(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0041065
(43) 공개일자 2018년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/40 (2006.01) *C12M 1/12* (2006.01)
C12N 11/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 21/18 (2013.01)
C12M 25/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0128033
(22) 출원일자 2017년09월29일
심사청구일자 2017년09월29일
(30) 우선권주장
1020160132989 2016년10월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김중배
서울특별시 강남구 역삼로 309, 101동 1501호 (역삼동, 래미안펜타빌아파트)
김한솔
경기도 용인시 기흥구 언남로 15, 206동 1701호 (언남동,동일하이빌2차)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 18 항

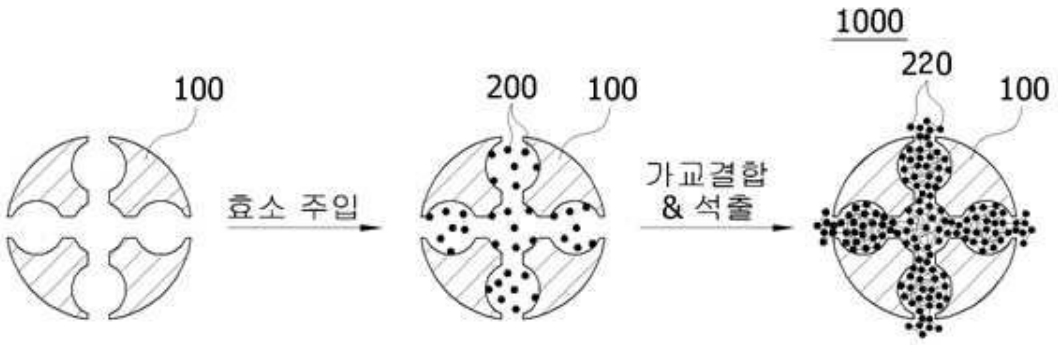
(54) 발명의 명칭 **효소-다공성담체 복합체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명의 효소-다공성담체 복합체 및 이의 제조방법은 다공성담체의 공극 내부에 효소를 집적시켜 단단하게 고정할 수 있으며, 다공성 물질의 외부까지 효소의 고정에 활용함으로써 효소의 고정화양 및 활성의 안정성을 동시에 향상시킬 수 있다.

또한, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체 및 이의 제조방법은 다른 물질과의 결합이 가능하고, 향상된 결합 표면적으로 인하여 다양한 기술분야에 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 11/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20142020200980
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국에너지기술평가원
연구사업명 에너지기술개발사업
연구과제명 나노바이오촉매 기반 고효율 이산화탄소 전환 및 활용 기술개발
기 여 율 80/100
주관기관 고려대학교
연구기간 2016.10.01 ~ 2017.09.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014K1A1A2043032
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 글로벌연구실사업
연구과제명 미생물 오염 방지 및 제거를 위한 나노바이오촉매 소재 개발
기 여 율 20/100
주관기관 고려대학교
연구기간 2017.07.01 ~ 2018.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

다공성담체;및

상기 다공성담체의 공극 내부 및 상기 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체;를 포함하는 효소-다공성담체 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 효소-다공성담체 복합체는 상기 공극 내부에 형성된 가교결합 효소집합체인 제1 가교결합 효소집합체 및 상기 다공성담체 외부에 형성된 가교결합 효소집합체인 제2 가교결합 효소집합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 효소-다공성담체 복합체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 제1 가교결합 효소집합체 및 제2 가교결합 효소집합체는 상이한 효소가 혼합된 형태로 형성된 것을 특징으로 하는 효소-다공성담체 복합체.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 제1 가교결합 효소집합체 및 제2 가교결합 효소집합체는 서로 동일한 효소로 형성된 것을 특징으로 하는 효소-다공성담체 복합체.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 제1 가교결합 효소집합체 및 제2 가교결합 효소집합체는 서로 상이한 효소로 형성된 것을 특징으로 하는 효소-다공성담체 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 다공성담체는 실리카, 알루미나, 니오비움, 탄탈륨, 지르코늄, 카본, 마그네슘, 티타늄 및 고분자로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-다공성담체 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 효소는 탄산무수화효소, 트립신, 당산화효소, 알코올탈수소효소, 포름산탈수소효소, 포름알데하이드탈수소효소, 서브틸리신, 파파인, 리파아제, 호스래디시 퍼옥시다아제, 소이빈 퍼옥시다아제, 클로로 퍼옥시다아제, 망가네이즈 퍼옥시다아제, 티로시나제, 락카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 수크라아제, 오가노 포스포 히드라아제, 콜린 에스터아제, 글루코스 히드라아제, 글루코스 이소머아제, 콜레스테롤 옥시다아제, 폴리페놀 옥시다아제, 모노아민 옥시다아제, 잔틴 옥시다아제, 시토토크롬 옥시다아제, 아스코르브산 옥시다아제, 및 D-아라비노-1,4-락톤 옥시다아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-다공성담체 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 효소-다공성담체 복합체는 바이오전환 소재용, 바이오정화 소재용, 바이오센서 소재용 또는 바이오 연료전지 소재용인 것을 특징으로 하는 효소-다공성담체 복합체.

청구항 9

효소-다공성담체 복합체;및

상기 효소-다공성담체 복합체를 일부 또는 전부 둘러싸는 한 층 이상의 가교결합 효소 층;을 포함하며,

상기 가교결합 효소 층과 효소-다공성담체 복합체의 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체 간에 화학결합이 형성되어 있으며,

상기 효소-다공성담체 복합체는, 다공성담체, 상기 다공성담체의 공극 내부 및 상기 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 다층 효소-다공성담체 복합체.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 가교결합 효소 층은 상기 효소-다공성담체 복합체에 포함되는 효소와 상이한 효소로 구성되는 것을 특징으로 하는 다층 효소-다공성담체 복합체.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 가교결합 효소 층은 상기 가교결합 효소집합체 층인 것을 특징으로 하는 다층 효소-다공성담체 복합체.

청구항 12

(1) 다공성담체의 공극 내부 및 다공성담체의 외부에 효소를 흡착하는 단계;및

(2) 상기 효소가 흡착된 다공성담체에 석출화제 및 가교결합제를 첨가하여, 상기 효소들은 석출 및 가교결합을 통해 효소-다공성담체 복합체를 형성하는 단계;를 포함하는 효소-다공성담체 복합체 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 (2) 단계의 석출화제 및 가교결합제는 동시에 첨가하는 것을 특징으로 하는 효소-다공성담체 복합체 제조

방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 (2) 단계 수행 시 효소들은 석출 및 가교결합을 통해, 다공성담체의 공극 내부 및 상기 다공성담체의 외부에서 가교결합 효소집합체를 형성하는 것을 특징으로 하는 효소-다공성담체 복합체 제조방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 (2) 단계의 석출화제는 설페이트, 포스페이트, 클로라이드 및 플로라이드 중 어느 하나의 음이온과 암모늄, 포타슘 및 나트륨 중 어느 하나의 양이온으로 구성되는 이온성 물질, 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알콜, 아세톤, 폴리에틸렌글리콜로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-다공성담체 복합체 제조방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 (2) 단계의 가교결합제는 글루타르알데하이드, 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르) 및 디애시드 클로라이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소-다공성담체 복합체 제조방법.

청구항 17

(1) 다공성담체의 공극 내부 및 다공성담체의 외부에 효소를 흡착하는 단계;

(2) 상기 효소가 흡착된 다공성담체에 석출화제 및 가교결합제를 첨가하여, 상기 효소들은 석출 및 가교결합을 통해 효소-다공성담체 복합체를 형성하는 단계;및

(3) 상기 효소-다공성담체 복합체에 가교결합제를 첨가하여, 상기 효소-다공성담체 복합체를 일부 또는 전부 둘러싸는 한 층 이상의 가교결합 효소 층을 형성하는 단계;를 포함하는 다층 효소-다공성담체 복합체 제조방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 (2) 단계는, 가교결합제와 함께 석출화제를 첨가하여, 상기 효소-다공성담체 복합체를 일부 또는 전부 둘러싸는 한 층 이상의 가교결합 효소집합체 층을 형성하는 것을 특징으로 하는 다층 효소-다공성담체 복합체의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 효소-다공성담체 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 보다 많은 양의 효소를 효과적으로 고정함으로써 효소의 고정화양 및 활성의 안정성을 동시에 향상시킬 수 있는 효소-다공성담체 복합

체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 효소는 생체 내에서 다양한 화학반응의 촉매 작용을 하는 물질로, 화학 촉매(catalyst)에 비하여 반응물에 대한 선택성(selectivity)이 우수하고 반응속도가 빠른 장점이 있다. 효소를 다양한 기술분야에 응용하기 위해서는 효소의 고정화 및 효소 변성의 방지를 통한 효소활성의 안정성 향상이 필요하다. 고정화된 효소의 사용은 반응기의 설계나 컨트롤을 매우 간편하게 할 수 있어 효소를 산업적으로 활용하기 위해 필수적인 요소라 할 수 있다.

[0003] 다공성 물질(porous materials)은 내부에 형성된 기공들의 높은 공극 부피(pore volume)을 활용하여, 기존의 방법들에 비해 훨씬 높은 효소 담지량을 실현할 수 있다. 또한, 기공의 내부에 효소를 담지하기 때문에, 가혹한 외부 환경으로부터 내부의 효소를 보호할 수 있다. 상기 다공성 물질을 이용한 일반적인 효소 고정화 방법으로는 단순 흡착(adsorption) 방법이 있다. 하지만, 상기 단순 흡착 방법은 기공 내의 효소가 누출되는 현상을 방지할 수 없으며, 누출된 효소는 세척 과정에서 손실되어 활성의 감소로 이어질 수 있다.

[0004] 이러한 문제점을 해결하기 위해, 다공성 물질 내에 효소 담지량을 높이고 효소의 누출을 방지하는 아주 간단하고 효과적인 방법으로 NER(Nanoscale Enzyme Reactor) 접근방식이 고안되었다. 쉽-인-어-바틀(ship-in-abottle) 접근방식으로도 불리는 상기 NER 기술은 다공성 물질의 공극 안에서 효소를 가교결합시켜 효소의 누출을 효과적으로 방지함으로써 효소활성을 안정화할 수 있다.

[0005] 그러나, 상기 NER 기술은 다공성 물질의 공극 내에만 효소를 고정하기 때문에 효소가 고정화 될 수 있는 양에 제한이 있기 때문에 단위 무게의 다공성 물질 당 효소의 고정화양이 한정되는 문제점이 있다. 이에 따라 다공성 물질을 이용하여 효과적으로 고정하고 집적하여 효소의 고정화양 및 활성의 안정성을 향상시키는 기술이 필요한 실정이다. 특히, 다공성 물질의 외부를 효소 고정에 이용하는 경우, 외부로 노출된 효소의 안정성 감소를 최소화 하는 기술이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 2016-0092652

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 보다 많은 양의 효소를 효과적으로 고정할 수 있고, 다공성 물질의 외부까지 효소의 고정에 활용함으로써 효소의 고정화양 및 활성의 안정성을 동시에 향상시킬 수 있는 효소-다공성담체 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 다른 물질과의 결합이 용이한 작용기를 갖고, 결합 가능한 표면적 넓어 다양한 기술분야에 활용될 수 있는 효소-다공성담체 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 상술한 과제를 해결하기 위하여, 다공성담체, 상기 다공성담체의 공극 내부 및 상기 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체를 포함하는 효소-다공성담체 복합체를 제공한다.

[0010] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 효소-다공성담체 복합체는 상기 공극 내부에서 가교결합된 효소집합체인 제1 가교결합 효소집합체 및 상기 다공성담체 외부에서 형성된 제2 가교결합 효소집합체를 포함할 수 있다.

[0011] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 제1 가교결합 효소집합체 및 제2 가교결합 효소집합체는 상이한 효소가 혼합된 형태로 형성될 수 있다.

[0012] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 제1 가교결합 효소집합체 및 제2 가교결합 효소집합체는

서로 동일한 효소로 형성될 수 있다.

[0013] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 제1 가교결합 효소집합체 및 제2 가교결합 효소집합체는 서로 상이한 효소로 형성될 수 있다.

[0014] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 다공성담체는 실리카, 알루미나, 니오비움, 탄탈륨, 지르코늄, 카본, 마그네슘, 티타늄 및 고분자로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0015] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 효소는 탄산무수화효소, 트립신, 당산화효소, 알코올탈수소효소, 포름산탈수소효소, 포름알데하이드탈수소효소, 서브틸리신, 파파인, 리파아제, 호스래디시 퍼옥시다아제, 소이빈 퍼옥시다아제, 클로로 퍼옥시다아제, 망가네이즈 퍼옥시다아제, 티로시나제, 락카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 수크라아제, 오가노 포스포 히드라아제, 콜린 에스터아제, 글루코스 히드라아제, 글루코스 이소머아제, 콜레스테롤 옥시다아제, 폴리페놀 옥시다아제, 모노아민 옥시다아제, 잔틴 옥시다아제, 시토토크롬 옥시다아제, 아스코르브산 옥시다아제, 및 D-아라비노-1,4-락톤 옥시다아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0016] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 효소-다공성담체 복합체는 바이오전환 소재용, 바이오정화 소재용, 바이오센서용 또는 바이오 연료전지용일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기의 어느 하나의 효소-다공성담체 복합체 및 상기 효소-다공성담체 복합체를 일부 또는 전부 둘러싸는 한 층 이상의 가교결합 효소 층을 포함하며, 상기 가교결합 효소 층과 효소-다공성담체 복합체의 복합체의 다공성담체의 외부에서 형성된 가교결합 효소집합체간에 화학결합이 형성되어 있는 다층 효소-다공성담체 복합체를 제공한다.

[0018] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 가교결합 효소 층은 가교결합 효소집합체 층일 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 가교결합 효소 층은 상기 효소-다공성담체 복합체에 포함되는 효소와 상이한 효소로 구성될 수 있다.

[0020] 나아가, 본 발명은 (1) 다공성담체의 공극 내부 및 다공성담체 외부에 효소를 흡착하는 단계 (2) 상기 효소가 흡착된 다공성담체에 석출화제 및 가교결합제를 첨가하여, 상기 효소들은 석출 및 가교결합을 통해 효소-다공성담체 복합체를 형성하는 단계를 포함하는 효소-다공성담체 복합체 제조방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (2) 단계의 석출화제 및 가교결합제는 동시에 첨가할 수 있다.

[0022] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (2) 단계 수행 시 효소들은 석출 및 가교결합을 통해, 다공성담체의 공극 내부와 다공성담체의 외부에서 가교결합 효소집합체를 형성할 수 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (2) 단계의 석출화제는 설페이트, 포스페이트, 클로라이드 및플로라이드 중 어느 하나의 음이온과 암모늄, 포타슘 및 나트륨 중 어느 하나의 양이온으로 구성되는 이온성 물질, 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알콜, 아세톤, 폴리에틸렌글리콜로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0024] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (2) 단계의 가교결합제는 글루타르알데하이드, 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸아미노프로필카보디이미드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르) 및 디애시드 클로라이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0025] 또한 본 발명은 (1) 다공성담체의 공극 내부 및 다공성담체의 외부에 효소를 흡착하는 단계 (2) 상기 효소가 흡착된 다공성담체에 석출화제 및 가교결합제를 첨가하여, 상기 효소들은 석출 및 가교결합을 통해 효소-다공성담체 복합체를 형성하는 단계 및 (3) 상기 효소-다공성담체 복합체에 가교결합제를 첨가하여, 상기 효소-다공성담체 복합체를 일부 또는 전부 둘러싸는 한 층 이상의 가교결합 효소 층을 형성하는 단계를 포함하는 다층 효소-다공성담체 복합체 제조방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (2) 단계에서 가교결합제와 함께 석출화제를 첨가하여, 상기 효소-다공성담체 복합체를 일부 또는 전부 둘러싸는 한 층 이상의 가교결합 효소집합체 층을 형성할 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 효소-다공성담체 복합체 및 이의 제조방법은 다공성담체의 공극 내부에 효소를 집적시켜 단단하게 고

정할 수 있으며, 다공성 물질의 외부까지 효소의 고정에 활용함으로써 효소의 고정화양 및 활성의 안정성을 동시에 향상시킬 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체 및 이의 제조방법은 다른 물질과의 결합이 가능하고, 향상된 결합 표면적으로 인하여 다양한 기술분야에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 제조과정을 나타낸 구조도이다.

도 2는 통상적인 다공성담체 내부에 효소를 담지하는 NER(Nanoscale Enzyme Reactor) 방식의 효소 고정화 과정을 나타낸 구조도이다.

도 3은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 SEM 이미지이다.

도 4는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 다공성담체의 단위 무게 당 효소의 활성을 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 반감기를 측정한 그래프이다.

도 6은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 (a) 효소-다공성담체 복합체 제조 과정 (b) 효소의 활성을 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 (a) 효소-다공성담체 복합체 (b) 다층 효소-다공성담체 복합체를 나타낸 도면이다.

도 8a는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 제조과정을 나타낸 구조도이다.

도 8b는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 SEM 이미지이다.

도 8c는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 활성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 실시예에 대하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세하게 설명한다. 다만, 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0031] 상술한 바와 같이, 효소의 활성을 향상시키고 변성을 방지하기 위하여 통상적으로 이용되는 NER 기술은 다공성 물질의 공극 부피로 인해 효소가 고정화 될 수 있는 양에 제한이 있기 때문에 단위 무게의 다공성 물질 당 효소의 고정화양이 한정되는 문제점이 있었다.

[0032] 이에 본 발명의 발명자는, 보다 많은 양의 효소를 효과적으로 고정할 수 있고, 다공성 물질의 외부까지 효소의 고정에 활용함으로써 효소의 고정화양을 향상시킬 수 있고, 이와 동시에 활성의 안정성을 향상시킬 수 있는 효소 고정화 방안을 모색하였다. 그 결과 다공성담체, 상기 다공성담체의 공극 내부 및 상기 다공성담체의 외부에서 형성된 가교결합 효소집합체를 포함하는 효소-다공성담체 복합체를 제공하여 상술한 한계점의 극복방안을 제공하게 되었다.

[0033] 본 발명의 효소-다공성담체 복합체(1000)는, 다공성담체(100)의 공극 내부에 고도로 석출되어 가교결합된 효소집합체(200)를 형성함으로써 다공성담체의 공극 내부에 효소를 단단하게 고정할 수 있어 효소의 고정화 양 및 활성의 안정성을 향상시킬 수 있음과 동시에, 상기 공극 내부에 형성된 가교결합 효소집합체와 연결되고, 다공성담체의 외부에서 형성된 가교결합 효소집합체를 포함함으로써 내부에만 효소가 담지된 경우에 비하여 현저히 향상된 효소의 고정화양 및 활성의 안정성을 달성할 수 있고, 다공성담체의 외부에서 형성된 가교결합 효소집합체를 통해 다른 물질과의 결합이 가능한 장점이 있다.

[0034] 구체적으로 도 1은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 제조과정을 나타낸 구조도이다. 상기 도면을 참조하면, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체(1000)는 다공성담체(100)의 공극 내부에 고도로 석출되어 가교결합된 효소집합체(200)를 형성하고, 공극 내부에서 형성된 가교결합 효소집합체와 연결되고, 다공성담체(100)의 외부에서 형성된 가교결합 효소집합체를 포함하는 구조를 가짐을 확인할 수 있다. 또한, 도 2는 통상적인 다공성담체(100) 내부에 효소를 담지하는 NER(Nanoscale Enzyme Reactor) 방식의 효소 고정화 과정

을 나타낸 구조도이고, 상기 도면을 참조하면 이 경우 역시 다공성담체 내부에 담지되는 효소의 양에 한계가 있고, 효과적인 효소의 집적이 어려워 효소의 활성 및 안정성에 한계가 있음을 알 수 있다.

[0035] 먼저, 상기 다공성담체(100)는 하나 이상의 공극을 갖는 담체를 의미하며, 바람직하게는 내부에 1 ~ 1000nm 크기의 하나 이상의 공극을 갖는 담체를 의미하며 공극의 크기에 따라 마이크로포러스(microporous, pore < 2 nm), 메조포러스(mesoporous, 2 nm < pore < 50 nm), 메크로포러스 (macroporous, pore > 50 nm) 물질로 구분할 수 있다.

[0036] 상기 다공성담체(100)는 다공성담체의 외부 표면 상에 작용기를 포함할 수도 있고, 포함하지 않을 수도 있다. 작용기를 포함하는 경우에는 다공성담체(100)의 외부 공간을 용이하게 활용할 수 있는 장점이 있다. 뿐만 아니라 본 발명의 효소-다공성담체 복합체(1000)는 외부 표면 상에 작용기를 포함하지 않는 다공성담체(100)를 사용할 수 있는데, 이 경우에는 별도의 표면 개질 없이도 다공성담체(100)의 외부 공간을 활용할 수 있는 장점이 있다. 즉, 본 발명은 다공성담체(100)의 외부 표면 상에 작용기를 포함하는 경우는 물론, 작용기를 포함하지 않는 경우에도 다공성담체(100)의 외부 공간을 효과적으로 활용할 수 있고 이와 동시에 고정화된 효소의 양을 달성할 수 있는 효과가 있다.

[0037] 또한, 상기 다공성담체(100)는 공극 내부에 효소를 담지하여 효소-다공성담체 복합체(1000)를 형성할 수 있는 것으로 해당 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 것이면 공극의 크기 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 실리카, 알루미나, 니오비움, 탄탈륨, 지르코늄, 카본, 마그네슘, 티타늄 및 고분자로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며 MPS (mesoporous silica), MCM (mobil composition of matter), SBA (Santa Barbara materials), CNS (MPS with cyanofuntional groups), OMC (ordered mesoporous carbon), MCF-C (mesocellular carbon foam) 또는 SCMS (supplementary cementitious materials)의 형태로 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 MCF (mesocellular foam)일 수 있다.

[0038] 상기 다공성담체(100)의 공극 내부에 '담지'된 효소는, 효소가 담체 내부에 충진된 상태로 존재하여 효소집합체를 형성할 수 있는 상태로 제한 없이 존재할 수 있고, 물리적 결합 없이도 존재할 수 있으나, 바람직하게는 다공성담체 내부와 흡착된 상태로 담지되어 있을 수 있다.

[0039] 또한, 상기 다공성담체(100) 내부에는 나노자성입자, 코팩터(cofactor) 등이 효소와 함께 담지되거나 흡착될 수도 있다.

[0040] 또한, 본 발명에 사용될 수 있는 효소는 다공성담체(100)에 담지되어 효소-다공성담체 복합체를 형성할 수 있는 것이면 제한이 없으나, 바람직하게는 상기 효소는 탄산무수화효소, 트립신, 당산화효소, 알코올탈수소효소, 포름산탈수소효소, 포름알데하이드탈수소효소, 서브틸리신, 파파인, 리파아제, 호스래디시 퍼옥시다아제, 소이빈 퍼옥시다아제, 클로로 퍼옥시다아제, 망가네이즈 퍼옥시다아제, 티로시나제, 락카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 수크라아제, 오가노 포스포 히드라아제, 콜린 에스터아제, 글루코스 히드라아제, 글루코스 이소머아제, 콜레스테롤 옥시다아제, 폴리페놀 옥시다아제, 모노아민 옥시다아제, 잔틴 옥시다아제, 시토토크롬 옥시다아제, 아스코르브산 옥시다아제, 및 D-아라비노-1,4-락톤 옥시다아제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0041] 상기 효소를 사용하여 효소-다공성담체 복합체(1000)를 형성하는 경우, 바이오전환 소재용, 바이오정화 소재용, 바이오센서용 또는 바이오 연료전지용 등 다양한 분야에서 활용가치가 높은 장점이 있다.

[0042] 다음으로, 다공성담체의 공극 내부에 형성된 가교결합 효소집합체(200)를 설명한다.

[0043] 다공성담체의 공극 내부에 담지된 효소들은 가교결합하여 공극 내부에 형성된 가교결합 효소집합체(200)를 형성한다. 효소들의 가교결합은 공극 내부에 담지된 효소들 간에 형성되는 것으로 공극 내부에 흡착된 효소들 간에도 형성 가능하다.

[0044] 이와 같이 가교결합 효소집합체(200)는 다공성담체의 공극 입구의 크기보다 커지게 되어 다공성담체(100)의 공극 내부에 효소를 단단하게 고정할 수 있다. 뿐만 아니라 시간이 경과하여도 상기 공극 내부에 효소집합체가 위치하게 된다. 이에 따라 다공성담체(100)와 효소들간에 공유결합과 같은 직접적인 결합관계를 형성하지 않더라도 가교결합 효소집합체(200)가 다공성담체(100)의 공극 내부에 장기간 구비될 수 있으므로, 다공성담체의 내부를 효소와 공유결합 등의 직접적인 결합관계를 형성하도록 개질할 필요가 없어 보다 용이하게 효소-다공성담체 복합체(1000)를 형성할 수 있는 장점이 있다.

[0045] 또한, 상기 가교결합된 효소집합체(200)는 고도로 석출된 상태로 가교결합 되어 있어 다공성담체(100) 내에 고

도로 집적된 상태로 존재할 수 있다. 이를 통해 공극의 단위 부피당 보다 많은 양의 효소가 고정화될 수 있어, 다공성담체의 단위 무게 당 효소의 고정화양이 증가하게 되는 효과가 있다.

[0046] 구체적으로 도 4는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체(1000)의 다공성담체의 단위 무게 당 효소의 활성을 나타낸 그래프이다. 상기 도면을 살펴보면, 본 발명에 따른 효소-다공성담체 복합체인 p-NER의 경우 다공성담체의 단위 무게 당 효소의 활성이 종래의 효소 고정화 기술의 경우에 비하여 현저히 높음을 확인할 수 있다. 이를 통해 본 발명의 효소-다공성담체 복합체는 종래의 공극 내부에서 효소가 고정화 될 수 있는 양에 제한이 있어 효소의 활성이 낮은 한계점을 극복하여, 효소의 고정화양이 현저히 향상되었음을 알 수 있다.

[0047] 뿐만 아니라, 이와 같이 상기 효소집합체가 석출된 상태로 가교결합 되는 경우, 효소들이 밀집된 상태로 가교결합을 형성하게 되어 더욱 단단하게 고정화될 수 있는 효과가 있다. 이에 따라 안정성이 우수한 효소-다공성담체 복합체를 제공할 수 있다.

[0048] 구체적으로 도 5는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 반감기를 측정한 그래프이다. 상기 그래프를 살펴보면, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체인 p-NER의 경우 반감기가 762일로 종래의 NER 기술의 373일 보다 현저히 길다. 이를 통해 본 발명의 효소-다공성담체 복합체의 안정성이 매우 우수함을 알 수 있다.

[0049] 다음으로, 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체(220)에 대해서 설명한다.

[0050] 본 발명의 효소-다공성담체 복합체는 상기 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체(220)를 포함한다. 즉, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체는 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체(220)를 포함하여 다공성담체의 외부로 가교결합 효소집합체가 노출되어 있는 양상으로 존재할 수 있는 것이다.

[0051] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체는 효소들이 가교결합된 효소집합체로 존재하는 것으로, 효소들간 단단히 고정되어 있어 우수한 안정성을 보인다. 또한, 상기 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체를 통해 효소의 고정화양이 향상될 수 있는 효과가 있다.

[0052] 구체적으로 도 6은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 (a) 효소-다공성담체 복합체 제조 과정 (b) 효소의 활성을 나타낸 도면이다. 상기 도 6(a)를 살펴보면, 다공성담체(100) 내부에만 효소가 담지되는 고정화 방식인 통상적인 NER 기술(상단)에 비하여 본 발명에 따른 효소-다공성담체 복합체(1000)의 경우에는 다공성담체(100) 내부/외부를 모두 활용할 수 있음을 확인할 수 있다. 또한, 도 6(b)는 본 발명의 효소-다공성담체 복합체(1000)에 포함되는 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체(220)에 따른 효소의 활성을 나타낸 그래프인데, 후술하는 바와 같이 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체의 효소의 활성으로 인해 본 발명의 경우 현저히 향상된 활성을 보임을 알 수 있다.

[0053] 뿐만 아니라, 상기 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체 (220)를 포함함으로써 본 발명의 효소-다공성담체 복합체는 별도의 표면 개질 없이도 다공성담체의 외부 공간을 활용할 수 있는 장점이 있다. 구체적으로, 기존의 NER의 경우엔 다공성담체에 다른 물질을 추가적으로 결합하기 위해서는 다공성담체의 표면을 개질하는 추가적인 공정이 수반되어야 했으나, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체의 경우에는 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체(220)를 포함하여, 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체 220)를 구성하는 효소들의 작용기를 활용하여 용이하게 화학결합을 형성할 수 있어 별도의 표면 개질 공정이 필요하지 않다. 뿐만 아니라, 상기 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체 (220)의 양을 조절하여 화학결합을 형성할 수 있는 결합 가능한 표면적을 쉽게 조절할 수 있다. 이에 따라, 보다 다양한 기술 분야에서 활용 가능한 효소-다공성담체 복합체를 제공할 수 있는 장점이 있다.

[0054] 또한, 상기 효소집합체는 상기 공극 내부에서 가교결합된 효소집합체인 제1 가교결합 효소집합체 및 다공성담체 외부에 형성된 가교결합 효소집합체인 제2 가교결합 효소집합체를 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 제1 가교결합 효소집합체 및 제2 가교결합 효소집합체는 상이한 효소가 혼합된 형태로 형성될 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 제1 가교결합 효소집합체 및 제2 가교결합 효소집합체는 서로 동일한 효소로 형성될 수도 있고, 서로 상이한 효소로 형성될 수 있다. 제1 가교결합 효소집합체 및 제2 가교결합 효소집합체가 서로 상이한 효소로 형성되는 경우에 제1 가교결합 효소집합체를 형성하는 효소와 제2 가교결합 효소집합체를 형성하는 효소를 적절하게 선택하여, 물질전달 순서 등을 조절하여 연쇄반응 등의 반응을 용이하게 조절할 수 있는 효과가 있다. 예를 들어, 제1 가교결합 효소집합체는 당산화효소로 형성되고 제2

가교결합 효소집합체가 퍼옥시다아제로 형성되는 경우에는 1) 포도당의 내부 침투까지 걸리는 시간을 의도적으로 지연시킴으로써 연쇄반응속도를 조절할 수 있고, 2) 퍼옥시다아제를 통해 생성되는 최종 산물을 외부 공간에서 생성되도록 설계를 함으로써 최종 산물의 물질전달저항을 용이하게 조절할 수 있는 것이다.

[0056] 또한, 상기 제2 가교결합 효소집합체는 효소-다공성담체 복합체를 형성하여 목적하는 효소의 활성 및 안정성을 달성할 수 있는 함량이면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0057] 본 발명은 상술한 효소-다공성담체 복합체(1000) 및 상기 효소-다공성담체 복합체를 일부 또는 전부 둘러싸는 한 층 이상의 가교결합 효소 층(300)을 포함하며, 상기 가교결합 효소 층과 효소-다공성담체 복합체의 다공성담체의 외부에서 형성된 가교결합 효소집합체간에 화학결합이 형성되어 있는 다층 효소-다공성담체 복합체를 제공한다. 이 때, '가교결합 효소 층'은 효소들간의 가교결합을 통해 형성되는 다공성담체의 외부에 형성되는 층을 의미한다.

[0058] 이를 통해, 상술한 효소-다공성담체 복합체의 외부 공간을 다양하게 활용할 수 있어 바이오전환 소재용, 바이오정화 소재용, 바이오센서용 또는 바이오 연료전지용 등 다양한 분야에 폭넓게 활용될 수 있다.

[0059] 또한, 상기 가교결합 효소 층과 효소-다공성담체 복합체의 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체(220) 간에 화학결합이 형성되어 있는데, 이는 효소의 작용기를 활용하여 가교결합 효소집합체 층(300)을 형성함을 의미한다. 즉, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체는 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체를 포함함으로써 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체에 포함되는 효소의 작용기를 적극 활용할 수 있고, 이러한 활용의 일례로 한 층 이상의 가교결합 효소 층을 포함하는 '다층' 효소-다공성담체 복합체를 용이하게 제공할 수 있는 것이다.

[0060] 상기 '다층' 효소-다공성담체 복합체의 경우, 각 가교결합 효소 층 간에는 효소들의 작용기에 의한 화학결합이 형성되어 있다. 즉, 상술한 바와 같이 효소의 작용기의 활용을 통해서 한 층 이상의 가교결합 효소 층을 적층할 수 있는 것이다.

[0061] 구체적으로 도 7a 및 7b는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체(1000)의 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체(220)로 인한 연쇄반응 및 다층 효소-다공성담체 복합체(2000)를 나타낸 도면이다. 상기 도면을 살펴보면, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체는 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체(220)를 포함함으로써 상술한 바와 같이 연쇄 반응 등의 반응을 조절할 수 있고, 다층 구조의 효소-다공성담체 복합체(1000)를 제공할 수 있음을 알 수 있다.

[0062] 한편, 상기 가교결합 효소 층(300)은 가교결합제를 첨가하여 효소들간의 가교결합을 통해 형성될 수 있다. 본 발명의 바람직한 일실시에에 따르면, 상기 가교결합 효소 층(300)은 가교결합 효소집합체 층일 수 있다. 이 때, '가교결합 효소집합체 층'이란 효소들간의 가교결합과 석출을 통해 형성되는 다공성담체 외부에 형성된 층을 의미한다.

[0063] 본 발명의 바람직한 일실시에에 따르면, 상기 가교결합 (300)은 상기 효소-다공성담체 복합체에 포함되는 효소와 상이한 효소로 구성될 수 있다. 이를 통해 효소-다공성담체 복합체에 포함되는 효소들과 가교결합 효소 층의 효소를 적절하게 선택하여, 물질전달 순서 등을 조절하여 연쇄반응 등의 반응을 용이하게 조절할 수 있는 효과가 있다. 예를 들어, 상기 효소-다공성담체 복합체에 포함되는 효소집합체는 당산화효소로 형성되고 가교결합 효소 층의 효소가 퍼옥시다아제의 효소 형성되는 경우에는 1) 포도당의 내부 침투까지 걸리는 시간을 의도적으로 지연시킴으로써 연쇄반응속도를 조절할 수 있고, 2) 퍼옥시다아제를 통해 생성되는 최종 산물을 외부 공간에서 생성되도록 설계를 함으로써 최종 산물의 물질전달저항을 용이하게 조절할 수 있는 것이다.

[0064] 또한, 상기 가교결합 효소 층(300)의 두께는 상기 다공성담체 복합체를 둘러쌀 수 있을 정도로 형성되는 경우이면 제한이 없으나, 바람직하게는 효소-다공성담체 복합체의 직경 대비 1×10^{-10} ~ 2 배의 범위에서 선택될 수 있다.

[0065] 상기 가교결합 효소 층(300)은 단층으로 형성될 수도 있으며, 1 이상의 층으로 구성된 다층일 수도 있다.

[0066] 또한, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체는 바람직하게는 바이오전환 소재용, 바이오정화 소재용, 바이오센서용 또는 바이오 연료전지용 등 다양한 분야로 활용될 수 있는 장점이 있다.

[0067] 나아가, 본 발명은 (1) 다공성담체의 공극 내부 및 다공성담체 외부에 효소를 흡착하는 단계 (2) 상기 효소가 흡착된 다공성담체에 석출화제 및 가교결합제를 첨가하여, 상기 효소들은 석출 및 가교결합을 통해 효소-다공성

담체 복합체를 형성하는 단계를 포함하는 효소-다공성담체 복합체 제조방법을 제공한다.

[0068] 이하, 상술한 내용과 중복되는 내용을 제외하고 상세히 설명한다.

[0069] 먼저, (1) 다공성담체의 공극 내부 및 다공성담체 외부에 효소를 흡착하는 단계를 설명한다.

[0070] 상기 효소의 흡착은 효소가 다공성담체의 공극 내부 및 다공성담체의 외부에 담지되어 효소-다공성담체 복합체를 형성할 수 있는 방법으로, 통상적으로 사용되는 방법을 통해 흡착될 수 있다.

[0071] 다음으로, (2) 상기 효소가 흡착된 다공성담체에 석출화제 및 가교결합제를 첨가하여, 상기 효소들은 석출 및 가교결합을 통해 효소-다공성담체 복합체를 형성하는 단계를 설명한다.

[0072] 상기 석출화제는 설페이트, 포스페이트, 클로라이드 및 플로라이드 중 어느 하나의 음이온과 암모늄, 포타슘 및 나트륨중 어느 하나의 양이온으로 구성되는 이온성 물질, 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알콜, 아세톤, 폴리에틸렌글리콜로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0073] 상기 석출화제에 사용 가능한 용매로는, 효소-다공성담체 복합체 내의 효소들을 석출시킬 수 있는 것으로 통상의 기술 분야에서 사용되는 것이면 제한 없이 이용가능하나, 바람직하게는 물을 사용할 수 있다.

[0074] 상기 석출화제의 농도는 바람직하게는 5 ~ 95중량%일 수 있으며, 보다 바람직하게는 20 ~ 80중량%일 수 있다. 만일 석출화제의 농도가 5중량% 미만인 경우에는 다공성담체의 공극 내부에서 효소가 충분히 석출되지 않을 수 있으며, 만일 석출화제의 농도가 95중량%를 초과하는 경우에는 효소의 과도한 석출로 인해 효소들이 용액으로부터 분리되어 비균질적인 석출체를 형성하는 문제가 발생할 수 있다.

[0075] 또한, 상기 가교결합제는 글루타르알데하이드, 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르) 및 디애시드 클로라이드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0076] 상기 가교결합제에 사용 가능한 용매로는, 효소-다공성담체 복합체 내의 효소들 간 가교결합을 형성할 수 있는 것으로 통상의 기술 분야에서 사용되는 것이면 제한 없이 이용가능하나, 바람직하게는 물을 사용할 수 있다.

[0077] 상기 가교결합제의 농도는 바람직하게는 0.05 ~ 50중량%일 수 있으며, 보다 바람직하게는 0.1 ~ 10중량%일 수 있다. 만일 가교결합제의 농도가 0.05중량% 미만인 경우에는 다공성담체의 공극 내부에서 효소들 간의 가교결합이 용이하지 못하여 효소의 누출을 효과적으로 방지할 수 없으며, 만일 가교결합제의 농도가 50중량%를 초과하는 경우에는 일부 효소의 경우 효소의 변성을 유발하는 문제가 발생할 수 있다.

[0078] 또한, 상기 가교결합제는 다공성담체에 주입된 효소의 함량에 대비하여 과량으로 첨가하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 석출화제는 다공성담체에 주입된 효소를 석출하여 효소집합체를 형성할 수 있는 함량이면 제한없이 첨가할 수 있다

[0079] 상기 (2) 단계 수행 시 효소들은 석출 및 가교결합을 통해, 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체를 형성할 수 있다. 즉, 석출화제의 첨가에 의해 효소들이 석출/석출하게 되고, 가교결합제를 함께 첨가함으로써 효소들 간 가교결합을 형성하여 공극 내부에 형성된 가교결합 효소집합체와 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체를 형성할 수 있는 것이다.

[0080] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (2) 단계의 석출화제 및 가교결합제는 동시에 첨가할 수 있다. 본 발명이 목적하는 상술한 한계점을 극복한 효소-다공성담체 복합체를 형성하기 위해서는 석출화제 및 가교결합제를 동시에 첨가하여야만 하는데, 이를 통해 담체의 공극 내부 및 담체의 외부에서 효소들이 고도로 석출된 채로 긴밀하게 가교결합을 형성하여 효소집합체를 형성할 수 있다.

[0081] 만일 석출화제를 먼저 첨가하여 석출을 먼저 수행한 후 가교결합제를 첨가하여 효소들의 가교결합을 형성하는 경우에는 효소들이 고도로 석출된 채로 긴밀하게 가교결합을 형성하지 못하여, 다공성담체의 외부에서 가교결합 효소집합체를 형성하기 어려운 문제점이 발생할 수 있다.

[0082] 구체적으로 도 8a는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 제조과정을 나타낸 구조도이고, 도 8b는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 SEM 이미지이며, 도 8c는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 효소-다공성담체 복합체의 활성을 나타낸 그래프이다. 상기 도 8a를 살펴보면, 석출화제 및 가교결합제를 동시에 첨가하여 석출 및 가교결합을 동시에 수행하는 경우에는 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체가 형성되어 본 발명이 목적하는 효소-다공성담체 복합체를 제조할 수 있음을 알 수

있다. 반면, 석출화제를 먼저 첨가하고 그 후 가교결합제를 첨가하는 경우에는 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체가 형성되지 않고, 효소집합체가 공극 내부에만 형성되어 있음을 확인할 수 있다. 이는 도 8b의 SEM 이미지를 통해서도 확인할 수 있는데, 석출화제 및 가교결합제를 동시에 첨가하여야만 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체가 형성되어 있음을 알 수 있다. 그 결과, 도 8c의 그래프와 같이 본 발명의 효소-다공성담체 복합체의 효소의 활성이 현저히 향상됨을 확인할 수 있다.

[0083] 또한, 본 발명은 상기의 적어도 어느 하나의 효소-다공성담체 복합체에 가교결합제를 첨가하여, 상기 효소-다공성담체 복합체를 일부 또는 전부 둘러싸는 한 층 이상의 가교결합 효소 층을 형성하는 단계를 포함하는 다층 효소-다공성담체 복합체 제조방법을 제공한다.

[0084] 이를 통해 상기 효소-다공성담체 복합체의 외부 공간을 다양하게 활용할 수 있어 바이오전환 소재용, 바이오정화 소재용, 바이오센서용 또는 바이오 연료전지용 등 다양한 분야에 폭넓게 활용될 수 있다.

[0085] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (2) 단계에서 가교결합제와 함께 석출화제를 첨가하여, 상기 효소-다공성담체 복합체를 일부 또는 전부 둘러싸는 한 층 이상의 가교결합 효소집합체 층을 형성할 수 있다.

[0086] 즉, 상술한 바와 같이 가교결합체를 첨가하여 한 층 이상의 가교결합 효소 층을 형성할 수도 있고, 가교결합제 및 석출화제를 함께 첨가하여 한 층 이상의 가교결합 효소집합체 층을 형성할 수도 있다.

[0087] 결국, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체 및 이의 제조방법은 다공성담체의 공극 내부에 효소를 단단하게 고정할 수 있어 안정성을 향상시킬 수 있음과 동시에 다공성 물질의 외부까지 효소의 고정에 활용함으로써 효소의 고정화양을 향상시킬 수 있다. 또한, 별도의 표면 개질 없이도 다공성담체의 외부 공간을 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체를 통해 활용할 수 있는 장점이 있어 바이오전환 소재용, 바이오정화 소재용, 바이오센서용 또는 바이오 연료전지용 등 다양한 분야로 활용될 수 있다.

[0088] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0089] **실시예 1**

[0090] 탄산무수화효소(carbonic anhydrase, CA) 분말을 100 mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, PB)에 녹여 5 mg/mL 탄산무수화효소 용액을 제조하였다. 공극 내부가 비어있고 자성 분리가 가능한 다공성담체인 Mag-S-MCF 5 mg에 탄산무수화효소를 흡착법(adsorption)으로 담지시키기 위하여 5 mg/mL 탄산무수화효소 용액 2 mL를 주입한 뒤, 1 시간 동안 150 rpm으로 교반시켰다. 그 뒤 자성 분리를 통해 흡착되지 않은 효소를 제거하였다. 석출과 가교결합 반응을 동시에 진행하기 위해서 석출화제인 50% 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)와 가교제인 0.5% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde) 혼합 용액 2 mL를 주입하고, 2 시간 동안 150 rpm으로 교반시켰다. 자성 분리를 통해 반응 용액을 제거한 뒤, 반응에 참여하지 않은 글루타릭 디알데하이드를 비활성화 시키기 위하여 100 mM트리스 버퍼(Tris buffer) 2 mL를 주입하고, 1 시간 동안 200 rpm으로 교반시켰다. 이후 트리스 버퍼로 5회 세척한 뒤 보관을 하였다.

[0091] **실시예 2**

[0092] 다양한 무게(1.8 mg, 2.1 mg, 2.5 mg, 2.8 mg, 3.2 mg, 3.5 mg)의 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA) 분말을 100 mM PB 버퍼에 녹여 다양한 농도(1.8 mg/mL, 2.1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 2.8 mg/mL, 3.2 mg/mL, 3.5 mg/mL)의 소혈청알부민 용액을 제조하였다. 탄산무수화효소 분말을 100 mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, PB)에 녹여 5 mg/mL 탄산무수화효소 용액을 제조하였다. 공극 내부가 비어있고 자성 분리가 가능한 다공성담체인 Mag-S-MCF 5 mg에 BSA 용액 1 mL를 주입한 뒤, 1 시간 동안 150 rpm으로 교반시켰다. 그 뒤 자성 분리를 통해 BSA 용액을 제거하고, 5 mg/mL 탄산무수화효소 용액 2 mL를 주입한 뒤, 1 시간 동안 150 rpm으로 교반시켰다. 석출과 가교결합 반응을 동시에 진행하기 위해서 석출화제인 50% 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)와 가교제인 0.5% 글루타릭 디알데하이드(glutaric dialdehyde) 혼합 용액 2 mL를 주입하고, 2 시간 동안 150 rpm으로 교반시켰다. 자성 분리를 통해 반응 용액을 제거 한 뒤, 반응에 참여하지 않은 글루타릭 디알데하이드를 비활성화 시키기 위하여 100 mM트리스 버퍼(Tris buffer) 2 mL를 주입하고, 1 시간 동안 200 rpm으로 교반시켰다. 이후 트리스 버퍼로 5회 세척한 뒤 보관을 하였다.

[0093] **비교예 1**

[0094] 석출화제와 가교제를 첨가하지 않는 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0095] **비교예 2**

[0096] 석출화제를 첨가하지 않는 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0097] **비교예 3**

[0098] 석출화제를 먼저 첨가하여 석출을 먼저 수행한 후 가교결합제를 첨가하여

[0099] 가교결합을 수행한 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0100] **비교예 4**

[0101] 석출화제를 첨가하지 않는 것을 제외하고 실시예 2과 동일하게 실시하였다.

[0102] **실험예 1. 효소의 활성 측정**

[0103] 실시예 1, 2 및 비교예 1, 2, 3을 통해 제조한 복합체의 효소 활성을 측정하기 위해 60 mM 4-나이트로페닐 아세테이트(4-nitrophenyl acetate, 4-NA) 용액을 아세토니트릴(acetonitrile)에 준비하였다. 큐벳(cuvette)에서 복합체 25μL, 4-NA 50 μL, 트리스 버퍼 925 μL를 혼합하고 348 nm 파장에서 시간에 따른 흡광도 변화를 분광광도계를 통해 측정하였다. 그 결과를 하기 표 1, 2, 3에 나타내었다. 한편, 표 2의 경우에는 실시예 1과 비교예 3의 효소의 활성을 비교한 표로, 실시예 1의 효소의 활성이 1이라고 할 때 비교예 3의 효소의 활성을 이의 상대적인 비로 나타내었다.

[0104] **실험예 2. 반감기 측정**

[0105] 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2를 통해 제조한 복합체의 반감기를 측정하기 위해 복합체를 상온, 200 rpm 교반 조건에서 보관하며 시간에 따른 활성 감소를 측정하였다. 시간에 따른 활성 감소 결과를 세미로그(semi-logarithm) 함수로 플롯(plot) 하였다. 1차 분해식을 가정하여 반감기를 계산하고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0106] **표 1**

[0107]

	효소의 활성 (unit/mg Mag-S-MCF)	반감기 (일)
실시예 1	0.271	762
비교예 1	0.055	6
비교예 2	0.158	373

[0108] 상기 표 1을 참조하면, 실시예 1의 경우 비교예 1 및 2의 경우에 비하여 효소의 활성이 현저히 우수함을 알 수 있다. 또한, 실시예 1은 비교예 1 및 2의 경우에 비하여 반감기가 현저히 길어 안정성이 우수함을 알 수 있다. (도 4 및 5 참조)

[0109] **표 2**

[0110]

	효소의 활성 (unit/mg Mag-S-MCF)의 상대값
실시예 1	1
비교예 3	0.75

[0111] 상기 표 2를 참조하면, 실시예 1의 경우 석출 및 가교결합을 동시에 수행하여, 석출을 수행한 후 가교결합을 수행하는 비교예 2의 경우에 비하여 효소의 활성이 현저히 우수함을 알 수 있다. (도 8c 참조)

[0112] 표 3

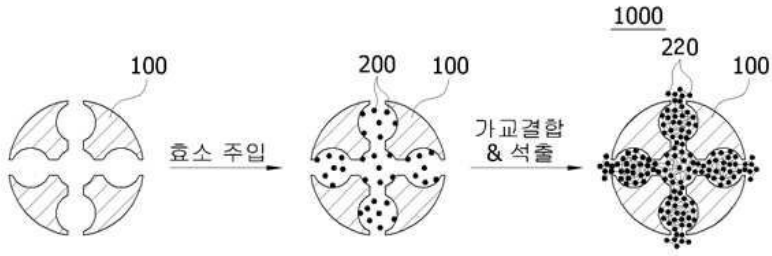
	공극 전체 부피 대비 BSA 의 부피%	효소의 활성 (unit/mg Mag-S-MCF)
실시예 2	50	0.196
	60	0.190
	70	0.155
	80	0.185
	90	0.149
	100	0.126
비교예 4	50	0.110
	60	0.090
	70	0.061
	80	0.038
	90	0.055
	100	0.018

[0113]

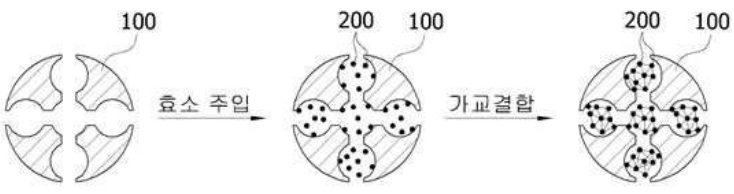
[0114] 상기 표3을 참조하면, 실시예 2와 비교예 4의 경우 효소의 활성의 차이가 유사하게 유지됨을 확인할 수 있다. 이를 통해, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체는 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체를 포함함으로써 향상된 효소의 활성을 제공할 수 있음을 알 수 있다. 또한, 상기 활성의 차이는 실시예 2의 전체 효소 활성의 약 30 ~ 45%정도로, 본 발명의 효소-다공성담체 복합체의 효소 활성의 30 ~ 45%는 다공성담체의 외부에 형성된 가교결합 효소집합체로부터 유래한 것임을 알 수 있다. (도 6 참조)

도면

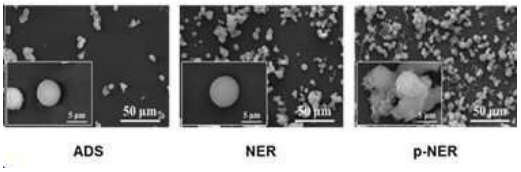
도면1



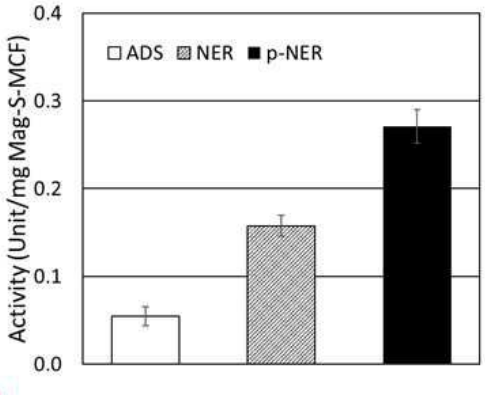
도면2



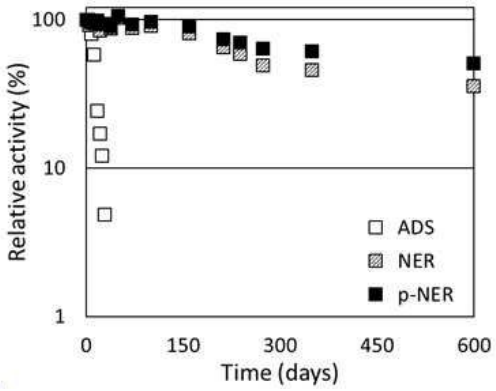
도면3


ADS
NER
p-NER

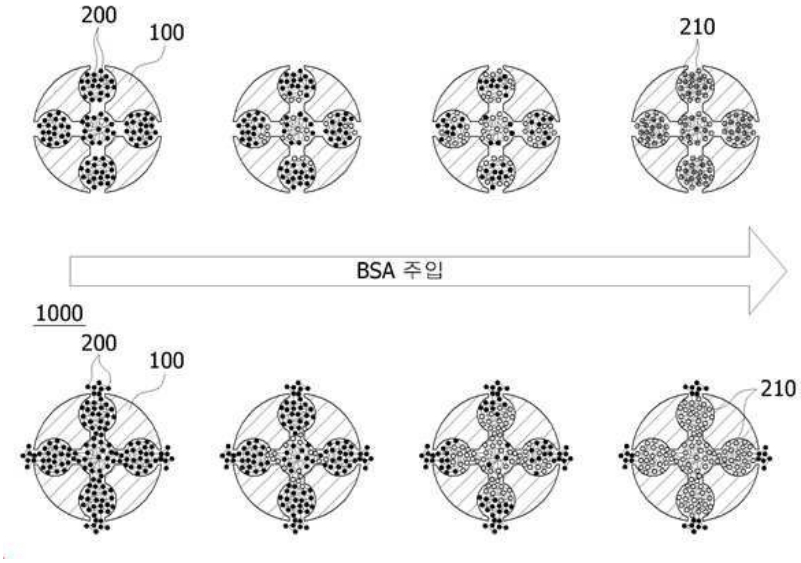
도면4


0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Activity (Unit/mg Mag-S-MCF)
ADS
NER
p-NER

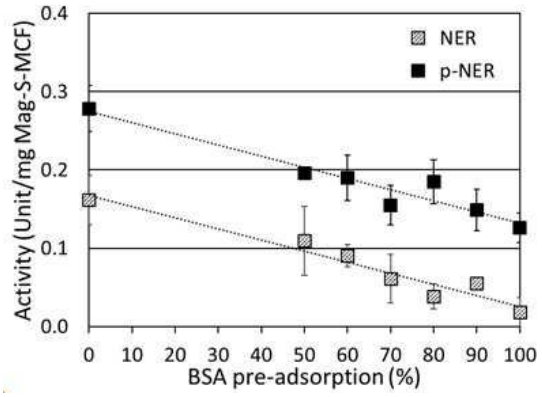
도면5


100
10
1
Relative activity (%)
0
150
300
450
600
Time (days)
ADS
NER
p-NER

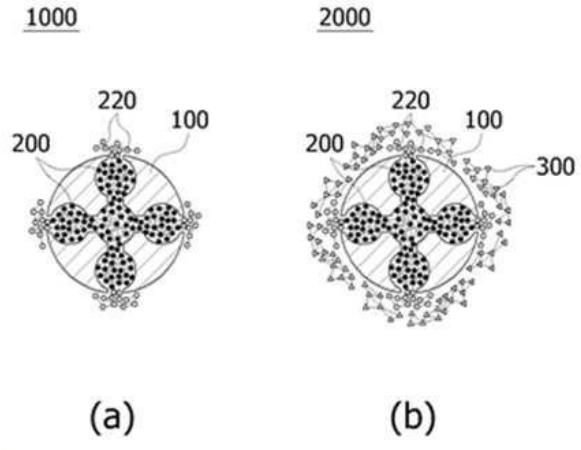
도면6a



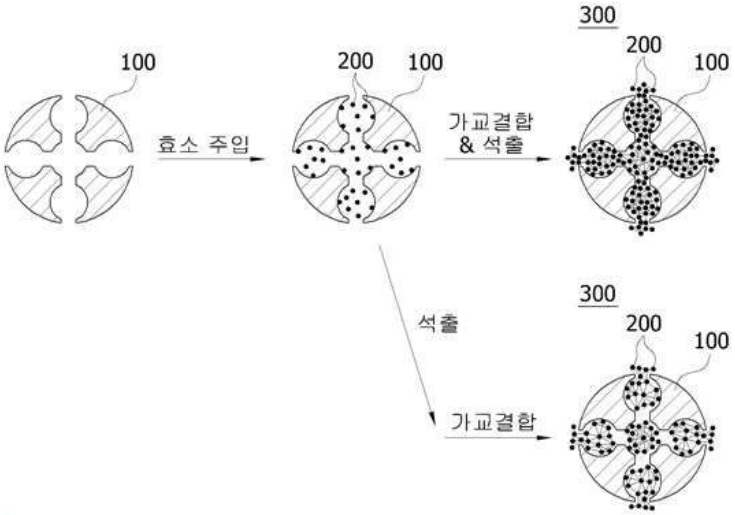
도면6b



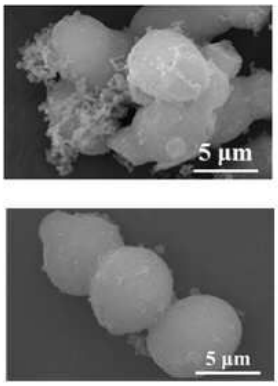
도면7



도면8a



도면8b



도면8c

