



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2012-0108492

(43) 공개일자

2012년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 11/14 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

(21) 출원번호

10-2011-0026413

(22) 출원일자

2011년03월24일

심사청구일자

2011년03월24일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

구만복

서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동)

황이택

서울특별시 성북구 동소문로34길 29, 706호 (돈암동, 금도오피스텔)

라미쉬

서울시 성북구 안암동 고려대학교 cj하우스 w447

(74) 대리인

이처영

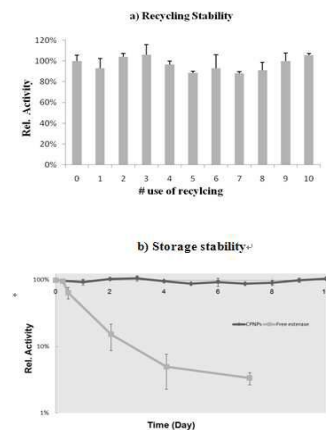
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 효소가 인산 칼슘에 고정화되어 복합체가 형성된 나노입자

(57) 요약

본 발명은 효소가 인산 칼슘에 고정화되어 복합체를 형성한 나노입자에 관한 것이다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0020501

부처명 교육과학기술부

연구사업명 해양바이오 기초원천기술개발사업

연구과제명 해양 유래 CA-PEPCase system 기반 생물전환 원천 기술 개발

주관기관 한국연구재단

연구기간 2010.06.23 ~ 2015.06.22

특허청구의 범위

청구항 1

효소가 인산 칼슘에 고정화되어 복합체를 형성한 나노입자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 나노입자는 구연산 나트륨을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 효소는 에스테레이즈, 프로테아제, 리페아제, 글루코즈 옥시데이즈, 또는 알파카모트립신인 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 나노입자의 크기는 200-300 nm인 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 나노입자는 안정성 및 재활용성을 가지는 것을 특징으로 하는 나노입자.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 효소가 인산 칼슘에 고정화되어 복합체가 형성된 나노입자에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 효소는 분해되기 쉽고 따라서 실질적인 적용에서 짧은 수명을 가지기 때문에 효소의 재활용은 중요한 이슈이다. 반면, 고정화된 효소는 증가된 수명을 가져서 재사용될 수 있다. 비록 여러 물질들이 개발되고 고정화를 통한 효소 안정화에 대한 담체로 테스트되었지만, 효소 재사용을 위한 단일 효소 또는 나노섬유와 같은 선행기술들이 보고되었다(J. Kim, J. W. Grate, *Nano Letters*, 2003, 3, 1219; J. Lee, Y. Lee, J. K. Youn, H. B. Na, T. Yu, H. Kim, S. M. Lee, Y. M. Koo, J. H. Kwak, H. G. Park, H. N. Chang, M. Hwang, J. G. Park, J. Kim, T. Hyeon, *Small*, 2008, 4, 143; C. Lei, Y. Shin, J. Liu, E. J. Ackerman, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124, 11242; H. R. Luckarift, J. C. Spain, R. R. Naik, M. O. Stone, *Nat Biotech*, 2004, 22, 211; A. J. Patil, E. Muthusamy, S. Mann, *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43, 4928; Y. Wang, F. Caruso, *Chemical Communications*, 2004, 13, 1528; J. Kim, J. W. Grate, *Nano Letters* 2003, 3, 1219).

[0003] 예를 들어, 다공성 실리카, 클레이 물질 또는 단일 효소 나노입자를 이용한 연구들이 보고되었지만, 그들은 엄격한 조건 하에서 그들의 안정성 문제 이외에도 합성하기 어렵고 비교적 크기도 크다(H. R. Luckarift, J. C. Spain, R. R. Naik, M. O. Stone, *Nat Biotech*, 2004, 22, 211; A. J. Patil, E. Muthusamy, S. Mann, *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43, 4928; Y. Wang, F. Caruso, *Chemical Communications*, 2004, 13, 1528; J. Kim, J. W. Grate, *Nano Letters* 2003, 3, 1219). 특히, 나노입자의 고안은 그들이 확산 제한을 감소시키고 브라운 운동을 증가시키기 때문에 많은 관심을 가진다.

[0004] 최근에, 칼슘 포스페이트(이하, 'CP'라 함) 나노입자는 생체적합성 및 생분해성을 가지기 때문에 생명과학 및 의약분야에서 큰 관심을 가진다.(A. J. Patil, E. Muthusamy, S. Mann, *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43, 4928; Y. Wang, F. Caruso, *Chemical Communications*, 2004, 13, 1528; J. Kim, J. W. Grate, *Nano Letters* 2003, 3, 1219; E. I. Altinoglu, T. J. Russin, J. M. Kaiser, B. M. Barth, P. C. Eklund, M. Kester, J. H. Adair, *ACS Nano*, 2008, 2, 2075; S. Bisht, G. Bhakta, S. Mitra, A. Maitra, *Int J Pharm*, 2005, 288, 157; U. Mukesh, V. Kulkarni, R. Tushar, R. S. Murthy, *J Biomed Nanotechnol*, 2009, 5, 99; M. Kester, Y. Heikal, T. Fox, A. Sharma, G. P. Robertson, T. T. Morgan, E. I. Altinoglu, A.

Tabakovic, M. R. Parette, S. M. Rouse, V. Ruiz-Velasco, J. H. Adair, *Nano Lett*, 2008, 8, 4116; J. Li, Y. C. Chen, Y. C. Tseng, S. Mozumdar, L. Huang, *J Control Release*, 2010, 142, 416; V. V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann, M. Epple, *Biomaterials*, 2006, 27, 3147; T. T. Morgan, H. S. Muddana, E. I. Altinoglu, S. M. Rouse, A. Tabakovic, T. Tabouillot, T. J. Russin, S. S. Shanmugavelandy, P. J. Butler, P. C. Eklund, J. K. Yun, M. Kester, J. H. Adair, *Nano Lett*, 2008, 8, 4108). 그들은 They have been widely studied as delivery carriers of 유전자, siRNA, 약물 및 형광단의 운반 담체로 광범위하게 연구되었다. (U. Mukesh, V. Kulkarni, R. Tushar, R. S. Murthy, *J Biomed Nanotechnol*, 2009, 5, 99; M. Kester, Y. Heakal, T. Fox, A. Sharma, G. P. Robertson, T. T. Morgan, E. I. Altinoglu, A. Tabakovic, M. R. Parette, S. M. Rouse, V. Ruiz-Velasco, J. H. Adair, *Nano Lett*, 2008, 8, 4116; J. Li, Y. C. Chen, Y. C. Tseng, S. Mozumdar, L. Huang, *J Control Release*, 2010, 142, 416; T. T. Morgan, H. S. Muddana, E. I. Altinoglu, S. M. Rouse, A. Tabakovic, T. Tabouillot, T. J. Russin, S. S. Shanmugavelandy, P. J. Butler, P. C. Eklund, J. K. Yun, M. Kester, J. H. Adair, *Nano Lett*, 2008, 8, 4108).

[0005]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 효소 고정화를 위한 새로운 수단을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007]

상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 효소가 인산 칼슘에 고정화되어 복합체를 형성한 나노입자를 제공한다.

[0008]

상기 나노입자는 도 1에 도시된 것과 같은 구조를 가진다.

[0009]

본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 나노입자는 구연산 나트륨을 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0010]

다른 구현예에 있어서, 상기 효소는 에스테레이즈, 프로테아제, 리페아제, 글루코즈 옥시데이즈, 또는 알파카모 트립신인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0011]

또 다른 구현예에 있어서, 상기 나노입자의 크기는 200-300 nm인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0012]

또 다른 구현예에 있어서, 상기 나노입자는 안정성 및 재활용성을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013]

이하 본 발명을 설명한다.

[0014]

본 발명자들은 높은 안정성 및 재활용성을 가지는 고정화된 효소(예를 들어 에스테레이즈)를 가지는 CP나노입자의 성공적인 제조 및 그것의 실현가능성을 보고한다. 도 1은 고정화된 효소를 가지는 다공성 구조의 CP-에스테레이즈 나노입자를 나타낸다. 이 제조된 CP-에스테레이즈 나노입자들은 투과 전자 현미경(TEM), 동적 광산란법(DLS), 주사 전자 현미경(SEM), 및 원소 분석(EA)에 의하여 성공적으로 특성을 규명하였다. 그 CP-효소 나노입자의 TEM 사진은 200~300 nm 크기를 가지는 전형적인 균일한 구형 나노공을 나타내고(도 2a), 모델 효소 에스테레이즈에 대하여 안과 밖으로 기질을 확산시키게 하는 다공성 형태를 나타낸다. 동적 광산란법에 의하여 얻어진 그 입자 크기 분포는 TEM 이미지와 일치하였지만(도 2b), CP 입자의 크기는 여러 다른 크기를 얻기 위해서 조절될 수 있다(도 4). 효소 재활용 연구를 위해서, 더 작은 크기의 나노입자에 비하여 더 큰 크기의 나노입자의 표면으로부터 생성물이 밖으로 나가게 하고 안으로 기질의 효율적인 확산이 가능하게 하는 더 큰 크기의 구멍을 가질 수 있기 때문에 더 큰 크기의 나노입자를 구상하였다. 또한 효소 로딩 및 침전을 통한 용이한 분리가 기대되었다. CP-효소 나노입자의 원소 조성을 분석하여 탄소, 질소, 칼슘 및 인산에 해당하는 원소 피크를 가지는 것을 발견하였다. 그 입자들은 효소 캡슐화를 확인하여 위하여 TEM 현미경으로 관찰되고 uranyl acetate에 의하여 네가티브적으로 염색되었다(추가 정보는 도 5 내지 6 참조). 이 생체분자-CP 나노조성물의 중요한 특징은 약물이나 단백질 로딩에 매우 적합한 그들의 다공성이다. 다공성 형태를 나타내는 합성된 200-300 nm CP-효소 나노입자의 TEM 이미지로부터, 구멍 크기는 상당한 확산 제한없이 기질을 통과시키기에 충분하게 크다는 것을

예측할 수 있다.

[0015] 본 발명자들은 CP 나노입자에 결합된 효소는 침출되지 않아서 높은 효소 로딩과 동시에 효소 활성의 개량된 안정화를 유도할 것이라고 생각한다. 에스터레이스 효소의 결합은 0.5 mg의 20 μ l(25 mg/mL)의 free 에스터레이스 용액의 시작 농도로 30분 이하에서 완성되었다. CP 나노입자에서 그 이론적인 최대 에스터레이스 로딩은 BCA 단백질 분석 키트에 의하여 계산되고, 약 0.35 mg이었으며, 그것은 효소 로딩이 이론적 최대치의 70%라는 것을 나타낸다(추가 정보는 도 7를 참조).

[0016] 에스터레이스 침출의 방해는 개량된 효소 안정화에 관여하여 이들 효과를 조사하였다. free 에스터레이스와 CP-에스터레이스 나노입자의 안정성을 효소 반응기 연구에서 일어나는 자연 환경을 가상하여 그들을 교반 조건(200 rpm)에서 수용성 버퍼에 배양하여 측정하였다. CP-에스터레이스 나노입자는 도 3에 나타난 것과 같이 심한 교반 조건 하에서 우수한 재활용성 및 저장 안정성을 나타내었다. CP 나노입자에 결합된 에스터레이스의 초기 활성은 결합된 에스터레이스의 상대적 활성을 그 초기 효소 활성과 그 활성의 비율로서 정의하였기 때문에 100%일 것으로 추측하였다. 도 3에 나타난 것과 같이, 고정화된 에스터레이스 효소는 심지어 10회 재사용시에도 초기 활성의 85% 이상을 유지하였고, 또한 어떠한 가교 효소 응집제를 사용하지 아니하고 200 rpm의 심한 교반 조건에서도 10일 이상 안정하였다. 또한, 그 CP-에스터레이스 효소 나노입자는 그 반응 배지로부터 용이한 분리가 가능하여 원심분리에 의하여 분리될 수 있고 다음 사용을 위하여 증류수에 재현탁할 수 있다. 따라서 CP-에스터레이스 나노입자는 높은 로딩 및 재활용 안정성을 나타내고 중요하게도 그것의 특정 활성을 보유한다.

[0017] 효소 고정 후, 그 효소 반응속도를 조사하여 고정화되지 않은 효소와 표 1에 비교하였다. 예상한 것과 같이, CP-에스터레이스 나노입자의 K_m 값은 주로 효소 고정화 후에 효소의 활성 부위에 기질의 감소된 접근으로 인하여 고정화되지 않은 에스터레이스 효소에 비하여 더 높았다. 그러나 가장 큰 변화는 고정화되지 않은 효소의 50%로 측정된 최대 비활성[(V_{max})/효소 농도]에서 관찰되었다. 전통적인 방법을 사용하여 고정된 대부분의 효소는 <10%의 활성 보유를 나타낸다는 사실을 고려하면(Ying Zhang, Fei Gao, Song-Ping Zhang, Zhi-Guo Su, Guang-Hui Ma, Ping Wang (2011) Bioresource Technology, 102(2):1837-43), 이 값은 CP-효소 나노입자가 효소 고정화 후 높은 효소 활성을 보유하고 있다는 것을 나타낸다.

표 1

	K_m [mM]	Specific V_{max} [mM/min.mg]
Free 효소	0.4143	0.3917
CP-효소 나노입자	0.7956	0.1911

[0018]

[0019] 표 1은 free 효소와 CP-효소 나노입자에 대한 Lineweaver-Burke 그래프를 요약한 표이다.

[0020] 본 발명자들은 CP-효소 나노입자의 그 감소된 최대 비활성은 고정화 과정 동안 에스터레이스 분자의 자가분해 및 효소 고정화에 대한 CP 나노입자의 제한된 공간에 기인하는 것 같다고 예상한다. 모델로서 이 CP-효소 나노입자는 증가된 안정화를 위하여 중합체 리간드로 더 변형될 수 있고 효소 기반 공정 분야에 사용을 위한 새로운 가능성을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, CP-효소 나노입자를 성공적으로 제조하여서 그것의 안정한 특성 및 재활용성의 관점에서 효소 고정화 적용을 위한 새로운 담체라는 것을 보여주었다. 그 CP-효소 나노입자 조성물은 ~70% 이상의 높은 효소 로딩 능력을 나타내었고, 그들은 매우 안정하며, 85% 이상의 상대적 활성을 보유하였다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 효소-CP 나노입자 조성물의 도시적인 개략도를 나타낸 그림.
- 도 2는 본 발명에서 제조된 효소-CP 나노입자 조성물의 특성을 규명한 그림. a) CP-효소 나노입자의 투과 전자 현미경 이미지; b) CP-효소 나노입자의 입자 크기 분포.
- 도 3의 a) 10-th 반복 사용 후 CP-효소 나노입자에 고정화된 에스테레이즈의 안정성을 나타냄. 상대적인 활성은 그것의 최초 사용에서 발견된 것과 비교하여 각 사용에서 잔류 활성을 사용하여 계산됨. b) 10 회 재사용 CP-효소 나노입자의 저장 안정성을 나타냄.
- 도 4는 미세에멀전 합성 과정에서 사용된 여러 회전 속도에서 얻어진 CP-효소 나노입자의 여러 크기의 대표적인 투과 전자 현미경(TEM) 이미지로, 각각 a) 800 rpm; b) 600 rpm; 및 c, d) 400 rpm에서 수행함.
- 도 5는 네가티브하게 염색된 CP-효소 나노입자의 TEM 이미지.
- 도 6은 CP-효소 나노입자의 주사 전자 현미경 (SEM) 이미지 및 원소 분석 (EDX).
- 도 7은 여러 다른 효소 농도에서 CP-효소 나노입자의 효소 로딩 효율성을 나타냄.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

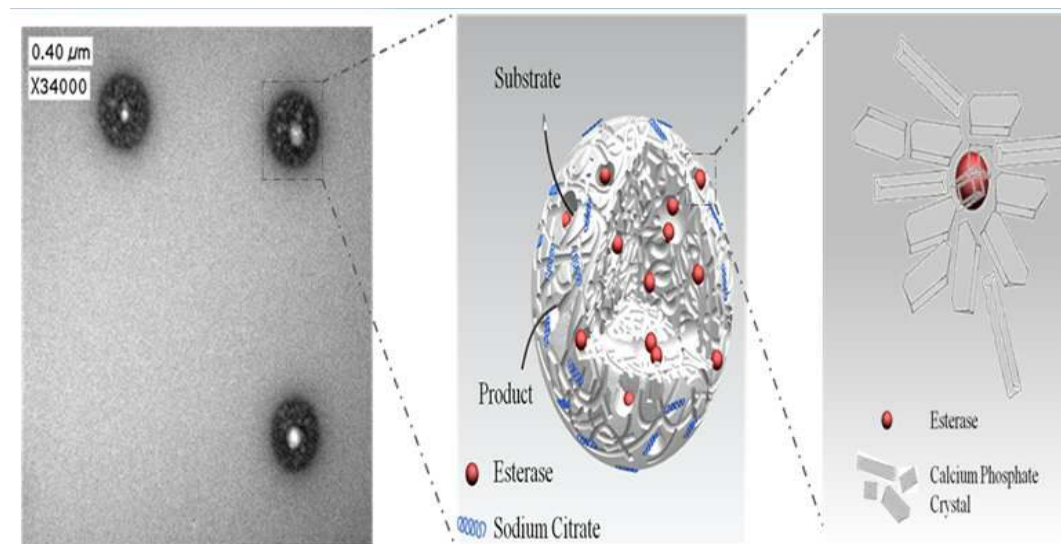
- [0023] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0024] 본 발명에 사용된 Igepal CO-520 (Aldrich), Cyclohexane (99%, sigma), N, N-dimethylformamide (DMF) (99.8%, Sigma-Aldrich), calcium chloride dihydrate (sigma), p-nitrophenyl butyrate (Sigma) 및 sodium phosphate diatomic (Sigma)는 구입하여 추가적인 정제없이 사용하였다. 효소 고정화에 사용된 *Rhizopus oryzae* 유래 에스테레이즈는 Biochemik Chemicals (Aldrich)로부터 구입하였다. BCA Protein 어세이 키트 (Pierce)는 제조업자에 의하여 제공된 프로토콜에 따라서 효소 농도를 측정하는데 사용하였다.
- [0025] 실시예 1: CP-효소 나노입자의 합성
- [0026] CP-효소 나노입자는 보고된 것과 같이 주지된 이중 리버스 마이크로에멀전 방법(C. Lei, Y. Shin, J. Liu, E. J. Ackerman, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124, 11242)을 통해서 합성되었다. 요약하면, 각 10ml 유리 병에 30 vol %의 Igepal CO-520와 2.65 mL의 사이클로헥산을 넣고, 이 유리병 각각에 20-100 μ l의 여러 에스테레이즈 효소(10-50 mg/mL)를 포함하는 100 μ l의 60 mM NaHPO₄ (B) 및 수용성 상을 가지는 120 μ l의 100 mM CaCl₂(A)을 첨가하고 투명한 마이크로에멀전 A 및 B를 얻기 위하여 20분 동안 고속(600 rpm)에서 교반하였다. 다음, 효소를 포함하는 효소 마이크로에멀전을 마이크로에멀전 A로 천천히 떨어뜨리고 양 에멀전을 완전히 혼합하고 나노크기의 마이크로에멀전 인산 칼슘 형성이 가능하게 하기 위하여 5분간 교반한 후 인산 칼슘 나노입자를 안정화하기 위하여 그 마이크로에멀전에 하였다. 50 μ l의 구연산 나트륨(15 mM)을 첨가하고 20분 더 반응한 후 세 배 부피의 에탄올을 첨가하여 그 에멀전을 분쇄하고 에탄올 첨가 후 투명한 흰색 숨털모양(fluffy)의 침전의 인산칼슘 입자가 관찰된다. 그 용액을 6000 rpm에서 원심분리하고 에탄올로 3-4회 세척하고 진공건조하고 추가 사용때까지 건조분말로 저장하였다.
- [0027] 캡슐화된 효소 로딩 능력을 BCA 단백질 어세이 키트로 측정하였다.
- [0028] 실시예 2: CP-효소 나노입자의 특성
- [0029] 투과 전자 현미경(TEM) (Tecnai 12, Philips, Eindhoven, Netherlands)을 효소 인케이스된(encased) 인산 칼슘 나노입자의 고 해상 이미지에 사용하였고 탄소 서포트된 300 메쉬 구리 시료 격자(specimen grid) 상에 드롭하였고, 효소 캡슐화된 나노입자에 빔 손상을 회피하기 위하여 100 keV에서 수행하였다.
- [0030] 입자 크기 분석은 malvern instruments 나노입자 크기 분석기(NanoZS, Worcestershire, United Kingdom)를 사용한 동적 광 산란법에 의하여 수행되었다.
- [0031] 효소 캡슐화된 나노입자의 유체역학(hydrodynamic) 직경은 증류수 ml 당 1 mg의 건조 분말의 나노입자를 녹여서 측정하였다.
- [0032] 실시예 3: 활성 및 안정성 측정

[0033]

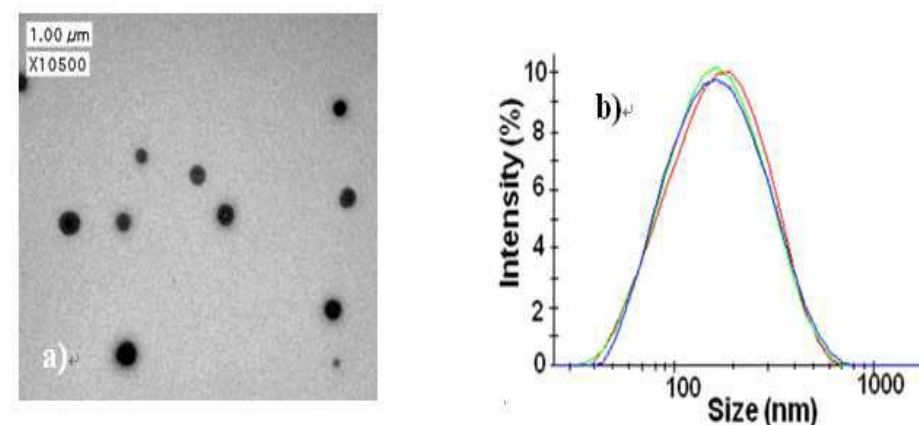
1 mg의 CP-효소 나노입자의 생물활성을 N, N-dimethylformamide에 녹아 있는 p-nitrophenyl butyrate의 가수분해로부터 p-nitrophenol의 생성을 모니터링하여서 측정하였다. 요약하면, N, N-dimethylformamide에 녹아 있는 20 μ l의 50mM의 p-nitrophenyl butyrate를 포함하는 1.98 mL의 100 mM phosphate buffer (pH 6.5)를 기질로 제조하였다. CP-효소 나노입자를 포함하는 고정화된 에스테레이즈를 상기 기질 용액에 분산시키고 200 rpm에서 교반하였다. 10 분의 짧은 반응 후, 초기 활성을 400 nm에서 흡광도로부터 측정하고 그 흡광도를 p-nitrophenol의 표준 곡선 농도로 동일시하였다. 안정성 실험을 위해, 활성 측정 후, CP-효소 나노입자에서 고정화된 에스테레이즈를 100 mM phosphate buffer (pH 6.5)로 3회 세척하고 200 rpm 교반 조건에서 추가 사용을 위해서 상온에서 저장하였다. 반복 사용 동안 에스테레이즈-나노입자 조성물의 안정성을 측정할 때 동일한 실험 프로토콜을 사용하였다. 1 유닛(U)의 에스테레이즈 활성은 어세이 조건에서 분당 1 μ mol p-nitrophenol을 해리하는 효소의 양으로 정의한다. 모든 샘플을 여러 분석을 위해 3회 반복 수행하였다. 그 결과에 대한 표준 편차를 그래프 내에서 여러 바로 나타낸다.

도면

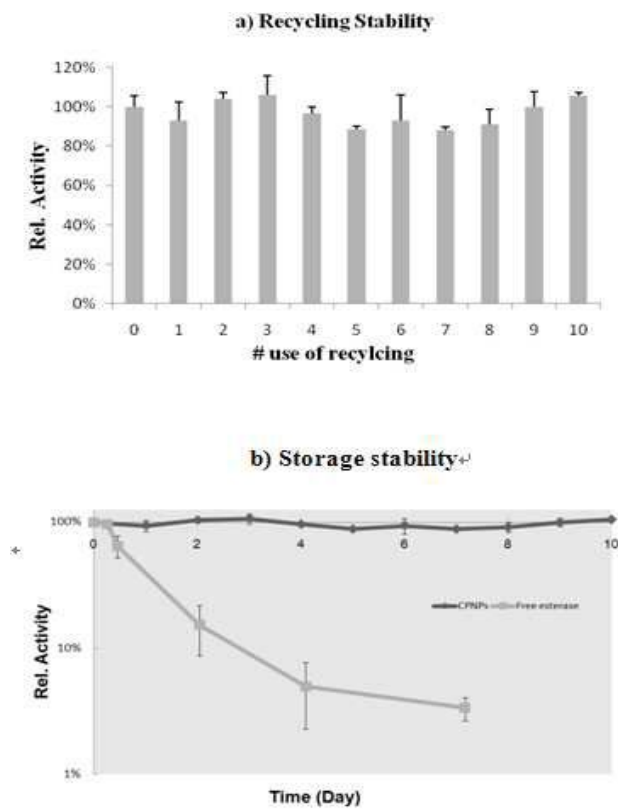
도면1



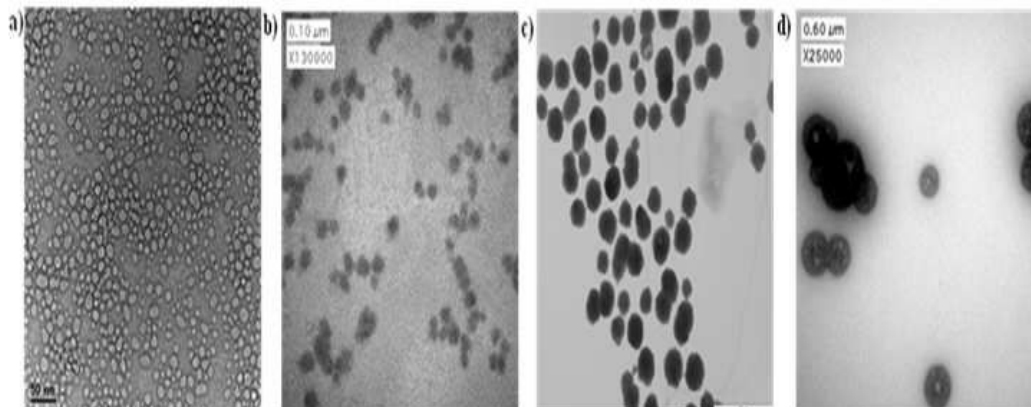
도면2



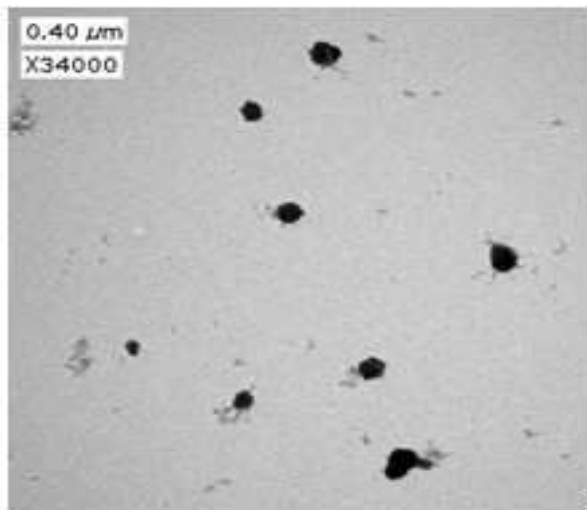
도면3



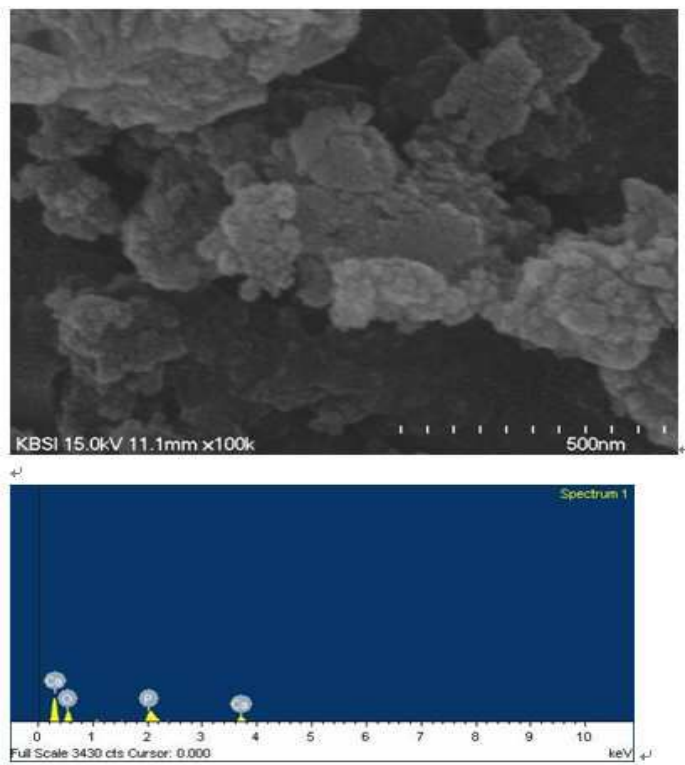
도면4



도면5



도면6a



도면6b

Element	Weight%	Atomic%
C	56.33	65.29
O	36.84	32.06
P	2.76	1.24
Ca	4.07	1.41
Totals	100.00	

도면7

