 크기의 단백질 및 효소의 크기에 따라 맞춤형 공간을 제공할 수 있어 단백질 및 효소의 기능을 그대로 유지한 채 안정화시킬 수 있으며, 또한 다양한 크기의 채널들을 통해 기질의 접근이 용이하여 효소의 반응이 효과적으로 수행될 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 실리카 담지체의 제조방법을 이용하면, 효소가 담지되어 안정화되는 주채널 또는 중공부, 및 상기 주채널 또는 중공부에 연결되어 기질이 용이하게 주입 및 유동될 수 있는 부채널 또는 채널부 등 다양한 기공들을 구비한 담지체를 용이하게 제작할 수 있으며, 이를 통해 효소 및 단백질을 효과적으로 안정화시킬 수 있는 담지체를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따른 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 2에 따른 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 모식도이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예 1에 따른 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 SEM(a, b) 및 TEM 이미지(c)이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예 2에 따른 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 SEM(a, b) 및 TEM 이미지(c)이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예 1에 따른 실리카 담지체의 BET 표면적 분석 및 질소 흡탈착 측정 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 실시예 2에 따른 실리카 담지체의 BET 표면적 분석 및 질소 흡탈착 측정 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 실시예 1, 2에 따른 실리카 담지체에 GFP(green fluorescence protein) 담지 실험 결과를 나타낸 형광현미경 이미지이다.
- 도 8은 본 발명의 실시예 1에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고 상온 건조시킨 후 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.
- 도 9는 본 발명의 실시예 1에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고 상온 건조시킨 후 92일 후에 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.
- 도 10은 본 발명의 실시예 2에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고 상온 건조시킨 후 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.
- 도 11은 본 발명의 실시예 2에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고 상온 건조시킨 후 92일 후에 GFP의 안정도

를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

도 12는 본 발명의 실시예 1에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고, 산성 용액(pH=2)에서 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

도 13은 본 발명의 실시예 2에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고, 산성 용액(pH=2)에서 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

도 14는 본 발명의 실시예 1 혹은 2의 실리카 담지체를 사용하지 않고, GFP 용액을 단독으로 상온 건조시킨 후 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

도 15는 본 발명의 실시예 1 혹은 2의 실리카 담지체를 사용하지 않고, GFP 용액을 단독으로 산성 용액(pH=2)하에서 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어 지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서, 동일한 구성 요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를 가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 또한 "제1", "제2" 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위해 사용되는 것으로, 구성요소가 상기 용어들에 의해 제한되는 것은 아니다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.
- [0043] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.
- [0044] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따른 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 모식도이다.
- [0045] 본 발명의 실시예 1-1에 따른 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체는 도 1에 도시된 바와 같이 본체(10), 각각 상기 본체 내부에 적어도 2개 이상이 서로 교차하고, 단백질 또는 효소가 주입되어 담지되는 다수의 주채널(20)을 포함할 수 있다.
- [0046] 이때, 상기 본체(10)는 인체에 무해하며, 단백질 및 효소와 반응하지 않는 실리카, 즉 SiO₂로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 본체(10) 내부에서는 단백질 또는 효소가 주입되어 담지되는 공간인 주채널(20)이 구비될 수 있는데, 이때, 상기 주채널(20)은 적어도 2개 이상(예를 들어 20a, 20b)이 서로 교차되어 연결되어 있을 수 있다. 이러한 주채널(20)에 단백질 또는 효소가 주입 및 담지되면, 높은 온도, 공기, 산성환경 등의 외부 환경과의 접촉이 차단되는바, 단백질 또는 효소가 기능의 변성 없이 효과적으로 안정화될 수 있다.
- [0047] 이에 더하여, 본 발명의 실시예 1-2에 따른 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체는 도 1에 도시된 바와 같이 서로 다른 2개의 상기 주채널(20)을 서로 연결하고, 기질이 주입되어 유동하는 다수의 부채널(30)을 더 포함할 수 있다. 단백질 또는 효소와 반응할 수 있는 기질들은 상기 주채널(20) 뿐만 아니라, 상기 부채널(30)을 통해서도 주입되어 유동할 수 있는바, 상기 부채널(30)이 구비됨으로써 주채널(20)에 담지된 단백질 또는 효소와 반응할 수 있는 기질의 접근성이 용이해질 뿐만 아니라, 반응을 통해 생성된 생성물 또한 주채널(20) 또는 부채널(30)을 통해 순조롭게 이동할 수 있다는 장점이 있다.
- [0048] 또한, 상기 주채널(20)은 하기 도 1에 도시된 바와 같이 만곡된 형상으로 형성될 수 있다. 이를 통해 주채널(20)에 단백질 또는 효소가 주입 및 담지된 후에 유출되는 것을 효과적으로 방지할 수 있는바, 단백질 또는 효소를 더욱 효과적으로 안정화시킬 수 있다.
- [0049] 또한, 상기 부채널(30)은 단백질 또는 효소가 유출되는 것을 방지하고, 단백질 또는 효소와 반응하는 기질들이 효과적으로 유동될 수 있도록, 상기 주채널(20)보다 직경이 작게 형성된 것일 수 있다.
- [0050] 상기 주채널(20)의 직경은 단백질 또는 효소가 효과적으로 담지된 후 쉽게 유출되지 못하도록 단백질 또는 효소의 크기에 따라 다양하게 변경 가능하나, 바람직하게는 상기 주채널(20)의 직경은 5 내지 30 nm일 수 있다. 또한, 상기 부채널(30)의 직경은 단백질 또는 효소가 쉽게 유출되지 못하도록 하기 위해 주채널(20)의 직경보다는 작은 것이 바람직하며, 단백질 또는 효소와 반응하는 기질들이 쉽게 유동할 수 있도록 기질의 크기에 따라 다양하게 변경 가능하나, 바람직하게는 상기 부채널(30)의 직경은 1 내지 10 nm일 수 있다.

- [0052] 도 2는 본 발명의 실시예 2에 따른 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 모식도이다.
- [0053] 본 발명의 실시예 2에 따른 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체는 도 2에 도시된 바와 같이 본체(100), 상기 본체(100) 내부에 형성되어 단백질 또는 효소가 담지되는 중공부(200); 및 각각 상기 중공부(200)와 소통되어 기질이 주입되어 유동하는 다수의 채널부(300)를 포함할 수 있다.
- [0054] 이때, 상기 본체(100)는 인체에 무해하며, 단백질 및 효소와 반응하지 않는 실리카, 즉 SiO_2 로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 본체(100) 내부에서는 단백질 또는 효소가 주입되어 담지되는 공간인 중공부(200)가 구비될 수 있으며, 상기 중공부(200)와 소통되어 기질이 주입되어 유동하는 다수의 채널부(300)가 함께 구비될 수 있다. 이를 통해 중공부(200) 내에 담지된 단백질 또는 효소들은 높은 온도, 공기, 산성환경 등의 외부 환경과의 접촉이 차단되는바, 단백질 또는 효소가 기능의 변성 없이 효과적으로 안정화될 수 있다. 이에 더하여, 단백질 또는 효소가 주입되는 과정에서 먼저 주입되어 중공부(200)의 중심에 가깝게 담지된 단백질 또는 효소들은 후에 주입되어 중공부(200)의 중심에서 멀게 담지된 단백질 또는 효소나, 중공부(200)에 담지되지 못하고 채널부(300)에 담지된 단백질 또는 효소에 비하여 외부 환경과의 접촉이 더욱 효과적으로 차단되는바, 더욱 효과적으로 안정화될 수 있다. 또한, 상기 채널부(300)들은 상기 중공부(200)와 연결되어 있는바, 단백질 또는 효소와 반응할 수 있는 기질들이 채널부(300)를 통해 주입되어 중공부(200)에 있는 단백질 또는 효소와 반응한 후 다시 채널부(300)를 통해 유출될 수 있는바, 단백질 또는 효소의 기능의 변성 없이도 효과적으로 반응을 수행한 후 생성물과 순조롭게 이동할 수 있다는 장점이 있다.
- [0055] 또한, 상기 중공부(200)는 하기 도 2에 도시된 바와 같이 구형으로 형성될 수 있으며, 본체(100) 외면 전영역에서 단백질 또는 효소의 주입 및 기질의 유출입이 효과적으로 이루어질 수 있도록 다수의 상기 채널부(300)가 상기 중공부(200)를 중심으로 원호 방향을 따라 소정의 간격으로 이격 배치되는 것일 수 있다.
- [0056] 또한, 다수의 상기 채널부(300) 중 적어도 2개 이상은 서로 다른 횡단면적을 갖도록 형성된 것일 수 있다. 이때, 상기 횡단면적은 단백질, 효소 또는 기질이 주입되는 방향에 대해 수직인 단면적을 의미한다. 이처럼, 채널부(300)들이 서로 다른 횡단면적을 가질 수 있는바, 상대적으로 크기가 큰 횡단면적을 가진 채널부(300)를 통해서 단백질 또는 효소가 주입될 수 있고, 상대적으로 크기가 작은 횡단면적을 가진 채널부(300)를 통해서 기질이 주입되도록 함으로써, 기질이 중공부에 담지된 단백질 또는 효소에 효과적으로 접근하도록 할 수 있다.
- [0057] 또한, 상기 채널부(300)는 바람직하게는 원통형으로 형성되어 있는 것이 바람직하며, 이때, 상기 채널부(300)의 직경은 단백질, 효소 및 기질의 크기에 따라 다양하게 변경 가능하나 바람직하게는 5 내지 30 nm일 수 있다.
- [0059] 이처럼, 본 발명에 따른 실리카 담지체는 인체에 무해하고 단백질 및 효소와 반응하지 않는 실리카를 기반으로 하며, 다양한 크기의 단백질 및 효소의 크기에 따라 맞춤형 공간을 제공할 수 있어 단백질 및 효소의 기능을 그대로 유지한 채 안정화시킬 수 있으며, 또한 다양한 크기의 채널들을 통해 기질의 접근이 용이하여 효소의 반응이 효과적으로 수행될 수 있다.
- [0061] 또한, 본 발명에서는 상기 실시예 1에 따른 실리카 담지체를 제조하는 방법을 제공하며, 구체적으로 본 발명의 실시예 1-1에 따른 실리카 담지체의 제조방법은 (a) 비이온성 폴리머 및 무기 첨가제를 증류수와 염산의 혼합용액에 첨가하고 1차 교반 과정을 수행하는 단계; (b) 상기 1차 교반 용액에 유기 첨가제를 첨가하여 2차 교반 과정을 수행하는 단계; 및 (c) 상기 2차 교반 용액에 실리카 전구체를 첨가 후 가열, 건조 및 하소시켜 본체 내부에 적어도 2개 이상이 서로 교차하는 다수의 주채널이 형성된 다공성 입자를 획득하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0062] 또한, 본 발명의 실시예 1-2에 따른 실리카 담지체의 제조방법은 상기 실시예 1-1에 따른 실리카 담지체의 제조방법에 더하여 (d) 세틸트리메틸암모늄브로마이드(CTAB) 또는 세틸트리메틸암모늄클로라이드(CTAC)와 NaOH 또는 KOH의 혼합용액에 상기 획득한 다공성 입자를 첨가한 후 가열, 건조 및 하소시켜 서로 다른 2개의 상기 주채널을 서로 연결하는 다수의 부채널이 형성된 다공성 입자를 획득하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 제조방법을 구체적으로 살펴보면, 먼저 상기 (a) 단계에서는 비이온성 폴리머 및 무기 첨가제를 증류수와 염산의 혼합용액에 첨가하고 1차 교반 과정을 수행한다. 이 과정에서 비이온성 폴리머는 무기 첨가제가 용해된 높은 극성의 용매에서 마이셀컬럼을 형성한다. 이렇게 생성된 마이셀컬럼은 담지체의 주채널을 형성시키는 원인

이 되며, 이후 (c) 단계의 하소과정을 통해 제거됨으로써 담지체의 주채널을 형성하게 된다. 비이온성 폴리머는 농도에 따라 마이셀, 마이셀컬럼, 라멜라 및 역마이셀(reverse micelle)의 단계를 거칠 수 있으므로 비이온성 폴리머가 마이셀컬럼을 이루기 위한 적정 농도가 요구되며, 비이온성 폴리머의 최적 농도는 비이온성 폴리머의 종류에 따라 달라질 수 있으나, 바람직하게는 1.0 내지 1.8 mM 일 수 있다.

[0064] 상기 비이온성 폴리머는 플루로닉 123, 플루로닉 F123 및 플루로닉 F68로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0065] 상기 무기 첨가제는 용해되어 많은 이온을 형성할 수 있는 알칼리금속 또는 알칼리토금속을 바탕으로 하는 할로젠 화합물이 바람직하며, 예를 들어 염화칼륨, 염화마그네슘, 염화나트륨, 염화리튬, 염화칼슘 및 염화세슘으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0066] 다음으로, 상기 (b) 단계는 상기 1차 교반 용액에 유기 첨가제를 첨가하여 2차 교반 과정을 수행한다. 이 과정에서 상기 유기 첨가제는 상기 (a) 단계에서 형성된 폴리머 마이셀컬럼의 내부에 위치하는 소수성 부분과 상호작용함으로써 폴리머가 마이셀컬럼의 직경을 크게 만들어 담지체의 주채널의 크기를 조절하는데 기여한다. 이때, 상기 유기 첨가제의 종류 및 크기에 따라 폴리머 마이셀컬럼과의 상호작용 정도가 달라지기 때문에 요구되는 주채널의 직경에 따라 적절히 선택할 필요가 있으며, 상기 유기 첨가제는 테트라메틸벤젠, 테트라에틸벤젠, 자일렌 및 톨루엔으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 이때, 상기 유기 첨가제의 농도는 요구되는 주채널의 직경에 따라 달라질 수 있으나 바람직하게는 0.50 mM 이하일 수 있다. 상기 유기 첨가제는 전술한 바와 같이 마이셀컬럼의 직경을 크게 만드는 작용을 하기 때문에 유기 첨가제의 농도가 낮을수록 마이셀컬럼의 크기 변화가 작아져 주채널의 크기 또한 작아지게 되며, 유기 첨가제의 농도가 높을수록 마이셀컬럼의 크기 변화가 커져 주채널의 크기 또한 커지게 된다. 다만, 상기 유기 첨가제의 농도가 0.50 mM을 초과할 경우 비이온성 고분자로 이루어진 마이셀컬럼이 파괴되어 주채널을 형성시킬 수 없다는 문제가 있다.

[0067] 다음으로, 상기 (c) 단계는 상기 2차 교반 용액에 실리카 전구체를 첨가 후 가열, 건조 및 하소시켜 본체 내부에 적어도 2개 이상이 서로 교차하는 다수의 주채널이 형성된 다공성 입자를 획득하는 단계이다. 이 과정을 통해 실리카 전구체가 솔-겔 반응(sol-gel process)을 하여 1차적으로 다수의 폴리머 마이셀컬럼을 내부에 포함하는 실리카 입자가 형성되고, 건조 및 하소 과정을 통해 폴리머 마이셀컬럼이 제거되면서 주채널이 형성된 다공성 입자 즉 본 발명의 실시예 1-1에 따른 실리카 담지체가 형성된다. 실리카 전구체를 첨가하기 전에는 (b) 단계를 통해 잘 정렬이 된 폴리머 마이셀컬럼이 형성되어 있고, 이렇게 형성된 폴리머 마이셀컬럼 위에 실리카 전구체가 첨가되면서 빈 공간 사이사이에서 솔-겔 반응(sol-gel process)을 통해 실리카가 형성된다. 이때, 상기 실리카 전구체의 농도는 요구되는 실리카 입자의 크기 및 입자의 두께에 따라 달라질 수 있으나, 바람직하게는 0.2 내지 0.5 mM일 수 있다. 상기 실리카 전구체의 농도가 상기 하한치 미만이면 솔-겔 반응(sol-gel process)이 일어나지 않아 입자를 형성할 수 없고, 상기 상한치를 초과하면 채널을 형성하지 못한 입자가 많이 생성된다는 문제가 있다.

[0068] 또한, 상기 실리카 전구체는 테트라에틸 오쏘실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS)일 수 있다.

[0069] 마지막으로, 상기 (d) 단계는 세틸트리메틸암모늄브로마이드(CTAB) 또는 세틸트리메틸암모늄클로라이드(CTAC)와 NaOH 또는 KOH의 혼합용액에 상기 획득한 다공성 입자를 첨가한 후 가열, 건조 및 하소시켜 서로 다른 2개의 상기 주채널을 서로 연결하는 다수의 부채널이 형성된 다공성 입자를 획득하는 단계이다. 이를 통해 세틸트리메틸암모늄브로마이드(CTAB) 또는 세틸트리메틸암모늄클로라이드(CTAC)이 친수성 및 소수성 부분으로 상호작용을 하는 마이셀컬럼이 형성된다. 형성된 마이셀컬럼은 담지체의 주채널에 침투하고 건조 및 하소과정에서 불완전하게 condense된 실리카의 실라놀(-SiOH)과 반응하게 된다. 불완전하게 condense된 실리카 부분은 수용액에서 극성을 띠기 쉽고 이 부분이 세틸트리메틸암모늄브로마이드(CTAB) 또는 세틸트리메틸암모늄클로라이드(CTAC)의 친수성 부분에서 형성되는 양이온성 질소와 반응하여 천천히 제거되면서 부채널이 형성되며, 최종적으로 본 발명의 실시예 1-2에 따른 다중채널이 구비된 실리카 담지체가 형성된다.

[0071] 또한, 본 발명에서는 상기 실시예 2에 따른 실리카 담지체를 제조하는 방법을 제공하며, 구체적으로 본 발명에 따른 방법은 (a) 에탄올, 메탄올, 프로판올로 이루어진 군에서 선택되는 유기용매를 증류수 및 암모니아 수용액과 혼합 및 교반하여 제1 혼합용액을 제조하는 단계; (b) 실리카 전구체와 탄소 전구체를 혼합 및 교반하여 제2 혼합용액을 제조하는 단계; (c) 상기 제1 혼합용액에 실리카 전구체를 첨가 및 교반한 후, 상기 제2 혼합용액을 첨가 및 교반하여 본체 내부에 서로 다른 밀도를 가지는 2중 입자를 획득하는 단계; 및 (d) 상기 획득한 입자를 탄산염 용액에 첨가한 후 가열, 건조 및 하소시켜, 본체 내부에 중공부 및 상기 중공부와 소통되는 다수의 채널

부가 형성된 다공성 입자를 수득하는 단계;를 포함한다.

- [0072] 상기 제조방법을 구체적으로 살펴보면, 먼저 상기 (a) 단계에서는 에탄올, 메탄올, 프로판올로 이루어진 군에서 선택되는 유기용매를 증류수 및 암모니아 수용액과 혼합 및 교반하여 제1 혼합용액을 제조한다. 이 과정을 통해 혼합용액이 약 염기성을 띠게 되며 솔-젤 반응(sol-gel process)에 최적의 환경을 제공하게 된다. 상기 암모니아 수용액의 농도가 높을 경우 혼합용액을 강한 염기성을 띠게 하여 는 솔-젤 반응(sol-gel process)반응이 단계적으로 일어나는 것을 방해하고 많은 반응을 한 번에 일어나게 하여 실리카입자의 크기가 수십 nm 정도로 작아지게 한다는 문제가 있는바, 상기 암모니아 수용액의 농도는 3-7%가 바람직하다.
- [0073] 다음으로, 상기 (b) 단계에서는 실리카 전구체와 탄소 전구체를 혼합 및 교반하여 제2 혼합용액을 제조한다.
- [0074] 제2 혼합용액에 포함된 실리카 전구체와 탄소 전구체는 서로 혼합되어 있다가 이후 (c) 단계에서 솔-젤 반응(sol-gel process)반응이 일어나게 되어 서로 구형태로 불완전한 실리카 입자를 형성하게 되며, 이렇게 형성된 입자는 긴 탄소사슬이 형성하는 많은 수의 마이셀컬럼이 붙어있는 테더드파티클(tethered particle)을 형성하게 된다. 이때, 테더드파티클을 형성하기 위해서는 실리카 전구체와 탄소 전구체의 적절한 혼합 비율이 중요하게 작용하며, 이때 상기 실리카 전구체와 탄소 전구체의 혼합비는 1:0.4-0.8인 것이 바람직하다. 또한, 상기 탄소 전구체의 농도는 0.2 내지 0.4 mM인 것이 바람직하다. 상기 탄소 전구체의 농도가 상기 하한치 미만이면 채널이 형성되지 않는다는 문제가 있고, 상기 상한치를 초과하면 입자 자체가 형성되지 않는다는 문제가 있다.
- [0075] 상기 실리카 전구체는 테트라에틸 오쏘실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS)이고, 상기 탄소 전구체는 옥타데실트리메톡시실란(octadecyltrimethoxysilane, C18TMS)일 수 있다.
- [0076] 다음으로, 상기 (c) 단계에서는 상기 제1 혼합용액에 실리카 전구체를 첨가 및 교반한 후, 상기 제2 혼합용액을 첨가 및 교반하여 본체 내부에 서로 다른 밀도를 가지는 2중 입자를 수득한다. 구체적으로, 상기 제1 혼합용액에 실리카 전구체가 첨가되어 실리카 입자가 1차로 형성되는데 상대적으로 많은 양의 실리카 전구체가 빠르게 반응함으로써 높은 밀도의 Si-O-Si를 가지는 실리카 입자가 형성된다. 이렇게 생성된 입자 위에 제2 혼합용액이 첨가되어 다량의 마이셀컬럼이 붙어있는 테더드파티클(tethered particle)이 형성되게 된다. 이때 상기 첨가되는 실리카 전구체의 농도는 요구되는 중공부의 크기에 따라 달라질 수 있으나, 바람직하게는 1.0 내지 4 mM일 수 있다. 상기 실리카 전구체의 농도가 상기 하한치 미만이면 이중입자입자가 형성되지 않고, 상기 상한치를 초과하면 입자의 두께가 커져 중공부를 가지는 입자가 만들어지지 않는다는 문제가 있다.
- [0077] 마지막으로, 상기 (d) 단계에서는 상기 수득한 입자를 탄산염 용액에 첨가한 후 가열, 건조 및 하소시켜, 중공부 및 상기 중공부와 소통되는 다수의 채널부가 형성된 다공성 입자를 수득한다. 이때, 상기 탄산염 용액은 $MgCO_3$, $CaCO_3$, K_2CO_3 또는 Na_2CO_3 용액일 수 있다. 예를 들어 상기 탄산염 용액이 Na_2CO_3 용액인 경우, Na_2CO_3 용액은 마일드한 조건에서 Si와 반응하여 Na_2SiO_3 가 되려 하기 때문에 높은 밀도의 Si-O-Si를 가지는 중앙부 1차 입자와 더 효과적으로 반응하게 되고 상기 2중 입자를 중공부를 가지는 실리카 입자로 변화시킨다. 이때, 상기 탄산염 용액의 농도는 0.3 내지 0.8 M인 것이 바람직하다. 상기 탄산염 용액의 농도가 상기 하한치 미만이면 반응이 일어나지 않아 중공부가 형성되지 않는다는 문제가 있고, 상기 상한치를 초과하면 입자가 전부 분해된다는 문제가 있다. 마지막으로 상기 하소 과정을 통해 탄소전구체가 형성한 마이셀컬럼이 연소 되고 중공부와 소통되는 다수의 채널부가 형성됨으로써 본 발명에 따라 본체 내부에 중공부 및 상기 중공부와 소통되는 다수의 채널부가 구비된 실리카 담지체가 형성된다.
- [0079] 이처럼, 본 발명에 따른 실리카 담지체의 제조방법을 이용하면, 효소가 담지되어 안정화되는 주채널 또는 중공부, 및 상기 주채널 또는 중공부에 연결되어 기질이 용이하게 주입 및 유동될 수 있는 부채널 또는 채널부 등 다양한 기공들을 구비한 담지체를 용이하게 제작할 수 있으며, 이를 통해 효소 및 단백질을 효과적으로 안정화시킬 수 있는 담지체를 제공할 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명은 상기 실시예 1 또는 2에 따른 실리카 담지체에 단백질을 담지하는 단계;를 포함하는 단백질 및 효소의 안정화 방법을 제공한다.
- [0083] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을

보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0085] 실시예 1 : 다중 채널을 보유한 실리카 담지체 제조

[0086] P-123(0.8g)과 KCl(2.92g)을 증류수(10 mL)와 진한염산(1.4 mL) 혼합액에 넣고 상온에서 투명해질 때까지 마그네틱 바를 이용해서 교반하였다. 용액이 투명해지면 테트라메틸벤젠(0.62 mL)을 넣고 2시간 동안 천천히 교반시킨 후 TEOS(2.14 mL)를 교반하면서 한방울씩 천천히 첨가하였다. 첨가가 끝나면 10분 동안 빠른 속도로 마그네틱 바를 교반한 후, 55 °C에서 24시간 동안 교반하지 않고 방치한 후, 100 °C에서 24시간 동안 가열하였다. 이후, 침전물을 원심분리기를 이용하여 분리하고 증류수를 이용하여 침전물을 씻어주었으며, 이를 상층액이 투명해질 때까지 반복하였다. 침전물을 60 °C에서 건조시키고, 500 °C에서 6시간 동안 하소시켜 본체 내부에 적어도 2개 이상이 서로 교차하는 다수의 주채널이 형성된 다공성 입자를 수득하였다. 이후, CTAB(10.5 mL, 0.1 M)와 NaOH(1.5 mL, 0.4 M)의 혼합물을 50 °C에서 빠르게 24시간 동안 교반한 후 상온으로 식히고 상기 수득한 다공성 입자(0.3 g)를 첨가 및 빠르게 교반시켰다. 4시간 후 혼합물을 90 °C에서 교반없이 48시간 동안 가열시킨 후 입자를 원심분리기로 분리하고 증류수를 이용하여 입자를 세척하였다. 이후, 100 °C에서 12시간 동안 건조시키고 500 °C에서 5시간 동안 하소시켜, 서로 다른 2개의 상기 주채널을 서로 연결하는 다수의 부채널이 형성된, 본 발명에 따른 실리카 담지체를 수득하였다.

[0088] 실시예 2 : 다중 기공 할로우 실리카 담지체 제조

[0089] 에탄올(61.4 mL), 증류수(20 mL) 및 암모니아 수용액(1.14 mL)을 50 °C에서 마그네틱 바를 이용하여 1시간 동안 교반하여 제1 혼합용액을 준비하였다. 동시에 TEOS(7 mL)와 C18TMS(5 mL)를 상온에서 따로 교반하여 제2 혼합용액을 준비하였다. 상기 제1 혼합용액을 1시간 동안 교반한 후 TEOS(3 mL)를 빠르게 첨가하고 1시간을 추가적으로 교반하였다. 이후 상기 제2 혼합용액을 빠르게 첨가하고 1시간 동안 교반하여 본체 내부에 중공부가 형성된 입자를 수득하였다. 상기 수득한 입자를 원심분리기로 걸러내고 증류수를 이용하여 세척하였다. 이후, 상기 입자를 Na₂CO₃(20 mL, 0.2 M) 용액에 첨가하고 60 °C에서 7시간 동안 교반한 후 원심분리기로 걸러내고 증류수로 세척하였다. 이후, 60 °C에서 12시간 동안 건조시킨 후 550 °C에서 6시간 동안 하소시켜, 상기 중공부와 소통되는 다수의 채널부가 형성된, 본 발명에 따른 실리카 담지체를 수득하였다.

[0091] 실험예

[0092] 1. 실리카 담지체의 TEM 및 SEM 이미지 분석

[0093] 도 3은 본 발명의 실시예 1에 따른 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 SEM(a, b) 및 TEM 이미지(c)이고, 도 4는 본 발명의 실시예 2에 따른 단백질 및 효소 안정화용 실리카 담지체의 SEM(a, b) 및 TEM 이미지(c)이다.

[0094] SEM(a,b) 이미지는 실리콘 웨이퍼에 담지체 샘플을 일정량 올리고 고해상도 주사전자현미경 (HR-SEM)을 통해 분석하였고, TEM이미지(c)는 골드 그리드 (Au grid)에 샘플을 고해상도 투과전자현미경 (HR-TEM)을 이용하여 측정하였다.

[0095] 도 3의 SEM(a,b) 이미지를 통해 구형의 담지체가 잘 형성됨을 알 수 있고, TEM이미지(c)를 통해 담지체 내부에 주채널 및 부채널이 형성되었음을 확인하였다. 또한, 도 4의 SEM(a,b) 이미지를 통해 균일한 크기의 구형의 담지체가 잘 형성됨을 알 수 있고, TEM이미지(c)를 통해 담지체 내부가 비어 있는 중공형상이 형성됨을 확인하였다.

[0097] 2. 실리카 담지체의 BET 표면 분석 측정법

[0098] 도 5는 본 발명의 실시예 1에 따른 실리카 담지체의 BET 표면적 분석 및 질소 흡탈착 측정 결과를 나타낸 그래프이고, 도 6은 본 발명의 실시예 2에 따른 실리카 담지체의 BET 표면적 분석 및 질소 흡탈착 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[0099] BET 실험에서는 약 200 mg의 샘플을 높은 진공을 통해 내부 기공에 존재하는 용매와 같은 불순물을 제거한 후

질소를 채움으로써 기공의 평균 크기 및 기공의 성질 등을 측정하였으며, 본 데이터는 Micromeritics Tristar II instrument (Micromeritics Instrument Corporation, USA)과 BELSORPmini II (MicrotracBEL Corp., Japan) 장비로 77 K에서 측정하였다.

[0100] 도 5의 (a)와 (c)는 실리카 담지체에 주채널만 있는 상태에서 측정한 결과이고 (b)와 (d)는 주채널 및 부채널이 존재하는 담지체를 나타낸다. 도 5의 (a)를 통해 주채널의 평균 직경이 10.6 nm임을 확인하였고, (c)에서는 히스테리시스의 존재를 통해 샘플이 가지고 있는 기공이 매크로포로스(macroporous)한 상태임을 확인하였다. (b)를 통해 다수의 부채널의 형성으로 인해 평균 기공의 크기가 3.3 nm로 감소하였음을 확인하였고, (d)를 통해 다수의 부채널의 형성으로 인해 히스테리시스가 사라지면서 샘플의 성질이 매크로포로스(macroporous)에서 마이크로포로스(microporous)상태로 변화함을 확인하였다.

[0101] 도 4를 통해 기공의 평균 크기가 대략 10 nm 임을 확인하였고, 도 6의 (b)에서는 히스테리시스의 존재를 통해 샘플이 가지고 있는 기공이 매크로포로스(macroporous)한 상태임을 확인하였다.

[0103] 3. GFP 단백질 담지를 통한 단백질 안정화 효과 측정

[0104] (1) GFP 단백질의 담지여부 확인

[0105] GFP(3 mL, 3.3 μ M) 용액에 상기 실시예 1 및 2에 따른 실리카 담지체를 10 mg 첨가하고, 상온에서 24, 32, 48 시간 동안 흔들어 준 후 원심분리기로 분리하고 증류수로 5번 세척하였다. GFP의 담지 여부는 형광현미경을 통해 확인하였다.

[0106] 도 7은 본 발명의 실시예 1, 2에 따른 실리카 담지체에 GFP(green fluorescence protein) 담지 실험 결과를 나타낸 형광현미경 이미지이다. 이를 통해 본 발명에 따른 실리카 담지체를 이용할 경우 24시간 이전에 GFP의 담지가 충분히 이루어짐을 확인하였다.

[0108] (2) 상온 및 공기 중에서 실리카 담지체에 담지된 GFP 단백질의 안정도 확인

[0109] 도 8은 본 발명의 실시예 1에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고 상온 건조시킨 후 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

[0110] 도 9는 본 발명의 실시예 1에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고 상온 건조시킨 후 92일 쯤에 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

[0111] 도 10은 본 발명의 실시예 2에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고 상온 건조시킨 후 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

[0112] 도 11은 본 발명의 실시예 2에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고 상온 건조시킨 후 92일 쯤에 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

[0113] 도 14는 GFP를 본 발명에 따른 담지체에 담지하지 않고 상온 건조시킨 후 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

[0114] 도 14를 통해 높은 농도의 GFP가 상온 건조에서 48시간 후에 그 성질을 완전히 잃어 버려 형광이 없어짐을 확인하였다. 이처럼, 일반적으로 단백질이나 효소들이 상온 건조 조건에서 그 성질을 잃어 버리는 것과 달리 도 8 내지 도 11을 통해 본 발명에 따른 실리카 담지체를 이용할 경우 GFP가 상온 건조 후 92 일까지 그 성질이 보존되어 효과적으로 안정화됨을 확인하였다.

[0116] (3) 산성 조건하에서 실리카 담지체에 담지된 GFP 단백질의 안정도 확인

[0117] 도 12는 본 발명의 실시예 1에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고, 산성 용액(pH=2)에서 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

[0118] 도 13은 본 발명의 실시예 2에 따른 실리카 담지체에 GFP를 담지하고, 산성 용액(pH=2)에서 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

[0119] 도 15는 GFP를 본 발명에 따른 담지체에 담지하지 않고 산성 용액(pH=2)에서 시간에 따른 GFP의 안정도를 나타내는 형광현미경 이미지이다.

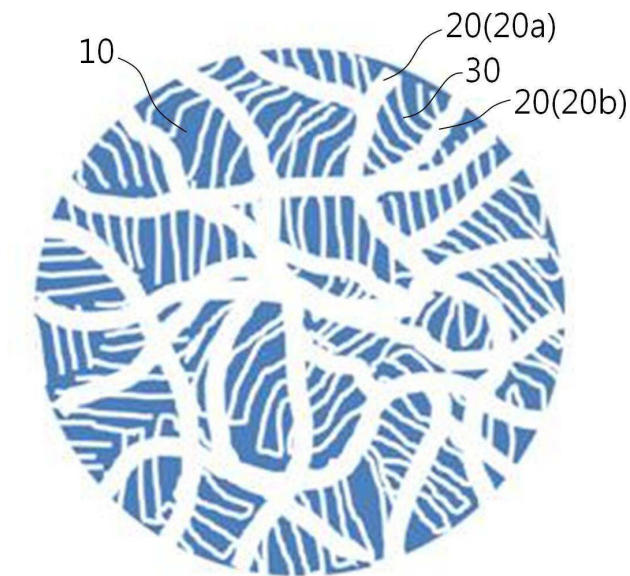
[0120] 도 15를 통해 높은 농도의 GFP가 산성 용액(pH=2)에서 10분 미만의 시간에 그 성질을 완전히 잃어 버려 형광이 없어짐을 확인하였다. 이처럼, 일반적으로 단백질이나 효소들이 산성 조건에서 그 성질을 잃어 버리는 것과 달리 도 12 및 도 13을 통해 본 발명에 따른 실리카 담지체를 이용할 경우 GFP가 산성 용액(pH=2)에서 5 시간까지 그 성질이 보존되어 효과적으로 안정화됨을 확인하였다.

부호의 설명

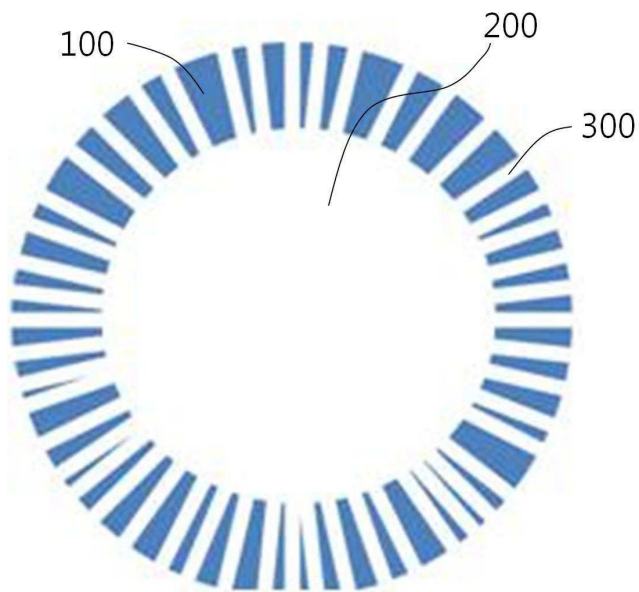
[0121] 10: 본체 20 : 주채널
30: 부채널 100: 본체
200: 중공부 300: 채널부

도면

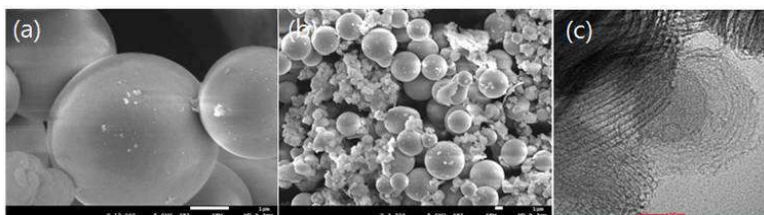
도면1



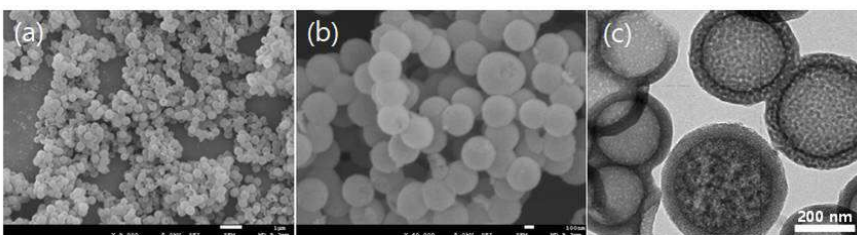
도면2



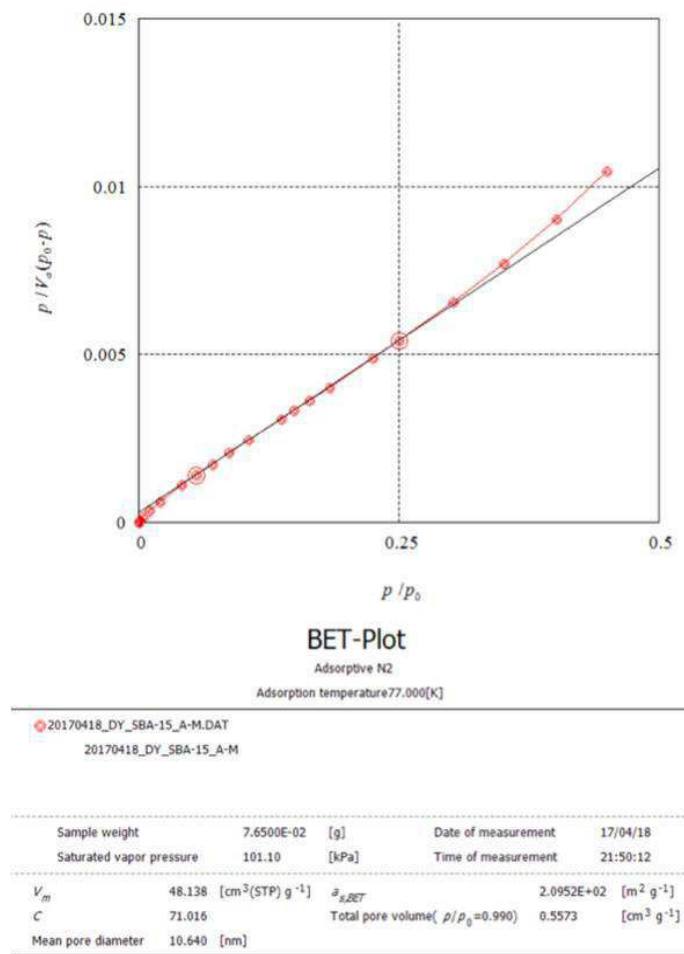
도면3



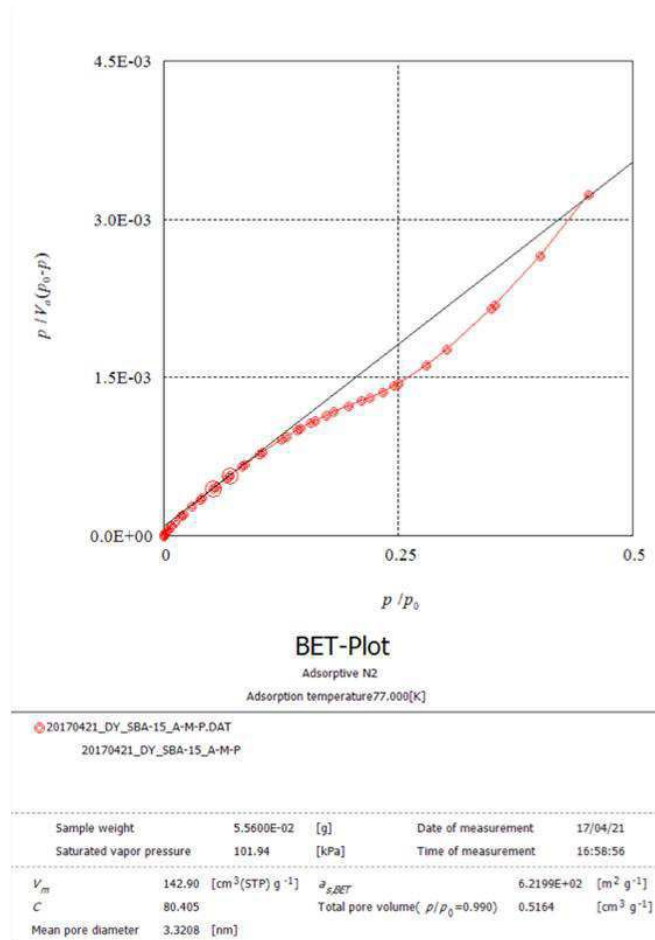
도면4



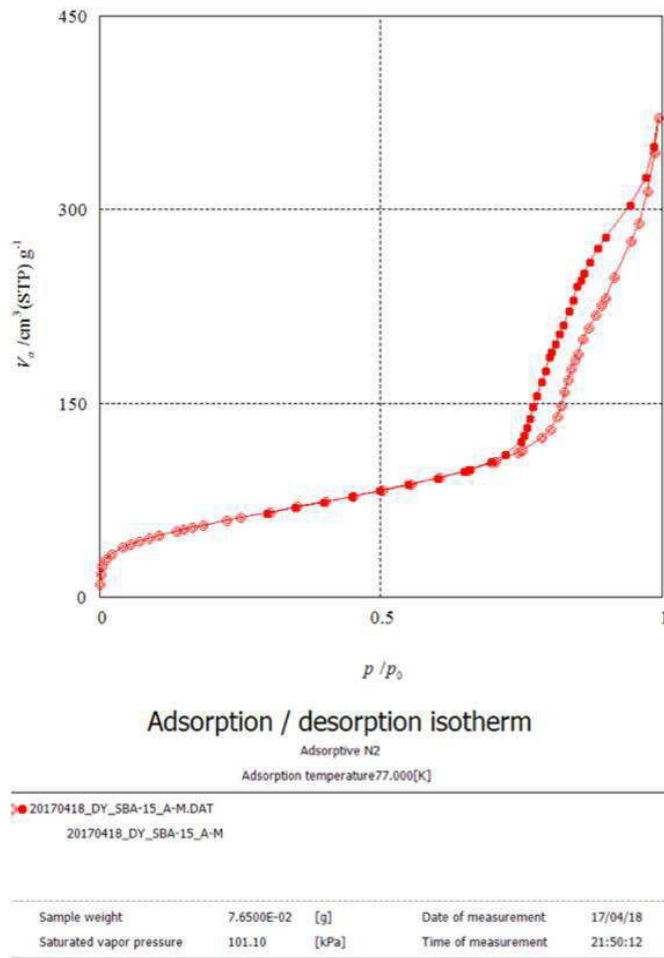
도면5a



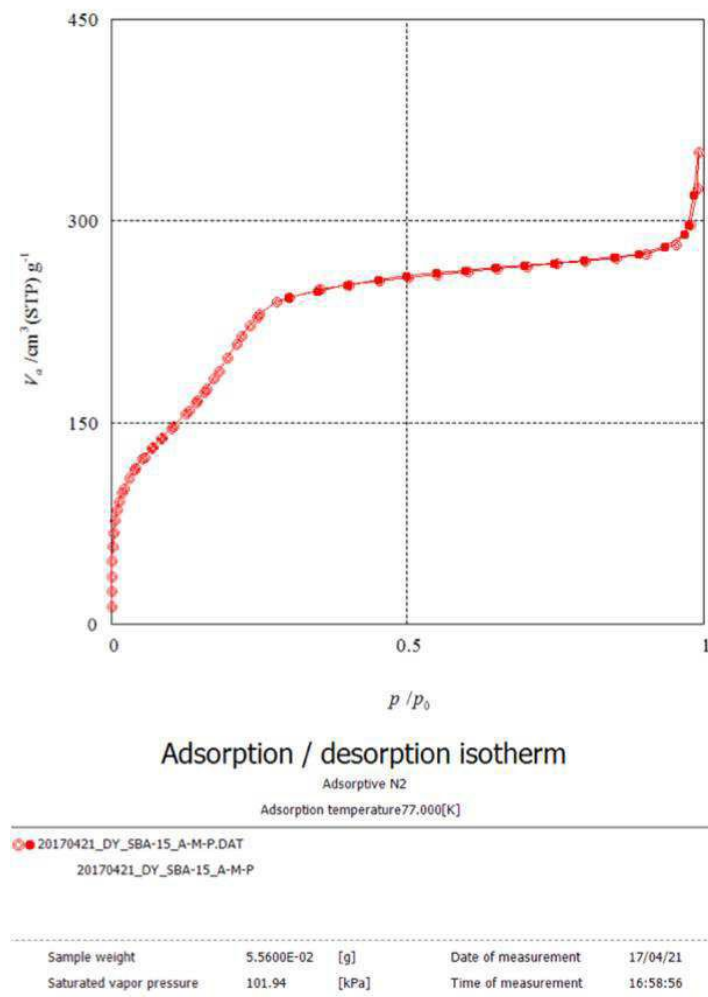
도면5b



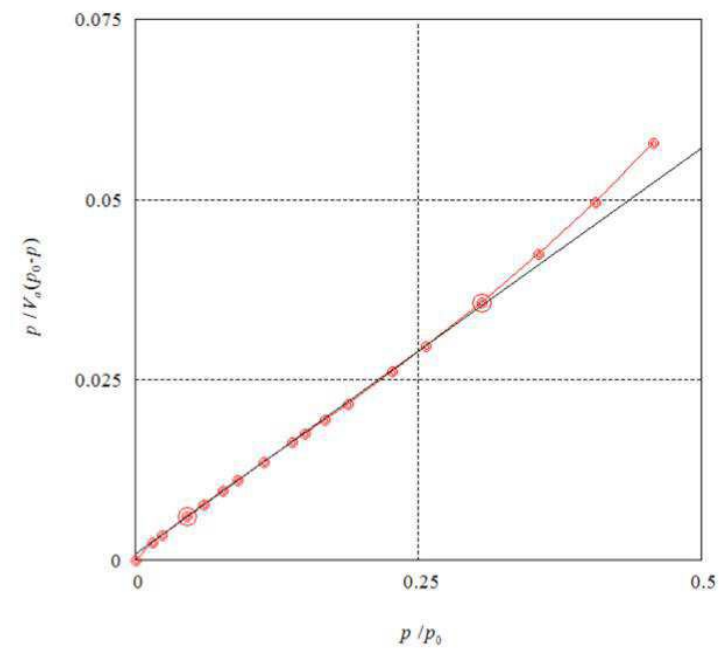
도면5c



도면5d

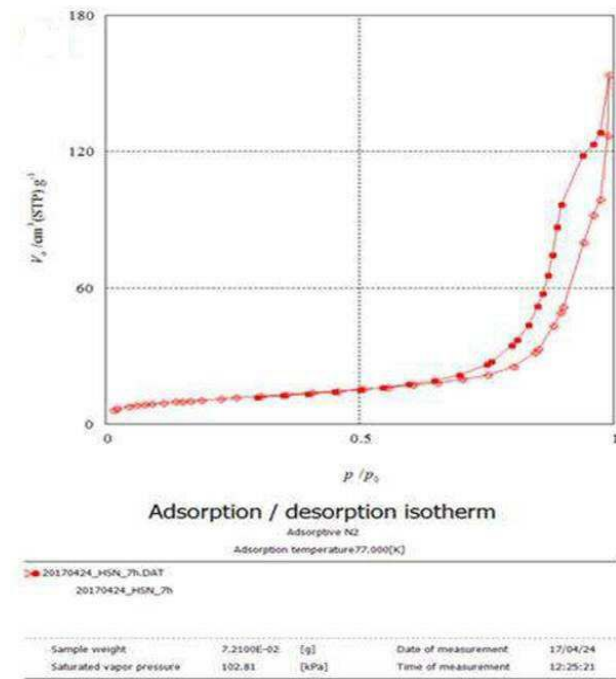


도면6a



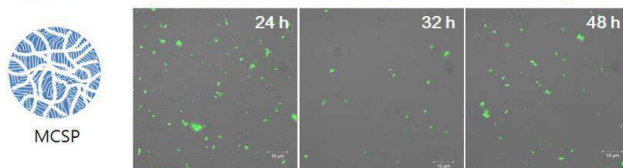
20170424_HSN_7h.DAT				
20170424_HSN_7h				
Sample weight	7.2100E-02	[g]	Date of measurement	17/04/24
Saturated vapor pressure	102.81	[kPa]	Time of measurement	12:25:21
V_m	8.8217	[cm ³ (STP) g ⁻¹]	$a_{s,BET}$	3.8396E+01 [m ² g ⁻¹]
C	127.70		Total pore volume($p/p_0=0.990$)	0.2256 [cm ³ g ⁻¹]
Mean pore diameter	23.498	[nm]		

도면6b

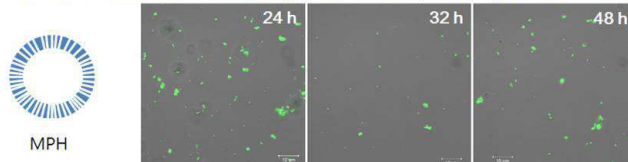


도면7

다중 채널 실리카 파티클(multi-channel silica particle, MCSP) in GFP 용액(3.3 μ M)



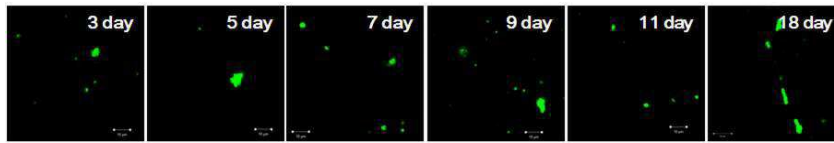
다중 기공 할로우 실리카 파티클(multi-pore hollow silica particle, MPH) in GFP 용액(3.3 μ M)



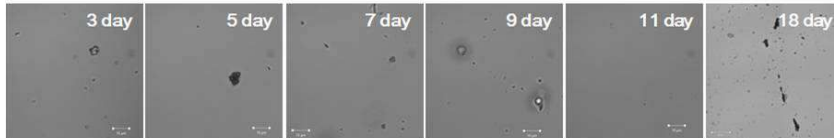
Scale bar : 10 μ m

도면8

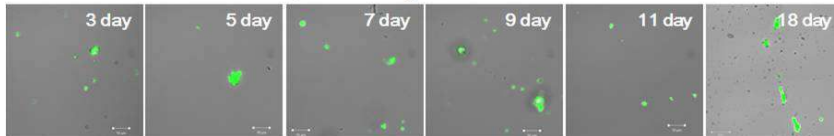
- Green fluorescence image



- Particle image



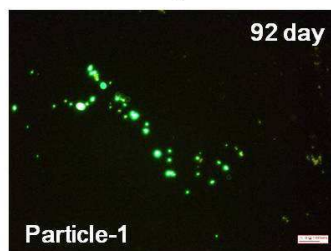
- Green fluorescence with particle image



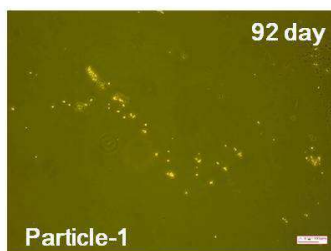
Scale bar : 10 μ m

도면9

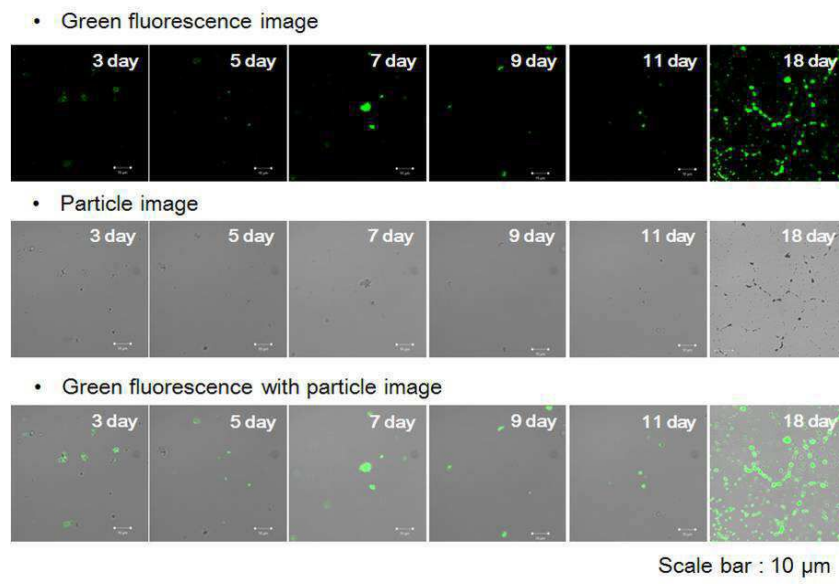
- Green fluorescence image



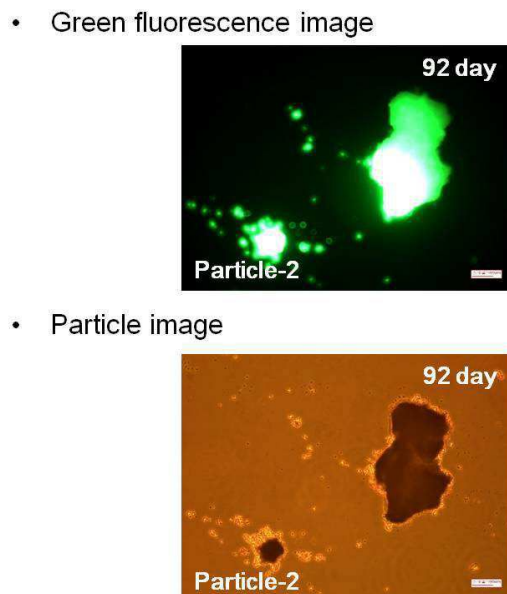
- Particle image



도면10

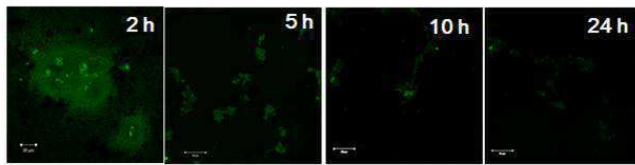


도면11

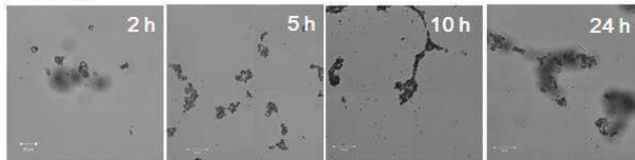


도면12

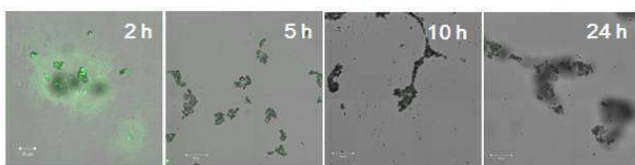
- Green fluorescence image



- Particle image



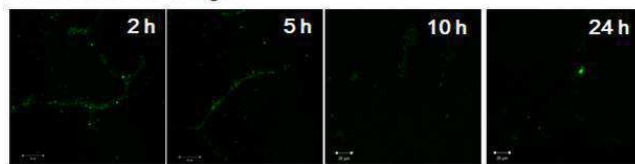
- Green fluorescence with particle image



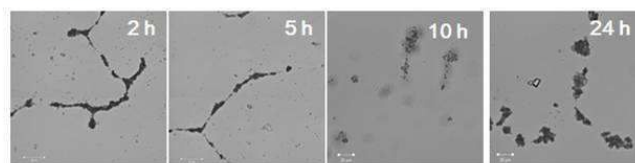
Scale bar : 20 μ m

도면13

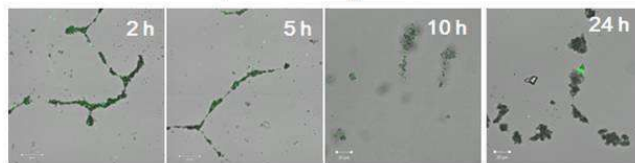
- Green fluorescence image



- Particle image

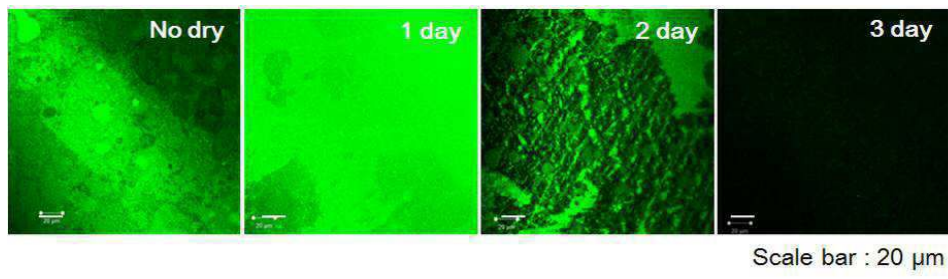


- Green fluorescence with particle image



Scale bar : 20 μ m

도면14



도면15

