(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0120904
(43) 공개일자 2010년11월17일

(51) Int. Cl.
B82B 1/00 (2006.01) *B82B 3/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0039770
(22) 출원일자 2009년05월07일
심사청구일자 2009년05월07일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
이인수
경기도 수원시 영통구 영통2동 988-2 동아아파트 717동 802호
이은열
경기도 성남시 분당구 정자동 한솔마을 5단지 507동 1502호
(74) 대리인
유수미

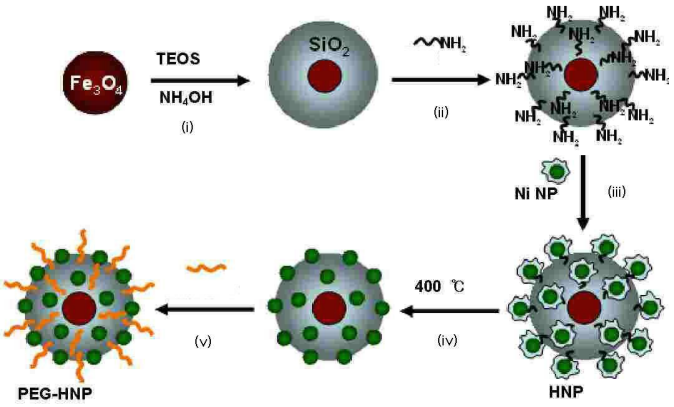
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 혼성 나노입자 및 그를 이용한 바이오촉매

(57) 요 약

본 발명은 효소를 활성의 손실 없이 용이하게 고정화할 수 있을 뿐만 아니라 자기적으로 용이하게 분리하여 재활용가능한 혼성 나노입자, 상기 나노입자를 간단하고 용이하게 제조하는 방법 및 상기 혼성 나노입자에 효소가 고정화된 고활성이고 재활용가능한 바이오촉매에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

자성 나노코어와 상기 자성 나노코어에 형성된 실리카 껍질을 포함하는 실리카 나노구(nanosphere) 및 상기 실리카 나노구의 표면에 부착된 NiO 나노입자를 포함하는 혼성 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 자성 나노코어가 상자성, 초상자성 또는 강자성 금속 산화물로 구성되는 것을 특징으로 하는 혼성 나노입자.

청구항 3

제2항에 있어서, 자성 나노코어가 철, 망간, 아연, 니켈, 코발트 또는 구리 산화물로 구성되는 것을 특징으로 하는 혼성 나노입자.

청구항 4

제3항에 있어서, 자성 나노코어가 Fe_3O_4로 구성되는 것을 특징으로 하는 혼성 나노입자.

청구항 5

제1항에 있어서, NiO 나노입자가 실리카 나노구의 표면에 존재하는 말단 아민기를 경유하여 부착되는 것을 특징으로 하는 혼성 나노입자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 실리카 나노구의 표면이 생체적합성 폴리(에틸렌글리콜)(PEG)기로 변형된 것을 특징으로 하는 혼성 나노입자.

청구항 7

(i) 자성 나노코어에 실리카 껍질을 형성시켜 실리카 나노구를 수득하는 단계;

(ii) 상기 실리카 나노구의 표면에 존재하는 실라놀기의 일부를 아민기로 치환시키는 단계; 및

(iii) 아민기가 치환된 실리카 나노구의 표면에 NiO 나노입자를 부착시키는 단계를 포함하는 혼성 나노입자의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 단계 (ii)에서, 상기 단계 (i)에서 수득한 실리카 나노구를 말단 아민기를 가지는 실라놀 화합물로 처리하여 실리카 나노구의 표면에 존재하는 실라놀기의 일부를 아민기로 치환시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 말단 아민기를 가지는 실라놀 화합물이 $Si(OR_1)_3R_2NH_2$의 화학식을 가지는 것을 특징으로 하는 제조방법:

상기 식에서, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 C_1-C_5의 알킬기이다.

청구항 10

제9항에 있어서, 말단 아민기를 가지는 실라놀 화합물이 (3-아미노프로필)트리메톡시실란{(3-aminopropyl)trimethoxylsilane: APTMS)}인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (iii) 이후에,

(iv) 혼성 나노입자를 공기중에서 하소(calcination)시켜 NiO 나노입자 표면으로부터 유기 계면활성제를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 단계 (iv) 이후에,

(v) 혼성 나노입자의 실리카 표면을 폴리(에틸렌글리콜)(PEG)기로 변형시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 혼성 나노입자를 PEG기를 가지는 실라놀 화합물로 처리하여 혼성 나노입자의 실리카 표면을 폴리(에틸렌글리콜)(PEG)기로 변형시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서, PEG기를 가지는 실라놀 화합물이 $Si(OR_1)_3R_2PEG$의 화학식을 가지는 것을 특징으로 하는 제조방법:

상기 식에서, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 C_1-C_5의 알킬기이다.

청구항 15

제14항에 있어서, PEG기를 가지는 실라놀 화합물이 2-[메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필]트리메톡시실란 {2-[methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trimethoxysilane: MPEOPS}인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 혼성 나노입자를 염기 조건에서 처리하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 염기가 수산화암모늄인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 18

자성 나노코어와 상기 자성 나노코어에 형성된 실리카 껍질을 포함하는 실리카 나노구(nanosphere) 및 상기 실리카 나노구의 표면에 부착된 NiO 나노입자를 포함하는 혼성 나노입자에 히스티딘 표지 효소가 고정화된 바이오촉매.

청구항 19

제18항에 있어서, 효소가 에폭사이드 가수분해 효소, 리파아제 및 디할로게나아제로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오촉매.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혼성 나노입자, 그의 제조방법 및 그를 이용한 바이오촉매에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 효소를 활성의 손실 없이 용이하게 고정화할 수 있을 뿐만 아니라 자기적으로 용이하게 분리하여 재활용가능한 혼성 나노입자, 상기 나노입자를 간단하고 용이하게 제조하는 방법 및 상기 혼성 나노입자에 효소가 고정화된 고활성이고 재활용가능한 바이오촉매에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 몇 년 동안, 나노 크기의 입자는 효소와 같은 바이오촉매를 고정화하기 위한 우수한 지지체로서 부각되어

왔다. 나노입자는 효소를 고정화할 수 있는 최대 표면적을 제공함과 동시에 반응물이 효소의 활성 부위에 접근하는 것을 막는 입체장애를 최소화하여, 고정화된 효소가 고활성을 나타낼 수 있도록 한다. 아울러, 자성 나노입자는 반응용액으로부터 외부 자기장을 인가하여 용이하게 분리할 수 있다. 따라서, 고정화된 효소를 다음 반응을 위해 재사용할 수 있어 고가의 효소를 대량 사용하여야 하는 경우 비용을 현저히 감소시킬 수 있다.

[0003] 종래에는 대부분 효소를 나노입자 표면에 공유결합시켜 고정화하였다. 이러한 방법에 따르면, 효소의 활성부위가 촉매작용을 하기 위해 필요한 형태로 전환되지 못하고 숨겨지거나 제한되어 활성이 손상될 수 있다. 따라서, 바이오분자를 생물학적 활성의 손상 없이 나노입자에 고정화하는 방법에 대한 관심이 증대되어 왔다. 최근에, 히스티딘 표지(histidine-tagged) 단백질을 금속 말단 니트릴로트리아세테이트기(nitrilotriacetate group)에 부착시키는 방법이 효소를 나노입자에 효율적으로 고정화시키는 것으로 증명되었다[참고문헌: A. R. Herdt, B.-S. Kim and A. Taton, *Bioconjugate Chem.* 2007, **18**, 183; J. M. Abad, S. F. L. Mertens, M. Pita, V. M. Fernandez and D. J. Schiffrin, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 5689; C. Xu, K. Xu, H. Gu, X. Zhong, Z. Guo, R. Zheng, X. Zhang, and B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, **126**, 3392; C. Xu, K. Xu, H. Gu, R. Zheng, H. Liu, X. Zhang, Z. Guo and B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, **126**, 9938]. 그러나, 상기 방법은 기질 물질에 포획제(capturing agent)를 합성하고 콘쥬게이션(conjugation)시켜야 하므로, 제조공정이 복잡한 문제점을 가지고 있었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0004] 본 발명자들은 나노입자에 효소를 활성의 저하 없이 효율적이고 강하게 고정화할 수 있는 방법을 개발하기 위해 예의 연구 검토한 결과, 자성 실리카의 표면에 NiO 나노입자를 부착시켜 히스티딘 표지 단백질에 대한 결합력과 자기적으로 조절가능한 응집 및 분산 성질을 동시에 가지는 혼성 나노입자를 제조할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0005] 따라서 본 발명의 목적은 효소를 활성의 손실 없이 용이하게 고정화할 수 있을 뿐만 아니라 자기적으로 용이하게 분리하여 재활용가능한 혼성 나노입자를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 나노입자를 간단하고 용이하게 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 혼성 나노입자에 효소가 고정화된 고활성이고 재활용가능한 바이오촉매를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0008] 본 발명은 자성 나노코어와 상기 자성 나노코어에 형성된 실리카 껍질을 포함하는 실리카 나노구(nanosphere) 및 상기 실리카 나노구의 표면에 부착된 NiO 나노입자를 포함하는 혼성 나노입자에 관한 것이다.

[0009] 본 발명의 혼성 나노입자는 자성 나노코어/실리카/NiO 나노입자의 초구조체(superstructure)로서, NiO 나노입자를 통해 효소, 특히 히스티딘 표지 효소를 용이하게 고정화할 수 있으며, 자성 나노코어의 존재로 인해 자기적으로 용이하게 분리하여 재활용가능하다.

[0010] 상기 자성 나노코어의 크기는 2 내지 30 nm가 바람직하고, 상기 실리카 나노구의 크기는 20 내지 500 nm가 바람직하며, 상기 NiO 나노입자의 크기는 2 내지 30 nm가 바람직하다.

[0011] 상기 자성 나노코어는 상자성, 초상자성 또는 강자성 금속 산화물, 바람직하게는 철, 망간, 아연, 니켈, 코발트 또는 구리 산화물, 가장 바람직하게는 Fe_3O_4를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 상기 NiO 나노입자는 상기 실리카 나노구의 표면에 존재하는 말단 아민기를 경유하여 부착되는 것이 바람직하다. 아울러, 하나의 실리카 나노구에 약 5 내지 200개의 NiO 나노입자가 부착되는 것이 바람직하다.

[0013] 본 발명의 혼성 나노입자는 상기 실리카 나노구의 표면을 생체적합성 폴리(에틸렌글리콜)(PEG)기로 변형시키는 것이 바람직하다. PEG기는 효소의 표면에 대한 비특이적 결합과 고정화된 효소의 활성에 대한 고체 표면의 간섭을 최소화할 수 있을 것으로 예상된다.

[0014] 다른 한편으로, 본 발명은 본 발명의 혼성 나노입자의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 제조방법은

[0015] (i) 자성 나노코어에 실리카 껍질을 형성시켜 실리카 나노구를 수득하는 단계;

[0016] (ii) 상기 실리카 나노구의 표면에 존재하는 실라놀기의 일부를 아민기로 치환시키는 단계; 및

[0017] (iii) 아민기가 치환된 실리카 나노구의 표면에 NiO 나노입자를 부착시키는 단계를 포함한다.

[0018] 상기 자성 나노코어 및 NiO 나노입자는 참고문헌[J. Park, K. An, Y. Hwang, J.-G. Park, H.-J. Noh, J.-Y. Kim, J.-H. Park, N.-M. Hwang and T. Hyeon, *Nat. Mater.* 2004, **3**, 891; J. Park, E. Kang, S. U. Son, H. M. Park, M. K. Lee, J. Kim, K. W. Kim, H.-J. Noh, J.-H. Park, C. J. Bae, J.-G. Park and T. Hyeon, *Adv. Mater.* 2005, **17**, 429]에 공지된 열분해 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0019] 상기 단계 (i)의 자성 나노코어에 실리카 껍질을 형성시키는 단계는 공지된역마이크로에멀젼(reverse microemulsion) 방법을 이용할 수 있다. 상기 방법에 따르면, 물방울과 외부 시클로헥산상 사이의 계면에서 테트라에틸오르토실리케이트(tetraethylorthosilicate: TEOS)를 수화 및 응결시켜 실리카 껍질을 형성시킨다[참고문헌: D. C. Lee, F. V. Mikulec, J. M. Pelaez, B. Koo and B. A. Korgel, *J. Phys. Chem. B* 2006, **110**, 11160; D. K. Yi, S. T. Selvan, S. S. Lee, G. C. Papaefthymiou, D. Kundaliya and J. Y. Ying, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 4990].

[0020] 상기 단계 (ii)에서는 상기 단계 (i)에서 수득한 실리카 나노구를 말단 아민기를 가지는 실라놀 화합물, 바람직하게는 $Si(OR_1)_3R_2NH_2$(상기 식에서, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 C_1-C_5의 알킬기이다), 가장 바람직하게는 (3-아미노프로필)트리메톡시실란{(3-aminopropyl)trimethoxylsilane: APTMS)}으로 처리하여, 실리카 표면에 존재하는 실라놀기와 말단 아민기를 가지는 실라놀 화합물의 반응에 의해 실리카 나노구의 표면에 존재하는 실라놀기의 일부를 아민기로 치환시킨다. 이에 따라 실리카 표면은 NiO에 대한 결합력을 갖게 된다.

[0021] 상기 단계 (iii)의 아민기가 치환된 실리카 나노구의 표면에 NiO 나노입자를 부착시키는 단계는 NiO 나노입자와 아민기가 치환된 실리카 나노구를 유기용매, 가장 바람직하게는 클로로포름과 톨루엔의 혼합용매에서 인큐베이션(incubation)시켜 수행할 수 있다.

[0022] 상기 단계 (iii) 이후에, (iv) 혼성 나노입자를 공기중에서 하소(calcination)시켜 NiO 나노입자 표면으로부터 유기 계면활성제를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것이 바람직하다.

[0023] 아울러, 상기 단계 (iv) 이후에, (v) 혼성 나노입자의 실리카 표면을 폴리(에틸렌글리콜)(PEG)기로 변형시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 상기 단계 (v)는 혼성 나노입자를 PEG기를 가지는 실라놀 화합물, 바람직하게는 $Si(OR_1)_3R_2PEG$(상기 식에서, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 C_1-C_5의 알킬기이다), 가장 바람직하게는 2-[메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필]트리메톡시실란 {2-[methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trimethoxysilane: MPEOPS}으로 처리하여 수행한다. 상기 처리는 바람직하게는 염기 조건, 가장 바람직하게는 수산화암모늄의 존재 하에 수행한다.

[0025] 도 1은 자성 나노코어로 Fe_3O_4를 사용한 본 발명의 일 실시예에 따른 혼성 나노입자의 제조공정을 개략적으로 나타낸 도면이다. 도 1에서 Ni NP는 NiO 나노입자, HNP는 혼성 나노입자, PEG-HNP는 PEG 변형된 혼성 나노입자를 나타낸다.

[0026] 또 다른 한편으로, 본 발명은 자성 나노코어와 상기 자성 나노코어에 형성된 실리카 껍질을 포함하는 실리카 나노구(nanosphere) 및 상기 실리카 나노구의 표면에 부착된 NiO 나노입자를 포함하는 혼성 나노입자에 히스티딘 표지 효소가 고정화된 바이오촉매에 관한 것이다.

[0027] 상기 효소로는 에폭사이드 가수분해 효소, 리파아제, 디할로게나아제 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것이 아니다.

[0028] 1 mg의 혼성 나노입자에 고정화된 효소의 양은 5 내지 20 ㎍이 바람직하며, 10 내지 15 ㎍이 보다 바람직하다.

[0029] 상기 고정화된 바이오촉매는 본 발명의 혼성 나노입자를 효소와 혼합한 다음 인큐베이션시켜 용이하게 제조할 수 있다.

[0030] 도 2는 히스티딘 표지 에폭사이드 가수분해 효소를 본 발명의 혼성 나노입자에 고정화시키고, 이를 이용하여 라세미 스티렌 에폭사이드를 입체선택적으로 가수분해시켜 광학적으로 순수한 (S)-스티렌 에폭사이드를 분리한 다음, 나노입자에 고정화된 에폭사이드 가수분해 효소를 재사용하는 공정을 개략적으로 나타낸 도면이다. 도 2에서 PEG-HNP는 PEG 변형된 혼성 나노입자, HIS-HNP는 히스티딘 표지 효소가 고정화된 혼성 나노입자를 나타낸다.

효 과

[0031] 본 발명의 혼성 나노입자는 효소를 활성의 손실 없이 용이하게 고정화할 수 있을 뿐만 아니라 자기적으로 용이하게 회수 및 재사용할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 혼성 나노입자에 고정화된 효소는 반복 사용시에도 활성의 저하가 없고 혼성 나노입자로부터 거의 분리되지 않는다.

[0033] 따라서, 본 발명의 혼성 나노입자는 재활용가능한 바이오촉매의 지지체로서, 특히 에폭사이드 가수분해 효소와 같이 상업적으로 대량 제조되지 않아, 정제한 효소를 고정화시켜 재사용하는 것이 생물공정의 경제성 확보에 필수적인 효소를 고정화하는데 효과적으로 사용될 수 있다.

[0034] 아울러, 본 발명의 혼성 나노입자는 간단하고 용이하게 제조가능하므로, 고정화 바이오촉매를 상업적 규모로 생산하는데 효율적으로 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0036] **실시예 1: Fe_3O_4 나노코어를 함유하는 실리카 나노구의 제조**

[0037] 12nm의 코어 크기를 가지는 Fe_3O_4 나노입자를 공지된 방법에 따라 합성하였다. 둥근바닥 플라스크에 시클로헥산 (170 ml)을 가하고 폴리옥시에틸렌(5)노닐페닐 에테르{Polyoxyethylene(5)nonylphenyl ether} (8 ml, 17.4 mmol, Igepal CO-520, 50 mol% 친수성기 함유, Aldrich)를 가한 다음, 초음파 처리(sonication)하여 분산시켰다. 그런 다음, 반응용액에 시클로헥산에 분산된 35 mg의 Fe_3O_4 나노입자를 가하였다. 생성된 혼합물을 투명해질 때까지 보텍싱(vortexing)하였다. 반응 혼합물에 수산화암모늄 용액 (30 %, 1.3 ml)을 가하여 투명 현탁액을 형성시켰다. 그런 다음, 테트라에틸오르토실리케이트 (TEOS, 3 ml)를 가하고 12 시간 동안 교반하였다. 생성된 Fe_3O_4 나노코어를 함유하는 실리카 나노구를 자기적 디캔테이션(decantation)에 의해 수집하였다. 수집된 나노구를 에탄올에 재분산시키고 자석을 이용하여 회수하였다. 나노구를 에탄올에 분산시키고 자기적으로 분리하는 과정을 3회 반복하여 정제하였다.

[0038] **실시예 2: 혼성 나노입자의 제조**

[0039] 실시예 1에서 수득한 Fe_3O_4 나노코어를 함유하는 실리카 나노구 (336 mg)를 함유하는 톨루엔 현탁액 (85 ml)에 3-아미노프로필트리에톡시실란 (3-aminopropyltriethoxysilane: APTMS) (5 ml)를 가하고 상온에서 12 시간 동안 교반하였다. 생성된 아민기가 치환된 실리카 나노구를 원심분리하여 수집하였다. 수집된 나노구를 에탄올에 재분산시키고 원심분리하는 과정을 반복하여 정제하였다. 아민기가 치환된 Fe_3O_4 나노코어를 함유하는 실리카 나노구 (30 mg)와 NiO 나노입자 (10 mg)를 THF/$CHCl_3$ 혼합용매에서 혼합하였다. 생성된 입자를 3000 rpm에서 원심분리하여 수집하고, 헥산에 재분산시키고 원심분리하는 과정을 2회 반복하여 정제하였다.

[0040] 도 3은 수득한 고체상의 혼성 나노입자를 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy: TEM)으로 관찰한 도(a), 고해상도 투과 전자 현미경(high resolution transmission electron microscopy: HRTEM)으로 관찰한 도(b) 및 전계 방출 주사 전자 현미경(field-emission scanning electron microscopy: FE-SEM)으로 관찰한 도(c)이다. 도 3에 따르면, 10 nm의 NiO 나노입자가 12 nm의 Fe_3O_4 나노코어를 함유하는 60 nm의 실리카 나노구

에 잘 부착되어 있다.

[0041]

[0042] **실시예 3: PEG 변형된 혼성 나노입자의 제조**

[0043] 실시예 2에서 수득한 혼성 나노입자를 노(furnace)에서 5 ℃/분의 가열속도로 승온하여 400 ℃에서 공기 조건에서 2 시간 동안 어니일링(annealing)하였다. 그런 다음, 실온으로 냉각된 나노입자를 2-[메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필]트리메톡시실란 (MPEOPS)와 에탄올에서 혼합하였다. 그런 다음, 생성된 현탁액에 소량의 수산화암모늄 용액을 가하여 반응을 개시하고 12 시간 동안 교반하였다. 생성된 PEG 변형된 혼성 나노입자를 자석을 이용하여 회수하고 에탄올로 2회 세척하였다.

[0044] 도 4는 수득한 PEG 변형된 혼성 나노입자를 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy: TEM)으로 관찰한 도(a), 고해상도 투과 전자 현미경(high resolution transmission electron microscopy: HRTEM)으로 관찰한 도(b) 및 전계 방출 주사 전자 현미경(field- emission scanning electron microscopy: FE-SEM)으로 관찰한 도(c)이다. 도 4에 따르면, 하소(calcinations) 및 PEG 변형 반응 중에 NiO 부착된 초구조체에 유의적인 변화가 없다.

[0045] 유도 결합 플라즈마-원자 발광 분광법(inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry: ICP-AES)에 따르면, 900 mg의 Ni이 10 mg의 Fe을 함유한 고체에 함유되어 있음을 나타내었으며, 이는 108개의 NiO 나노입자가 각 초구조체에 부착되어 있음을 나타낸다.

[0046] 고체상의 PEG 변형된 혼성 나노입자는 격렬한 진탕(shaking), 보텍싱(vortexing) 또는 초음파처리(sonication)에 의해 물에 분산되어 암갈색 현탁액을 형성하며, 이는 용기의 측면에 작은 자석을 놓아 용이하게 모을 수 있다(도 5 참조). 대부분의 PEG 변형된 혼성 나노입자가 수 분내에 현탁액으로부터 응집 및 침전되었다. 침전물은 진탕(shaking), 보텍싱(vortexing) 또는 초음파처리(sonication)에 의해 재분산시킬 수 있었다.

[0047] 자기 측정 결과, PEG 변형된 혼성 나노입자는 30 emu/g의 포화 자기화 값을 가지고 298 K에서 초상자성을 가짐을 알 수 있었다(도 6 참조).

[0048]

[0049] **실시예 4: 히스티딘 표지 에폭사이드 가수분해 효소의 제조**

[0050] 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*)의 에폭사이드 가수분해 효소 유전자 및 pGro7 플라스미드를 함유한 재조합 대장균(*Escherichia coli*)을 50 ㎍/ml의 암피실린(ampiciline) 및 20 ㎍/ml의 클로람페니콜(chloramphenicol)를 함유한 LB 배지에서 37°C에서 배양하였다. 배양액의 OD600 값이 0.5에 도달했을 때, 1 mM의 IPTG 및 4 mg/ml의 L-아라비노즈(L-arabinose)로 유도하여 에폭사이드 가수분해 유전자를 발현시켰다. 15°C에서 24 시간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 수확한 다음 초음파처리하여 파괴하였다. 재조합 에폭사이드 가수분해 효소를 Ni-세파로즈(Ni-sepharose) 컬럼을 이용하여 분리하였다.

[0051] **실시예 5: 효소 고정화**

[0052] 100 ㎍의 상기 실시예 4에서 수득한 에폭사이드 가수분해 효소를 4.8 mg의 상기 실시예 3에서 수득한 PEG 변형된 혼성 나노입자를 함유하는 100 mM 인산염 완충액 (1 ml)에 가한 다음, 25 °C에서 가볍게 진탕하면서 30분 동안 인큐베이션하여 에폭사이드 가수분해 효소를 나노입자에 고정화시켰다. 결합되지 않은 단백질을 완충용액으로 2회 세척하여 제거한 다음, 고정화된 에폭사이드 가수분해 효소를 입체선택적 가수분해 반응에 사용하였다. 1 mg의 PEG 변형된 혼성 나노입자에 고정화된 효소의 양은 10.9-13.0 ㎍이었다.

[0053] **실험예 1: 고정화된 효소의 활성 측정**

[0054] 20 mM의 라세미 스티렌 옥사이드를 4.8 mg의 상기 실시예 5에서 수득한 효소가 고정화된 혼성 나노입자를 함유하는 수성 완충 현탁액(pH 7.4)에 가하고, 30 °C에서 연속적으로 교반하여 입체선택적 분할 반응을 수행하였다. 그 결과, 98% ee의 광학적으로 순수한(enantiopure) (*S*)-스티렌 옥사이드를 25분 내에 40.2%의 수율로 수득하였

고, 이는 70% 이상의 효소 활성이 고정화 후에도 유지되고 있음을 나타낸다.

[0055] 광학적으로 순수한 스티렌 옥사이드의 거울상 이성질체 순도(enantiomeric excess (ee)) 및 수율은 융합 실리카 모세 칼럼 β-DEX-250(fused silica capillary β-DEX-250 column) (60 m 길이, 0.25 mm ID 및 0.25 ㎛ 필름 두께, Supelco Inc.) 및 FID 검출기가 장착된 키랄 GC에 의해 측정하였다. 칼럼, 주입기 및 검출기의 온도는 각각 100, 220 및 220 ℃이었다. 거울상 이성질체 순도(enantiomeric excess (ee))는 하기 식에 의해 결정하였다.

[0056] *ee*(%) = [((*S*)-에폭사이드 - (*R*)-에폭사이드)/((*S*)-에폭사이드 + (*R*)-에폭사이드)] x 100.

[0057] 이론적인 수율은 50%이다.

[0058] **실험예 2: 고정화된 효소의 반복 사용에 따른 활성 측정**

[0059] 라세미 스티렌 옥사이드의 입체선택적 가수분해에 의해 광학적으로 순수한(enantiopure) (S)-스티렌 옥사이드를 제조하는데 있어, 고정화된 에폭사이드 가수분해 효소의 반복 사용을 연속 배치식으로 수행하였다. 배치식 반응에서 입체선택적 분할 반응의 완결 후에 고정화된 에폭사이드 가수분해 효소를 막대 자석으로 반응 용매로부터 회수하였다. 재사용을 위해 20 mM의 라세미 스티렌 옥사이드가 함유된 새로운 반응 완충액을 고정화된 효소에 가하였다. 각각의 반응 후에 얻은 수용액 샘플을 동일한 부피의 시클로헥산으로 추출한 다음, 시클로헥산에 존재하는 스티렌 옥사이드를 키랄 GC에 의해 분석하였고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0060] 표 1

[0061]

반응횟수	에폭사이드의 광학순도 (%ee)	에폭사이드의 수율 (%)	반응시간 (분)
1	>98	40.2	25
2	>98	37.5	35
3	>98	35.3	50
4	>98	39.5	60
5	>98	40.0	90
6	>98	40.7	105

[0062] 상기 표 1에서 보듯이, > 98% ee의 광학순도(enantiopurity)를 가지는 (S)-스티렌 옥사이드를 첫 6회 사용 동안 25 내지 105 분의 반응시간 내에 수득할 수 있었으며, 이는 효소가 고정화된 혼성 나노입자의 재활용가능성을 입증한다.

[0063] 각 반응 후에 PEG 변형된 혼성 나노입자로부터 방출되는 단백질의 양을 브래드포드(Bradford) 및 마이크로 비신코닌산(bicinchoninic acid: BCA) 단백질 분석법에 의해 측정하였다. 그 결과, 효소가 고정화된 혼성 나노입자로부터 분리되는 효소의 양은 각 반응 당 5% 미만인 것으로 측정되었다.

도면의 간단한 설명

[0064] 도 1은 본 발명의 일 실시예 따른 혼성 나노입자의 제조공정을 개략적으로 나타낸 도면이다(Ni NP: NiO 나노입자, HNP: 혼성 나노입자, PEG-HNP: PEG 변형된 혼성 나노입자).

[0065] 도 2는 히스티딘 표지 에폭사이드 가수분해 효소를 본 발명의 혼성 나노입자에 고정화시키고, 이를 이용하여 라세미 스티렌 에폭사이드를 입체선택적으로 가수분해시켜 (S)-스티렌 에폭사이드를 분리한 다음, 나노입자에 고정화된 에폭사이드 가수분해 효소를 재사용하는 공정을 개략적으로 나타낸 도면이다(PEG-HNP: PEG 변형된 혼성 나노입자, HIS-HNP: 히스티딘 표지 효소가 고정화된 혼성 나노입자).

[0066] 도 3은 실시예 2에서 제조된 고체상의 혼성 나노입자를 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy: TEM)으로 관찰한 도(a), 고해상도 투과 전자 현미경(high resolution transmission electron microscopy: HRTEM)으로 관찰한 도(b) 및 전계 방출 주사 전자 현미경(field-emission scanning electron microscopy: FE-SEM)으로 관찰한 도(c)이다.

[0067] 도 4는 실시예 3에서 수득한 PEG 변형된 혼성 나노입자를 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy: TEM)으로 관찰한 도(a), 고해상도 투과 전자 현미경(high resolution transmission electron

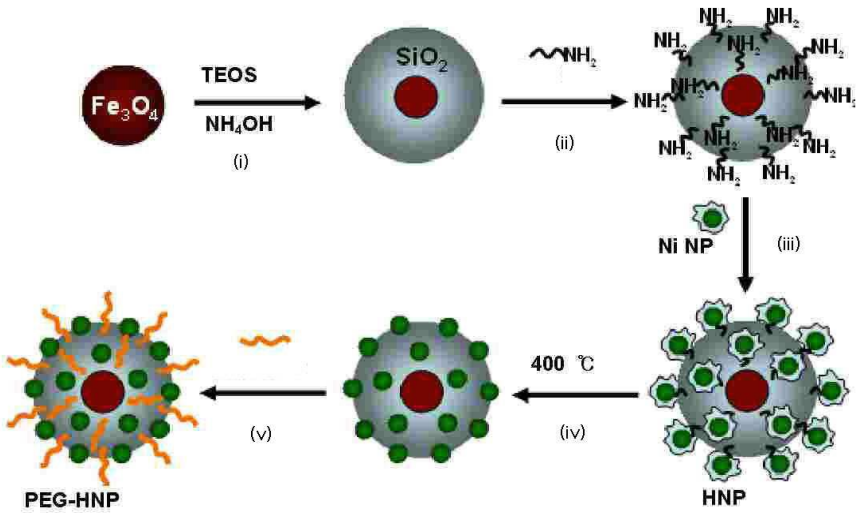
microscopy: HRTEM)으로 관찰한 도(b) 및 전계 방출 주사 전자 현미경(field- emission scanning electron microscopy: FE-SEM)으로 관찰한 도(c)이다.

[0068] 도 5는 실시예 3에서 수득한 PEG 변형된 혼성 나노입자가 물에 분산된 현탁액의 사진(a) 및 용기의 측면에 작은 자석을 놓은 후에 촬영한 사진(b)이다.

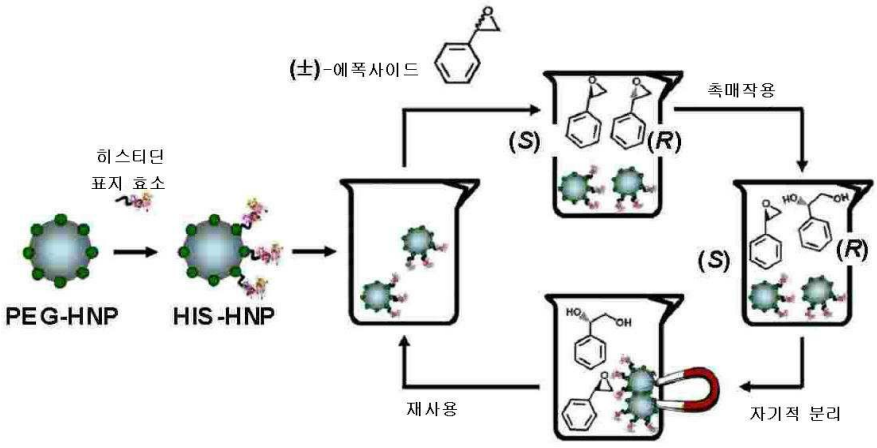
[0069] 도 6은 실시예 3에서 수득한 PEG 변형된 혼성 나노입자의 히스테리시스 곡선(hysteresis loop)을 나타낸 그래프이다.

도면

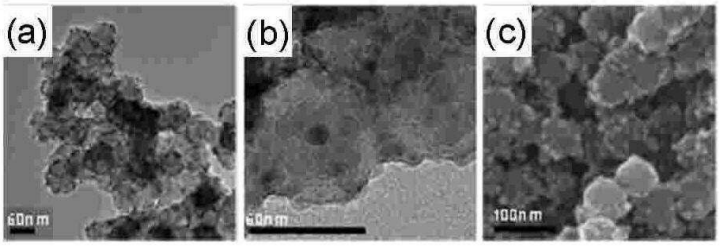
도면1



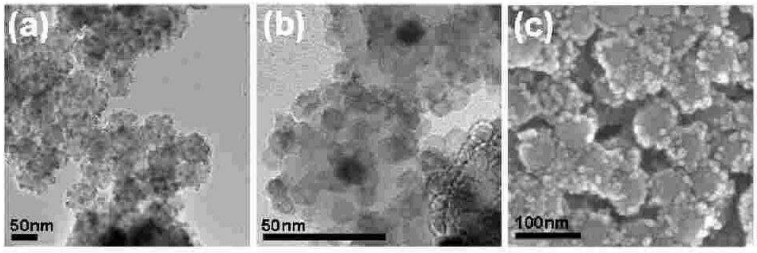
도면2



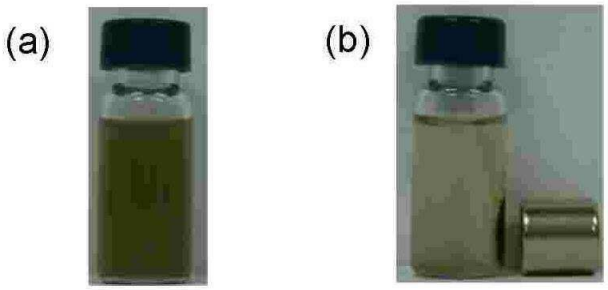
도면3



도면4



도면5



도면6

