(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0055566
(43) 공개일자 2014년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B82B 1/00 (2006.01) *B82B 3/00* (2006.01)
B01J 13/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0122616
(22) 출원일자 2012년10월31일
심사청구일자 2012년11월01일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김승욱
서울 노원구 공릉로46길 32, 104동 905호 (공릉동, 삼익아파트)
이희욱
경기 고양시 일산서구 송산로 420-81, (가좌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한양특허법인

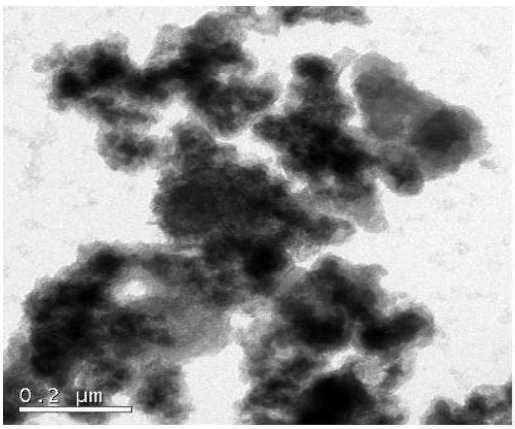
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **캡슐화된 자성 코어/쉘 나노입자 및 그 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은, a)자성 물질과 붕소가 결합되어 형성되는 코어 부; b)상기 코어를 둘러싸고 있는 실리카 쉘 부; c)상기 쉘 부를 둘러싸고, 실리카를 포함하는 최외각 쉘 부; d)상기 최외각 쉘의 표면이 $-NH_2$, -COOH, -NHS 및 바이오틴(-Biotin)으로 이루어진 군부터 선택되는 치환기로 개질된 최외각 쉘 표면 부; 및 e) 상기 쉘 표면 부에 고정화되는 효소 또는 바이오 물질을 포함하는 자성 코어/쉘 나노입자로, 상기 나노입자는 키토산으로 캡슐화된 것을 특징으로 하는, 자성 코어/쉘 나노입자를 제공한다. 본 발명에 따라 캡슐화된 코어/쉘 나노입자는, 수차례 재사용 하는 경우에도 효소 또는 바이오 물질의 활성을 높은 수준으로 유지할 수 있으며, 효소 또는 바이오 물질의 구조가 안정하게 보호되는 장점이 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

박철환

서울 성북구 동소문로29길 63, B동 402호 (동선동5가, 동선빌라)

송윤석

경기 부천시 원미구 계남로 329, 503호 (춘의동, 아태리치빌아파트)

서영준

서울 동대문구 안암로16길 9, 용두삶터 202호 (용두동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20110031360
부처명	한국연구재단
연구사업명	(원천)글로벌프론티어
연구과제명	바이오매스의 바이오디젤 및 고부가가치 화학물질 생산을 위한 전환기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	한국과학기술원
연구기간	2011.08.22 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

a)자성 물질과 붕소가 결합되어 형성되는 코어 부;

b)상기 코어를 둘러싸고 있는 실리카 쉘 부;

c)상기 쉘 부를 둘러싸고, 실리카를 포함하는 최외각 쉘 부;

d)상기 최외각 쉘의 표면이 $-NH_2$, -COOH, -NHS 및 바이오틴(-Biotin)으로 이루어진 군부터 선택되는 치환기로 개질된 최외각 쉘 표면 부; 및

e) 상기 쉘 표면 부에 고정화된, 글루코오즈 옥시데이즈, 리파아제(lipase), 라카아제(laccase), 카탈라아제(catalase), 미생물, 항원 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소 또는 바이오 물질을 포함하는 자성 코어/쉘 나노입자로,

상기 나노입자는 키토산으로 캡슐화된 것을 특징으로 하는, 자성 코어/쉘 나노입자.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 자성 물질은 코발트인 것을 특징으로 하는 자성 코어/쉘 나노입자.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 입자의 크기가 10 nm 내지 1000 nm 인 것을 특징으로 하는 자성 코어/쉘 나노입자.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 치환기는 $-NH_2$인 것을 특징으로 하는 자성 코어/쉘 나노입자.

청구항 5

a)자성 물질과 붕소 수소화물을 반응시켜 자성물질-붕소 결합된 코어 부를 형성하는 단계;

b)상기 코어에 실리카를 코팅하여 코어를 감싸는 쉘 부를 형성하는 단계;

c)상기 코어 및 쉘로 형성된 입자에 실리카를 첨가하여 최외각 쉘 부를 형성하는 단계;

d)상기 최외각 쉘의 표면을 $-NH_2$, -COOH, -NHS 및 바이오틴(-Biotin)으로 이루어진 군부터 선택되는 치환기로 개질하는 단계;

e) 고정화 버퍼를 사용하여 상기 쉘 표면 부에 글루코오즈 옥시데이즈, 리파아제(lipase), 라카아제(laccase), 카탈라아제(catalase), 미생물, 항원 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소 또는 바이오 물질을 고정화하는 단계; 및

f) 상기 효소 또는 바이오 물질이 고정화된 입자를 키토산으로 캡슐화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 자성 코어/쉘 나노입자의 제조방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

e) 단계의 고정화 버퍼는 인산나트륨(sodium phosphate buffer)인 것을 특징으로 하는 자성 코어/쉘 나노입자의 제조방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 f) 단계는, 키토산 용액에 상기 효소 또는 바이오 물질이 고정화된 입자를 분산한 후, 삼인산 나트륨(TPP ;sodium tripolyphosphate)버퍼를 사용하여 비드형태로 경화시키는 단계인 것을 특징으로 하는 자성 코어/쉘 나노입자의 제조방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 키토산 용액의 농도는 1 내지 1.6 wt%이며, 상기 삼인산 나트륨(TPP ;sodium tripolyphosphate)버퍼의 농도는 1 내지 3 wt%인 것을 특징으로 하는 자성 코어/쉘 나노입자의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 캡슐화된 자성 코어/쉘 나노입자 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자성 코어/쉘 나노입자를 키토산으로 캡슐화하여 비드형태로 제조한 코어/셀 나노입자 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 효소는 특이반응에 의한 촉매작용, 원하지 않는 중간생성물의 제거, 높은 순도의 생산할 수 있는 능력 때문에 식품, 제약, 농약 산업에 의해 넓은 분야에서 사용되고 있다. 이러한 효소를 고정화하게 되면 효소의 안정성, 반응 매체의 제거 편의성, 효소의 재사용 등의 장점을 가지고 있다. 특히, 산업적 응용에 대한 고정화 효소는 안정성, 쉬운 분리 및 제거, 그리고 재사용 등을 높일 수 있기 때문에 많은 연구가 진행되고 있다.

[0003] 또한, 자성입자는 바이오 분자들을 이용한 다양한 고정화 방법에 대한 활용이 증가되고 있다. 이 자성 입자의 장점은 자성 운반체에 고정화된 바이오 분자들을 외부 자기장에 의해 쉽게 조정 할 수 있기 때문에 까다로운 혼합물로부터 특이적인 바이오 분자를 쉽고 빠르게 회수 할 수 있다. 이러한 고정화를 목적으로 사용되는 자성 지지체들은 고분자를 포함하여 활용하거나 실리카와 같은 물질을 자성입자에 코팅에 의해서 많이 활용 되고 있다.

[0004] 한편, 키토산은 키틴의 탈아세틸에 의해 얻어지는 비독성 생체고분자이며, 자연상에서 두번째로 풍부한 다당류이다. 키틴은 균류의 세포벽, 곤충의 외골격, 그리고 갑각류 껍질 등의 중요한 요소이다. 이 키토산의 주요 분자 구조는 수산기와 아민 그룹들이 포함된 글루코사민 (glucosamine) 단위로 이루어져있으며, 이 반응 그룹들은 화학적 개질에 의해서 다양하게 사용된다. 게다가, 키토산은 생적합, 생분해, 그리고 항균성에 매우 좋은 특징을 가지고 있다. 그 결과, 키토산은 생물의학, 화학, 미용, 식품, 그리고 제약 산업 등 많은 분야에 응용하기 위하여 상당한 관심을 받고 있다. 또한, 키토산은 쉽게 사용하고, 저렴한 비용, 낮은 독성, 그리고 좋은 생분해성 등과 같은 물질로서, 이러한 특성을 이용하여 캡슐화하여 선택적으로 사용된다.

[0005] 이와 관련하여, 대한민국 공개특허 제2010-006093호, 대한민국 공개특허 제2012-0101961호 등에는 나노입자를 이용하는 기술이 공개되어 있다, 그러나, 키토산을 이용하여 효소 등이 고정화된 나노입자를 캡슐화 하는 기술은 기재되어 있지 않다.

[0006] 이러한 결과물을 이용하여 본 발명자는 효소의 효율적인 활용과 응용, 효소의 단백질의 보호, 그리고 산업적으로 재사용을 위하여 코발트와 붕소가 결합된 입자 표면에 실리카를 코팅하여 자성입자를 합성하였다. 그리고 입자 표면을 개질하여 효소를 고정화 하였다. 이러한 고정화된 효소를 위하여 키토산에 캡슐화 시킨 비트 형태로 합성하여 그에 최적 조건과 재사용에 대한 연구를 수행하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2010-006093호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2012-0101961호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은, 자성 코어/쉘 나노입자에 고정된 효소 또는 바이오 물질이 안정하게 그 구조를 보존하도록, 캡슐화된 자성 코어/쉘 나노입자를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은, a)자성 물질과 붕소가 결합되어 형성되는 코어 부; b)상기 코어를 둘러싸고 있는 실리카 쉘 부; c) 상기 쉘 부를 둘러싸고, 실리카를 포함하는 최외각 쉘 부; d)상기 최외각 쉘의 표면이 $-NH_2$, -COOH, -NHS 및 바이오틴(-Biotin)으로 이루어진 군부터 선택되는 치환기로 개질된 최외각 쉘 표면 부; 및 e) 상기 쉘 표면 부에 고정화되며, 글루코오즈 옥시데이즈, 리파아제(lipase), 라카아제(laccase), 카탈라아제(catalase), 미생물, 항원 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소 또는 바이오 물질을 포함하는 자성 코어/쉘 나노입자로, 상기 나노입자는 키토산으로 캡슐화된 것을 특징으로 하는, 자성 코어/쉘 나노입자를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일예에 의하면, 상기 자성 물질은 코발트일 수 있다.

[0012] 본 발명의 다른 예에 의하면, 상기 입자의 크기가 10 nm 내지 1000 nm 일 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 예에 의하면, 상기 치환기는 $-NH_2$일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은, a)자성 물질과 붕소 수소화물을 반응시켜 자성물질-붕소 결합된 코어 부를 형성하는 단계; b)상기 코어에 실리카를 코팅하여 코어를 감싸는 쉘 부를 형성하는 단계; c)상기 코어 및 쉘로 형성된 입자에 실리카를 첨가하여 최외각 쉘 부를 형성하는 단계; d)상기 최외각 쉘의 표면을 $-NH_2$, -COOH, -NHS 및 바이오틴(-Biotin)으로 이루어진 군부터 선택되는 치환기로 개질하는 단계; e) 고정화 버퍼를 사용하여 상기 쉘 표면 부에 루코오즈 옥시데이즈, 리파아제(lipase), 라카아제(laccase), 카탈라아제(catalase), 미생물, 항원 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소 또는 바이오 물질을 고정화 하는 단계; 및 f) 상기 효소 또는 바이오 물질이 고정화된 입자를 키토산으로 캡슐화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 자성 코어/쉘 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일예에 의하면, 상기 e) 단계의 고정화 버퍼는 인산나트륨(sodium phosphate buffer)일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 예에 의하면, 상기 f) 단계는, 키토산 용액에 상기 효소 또는 바이오 물질이 고정화된 입자를 분산한 후, 삼인산 나트륨(TPP ;sodium tripolyphosphate)버퍼를 사용하여 비드형태로 경화시키는 단계일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른예에 의하면, 상기 키토산 용액의 농도는 1 내지 1.6 wt%이며, 상기 삼인산 나트륨(TPP ;sodium tripolyphosphate)버퍼의 농도는 1 내지 3 wt%일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 캡슐화된 자성 코어/쉘 나노입자는, 실리카로 코팅된 자성 입자에 효소 또는 바이오 물질의 고정화와 키토산으로 캡슐화를 통하여 효소 또는 바이오 물질의 보호가 가능하며, 수차례 재사용 하는 경우에도 효소 또는 바이오 물질의 활성을 높은 수준으로 유지할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1 및 2는, 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 코어/쉘 나노입자를TEM(Transmission electron microscope)으로 촬영한 사진이다.

도 3은 XPS(X-ray photoelectron spectroscope)을 이용하여 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 코어/쉘 나노입

자의 패턴을 측정하여 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 코어/쉘 나노입자의 표면을 FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)로 분석한 결과이다.

도 5는 자성입자를 분산 시켰을 때와 분산 시킨 자성입자를 자성에 의해 모이게 하였을 때의 그림을 나타낸다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 코어/쉘 나노입자에 대해서 VSM(vibrating sample magnetometer)로 300K에서 측정한 장의존적(field-dependent) 자기화 곡선을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 코어/쉘 나노입자의, 키토산의 농도에 따른 효소 활성도(Enzyme activity)를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 코어/쉘 나노입자의, TTP 버퍼의 농도에 따른 효소 활성도(Enzyme activity)를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 코어/쉘 나노입자의, 비드의 그림을 나타낸 것이다. 도 9에서, (a) 는 아무 것도 첨가 시키지 않은 순수한 키토산 비드만을 SEM image로 측정한 결과를 나타내며, (b) 는 자성입자에 효소를 고정화 한 키토산 비드를 SEM image로 측정한 결과를 나타내며, (c) 는 효소가 고정화된 자성입자를 자석을 가까이 한 경우의 측정 결과(자성을 띄는지)를 나타낸다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 키토산 비드로 캡슐화된 고정화된 효소의, 효소 반응물인 기질의 농도에 따른 속도변수를 나타낸다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 최적화된 캡슐화된 고정화 효소의 활성도(activity)를 측정하기 위하여, 고정화 효소와 캡슐화된 효소를 7회까지 반복적으로 측정하여 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 자성 물질이 포함된 코발트 중심(core)과 실리카 쉘(shell)로 이루어진 코어/쉘 입자에 효소 또는 바이오물질, 예를 들어 글루코오즈 옥시데이즈(glucose oxidase;GOD)를 고정하고, 이를 키토산으로 캡슐화한 자성 나노입자를 제공하고, 그 제조방법을 제공한다.

[0022] 구체적으로 살펴보면, 본 발명은, a)자성 물질과 붕소가 결합되어 형성되는 코어 부; b)상기 코어를 둘러싸고 있는 실리카 쉘 부; c)상기 쉘 부를 둘러싸고, 실리카를 포함하는 최외각 쉘 부; d)상기 최외각 쉘의 표면이 $-NH_2$, -COOH, -NHS 및 바이오틴(-Biotin)으로 이루어진 군부터 선택되는 치환기로 개질된 최외각 쉘 표면 부; 및 e) 상기 쉘 표면 부에 고정화되는 효소 또는 바이오 물질을 포함하는 나노입자로, 상기 나노입자는 키토산으로 캡슐화된 것을 특징으로 하는, 자성 코어/쉘 나노입자를 제공한다..

[0023] 상기 자성 물질로는 Co, Mn, Fe, Ni, Gd, Mo 등이 있으며, 바람직하게는 코발트(Co)를 사용할 수 있으나, 반드시 이에 한정되지는 않는다.

[0024] 또한, 상기 입자의 크기가 10 nm 내지 1000 nm 인 것이 바람직하며, 100nm 내지 200 nm인 것이 더욱 바람직하다.

[0025] 상기 최외각 쉘의 표면을 개질하는 치환기로는 $-NH_2$, -COOH, -NHS, 바이오틴(-Biotin) 등이 있으며, 바람직하게는 아민으로 최외각 쉘을 개질하여 사용할 수 있다. 즉, 예를 들어 최외각 표면에 $-NH_2$, -COOH, -NHS, -Biotin 등으로 개질하면, 효소 또는 바이오 물질를 안정적으로 고정화 할 수 있다.

[0026] 상기 효소 또는 바이오 물질은, 당업자에게 효소 또는 바이오 물질로 인식되는 것이면 특별히 한정되지 않는다. 바람직하게는, 글루코오즈 옥시데이즈, 리파아제(lipase), 라카아제(laccase) 또는 카탈라아제(catalase)에서 선택된 효소 또는 미생물, 항원 또는 항체에서 선택된 바이오물질이 사용될 수 있다. 상기 미생물, 항원 및 항체는 일반적으로 미생물, 항원 또는 항체라고 인식되는 것으로서, 단백질로 이루어진 구조를 갖는 것이면 본 발명에 적용가능하며, 특히 아민기, 카르복실기, 또는 알데하이드 등의 치환기를 갖는 것이 바람직하다.

[0027] 가장 바람직하게는 글로코오즈 옥시데이즈를 사용할 수 있다.

[0028] 한편, 본 발명은, a)자성 물질과 붕소 수소화물을 반응시켜 자성물질-붕소 결합된 코어 부를 형성하는 단계; b)상기 코어에 실리카를 코팅하여 코어를 감싸는 쉘 부를 형성하는 단계; c)상기 코어 및 쉘로 형성된 입자에 실리카를 첨가하여 최외각 쉘 부를 형성하는 단계; d)상기 최외각 쉘의 표면을 $-NH_2$, -COOH, -NHS 및 바이오틴(-Biotin)으로 이루어진 군부터 선택되는 치환기로 개질하는 단계; e) 고정화 버퍼를 사용하여 상기 쉘 표면 부에 효소 또는 바이오 물질을 고정화 하는 단계; 및 f) 상기 효소 또는 바이오 물질이 고정화된 입자를 키토산으로 캡슐화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 코어/쉘 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0029] 상기 a)단계에서 자성 물질과 붕소를 결합하여 코어 부를 형성하는 것은, 자성물질 단독으로 사용할 때보다 붕소를 결합하여 사용하면 자성분자 간에 결합, 입자의 형성 등의 효과가 있기 때문이다.

[0030] 상기 자성 물질로는 Co, Mn, Fe, Ni, Gd, Mo 등이 있으며, 바람직하게는 코발트(Co)를 사용할 수 있으나, 반드시 이에 한정되지는 않는다.

[0031] 상기 d)단계의 최외각 쉘의 표면을 개질하는 치환기로는 $-NH_2$, -COOH, -NHS, 바이오틴(-Biotin) 등이 있으며, 바람직하게는 아민으로 최외각 쉘을 개질하여 사용할 수 있다. 즉, 예를 들어 최외각 표면에 $-NH_2$, -COOH, -NHS, -Biotin 등으로 개질하면, 효소 또는 바이오 물질를 안정적으로 고정화 할 수 있다.

[0032] 상기 e) 단계의 효소 또는 바이오 물질은, 당업자에게 효소 또는 바이오 물질로 인식되는 것이면 특별히 한정되지 않는다. 바람직하게는, (글루코오즈 옥시데이즈, 리파아제(lipase), 라카아제(laccase), 카탈라아제(catalase), 미생물, 항원 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소 또는 바이오 물질을 사용할 수 있다.

[0033] 또한, 고정화 버퍼는 인산나트륨(sodium phosphate buffer)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 상기 인산나트륨(sodium phosphate buffer)은 0.025 내지 0.2M의 농도로 사용하는 것이 바람직하며, 상기 범위 내의 인산나트륨버퍼를 사용하는 경우, 자성 코어/쉘 나노입자에 고정된 효소 또는 바이오 물질의 활성이 가장 우수하다.

[0035] 상기 e) 단계는, pH 5 내지 8 및 5 내지 45° C의 조건에서 수행되는 것이 바람직하며, 상기 범위 내에서 반응을 수행하는 경우, 자성 코어/쉘 나노입자에 고정된 효소 또는 바이오 물질의 활성이 가장 우수하다.

[0036] 또한, 상기 f) 단계는, 키토산 용액에 상기 효소 또는 바이오 물질이 고정화된 입자를 분산한 후, 삼인산 나트륨(TPP ;sodium tripolyphosphate)버퍼를 사용하여 비드형태로 경화시키는 단계일 수 있다. 이때, 상기 키토산 용액의 농도는 1 내지 1.6 wt%인 것이 바람직하며, 상기 삼인산 나트륨(TPP ;sodium tripolyphosphate)버퍼의 농도는 1 내지 3 wt%인 것이 바람직한데, 상기 범위 내에서 반응을 수행하는 경우, 자성 코어/쉘 나노입자에 고정된 효소 또는 바이오 물질의 활성이 가장 우수하다.

[0037] 본 발명의 자성 코어/쉘 나노입자는, 자성 물질인 코발트 이온과 붕소의 결합, 약계면활성제인 구연산, 그리고 붕소 화학수소화물의 흡착과 화학반응으로 구성되며, 구성화된 입자 표면에 실리카로 단단하게 결합시킬 수 있어 강자성체 특성을 유지할 수 있으며, 수용성 및 유기 용매에 잘 분산이 된다. 또한, 본 발명에 따라, 키토산 비드(baed) 안에 고정화된 효소 또는 바이오 물질은 환경 영향에 의해 야기되는 변형 현태로부터 효소의 단백질과 효소의 제 3의 구조를 보존할 수 있다.

[0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] **[실시예]**

[0040] **실시예 1**

[0041] **<코발트-붕소 입자의 형성 및 실리카 분자의 코팅에 따른 자성 코어/쉘 나노입자의 형성(대량생산)>**

[0042] 상온 상에서 0.2 M $NaBH_4$과 0.4 mM citric acid의 혼합 용액_1000mL과 2 M $CoCl_26H_2O$_2mL을 65 ° C에 녹인 용액을 혼합하여 질소가스 상에서 8분 동안 거품내면서 반응을 시킨다. 코발트-붕소 입자의 형성은 코발트 입자들의 이온간 반발력에 의해 이중 층으로 성장을 하게 되고 그 사이는 $-B(OH)_4$이 흡착에 의해 결합이 된다.

또한 코발트-붕소 (Co-B) 입자의 크기는 구연산염의 양과 관계를 가지게 된다.

[0043]

[0044] 코어로 성장한 코발트-붕소입자는 스토브방법(Stmethod)에 의해 그 표면을 코팅하게 된다. 코발트-붕소 입자 혼합 용액에 에탄올_2000ml, TEOS_1ml, Ammonia (28%)_1ml를 넣고 2시간 동안 반응하고, 그 다음 세척 단계를 거친 후 오븐에 건조 시킨다. 구연산 (citric acid)은 약계면활성제로 작용하여 하나의 막을 형성하고 그 막 안에서 실리카 분자들이 가수분해 및 응축되어 쉘 형태로 실리카층이 형성하게 되며, 구연산염의 농도가 증가 할수록 그 쉘의 두께는 감소하게 된다. 따라서, 자성의 성질을 유지 시키기 위하여 쉘을 얇은 두께로 형성시켰다.

[0045] **실시예 2**

[0046] **<입자의 표면이 개질된 자성 코어/쉘 나노입자의 형성>**

[0047] 상기 실시예 1에서 얻은 입자들의 표면을 개질하기 위하여, 실시예 1에서 얻은 입자들을 아세톤 100ml과 혼합 후 분산 시킨 다음 3-APTS(3-aminopropyltriethoxysilane)18ml를 혼합하고 50 ° C 상에서 2시간 동안 개질하였다. 3-APTS의 실란기가 가수분해에 의해 결합이 되면서 입자의 표면은 쉽게 아민기로 개질이 된다.

[0048] **실시예 3**

[0049] **<표면이 개질된 입자 표면에 글루코오즈 옥시데이즈가 고정화된, 자성 코어/쉘 나노입자의 형성>**

[0050] 상기 실시예 2에서 얻어진 표면이 개질된 입자 표면에, 효소 또는 바이오 물질을 고정화 하기 위하여, 상기 표면 개질된 입자 0.2g와 sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) 5ml에 각각 혼합 후 분산 시켰다. 그 후 효소인 글루코오즈 옥시데이즈(glucose oxidase, GOD) 1mg/5ml 와 20mM EDC를 입자와 혼합된 버퍼에 섞은 후, 반응 온도를 4 ° C 상에서 각각 15 시간 동안 반응하면 입자의 아민 그룹과 효소 또는 바이오 물질의 공유결합으로 고정화하게 된다. 그 다음 회전 건조기 (rotary evaporator)로 건조한 후 4 ° C에서 보관한다.

[0051]

[0052] **실시예 4**

[0053] **<키토산 비드에 캡슐화한, 글루코오즈 옥시데이즈가 고정화된 자성 코어/쉘 나노입자의 형성>**

[0054] 상기 실시예 3에서 얻어진 글루코오즈 옥시데이즈가 고정화된 자성 코어/쉘 나노입자를, 키토산에 캡슐화 하기 위하여 1% 아세트산(acetic acid)와 Di-water_100ml을 첨가하여 키토산 (1.0부터 1.8 wt%)을 혼합시켜서 상온상에서 3시간 동안 키토산을 녹였다. 이렇게 형성된 키토산 용액을 pH 7.0으로 조절 후 나일론 필터로 여과시켰다. 그 다음 고정화된 효소_0.01g을 키토산 용액_5ml에 잘 분산 시켰다. 혼합된 고정화 효소와 키토산 용액을 비드 형태로 제조 하기 위하여 삼인산 나트륨(TPP ;sodium tripolyphosphate)버퍼의 농도 (0.5부터 4wt%)를 100ml 안에 한 방울씩 떨어 뜨려 3시간 동안 5 ° C 상에서 비드 형태로 경화 시켰다.

[0055]

[0056] 결론적으로, 코발트-붕소입자인 코어와 실리카인 쉘로 입자를 형성과 대량 생산을 하여, 입자 표면을 개질 효소를 고정화 할 수 있었으며, 이 고정화된 효소를 키토산으로 캡슐화된 비드 형태로 제조하여 다양한 응용분야에 활용 될 수 있다.

[0057]

[0058] **[시험예 1] TEM 이미지 측정**

[0059] 상기 실시예 1에서 얻어진 입자를 TEM(Transmission electron microscope)로 촬영하여 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0060] 이를 살펴보면, 실시예 1의 입자는 코어/쉘 구조를 갖는 구형체임을 알 수 있고, 입자의 쉘에 표면이 비연속적으로 분포되어 있음을 알 수 있다.

[0061] **[시험예 2] XPS 패턴 측정**

[0062] 실시예 1의 자성 입자를 XPS(X-ray photoelectron spectroscope)을 이용하여 패턴을 측정하여 도 3에 나타냈다.

[0063] 도 3은 XPS(X-ray photoelectron spectroscope)을 이용하여 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 코어/쉘 나노입자의 패턴을 측정하여 나타낸 것이다.

[0064] 이를 살펴보면, XPS 범위는 입자에 모든 코발트들은 Co_{2P}(780.9,796.7eV),B_{1S}(192.1,198.3eV)의 결합 에너지를 갖는 것을 확인하였다. 또한 Co-B 입자에 코팅된 실리카인 경우 Si_{2p}(102.1eV)의 결합에너지를 갖는 것을 확인하였다. 이를 통하여 자성을 가지는 Co-B/SiO_2입자 형성이 존재 하는 것을 알 수 있다.

[0065] **[시험예 3] FT-IR 표면 측정**

[0066] 실시예 1의 자성 입자를 FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)로 표면을 분석하여 도 4에 나타내었다.

[0067] 도 4와 같이 (a)는 아민으로 표면을 개질 하기 전과 (b)는 아민으로 개질 후에 나타나는 wavenumber가 다른 것을 확인 하였다. 이를 통하여 자성을 가지는 Co-B/SiO_2입자 표면이 아민(amine) 그룹으로 개질 된 것을 알 수 있다.

[0068] **[시험예 4] 자기화(magnetization) 측정**

[0069] VSM (vibrating sample magnetometer)로 300K에서 측정한, 상기 실시 예 1, 2에서 얻어진 입자의 장의존적(field-dependent) 자기화 곡선을 도 6에 나타내었다.

[0070] 300K의 자기 히스테리시스(magnetic hysteresis) 곡선은 보자력(coercivity)을 거의 보여주지 않고 강한 자기장에서도 수렵하지 않는데, 이는 자성의 특성을 가짐을 나타낸다.

[0071] 300K 상에서 단위 질량당 포화모멘트 (saturation moment per unit mass_M_s)는 15.02 emu/g, 보자력(coercivity)는 52.04 Oe가 되는 것을 확인 하였다.

[0072] **[시험예 5] 키토산 및 버퍼의 농도에 따른 글루코오즈 옥시데이즈 효소 활성도 측정**

[0073] 실시예 4의 키토산, TPP 버퍼의 농도에 따른 효소 활성도를 도 7 및 도 8에 나타내었다. 상기 글루코오즈 옥시데이즈(glucose oxidase;GOD)의 활성도(activity) 측정은 GOD assay kit (K-GOLX 01/05, Megazyme Ltd., Ireland)를 사용하였다.

[0074] 고정화된 효소를 키토산의 농도 1.0부터 1.8 wt%까지 증가 시켜 각각 혼합하였을 때, 최적 활성도는 키토산의 농도 1.2 wt%일 때 그 활성도가 높은 것을 확인 하였다. 또한 키토산 용액을 경화 시키는 TPP 버퍼의 농도를 0.5부터 4 wt%까지 증가 시켜 경화하였을 때, 최적 활성도는 TPP 버퍼의 농도 2 wt%일 때 그 활성도가 높은 것을 확인 하였다.

[0075] 또한, 도 9와 같이 형성된 비드의 내부가 매우 다공성이고, 자성입자에 의하여 키토산 비드가 자성을 띄는 것을 확인 하였다.

[0076] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 코어/쉘 나노입자의, 비드의 그림을 나타낸 것이다. 도 9에서, (a) 는 아무 것도 첨가 시키지 않은 순수한 키토산 비드만을 SEM image로 측정한 결과를 나타내며, (b) 는 자성입자에 효소를 고정화 한 키토산 비드를 SEM image로 측정한 결과를 나타내며, (c) 는 효소가 고정화된 자성입자를 자

석을 가까이 한 경우의 측정 결과(자성을 띄는지)를 나타낸다.

[0077] **[시험 예 6] 효소 반응물인 기질의 농도에 따른 Michaelis-Menten 속도 변수(kinetic parameters) 측정**

[0078] 실시 예 4의 고정화된 효소를 키토산 비드로 캡슐화에 따른 효소 반응물인 기질의 농도에 따른 속도변수를 도 10에 나타내었다.

[0079] 고정화 전 효소, 고정화 후 효소, 캡슐화된 효소를 각각 기질의 농도 1.6mM부터 100mM까지 변화 시켰을 때 K_M과 V_{max}는 고정화 전 효소_60.7mM, 43.5M/min, 고정화 후 효소_15.2mM, 4.8M/min, 그리고 캡슐화된 효소_51.2.mM, 5.0M/min 인 것을 확인 하였다.

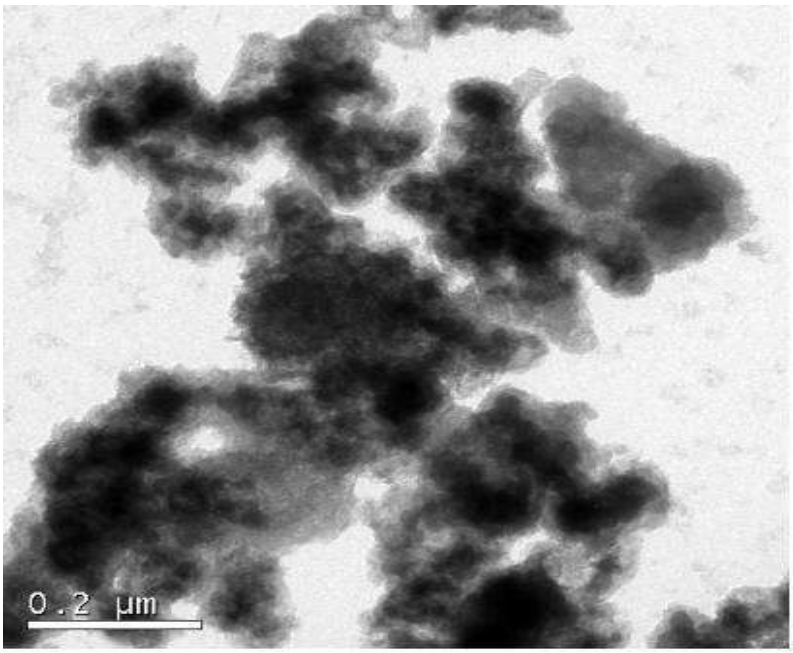
[0080] **[시험 예 7] 고정화된 효소의 재사용**

[0081] 실시 예 4의 최적화된 캡슐화된 고정화 효소의 활성도(activity)를 측정하기 위하여 고정화 효소와 캡슐화된 효소를 7회까지 반복적으로 측정하여, 그 결과를 도 11에 나타내었다.

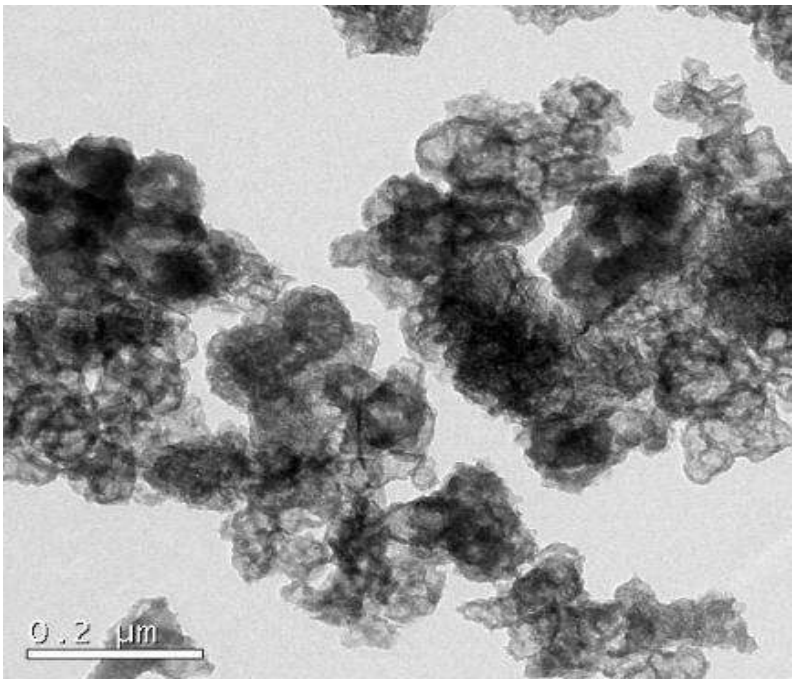
[0082] 도 11과 같이 7회 반복하여 효소 활성도를 측정하였을 때 이 활성도는 최대 60% 이상까지 유지 되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 고정화된 효소와 캡슐화된 효소를 비교하였을 때, 캡슐화된 효소가 재사용에 높은 것을 확인 하였다.

도면

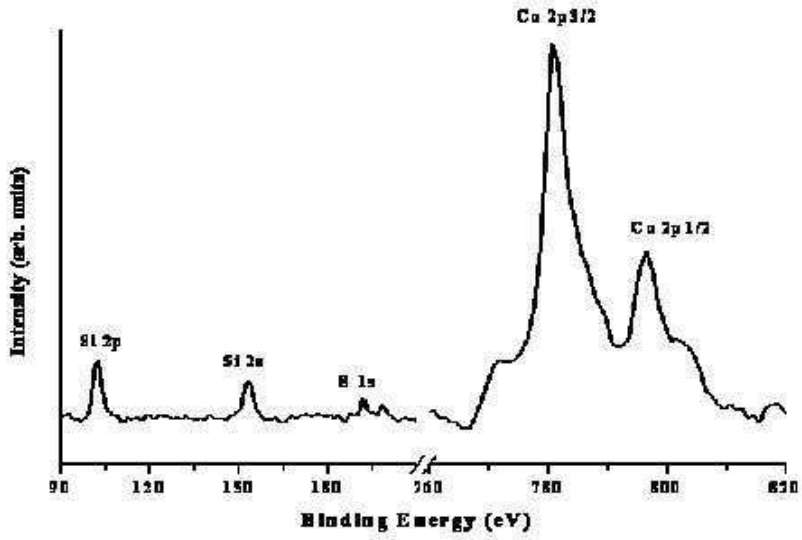
도면1



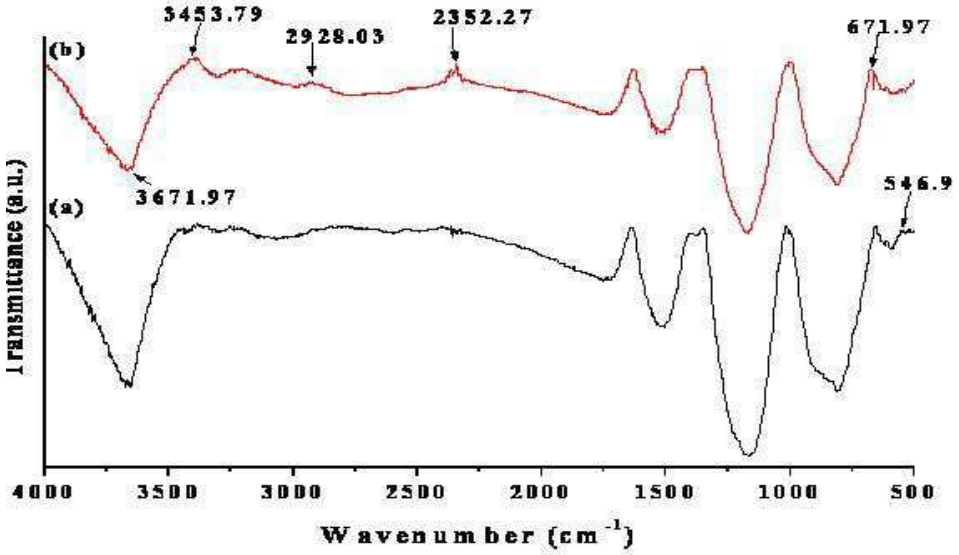
도면2


0.2 μm

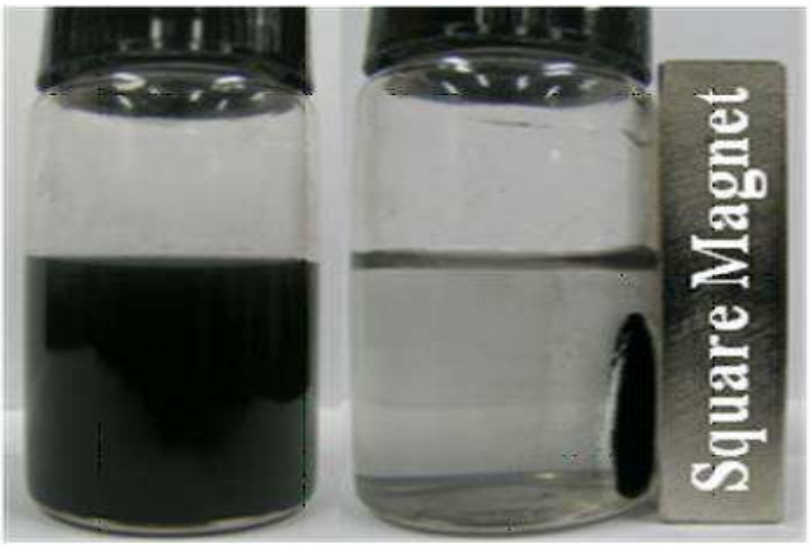
도면3


Cu 2p3/2
Cu 2p1/2
Si 2p
Si 2s
B 1s
Intensity (arb. units)
90
120
150
180
760
800
850
Binding Energy (eV)

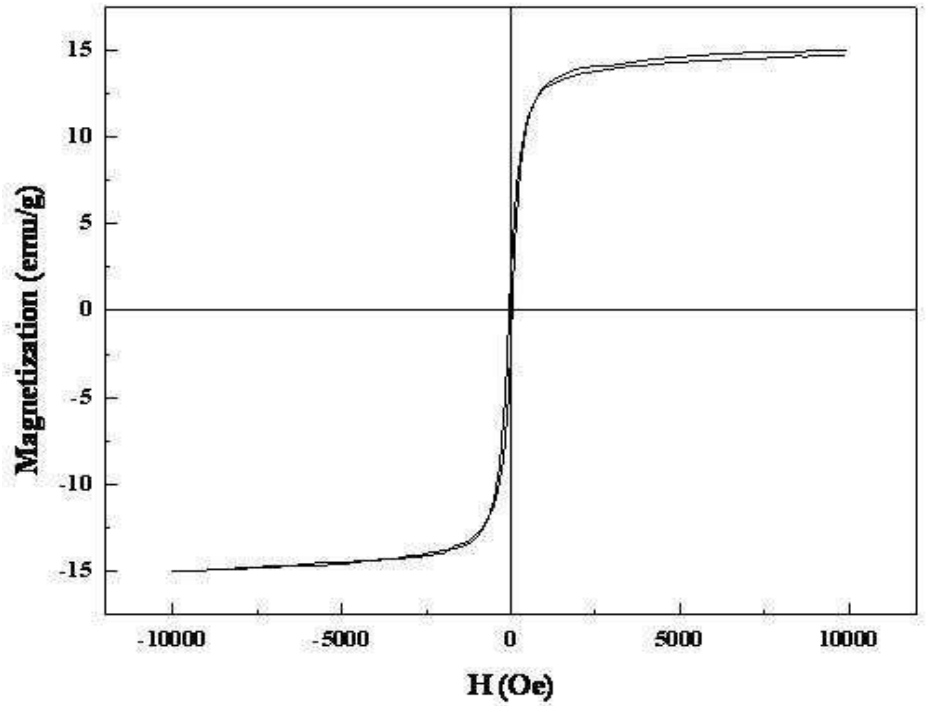
도면4


3453.79
2928.03
2352.27
671.97
(b)
3671.97
546.9
(a)
Transmittance (a.u.)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumber (cm-1)

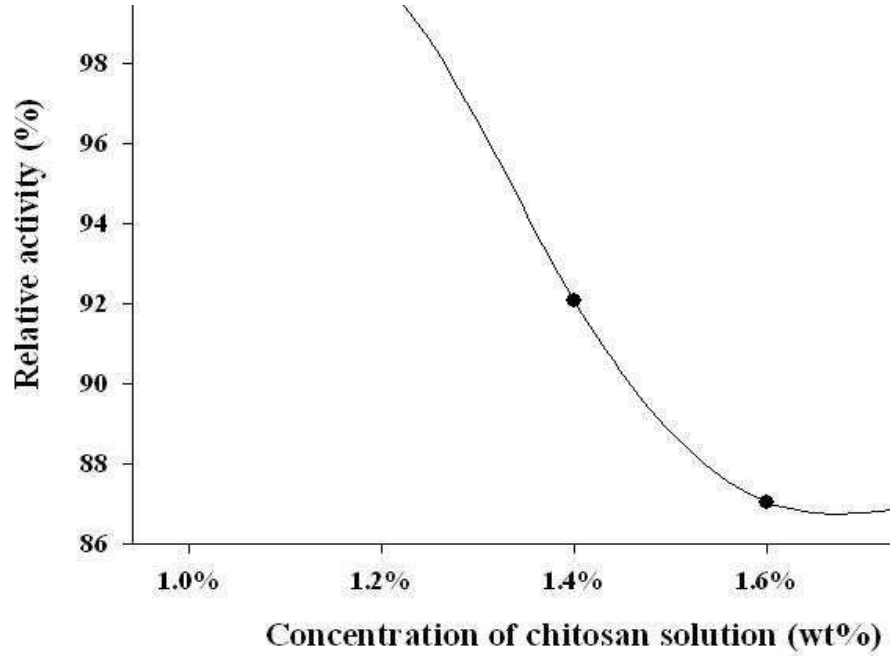
도면5


Square Magnet

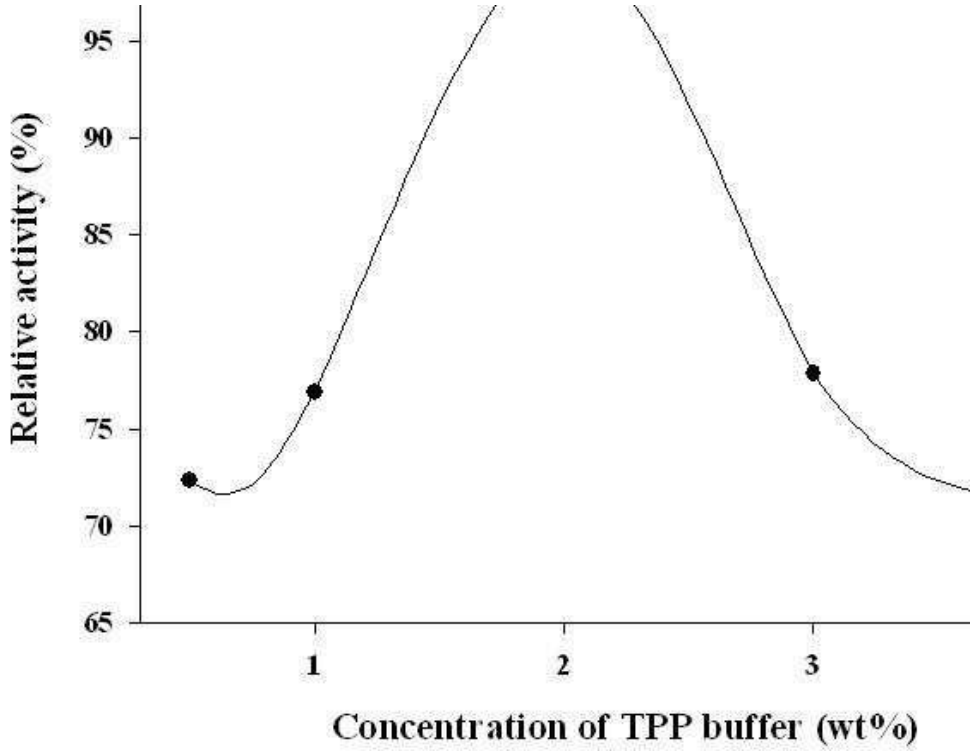
도면6


15
10
5
0
-5
-10
-15
Magnetization (emu/g)
-10000
-5000
0
5000
10000
H(Oe)

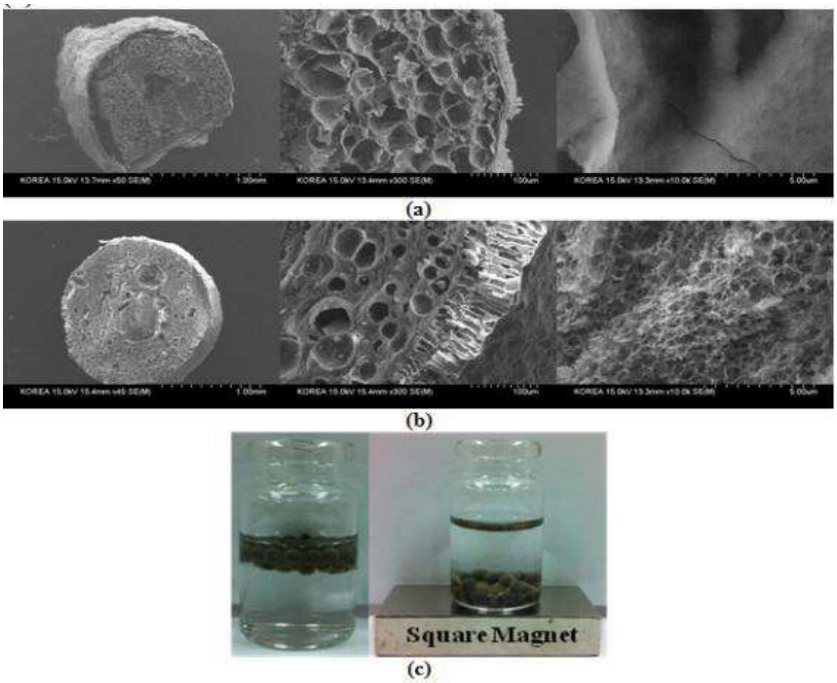
도면7


98
96
94
92
90
88
86
Relative activity (%)
1.0%
1.2%
1.4%
1.6%
Concentration of chitosan solution (wt%)

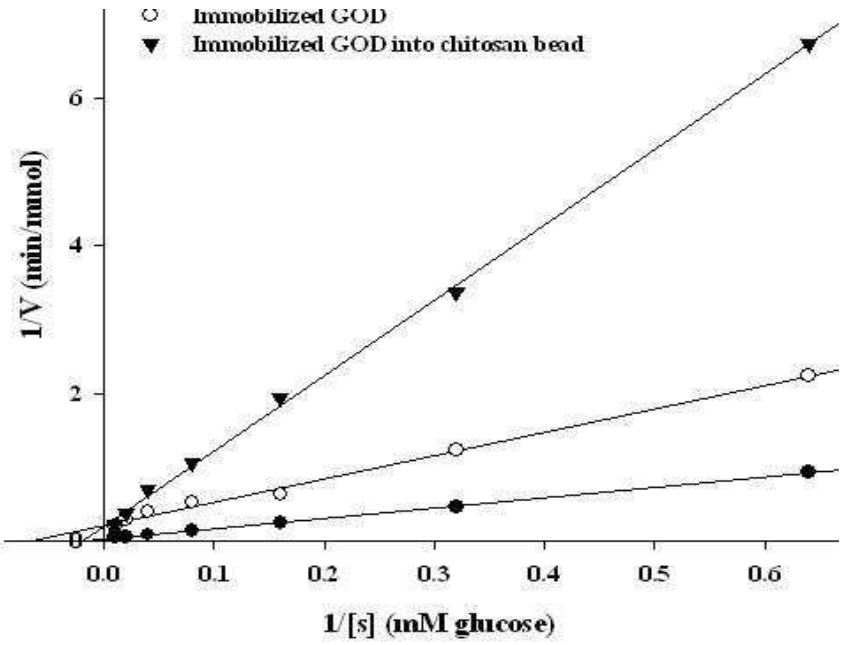
도면8


Relative activity (%)
95
90
85
80
75
70
65
1
2
3
Concentration of TPP buffer (wt%)

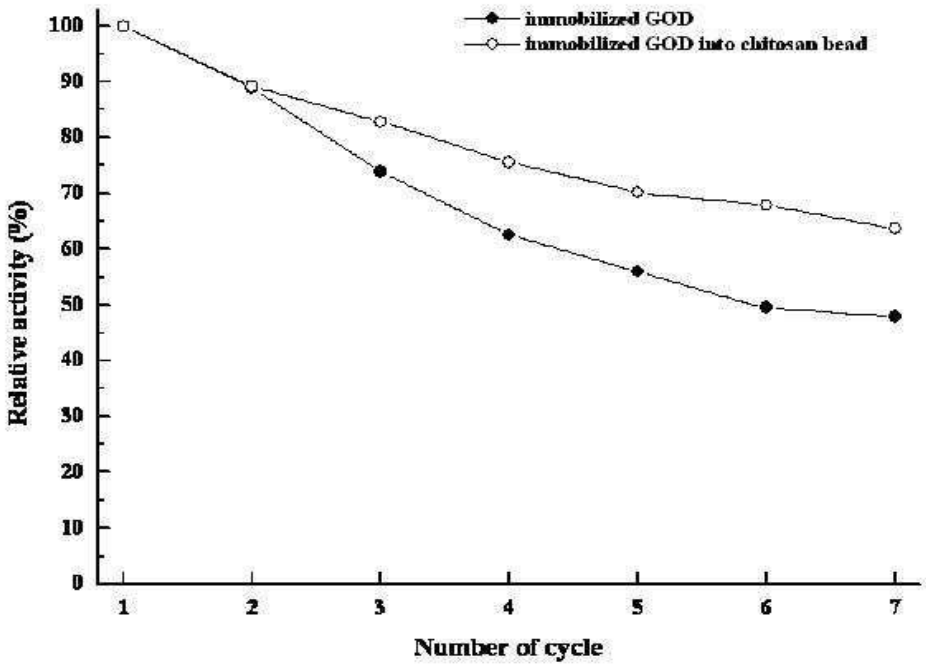
도면9


(a)
(b)
Square Magnet
(c)

도면10


Immobilized GOD
Immobilized GOD into chitosan bead
1/V (min/mmol)
1/[s] (mM glucose)
0
2
4
6
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6

도면11


immobilized GOD
immobilized GOD into chitosan bead
Relative activity (%)
Number of cycle
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
1
2
3
4
5
6
7