(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0135675
(43) 공개일자 2017년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08J 3/12 (2006.01) *A61K 47/50* (2017.01)
C08J 3/075 (2006.01) *C08J 3/16* (2006.01)
C08J 3/24 (2006.01) *C08J 5/00* (2006.01)
C08J 7/04 (2006.01) *C08L 101/00* (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08J 3/128 (2013.01)
A61K 47/61 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2017-0056914
(22) 출원일자 2017년05월04일
심사청구일자 2017년05월04일
(30) 우선권주장
1020160066406 2016년05월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김중배
서울특별시 강남구 역삼로 309, 101동 1501호 (역삼동, 래미안펜타빌아파트)
유지성
서울특별시 성북구 종암로24가길 53, 106동 1903호(종암동, SK아파트)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

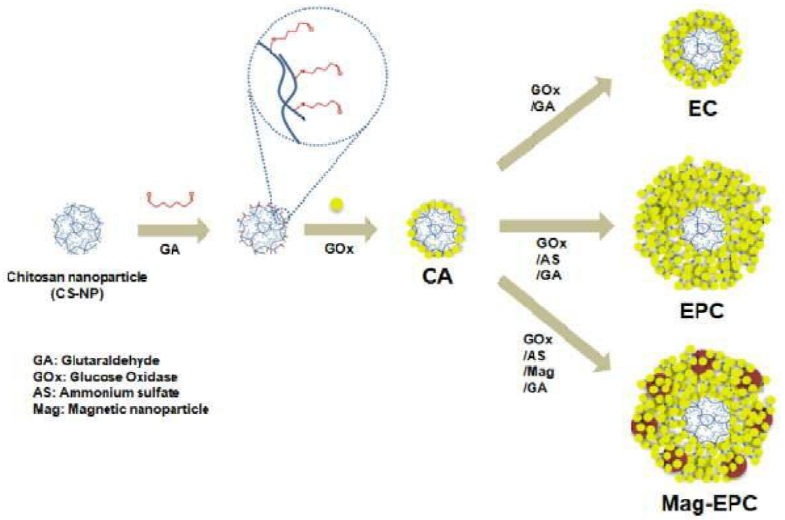
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **코어쉘 구조의 바이오분자-나노입자 복합체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 바이오분자-나노입자 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로 설명하면, 작용기를 포함하는 나노입자의 상기 작용기에 바이오분자를 고정화시킴으로써 바이오분자의 고정화량 증대 및 장기사용 안정성을 향상시킨 코어쉘 구조의 바이오분자-나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C08J 3/075 (2013.01)
C08J 3/16 (2013.01)
C08J 3/245 (2013.01)
C08J 5/005 (2013.01)
C08J 7/04 (2013.01)
C08L 101/00 (2013.01)
C08L 5/08 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
C08L 2203/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014043032
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 글로벌연구실사업
연구과제명 미생물 오염 방지 및 제거를 위한 나노바이오촉매 소재 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2015.08.01 ~ 2016.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

작용기를 가지는 고분자가 응집된 고분자 나노입자를 포함하는 코어; 및 상기 작용기에 고정된 바이오분자를 포함하는 쉘;을 포함하며,

상기 바이오분자는 근접하고 있는 단수 또는 복수 개의 바이오분자와 서로 가교되어 있는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 쉘은 자성 나노입자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 작용기는 알데하이드기, 카르복시기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기 및 아이오드기 중에서 선택된 1종 이상의 작용기를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 바이오분자는 효소, 항원, 항체, 알부민, 인슐린, 콜라겐, 프로테인A, 프로테인G, 아비딘, 바이오틴, 스트렙타비딘, 펩타이드, 핵산, 렉틴(Lectin), 탄수화물, 아미노산 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 효소는 포도당 산화효소, 탄산무수화 효소, 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 페록시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 수크라아제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 콜레스테롤 옥시다제, 폴리페놀 옥시다제, 모노아민 옥시다제, 잔틴 옥시다제, 시토토크롬 옥시다제, 아스코르브산 옥시다제, 및 D-아라비노-1,4-락톤 옥시다제 알코올 탈수소 효소, 포름산 탈수소 효소, 알데하이드 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체.

청구항 6

고분자가 응집된 고분자 나노입자를 제조하는 1단계;

고분자 나노입자를 표면처리하여 작용기를 가지는 고분자 나노입자를 제조하는 2단계;

고분자 나노입자의 작용기에 바이오분자를 고정화시키는 3단계; 및

바이오분자의 가교결합 반응 또는 석출-가교결합 반응을 수행하여 쉘을 형성시켜서 코어-쉘 구조의 복합체를 제조하는 4단계;를 포함하는 공정을 수행하는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 가교결합 반응은 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르디알데하이드, 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디알데하이드, 디에폭사이드, 디애시드 클로라이드, 디이미드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르)로 구성되는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 가교결합제를 사용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 4단계의 가교결합 반응은 3단계의 바이오분자가 고정화된 고분자 나노입자를 가교결합제로 0℃ ~ 40℃ 하에서 1분 ~ 48 시간 동안 가교처리하여 수행하는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 4단계의 석출-가교결합 반응은 3단계의 바이오분자가 고정화된 고분자 나노입자를 석출화제를 이용하여 석출반응을 수행한 후, 가교결합제를 이용하여 가교결합 반응을 수행하며,

상기 석출화제는 1-프로판올, 2-프로판올, 메탄올, 부틸알콜, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 아세톤, 암모늄 설페이트, 에탄올, PEG, 포타슘 설페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 포스페이트, 폴리에틸렌글라이콜 및 이들의 수용액 중에서 선택된 1종 이상을 포함하며,

상기 가교결합제는 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르디알데하이드, 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디알데하이드, 디에폭사이드, 디애시드 클로라이드, 디이미드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르)로 구성되는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 석출-가교결합 반응은 자성나노입자 존재 하에서, 석출화제로 석출반응시킨 후, 3단계의 바이오분자가 고정화된 고분자 나노입자를 가교결합제로 가교결합 반응을 수행하는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 석출-가교결합 반응은 3단계의 바이오분자가 고정화된 고분자 나노입자와 석출화제를 0℃ ~ 40℃ 및 10 rpm ~ 1,000 rpm 속도 하에서, 쉐이킹(shaking)시켜서 석출반응을 수행한 후, 0℃ ~ 40℃ 하에서 1분 ~ 48 시간 동안 가교결합제로 가교처리하여 수행하는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 12

제6항에 있어서, 세척 후, 미반응 작용기를 캡핑(capping)시키는 5단계;를 포함하는 공정을 더 수행하는 것을 특징으로 하는 바이오분자-나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 13

제1항 내지 제5항 중에서 선택된 어느 한 항의 바이오분자-나노입자 복합체를 이용하여 미생물 살균처리제.

청구항 14

제1항 내지 제5항 중에서 선택된 어느 한 항의 바이오분자-나노입자 복합체를 이용하여 미생물을 살균처리하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제5항 중에서 선택된 어느 한 항의 바이오분자-나노입자 복합체를 포함하는 미생물 살균처리 장치.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바이오분자-나노입자 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 작용기를 포함하는 나노입자의 상기 작용기에 바이오분자를 고정화시킴으로써 바이오분자의 고정화량 증대 및 장기사용안정성을 향상시킨 코어쉘 구조의 바이오분자-나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

배 경 기 술

[0003] 나노바이오 기술은 나노미터 수준에서 바이오 물질을 다루는 기술로 그 중요성이 강조됨에 따라 다양한 나노구조물질과 생체분자의 융합연구가 활발히 진행되고, 이를 통해 그 시너지 효과를 극대화 하려는 연구도 활발히 진행되고 있다. 나노바이오 기술은 나노구조물질과 생체분자가 결합되어 재료공학, 생명공학, 의학 등의 다양한 분야에 활발히 응용되고 있다. 나노수준에서 나타나는 고유한 특성을 기반으로 단백질칩, DAN칩, 랩온어칩, 바이오센서 등의 진단장치가 활발히 개발되고 있다. 또한 에너지/환경 분야에서는 오염물질 감지 및 제거에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다.

[0004] 나노바이오 기술이 큰 주목을 받고 많은 연구가 진행되고 있지만, 성공적인 실용화를 위해서는 나노구조물질에 생체분자를 안정적으로 고집적 시키는 기술이 절대적으로 선행되어야 한다. 현재는 탄소나노튜브(carbon nanotube), 자성나노입자(magnetic nanoparticle), 섬유(nanofiber), 나노선(nanowire), 나노세공성물질(nanoporous material) 등 다양한 나노구조물질이 합성되고 있다. 여기에 DNA와 같은 저분자의 펩타이드로부터 효소, 항체 등과 같은 바이오분자를 결합하려는 시도가 꾸준히 이루어지고 있다. 이를 위해서 물리적인 흡착(physical adsorption) 혹은 표면전하의 차이에 의한 이온 결합(ionic bond)법이 과정상 편리함 때문에 많이 사용되어 왔다. 하지만 이러한 결합은 결합력이 약해 생체분자를 안정적으로 결합시키지 못하고, 쉽게 나노구조물질로부터 분리되는 치명적인 단점이 존재한다. 결국, 산업적인 응용 시에 바이오분자들이 안정적으로 고집적되지 못하여 전체적인 반응공정의 수율이 하락하는 문제가 발생하게 된다. 나아가, 나노구조물질은 파우더 형태로 반응과정에서 이를 조작하는 데 어려움이 있다. 나노구조물질 뿐만 아니라, 바이오분자는 크기가 나노미터 수준으로 너무 작아 원하는 목적으로 사용한 이후에 회수를 하는 데에 문제가 있었다. 그리고, 이러한 문제는 전체 반응공정의 비용이 상승하게 되는 직접적인 요인으로 작용하게 된다.

[0005] 결국, 종래의 방법대로는 나노구조물질에 생체분자를 안정적으로 고집적시키지 못하고, 손쉽게 핸들링을 할 수 없는 단점이 있으며, 이는 산업적인 응용을 제한하게 되는 문제가 있었다.

[0006] 또한, 병원성 미생물들의 살균은 환경적인 안전성을 위한 중요한 과제이다. 살균방법은 염소소독, 자외선소독, 오존살균 등에 국한되어 있으며 염소소독의 경우는 소독부산물인 트리할로메탄의 위해성과 수생생물에 대한 영향으로 반드시 탈염소설비등의 대책을 강구해야 하며 자외선 소독의 경우는 대규모 처리장에 설치 시 램프의 주기적인 교체가 필요하고 처리 수 내 탁도나 색도 등이 존재할 경우 소독효율이 떨어지는 문제점이 있다. 뿐만 아니라 자외선소독 혹은 오존살균 공정은 가격이 비싸 경제적인 측면을 고려하면 이들 소독공정이 국내의 실정에 적당하다고 볼 수는 없다. 따라서 차 오염물의 발생이 없고 유량 변동에 쉽게 대처할 수 있는 효율적인 살균공정의 개발이 절실한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허번호 2011-0012463호(2011.02.09)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명은 기존 상업성 및 안정성이 낮은 바이오 분자 기반의 촉매 문제점을 해결한 발명으로서, 특정 물질로 구성된 나노입자에 작용기를 도입시킨 후, 상기 작용기에 효소, 항원, 항체, 알부민, 인슐린, 콜라겐, 프로테인A, 프로테인G, 아비딘, 바이오틴, 스트렙타비딘, 펩타이드, 핵산, 렉틴(Lectin), 탄수화물, 아미노산 등의 바이오분자를 결합(또는 흡착)시킨 후, 가교처리하거나 또는 가교 및 석출처리하거나, 또는 자성나노입자 도입과 함께 가교 및 석출처리 등을 하면 바이오분자 도입량을 크게 향상시키면서도 나노입자에 고정된 바이오분자의 안정성을 향상시킬 수 있는 복합체 및 이를 제조하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체는 작용기를 가지는 고분자가 응집된 고분자 나노입자를 포함하는 코어(core); 및 상기 작용기에 고정된 바이오분자를 포함하는 쉘(shell);를 포함한다.

[0012] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 쉘을 구성하는 작용기에 고정된 바이오분자는 근접하고 있는 단수 또는 복수 개의 바이오분자와 서로 가교되어 있을 수 있다.

[0013] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 쉘은 자성 나노입자를 더 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 작용기는 알데하이드기, 카르복시기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기 및 아이오드기 중에서 선택된 1종 이상의 작용기를 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 바이오분자는 효소, 항원, 항체, 알부민, 인슐린, 콜라겐, 프로테인A, 프로테인G, 아비딘, 바이오틴, 스트렙타비딘, 펩타이드, 핵산, 렉틴(Lectin), 탄수화물, 아미노산 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수도 있다.

[0016] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 효소는 포도당 산화효소, 탄산무수화 효소, 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 페록시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 수크라아제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 콜레스테롤 옥시다제, 폴리페놀 옥시다제, 모노아민 옥시다제, 잔틴 옥시다제, 시토토크롬 옥시다제, 아스코르브산 옥시다제, 및 D-아라비노-1,4-락톤 옥시다제 알코올 탈수소 효소, 포름산 탈수소 효소, 알데하이드 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수도 있다.

[0018] 본 발명의 다른 목적은 앞서 설명한 다양한 형태의 코어쉘 구조의 바이오분자-나노입자 복합체를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 고분자가 응집된 고분자 나노입자를 제조하는 1단계; 고분자 나노입자를 표면처리하여 작용기를 가지는 고분자 나노입자를 제조하는 2단계; 고분자 나노입자의 작용기에 바이오분자를 고정화시키는 3단계; 바이오분자의 가교결합 반응 또는 석출-가교결합 반응을 수행하여 쉘을 형성시켜서 코어-쉘 구조의 복합체를 제조하는 4단계;를 포함하는 공정을 수행하여 제조할 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체의 제조방법은 상기 세척 후, 미반응 작용기를 캡핑(capping)시키는 5단계;를 포함하는 공정을 더 수행할 수도 있다.

[0020] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 4단계의 가교결합 반응은 3단계의 바이오분자가 고정화된 고분자 나노입자를 가교결합제로 0℃ ~ 40℃ 하에서 1분 ~ 48 시간 동안 가교처리하여 수행할 수 있다.

[0021] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 4단계의 석출-가교결합 반응은 3단계의 바이오분자가 고정화된 고분자 나노입자를 석출화제를 이용하여 석출반응을 수행한 후, 가교결합제를 이용하여 가교결합 반응을 수행할 수 있다.

[0022] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 4단계의 석출-가교결합 반응은 3단계의 바이오분자가 고정화된 고분자 나노입자를 자성나노입자 존재 하에서, 석출화제로 석출반응시킨 후, 가교결합제로 가교결합 반응을 수행할 수도 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 석출-가교결합 반응의 석출반응은 0℃ ~ 40℃ 및 10 rpm ~ 1,000 rpm 속도 하에서, 쉐이킹(shaking)시켜서 석출반응을 수행한 후, 0℃ ~ 40℃ 하에서 1분 ~ 48시간 동안 가교처리하여 수행할 수 있다.

[0024] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 석출화제는 1-프로판올, 2-프로판올, 메탄올, 부틸알콜, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 아세톤, 암모늄 설페이트, 에탄올, PEG, 포타슘 설페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 포스페이트, 폴리에틸렌글라이콜 및 이들의 수용액 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 가교결합제는 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르디알데하이드, 디이소시아네이트, 디안하이드라이드, 디알데하이드, 디에폭사이드, 디애시드 클로라이드, 디이미드, 비스(이미도 에스테르) 및 비스(석신이미딜 에스테르) 중에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 목적은 바이오분자-나노입자 복합체를 포함하는 친환경 생촉매를 제공하고자 한다.

[0028] 본 발명의 또 다른 목적은 바이오분자-나노입자 복합체를 포함하는 미생물 살균처리제를 제공하고자 한다.

[0029] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오분자-나노입자 복합체를 이용한 미생물 살균처리 방법 및/또는 미생물 살균처리 장치를 제공하고자 한다.

[0030] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오분자-나노입자 복합체를 포함하는 친환경 촉매, 미생물 살균처리 장치, 이산화탄소 저감 장치, 바이오 센서, 바이오 정화기기, 바이오 연료전지 등을 제공하고자 한다.

발명의 효과

[0032] 본 발명의 코어쉘 구조의 바이오분자-나노입자 복합체는 기존 복합체 보다 복합체 내 단백질 복합체 양을 크게 증대시킬 수 있으며, 장기사용안정성을 확보한 바이오분자-나노입자 복합체를 우수한 상업성으로 제공할 수 있다. 이러한, 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체는 친환경 촉매, 미생물 살균처리 장치, 이산화탄소 저감 장치, 바이오 센서, 바이오 정화기기, 바이오 연료전지, 중합효소연쇄반응용 촉매, 단백질 가수분해장치, 단백질 정량분석 장치(ELISA), 방오제, 효소컬럼, 결정성 이부프로펜 제조 등 다양한 분야에 응용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명의 바람직한 일구현예로서, 본 발명의 코어쉘 구조의 바이오분자-나노입자 복합체를 제조하는 과정을 나타낸 개략도이다.

도 2a는 본 발명 복합체의 코어 부분인 고분자 나노입자를 제조하는 과정을 나타낸 개략도이며, 도 2b ~ 도 2각각은 고분자 나노입자, 비교예 1, 실시예 1 ~ 실시예 3에서 제조한 복합체 각각의 SEM 측정 사진이다.

도 3은 포도당 산화효소의 동적 광산란(Dynamic Light Scattering)을 이용 하여 평균 지름(average diameter)과 다분산지수(polydispersity index)를 측정한 결과이다.

도 4는 탄산무수화 효소의 동적 광산란(Dynamic Light Scattering)을 이용 하여 평균 지름(average diameter)과 다분산지수(polydispersity index)를 측정한 결과이다.

도 5은 실험예 3에서 실시한 실시예 1 ~ 실시예 3 및 비교예 1의 복합체 각각의 포도당 산화효소 활성 측정 결

과이다.

도 6은 실험예 4에서 실시한 실시예 1 ~ 실시예 3 및 비교예 1의 복합체 각각의 포도당 산화효소 활성 측정 결과이다

도 7은 실험예 5의 (1)에서 실시한 실시예 1 ~ 실시예 3 및 비교예 1의 복합체 각각의 장기사용안정성 측정 결과이다.

도 8은 실험예 5의 (2)에서 실시한 실시예 1 ~ 실시예 3 및 비교예 1의 복합체 각각의 장기사용안정성 측정 결과이다.

도 9는 실험예 5의 (3)에서 실시한 실시예 1 ~ 실시예 3 및 비교예 1의 복합체 각각의 장기사용안정성 측정 결과이다.

도 10은 실험예 6에서 실시한 복합체의 미생물 살균 측정결과이다.

도 11은 실험예 7에서 실시한 복합체 농도별 미생물 살균력 및 염색시료 유출량 측정 결과로서, (a)는 비교예 1의 복합체, (b)는 실시예 1의 복합체, (c)는 실시예 2의 복합체 및 (d)는 실시예 3의 복합체에 대한 측정 결과이다.

도 12는 실험예 8에서 실시한 복합체의 미생물 살균 측정결과이다.

도 13은 실험예 9에서 실시한 복합체로 처리한 미생물의 공초점 레이저 주사현미경 측정 사진으로서, (a)는 대조군(control)이고, (b) ~ (e) 각각은 순서대로 비교예 1, 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3의 복합체로 처리한 미생물에 대한 측정사진이다.

도 14는 실험예 10에서 실시한 실시예 3 복합체의 장기사용안정성 측정 결과이다.

도 15는 실험예 11에서 실시한 미생물 성장 저해 효과를 확인한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하에서는 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0036] 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체는 바람직한 일례로서, 도 1에 개략도로 나타낸 바와 같이, 고분자가 응집된 나노입자를 제조한 후, 상기 나노입자를 개질시켜 작용기를 형성시킨 후, 상기 작용기에 바이오분자를 고정화시킨 후, 바이오 분자를 성장시켜서 상기 나노입자로 구성된 코어 및 바이오 분자를 포함하는 쉘이 형성된 바이오분자-나노입자 복합체이다.

[0037] 이러한, 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체를 제조하는 방법에 대하여 좀 더 구체적으로 설명하면, 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체는 고분자가 응집된 고분자 나노입자를 제조하는 1단계; 고분자 나노입자를 표면처리하여 작용기를 가지는 고분자 나노입자를 제조하는 2단계; 고분자 나노입자의 작용기에 바이오분자를 고정화시키는 3단계; 바이오분자가 작용기에 고정된 고분자 나노입자를 가교결합 반응 또는 석출-가교결합 반응을 수행하여 쉘을 형성시켜서 코어-쉘 구조의 복합체를 제조하는 4단계;를 포함하는 공정을 수행하여 도 1의 EC 와 같은 형태의 코어-쉘 구조의 복합체를 제조할 수 있다.

[0038] 또한, 4단계의 가교결합 반응을 통해서 도 1의 EC와 같은 형태의 코어-쉘 구조의 복합체를 제조할 수 있다.

[0039] 또한, 4단계의 석출-가교결합 반응을 통해서 도 1의 EPC와 같은 형태의 코어-쉘 구조의 복합체를 제조할 수 있다.

[0040] 또한, 4단계의 석출-가교결합 반응 수행시, 자성나노입자를 더 추가하여 수행함으로써, 도 1의 Mag-EPC와 같은 형태의 코어-쉘 구조의 복합체를 제조할 수 있다.

[0041] 또한, 4단계 수행한 다음, 세척을 수행하고, 미반응 작용기를 캡핑(capping)시키는 5단계;를 더 수행할 수도 있다.

[0043] 1단계는 고분자, 계면활성제 및 용매를 포함하는 고분자 용액을 천천히 교반시키면서 이온결합제 및 계면활성제를 포함하는 용액을 적가시켜서 아이오노트로픽 겔화반응(ionotropic gelation)을 수행하여 고분자가 이온결합제와 결합 및 응집된 응집체를 형성시켜서 고분자 나노입자를 형성시키는 공정이다. 이때, 고분자는 양이온 또

는 음이온을 가지고, 상기 이온결합제는 고분자 섬유와 반대되는 음이온 또는 양이온을 가진 것을 사용하므로 이들간 결합 및 응집이 되게 된다.

[0044] 상기 고분자는 키토산, 나일론, 셀루로우즈, 셀룰로오스 아세테이트, 콜라겐, 실크, 실리콘, 폴리아닐린, 폴리아미드, 폴리카보네이트, 폴리파이롤, 아크릴로나이트릴-뷰타디엔-스티렌, 폴리락틱산, 폴리비닐알콜, 폴리비닐아세테이트, 폴리비닐카바졸, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴로니트릴, 폴리에스테르, 폴리에스테르계 공중합체, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리에틸렌비닐알코올 공중합체, 폴리에틸렌비닐아세테이트 공중합체, 폴리에틸렌이민, 폴리프로필렌옥사이드, 폴리비닐리데인플로라이드, 폴리우레탄, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리카프로락탐, 폴리락틱글리콜산 공중합체, 폴리글리콜산, 폴리카프로락톤, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리다이메틸실록산, 테플론, 콜라겐 및 스티렌말레익안하이드라이드 공중합체 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 키토산, 나일론, 셀루로우즈, 실리콘, 폴리아닐린, 폴리파이롤 및 콜라겐 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0045] 상기 이온결합체는 고분자의 표면이 양이온을 가지는 경우, 음이온결합체를 사용하며, 고분자 섬유의 표면이 음이온을 가지는 경우, 양이온결합제를 사용하며, 상기 음이온 결합제의 이례로 트리포스페이트(Tripolyphosphate, TPP)를 들수 있다.

[0046] 1단계의 고분자 나노입자를 제조하는 바람직한 일구현예를 도 2a에 개략도를 나타냈으며, 이를 참고하면 키토산 섬유, 계면활성제인 폴리소르베이트를 포함하는 키토산 수용액을 제조한 후, 이를 천천히 교반시키면서 키토산 수용액에 폴리소르베이트 및 TPP를 포함하는 용액을 조금씩 적가시키면서 교반을 수행하면 TPP와 키노산 섬유가 결합 및 응집되어 키토산 나노입자를 형성하게 되는 것이다.

[0048] 2단계는 고분자 나노입자를 구성하는 고분자 섬유에 작용기를 형성시키기 위해 고분자 나노입자를 표면처리(또는 표면개질처리)를 수행하는 공정이다.

[0049] 이때, 상기 작용기는 알데하이드기, 카르복시기, 아민기, 이민기, 에폭시기, 하이드록시기, 카르보닐기, 에스터기, 메톡시기, 에톡시기, 페록시기, 에테르기, 아세탈기, 설파이드기, 포스페이트기 및 아이오드기 중에서 선택된 1종 이상의 작용기를 포함하며, 후 공정에서 상기 작용기에 바이오분자가 결합(또는 흡착)되어 고정되는 것이다.

[0050] 그리고, 상기 표면처리는 당업계에서 사용하는 일반적인 방법으로 수행할 수 있으며, 바람직하게는 고분자 나노입자를 가교결합제(GA)로 처리하여 고분자 나노입자에 작용기를 형성시킬 수 있다. 도 1을 참고하여 구체적인 일례를 들면, 이오노트로픽 겔화반응으로부터 형성된 키토산 나노입자(CS-NP) 수용액을 pH 5.5 ~ 6.5로 조절한 다음, 가교결합제를 투입한 후, 0℃ ~ 40℃ 천천히 교반시키면서 1분 ~ 48 시간 동안, 바람직하게는 5시간 ~ 24 시간 동안 표면처리하여 키토산 나노입자의 키토산 표면에 작용기를 형성시킬 수 있다.

[0051] 이때, 상기 가교결합제는 바이오 분자의 활성을 저해하지 않고서 가교결합을 형성할 수 있는 것이면 종류의 제한 없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 글루타르디알데하이드, 도파민, 도파민 유래 카테콜기를 포함하는 화합물, 제니핀, 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르, 디이소시아네이트, 디안하이드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르) 및 디애시드 클로라이드 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르디알데하이드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르) 및 디애시드 클로라이드 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0053] 3단계는 고분자 나노입자의 작용기에 바이오분자를 고정화시키는 공정으로서, 2단계에서 제조한 작용기를 포함하는 고분자 나노입자와 바이오분자를 혼합 및 반응시켜서 상기 작용기에 바이오분자를 결합(또는 흡착)시켜서 고정시킬 수 있다(도 1의 CA에 해당).

[0054] 여기서, 상기 바이오분자는 효소, 항원, 항체, 알부민, 인슐린, 콜라겐, 프로테인A, 프로테인G, 아비딘, 바이오틴, 스트렙타비딘, 펩타이드, 핵산, 렉틴(Lectin), 탄수화물, 아미노산 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0055] 그리고, 상기 효소는 포도당 산화효소, 탄산무수화 효소, 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 페록시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 수크라아제, 락타아제, 유기포스포

하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 콜레스테롤 옥시다제, 폴리페놀 옥시다제, 모노아민 옥시다제, 잔틴 옥시다제, 시토토크롬 옥시다제, 아스코르브산 옥시다제, 및 D-아라비노-1,4-락톤 옥시다제 알코올 탈수소 효소, 포름산 탈수소 효소, 알데하이드 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0056] 3단계에서 제조된 복합체는 바이오분자의 양이 충분치 못한 바, 가교결합 반응, 석출-가교결합 반응 등을 통해서 바이오분자의 양을 증대시키고, 바이오분자간 가교결합을 통해 고분자 나노입자에 고정된 바이오분자의 고정력을 증대시킬 수 있다. 즉, 바이오분자로 이루어진 쉘의 두께를 두껍고 단단하게 형성시킬 수 있는 것이다.

[0058] 4단계의 가교결합 반응은 3단계의 바이오분자가 고정화된 고분자 나노입자를 가교결합제로 0℃ ~ 40℃ 하에서 1 ~ 48 시간 동안, 바람직하게는 2℃ ~ 7℃ 하에서 8 ~ 24 시간 동안 가교처리하여 수행하여 바이오분자가 근접하고 있는 단수 또는 복수 개의 바이오분자와 서로 가교되어 있을 수 있다(도 1의 EC 참조).

[0059] 그리고, 상기 가교결합제는 2단계의 가교결합제와 동일한 것을 사용할 수 있다.

[0060] 또한, 4단계의 석출-가교결합 반응은 3단계의 바이오분자가 고정화된 고분자 나노입자를 석출화제를 이용하여 석출반응을 수행한 후, 가교결합제를 이용하여 가교결합 반응을 수행할 수 있다. 이때, 상기 석출반응은 0℃ ~ 40℃ 및 10 rpm ~ 1,000 rpm 속도 하에서, 1분 ~ 48시간 동안 쉐이킹(shaking)시켜서 석출반응을 수행할 수 있으며, 바람직하게는 상기 석출반응은 5℃ ~ 35℃ 및 70 rpm ~ 400 rpm 속도 하에서, 10분 ~ 24시간 동안 쉐이킹(shaking)시켜서 석출반응을 수행할 수 있다.

[0061] 상기 석출화제는 바이오 분자의 활성에 거의 영향을 미치지 않으면서 바이오 분자를 석출시킬 수 있는 것이면 종류의 제한 없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알콜, 아세톤, PEG(polyethlene glycol), 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.

[0062] 다음으로, 석출반응시킨 후, 가교결합제로 0℃ ~ 40℃ 하에서 1분 ~ 48 시간 동안, 바람직하게는 2℃ ~ 7℃ 하에서 8 ~ 24 시간 동안 가교처리하여 바이오분자가 근접하고 있는 단수 또는 복수 개의 바이오분자와 서로 가교시킴으로써, 쉘을 구성하는 바이오분자 양을 크게 증가시킬 수 있다(도 1의 EPC 참조).

[0063] 이때, 상기 가교결합제는 2단계 및/또는 4단계의 가교결합제와 동일한 것을 사용할 수 있다.

[0065] 또한, 4단계의 석출-가교결합 반응은 자성나노입자 존재 하에서, 코어-쉘 구조의 복합체를 석출화제로 석출반응시킨 후, 가교결합제로 가교처리시켜서 수행할 수 있으며, 이를 통해서 자성나노입자 없이 효소석출코팅반응을 수행할 때 보다 더 많은 양의 바이오분자를 고정시킬 수 있을 수 있다(도 1의 Mag-EPC 참조).

[0067] 5단계는 코어를 구성하는 고분자 나노입자에 존재할 수 있는 바이오분자와 미반응된 작용기를 캡핑(capping)해주기 위한 것으로서, 구체적인 일례를 들면, 100 mM Tris 완충용액(pH 7.0)을 넣고 상온(24℃ ~ 25℃)에서 100 ~ 1,000 rpm으로 1분 ~ 48시간 동안 교반시키면서 캡핑반응을 수행한 다음, 완충용액을 이용하여 세척을 수행할 수 있다.

[0068] 그리고, 상기 세척은 당업계의 일반적인 방법을 통해서 수행할 수 있으며, 일례를 들면, EC 또는 EPC는 1,000 ~ 10,000 rpm 속도 하에서, 5분 ~ 30시간 동안 원심분리를 이용하여 세척을 하거나, Mag-EPC의 경우 자성 분리를 통해 간편하게 세척을 수행할 수도 있다.

[0070] 이러한 방법으로 제조한 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체는 코어쉘 구조를 가지며, 도 1의 EC 및/또는 EPC와 같이, 코어는 작용기를 가지는 복수 개의 고분자가 응집된 고분자 나노입자를 포함하며, 쉘은 상기 작용기에 고정된 바이오분자를 포함한다. 그리고, 상기 쉘을 구성하는 바이오분자는 근접하고 있는 단수 또는 복수 개의 바이오분자와 서로 가교되어 바이오분자의 가교체를 형성한다.

[0071] 또한, 발명의 바이오분자-나노입자 복합체는 도 1의 Mag-EPC와 같이 자성나노입자를 더 포함할 수 있으며, 이

경우, 상기 EC 및/또는 EPC 보다 바이오분자 양을 증대시킬 수 있는 바, 더 두꺼운 쉘을 가질 수 있게 된다. 그리고, 자성나노입자를 쉘에 포함하는 복합체는 자성을 띠는 바, 이를 이용하여 복합체를 용이하게 회수 및 재사용이 가능하다.

[0072] 그리고, 상기 방법으로 제조된 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체는 EC의 경우, 평균지름 100nm ~ 400nm일 수 있으며, 바람직하게는 평균지름 120 nm ~ 350 nm일 수 있다. 또한, 바이오분자-나노입자 복합체는 EC의 경우, 다분산지수(polydispersity index)가 0.250 ~ 0.400일 수 있으며, 바람직하게는 다분산지수가 0.280 ~ 0.365일 수 있다. 특히, 바이오분자로서 포도당 산화효소를 사용하는 경우, EC의 평균지름은 150nm ~ 600nm이고, 다분산지수가 0.320 ~ 0.390일 수 있고, 바이오분자로서 탄산무수화 효소를 사용하는 경우, EPC의 평균지름은 120nm ~ 300nm이고, 다분산지수가 0.250 ~ 0.330일 수 있다.

[0073] 그리고, 상기 방법으로 제조된 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체는 EPC의 경우, 평균지름 150 nm ~ 1,400 nm일 수 있으며, 바람직하게는 평균지름 180nm ~ 1,200nm일 수 있다. 또한, 바이오분자-나노입자 복합체는 EPC의 경우, 다분산지수가 0.100 ~ 0.500일 수 있으며, 바람직하게는 다분산지수가 0.110 ~ 0.485일 수 있다. 특히, 바이오분자로서 포도당 산화효소를 사용하는 경우, EPC의 평균지름은 600 nm ~ 1,200nm이고, 다분산지수가 0.105 ~ 0.130일 수 있고, 바이오분자로서 탄산무수화 효소를 사용하는 경우, EPC의 평균지름은 150 nm ~ 400nm이고, 다분산지수가 0.420 ~ 0.500일 수 있다.

[0074] 그리고, 상기 방법으로 제조된 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체는 Mag-EPC의 경우, 평균지름 180nm ~ 1,600nm일 수 있으며, 바람직하게는 평균지름 200nm ~ 1,350nm일 수 있다. 또한, 바이오분자-나노입자 복합체는 Mag-EPC의 경우, 다분산지수가 0.100 ~ 0.400일 수 있으며, 바람직하게는 다분산지수가 0.105 ~ 0.365일 수 있다. 특히, 바이오분자로서 포도당 산화효소를 사용하는 경우, Mag-EPC의 평균지름은 750nm ~ 1,150nm이고, 다분산지수가 0.100 ~ 0.120일 수 있고, 바이오분자로서 탄산무수화 효소를 사용하는 경우, Mag-EPC의 평균지름은 180nm ~ 400nm이고, 다분산지수가 0.300 ~ 0.400일 수 있다.

[0076] 앞서 설명한 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체는 기존 복합체 보다 복합체 내 바이오분자 양을 크게 증대시킬 수 있으며, 장기사용안정성이 우수하며, 이를 높은 상업성으로 제조할 수 있다.

[0077] 이러한, 본 발명의 바이오분자-나노입자 복합체는 친환경 촉매, 미생물 살균처리제, 미생물 살균처리 장치, 이산화탄소 저감, 바이오 센서, 바이오 정화기기, 바이오 연료전지, 중합효소연쇄반응용 촉매, 단백질 가수분해장치, 단백질 정량분석 장치(ELISA), 방오제, 효소컬럼, 결정성 이부프로펜 제조 등 다양한 분야에 사용할 수 있다.

[0079] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 하기 실시예 및 실험예들은 본 발명을 예시하기 위하여 제시된 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0080] **[실시예]**

[0081] **비교예 1 : 바이오분자(포도당 산화효소)-나노입자 복합체(CA)의 제조**

[0082] **(1) 키토산 나노입자(CS-NP)의 제조**

[0083] 키토산 나노입자를 제조하기 위해 1% 아세트산 수용액을 이용하여 0.5% 폴리소르베이트(polysorbate)가 포함된 키토산 수용액(2 mg/ml)을 준비하였다. 그리고 0.5% 폴리소르베이트(polysorbate)가 포함된 0.6 mg/ml 농도의 트리폴리포스페이트(TPP)를 주사기를 이용하여 키토산 수용액에 떨어뜨리면서 아이오노트로픽 겔화(Ionotropic gelation) 방법을 통해 키토산 나노입자(Chitosan nanoparticle, CS-NP)를 제조하였다. 제조한 키토산 나노입자를 배율을 달리하여 측정한 SEM 측정 사진을 도 2b에 나타내었다.

[0084] **(2) 작용기를 가지는 키토산 나노입자(CS-NP)의 제조**

[0085] 다음으로, 키토산 나노입자들 사이의 결합과 동시에 입자 표면에 효소들이 공유결합을 통해 부착할 수 있도록 가교결합제인 글루타르디알데하이드(glutaraldehyde) 용액(0.1% w/v)을 넣고 pH를 6으로 적정한 후, 4℃에서 17시간 동안 배양하여, 표면이 개질되어 알데하이드 작용기를 포함하는 키토산 나노입자를 제조하였다.

[0086] **(3) 키토산 나노입자에 포도당 산화효소가 고정화된 복합체의 제조**

[0087] 포도당 산화효소 고정화를 위해 같은 무게(2mg)의 키토산 나노입자를 준비한 후, 포도당 산화효소 용액(10 mg/ml, 100mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 7.0))에 배양하였다. 포도당 산화효소를 나노입자에 공유결합을 이용해 고정화하기 위해(Covalent attached enzymes of glucose oxidase) 포도당 산화효소 용액과 나노입자가 들어있는 바이알(vial)을 15분간 200rpm으로 쉐이킹(shaking) 시켜서 키토산 나노입자에 포도당 산화효소가 고정화된 복합체를 제조하였다(도 1의 CA에 해당). 그리고, 키토산 나노입자에 포도당 산화효소가 고정화된 복합체(CA 또는 CA-GOx/CS-NP)를 배율을 달리하여 측정한 SEM 측정 사진을 도 2c에 나타내었다.

[0089] **실시예 1 : 바이오분자(포도당 산화효소)-나노입자 복합체(EC-GOx/CS-NP)의 제조**

[0090] 상기 비교예 1과 동일한 방법으로 작용기를 가지는 키토산 나노입자에 포도당 산화효소가 고정화된 복합체(CA)를 제조하였다.

[0091] 다음으로, 효소코팅(Enzyme coating)을 위해서 상기 CA를 제조한 용액에 가교결합제인 글루타르디알데하이드(glutardialdehyde) 용액(0.5% w/v)을 넣은 후, 4℃에서 17시간 동안 배양(가교결합 반응)하여, 도 1의 EC와 같은 형태의 코어쉘 구조를 가지는 포도당 산화효소가 가교되어 고정된 복합체(EC-GOx/CS-NP 또는 EC)를 제조하였다. 그리고 이의 SEM 측정 사진을 도 2d에 나타내었다.

[0093] **실시예 2 : 바이오분자(포도당 산화효소)-나노입자 복합체(EPC-GOx/CS-NP)의 제조**

[0094] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 작용기를 가지는 키토산 나노입자에 포도당 산화효소가 고정화된 복합체(CA)를 제조하였다.

[0095] 다음으로 효소석출코팅(Enzyme precipitate coating)을 위해서, 상기 CA를 제조한 용액에 50% 황화암모늄을 넣어 30분간 200rpm으로 쉐이킹(shaking)시켜서 석출 반응을 수행한 후, 가교결합제인 글루타르디알데하이드(glutardialdehyde) 용액(0.5% w/v)을 넣은 후, 4℃에서 17시간 동안 배양(가교결합 반응)하여, 도 1의 EPC와 같은 형태의 코어쉘 구조를 가지는 바이오분자-나노입자 복합체(EPC-GOx/CS-NP 또는 EPC)를 제조하였다. 그리고 이의 SEM 측정 사진을 도 2e에 나타내었다.

[0097] **실시예 3 : 바이오분자(포도당 산화효소)-나노입자 복합체(Mag-EPC-GOx/CS-NP)의 제조**

[0098] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 작용기를 가지는 키토산 나노입자에 포도당 산화효소가 고정화된 복합체(CA)를 제조하였다.

[0099] 다음으로 자성나노 입자(Magnetic nanoparticle, Mag)를 이용한 효소석출코팅(Enzyme precipitate coating)의 합성을 위해서, 상기 CA를 제조한 용액에 자성나노입자 및 50% 황화암모늄을 넣어 30분간 200rpm으로 쉐이킹(shaking) 시켜서 석출 반응을 수행한 후, 가교결합제인 글루타르디알데하이드(glutardialdehyde) 용액(0.5% w/v)을 넣은 후, 4℃에서 17시간 동안 배양(가교결합 반응)하여, 도 1의 Mag-EPC와 같은 형태의 코어쉘 구조를 가지는 바이오분자-나노입자 복합체(Mag-EPC-GOx/CS-NP 또는 Mag-EPC)를 제조하였다. 그리고 이의 SEM 측정 사진을 도 2f에 나타내었다.

[0101] **실험예 1 : 동적 광산란(Dynamic Light Scattering)을 이용하여 포도당산화 효소가 고정된 키토산 나노입자의 크기 측정**

[0102] 동적 광산란(Dynamic Light Scattering)을 이용 하여 포도당 산화효소가 고정된 키토산 나노입자의 평균 지름(avaerage diameter)과 다분산지수(polydispersity index)를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 1 및 도 3에 나타내었다.

표 1

[0103]

구분	평균 지름 (average diameter, nm)	다분산지수 (polydispersity index)
비교예 1(CS-NPs)	98 ± 28	0.263
비교예 1(CA)	397 ± 110	0.863

실시예 1(EC)	256 ± 67	0.350
실시예 2(EPC)	895 ± 247	0.115
실시예 3(Mag-EPC)	920 ± 177	0.110

[0105] **비교예 2 : 바이오분자(탄산무수화 효소)-나노입자 복합체(CA)의 제조**

[0106] 상기 비교예 1과 동일한 방법으로 알데하이드 작용기를 가지는 키토산 나노입자(CS-NP)를 제조하였다.

[0107] 다음으로, 탄산무수화 효소 고정화를 위해 같은 무게의 상기 키토산 나노입자를 준비한 후, 탄산무수화 효소용액(10 mg/ml, 100mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 7.6))에 배양하였다. 탄산무수화 효소를 나노입자에 공유결합을 이용해 고정화하기 위해(Covalent attached enzymes of glucose oxidase) 탄산무수화 효소 용액과 나노입자가 들어있는 바이알(vial)을 15분간 200rpm으로 쉐이킹(shaking)시켜서 키토산 나노입자에 탄산무수화 효소가 고정화된 복합체를 제조하였다.

[0109] **실시예 4 : 바이오분자(탄산무수화 효소)-나노입자 복합체(EC-GOx/CS-NP)의 제조**

[0110] 상기 비교예 2와 동일한 방법으로 작용기를 가지는 키토산 나노입자에 탄산무수화 효소가 고정화된 복합체(CA)를 제조하였다.

[0111] 다음으로, 효소코팅(Enzyme coating)을 위해서 상기 CA를 제조한 용액에 가교결합제인 글루타르디알데하이드(glutardialdehyde) 용액(0.5% w/v)을 넣은 후, 4℃에서 17시간 동안 배양(가교결합 반응)하여, 코어쉘 구조를 가지는 탄산무수화 효소가 가교되어 고정된 복합체(EC-GOx/CS-NP 또는 EC)를 제조하였다.

[0113] **실시예 5 : 바이오분자(탄산무수화 효소)-나노입자 복합체(EPC-GOx/CS-NP)의 제조**

[0114] 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 작용기를 가지는 키토산 나노입자에 탄산무수화 효소가 고정화된 복합체(CA)를 제조하였다.

[0115] 다음으로 효소석출코팅(Enzyme precipitate coating)을 위해서, 상기 CA를 제조한 용액에 50% 황화암모늄을 넣어 30분간 200rpm으로 쉐이킹(shaking)시켜서 석출 반응을 수행한 후, 가교결합제인 글루타르디알데하이드(glutardialdehyde) 용액(0.5% w/v)을 넣은 후, 4℃에서 17시간 동안 배양(가교결합 반응)하여, 코어쉘 구조를 가지는 바이오분자(탄산무수화 효소)-나노입자 복합체(EPC-GOx/CS-NP 또는 EPC)를 제조하였다.

[0117] **실시예 6 : 바이오분자(탄산무수화 효소)-나노입자 복합체(Mag-EPC-GOx/CS-NP)의 제조**

[0118] 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 작용기를 가지는 키토산 나노입자에 탄산무수화 효소가 고정화된 복합체(CA)를 제조하였다.

[0119] 다음으로 자성나노 입자(Magnetic nanoparticle, Mag)를 이용한 효소석출코팅(Enzyme precipitate coating)의 합성을 위해서, 상기 CA를 제조한 용액에 자성나노입자 및 50% 황화암모늄을 넣어 30분간 200rpm으로 쉐이킹(shaking) 시켜서 석출 반응을 수행한 후, 가교결합제인 글루타르디알데하이드(glutardialdehyde) 용액(0.5% w/v)을 넣은 후, 4℃에서 17시간 동안 배양(가교결합 반응)하여, 코어쉘 구조를 가지는 바이오분자(탄산무수화 효소)-나노입자 복합체(Mag-EPC-GOx/CS-NP 또는 Mag-EPC)를 제조하였다.

[0121] **실험예 2: 동적 광산란(Dynamic Light Scattering)을 이용하여 탄산무수화 효소가 고정된 키토산 나노입자의 크기 측정**

[0122] 동적 광산란(Dynamic Light Scattering)을 이용 하여 탄산무수화 효소가 고정된 키토산 나노입자의 평균 지름(avaerage diameter)과 다분산지수(polydispersity index)를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 2 및 도 4에 나타내었다.

표 2

[0123]

구분	평균 지름 (average diameter, nm)	다분산지수 (polydispersity index)
비교예 2(CS-NPs)	98 ± 28	0.263
비교예 2(CA)	157 ± 44	0.388
실시예 4(EC)	172 ± 47	0.293
실시예 5(EPC)	260 ± 70	0.472
실시예 6(Mag-EPC)	267 ± 63	0.348

[0125] **실험예 3: 복합체의 포도당 산화효소 활성 측정**

[0126] 포도당 산화효소 활성의 측정은 수용액 버퍼 내에서 포도당 산화효소의 반응으로 인해 생성된 과산화수소를 이용한 과산화효소의 테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB)의 분해를 측정하였다.

[0127] 구체적으로는 12 ml의 TMB 용액(0.576 mg/ml)과 2.5 ml의 포도당 용액(glucose solution, 110.1 mg/ml)을 혼합하여 리액션 칵테일(Reaction cocktail)을 제조하였다. 이때, 상기 TMB 용액은 TMB를 디술폭시드(Disulfoxide)를 이용해 용해시킨 용액(0.96 mg/ml in disulfoxide)을 100mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 7.0)을 이용하여 1/20 희석시켜 사용하였다. 상기 포도당 용액은 포도당을 100mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 7.0)를 이용해 용해시킨 용액(110 mg/ml in sodium phosphate buffer)을 제조하여 TMB 용액과 포도당 용액을 4.8 : 1로 혼합하여 사용하였다.

[0128] 다음으로, 0.89 ml의 리액션 칵테일, 0.01 ml의 퍼옥시다아제(3.798 mg/ml, horseradish peroxidase, HRP) 및 0.1 ml의 비교예 1 및 실시예 1 ~ 3의 복합체(20 ng/ml)를 각각 넣고 UV 분광광도계를 이용하여 655 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 3 및 도 5에 나타내었다.

표 3

[0129]

구분	활성도 (Activity)	활성도 비율(Ratio)
비교예 1(CA)	0.007	1
실시예 1(EC)	0.014	2
실시예 2(EPC)	0.171	24
실시예 3(Mag-EPC)	0.193	28

[0131] 상기 표 3 및 도 5의 실험결과를 살펴보면, 비교예 1에 비해 실시예 1 ~ 3의 복합체가 활성도가 높으며, 특히 비교예 1과 비교할 때, 실시예 2 및 실시예 3가 활성도가 크게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0133] **실험예 4: 복합체의 탄산무수화 효소 활성 측정**

[0134] 탄산무수화 효소 활성의 측정은 수용액 버퍼 내에서 4-나이트로페닐 아세테이트(4-nitrophenyl acetate, NPA)의 가수분해에 의하여 측정했다.

[0135] 구체적으로는 0.05 ml 의 NPA 용액 (60 mM)을 0.85 ml의 인산나트륨 버퍼 (sodium phosphate buffer, pH 7.0)와 혼합 하여 큐벳에 넣고 UV 분광광도계를 이용하여 348 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 4 및 도 6에 나타내었다.

표 4

[0136]

구분	활성도 (Activity)	활성도 비율(Ratio)
비교예 2(CA)	0.23	1
실시예 4(EC)	0.22	0.95

실시예 5(EPC)	0.56	2.4
실시예 6(Mag-EPC)	0.59	2.5

[0138] 상기 표 4 및 도 6을 보면 비교예 2에 비해 실시예 4 ~ 6의 복합체 활성도가 높아진 것을 확인할 수 있다.

[0140] **실험예 5: 복합체의 포도당 산화효소 활성 장기안정성 측정**

[0141] **(1) 25℃ 및 교반 하에서 장기안정성 측정**

[0142] 상기 실험예 3과 동일한 방법으로 리액션 칵테일(Reaction cocktail)을 제조한 후, 0.89 ml의 리액션 칵테일, 0.01 ml의 퍼옥시다아제(3.798 mg/ml, horseradish peroxidase, HRP) 및 0.1 ml의 비교예 1 및 실시예 1 ~ 3의 복합체(20 ng/ml)를 각각 넣고 25℃ 하에서 200 rpm 속도로 교반시키면서, 시간에 따른 포도당 산화효소 활성 변화를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 5 및 도 7에 나타내었다. 상대활성도는 0일의 활성도와 30일의 활성도를 비교하여 구한 것이다.

표 5

[0143]

구분	30일의 상대활성도(%)
비교예 1(CA)	19
실시예 1(EC)	37
실시예 2(EPC)	51
실시예 3(Mag-EPC)	52

[0145] **(2) 25℃ 및 무교반 하에서 장기안정성 측정**

[0146] 상기 (1)과 동일한 방법으로 시간에 따른 포도당 산화효소 활성 변화를 측정하되, 교반 없이 25℃ 하에서 시간에 따른 포도당 산화효소 활성 변화를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 6 및 도 8에 나타내었다. 상대 활성도는 0일의 활성도와 30일의 활성도를 비교하여 구한 것이다.

표 6

[0147]

구분	30일의 상대활성도(%)
비교예 1(CA)	12
실시예 1(EC)	32
실시예 2(EPC)	41
실시예 3(Mag-EPC)	43

[0149] **(3) 4℃ 및 무교반 하에서 장기안정성 측정**

[0150] 상기 (1)과 동일한 방법으로 시간에 따른 포도당 산화효소 활성 변화를 측정하되, 교반 없이 4℃ 하에서 시간에 따른 포도당 산화효소 활성 변화를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 7 및 도 9에 나타내었다. 상대활성도는 0일의 활성도와 30일의 활성도를 비교하여 구한 것이다.

표 7

[0151]

구분	30일의 상대활성도(%)
비교예 1(CA)	53
실시예 1(EC)	68
실시예 2(EPC)	102
실시예 3(Mag-EPC)	93

[0153] 표 5 ~ 표 7 및 도 7 ~ 도 9를 종합해보면, 비교예 1, 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3 순으로 상대활성도가 높은 것을 확인할 수 있으며, 특히, 실시예 2 및 실시예 3의 복합체가 장기활성안정성이 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0155] **실험예 6: 미생물 살균효과 실험 1**

[0156] 비교예 1, 실시예 1 ~ 3 복합체의 살균효과를 확인하기 위하여 아래와 같은 방법으로 미생물 살균 효과를 측정하였다.

[0157] 미생물은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)를 사용하였고, 미생물의 배양을 위한 영양배지(Nutrient broth)를 준비한 후 추가로 0.5%의 포도당을 넣어주었다. 그 후 다양한 방법으로 복합체(비교예 1, 실시예 1 ~ 3)를 각각 넣어 준 후 배양기에서 37 ℃, 100 rpm 교반조건 조건으로 배양하였다. 미생물을 배양하면서 30분 간격으로 1 ml씩 샘플을 채취하여 미생물로 성장으로 인한 탁도를 600 nm에서 분광광도계(spectrophotometer)로 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0158] 도 10을 살펴보면, 실시예 2(EPC) 및 실시예 3(Mag-EPC)가 미생물 성장 저해 효과가 우수함을 확인할 수 있다.

[0160] **실험예 7: 미생물 살균효과 실험 2**

[0161] 형광을 띄는 염색시료 (5 (and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, cFDA-SE) 로 배양된 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 염색 한 후, 살균 효과로 인해 유출된 염색시료를 형광을 통해 측정하였으며, 그 결과를 도 11에 나타내었다. 도 11(a)는 비교예 1, 도 11(b) ~ (d)는 차례대로 실시예 1 ~ 실시예 3의 복합체를 사용하여 측정한 결과이다.

[0162] 도 11을 살펴보면, 도 11(c)인 실시예 2(EPC) 및 도 11(d)인 실시예 3(Mag-EPC)가 비교예 1(CA) 및 실시예 1(EC)에 비해 형광 세기가 높게 나타나는 것(살균으로 인해 염색시료의 유출)을 확인할 수 있었다.

[0164] **실험예 8: 미생물 살균효과 실험 3**

[0165] 세포벽을 염색하는 시료인 크리스탈 바이올렛(crystal violet)을 이용하여 형성된 생물막의 양을 확인하였으며, 미생물인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 플레이트(Plate)에 배양, 생물막을 형성하는 과정에서 비교예 1 및 실시예1 ~ 3의 복합체의 살균 효과를 확인하였고, 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0167] **실험예 9: 공초점 레이저 주사 현미경 측정 실험**

[0168] 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 포도당 농도는 0.5% 및 영양배지(Nutrient broth)에 비교예 1, 실시예 1 ~ 실시예 3의 복합체 처리 농도는 50 마이크로리터로 각각 처리한 다음, 24시간 배양, 형광을 띄는 염색시료(5 (and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, cFDA-SE)로 배양된 미생물을 염색한 후, 공초점 레이저 주사 현미경을 통해 형성된 생물막의 양을 확인하였고, 그 결과를 도 10에 각각 나타내었다. 도 13의 스케일바의 단위는 100 ㎛이다.

[0170] **실험예 10: 자성분리를 통한 반복사용에 따른 과산화수소 생성양 측정**

[0171] 실시예 3의 복합체를 자성분리 및 회수, 반복사용하여 과산화수소 생성양을 측정하였고 그 결과를 도 11에 나타내었다. 도 14을 살펴보면 과산화수소 생성양이 5회 반복 사용해도 60% 이상으로 매우 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0173] **실험예 11: 미생물 성장 저해 효과 측정**

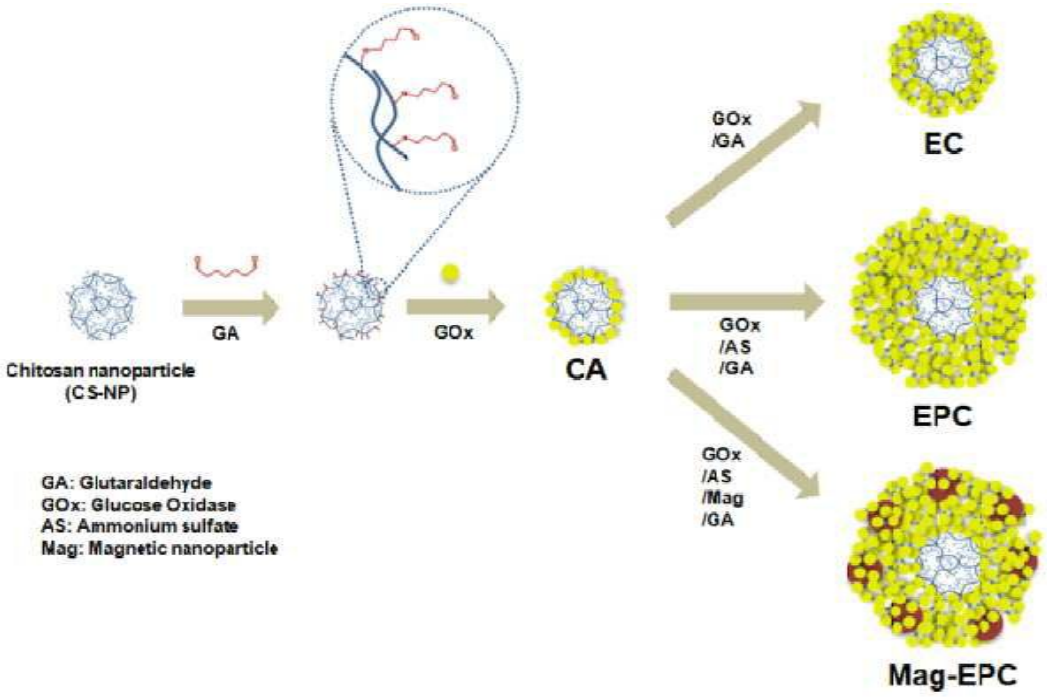
[0174] 한천 웰플레이트(Agar well plate)에서 미생물 배양시 포도당 산화효소가 고정화된 키토산 나노입자(포도당 포함)를 첨가하여 생성된 과산화수소로 인해 미생물의 생장이 저해되는 것을 확인하였으며, 그 결과를 도 15에 나타내었다.

[0175] 도 15를 살펴보면 실시예 1 ~ 3의 경우, 생성된 과산화수소가 확산되면서 샘플 주위로 원형 모양으로 미생물의 성장을 저해되는 것을 확인할 수 있었다.

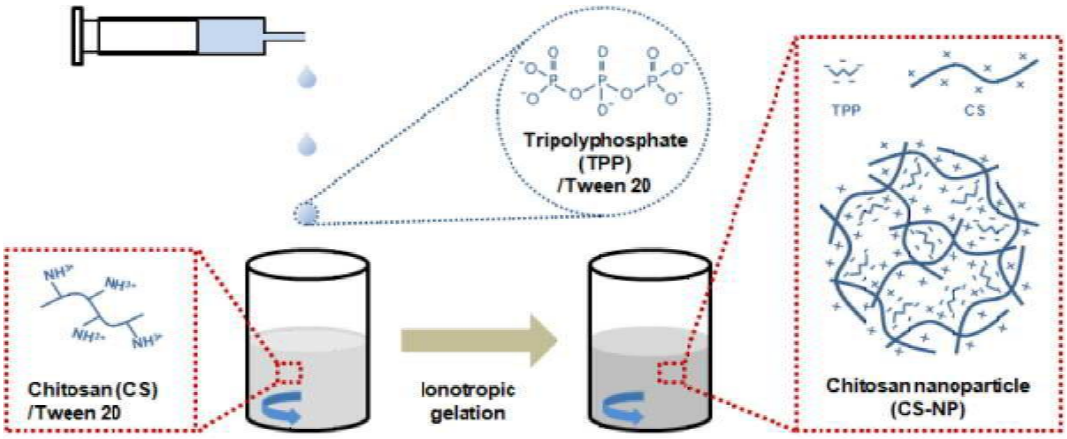
[0177] 상기 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명의 코어쉘 구조의 바이오분자-나노입자 복합체가 장기사용안정성 우수하고, 바이오분자의 고정화량이 매우 높은 바, 활성화가 극대화된 촉매로 사용하기에 적합할 뿐만 아니라, 미생물 살균력이 매우 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 본 발명은 친환경 촉매, 미생물 살균처리 장치, 이산화탄소 저감 장치, 바이오 센서, 바이오 정화기기, 바이오 연료전지, 중합효소연쇄반응용 촉매, 단백질 가수분해장치, 단백질 정량분석 장치(ELISA), 방오제, 효소컬럼, 결정성 이부프로펜 제조 등 다양한 분야에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면

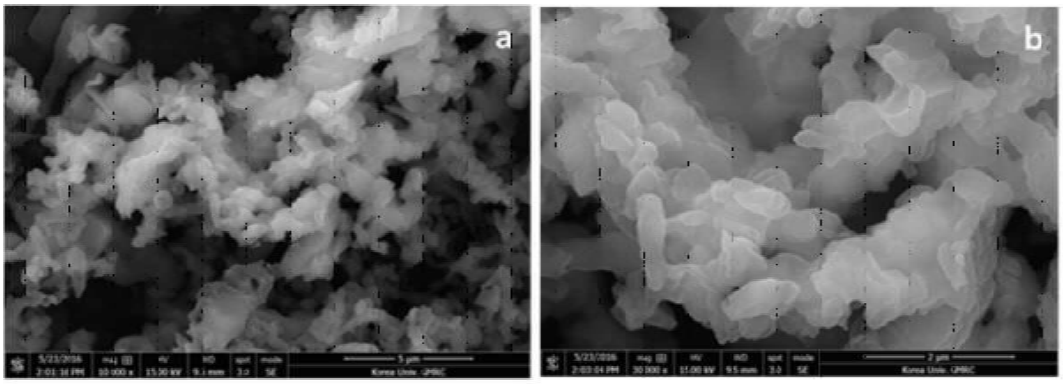
도면1



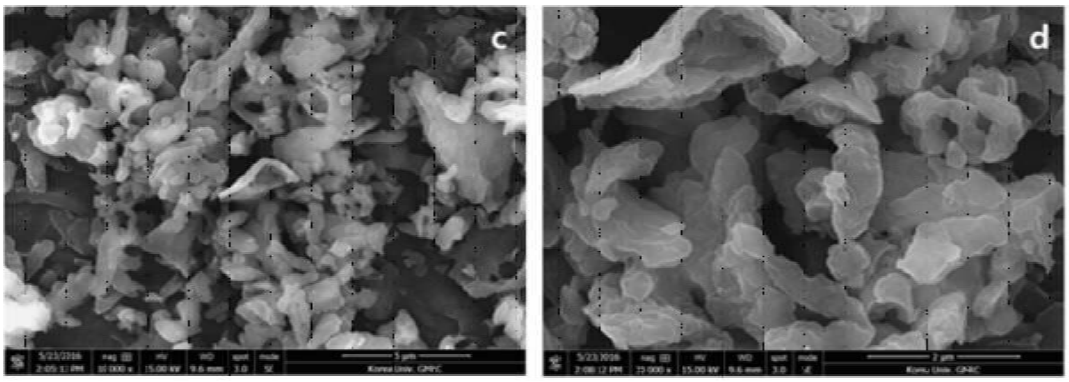
도면2a



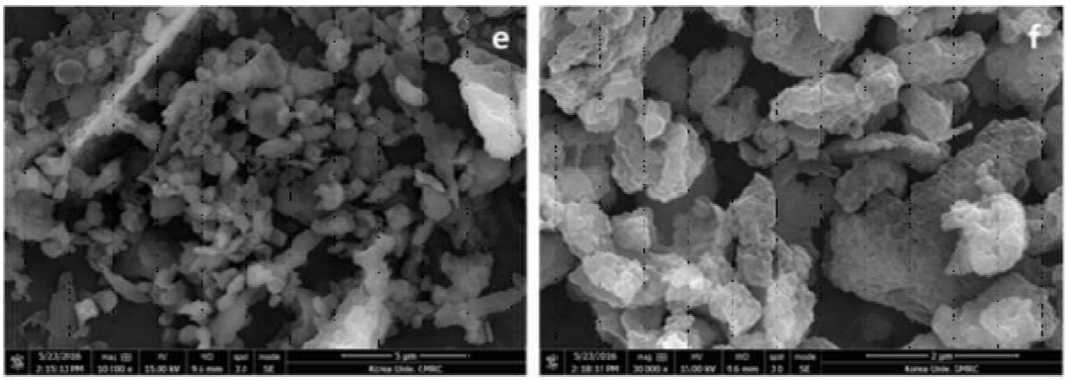
도면2b



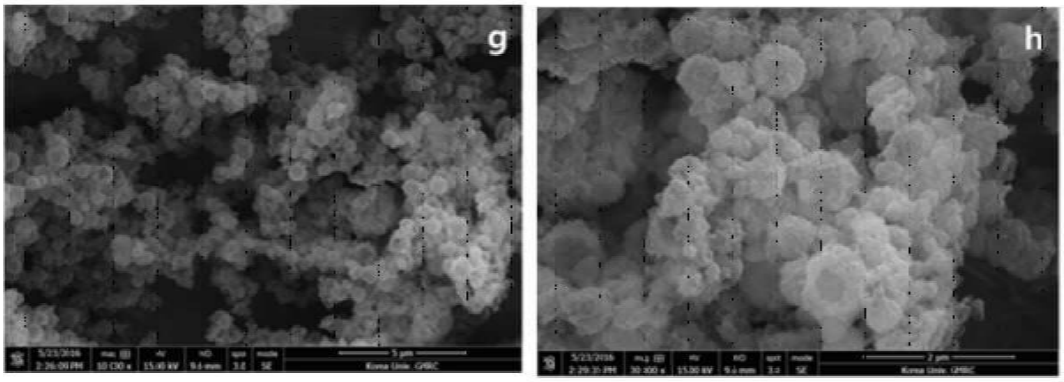
도면2c



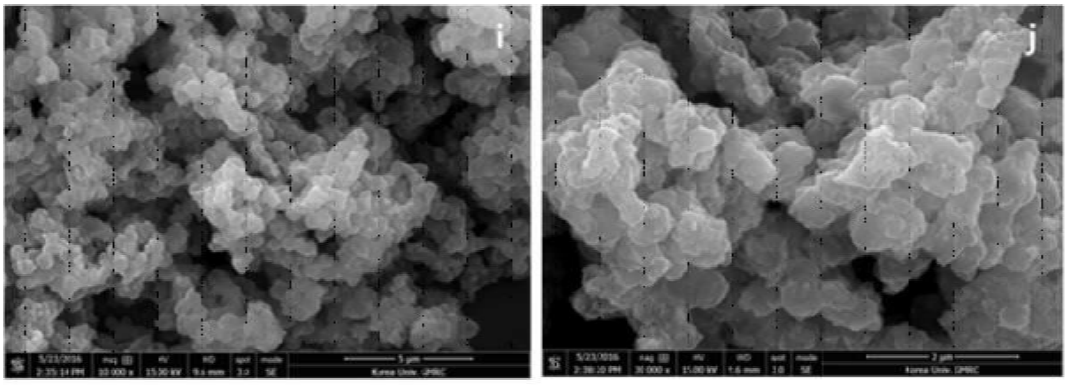
도면2d



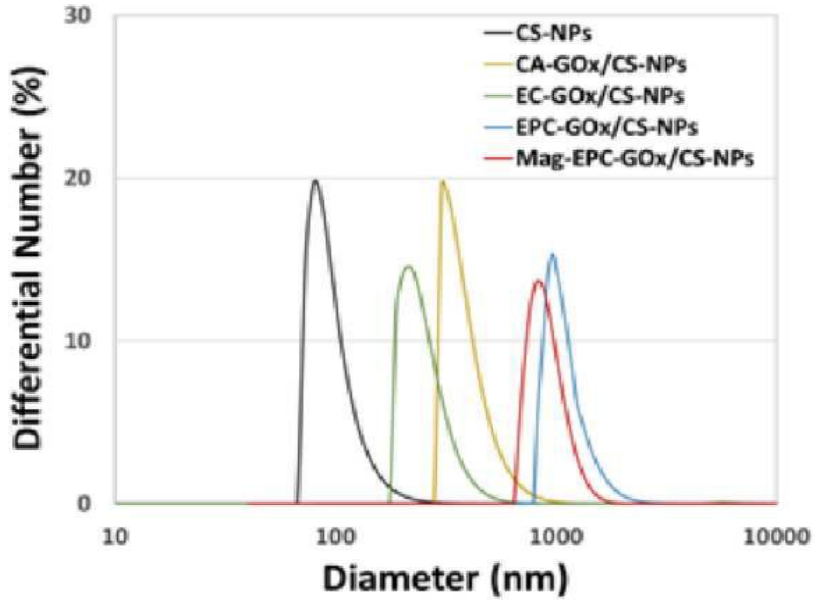
도면2e



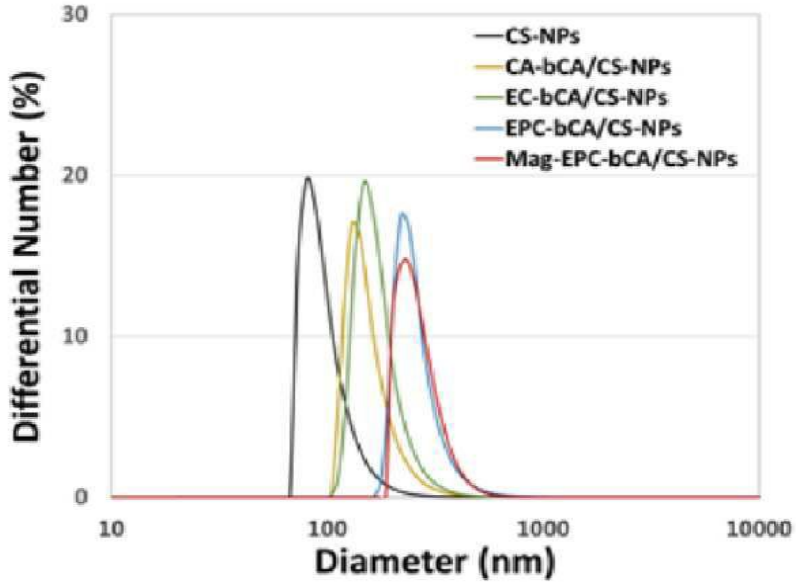
도면2f



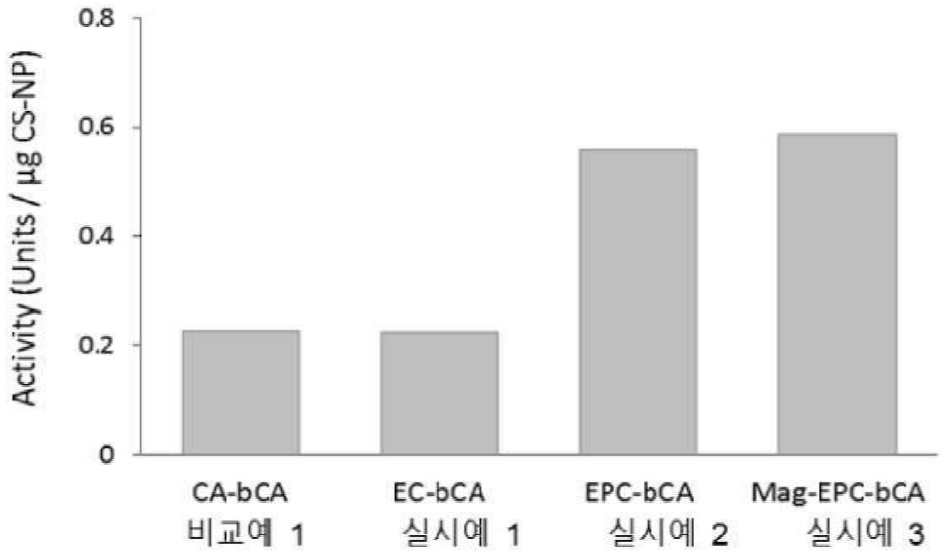
도면3


CS-NPs
CA-GOx/CS-NPs
EC-GOx/CS-NPs
EPC-GOx/CS-NPs
Mag-EPC-GOx/CS-NPs
Differential Number (%)
30
20
10
0
10
100
1000
10000
Diameter (nm)

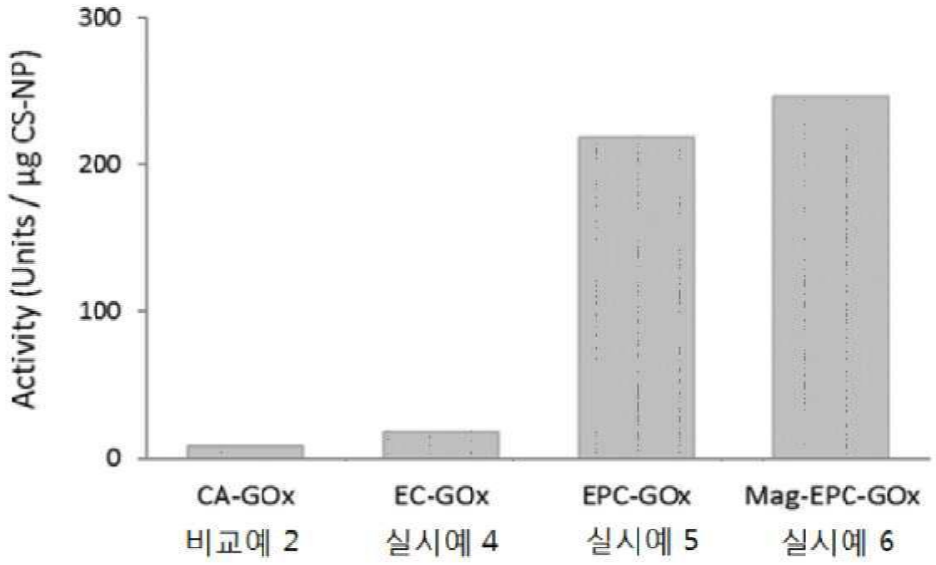
도면4


CS-NPs
CA-bCA/CS-NPs
EC-bCA/CS-NPs
EPC-bCA/CS-NPs
Mag-EPC-bCA/CS-NPs
Differential Number (%)
30
20
10
0
10
100
1000
10000
Diameter (nm)

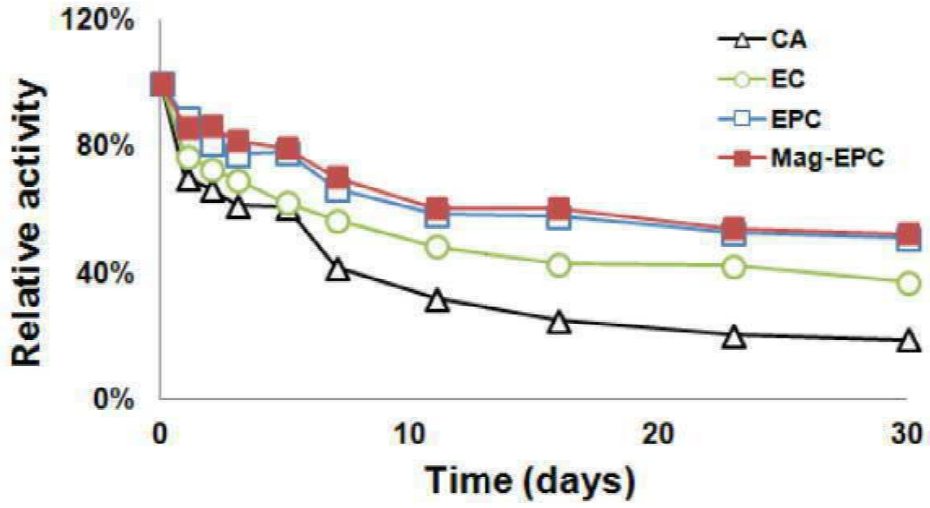
도면5


Activity (Units / μg CS-NP)
0.8
0.6
0.4
0.2
0
CA-bCA
비교예 1
EC-bCA
실시예 1
EPC-bCA
실시예 2
Mag-EPC-bCA
실시예 3

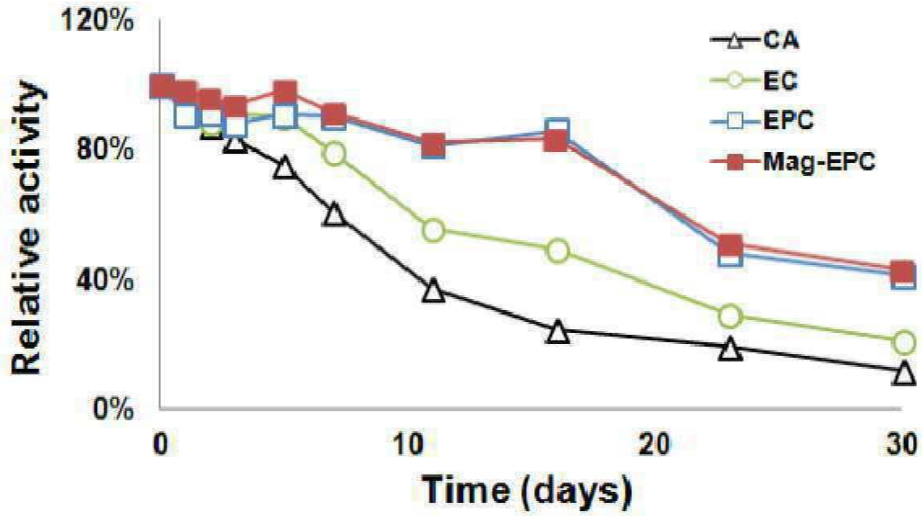
도면6


Activity (Units / μg CS-NP)
300
200
100
0
CA-GOx
비교예 2
EC-GOx
실시예 4
EPC-GOx
실시예 5
Mag-EPC-GOx
실시예 6

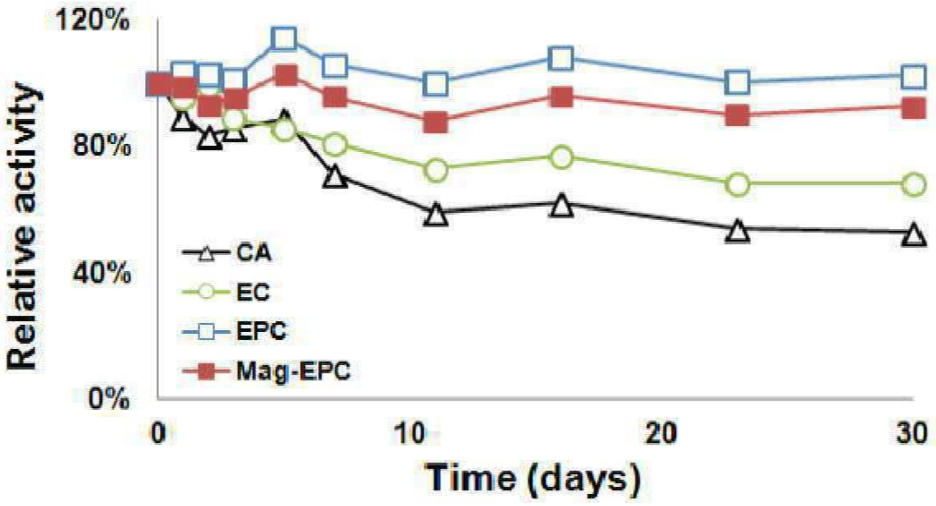
도면7


120%
80%
40%
0%
Relative activity
0
10
20
30
Time (days)
CA
EC
EPC
Mag-EPC

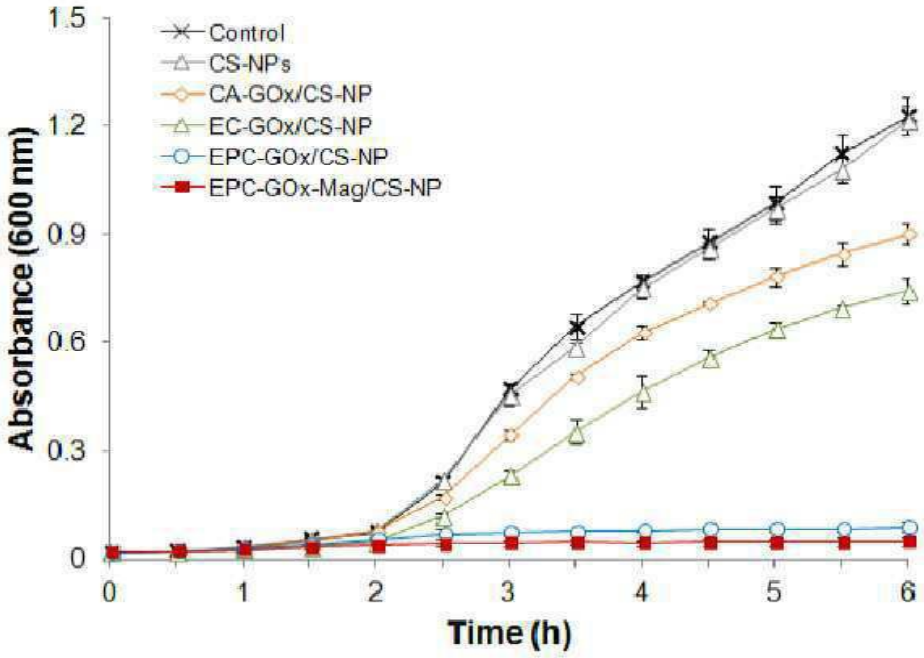
도면8


120%
80%
40%
0%
Relative activity
0
10
20
30
Time (days)
CA
EC
EPC
Mag-EPC

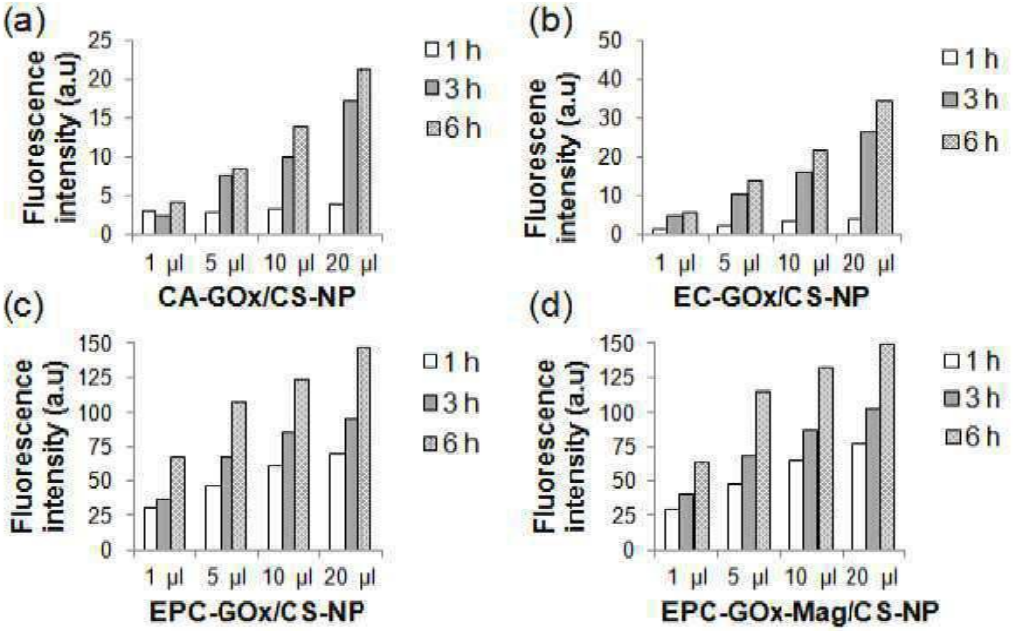
도면9


120%
80%
40%
0%
Relative activity
CA
EC
EPC
Mag-EPC
0
10
20
30
Time (days)

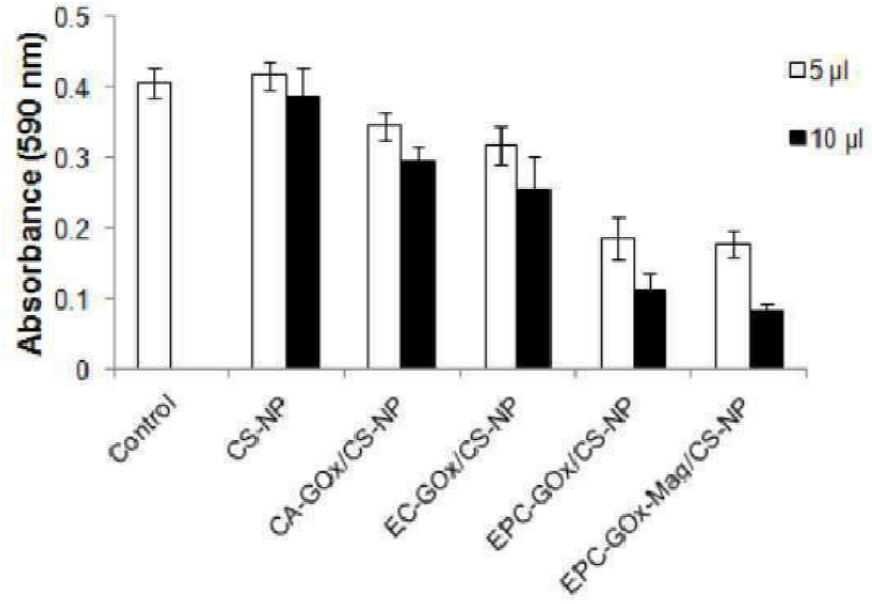
도면10


1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0
Absorbance (600 nm)
Control
CS-NPs
CA-GOx/CS-NP
EC-GOx/CS-NP
EPC-GOx/CS-NP
EPC-GOx-Mag/CS-NP
0
1
2
3
4
5
6
Time (h)

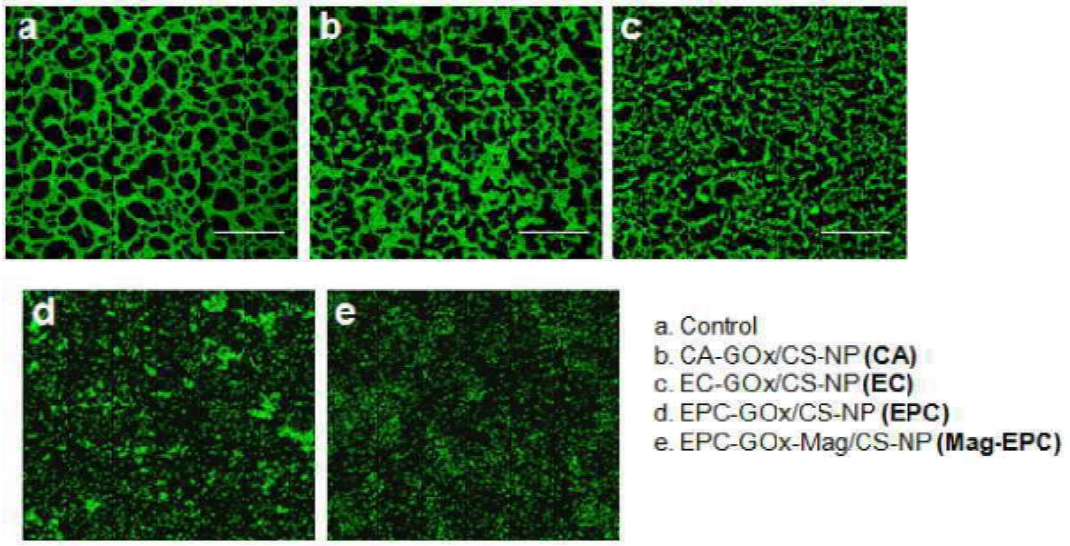
도면11


(a)
Fluorescence intensity (a.u)
25
20
15
10
5
0
1 μl 5 μl 10 μl 20 μl
CA-GOx/CS-NP
1 h
3 h
6 h
(b)
Fluorescene intensity (a.u)
50
40
30
20
10
0
1 μl 5 μl 10 μl 20 μl
EC-GOx/CS-NP
1 h
3 h
6 h
(c)
Fluorescence intensity (a.u)
150
125
100
75
50
25
0
1 μl 5 μl 10 μl 20 μl
EPC-GOx/CS-NP
1 h
3 h
6 h
(d)
Fluorescence intensity (a.u)
150
125
100
75
50
25
0
1 μl 5 μl 10 μl 20 μl
EPC-GOx-Mag/CS-NP
1 h
3 h
6 h

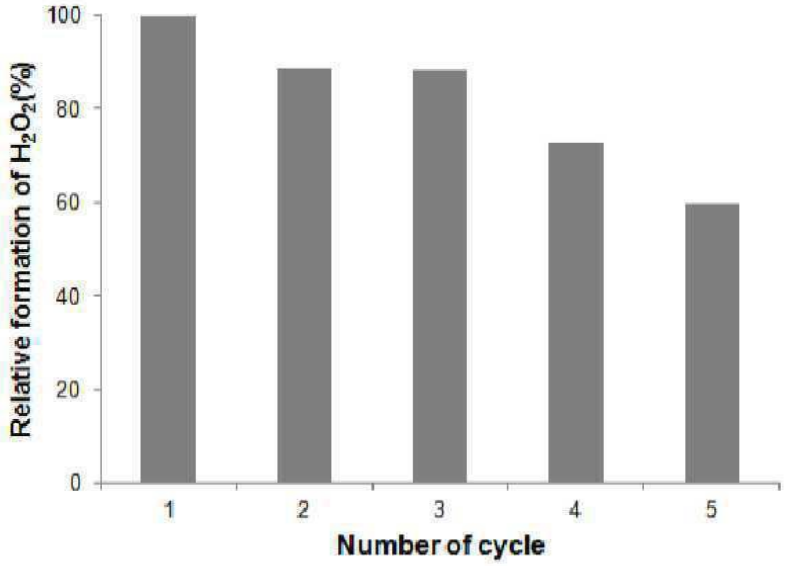
도면12


Absorbance (590 nm)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
5 μl
10 μl
Control
CS-NP
CA-GOx/CS-NP
EC-GOx/CS-NP
EPC-GOx/CS-NP
EPC-GOx-Mag/CS-NP

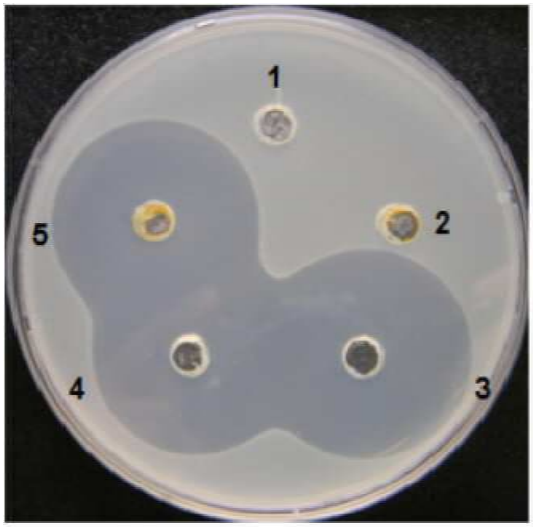
도면13


a
b
c
d
e
a. Control
b. CA-GOx/CS-NP (CA)
c. EC-GOx/CS-NP (EC)
d. EPC-GOx/CS-NP (EPC)
e. EPC-GOx-Mag/CS-NP (Mag-EPC)

도면14


Relative formation of H2O2(%)
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
Number of cycle

도면15



1. Chitosan NP (CS-NP)
2. Magnetic NP (Mag)
3. CA-GOx/CS-NP
4. EC-GOx/CS-NP
5. EPC-GOx-Mag/CS-NP