



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0033520

(43) 공개일자 2020년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C01G 31/02 (2006.01) *C01B 33/18* (2006.01)

C12N 11/14 (2020.01)

(52) CPC특허분류

C01G 31/02 (2013.01)

C01B 33/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0112888

(22) 출원일자 2018년09월20일

심사청구일자 2018년09월20일

(71) 출원인

건국대학교 산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이정결

서울특별시 광진구 능동로 50, A동 2401호 (자양동, 이튼타워리버2차)

강윤찬

서울특별시 성북구 안암로 145, 803호(안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스 신공학관)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

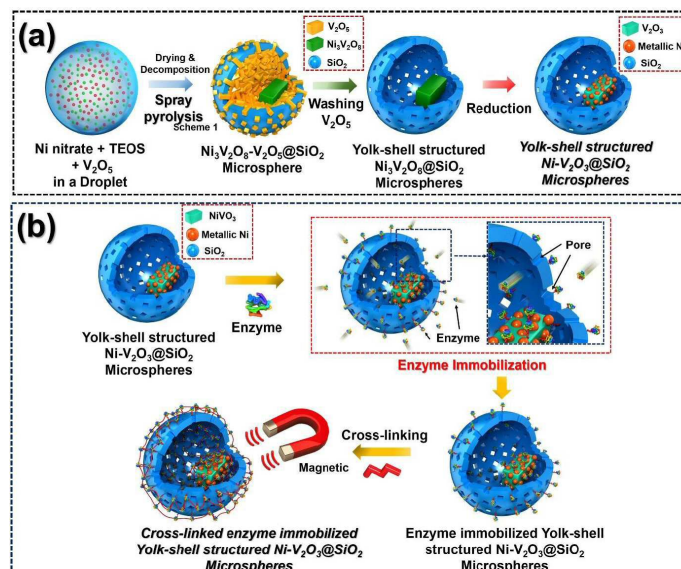
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 자성을 갖는 요크-셸 구조의 마이크로스피어의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 자성을 갖는 요크-셸 구조의 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 제조방법 및 이 제조방법에 의해 제조된 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 11/14 (2013.01)
C01P 2004/80 (2013.01)
C01P 2006/42 (2013.01)

최현수

서울특별시 광진구 능동로 120, 쿨하우스 레이크홀
 1318호(화양동)

(72) 발명자

예숙 쿠마

서울특별시 광진구 능동로 120-1, 917호(화양동,
 건국대학교 신공학관)

박기대

서울특별시 광진구 능동로 120, 803호(화양동, 건국
 대학교 신공학관)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20153010092130

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국에너지기술평가원

연구사업명 에너지기술개발사업

연구과제명 에너지 저소비형 바이오디젤 생산을 위한 생축매 이용 공정기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)비츠로테크

연구기간 2017.10.01 ~ 2018.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

Ni, V, 및 Si 전구체를 포함하는 용액을 사용하여 스프레이 열분해법으로 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 합성하는 단계;

상기 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 세척하여 수용성 V_2O_5 를 제거하는 단계; 및

상기 마이크로스피어를 환원시켜 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 합성하는 단계

를 포함하는 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Ni, V, 및 Si 전구체는 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, V_2O_5 , 및 테트라에틸 오르소실리케이트(TEOS)인 것인, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 환원은 10% H_2/Ar 대기 하에서 700℃에서 실시하는 것인, 제조방법.

청구항 4

제1항의 제조방법에 의해 제조된 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 마이크로스피어는 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3$ 요크 및 다공성의 할로우 SiO_2 셸을 포함하는 것인 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어는 효소를 고정한 후 자석으로 분리되는 것인 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어.

청구항 7

제4항의 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 사용하여 페놀 화합물을 분해하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어에 효소를 고정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 효소는 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어에 교차결합하여 고정되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자성을 갖는 요크-셸 구조의 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어의 제조방법 및 이 제조방법에 의해 제조된 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 구조적으로 최적화된 나노물질은 여러 장점을 가지고 있어 여러 분야에 널리 사용된다. 나노구조 물질에 적용되는 효소 고정화 전략은 효소의 재사용성과 안정성을 개선하기 위해 널리 연구되고 있다. 다양한 구조의 금속 산화물이 효율적인 효소 고정화를 위해 개발되고 있으며, 특히, 다공성 요크-셸 구조의 금속 산화물이 이들의 풍부한 효소 고정화 위치 때문에 성공적으로 적용되고 있다. 자성, 코어 셸 및 요크 셸 구조, 증가된 표면적을 갖는 다공성과 같은 특성들로 인해 나노구조가 종래의 나노입자에 비해 사용에 유리하다. 니켈 산화물(NiO)은 격자 사이에 부분적 회전 보상에 의해 초상자성이거나 약한 강자성의 나노입자이다. 이들을 산업적 규모로 사용하기 위해 나노입자 구조를 변형하고자 하는 다양한 시도가 있어왔다.

[0003] 할로우 스피어인 나노튜브는 높은 표면적을 갖지만 셸에 의해 둘러싸인 내부 코어 내의 스피어가 총 표면적뿐만 아니라 코어 및 셸에 동시에 효소와 같은 유기 분자의 분포에도 영향을 미칠 수 있다. 생촉매 및 바이오센서 분야에서 코어 셸 자성 입자는 높은 단백질 담지, 개선된 촉매 특성 및 효소의 안정성으로 인해 매우 유용하다. NiO 의 자성 특성은 이를 둘러싼 산화물 셸의 존재에 의해 상당히 영향을 받는다. 특히, NiO 나노스피어 주위의 실리카 셸은 높은 분산, 조절된 다공성 및 코어 셸 구조의 내부 및 외부 표면에 높은 단백질 증착 특성을 부여한다. 또한, 실리카 셸은 단백질의 아민기 및 카르복시기와 접합하는 표면을 제공한다. 이러한 입자의 다공성 구조는 효소의 촉매 부위가 내부 표면으로 분산되도록 하고 효소가 흡착한 유기 용매 및 열에 직접적으로 닿지 않도록 보호하여 활성 및 안정성을 개선시킨다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) M.Z. Anwar, D.J. Kim, A. Kumar, S.K.S. Patel, S. Otari, P. Mardina, J.H. Jeong, J.H. Sohn, J.H. Kim, J.T. Park, J.K. Lee, SnO_2 hollow nanotubes: a novel and efficient support matrix for enzyme immobilization, Sci Rep-Uk 7 (2017)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 효소의 고정화에 효과적인 자성 요크 및 다공성 SiO_2 할로우 셸로 구성된 독특한 구조의 마이크로스피어를 설계하고 합성함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Ni , V , 및 Si 전구체를 포함하는 용액을 사용하여 스프레이 열분해법으로 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 합성하는 단계; 상기 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 세척하여 수용성 V_2O_5 를 제거하는 단계; 및 상기 마이크로스피어를 감압대기 하에서 환원시켜 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 합성하는 단계를 포함하는 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어의 제조방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어의 제조방법에 의해 제조된 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 사용하여 페놀 화합물을 분리하

는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어는 자성으로 재사용가능하며, 증가된 표면적을 갖는 고도의 다공성 코어 셸 입자 형태로서 높은 고정화 효율 및 수율을 달성하였다. 또한, 마이크로스피어에 고정된 효소는 온도 안정성, 저장 안정성 및 재사용성이 개선되었으며, 전기화학적 특성 역시 개선되어 페놀 화합물의 산화를 더욱 촉진해 효과적으로 페놀 화합물을 분해할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 자성 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 합성 (a) 및 효소의 고정화 (b)를 나타내는 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 형태, SAED 패턴 및 원소 맵핑 이미지를 나타낸 것이다: (a) SEM, (b,c) TEM 이미지, (d) 고해상도 TEM 이미지, (e) SAED 패턴, 및 (f) 원소 맵핑 이미지를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서 라카아제의 고정화 후 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 형태 및 원소 맵핑 이미지를 나타낸 것이다: (a) SEM, (b) TEM 이미지, (c,d) 고해상도 TEM 이미지, 및 (e) 원소 맵핑 이미지를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서 Ni-NiO-SiO_2 마이크로스피어의 형태, SAED 패턴, 및 원소 맵핑 이미지를 나타낸 것이다: (a) SEM, (b) TEM 이미지, (c,d) 고해상도 TEM 이미지, (e) SAED 패턴, 및 (f) 원소 맵핑 이미지를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서 라카아제 고정 전 및 후의 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 XPS 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서 총 표면적 및 포어 크기를 결정하기 위한 Ni-NiO-SiO_2 및 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 BET 분석결과를 나타낸 것이다: (a) N_2 가스 흡착 및 탈착 등온선 및 (b) BJH 포어 크기 분포.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서 원색색을 이용한 유리 및 결합 라카아제의 이차 구조 분석의 비교 결과를 나타낸 것이다: Ni-NiO-SiO_2 마이크로입자 상의 FITC 표지된 효소의 공초점 현미경 이미지.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서 유리 및 고정 라카아제의 다양한 a) 온도 및 b) pH 수치에서의 활성을 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서 (A-C) 50, 60, 및 70°C 에서 유리 효소 및 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어에 고정된 효소의 상대적 활성 및 (D-F) 유리 및 고정 효소의 안정성 및 재사용성을 나타낸 것이다: D) 25°C 에서의 안정성, E) 4°C 에서의 저장 안정성, 및 F) 재사용성.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 유리 및 고정된 라카아제를 시트르산염 버퍼에 6시간 동안 인큐베이션 후 $15 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 스캔 속도에서 쿠마르산 (A), 갈산 (B), 타닌산 (C), 및 페룰산 (D)의 순환 전압전류법 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 효소가 고정된 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 자석 제거를 보이는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 이하, 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

- [0013] 본 발명은 Ni, V, 및 Si 전구체를 포함하는 용액을 사용하여 스프레이 열분해법으로 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 합성하는 단계; 상기 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 세척하여 수용성 V_2O_5 를 제거하는 단계; 및 상기 마이크로스피어를 감압대기 하에서 환원시켜 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 합성하는 단계를 포함하는 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어의 제조방법에 관한 것이다.
- [0014] 상기 Ni, V, 및 Si 전구체는 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, V_2O_5 , 및 테트라에틸 오르소실리케이트(TEOS)를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 각각 2 : 5 : 5의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 상기 환원은 감압 대기, 예를 들어 10% H_2/Ar 대기 하에서 700℃로 환원반응시켜 실시할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예에 따른 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어의 합성 공정은 도 1a에 도시되었다. 코어-셸 구조의 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어는 Ni, V, 및 Si 성분을 함유하는 액적(droplet)으로부터 직접적으로 제조된다. 원-팟 스프레이 열분해 공정에서 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8$ 및 V_2O_5 상의 결정화에 의한 상 분리가 코어-셸 구조의 마이크로스피어를 형성한다. 비-결정성 SiO_2 물질은 표면 외부로 이동하여 마이크로스피어의 얇은 셸을 형성한다. 수용성 V_2O_5 결정 을 세척하여 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어 내에 빈 공간이 생성된다. 자성 분리 능력을 부여하기 위해, 감압 대기 하에서 후처리하여 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{@SiO}_2$ 를 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어로 변형시켰다. 결과적으로, 자성적으로 분리가능한 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어가 스프레이 열분해법을 포함한 여러 단계에 의해 합성될 수 있다. 다공성의 할로우 SiO_2 셸은 도 1b에 보여지는 바와 같이 재사용가능한 효소 고정화를 위한 풍부한 부위를 제공한다. 높은 자성을 갖는 이동가능한 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3$ 요크는 효소-촉매 반응 후 효소가 고정된 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어의 자성 분리를 가능하게 한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어의 제조방법에 의해 제조된 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 제공한다.
- [0019] 상기 마이크로스피어는 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3$ 요크 및 다공성의 할로우 SiO_2 셸을 포함하며, 구체적으로는 다공성 SiO_2 셸 내에 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3$ 요크가 위치한 형태일 수 있다.
- [0020] 상기 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어는 효소를 고정한 후 자석으로 분리될 수 있다. 높은 자성을 갖는 이동가능한 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3$ 요크는 효소-촉매 반응 후 효소가 고정된 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어의 자성 분리가 가능하다.
- [0022] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어를 사용하여 페놀 화합물을 분리하는 방법을 제공한다.
- [0023] 상기 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ 마이크로스피어에 효소를 고정하여 사용할 수 있으며, 예를 들어 교차결합하여 고정할 수 있다. 상기 효소는 예를 들어 라카아제일 수 있다.
- [0025] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] [실시예]
- [0028] 물질
- [0029] 라카아제 (*T. versicolor*), ABTS, 글루타르알데하이드, 쿠마르산, 갈산, 탄닌산, 및 페룰산은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그의 실시예에서 사용된 모든 화학물질 및 시약은 다른 방식으로 언급되

지 않는 이상 시판처에서 분석 등급으로 구입한 것이다.

[0031] <제조예 1>

[0032] **요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_5@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 합성**

[0033] $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어를 초음파 스프레이 열분해법으로 합성하였다[Y. Zhang, Y.D. Li, Synthesis and characterization of monodisperse doped ZnS nanospheres with enhanced thermal stability, J Phys Chem B 108(46) (2004) 17805-17811]. 소량의 질산과 함께 Ni, V, 및 Si 전구체를 증류수에 용해시켜 스프레이 용액을 제조하였다. Ni, V, 및 Si의 소스 물질로 사용된 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (Junsei, 97%), V_2O_5 (Junsei, 99%), 및 테트라에틸 오르소실리케이트(TEOS)(Samchun, 98%)의 농도는 각각 0.02, 0.05, 및 0.03 M이었다. 스프레이 열분해법으로 합성된 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어를 증류수로 세척하여 수용성 V_2O_5 를 제거한 후 10% H_2/Ar 대기 하 700°C에서 환원 공정을 실시하여 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어를 제조하였다.

[0035] <실시예 1>

[0036] **마이크로스피어의 특성화**

[0037] 제조예 1에서와 같이 제조된 마이크로스피어의 마이크로구조를 scanning electron microscopy (SEM, Tescan VEGA3 SBH) 및 field emission transmission electron microscopy (FE-TEM, JEOL JEM-2100F)를 사용하여 관찰하였다. 분말의 결정 구조를 Cu K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$)을 사용하여 XRD (X'pert PRO MPD, PANalytical, the Netherlands)로 결정하였다. 또한, 형태적 특성을 200 kV의 가속 전압에서 전계방출 SEM (FE-SEM; Hitachi S-4800, Japan) 및 TEM (JEM-2100F, JEOL, Tokyo, Japan)으로 평가하였다. 자성 특성을 vibrating sample magnetometer (VSM, Lake Shore Cryotronics, Model 7300)를 사용하여 실온에서 측정하였다. TGA (Seiko Exstar 6000 TG/DTA 6100, Japan) 분석을 20°C/min의 가열 속도에서 공기 중에서 실시하여 복합체 입자 내의 SiO_2 입자의 양을 측정하였다. $\text{NiO-NiV}@\text{SiO}_2$ 복합체 입자의 평균 입자 크기 및 상대적 표준 편차를 dynamic light scattering analysis (Malvern, Nano ZS90)로 평가하였다. 마이크로스피어의 비표면적은 nitrogen adsorption measurements (TriStar 3000, Micromeritics, USA)의 BET 분석으로 계산하였다.

[0039] 여러 단계에 거친 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 합성은 각 단계에서 형성된 중간체 산물의 형태 및 결정 구조를 분석하여 조사하였다. 원-팟 스프레이 열분해법에 의해 합성된 코어-셸 구조의 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 형태 및 결정구조는 각각 도 2 및 3(마이크로스피어 부분의 SEM 및 TEM 이미지)에 나타났다. Ni, V, 및 Si 성분을 함유하는 하나의 액적으로부터 형성된 마이크로스피어는 SEM 및 TEM 이미지에서 보여지는 바와 같이 구체 형태를 갖는다. 도 2e 및 7c에서 보여지는 XRD 및 SAED 패턴은 일 단계 스프레이 열분해법에 의해 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8$ 및 V_2O_5 상의 혼합된 결정 구조를 형성함을 확인시켰다. SiO_2 의 결정화는 1000°C의 반응 온도에서는 나타나지 않았다. 본 실시예에서, 1000°C의 높은 반응 온도를 적용시켜 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5$ 의 결정화를 통한 상 분리에 의해 코어-셸 구조의 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어를 형성하였다. 도 2의 원소 맵핑 이미지는 코어-셸 구조의 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어를 나타낸다. Ni 성분은 대부분 코어 부분에서만 위치한다. 하나의 액적으로부터 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어를 형성하는 자세한 공정은 도 1에 도시하였다. 액적을 건조하여 Ni, V, 및 Si 전구체의 복합 마이크로스피어를 형성한 후 금속 전구체를 분해하여 NiO, V_2O_5 , 및 SiO_2 의 복합체를 제조하였다. 690°C의 낮은 용융 온도로 V_2O_5 를 용융시켜 상 분리된 코어를 형성하였다. NiO 및 과잉의 VO_x 결정 사이의 고체 상태 반응으로 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5$ 코어를 형성하였다. 고결정질 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5$ 코어의 형성 동안, 낮은 밀도의 무정형 SiO_2 물질을 표면 부분으로 배출하여 셸을 형성하였다. 수용성 V_2O_5 상의 세척으로 형성된 요크-셸 구조의 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8\text{-V}_2\text{O}_5@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 형태를 도 2에 도시하였다. 도 2a-2d의 SEM 및 TEM 이미지는 물 세척 공정으로 다공성 셸을 갖는 요크-셸 구조의 형성을 확인시켰다. V_2O_5 로드의 제거는 SiO_2 셸에 구멍을 뚫어 도 2c에

보여지는 바와 같이 초미세 빈 구멍을 형성하였다. 도 2e 및 7c의 XRD 및 SAED 패턴은 또한 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8$ 의 상을 확인시켰다. 도 2f의 원소 맵핑 이미지는 다중 요크를 갖는 요크-셸 구조의 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어를 확인시켰다. Si 성분은 할로우 셸 부분에서 발견되었다. 반면에, V 및 Ni 성분은 요크 부분에서만 위치하였다.

[0041] $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 환원에 의해 제조된 효소 고정화 전의 $\text{Ni}-\text{V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 형태는 도 2에 도시된 바와 같다. $\text{Ni}-\text{V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어는 도 2a에 도시된 SEM 이미지에서 볼 수 있는 바와 같이 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어와 유사한 형태를 갖는다. 그러나, 도 2c의 고해상도 TEM 이미지에서 볼 수 있는 바와 같이, 700℃에서의 환원 공정 동안 형성된 깨끗한 Ni 나노결정을 보였다. Ni 나노결정은 화살표로 표시된 바와 같이 V_2O_3 나노로드 상에 균일하게 증착되었다.

[0042] 고정화를 위해 효소 분자가 투과할 수 있도록 하는 SiO_2 셸 내의 비어있는 구멍을 TEM 이미지로 확인하였다. 0.20 및 0.27 nm 간격의 명확한 격자 프린지는 각각 금속성 Ni 및 V_2O_3 상의 (111) 및 (104) 결정면에서 기인한 것이다. 도 7c 및 도 2e에 도시된 XRD 및 SAED 패턴은 Ni 및 V_2O_3 혼합상의 결정 구조를 갖는 마이크로스피어의 형성을 확인시켰다. 효소-고정된 $\text{Ni}-\text{V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 형태는 도 3에 도시하였다. 도 3a 및 3b에 각각 도시된 SEM 및 TEM 이미지는 도 2의 $\text{Ni}-\text{V}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ 마이크로스피어에 비해 더 적은 다공성 구조를 나타냈다. HR-TEM 이미지(도 3c 및 3d)는 다공성 SiO_2 셸의 메조포어를 통해 효소가 균일하게 분포됨을 보여준다. 도 3e에 도시된 바와 같이 효소로부터 유래된 C 및 N 성분의 균일한 분포를 보이는 원소 맵핑 이미지는 SiO_2 할로우 셸 상에 효소가 잘 고정되었음을 확인시켰다.

[0044] <비교예 1>

[0045] Ni-NiO-SiO₂ 복합 마이크로스피어의 합성

[0046] 효소 고정화를 위한 비교예로서 밀집한 구조를 갖는 Ni-NiO-SiO₂ 복합 마이크로스피어를 도 4에 도시하였다. NiO-SiO₂ 마이크로스피어를 제조예 1과 동일 조건 하에서 스프레이 열분해법으로 합성하였다. 스프레이 용액은 Ni 및 Si를 V 전구체 없이 증류수에 용해시켜 제조하였다. 1000℃에서 원-팟 스프레이 열분해법으로 합성된 NiO-SiO₂ 마이크로스피어를 10% H₂/Ar 대기 하 700℃에서 환원 공정을 통해 Ni-NiO-SiO₂ 마이크로스피어로 변환시켰다.

[0047] 도 4a의 SEM 이미지는 환원 공정 후에 매끈했던 표면이 양각된 표면으로 변환됨을 확인시켰다. 도 4b 및 4c의 TEM 이미지는 초미세 나노결정을 갖는 양각 형태의 마이크로스피어를 확인시켰다. SiO_2 마이크로스피어 상에 성장시킨 금속성 Ni 나노스피어는 SEM 및 TEM 이미지에서 관찰되었다. 0.2 nm 간격의 깨끗한 격자 프린지는 금속성 Ni 상의 (111) 결정면에서 기인하였다. 초미세 금속성 Ni 나노결정은 공기 중의 실온에서도 높은 산화 특성을 갖는다. 그러므로, 도 4d에서 볼 수 있는 바와 같이 얇은 NiO 층은 금속성 Ni 나노결정으로 둘러싸여 있다. 도 7c 및 4e에 도시된 바와 같이 XRD 및 SAED 패턴으로 금속성 Ni 및 SiO_2 상의 결정 구조를 형성함을 확인할 수 있다. 마이크로스피어의 표면 근처에 위치한 Ni 성분이 오스트발트 숙성(Ostwald ripening) 프로세스에 의해 이동하여 Ni 나노결정을 형성하였다. 도 4f에서 보여지는 원소 맵핑 이미지는 또한 마이크로스피어의 표면 근처의 Ni-결실 영역을 확인해주었다.

[0049] <실시예 2>

[0050] 효소 고정화

[0051] 10 mg의 자성 요크-셸 입자를 버퍼(50 mM)에 용해된 효소(1mg/ml) 중에서 사용하여 라카아제를 고정시켰다. 인큐베이션 시간, 인큐베이션 온도, 입자 및 효소 비율을 최적화하였다. 교차결합제로서 글루타르알데하이드를 4℃에서 진탕하면서 사용하였다. 효소의 흡착 후에, 4℃에서 15분 동안 10,000 rpm에서 원심분리하여 입자를 분리하였다. 세척된 용액의 단백질 농도를 Bradford method으로 측정하였다. IE를 결정하기 위해, 다른 입자에서

의 효소 고정화를 24시간 동안 모니터링하였다. 또한, 최적 조건 하에서 반응시 600 mg/g의 지지체로 효소의 농도를 증가시키면서 반응시켜 입자의 효소 담지 능력을 평가하였다. 높은 IY 및 IE에 근거하여, 라카아제를 추가 연구에 사용하였다.

[0053] **고정된 효소의 XPS 분석**

[0054] 라카아제의 성공적인 그래프팅(grafting)을 확인하기 위해, 도 5에 도시된 바와 같이 효소가 고정된 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어를 XPS (X-rayphotoelectronspectroscopy)로 특성화하였다. 도 5의 와이드-스캔 XPS 스펙트럼은 Ni, V, Si, O, C, 및 N에 대한 명확한 XPS 피크를 보였다. 이 스펙트럼에서, Ni, V 및 Si 피크는 효소를 고정하기 위한 지지체($\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 요크 셸)로부터 기인한 것이고 N 및 C 피크는 고정된 효소로부터 발생한 것임이 관찰되었다. 도 5b에 도시된 Ni 2p 스펙트럼은 각각 857.6 및 875.4 eV에서 Ni 2p_{3/2} 및 2p_{1/2} 오비탈 피크를 보였으며, 이는 $\text{Ni}_3\text{V}_2\text{O}_8$ 에서 환원 공정을 통해 금속성 Ni의 형성을 나타내는 것이다. 516.7 및 524.1 eV에서 V 2p_{3/2} 및 2p_{1/2} 오비탈 피크는 각각 V_2O_3 상의 형성을 나타내며, Si2p의 XPS 스펙트럼은 103.1 eV에서 주요 피크를 보이고, 이는 SiO_2 상 형성 셸에 상응하는 것이다. C 1s 피크는 라카아제의 다양한 결합에 의한 다양한 피크로 디콘볼루션(deconvolute)되었다. 각각의 C1, C2, C3 피크는 각각 (C-C, C-H, C=C), (C-O or C-O-C), (C=O or O-C-O)와 연관되어 있으며, 이는 고정된 라카아제에 기인한 것이다. N1s 스펙트럼에서 400.0 eV에서의 결합 에너지는 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 요크 셸 상에 아마이드 및 아민의 형성에 의한 것으로, 이는 또한 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 요크 셸 작용화의 성공 및 이 요크 셸이 효소에 공유결합한 것을 확인해주는 것이다.

[0056] **BET 분석**

[0057] 효소 고정화 전 및 후의 마이크로스피어의 N_2 흡착 및 탈착 등온선 및 BJH 포어 크기 분포를 도 6에 나타냈다. 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어에 대한 IV 유형 등온선 및 Barrett-Joyner-Halenda (BJH) 포어 크기 분포의 H3 히스테리시스(hysteresis) 루프는 SiO_2 할로우 마이크로스피어의 내부 상에 효소 고정을 위한 효소 침투 채널로서 작용할 수 있는 20 nm보다 큰 직경을 갖는 상당량의 메조포어의 존재를 나타냈다. 그러나, Ni-NiO-SiO_2 복합 마이크로스피어에는 5 nm를 넘는 메조포어는 거의 없었다. 특히, Ni-NiO-SiO_2 마이크로스피어는 잘 발달된 마이크로포어를 가지며, 이는 도 6a에 도시된 바와 같이 상대적으로 낮은 기압에서 흡착 흡수에 의해 확인되었다. $90.0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 의 높은 BET 표면적은 Ni-NiO-SiO_2 마이크로스피어 내부의 마이크로포어의 형성을 확인해준다. 도 6b에서 볼 수 있는 바와 같이 요크-셸 구조의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 메조포어의 포어 부피는 빈 채널 상으로 효소가 흡수됨에 의해 효소 고정화 후 감소되었다. 효소 고정화 전 및 후의 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 BET 표면적은 각각 33.4 및 $28.0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 이었다.

[0059] **<실시예 3>**

[0060] **고정된 효소의 특성화**

[0061] 자성 요크-셸 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어에 고정화된 라카아제를 다양한 장치를 사용하여 특성화하였다. 요크-셸 입자 상의 효소의 결합은 FTIR spectroscopy (JASCO FT-IR 300E spectrometer, Japan)로 확인하였으며 CLSM 이미지는 FV-1000 Olympus confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan)로 촬영하였다. 고정화 후 효소의 이차 구조의 변화는 CD detector (Chirascan-plus, Applied Photophysics, UK)를 사용하여 CD 분석으로 확인하였다. 합성된 자성 요크-셸 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어 및 이에 고정된 라카아제의 분해 특성을 TGA 분석을 사용하여 결정하였다. 고정된 효소의 XPS 스펙트럼을 Al K α radiation (1486.6 eV)을 수반한 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, K-alpha)를 사용하여 조사하였다.

[0063] 고정된 라카아제는 Vibrating-sample magnetometer (VSM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR),

X-ray Powder Diffraction (XRD) Circular dichroism (CD) 및 공초점 현미경을 이용하여 특성화하였다. 효소가 고정된 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 자성 특성을 효소 반응 후 자석 제거의 가능성을 확인하여 평가하였다. $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어에 대한 히스테리시스 루프는 도 7a에 도시하였으며 포화 자화(saturation magnetization)는 14.6 emu g^{-1} 이었다. 또한, 효소가 고정된 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 자석 제거를 보이는 사진은 도 11에 나타났다. 유리 및 고정 효소의 이차 구조에서의 구조적 변화는 CD spectroscopy로 분석하였다. 유리 효소에 비해 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어에 고정된 효소의 α -헬릭스 양이 12.7% 감소하였으며, β -시트 및 무질서한 랜덤 코일은 약간 증가하였다(도 7d). 이러한 이차 구조 분석을 CD Pro software package (CONTIN)로 분석하였다. 고정된 라카아제는 이의 본래 α -헬릭스 함량의 약 80%를 유지하고 있었으며, 이는 220 nm에서 평균 잔여 타원율(residue ellipticity)에 의해 반영된 바와 같다. 유리 및 고정 효소의 이전 CD 분석 결과는 유리 효소에 비해 α -헬릭스 구조의 63.0% 및 62.0% 보유율을 보였다[G. Eda, G. Fanchini, M. Chhowalla, Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent 및 flexible electronic material, Nat Nanotechnol 3(5) (2008) 270-274][P.J. Ji, H.S. Tan, X. Xu, W. Feng, Lipase Covalently Attached to Multiwalled Carbon Nanotubes as an Efficient Catalyst in Organic Solvent, Aiche J 56(11) (2010) 3005-3011]. XRD 및 SAED 패턴은 각각 도 7c 및 4e에 도시하였으며, 이는 Ni-NiO-SiO_2 복합 마이크로스피어의 형성을 확인하는 것이다.

[0064] $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어의 FTIR 스펙트럼은 816 및 1085 cm^{-1} 의 특징적인 밴드를 보였으며, 이는 Si-O 결합의 절단면(cleavage plane), 벤딩 및 스트레칭에 해당하는 것이다. 1058 cm^{-1} 에서의 주요 밴드는 화학량론적 실리콘 디옥사이드 구조를 나타낸다. 1632 cm^{-1} 에서의 밴드는 단백질의 아미드기에서 C=O 스트레칭 진동에 상응하는 것이다. 순수한 라카아제(1632 cm^{-1}) 및 메조다공성 $\text{Ni-V}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ 마이크로스피어에 결합된 라카아제(1652 cm^{-1})의 스펙트럼에서의 피크는 아미드기의 C=O의 스트레칭 진동에 기인하는 것이다(도 5). 이들 밴드는 아미드기에 해당하는 것으로 고정화 지지체에 효소의 존재를 확인시켜주었다. 2900 및 3400 cm^{-1} 에서의 피크는 OH기에 해당하는 것이고 O-H 결합의 대칭 스트레칭 진동을 나타낸다. 고정된 효소는 형광 염료로 표지하여 검출하였다. After 고정화 of FITC-표지 효소를 메조다공성 SiO_2 마이크로입자 내에 결합시킨 후 라카아제의 근접성 및 균질 분포를 공초점 현미경으로 확인하였다.

[0066] <실시예 4>

[0067] 효소 활성화

[0068] 기질로서 ABTS(1 mM)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 증가시켜 분광광도법으로 라카아제 활성을 측정하였다. 효소 활성을 international units (IU)로 표시하였으며, 1 IU는 표준 검정 조건[S.K.S. Patel, V.C. Kalia, J.H. Choi, J.R. Haw, I.W. Kim, J.K. Lee, Immobilization of Laccase on SiO_2 Nanocarriers Improves Its Stability and Reusability, J Microbiol Biotechnol 24(5) (2014) 639-647] 하에서 $1 \mu\text{mol/min}$ 의 산물을 형성하는 효소의 양을 나타낸다.

[0070] <실시예 5>

[0071] 고정된 라카아제의 생화학적 특성화

[0072] 유리 라카아제 및 입자 상에 고정된 라카아제의 활성을 표준 검정 조건 하에서 pH 3.0-11.0 범위의 여러 pH 버퍼(50 mM)(글리신-HCl (pH 2.0-2.5), 시트르산나트륨(pH 3.0-4.0), 아세트산나트륨(pH 4.5-5.5), 인산염나트륨(pH 6.0-7.0) 및 Tris-HCl 버퍼(pH 7.5-10.5)) 및 25-80°C의 온도 범위에서 측정하였다. 동역학 파라미터(K_m 및 V_{max})를 25°C에서 50 mM의 시트르산나트륨 버퍼 중의 ABTS(0.001-2.0 mM)의 농도를 변화시켜 결정하였다. 기질(ABTS)에 대한 동역학 파라미터(K_m 및 V_{max}) 수치를 GraphPad Prism 5(San Diego, CA, USA)를 사용하여 비선형 회귀 분석을 사용하여 획득하였다.

[0074] 25 내지 80℃에서 유리, 고정 및 교차결합 라카아제의 최적 온도를 연구하였다. 유리 라카아제는 55℃에서 잔여 활성의 50%를 잃은 반면, Ni-V₂O₃@SiO₂ 마이크로스피어 상에 고정 및 교차결합된 라카아제는 열 변성에 좀더 내성을 나타냈다. 그러나, 유리, 고정 및 교차결합 라카아제 모두의 최적 온도는 40℃로 관찰되었다. 그러나, 고정 및 교차결합된 라카아제 둘 다 40-80℃ 범위에서 유리 라카아제보다 더 높은 활성을 보였다. 자성 요크-셸 상의 교차결합된 라카아제는 75℃에서 원래 활성의 84%를 유지하였으며 교차결합 없이 고정된 효소도 유사하게 70℃에서 78% 이상의 활성을 나타냈다(도 8a). 이러한 결과는 자성 요크-셸 구조가 고정된 효소를 열 변성으로부터 보호하고 효소의 안정성을 개선시킴을 의미한다. Ni-V₂O₃@SiO₂의 독특한 형태는 이전에 공개된 자성 나노복합체[Y.Y. Liu, Z.T. Zeng, G.M. Zeng, L. Tang, Y. Pang, Z. Li, C. Liu, X.X. Lei, M.S. Wu, P.Y. Ren, Z.F. Liu, M. Chen, G.X. Xie, Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds, *Bioresource Technol* 115 (2012) 21-26; F. Wang, C. Guo, L.R. Yang, C.Z. Liu, Magnetic mesoporous silica nano입자: Fabrication and their laccase immobilization performance, *Bioresource Technol* 101(23) (2010) 8931-8935; Y.X. Yang, Q.M. Wei, J.B. Zhang, Y.J. Xi, H.M. Yuan, C. Chen, X.N. Liu, Degradation of MXC by host/guest-type immobilized laccase on magnetic tubular mesoporous silica, *Biochem Eng J* 97 (2015) 111-118]에 비해 더 우수한 효소의 열 안정성으로 더 잘 작용할 수 있도록 한다. 3-11의 pH 범위에서 유리, 고정 및 교차결합 라카아제의 상대적 활성을 평가하였다. 모든 효소 제제의 최적 pH는 4로 관찰되었다. 다만, 고정 및 교차결합 라카아제가 pH 5 및 6에서 약간 더 높은 활성을 보였으며 중성 및 알칼리성 범위에서 유리 라카아제와 유사하게 감소된 활성을 보였다(도 8b).

[0076] <실시예 6>

[0077] 고정된 효소의 안정성 및 재사용성

[0078] 안정성은 표준 검정 조건 하에서 50 mM 시트르산나트륨 버퍼(pH 3) 중에서 240시간까지 규칙적인 간격의 인큐베이션(25℃)으로 유리(0.01 mg/mL) 및 고정 라카아제(0.2 mg of particle/mL)의 잔여 효소 활성을 측정하여 결정하였다. 저장 안정성도 유사하게 표준 검정 조건 하에서 42일까지 인큐베이션(4℃) 동안 평가하였다. 또한, 고정 라카아제(0.5 mg of particle/mL)의 재사용성을 실온에서 표준 검정 조건 하에서 ABTS를 환원시켜 평가하였다. 유리 및 고정 효소의 초기 활성은 100% 잔여 활성을 간주되었다.

[0080] Ni-V₂O₃@SiO₂ 마이크로스피어에 고정 및 교차결합된 효소의 안정성을 50, 60 및 70℃에서 연구하였다. 교차결합된 효소는 70℃에서 300분 후에 원래 활성의 60%를 유지하였다. 반면에, 고정된 효소는 300분 후에 60%만을 보였다(도 9A-C). 고정 및 교차결합 효소의 안정성은 실온(25℃)에서 연구하였다. 효소를 교차결합시킨 후 교차결합 없이 고정된 효소에 비해 더 안정해졌다. 유리, 고정 및 교차결합 라카아제는 60시간의 인큐베이션 후 각각 18.5, 94.2 및 88.4 %의 잔여 활성을 나타냈다. 저장 안정성도 유사하게 모든 효소 제제에 대해 4℃에서 시험하였으며 유리 효소는 42일 후 90%의 활성을 잃은 반면, 고정 및 교차결합 효소 제제는 각각 54.6 및 73.8%의 활성을 유지하고 있었다. 자성 요크-셸 입자는 자석을 사용하여 반응 혼합물로부터 쉽게 제거할 수 있으며, 다중 사이클 동안 사용할 수 있다. Ni-V₂O₃@SiO₂ 마이크로스피어에 교차결합된 라카아제는 반복적인 12 사이클 후에도 92%의 활성을 유지하였으며 고정된 효소는 12 사이클 후에 78%의 활성을 유지하였다(도 9F). 고정된 라카아제의 재사용에 대한 이전 연구에서는 6사이클 후에 65%의 잔여 활성을 보였다[Y.X. Yang, Q.M. Wei, J.B. Zhang, Y.J. Xi, H.M. Yuan, C. Chen, X.N. Liu, Degradation of MXC by host/guest-type immobilized laccase on magnetic tubular mesoporous silica, *Biochem Eng J* 97 (2015) 111-118.]. 다른 연구에서, 요크-셸 실리카 입자에 고정된 리파아제는 첫 번째 사이클 후에 39.7%의 활성을 잃었다[Z.Y. Zhao, J. Liu, M. Hahn, S.Z. Qiao, A.P.J. Middelberg, L.Z. He, Encapsulation of lipase in mesoporous silica yolk-shell spheres with enhanced enzyme stability, *Rsc Adv* 3(44) (2013) 22008-22013].

[0082] <실시예 7>

[0083] 유리 및 고정 라카아제의 동역학 분석

[0084] 유리 라카아제의 동역학적 파라미터(K_m 및 V_{max})는 다른 여러 입자에 고정된 후 변화하였다(표 1). 특히, 유리 라카아제 및 $Ni-V_2O_3@SiO_2$ 마이크로스피어에 고정되거나 교차결합된 라카아제의 분명한 K_m 수치는 각각 26.6 ± 1.32 , 29.1 ± 2.2 및 $33.8 \pm 3.9 \mu M$ 이었다. $Ni-V_2O_3@SiO_2$ 마이크로스피어에 교차결합된 라카아제의 더 높은 K_m 수치는 기질에 대한 더 낮은 친화성을 나타낸다. 고정 및 교차결합 라카아제의 더 낮은 친화성은 물질 이동의 제한에 의한 것이다. 이전 연구들에서 다른 지지체에 고정된 후 K_m 수치가 50% 이상 증가하였다[F. Wang, C. Guo, L.R. Yang, C.Z. Liu, Magnetic mesoporous silica nano입자: Fabrication and their laccase immobilization performance, Bioresource Technol 101(23) (2010) 8931-8935; G. Bayramoglu, M. Yilmaz, M.Y. Arica, Preparation and characterization of epoxy-functionalized magnetic chitosan beads: laccase immobilized for degradation of reactive dyes, Bioproc Biosyst Eng 33(4) (2010) 439-448; D. Spinelli, E. Fatarella, A. Di Michele, R. Pogni, Immobilization of fungal (Trametes versicolor) laccase onto Amber lite IR-120 H beads: Optimization and characterization, Process Biochem 48(2) (2013) 218-223; X.B. Zheng, Q. Wang, Y.J. Jiang, J. Gao, Biomimetic Synthesis of Magnetic Composite particles for Laccase Immobilization, Ind Eng Chem Res 51(30) (2012) 10140-10146.].

표 1

laccase	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \mu M^{-1}$)
Free laccase	26.6 ± 1.3	1740 ± 84	65.4
Imm laccase	29.1 ± 2.2	1692 ± 72	58.2
Cross Linked	33.8 ± 3.9	2094 ± 95	61.9

[0085]

[0087] <실시예 8>

[0088] 페놀 화합물의 분해

[0089] 유리 및 교차결합 효소 제제를 페놀 화합물의 분해에 사용하였다. 선택된 페놀 화합물의 분해 비율을 순환 전압 전류법(cyclic voltammetry)을 사용하여 분석하였다. 유리 및 고정 라카아제로 처리된 대조 및 각 페놀 화합물의 피크 전류 밀도를 측정하였다. 페놀 화합물의 농도는 전류 피크 (I_p) 밀도에 직접적으로 비례하였다.

[0091] 라카아제는 페놀 화합물의 분해에 널리 사용되는 효소이다. 쿠마르산, 갈산, 타닌산, 및 페룰산과 같은 여러 페놀 화합물에 대한 상대적 산화 활성을 유리 라카아제 및 자성 요크-셀 $Ni-V_2O_3@SiO_2$ 마이크로스피어에 교차결합된 라카아제에 대해 평가하였다. 도 10A-D는 요크-셀 입자에 효소를 고정시킨 후, 라카아제가 유리 효소에 비해 페놀 화합물에 대해 더 높은 산화 활성을 나타냄을 보였다. 유리 및 고정된 효소의 산화 능력은 순환 전압전류법(cyclic voltammetry)으로 시험하였다. 시험된 페놀 화합물 중에서 쿠마르산이 다른 페놀 화합물에 비해 더 높은 산화율을 보였으며, 타닌산은 산화 피크로부터 명백하게 나타나듯이 최소 산화 반응을 보였다(도 10A-D).

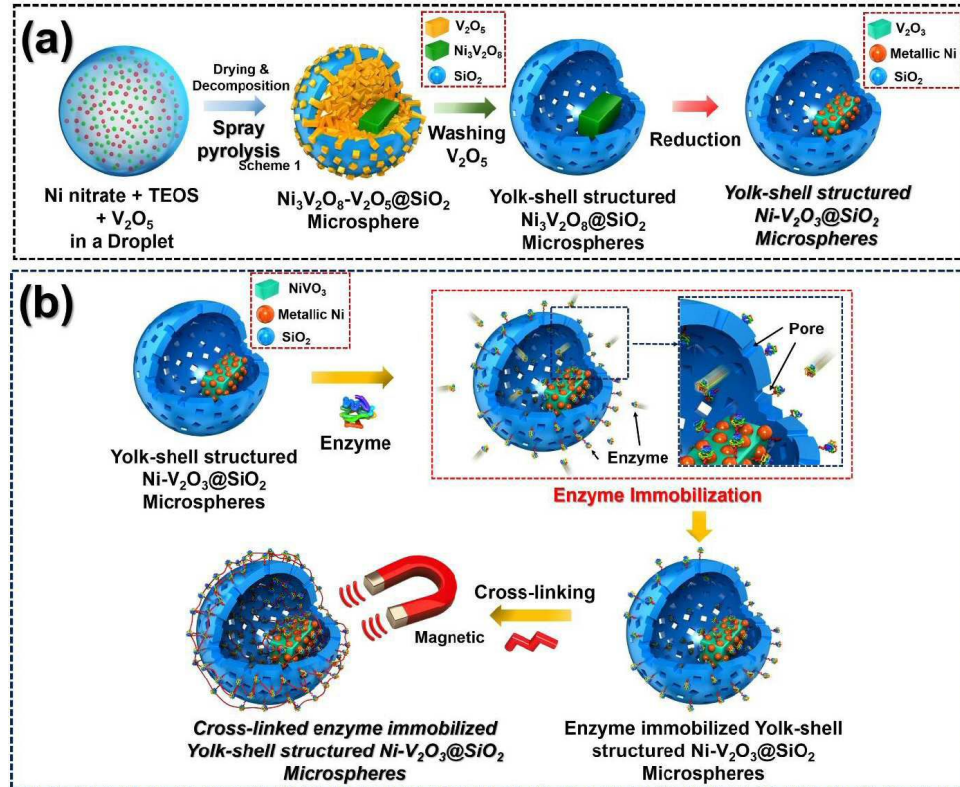
[0092] 유리 및 고정 라카아제로 처리된 대조 및 각 페놀 화합물의 피크 전류 밀도를 측정하였다. 페놀 화합물의 농도는 전류 피크 (I_p) 밀도에 직접적으로 비례하였다. 따라서, 각 페놀 화합물은 유리 및 고정 라카아제의 처리 후 급격한 전류 피크 밀도의 감소를 보였다. 현저하게는, 고정 라카아제로 처리된 각 페놀 화합물에 대해 산화 잠재력 및 한원 잠재력이 유리 효소에 비해 더 낮았다. 이는 고정 라카아제가 유리 효소보다 더 효율적으로 페놀 화합물을 분해함을 의미한다. 전류 피크 밀도는 페놀 화합물의 농도가 증가함에 따라 선형으로 증가하였다.

[0094] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고

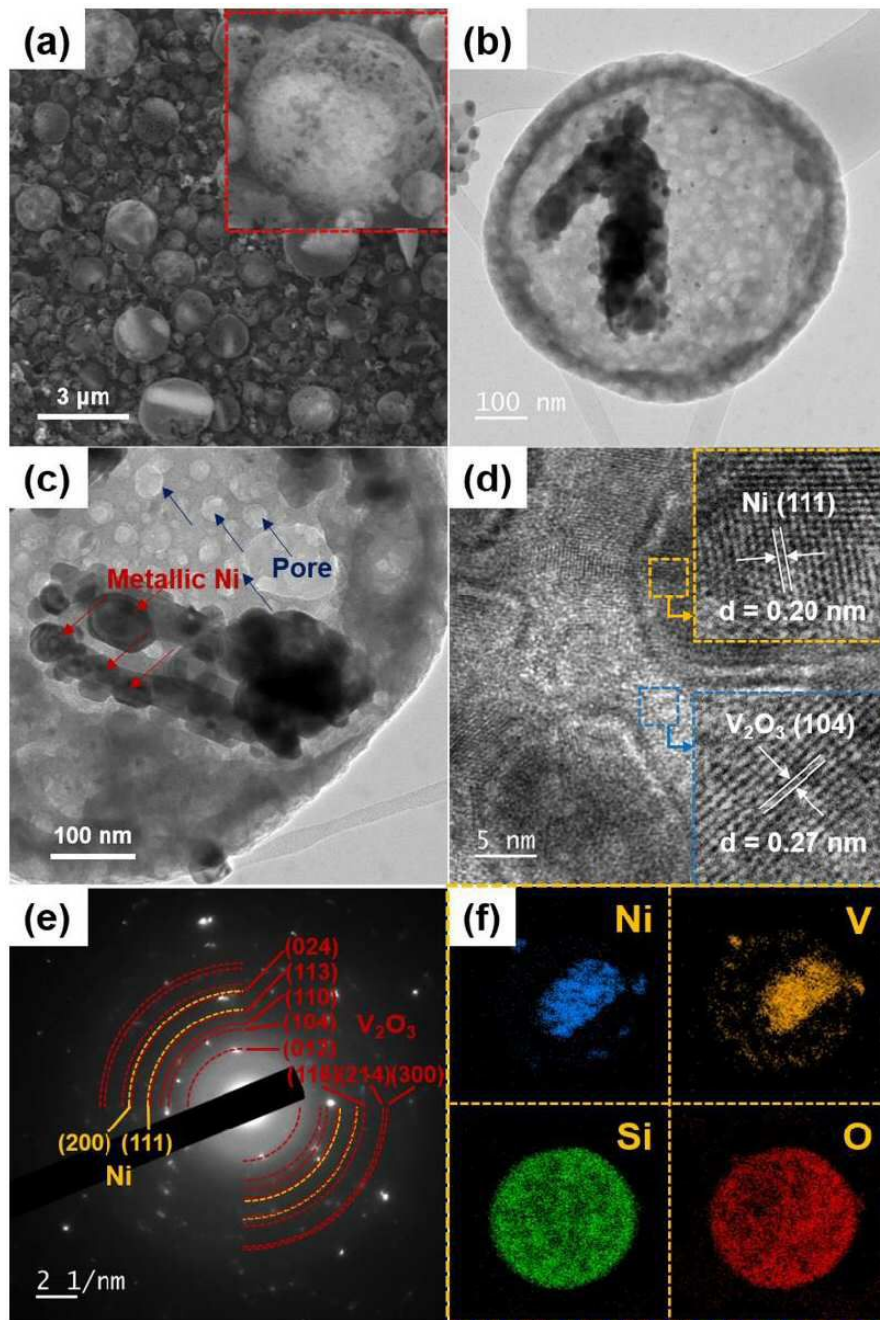
려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

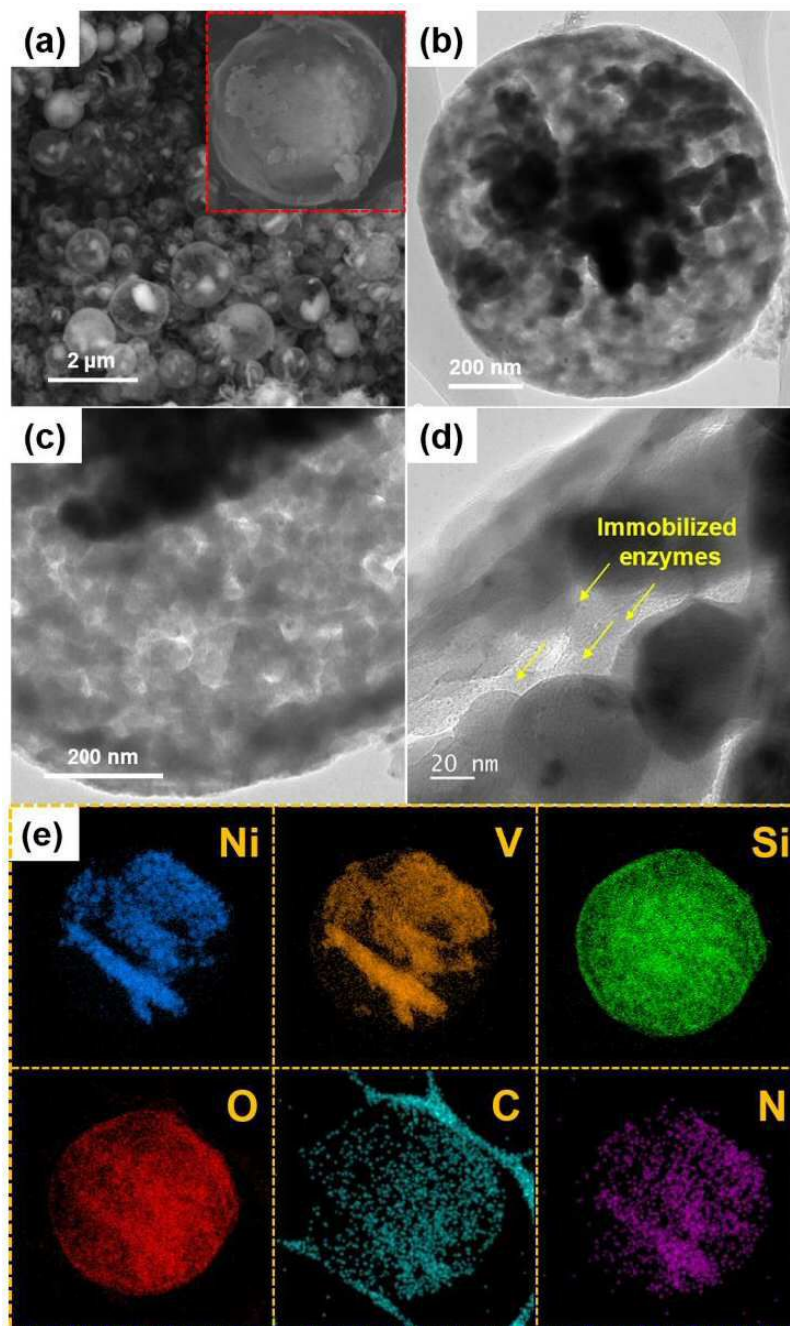
도면1



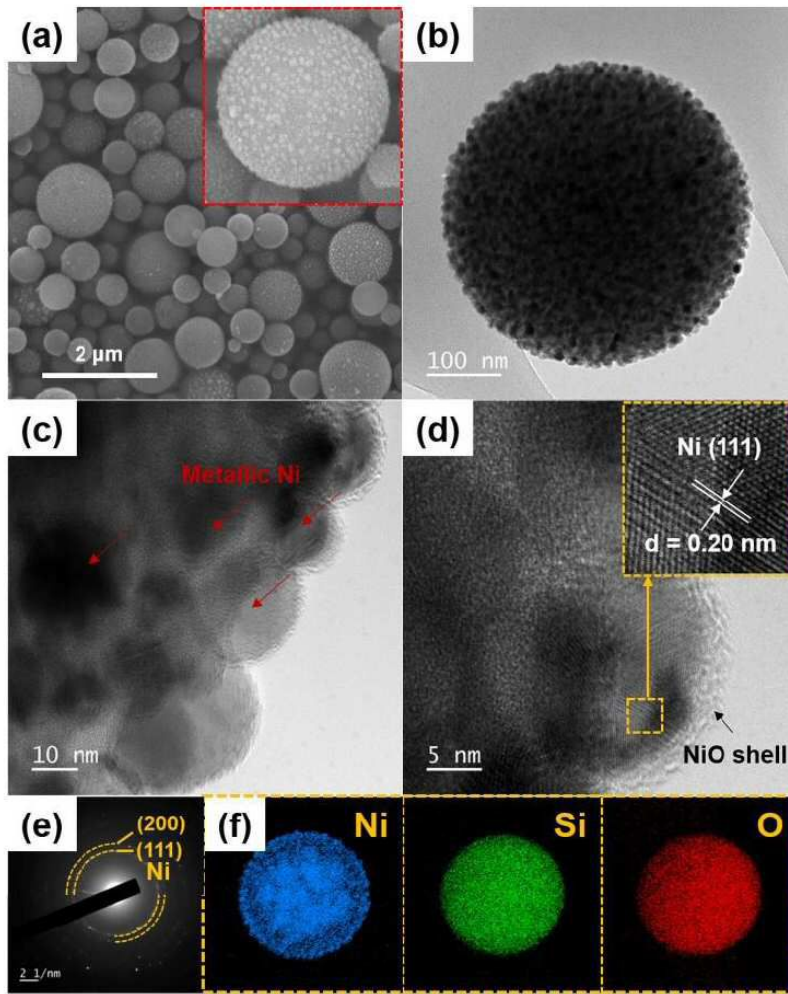
도면2



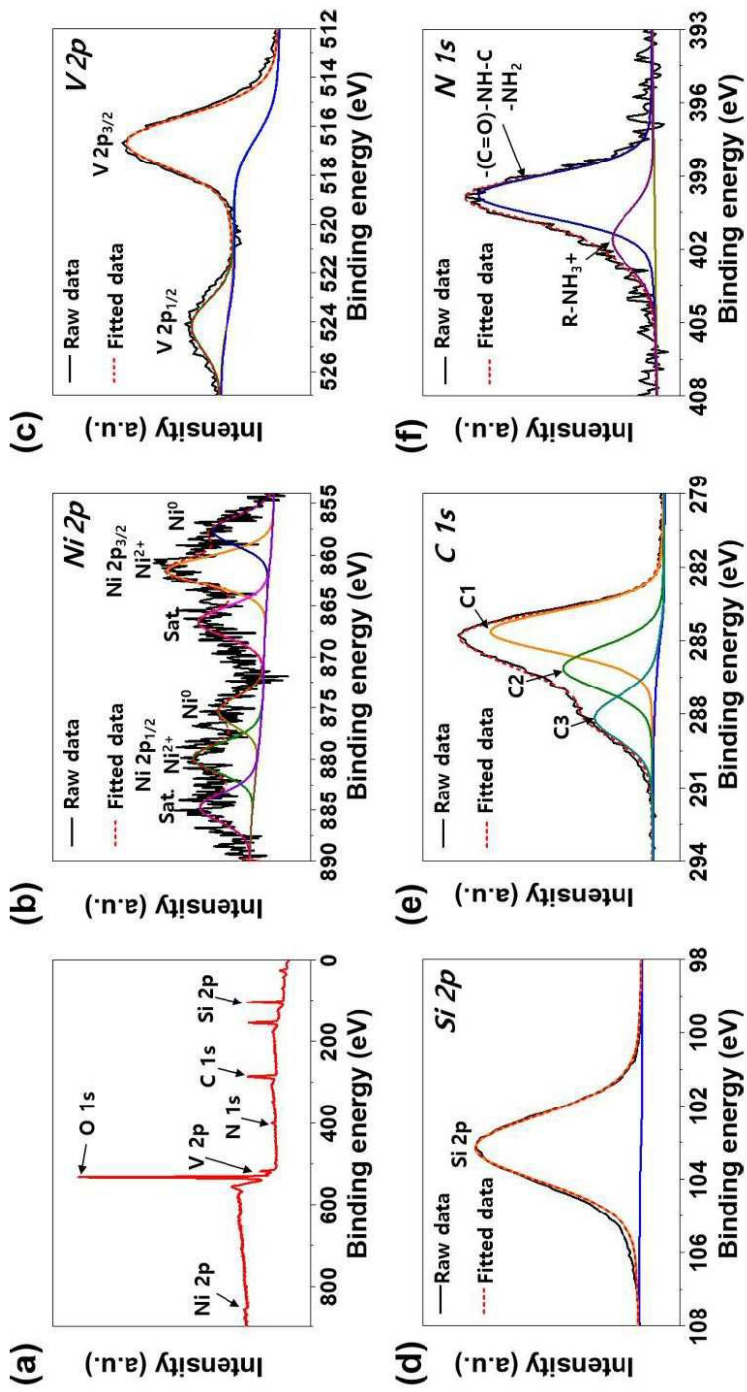
도면3



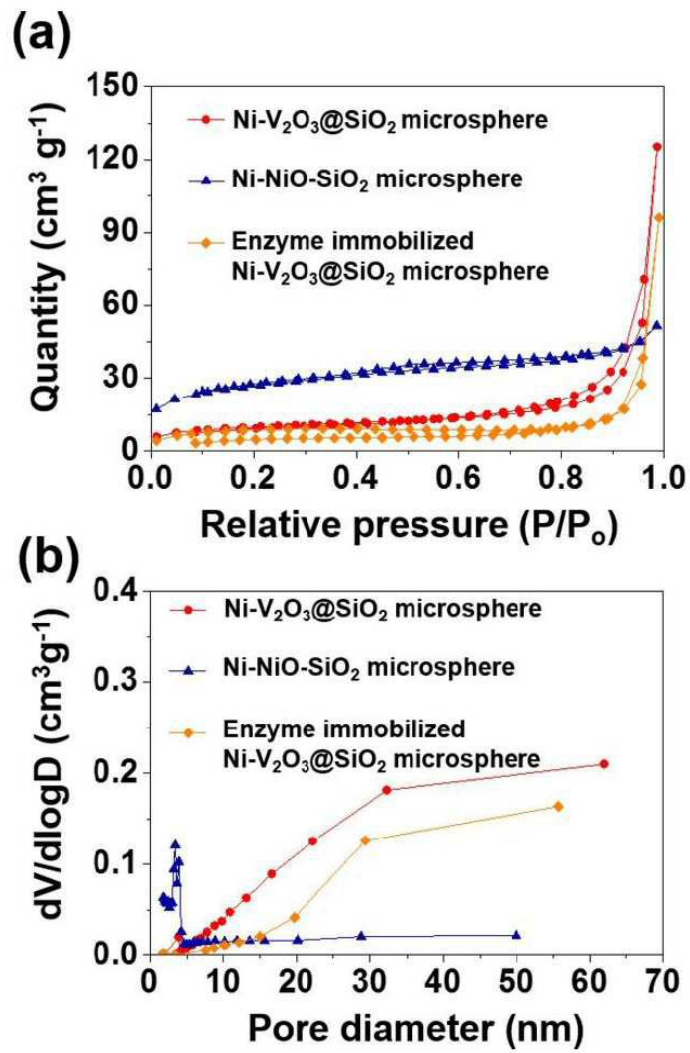
도면4



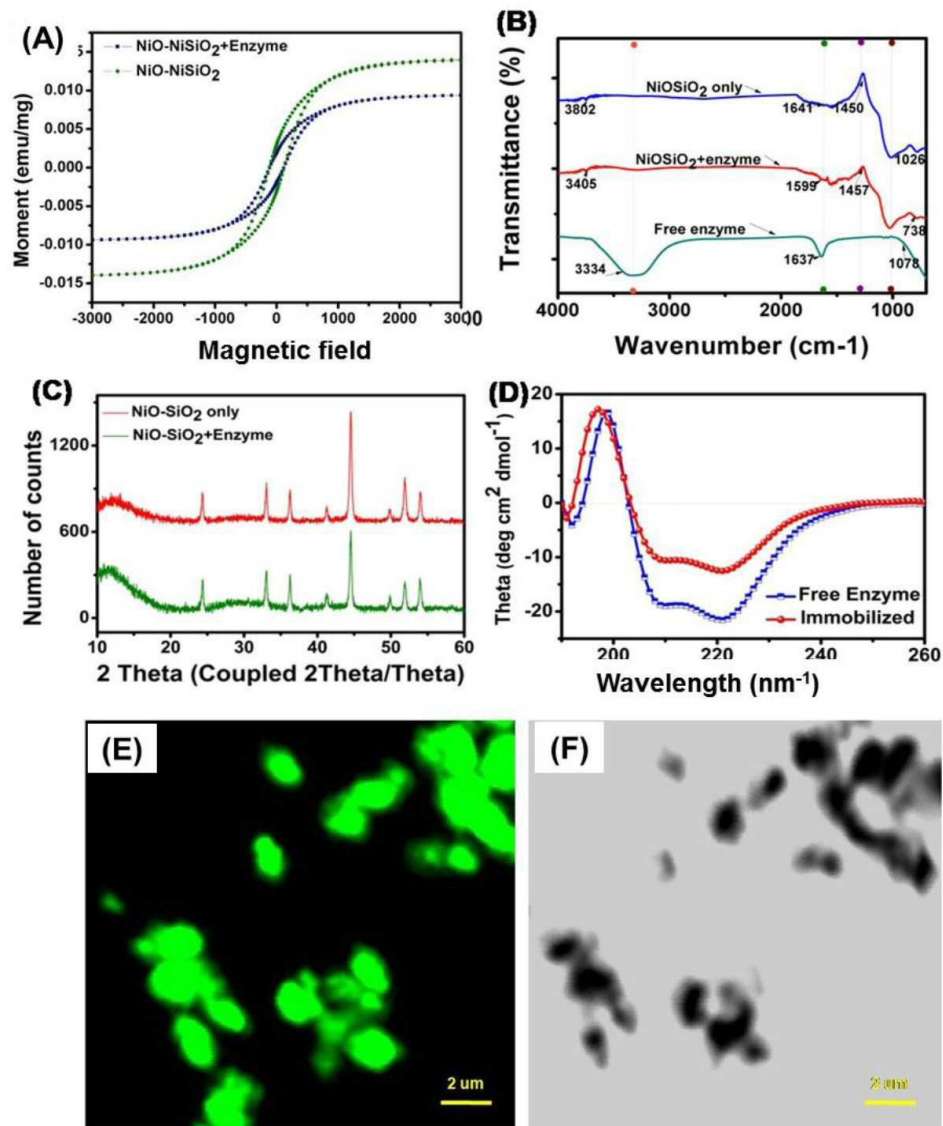
도면5



도면6

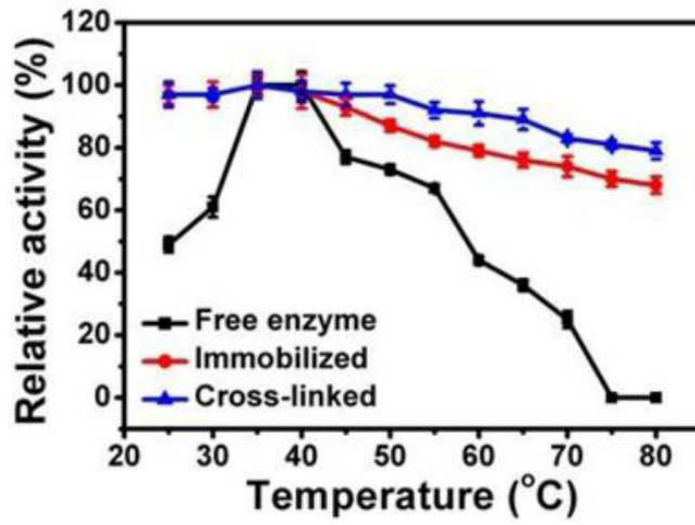


도면7

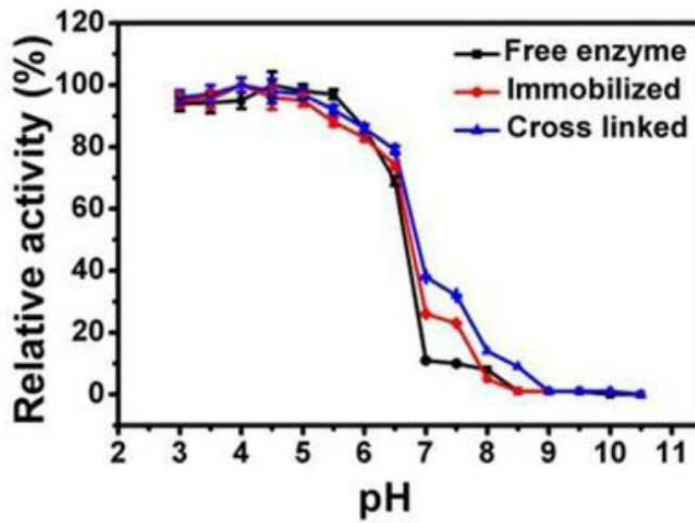


도면8

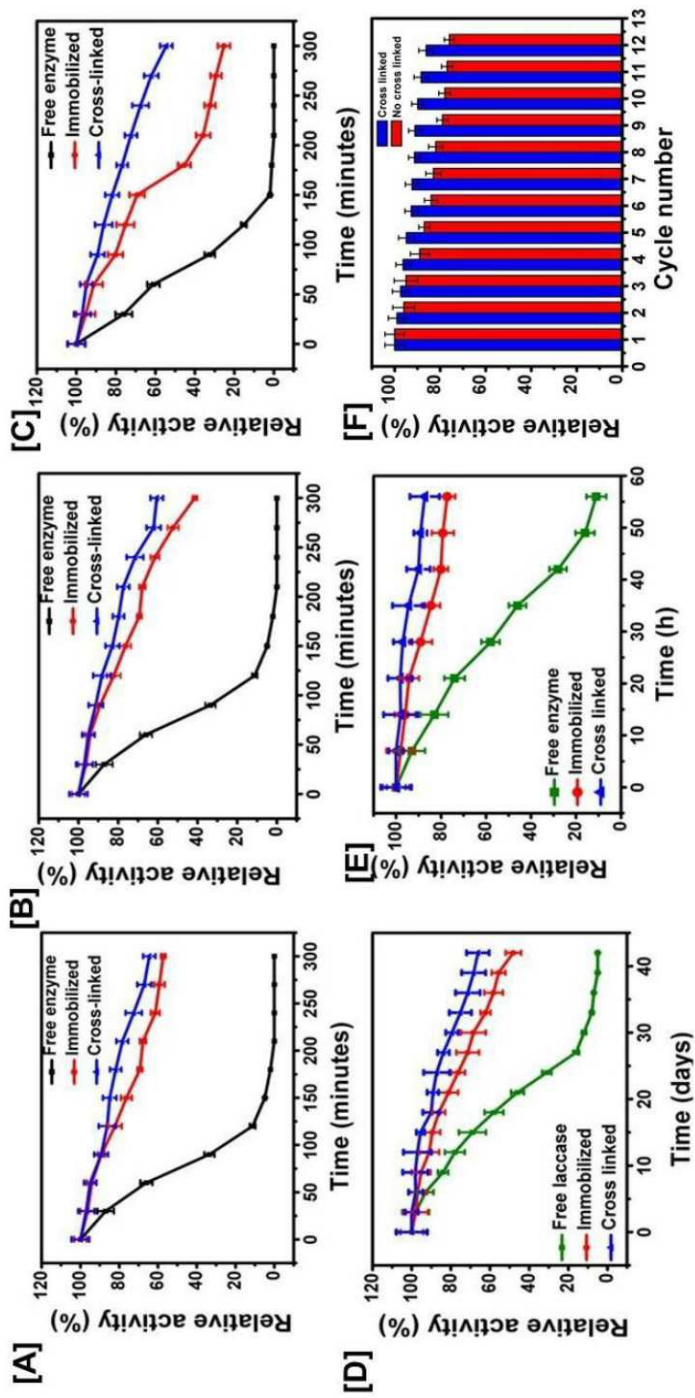
(a)



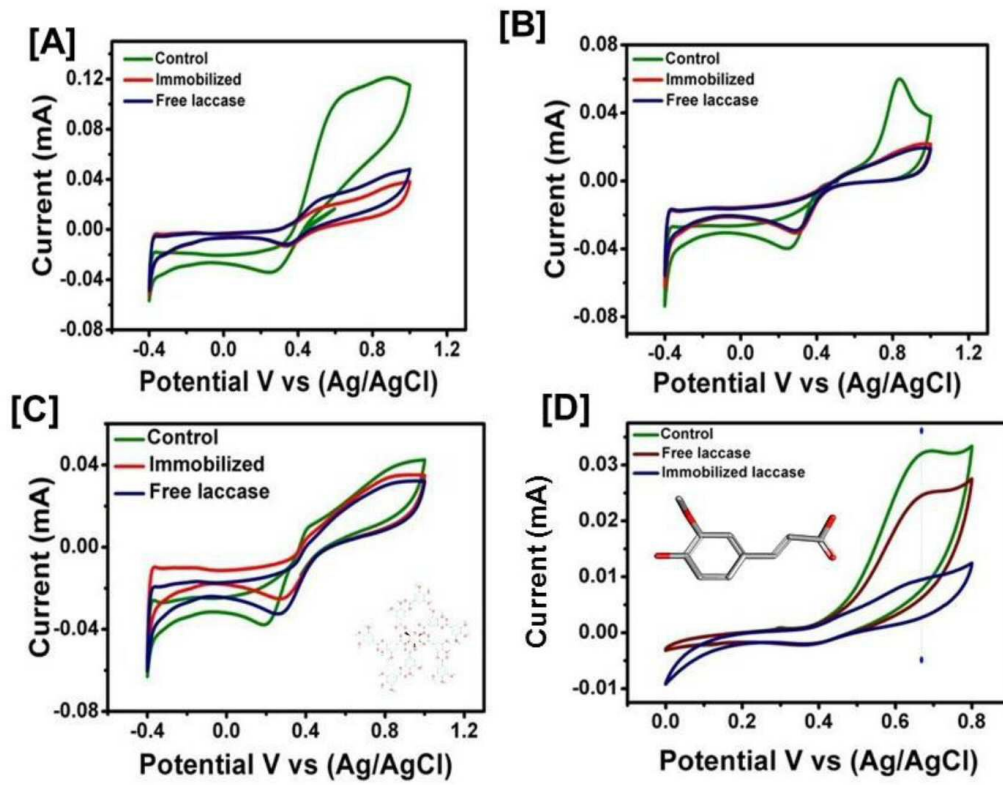
(b)



도면9



도면10



도면11

