

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6970311号

(P6970311)

(45) 発行日 令和3年11月24日 (2021. 11. 24)

(24) 登録日 令和3年11月1日 (2021. 11. 1)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 11/14 (2006. 01)	C 1 2 N 11/14	
C 1 2 M 1/40 (2006. 01)	C 1 2 M 1/40	A
H O 1 M 8/16 (2006. 01)	H O 1 M 8/16	
H O 1 M 4/90 (2006. 01)	H O 1 M 4/90	Y
H O 1 M 4/96 (2006. 01)	H O 1 M 4/96	M
請求項の数 15 (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-561910 (P2020-561910)	(73) 特許権者	510273880
(86) (22) 出願日	令和1年11月29日 (2019. 11. 29)		コリア ユニバーシティ リサーチ アン
(65) 公表番号	特表2021-519104 (P2021-519104A)		ド ビジネス ファウンデーション
(43) 公表日	令和3年8月10日 (2021. 8. 10)		KOREA UNIVERSITY RE
(86) 国際出願番号	PCT/KR2019/016745		SEARCH AND BUSINESS
(87) 国際公開番号	W02020/159061		FOUNDATION
(87) 国際公開日	令和2年8月6日 (2020. 8. 6)		大韓民国、02841 ソウル、ソンプク
審査請求日	令和2年11月27日 (2020. 11. 27)		ーグ、アナムーロ 145
(31) 優先権主張番号	10-2019-0012428	(74) 代理人	100108833
(32) 優先日	平成31年1月31日 (2019. 1. 31)		弁理士 早川 裕司
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)	(74) 代理人	100162156
			弁理士 村雨 圭介
早期審査対象出願			
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素－多孔性炭素複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多孔性炭素担体と；前記多孔性炭素担体の孔隙内部に吸着されて担持された酵素と；を含み、

前記酵素は、前記多孔性炭素担体の孔隙表面との疎水性相互作用を誘導するために前記酵素に導入された第2官能基としてビニル基を備える、酵素－多孔性炭素複合体。

【請求項 2】

前記酵素－多孔性炭素複合体は、緩衝溶液上で12日間攪拌後に酵素の流出量が攪拌前に比べて33%未満であることを特徴とする請求項1に記載の酵素－多孔性炭素複合体。

【請求項 3】

前記酵素－多孔性炭素複合体は、緩衝溶液上で12日間攪拌後に酵素の活性が攪拌前に比べて16%以上であることを特徴とする請求項1または2に記載の酵素－多孔性炭素複合体。

【請求項 4】

前記酵素－多孔性炭素複合体は、緩衝溶液上で45日間攪拌後に酵素の活性が攪拌前に比べて72%以上であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の酵素－多孔性炭素複合体。

【請求項 5】

前記多孔性炭素担体は、前記酵素との疎水性相互作用を誘導するために、孔隙表面に第1官能基をさらに備えることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の酵素－多孔性

10

20

炭素複合体。

【請求項 6】

前記多孔性炭素担体は、前記酵素との親水性相互作用を誘導するために、孔隙表面に第 1 官能基をさらに備えることを特徴とする請求項 1～5 のいずれかに記載の酵素－多孔性炭素複合体。

【請求項 7】

前記第 1 官能基は、アルキル基、フェニル基、ベンジル基、ビニル基およびハロ基よりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の疎水性相互作用を誘導する官能基を含むことを特徴とする請求項 5 に記載の酵素－多孔性炭素複合体。

【請求項 8】

前記第 1 官能基は、ヒドロキシ基、カルボニル基、ハライド基、カルボキシ基、メトキシ基、ヒドロペルオキシ基、アミン基、イミン基、イミド基、ニトリル基、ニトロ基、チオール基、スルフィノ基およびリン酸基よりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の親水性相互作用を誘導する官能基を含むことを特徴とする請求項 6 に記載の酵素－多孔性炭素複合体。

【請求項 9】

前記多孔性炭素担体の孔隙のサイズは、1～5000 nmであることを特徴とする請求項 1～8 のいずれかに記載の酵素－多孔性炭素複合体。

【請求項 10】

前記酵素は、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、リパーゼ、グルコース酸化酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ、チロシナーゼ、炭酸脱水酵素、ホルムアルデヒド脱水酵素、ギ酸脱水酵素、アルコール脱水酵素、コレステロール脱水酵素、アシラーゼ、ラクトナーゼ、プロテアーゼ、ペルオキシダーゼ、アミノペプチダーゼ、ホスファターゼ、トランスアミナーゼ、セリナーエンドペプチダーゼ、システイナーエンドペプチダーゼおよびメタロエンドペプチダーゼよりなる群から選ばれた 1 種以上の酵素を含むことを特徴とする請求項 1～9 のいずれかに記載の酵素－多孔性炭素複合体。

【請求項 11】

前記第 2 官能基は、アルキル基、フェニル基、ベンジル基およびハロ基よりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の疎水性相互作用を誘導する官能基をさらに含むことを特徴とする請求項 1～10 のいずれかに記載の酵素－多孔性炭素複合体。

【請求項 12】

請求項 1～11 のいずれかに記載の酵素－多孔性炭素複合体を含むバイオ燃料電池。

【請求項 13】

請求項 1～11 のいずれかに記載の酵素－多孔性炭素複合体を含むバイオセンサー用電極。

【請求項 14】

請求項 1～11 のいずれかに記載の酵素－多孔性炭素複合体を含む二酸化炭素転換システム。

【請求項 15】

請求項 1～11 のいずれかに記載の酵素－多孔性炭素複合体を含むアンチファウリング (anti fouling) システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素－多孔性炭素複合体に関し、より具体的には、多孔性物質に酵素を固定化することによって酵素の安定性を向上させる技術により長時間酵素の漏出を防止して、酵素を効果的に多孔性炭素物質の内部に固定させた酵素－多孔性炭素複合体に関する。

【背景技術】

【0002】

酵素は、多様な化学反応を促進する生触媒物質であって、高度な選択性、精密性、効率

10

20

30

40

50

性などを有しており、常温・常圧条件でも非常に速い速度で化学反応を促進するので、多様な産業に用いられる。しかしながら、産業分野の反応環境では、熱、pH、せん断応力などの外部環境により酵素の3次元構造が容易に変性されて、酵素の活性が早く消失する問題がある。したがって、酵素の安定性を向上させるための多様な研究が進行されている。

【0003】

酵素の安定性を向上させる技術のうちでも、固体支持体に酵素を固定化する技法は、酵素の安定性を向上させることができると共に、不均一触媒により反応溶液から固定化した酵素を容易に分離することができるという長所がある。特に多孔性物質は、酵素のサイズに対応して孔隙のサイズおよび形態を多様に調節できるので、酵素固定化のための最適な物質として研究されている。また、多孔性物質の内部に酵素を固定化する場合、多孔性物質の孔隙内部において酵素は、単位ミリリットル当たり数百ミリグラムの高濃度で存在する込合い効果(crowding effect)によってその安定性が画期的に向上することができる。また、多孔性物質は、外部のせん断応力など物理的な効果から内部に固定化された酵素を保護できるので、苛酷な環境でも酵素反応を適用することができる。

10

【0004】

しかしながら、一般的な多孔性物質の内部に担持された酵素は、容易に外部に漏れ出す可能性があり、漏れ出た酵素は回収されずに捨てられたり、外部環境により酵素構造が変性され得るので、結果的には、固定化された酵素の活性減少につながる可能性がある。

【0005】

20

これを解決するために、酵素を多孔性物質の内部に共有結合させて酵素の漏出を防止する技術が研究された。物理化学的方法を通じて多孔性物質を官能化(functionalization)した後に、架橋結合剤を用いて多孔性物質の官能基と酵素側鎖(side chain)の官能基との間に架橋結合を形成させることによって、多孔性物質の内部に担持された酵素が漏れ出るのを防止する技術である。

【0006】

しかしながら、共有結合技術を適用するためには、多孔性物質の合成過程でさらなる官能化過程を導入しなければならないという短所がある。また、多孔性物質の細孔内表面に位置する官能基と酵素表面の官能基との間に二つ以上の共有結合が誘導されれば、酵素の構造的変性を通した酵素の不活性化が発生しうる。

30

【0007】

一方、共有結合技術が応用されて酵素の漏出を防止するために、ナノ酵素反応器(nanoscale enzyme reactor)の技術が研究された。ナノ酵素反応器の技術は、多孔性物質の内部に酵素を担持させ、担持された酵素が漏れ出る前に酵素間に架橋結合を形成させて、多孔性物質のポア入口の直径より架橋された酵素のサイズを増加させることによって、多孔性物質の内部に担持された酵素が漏れ出るのを防止する技術である。

【0008】

しかしながら、従来のナノ酵素反応器の技術では、架橋結合剤により酵素の表面に二つ以上の架橋結合が誘導され得るが、この際、ギ酸脱水素酵素、ホルムアルデヒド脱水素酵素、アルコール脱水素酵素などのように酵素が容易に変性されて活性を失う可能性のある不安定な酵素の場合、当該技術で安定化させることが難しい。

40

【0009】

また、酵素を架橋結合剤を用いて安定化させる場合、グルタルジアルデヒドなどのような架橋結合剤の生体適合性が問題になり得、そのため、医療分野には活用しにくいという問題がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、前記の問題点を解決するために案出されたものであって、その目的は、酵素

50

活性の低下を最小化しつつ、酵素を多孔性物質内に固定化させ、かつ、多孔性物質内に固定化された酵素の漏出が防止され、多孔性物質内に固定化された酵素の安定性を確保した酵素－多孔性炭素複合体を提供することにある。

〔本発明を支援した韓国の国家研究開発事業〕

－課題固有番号：20182010600430

－部署名：産業通商資源部

－研究管理専門機関：エネルギー技術評価院

－研究事業名：エネルギー技術開発事業

－研究課題名：高集積・高安定性酵素システムを基盤としたCO₂転換工程技術の開発

－主管機関：高麗大学校

－研究期間：2019.04.01～2019.12.31

【課題を解決するための手段】

【0011】

上述した課題を解決するために、本発明は、多孔性炭素担体と、該多孔性炭素担体の孔隙内部に担持された酵素とを含む酵素－多孔性炭素複合体を提供する。

【0012】

本発明の一実施例によれば、前記酵素は、少なくとも一部が多孔性炭素担体の孔隙内部に吸着されて担持されたものでありうる。

【0013】

また、前記多孔性炭素担体は、メソポーラス炭素および／またはマイクロポーラス炭素であり得、一例として、孔隙のサイズは、1～5000nmでありうる。

【0014】

また、前記酵素は、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、リパーゼ、グルコース酸化酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ、チロシナーゼ、炭酸脱水酵素、ホルムアルデヒド脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、コレステロール脱水素酵素、アシラーゼ、ラクトナーゼ、プロテアーゼ、ペルオキシダーゼ、アミノペプチダーゼ、ホスファターゼ、トランスアミナーゼ、セリン－エンドペプチダーゼ、システイン－エンドペプチダーゼおよびメタロエンドペプチダーゼよりなる群から選ばれた1種以上の酵素を含むことができる。

【0015】

また、前記多孔性炭素担体は、前記酵素との疎水性相互作用および親水性相互作用のうちいずれか一つ以上を誘導するために、孔隙表面に第1官能基をさらに備えることができる。

【0016】

また、前記第1官能基は、アルキル基、フェニル基、ベンジル基、ビニル基およびハロ基などよりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の疎水性相互作用を誘導する官能基およびヒドロキシ基、カルボニル基、ハライド基、カルボキシル基、メトキシ基、ヒドロペルオキシ基、アミン基、イミン基、イミド基、ニトリル基、ニトロ基、チオール基、スルフィノ基およびリン酸基などよりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の親水性相互作用を誘導する官能基のうちいずれか一つ以上を含むことができる。

【0017】

また、前記酵素は、前記多孔性炭素担体の孔隙表面との疎水性相互作用および親水性相互作用のうちいずれか一つ以上を誘導するための第2官能基をさらに備えることができる。

【0018】

また、前記第2官能基は、アルキル基、フェニル基、ベンジル基、ビニル基およびハロ基などよりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の疎水性相互作用を誘導する官能基およびヒドロキシ基、カルボニル基、ハライド基、カルボキシル基、メトキシ基、ヒドロペルオキシ基、アミン基、イミン基、イミド基、ニトリル基、ニトロ基、チオール基、スルフィノ基およびリン酸基などよりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の親水性相互作用を

10

20

30

40

50

誘導する官能基のうちいずれか一つ以上を含むことができる。

【0019】

また、前記酵素－多孔性炭素複合体は、緩衝溶液に混合された状態で12日間攪拌後、多孔性炭素複合体に担持された酵素の流出量が攪拌前に比べて33%未満でありうる。

【0020】

また、前記酵素－多孔性炭素複合体は、緩衝溶液に混合された状態で12日間攪拌後、酵素－多孔性炭素複合体の酵素活性が攪拌前に比べて16%以上でありうる。

【0021】

また、前記酵素－多孔性炭素複合体は、緩衝溶液に混合された状態で45日間攪拌後、酵素－多孔性炭素複合体の酵素活性が攪拌前に比べて72%以上でありうる。

10

【0022】

また、本発明は、本発明による酵素－多孔性炭素複合体を含むバイオ燃料電池またはバイオセンサー用電極を提供する。

【0023】

また、本発明は、本発明による酵素－多孔性炭素複合体を含む二酸化炭素転換システムを提供する。

【0024】

また、本発明は、本発明による酵素－多孔性炭素複合体を含むアンチファウリング (antifouling) システムを提供する。

【発明の効果】

20

【0025】

本発明による酵素－多孔性炭素複合体は、酵素活性部位の変性なしに、多孔性炭素の内部に酵素を固定化させ、安定化するのに適するように使用することができる。また、従来の酵素安定化技術に応用された架橋結合剤のような生体適合性が問題になる成分を使用せずに、酵素を固定化、安定化することによって、使用が制限された医療分野にも使用が拡大され得る。また、酵素－多孔性炭素複合体をブドウ糖を基盤とするバイオ燃料電池および血糖測定を目的とするバイオセンサーの電極製作を目的としてグルコース酸化酵素などの関連酵素を固定化に活用する場合、非常に高い安定化効果を達成することができる。また、二酸化炭素を重炭酸塩に転換しうる炭酸脱水酵素および重炭酸塩からギ酸転換が可能なギ酸脱水酵素などの関連酵素を固定化に活用される場合、従来の多孔性物質を用いた固定化方式に比べて酵素の活性を長時間安定的に維持することが可能で、二酸化炭素転換および活用システムの触媒素材として活用することができる。また、クオラムセンシング (quorum sensing) の役割を行う信号分子 (signaling molecule) を分解して、バイオフィーム (biofilm) の形成を抑制できるアシラーゼなどの関連酵素を固定化に活用する場合、従来の多孔性物質を用いた固定化方式に比べて酵素の活性を安定的に維持することが可能で、メンブレン表面のバイオフィームの形成を抑制するための目的でアンチファウリング (antifouling) システム内の触媒素材として活用することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0026】

40

図1は、本発明の一実施例による酵素－多孔性炭素複合体の製造過程を概略的に示すものである。

図2は、本発明の一実施例によるギ酸脱水酵素－多孔性炭素複合体において多孔性炭素の単位重さ当たり酵素の活性を示すグラフである。

図3a～図3cは、それぞれ本発明の一実施例によるグルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体、炭酸脱水酵素－多孔性炭素複合体およびアシラーゼ－多孔性炭素複合体において多孔性炭素の単位重さ当たり酵素の活性を示すグラフである。

図4は、本発明の一実施例によるギ酸脱水酵素－多孔性炭素複合体の時間による酵素活性の安定性を測定したグラフである。

図5a～図5cは、本発明の一実施例によるグルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体、

50

炭酸脱水酵素－多孔性炭素複合体およびアシラーゼ－多孔性炭素複合体の時間による酵素活性の安定性を測定したグラフである。

図6a～図6cは、本発明の一実施例によるグルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体、炭酸脱水酵素－多孔性炭素複合体およびアシラーゼ－多孔性炭素複合体において多孔性炭素の単位重さ当たり酵素の初期担持量を示すグラフである。

図7a～図7cは、本発明の一実施例によるグルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体、炭酸脱水酵素－多孔性炭素複合体およびアシラーゼ－多孔性炭素複合体において保管された時間による多孔性炭素の単位重さ当たり酵素の担持量の変化を示すグラフである。

図8は、本発明の一実施例によるギ酸脱水素酵素－多孔性炭素複合体と、架橋結合されたギ酸脱水素酵素が多孔性炭素内に固定化された複合体の活性を比較したグラフである。

図9aおよび9bは、本発明の一実施例による官能基処理されたグルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体およびアシラーゼ－多孔性炭素複合体において多孔性炭素の単位重さ当たり酵素の初期担持量を示すグラフである。

図10aおよび図10bは、本発明の一実施例による官能基処理されたグルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体およびアシラーゼ－多孔性炭素複合体において保管された時間による多孔性炭素の単位重さ当たり酵素の担持量の変化を示すグラフである。

図11aおよび図11bは、本発明の一実施例によるグルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体、アシラーゼ－多孔性炭素複合体、官能基処理されたグルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体および官能基処理されたアシラーゼ－多孔性炭素複合体と、多孔性担体を多孔性シリカに変更して具現された複合体において多孔性担体の単位重さ当たり酵素の初期担持量を示すグラフである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

以下、添付の図面を参照して本発明の実施例について本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者が容易に実施できるように詳細に説明する。ただし、本発明は、様々な異なる形態に具現され得、ここで説明する実施例に限定されない。

【0028】

図1を参照して説明すると、本発明の一実施例による酵素－多孔性炭素複合体は、酵素と多孔性炭素担体とを含んで具現され、具体的に、前記多孔性炭素担体の内部に備えられた孔隙に酵素が担持されて備えられる。この際、前記酵素は、多孔性炭素担体の孔隙表面および酵素と酵素間に共有結合なしに孔隙に担持され得る。一例として、前記酵素は、多孔性炭素担体の孔隙に吸着状態で備えられる。この際、前記吸着状態の酵素のうち少なくとも一部は、多孔性炭素担体の孔隙表面に吸着され得る。また、前記酵素は、いずれか一つの酵素と隣接した他の酵素との間にも吸着状態で孔隙に備えられる。この場合、酵素間に共有結合なしに酵素が凝集体を形成することによって、孔隙の入口直径より相対的に物理的サイズが大きくなり得るが、これを通じて、酵素が孔隙から漏れ出るのが最小化または防止され得る。

【0029】

一方、多孔性物質の孔隙内部に酵素が担持されるといって、上記のような多孔性物質の孔隙表面と酵素間吸着や酵素間吸着を通じて酵素の漏出を防止できるものではない。また、多孔性物質の種類に関係なく、孔隙の体積に対応する量だけ酵素を多孔性物質の孔隙内部に導入できるものでもない。

【0030】

本発明の発明者は、酵素を多孔性物質の内部孔隙に収容するために、従来多く使用された多孔性シリカの代わりに、多孔性炭素物質を担体として用いる場合、酵素を孔隙内部に多量で担持させることができ、担持された酵素の活性を安定的に長期間維持することができることを知見して、本発明に至ることになった。このような効果は、多孔性物質内担持された酵素の漏出を防止するために、架橋結合剤を使用したり、共有結合のための官能基を具備するしかなかった従来の酵素固定化、安定化方法では予想しなかった画期的なものと評価することができる。

【0031】

すなわち、図2から確認できるように、多孔性物質としてシリカを使用した比較例1の場合、ギ酸脱水素酵素 (formate dehydrogenase, FDH) を担持させる処理をしたにもかかわらず、FDH酵素活性が測定されなかった反面、多孔性物質として多孔性炭素を使用した実施例1の場合、同じ酵素を同じ方法で処理したにもかかわらず、顕著に優れた酵素活性が感知されたことを確認することができる。このような技術的特徴は、図3a～図3cに示されたように、酵素の種類をグルコース酸化酵素 (glucose oxidase, GOx)、炭酸脱水素酵素 (carbonic anhydrase, bCA) およびアシラーゼ (acylase, AC) に変更した実験と同様に確認され、多孔性シリカ (比較例2～4) において酵素活性が測定されたが、その程度が多孔性炭素 (実施例2～4) より顕著に小さいことが分かる。

10

【0032】

また、図4から確認できるように、活性が測定されない比較例1に代わって、遊離酵素を溶液中に調製した比較例7は、酵素活性が1日以前に初期活性対比40%未満に急激に低くなった後、2～3日以内に酵素活性をほぼ喪失した。しかしながら、多孔性炭素内孔隙に担持された酵素の場合、初期活性対比80%に近い水準を維持しつつ、45日以上持続していることを確認することができる。このような技術的特徴は、図5a～図5cに示されたように、酵素の種類をグルコース酸化酵素、炭酸脱水素酵素およびアシラーゼに変更した実験と同様に確認された。結局、本発明の一実施例による酵素－多孔性炭素複合体は、多孔性炭素内酵素がいかなる共有結合なくとも漏出が防止され、安定的に酵素活性を長期間発現することができる。

20

【0033】

しかも、図6a～図6cを参照して説明すると、多孔性担体としてシリカを使用した比較例2～4に比べて多孔性担体として炭素を使用した実施例2～4においてグルコース酸化酵素、炭酸脱水素酵素およびアシラーゼの担持量 (enzyme loading) が顕著に高くなったことを観察した。また、図7a～図7cに示されたように、1日が経過した以後からは、多孔性炭素に担持された酵素がほとんど漏出せずに持続的に残っていることを確認することができた。したがって、多孔性炭素担体は、他の材質の多孔性物質と対比した場合、酵素を容易に孔隙内部に導入することができ、シリカ担体に比べてさらに高い担持量を提供することができ、導入後に持続的な攪拌反応にも酵素の漏出を防止することができて、酵素を安定的に担持することができるという利点がある。前記多孔性炭素担体は、内部に多数個の孔隙を有する炭素物質の場合、制限なしに使用され得、好ましくは酵素と相互作用ができる炭素物質の場合、制限なしに使用され得る。一例として、前記多孔性炭素は、孔隙のサイズが1～5, 000nm、他の一例として、1～1, 000nm、さらに他の一例として、1～500nmに具現された多孔性炭素でありうるが、これに制限されない。

30

【0034】

また、前記多孔性炭素担体は、形状において制限されるものではないが、一例として、球形、楕円形および非定形の粒子形態であるか、表面にフィルム形態に具現されたものであり得る。また、粒子形態の多孔性炭素担体は、サイズが100nm～1, 000μmであり得、ここで、担体のサイズは、形状が球形の場合、直径、非定形の場合、表面の互いに異なる二つの地点間距離のうち最大距離を意味する。

40

【0035】

また、多孔性炭素担体の表面積は、100～5000m²/gであり得、孔隙の体積は、0.1～10cm³/gでありうるが、これに制限されない。

【0036】

本発明の一実施例によれば、前記多孔性炭素担体は、担持される酵素の漏出を防止し、長期間安定的に酵素活性を発現させるために、酵素と相互作用を誘導できる第1官能基をさらに備えることができ、具体的に、前記官能基は、少なくとも多孔性炭素担体内孔隙表面に備えられる。前記相互作用は、非共有相互作用であり、一例として、前記相互作用は

50

、疎水性相互作用または親水性相互作用でありうる。前記親水性相互作用は、一例として、水素結合、イオン結合でありうる。このような相互作用は、共有結合に比べて酵素の立体構造に及ぼす影響が最小化または防止されることによって、従来共有結合を通じて支持体に酵素を固定化させたり共有結合を通じて酵素と酵素を架橋結合させるときに発生する強い結合力による酵素の立体構造変形の問題と、これによる酵素活性の低下または喪失の問題を防止したり最小化しうるという利点がある。この際、多孔性炭素担体に備えられる第1官能基は、親水性相互作用を誘導できる官能基よりは、疎水性相互作用を誘導する官能基が、酵素の孔隙内導入および漏出を防止し、安定的に長時間固定化させるのに一層有利になりうる。ただし、これは、導入される酵素の特性によってかえって親水性相互作用が有利な場合もありえることを明らかにする。

10

【0037】

前記第1官能基は、疎水性相互作用や、親水性相互作用を誘導できる官能基の場合、制限なしに採用され得るが、一例として、前記第1官能基は、アルキル基、フェニル基、ベンジル基、ビニル基およびハロ基などよりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の疎水性相互作用を誘導する官能基およびヒドロキシ基、カルボニル基、ハライド基、カルボキシル基、メトキシ基、ヒドロペルオキシ基、アミン基、イミン基、イミド基、ニトリル基、ニトロ基、チオール基、スルフィノ基およびリン酸基などよりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の親水性相互作用を誘導する官能基のうちいずれか一つ以上を含むことができる。

【0038】

20

また、前記第1官能基は、多孔性炭素の孔隙表面に公知の発明を通じて導入することができ、本発明は、これに対して特に限定しない。

【0039】

次に、上述した多孔性炭素担体内孔隙に担持される酵素は、公知となった酵素の場合、制限なしに使用され得る。前記酵素は、好ましくはトリプシン、キモトリプシン、ペプシン、リパーゼ、グルコース酸化酵素、西洋ワサビペルオキシダーゼ、チロシナーゼ、炭酸脱水酵素、ホルムアルデヒド脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、コレステロール脱水素酵素、アシラーゼ、ラクトナーゼ、プロテアーゼ、ペルオキシダーゼ、アミノペプチダーゼ、ホスファターゼ、トランスアミナーゼ、セリンーエンドペプチダーゼ、システインーエンドペプチダーゼ、メタロエンドペプチダーゼなどよりなる群から選ばれるいずれか一つ以上を含むことができる。特に、立体構造の安定性が多少良くないので、共有結合または架橋結合を通じた固定化時に酵素活性が低下しうるギ酸脱水素酵素、ホルムアルデヒド脱水素酵素、アルコール脱水素酵素などよりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の酵素は、本発明によって多孔性炭素担体内担持時に酵素活性を安定的に発現できるという利点がある。図8を参照して説明すると、多孔性担体内に吸着されたギ酸脱水素酵素が含まれた実施例1とは異なって、多孔性担体内で架橋結合剤により架橋結合されたギ酸脱水素酵素が溶液中に含まれた比較例8～9は、架橋結合剤の濃度が高まるにつれて、酵素活性が極めて低下することを確認することができる。結局、本発明の一実施例による酵素－多孔性炭素複合体は、多孔性炭素担体内担持時に酵素活性を安定的に発現できるという利点がある。

30

40

【0040】

本発明の一実施例によれば、前記酵素は、多孔性炭素担体および／または前記担体の孔隙に担持される酵素間に相互作用を増進させるために、非共有相互作用、具体的には、疎水性相互作用および親水性相互作用のうちいずれか一つ以上を誘導するための第2官能基をさらに備えることができる。前記第2官能基は、酵素の立体構造に影響を最小化しながらも、多孔性炭素の孔隙で漏出を防止し、安定的に酵素活性を発現するように機能することができる。前記第2官能基は、疎水性相互作用や、親水性相互作用を誘導できる官能基の場合、制限なしに採用され得るが、一例として、前記第2官能基は、アルキル基、フェニル基、ベンジル基、ビニル基およびハロ基などよりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の疎水性相互作用を誘導する官能基およびヒドロキシ基、カルボニル基、ハライド基、

50

カルボキシル基、メトキシ基、ヒドロペルオキシ基、アミン基、イミン基、イミド基、ニトリル基、ニトロ基、チオール基、スルフィノ基およびリン酸基などよりなる群から選ばれたいずれか一つ以上の親水性相互作用を誘導する官能基のうちいずれか一つ以上を含むことができる。

【0041】

酵素に導入される第2官能基を通じた相互作用による担持量、酵素安定化を図9 a～図11 bを参照して説明すると、アクリロイルクロリドを使用して表面にビニル基を追加したグルコース酸化酵素および同一に表面にビニル基を追加したアシラーゼは、酵素に第2官能基を備えることなく、多孔性炭素担体と複合体を形成した場合に比べて担持量が顕著に向上したことを確認することができる。一方、多孔性担体として多孔性シリカを使用する場合には、酵素に相互作用ができる第2官能基を備えたにもかかわらず、酵素の担持量が、第2官能基のない酵素を多孔性炭素担体に担持させた場合に比べて顕著に低いことを確認することができる。

10

【0042】

担持後に酵素の漏出量と関連して図10を参照して説明すると、1日が経過した以後からは、多孔性炭素に担持された酵素がほとんど漏出せずに持続的に残っていることを確認することができた。

【0043】

結局、多孔性炭素担体は、他の材質の多孔性物質に比べて、酵素を容易に孔隙内部に導入することができ、シリカ担体に比べてさらに高い担持量を提供することができ、導入後に持続的な攪拌反応にも酵素の漏出を防止することができて、酵素を安定的に担持できるという利点がある。ひいては、このような多孔性炭素担体を活用して多孔性炭素担体および／または酵素に非共有相互作用を誘導できる官能基を追加に導入する場合、酵素と多孔性物質間の相互作用を増進させることによって、多孔性物質内にさらに高い担持量と、さらに上昇された酵素固定化、安定化効果を発現できるという利点がある。

20

【0044】

また、前記酵素は、上述した多孔性炭素担体との相互作用を向上させるために、酵素を構成するアミノ酸が追加／除去または変更を目的として遺伝子組換えされたものでありうるが、これに制限されない。

【発明を実施するための形態】

30

【0045】

以下、本発明を実施例を通じて具体的に説明する。ただし、本実施例により本発明の範囲が制限されるものではない。

【0046】

<実施例1>—ギ酸脱水素酵素が固定化された酵素—多孔性炭素複合体の製造 (FDH—Carbon)

リン酸緩衝液 (100mM pH7.0) で調製したギ酸脱水素酵素 (formate dehydrogenase, FDH) 溶液 (5mg/mL) と多孔性炭素 (mesoporous carbon) パウダー 2mg とを 2mL 体積で混合した後、30分間 200rpm で攪拌した。この過程を通じて、ギ酸脱水素酵素が多孔性炭素内孔隙に担持された酵素—多孔性炭素複合体を製造した。以後、多孔性炭素に担持されていないギ酸脱水素酵素を除去し、リン酸緩衝液で3回洗浄後、4℃に保管した。

40

【0047】

この際、前記多孔性炭素は、孔隙のサイズが 26nm、ウィンドウのサイズが 17nm、孔隙の体積が $1.53\text{ cm}^3/\text{g}$ であるものを使用した。

【0048】

<比較例1>—ギ酸脱水素酵素が固定化された酵素—多孔性シリカ複合体の製造 (FDH—Silica)

リン酸緩衝液 (100mM pH7.0) で調製したギ酸脱水素酵素溶液 (5mg/mL) と多孔性シリカ (mesoporous silica) パウダー 2mg とを 2mL

50

体積で混合した後、30分間200rpmで攪拌した。この過程を通じて、ギ酸脱水素酵素は、多孔性シリカ内孔隙に担持されることになる。多孔性シリカに担持されていないギ酸脱水素酵素を除去し、リン酸緩衝液で3回洗浄後、4℃に保管した。

【0049】

この際、前記多孔性シリカは、孔隙のサイズが25nm、ウィンドウのサイズが18nm、孔隙の体積が $1.90\text{ cm}^3/\text{g}$ であるものを使用した。

【0050】

＜実施例2＞－グルコース酸化酵素が固定化された酵素－多孔性炭素複合体の製造（GOx-Carbon）

実施例1と同一に実施して製造するものの、酵素をグルコース酸化酵素（glucose oxidase, GOx）に変更して、酵素－多孔性炭素複合体を製造した。 10

【0051】

＜比較例2＞－グルコース酸化酵素が固定化された酵素－多孔性シリカ複合体の製造（GOx-Silica）

比較例1と同一に実施して製造するものの、酵素の種類をグルコース酸化酵素に変更して、酵素－多孔性シリカ複合体を製造した。

【0052】

＜実施例3＞－炭酸脱水酵素が固定化された酵素－多孔性炭素複合体の製造（CA-Carbon）

実施例1と同一に実施して製造するものの、リン酸緩衝液（100mM pH7.6）に炭酸脱水酵素（bovine carbonic anhydrase, bCA）を用いて酵素－多孔性炭素複合体を製造した。 20

【0053】

＜比較例3＞－炭酸脱水酵素が固定化された酵素－多孔性シリカ複合体の製造（CA-Silica）

比較例1と同一に実施して製造するものの、リン酸緩衝液（100mM pH7.6）に炭酸脱水酵素を用いて酵素－多孔性シリカ複合体を製造した。

【0054】

＜実施例4＞－アシラーゼが固定化された酵素－多孔性炭素複合体の製造（AC-Carbon） 30

実施例1と同一に実施して製造するものの、酵素をアシラーゼ（acylase, AC）に変更して、酵素－多孔性炭素複合体を製造した。

【0055】

＜比較例4＞－アシラーゼが固定化された酵素－多孔性シリカ複合体の製造（AC-Silica）

比較例1と同一に実施して製造するものの、酵素をアシラーゼ（acylase, AC）に変更して、酵素－多孔性シリカ複合体を製造した。

【0056】

＜実施例5＞－ビニル基が導入されたグルコース酸化酵素を固定化した酵素－多孔性炭素複合体の製造（fGOx-Carbon） 40

実施例1と同一に実施して製造するものの、酵素をビニル基が導入されたグルコース酸化酵素に変更して、酵素－多孔性炭素複合体を製造した。この際、グルコース酸化酵素が含まれたリン酸緩衝溶液にアクリロイルクロリド（acryloyl chloride）を処理して、酵素の表面にビニル基を導入した。

【0057】

＜比較例5＞－ビニル基が導入されたグルコース酸化酵素を固定化した酵素－多孔性シリカ複合体の製造（fGOx-Silica）

実施例5と同一に実施して製造するものの、担体を多孔性シリカに変更して酵素－多孔性シリカ複合体を製造した。

【0058】

<実施例6>ービニル基が導入されたアシラーゼを固定化した酵素ー多孔性炭素複合体の製造 (f A C - C a r b o n)

実施例1と同一に実施して製造するものの、酵素をビニル基が導入されたアシラーゼに変更して、酵素ー多孔性炭素複合体を製造した。この際、アシラーゼが含まれたリン酸緩衝溶液にアクリロイルクロリドを処理して、酵素の表面にビニル基を導入した。

【0059】

<比較例6>ービニル基が導入されたアシラーゼを固定化した酵素ー多孔性シリカ複合体の製造 (f A C - S i l i c a)

実施例6と同一に実施して製造するものの、担体を多孔性シリカに変更して、酵素ー多孔性シリカ複合体を製造した。

【0060】

<比較例7>ー遊離ギ酸脱水素酵素 (F r e e F D H)

リン酸緩衝液 (100mM pH7.0) にギ酸脱水素酵素 (f o r m a t e d e h y d r o g e n a s e, F D H) 溶液 (5mg/mL) を調製した。

【0061】

<比較例8>ー多孔性物質内に架橋結合剤 (0.01% w/v) により架橋結合されたギ酸脱水素酵素が担持された複合体の製造 (F D H - G A _ 0.01)

実施例1と同一に実施して製造するものの、酵素の添加後に架橋結合剤としてグルタルジアルデヒドを添加して、架橋結合されたギ酸脱水素酵素が担持された複合体を製造した。この際、0.01% w/v の濃度でグルタルジアルデヒドを添加した。

【0062】

<比較例9>ー多孔性物質内に架橋結合剤 (0.1% w/v) により架橋結合されたギ酸脱水素酵素が担持された複合体の製造 (F D H - G A _ 0.1)

実施例1と同一に実施して製造するものの、酵素の添加後に架橋結合剤としてグルタルジアルデヒドを添加して、架橋結合されたギ酸脱水素酵素が担持された複合体を製造した。この際、0.1% w/v の濃度でグルタルジアルデヒドを添加した。

【0063】

<実験例1>グルコース酸化酵素と多孔性炭素とを用いた酵素ー多孔性炭素複合体の酵素担持量および放出量の測定

酵素担持量は、固定化のために投入した初期酵素の量および洗浄過程で放出される酵素の量をタンパク質分析法を通じて定量し、初期酵素の量と洗浄過程で放出された酵素量との差異を計算して決定した。

【0064】

酵素放出量は、リン酸緩衝液上にサンプルを分散させた後、200rpmで攪拌を継続しながら、時間によって放出された酵素の量をタンパク質分析法を通じて持続的に定量し、これを累積した値である酵素放出量を計算した。この際、酵素担持以後、3回の洗浄過程まで含んで、時間による酵素の放出量を計算し、その結果を図6a、図7a、図9a、図10aおよび図11aに示した。具体的には、グルコース酸化酵素と多孔性炭素とを用いた酵素ー多孔性炭素複合体である実施例2およびグルコース酸化酵素と多孔性シリカとを用いた酵素ー多孔性シリカ複合体である比較例2の酵素放出量を対比した。図7aから確認できるように、比較例2は、4日以内に担持されたグルコース酸化酵素が全部放出された反面、実施例2は、12日経過した場合、初期担持量対比65%以上のグルコース酸化酵素が残っていた。

【0065】

<実験例2>炭酸脱水酵素と多孔性炭素とを用いた酵素ー多孔性炭素複合体の酵素担持量および放出量の測定

炭酸脱水酵素が固定化された酵素ー多孔性炭素複合体と炭酸脱水酵素が固定化された酵素ー多孔性シリカ複合体とを用いて実験例1と同じ方式で進め、その結果を図6bおよび図7bに示した。図7bから確認できるように、比較例3は、1日以内に担持された炭酸脱水酵素が全部放出された反面、実施例3は、10日経過した場合、初期担持量対比74

10

20

30

40

50

%以上の炭酸脱水酵素が残っていた。

【0066】

＜実験例3＞アシラーゼと多孔性炭素とを用いた酵素－多孔性炭素複合体の酵素担持量および放出量の測定

アシラーゼが固定化された酵素－多孔性炭素複合体とアシラーゼが吸着で固定化された酵素－多孔性シリカ複合体とを用いて実験例1と同じ方式で進め、その結果を図6c、図7c、図9b、図10bおよび図11bに示した。図7cから確認できるように、比較例4は、2日以内に担持されたアシラーゼが全部放出された反面、実施例4は、10日経過した場合、初期担持量対比86%以上のアシラーゼが残っていた。

【0067】

＜実験例4＞ギ酸脱水素酵素－多孔性炭素複合体の酵素活性および安定性の評価

ギ酸脱水素酵素－多孔性炭素複合体の初期活性は、紫外－可視線分光光度計を用いて測定した。より詳しくは、混合溶液（200mMギ酸ナトリウム（sodium formate）、2mM NAD+および100mMリン酸ナトリウム緩衝液）にギ酸脱水素酵素－多孔性炭素複合体を添加し、NADHの量を測定できる340nmで時間による吸光度を測定し、活性を計算した。

【0068】

ギ酸脱水素酵素－多孔性炭素複合体の酵素安定性は、時間によって酵素活性を持続的に測定しつつ評価して、その結果を図2、図4および図8に示した。この際、酵素－多孔性炭素複合体が含まれた溶液は、常温で200rpmの攪拌状態で保管された。

【0069】

＜実験例5＞グルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体の酵素活性および安定性の評価

グルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体の酵素活性は、紫外－可視線分光光度計を用いて測定した。より詳しくは、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）、ブドウ糖、西洋ワサビペルオキシダーゼ（horseradish peroxidase）を混合した混合溶液にグルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体を添加し、655nmで時間による吸光度を測定し、活性を計算した。

【0070】

グルコース酸化酵素－多孔性炭素複合体の酵素安定性は、時間によって酵素活性を持続的に測定しつつ評価し、その結果を図3aおよび図5aに示した。この際、酵素－多孔性炭素複合体が含まれた溶液は、常温で200rpmの攪拌状態で保管された。

【0071】

＜実験例6＞炭酸脱水酵素－多孔性炭素複合体の酵素活性および安定性の評価

炭酸脱水酵素－多孔性炭素複合体の初期活性は、紫外－可視線分光光度計を用いて測定した。より詳しくは、60mM 4-ニトロフェニルアセテート（4-nitrophenyl acetate、4-NA）をアセトニトリル（acetonitrile）に溶解した混合溶液に炭酸脱水酵素－多孔性炭素複合体を添加し、348nmで時間による吸光度の変化を測定した。

【0072】

炭酸脱水酵素－多孔性炭素複合体の酵素安定性は、時間によって酵素活性を持続的に測定しつつ評価し、その結果を図3bおよび図5bに示した。この際、酵素－多孔性炭素複合体が含まれた溶液は、常温で200rpmの攪拌状態で保管された。

【0073】

＜実験例7＞アシラーゼ－多孔性炭素複合体の酵素活性および安定性の評価

アシラーゼ－多孔性炭素複合体の酵素活性は、分光蛍光光度計を用いて測定した。より詳しくは、N-アセチル-L-メチオニンの加水分解により生成されるL-メチオニンがオ-フタルアルデヒド（OPA）と反応して現れる蛍光を用いて変化量を測定した。

【0074】

アシラーゼ－多孔性炭素複合体の酵素安定性は、時間によって酵素活性を持続的に測定しつつ評価し、その結果を図3c、図5cに示した。この際、酵素－多孔性炭素複合体が

10

20

30

40

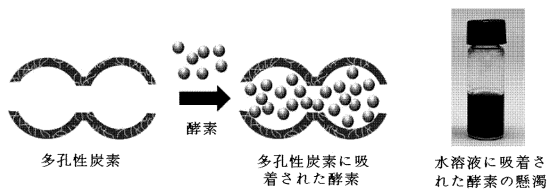
50

含まれた溶液は、常温で200rpmの攪拌状態で保管された。

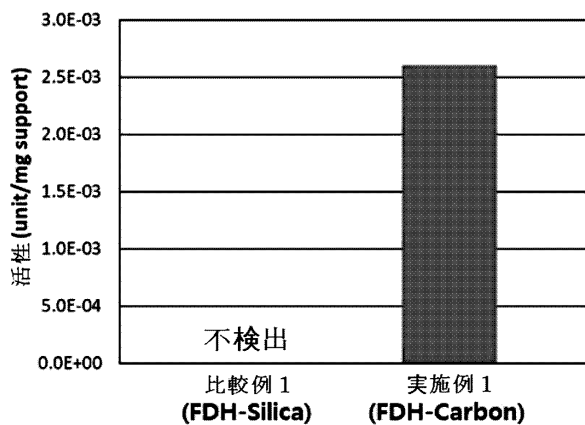
【0075】

以上、本発明の一実施例について説明したが、本発明の思想は、本明細書に提示される実施例に制限されず、本発明の思想を理解する当業者は、同じ思想の範囲内で、構成要素の付加、変更、削除、追加などにより他の実施例を容易に提案することができるが、これも、本発明の思想範囲内に入ると言える。

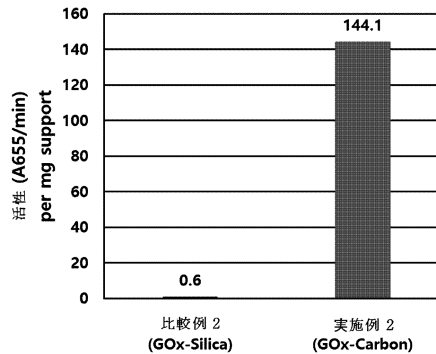
【図1】



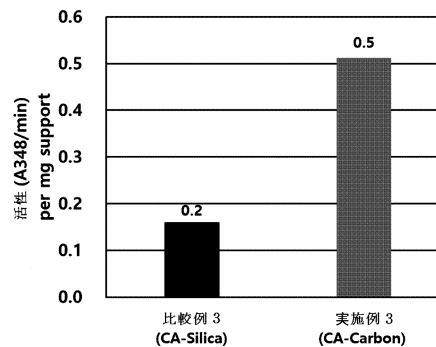
【図2】



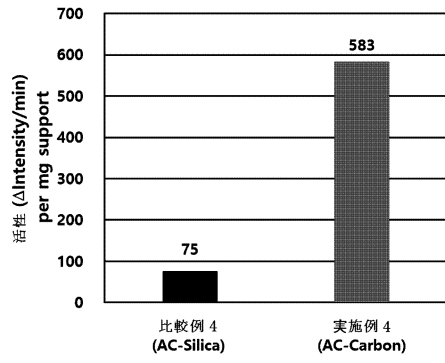
【図3a】



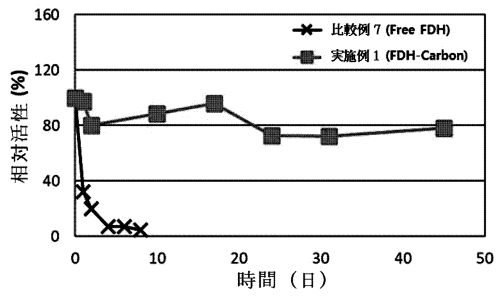
【図3b】



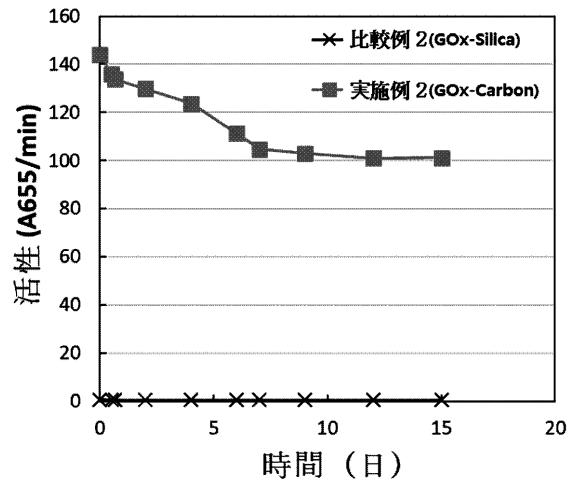
【図 3 c】



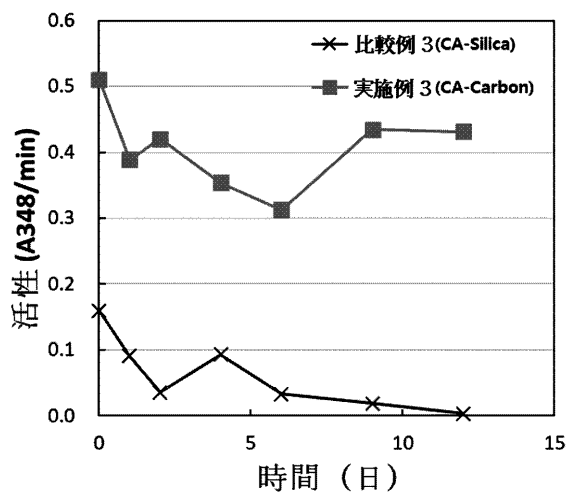
【図 4】



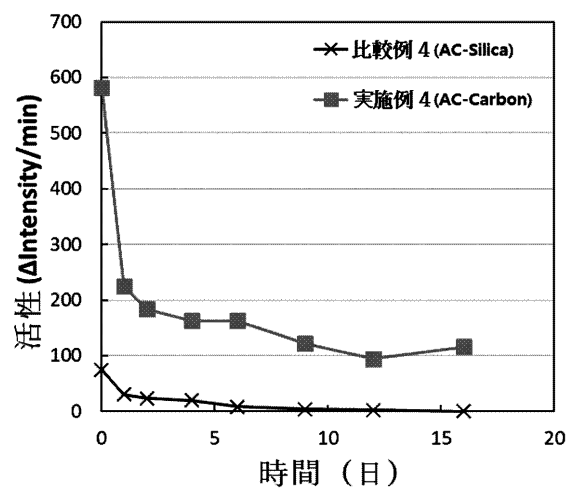
【図 5 a】



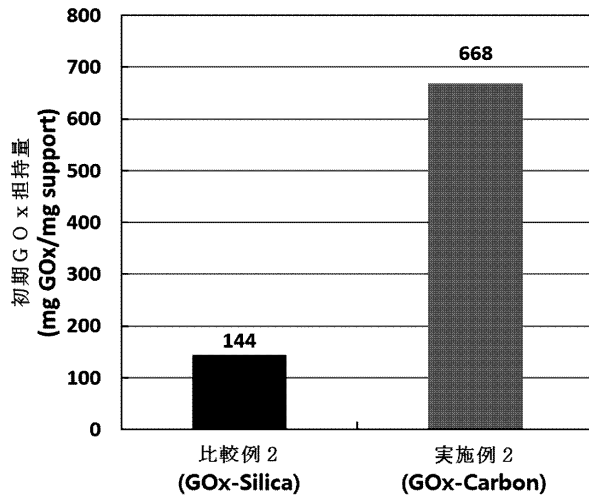
【図 5 b】



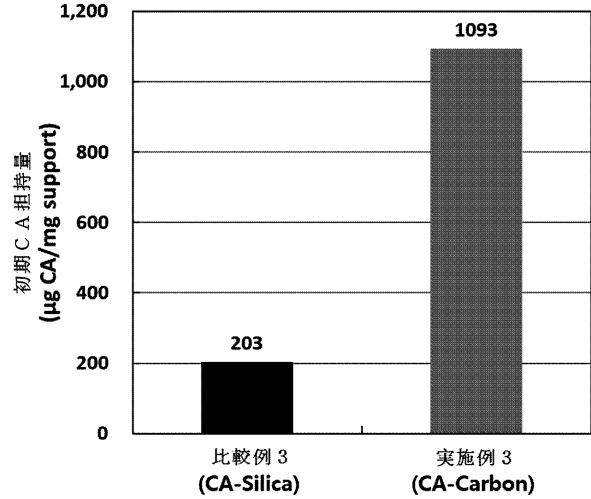
【図 5 c】



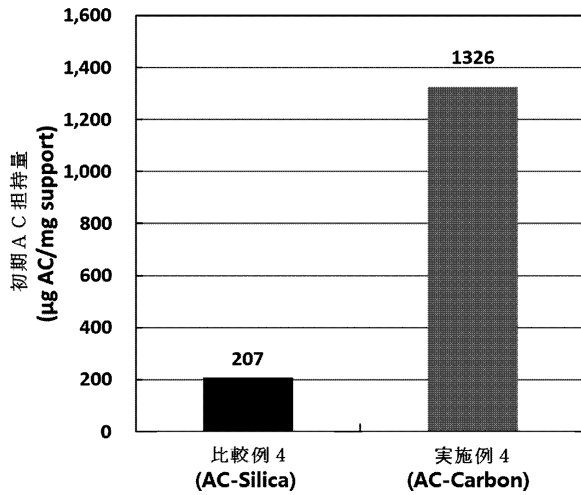
【図 6 a】



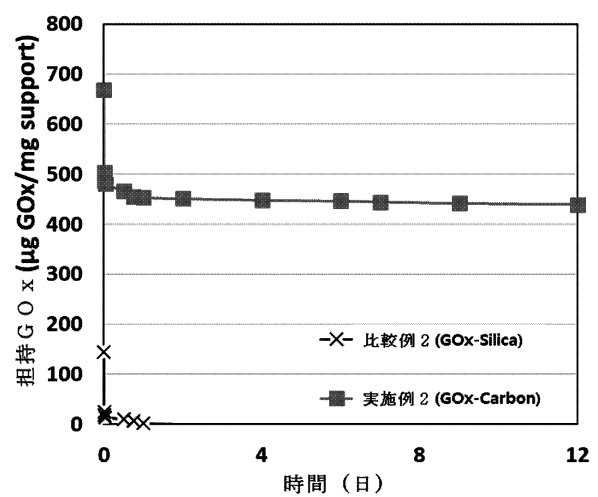
【図 6 b】



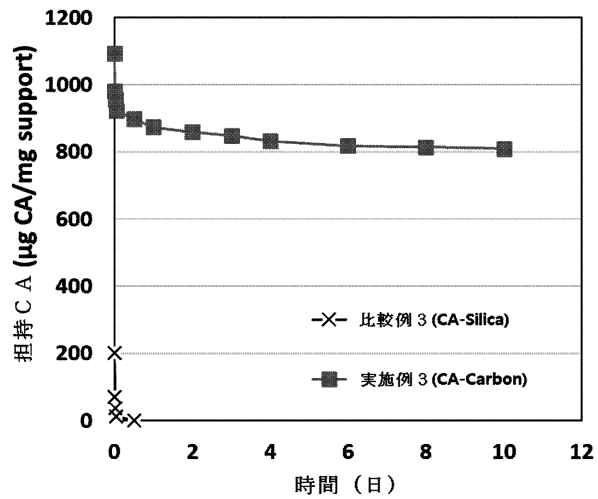
【図 6 c】



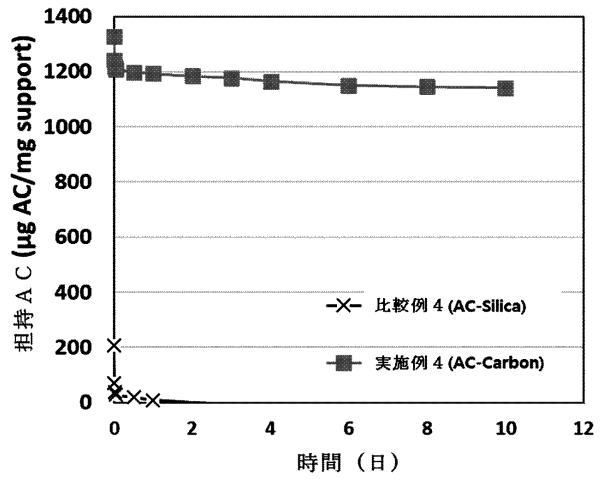
【図 7 a】



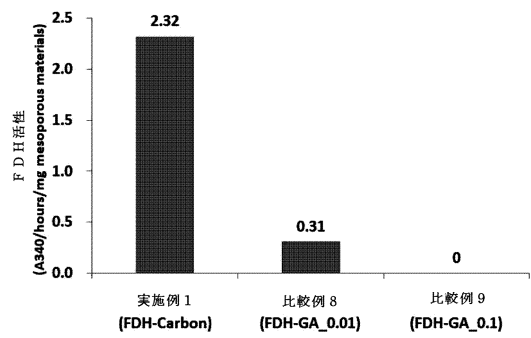
【図 7 b】



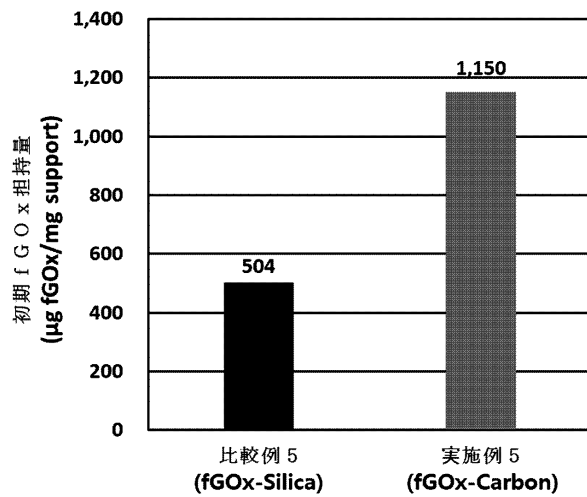
【図 7 c】



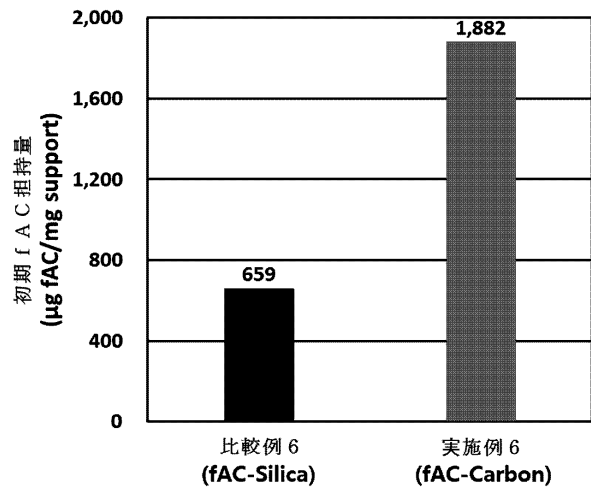
【図 8】



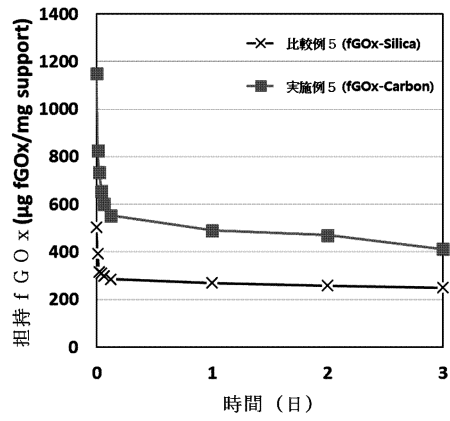
【図 9 a】



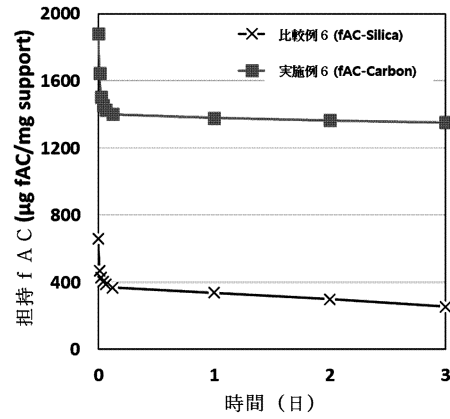
【図 9 b】



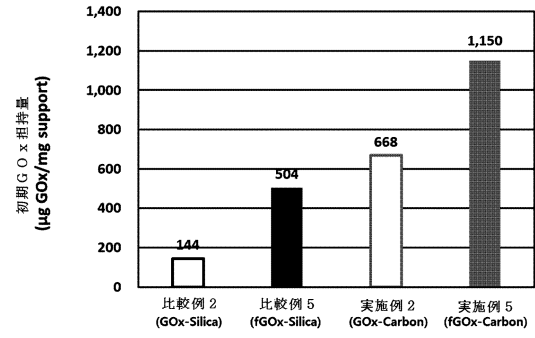
【図10a】



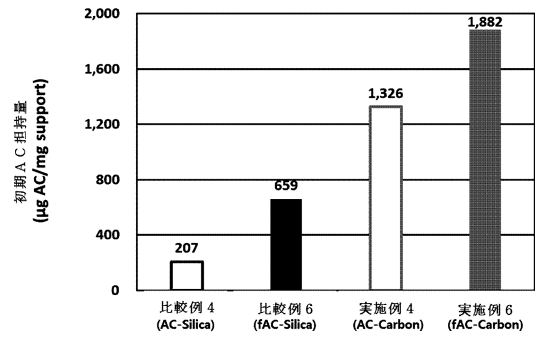
【図10b】



【図11a】



【図11b】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
H 0 1 M	4/86	(2006.01)	H 0 1 M	4/86	M
H 0 1 M	4/88	(2006.01)	H 0 1 M	4/88	H
C 1 2 N	9/50	(2006.01)	C 1 2 N	9/50	
C 1 2 N	9/76	(2006.01)	C 1 2 N	9/76	
C 1 2 N	9/20	(2006.01)	C 1 2 N	9/20	
C 1 2 N	9/04	(2006.01)	C 1 2 N	9/04	A
C 1 2 P	7/40	(2006.01)	C 1 2 N	9/04	E
			C 1 2 N	9/04	D
			C 1 2 P	7/40	

- (72)発明者 キム ジョン ペ
大韓民国 06215 ソウル、カンナムーグ、ヨクサムーロ、309、ナンバー101-150
1 (ヨクサムードン、レミアン ペンタ ヴィル アパートメント)
- (72)発明者 チュ ヨン ジュン
大韓民国 02855 ソウル、ソンプクーグ、コリョデーロ 22ーギル、15、ナンバー30
2 (アナムードン 5ーガ、ヨンサン ビルディング)
- (72)発明者 キム リ ナ
大韓民国 04702 ソウル、ソンドンーグ、ムハクーロ、33、ナンバー110-402 (フ
ァンシムニードン、テンズヒル)
- (72)発明者 ナム ジャ ヒョン
大韓民国 02855 ソウル、ソンプクーグ、アナムーロ 9ガーギル、80-17、ナンバー
5 (アナムードン 5ガ)
- (72)発明者 イ イン ソン
大韓民国 16930 キョンギード、ヨンインーシ、スジーグ、マンヒョンーロ、79、ナンバ
ー504-804 (サンヒョン 2ードン、マンヒョンーマウル アイーパーク 5ーダンジ)

審査官 原 大樹

- (56)参考文献 中国特許出願公開第107760668 (CN, A)
韓国公開特許第10-2005-0062989 (KR, A)
中国特許出願公開第105836731 (CN, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N
C 1 2 Q
C 1 2 M
MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/CaPlus (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)