(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0095419
(43) 공개일자 2020년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 11/14* (2020.01) *C12N 9/04* (2006.01)
*C12N 9/96* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12N 11/14* (2013.01)
*C12N 9/0006* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0012250
(22) 출원일자 2020년01월31일
심사청구일자 2020년01월31일
(30) 우선권주장
1020190012428 2019년01월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
**고려대학교 산학협력단**
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
**김중배**
서울특별시 강남구 역삼로 309, 101동 1501호 (역삼동, 래미안펜타빌아파트)
**주영준**
서울특별시 광진구 긴고랑로16길 23-3 , 101호(중곡동)
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인이룸리온**

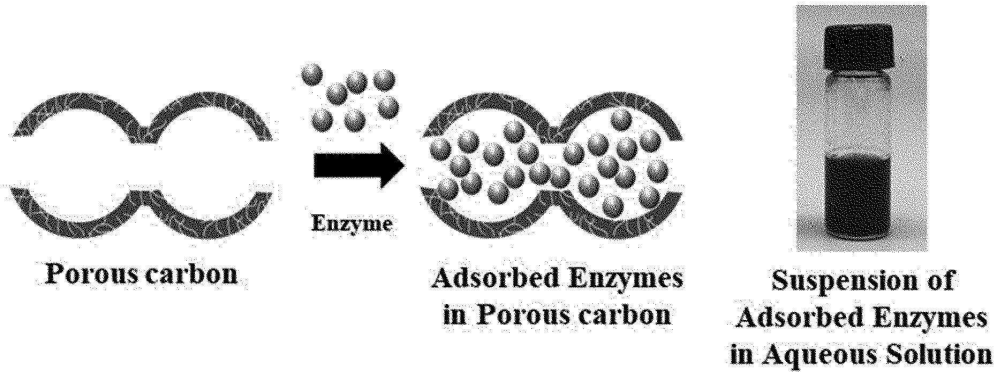
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **효소-다공성 탄소 복합체**

## (57) 요 약

본 발명은 효소-다공성 탄소 복합체에 관한 것이며, 더욱 상세하게는 다공성실리카보다 현저히 높은 효소 흡착량과 실현할 수 있으며, 고정화된 효소의 안정성을 높게 유지할 수 있는 효소-다공성 물질 복합체에 관한 것이다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*C12N 9/96* (2013.01)
*C12Y 101/03004* (2013.01)

(72) 발명자
**김리나**
서울특별시 성동구 무학로 33, 110동 402호 (하왕십리동, 텐즈힐)
**남자현**
서울특별시 성북구 인촌로7길 6, 301호 (안암동2가,우원빌 )
**이인선**
경기도 용인시 수지구 만현로 79, 504동 804호 (상현2동, 만현마을 아이파크5단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20182010600430
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 에너지기술평가원
연구사업명 에너지기술개발사업
연구과제명 고집적·고안정성 효소 시스템을 기반으로 한 CO2 전환 공정기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2018.10.01 ~ 2019.03.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

다공성 탄소 담체; 및 상기 다공성 탄소 담체의 공극 내부에 담지된 효소;를 포함하는 효소-다공성 탄소 복합체.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 효소-다공성 탄소 복합체는 완충용액 상에서 12일간 교반 후 효소의 유출량이 교반 전에 대비해 33% 미만인 것을 특징으로 하는 효소-다공성 탄소 복합체.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 효소-다공성 탄소 복합체는 완충용액 상에서 12일간 교반 후 효소의 활성이 교반 전에 대비해 16% 이상인 것을 특징으로 효소-다공성 물질 복합체.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 효소-다공성 탄소는 완충용액 상에서 45일간 교반 후 효소의 활성이 교반 전에 대비해 72% 이상인 것을 특징으로 효소-다공성 물질 복합체.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 다공성 탄소 담체는 상기 효소와의 소수성 상호작용을 유도하기 위하여 공극 표면에 제1작용기를 더 구비하는 것을 특징으로 하는 효소-다공성 탄소 복합체.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 다공성 탄소 담체는 상기 효소와의 친수성 상호작용을 유도하기 위하여 공극 표면에 제1작용기를 더 구비하는 것을 특징으로 하는 효소-다공성 탄소 복합체.

### 청구항 7

제5항에 있어서,

상기 제1작용기는 알킬기, 페닐기, 벤질기, 비닐기 및 할로기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 소수성 상호작용을 유도하는 작용기를 포함하는 것을 특징으로 하는 효소-다공성 탄소 복합체.

### 청구항 8

제6항에 있어서,

상기 제1작용기는 하이드록시기, 카보닐기, 할라이드기, 카복실기, 메톡시기, 하이드로퍼옥시기, 아민기, 이민기, 이미드기, 나이트릴기, 나이트로기, 싸이올기, 설피노기 및 인산기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 친수성 상호작용을 유도하는 작용기를 포함하는 것을 특징으로 하는 효소-다공성 탄소 복합체.

### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 다공성 탄소 담체의 공극 크기는 2 ~ 5000 ㎚ 인 것을 특징으로 하는 효소-다공성 탄소 복합체.

**청구항 10**

제1항에 있어서,

상기 효소는 트립신, 키모트립신, 펩신, 리파아제, 당산화효소, 양고추냉이 과산화효소, 티록시네이즈, 탄산무수화효소, 포름알데히드 탈수소효소, 포름산 탈수소효소, 알콜 탈수소효소, 콜레스테롤 탈수소효소, 아실레이즈, 락토네이즈, 프로테이즈, 퍼옥시데이즈, 아미노펩티데이즈, 포스파테이즈, 트렌스아미네이즈, 세린-엔도펩티데이즈, 시스테인-엔도펩티데이즈 및 메탈로엔도펩티데이즈로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 효소-다공성 탄소 복합체.

**청구항 11**

제1항에 있어서,

상기 효소는 상기 다공성 탄소 담체의 공극 표면과 소수성 상호작용 및 친수성 상호작용 중 어느 하나 이상을 유도하기 위한 제2작용기를 더 구비하는 것을 특징으로 하는 효소-다공성 탄소 복합체.

**청구항 12**

제1항에 있어서,

상기 효소의 적어도 일부는 다공성 탄소 담체의 공극 내부에 흡착된 것을 특징으로 하는 효소-다공성 탄소 복합체.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 효소-다공성 탄소 복합체를 포함하는 바이오 연료전지용 전극.

**청구항 14**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 효소-다공성 탄소 복합체를 포함하는 전기화학적 바이오센서용 전극.

**청구항 15**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 효소-다공성 탄소 복합체를 포함하는 이산화탄소 전환 시스템.

**청구항 16**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 효소-다공성 탄소 복합체를 포함하는 안티파울링(antifouling) 시스템.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 효소-다공성 탄소 복합체에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 다공성 물질에 효소를 고정화함으로써 효소 자체의 안정성을 향상시킴과 동시에 장시간 효소의 누출을 방지하여, 효소를 효과적으로 다공성 탄소 물질 내부에 고정시킨 효소-다공성 탄소 복합체에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 효소는 다양한 화학반응을 촉진하는 생촉매 물질로, 고도의 선택성, 정밀성, 효율성 등을 가지고 있으며, 상온·상압 조건에서도 매우 빠른 속도로 화학반응을 촉진하기 때문에 다양한 산업에 이용될 수 있다. 하지만 산업 분야의 반응 환경에서는 열, pH, 전단 응력 등의 외부 환경에 의해 효소의 3차원 구조가 쉽게 변성이 되어 효소의 활성을 빠르게 잃어버리는 문제가 있다. 따라서 효소의 안정성을 향상시키기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다.

[0003] 효소의 안정성을 향상시키는 기술 중에서도 고체 지지체에 효소를 고정화하는 기법은 효소의 안정성을 향상시킬 수 있을 뿐 만 아니라, 비균질 촉매로서 반응 용액으로부터 고정화된 효소를 손쉽게 분리해 낼 수 있다는 장점이 있다. 특히 다공성 물질은 효소의 크기에 대응하여 공극의 크기 및 형태를 다양하게 조절할 수 있기 때문에 효소 고정화를 위한 최적의 물질로 연구되고 있다. 또한, 다공성 물질 내부에 효소를 고정화할 경우, 다공성 물질의 공극 내부에서 효소는 단위 밀리리터 당 수백 밀리그램의 고농도로 존재하는 밀집 효과(crowding effect)로 인해 그 안정성이 획기적으로 향상될 수 있다. 또한, 다공성 물질은 외부의 전단 응력 등 물리적인 효과로부터 내부에 고정화된 효소를 보호할 수 있기 때문에 가혹한 환경에서도 효소 반응을 적용할 수 있다.

[0004] 그러나, 일반적인 다공성 물질의 내부에 담지된 효소는 쉽게 외부로 누출될 수 있고, 누출된 효소는 회수되지 못하고 버려지거나, 외부 환경에 의해 효소 구조가 변성될 수 있기 때문에, 결과적으로는 고정화된 효소의 활성 감소로 이어질 수 있다.

[0005] 이를 해결하기 위해서 효소를 다공성 물질 내부에 공유결합시켜서 효소의 누출을 방지하는 기술이 연구되었다. 물리화학적 방법을 통해 다공성 물질을 기능화(functionalization)한 뒤에, 가교결합제를 이용하여 다공성 물질의 기능기와 효소 곁사슬(side chain)의 기능기 사이에 가교결합을 형성시킴으로써, 다공성 물질 내부에 담지된 효소가 누출되는 것을 방지하는 기술이다.

[0006] 그러나 공유결합 기술을 적용하기 위해서는 다공성 물질 합성 과정에서 추가적인 기능화 과정을 도입해야 하는 단점이 있다. 또한 다공성 물질의 기공내 표면에 위치한 작용기와 효소 표면의 작용기 사이에 둘 이상의 공유결합이 유도되면, 효소의 구조적 변성을 통한 효소의 비활성화가 발생할 수 있다.

[0007] 한편 공유결합 기술이 응용되어 효소의 누출을 방지하기 위해 나노효소반응기(nanoscale enzyme reactor) 기술이 연구되었다. 나노효소반응기 기술은 다공성 물질 내부에 효소를 담지시키고, 담지된 효소들이 누출되기 전 효소 간에 가교결합을 형성시켜서 다공성 물질의 포어 입구 직경보다 가교된 효소들의 크기를 증가시킴으로써, 다공성 물질 내부에 담지된 효소가 누출되는 것을 방지하는 기술이다.

[0008] 그러나 종래의 나노효소반응기 기술로는 가교결합제에 의해 효소 표면에 둘 이상의 가교결합이 유도될 수 있는데, 이때, 포름산 탈수소효소, 포름알데히드 탈수소효소, 알코올탈수소효소 등과 같이 효소가 쉽게 변성이 되어 활성을 잃을 수 있는 불안정한 효소의 경우 당해 기술로 안정화시키기 어렵다.

[0009] 또한, 효소를 가교결합제를 이용해 안정화시키는 경우 글루타르다이알데히드 등과 같은 가교결합제의 생체적합성이 문제될 수 있고, 이로 인해 의료분야에는 활용하기 어려운 문제가 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 공개특허공보 특1995-0008685호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 효소 활성의 저하를 최소화하면서 효소를 다공성 물질 내에 고정화시키되, 다공성 물질 내에 고정화된 효소의 누출이 방지되고, 다공성 물질 내에 고정화된 효소의 안정성을 확보한 효소-다공성 탄소복합체를 제공하는 데에 목적이 있다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 상술한 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 다공성 탄소 담체 및 상기 다공성 탄소 담체의 공극 내부에 담지된 효소를 포함하는 효소-다공성 탄소 복합체를 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 효소는 적어도 일부가 다공성 탄소 담체의 공극 내부에 흡착되어 담지된 것일 수 있다.

[0014] 또한, 상기 다공성 탄소 담체는 메조포러스 탄소 및/또는 마이크로포러스 탄소일 수 있고, 일예로 공극 크기는

2 ~ 5000 nm일 수 있다.

[0015] 또한, 상기 효소는 트립신, 키모트립신, 펩신, 리파아제, 당산화효소, 양고추냉이 과산화효소, 티록시네이즈, 탄산무수화효소, 포름알데히드 탈수소효소, 포름산 탈수소효소, 알콜 탈수소효소, 콜레스테롤 탈수소효소, 아실레이즈, 락토네이즈, 프로테이즈, 퍼옥시데이트, 아미노펩티데이즈, 포스파테이즈, 트렌스아미네이즈, 세린-엔도펩티데이즈, 시스테인-엔도펩티데이즈 및 메탈로엔도펩티데이즈로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 효소를 포함할 수 있다.

[0016] 또한, 상기 다공성 탄소 담체는 상기 효소와의 소수성 상호작용 및 친수성 상호작용 중 어느 하나 이상을 유도하기 위하여 공극 표면에 제1작용기를 더 구비할 수 있다.

[0017] 또한, 상기 제1작용기는 알킬기, 페닐기, 벤질기, 비닐기 및 할로기 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 소수성 상호작용을 유도하는 작용기 및 하이드록시기, 카보닐기, 할라이드기, 카복실기, 메톡시기, 하이드로퍼옥시기, 아민기, 이민기, 이미드기, 나이트릴기, 나이트로기, 싸이올기, 설피노기 및 인산기 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 친수성 상호작용을 유도하는 작용기 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0018] 또한, 상기 효소는 상기 다공성 탄소 담체의 공극 표면과 소수성 상호작용 및 친수성 상호작용 중 어느 하나 이상을 유도하기 위한 제2작용기를 더 구비할 수 있다.

[0019] 또한, 상기 제2작용기는 알킬기, 페닐기, 벤질기, 비닐기 및 할로기 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 소수성 상호작용을 유도하는 작용기 및 하이드록시기, 카보닐기, 할라이드기, 카복실기, 메톡시기, 하이드로퍼옥시기, 아민기, 이민기, 이미드기, 나이트릴기, 나이트로기, 싸이올기, 설피노기 및 인산기 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 친수성 상호작용을 유도하는 작용기 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0020] 또한, 상기 효소-다공성 탄소 복합체는 완충용액에 혼합된 상태로 12일 간 교반 후 다공성 탄소 복합체에 담지된 효소의 유출량이 교반 전에 대비해서 33% 미만일 수 있다.

[0021] 또한, 상기 효소-다공성 탄소 복합체는 완충용액에 혼합된 상태로 12일 간 교반 후 효소-다공성 탄소 복합체의 효소 활성이 교반 전에 대비해서 16% 이상일 수 있다.

[0022] 또한, 상기 효소-다공성 탄소 복합체는 완충용액에 혼합된 상태로 45일 간 교반 후 효소-다공성 탄소 복합체의 효소활성이 교반 전에 대비해서 72% 이상일 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 효소-다공성 탄소 복합체를 포함하는 바이오 연료전지 또는 바이오센서용 전극을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 효소-다공성 탄소 복합체를 포함하는 이산화탄소 전환 시스템을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 효소-다공성 탄소 복합체를 포함하는 안티파울링(antifouling) 시스템을 제공한다.

## *발명의 효과*

[0026] 본 발명에 의한 효소-다공성 탄소 복합체는 효소 활성부위의 변성 없이, 다공성 탄소 내부에 효소를 고정화시키고 안정화하는데 적합하게 사용할 수 있다. 또한, 종래의 효소 안정화 기술에 응용되던 가교결합제와 같은 생체적합성이 문제되는 성분을 사용하지 않고 효소를 고정화, 안정화함에 따라서 사용이 제한되던 의료분야에도 사용이 확대될 수 있다. 더불어 효소-다공성 탄소 복합체를 포도당을 기반으로 하는 바이오 연료전지 및 혈당 측정을 목적으로 하는 바이오센서의 전극 제작을 목적으로 당산화효소 등의 관련 효소를 고정화에 활용할 경우, 매우 높은 안정화 효과를 달성할 수 있다. 또한, 이산화탄소를 중탄산염으로 전환할 수 있는 탄산무수화효소 및 중탄산염으로부터 포름산 전환이 가능한 포름산 탈수소효소 등의 관련 효소를 고정화에 활용될 경우, 종래의 다공성 물질을 이용한 고정화 방식에 비해 효소의 활성을 장시간 안정적으로 유지하는 것이 가능하여 이산화탄소 전환 및 활용 시스템의 촉매 소재로 활용할 수 있다. 또한, 정족수 감지(quorum sensing) 역할을 수행하는 신호분자(signaling molecule)를 분해하여 생물막(biofilm) 형성을 억제할 수 있는 아실레이즈 등의 관련 효소를 고정화에 활용될 경우, 종래의 다공성 물질을 이용한 고정화 방식에 비해 효소의 활성을 안정적으로 유지하는 것이 가능하여, 멤브레인 표면의 바이오필름 형성을 억제하기 위한 목적으로 안티파울링(antifouling) 시스템 내의 촉매 소재로 활용할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 효소-다공성 탄소 복합체의 제조과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 포름산 탈수소효소-다공성 탄소 복합체에서 다공성 탄소 단위 무게당 효소의 활성을 나타낸 그래프이다.

도 3a 내지 도 3c는 각각 본 발명의 일 실시예에 따른 당산화효소-다공성 탄소 복합체, 탄산무수화효소-다공성 탄소 복합체 및 아실레이즈-다공성 탄소 복합체에서 다공성 탄소 단위 무게당 효소의 활성을 나타낸 그래프이다.

도4는 본 발명의 일 실시예에 따른 포름산 탈수소효소-다공성 탄소 복합체의 시간에 따른 효소 활성의 안정성을 측정한 그래프이다.

도 5a 내지 도 5c는 본 발명의 일 실시예에 따른 당산화효소-다공성 탄소 복합체, 탄산무수화효소-다공성 탄소 복합체 및 아실레이즈-다공성 탄소 복합체의 시간에 따른 효소 활성의 안정성을 측정한 그래프이다.

도 6a 내지 도 6c는 본 발명의 일실시예에 따른 당산화효소-다공성 탄소 복합체, 탄산무수화효소-다공성 탄소 복합체 및 아실레이즈-다공성 탄소 복합체에서 다공성 탄소 단위 무게당 효소의 초기 담지량을 나타낸 그래프이다.

도7a 내지 도 7c는 본 발명의 일실시예에 따른 당산화효소-다공성 탄소 복합체, 탄산무수화효소-다공성 탄소 복합체 및 아실레이즈-다공성 탄소 복합체에서 보관된 시간에 따른 다공성 탄소 단위 무게 당 효소의 담지량의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 포름산 탈수소효소-다공성 탄소 복합체와, 가교결합된 포름산 탈수소효소가 다공성 탄소 내에 고정화된 복합체의 활성을 비교한 그래프이다.

도 9a 및 9b는 본 발명의 일실시예에 따른 작용기 처리된 당산화효소-다공성 탄소 복합체 및 아실레이즈-다공성 탄소 복합체에서 다공성 탄소 단위 무게당 효소의 초기 담지량을 나타낸 그래프이다.

도10a 및 도 10b는 본 발명의 일실시예에 따른 작용기 처리된 당산화효소-다공성 탄소 복합체 및 아실레이즈-다공성 탄소 복합체에서 보관된 시간에 따른 다공성 탄소 단위 무게 당 효소의 담지량의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 11a 및 도 11b는 본 발명의 일실시예에 따른 당산화효소-다공성 탄소 복합체, 아실레이즈-다공성 탄소 복합체, 작용기 처리된 당산화효소-다공성 탄소 복합체 및 작용기 처리된 아실레이즈-다공성 탄소 복합체와, 다공성 담체를 다공성 실리카로 변경하여 구현된 복합체에서 다공성 담체 단위 무게당 효소의 초기 담지량을 나타낸 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 실시예에 대하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세하게 설명한다. 다만, 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0030] 도 1을 참조하여 설명하면 본 발명의 일 실시예에 의한 효소-다공성 탄소 복합체는 효소와 다공성 탄소 담체를 포함하여 구현되며, 구체적으로 상기 다공성 탄소 담체 내부에 구비된 공극에 효소가 담지되어 구비된다. 이때, 상기 효소는 다공성 탄소 담체 공극 표면 및 효소와 효소 간에 공유결합 없이 공극에 담지될 수 있다. 일예로 상기 효소는 다공성 탄소 담체의 공극에 흡착 상태로 구비될 수 있다. 이때, 상기 흡착 상태의 효소 중 적어도 일부는 다공성 탄소 담체의 공극 표면에 흡착될 수 있다. 또한, 상기 효소는 어느 일 효소와 인접한 다른 효소 간에도 흡착 상태로 공극에 구비될 수 있다. 이 경우 효소 간 공유결합 없이 효소들이 응집체를 형성함에 따라서 공극의 입구 직경보다 상대적으로 물리적 크기가 커질 수 있는데, 이를 통해서도 효소가 공극에서 누출되는 것이 최소화 또는 방지될 수 있다.

[0031] 한편, 다공성 물질의 공극 내부에 효소가 담지된다고 하여 위와 같은 다공성 물질 공극 표면과 효소간 흡착이나 효소 간 흡착을 통해서 효소의 누출을 방지할 수 있는 것은 아니다. 또한, 다공성 물질의 종류에 관계없이 공극

의 부피에 대응할 양만큼 효소를 다공성 물질의 공극 내부로 도입할 수 있는 것도 아니다.

[0032] 본 발명의 발명자는 효소를 다공성 물질 내부 공극에 수용하기 위해서 종래에 많이 사용되던 다공성 실리카 대신에 다공성 탄소 물질을 담체로 이용할 때 효소를 공극 내부에 많은 양으로 담지시킬 수 있고, 담지된 효소의 활성을 안정적으로 장기간 유지할 수 있음을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다. 이러한 효과는 다공성 물질 내 담지된 효소의 누출을 방지하기 위해서 가교결합제를 사용하거나, 공유결합을 위한 작용기를 구비시킬 수밖에 없었던 종래의 효소 고정화, 안정화 방법에서는 예상할 수 없었던 획기적인 것으로 평가할 수 있다.

[0033] 즉, 도 2를 통해 확인할 수 있듯이 다공성 물질로 실리카를 사용한 비교예 1의 경우 포름산 탈수소효소(formate dehydrogenase, FDH)를 담지시키는 처리를 했음에도 불구하고, FDH 효소활성이 측정되지 않은 반면에 다공성 물질로 다공성 탄소를 사용한 실시예 1의 경우 동일한 효소를 동일한 방법으로 처리했음에도 현저히 우수한 효소활성이 감지된 것을 확인할 수 있다. 이러한 기술적 특징은 도 3a 내지 도 3c에 도시된 것과 같이 효소의 종류를 당산화효소(glucose oxidase, GOx), 탄산무수화효소(carbonic anhydrase, bCA) 및 아실레이즈(acylase, AC)로 변경한 실험에서와 마찬가지로 확인되었으며, 다공성 실리카(비교예 2 내지 4)에서 효소활성이 측정되긴 했으나 그 정도가 다공성 탄소(실시예 2 내지 4)에서 보다 현격하게 작은 것을 알 수 있다.

[0034] 또한 도 4을 통해 확인할 수 있듯이, 활성이 측정되지 않은 비교예 1을 대신하여 유리된 효소를 용액 내에 준비한 비교예 7은 효소 활성이 1일 이전에 초기 활성 대비 40% 미만으로 급격히 낮아진 뒤 2 ~ 3일 내 효소활성을 거의 상실했다. 그러나 다공성 탄소 내 공극에 담지 된 효소의 경우 초기 활성 대비 80%에 가까운 수준을 유지하면서 45일 이상 지속되고 있는 것을 확인할 있다. 이러한 기술적 특징은 도 5a 내지 도 5c에 도시된 것과 같이 효소의 종류를 당산화효소, 탄산무수화효소 및 아실레이즈로 변경한 실험에서와 마찬가지로 확인되었다. 결국 본 발명의 일 실시예에 의한 효소-다공성 탄소복합체는 다공성 탄소 내 효소가 어떠한 공유결합 없이도 누출이 방지되면서 안정적으로 효소활성을 장기간 발현할 수 있다.

[0035] 더불어 도 6a 내지 도 6c를 참고하여 설명하면, 다공성 담체로 실리카를 사용한 비교예 2 내지 4에 비해 다공성 담체로 탄소를 사용한 실시예 2 내지 4에서 당산화효소, 탄산무수화효소 및 아실레이즈의 담지량(enzyme loading)이 현저히 높아진 것을 관찰하였다. 또한 도 7a 내지 도 7c에 도시된 것과 같이, 1일이 경과된 이후부터는 다공성 탄소에 담지된 효소들이 거의 누출되지 않고 지속적으로 남아있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 다공성 탄소 담체는 다른 재질의 다공성 물질과 대비했을 때 효소를 쉽게 공극 내부로 도입할 수 있고, 실리카 담체에 비해 더 높은 담지량을 제공할 수 있으며, 도입 후 지속적인 교반 반응에도 효소의 누출을 방지할 수 있어서 효소를 안정적으로 담지할 수 있는 이점이 있다. 상기 다공성 탄소 담체는 내부에 다수 개의 공극을 갖는 탄소물질의 경우 제한없이 사용될 수 있고, 바람직하게는 효소와 상호작용을 할 수 있는 탄소 물질의 경우 제한없이 사용될 수 있다. 일 예로 상기 다공성 탄소는 공극 크기가 1 ~ 5,000㎚, 다른 일예로 1 ~ 1,000㎚, 또 다른 일예로 1 ~ 500㎚구현된 다공성탄소일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0036] 또한, 상기 다공성 탄소 담체는 형상에 있어서 제한되는 것은 아니나, 일예로 구형, 타원형 및 비정형의 입자 형태이거나, 표면에 필름 형태로 구현된 것일 수 있다. 또한, 입자 형태의 다공성 탄소 담체는 크기가 100㎚ ~ 1,000㎛ 일 수 있으며, 여기서 담체 크기는 형상이 구형일 경우 직경, 비정형 일 경우 표면의 서로 다른 두 지점 간 거리 중 최대거리를 의미한다.

[0037] 또한, 다공성 탄소 담체의 표면적은 100 ~ 5000 $m^2$ /g 일 수 있고, 공극 부피는 0.1 ~ 10 $cm^3$ /g 일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 다공성 탄소 담체는 담지 되는 효소의 누출을 방지하고 장기간 안정적으로 효소활성을 발현시키기 위하여 효소와 상호작용을 유도할 수 있는 제1작용기를 더 구비할 수 있고, 구체적으로 상기 작용기는 적어도 다공성 탄소 담체 내 공극의 표면에 구비될 수 있다. 상기 상호작용은 비공유 상호작용이며, 일 예로 상기 상호작용은 소수성 상호작용 또는 친수성 상호작용일 수 있다. 상기 친수성 상호작용은 일예로 수소결합, 이온결합일 수 있다. 이러한 상호작용은 공유결합에 대비해 효소의 입체구조에 미치는 영향이 최소화 또는 방지됨에 따라서 종래 공유결합을 통해 지지체에 효소를 고정화시키거나 공유결합을 통해 효소와 효소의 가교결합 시킬 때 발생하는 강한 결합력에 따른 효소의 입체구조 변형의 문제와 이로 인한 효소활성의 저하 또는 상실의 문제를 방지하거나 최소화할 수 있는 이점이 있다. 이때, 다공성 탄소 담체에 구비되는 제1작용기는 친수성 상호작용을 유도할 수 있는 작용기 보다는 소수성 상호작용을 유도하는 작용기가 효소의 공극 내 도입 및 누출을 방지하고 안정적으로 장시간 고정화시키는데 보다 유리할 수 있다. 다만, 이는 도입되는 효소의 특성에 따라서 오히려 친수성 상호작용이 유리한 경우도 있을 수 있음을 밝혀둔다.

[0039] 상기 제1작용기는 소수성 상호작용이나, 친수성 상호작용을 유도할 수 있는 작용기의 경우 제한 없이 채용될 수 있는데, 일예로, 상기 제1작용기는 알킬기, 페닐기, 벤질기, 비닐기 및 할로기 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 소수성 상호작용을 유도하는 작용기 및 하이드록시기, 카보닐기, 할라이드기, 카복실기, 메톡시기, 하이드로퍼옥시기, 아민기, 이민기, 이미드기, 나이트릴기, 나이트로기, 싸이올기, 설피노기 및 인산기 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 친수성 상호작용을 유도하는 작용기 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0040] 또한, 상기 제1작용기는 다공성 탄소 공극 표면에 공지된 발명을 통해 도입할 수 있으며, 본 발명은 이에 대해 특별히 한정하지 않는다.

[0042] 다음으로 상술한 다공성 탄소 담체 내 공극에 담지 되는 효소는 공지된 효소의 경우 제한 없이 사용될 수 있다. 상기 효소는 바람직하게는 트립신, 키모트립신, 펩신, 리파아제, 당산화효소, 양고추냉이 과산화효소, 티록시네이즈, 탄산무수화효소, 포름알데히드 탈수소효소, 포름산 탈수소효소, 알콜 탈수소효소, 콜레스테롤 탈수소효소 아실레이즈, 락토네이즈, 프로테이즈, 퍼옥시데이트, 아미노펩티데이즈, 포스파테이즈, 트렌스아미네이즈, 세린-엔도펩티데이즈, 시스테인-엔도펩티데이즈, 메탈로엔도펩티데이즈 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 특히, 입체구조의 안정성이 다소 좋지 않아서 공유결합 또는 가교결합을 통한 고정화 시 효소활성이 저하될 수 있는 포름산 탈수소효소, 포름알데히드 탈수소효소, 알코올 탈수소효소 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 효소는 본 발명에 따라서 다공성 탄소 담체 내 담지 시 효소활성을 안정적으로 발현할 수 있는 이점이 있다. 도 8을 참조하여 설명하면, 다공성 담체 내에 흡착된 포름산 탈수소효소가 포함된 실시예 1과 달리, 다공성 담체 내에서 가교결합제에 의해 가교결합된 포름산 탈수소효소가 용액 내에 포함된 비교예 8 내지 9는 가교결합제 농도가 높아짐에 따라 효소활성이 극적으로 저하되는 것을 확인할 수 있다. 결국 본 발명의 일 실시예에 의한 효소-다공성 탄소복합체는 다공성 탄소 담체 내 담지 시 효소활성을 안정적으로 발현할 수 있는 이점이 있다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 효소는 다공성 탄소 담체 및/또는 상기 담체의 공극에 담지 되는 효소 간에 상호작용 증진시키기 위하여 비공유 상호작용, 구체적으로는 소수성 상호작용 및 친수성 상호작용 중 어느 하나 이상을 유도하기 위한 제2작용기를 더 구비할 수 있다. 상기 제2작용기는 효소의 입체구조에 영향을 최소화하면서도 다공성 탄소 공극에서 누출을 방지하고, 안정적으로 효소활성을 발현되도록 기능할 수 있다. 상기 제2작용기는 소수성 상호작용이나, 친수성 상호작용을 유도할 수 있는 작용기의 경우 제한 없이 채용될 수 있는데, 일예로, 상기 제2작용기는 알킬기, 페닐기, 벤질기, 비닐기 및 할로기 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 소수성 상호작용을 유도하는 작용기 및 하이드록시기, 카보닐기, 할라이드기, 카복실기, 메톡시기, 하이드로퍼옥시기, 아민기, 이민기, 이미드기, 나이트릴기, 나이트로기, 싸이올기, 설피노기 및 인산기 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 친수성 상호작용을 유도하는 작용기 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0044] 효소에 도입되는 제2작용기를 통한 상호작용에 따른 담지량, 효소 안정화를 도 9a 내지 도 11b를 참고하여 설명하면, 아크릴로일 클로라이드를 사용하여 표면에 비닐기를 추가한 당산화효소 및 동일하게 표면에 비닐기를 추가한 아실레이즈는 효소에 제2작용기를 구비시키지 않고 다공성 탄소 담체와 복합체를 형성한 경우에 대비해 담지량이 현저히 향상된 것을 확인할 수 있다. 한편, 다공성 담체로 다공성 실리카를 사용하는 경우에는 효소에 상호작용을 할 수 있는 제2작용기를 구비시켰음에도 불구하고 효소의 담지량이 제2작용기 없는 효소를 다공성 탄소 담체에 담지시킨 경우 대비해 현저히 낮은 것을 확인할 수 있다.

[0045] 담지 후 효소의 누출량과 관련하여 도 10을 참고하여 설명하면, 1일이 경과된 이후부터는 다공성 탄소에 담지된 효소들이 거의 누출되지 않고 지속적으로 남아있는 것을 확인할 수 있었다.

[0046] 결국, 다공성 탄소 담체는 다른 재질의 다공성 물질과 대비했을 때 효소를 쉽게 공극 내부로 도입할 수 있고, 실리카 담체에 비해 더 높은 담지량을 제공할 수 있으며, 도입 후 지속적인 교반 반응에도 효소의 누출을 방지할 수 있어서 효소를 안정적으로 담지할 수 있는 이점이 있다. 나아가 이러한 다공성 탄소 담체를 활용해 다공성 탄소 담체 및/또는 효소에 비공유 상호작용을 유도할 수 있는 작용기를 추가로 도입할 경우 효소와 다공성 물질 간의 상호작용을 증진시킴으로써, 다공성 물질 내에 더 높은 담지량과, 더욱 상승된 효소 고정화, 안정화 효과를 발현할 수 있는 이점이 있다.

[0047] 또한, 상기 효소는 상술한 다공성 탄소 담체와의 상호작용을 향상시킬 목적으로 효소를 구성하는 아미노산이 추

가/제거 또는 변경을 목적으로 유전자 재조합 된 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0049] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 구체적으로 설명한다. 다만 본 실시예에 의하여 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0051] <실시예 1> - 포름산 탈수소효소가 고정화된 효소-다공성 탄소 복합체 제조 (FDH-Carbon)

[0052] 인산 완충액 (100 mM pH 7.0)에 준비한 포름산 탈수소효소 (formate dehydrogenase, FDH) 용액 (5 mg/mL)과 다공성 탄소 (mesoporous carbon) 파우더 2 mg을 2 mL 부피로 혼합한 후, 30분 200 rpm으로 교반하였다. 이 과정을 통해 포름산 탈수소효소는 다공성 탄소 내 공극에 담지된 효소-다공성 탄소 복합체를 제조하였다. 이후 다공성 탄소에 미담지된 포름산 탈수소효소를 제거하고 인산완충액으로 3번 세척 후 4℃에 보관하였다.

[0053] 이때, 상기 다공성 탄소는 공극 크기가 26㎚, 윈도우 크기가 17㎚, 공극부피가 1.53㎤/g인 것을 사용했다.

[0055] <비교예 1> - 포름산 탈수소효소가 고정화된 효소-다공성 실리카 복합체 제조 (FDH-Silica)

[0056] 인산 완충액 (100 mM pH 7.0)에 준비한 포름산 탈수소효소 용액 (5 mg/mL)과 다공성 실리카 (mesoporous silica) 파우더 2 mg을 2 mL 부피로 혼합한 후, 30분 200 rpm으로 교반하였다. 이 과정을 통해 포름산 탈수소효소는 다공성 실리카 내 공극에 담지 되게 된다. 다공성 실리카에 미담지된 포름산 탈수소효소를 제거하고 인산완충액으로 3번 세척 후 4℃에 보관하였다.

[0057] 이때, 상기 다공성 실리카는 공극 크기가 25㎚, 윈도우 크기가 18㎚, 공극부피가 1.90㎤/g인 것을 사용했다.

[0059] <실시예 2> - 당산화효소가 고정화된 효소-다공성 탄소 복합체 제조 (GOx-Carbon)

[0060] 실시예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 효소를 당산화효소 (glucose oxidase, GOx)로 변경하여 효소-다공성 탄소 복합체를 제조하였다.

[0062] <비교예 2> - 당산화효소가 고정화된 효소-다공성 실리카 복합체 제조 (GOx-Silica)

[0063] 비교예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 효소의 종류를 당산화효소로 변경하여 효소-다공성 실리카 복합체를 제조하였다.

[0065] <실시예 3> - 탄산무수화효소가 고정화된 효소-다공성 탄소 복합체 제조 (CA-Carbon)

[0066] 실시예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 인산 완충액(100 mM pH 7.6)에 탄산무수화효소 (bovine carbonic anhydrase, bCA)를 이용하여 효소-다공성 탄소 복합체를 제조하였다.

[0068] <비교예 3> - 탄산무수화효소가 고정화된 효소-다공성 실리카 복합체 제조 (GOx-Carbon)

[0069] 비교예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 인산 완충액 (100 mM pH 7.6)에 탄산무수화효소로 변경하여 효소-다공성 실리카 복합체를 제조하였다.

[0071] <실시예 4> - 아실레이즈가 고정화된 효소-다공성 탄소 복합체 제조 (AC-Carbon)

[0072] 실시예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 효소를 아실레이즈 (acylase, AC)로 변경하여 효소-다공성 탄소 복합체를 제조하였다.

[0074] <비교예 4> - 아실레이즈가 고정화된 효소-다공성 실리카 복합체 제조 (AC-Silica)

[0075] 비교예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 효소를 아실레이즈 (acylase, AC)로 변경하여 효소-다공성 실리카 복합체를 제조하였다.

[0077] <실시예 5> - 비닐기가 도입된 당산화효소를 고정화한 효소-다공성 탄소 복합체 제조 (fGOx-Carbon)

[0078] 실시예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 효소를 비닐기가 도입된 당산화효소로 변경하여 효소-다공성 탄소 복합체를 제조하였다. 이때, 당산화효소가 포함된 인산 완충용액에 아크릴로일 클로라이드(acryloyl chloride)를 처리하여 효소 표면에 비닐기를 도입하였다.

[0080] <비교예 5> - 비닐기가 도입된 당산화효소를 고정화한 효소-다공성 실리카 복합체 제조 (fGOx-Silica)

[0081] 실시예5와 동일하게 실시하여 제조하되, 담체를 다공성 실리카로 변경하여 효소-다공성 실리카 복합체를 제조하였다.

[0083] <실시예 6> - 비닐기가 도입된 당산화효소를 고정화한 효소-다공성 탄소 복합체 제조 (fAC-Carbon)

[0084] 실시예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 효소를 비닐기가 도입된 아실레이즈로 변경하여 효소-다공성 탄소 복합체를 제조하였다. 이때, 아실레이즈가 포함된 인산 완충용액에 아크릴로일 클로라이드(acryloyl chloride)를 처리하여 효소 표면에 비닐기를 도입하였다.

[0086] <비교예 6> - 비닐기가 도입된 당산화효소를 고정화한 효소-다공성 실리카 복합체 제조 (fAC-Silica)

[0087] 실시예6과 동일하게 실시하여 제조하되, 담체를 다공성 실리카로 변경하여 효소-다공성 실리카 복합체를 제조하였다.

[0089] <비교예 7> - 유리된 포름산 탈수소효소 (Free FDH)

[0090] 인산 완충액 (100 mM pH 7.0)에 포름산 탈수소효소 (formate dehydrogenase, FDH) 용액 (5 mg/mL)을 준비하였다.

[0092] <비교예 8> - 다공성 물질 내에 가교결합제(0.01% w/v)에 의해 가교결합된 포름산 탈수소효소가 담지된 복합체 제조 (FDH-GA_0.01)

[0093] 실시예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 효소 첨가 후 가교결합제로 글루타르다이알데히드를 첨가하여 가교결합된 당산화효소가 담지된 복합체를 제조하였다. 이때, 0.01% w/v의 농도로 글루타르다이알데히드를 첨가하였다.

[0095] <비교예 9> - 다공성 물질 내에 가교결합제(0.1% w/v)에 의해 가교결합된 포름산 탈수소효소가 담지된 복합체 제조 (FDH-GA_0.1)

[0096] 실시예1과 동일하게 실시하여 제조하되, 효소 첨가 후 가교결합제로 글루타르다이알데히드를 첨가하여 가교결합된 아실레이즈가 담지된 복합체를 제조하였다. 이때, 0.1% w/v의 농도로 글루타르다이알데히드를 첨가하였다.

[0098] <실험예 1> 당산화효소와 다공성 탄소를 이용한 효소-다공성 탄소 복합체의 효소 담지량 및 방출량 측정

[0099] 효소 담지량은 고정화를 위해 투입한 초기 효소의 양 및 세척 과정에서 방출되는 효소의 양들을 단백질 분석법을 통해 정량하고, 초기 효소의 양과 세척 과정에서 방출된 효소 양의 차이를 계산하여 결정하였다.

[0100] 효소 방출량은 인산 완충액상에 샘플을 분산시킨 후, 200 rpm 교반을 계속하면서 시간에 따라 방출된 효소의 양

을 단백질 분석법을 통해 지속적으로 정량하고, 이를 누적한 값인 효소 방출량을 계산하였다. 이때, 효소 담지 이후 3번의 세척과정까지 포함하여 시간에 따른 효소의 방출량을 계산하였으며, 그 결과를 도 6a, 도 7a, 도 9a, 도 10a 및 도 11a에 나타내었다 구체적으로는 당산화효소와 다공성 탄소를 이용한 효소-다공성 탄소 복합체인 실시예 2 및 당산화효소와 다공성 실리카를 이용한 효소-다공성 실리카 복합체인 비교예 2의 효소 방출량을 대비하였다. 도 7a를 통해 확인할 수 있듯이, 비교예 2은 4일 이내에 담지된 당산화효소가 모두 방출된 반면, 실시예 2는 12일 경과했을 때, 초기 담지량 대비 65% 이상의 당산화효소가 남아 있었다.

[0102] <실험예 2> 탄산무수화효소와 다공성 탄소를 이용한 효소-다공성 탄소 복합체의 효소 담지량 및 방출량 측정

[0103] 탄산무수화효소가 고정화 된 효소-다공성 탄소 복합체와 탄산무수화효소가 고정화 된 효소-다공성 실리카 복합체를 이용하여 실험예 1과 동일한 방식으로 진행하였고 그 결과를 도 6b 및 도 7b에 나타내었다. 도 7b를 통해 확인할 수 있듯이, 비교예 3은 1일 이내에 담지 된 탄산무수화효소가 모두 방출된 반면, 실시예 3는 10일 경과했을 때, 초기 담지량 대비 74% 이상의 탄산무수화효소가 남아 있었다.

[0105] <실험예 3> 아실레이즈와 다공성 탄소를 이용한 효소-다공성 탄소 복합체의 효소 담지량 및 방출량 측정

[0106] 아실레이즈가 고정화 된 효소-다공성 탄소 복합체와 아실레이즈가 흡착으로 고정화 된 효소-다공성 실리카 복합체를 이용하여 실험예 1과 동일한 방식으로 진행하였고, 그 결과를 도 6c, 도 7c, 도 9b, 도 10b 및 도 11b에 나타내었다. 도 7c를 통해 확인할 수 있듯이, 비교예 4은 2일 이내에 담지 된 아실레이즈가 모두 방출된 반면, 실시예 4는 10일 경과했을 때, 초기 담지량 대비 86% 이상의 아실레이즈가 남아 있었다.

[0108] <실험예 4> 포름산 탈수소효소-다공성 탄소 복합체의 효소 활성 및 안정성 평가

[0109] 포름산 탈수소효소-다공성 탄소 복합체의 초기 활성은 자외-가시선 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 보다 자세하게는, 혼합 용액 (200 mM 포름산 나트륨(sodium formate), 2 mM NAD+ 및 100 mM 인산나트륨 완충액)에 포름산 탈수소효소-다공성 탄소 복합체를 첨가하고, NADH의 양을 측정할 수 있는 340 nm에서 시간에 따른 흡광도를 측정하고, 활성을 계산하였다.

[0110] 포름산 탈수소효소-다공성 탄소 복합체의 효소 안정성은 시간에 따라 효소 활성을 지속적으로 측정하면서 평가하여 그 결과를 도 2, 도 4 및 도 8에 나타내었다. 이때, 효소-다공성 탄소 복합체가 포함된 용액은 상온에서 200 rpm의 교반 상태에서 보관되었다.

[0112] <실험예 5> 당산화효소-다공성 탄소 복합체의 효소 활성 및 안정성 평가

[0113] 당산화효소-다공성 탄소 복합체의 효소 활성은 자외-가시선 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 보다 자세하게는, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB), 포도당, 고추냉이과산화효소 (horseradish peroxidase)를 혼합한 혼합 용액에 당산화효소-다공성 탄소 복합체를 첨가하고, 655 nm에서 시간에 따른 흡광도를 측정하고, 활성을 계산하였다.

[0114] 당산화효소-다공성 탄소 복합체의 효소 안정성은 시간에 따라 효소 활성을 지속적으로 측정하면서 평가하였고, 그 결과를 도 3a 및 도 5a에 나타내었다. 이때, 효소-다공성 탄소 복합체가 포함된 용액은 상온에서 200 rpm의 교반 상태에서 보관되었다.

[0116] <실험예 6> 탄산무수화효소-다공성 탄소 복합체의 효소 활성 및 안정성 평가

[0117] 탄산무수화효소-다공성 탄소 복합체의 초기 활성은 자외-가시선 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 보다 자세하게는, 60 mM 4-나이트로페닐 아세테이트(4-nitrophenyl acetate, 4-NA)를 아세토니트릴(acetonitrile)에 용해한 혼합 용액에 탄산무수화효소-다공성 탄소 복합체를 첨가하고, 348 nm에서 시간에 따른 흡광도 변화를 측정하였다.

[0118] 탄산무수화효소-다공성 탄소 복합체의 효소 안정성은 시간에 따라 효소 활성을 지속적으로 측정하면서 평가하였

고, 그 결과를 도3b 및 도5b에 나타내었다. 이때, 효소-다공성 탄소 복합체가 포함된 용액은 상온에서 200 rpm의 교반 상태에서 보관되었다.

[0120] <실험예 7> 아실레이즈-다공성 탄소 복합체의 효소 활성 및 안정성 평가

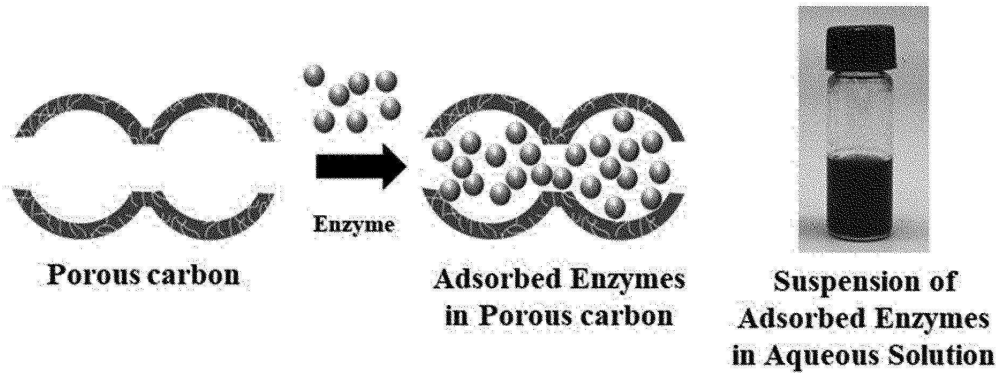
[0121] 아실레이즈-다공성 탄소 복합체의 효소 활성은 형광 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 보다 자세하게는, N-아세틸-L-메티오닌의 가수분해로 생성되는 L-메티오닌이 o-프탈알데히드(OPA)와 반응하여 나타나는 형광을 이용하여 변화량을 측정하였다.

[0122] 아실레이즈-다공성 탄소 복합체의 효소 안정성은 시간에 따라 효소 활성을 지속적으로 측정하면서 평가하였고, 그 결과를 도 3c, 도 5c에 나타내었다. 이때, 효소-다공성 탄소 복합체가 포함된 용액은 상온에서 200 rpm의 교반 상태에서 보관되었다.

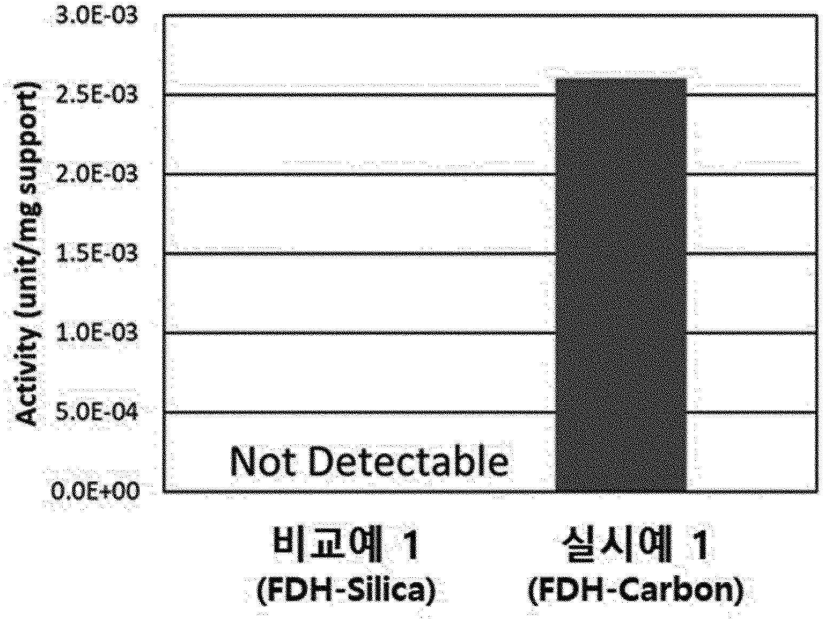
[0124] 이상에서 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 본 발명의 사상은 본 명세서에 제시되는 실시 예에 제한되지 아니하며, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서, 구성요소의 부가, 변경, 삭제, 추가 등에 의해서 다른 실시 예를 용이하게 제안할 수 있을 것이나, 이 또한 본 발명의 사상범위 내에 든다고 할 것이다.

## 도면

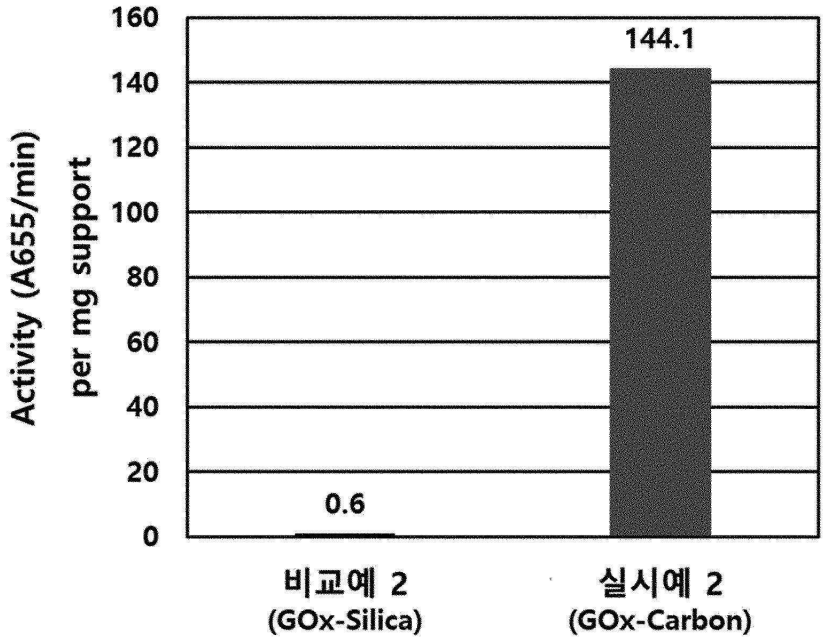
### 도면1



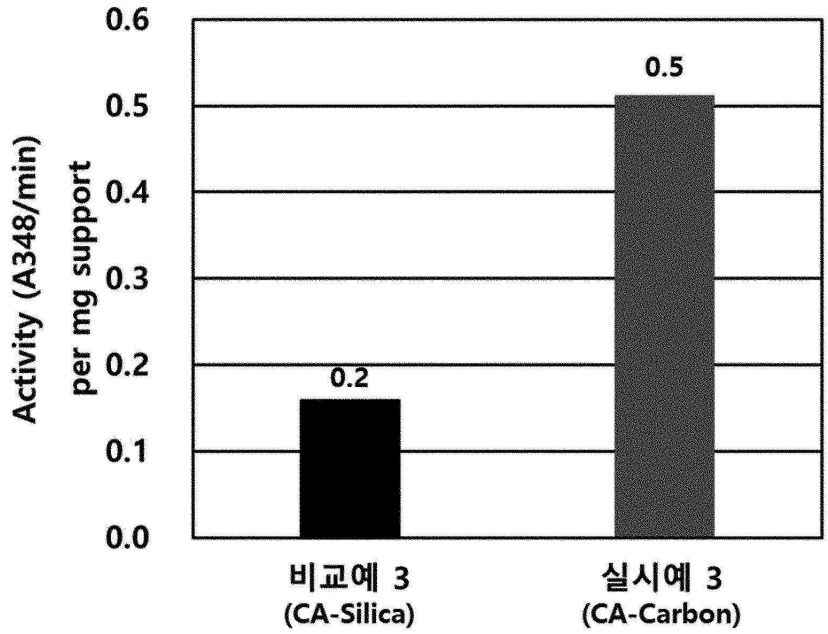
도면2


3.0E-03
2.5E-03
2.0E-03
1.5E-03
1.0E-03
5.0E-04
0.0E+00
Activity (unit/mg support)
Not Detectable
비교예 1
(FDH-Silica)
실시예 1
(FDH-Carbon)

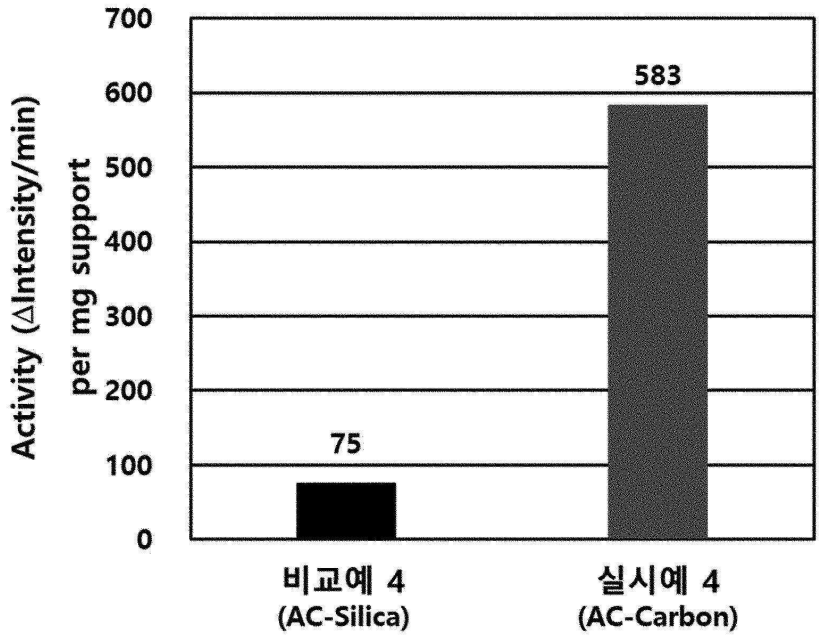
도면3a


160
140
120
100
80
60
40
20
0
Activity (A655/min)
per mg support
144.1
0.6
비교예 2
(GOx-Silica)
실시예 2
(GOx-Carbon)

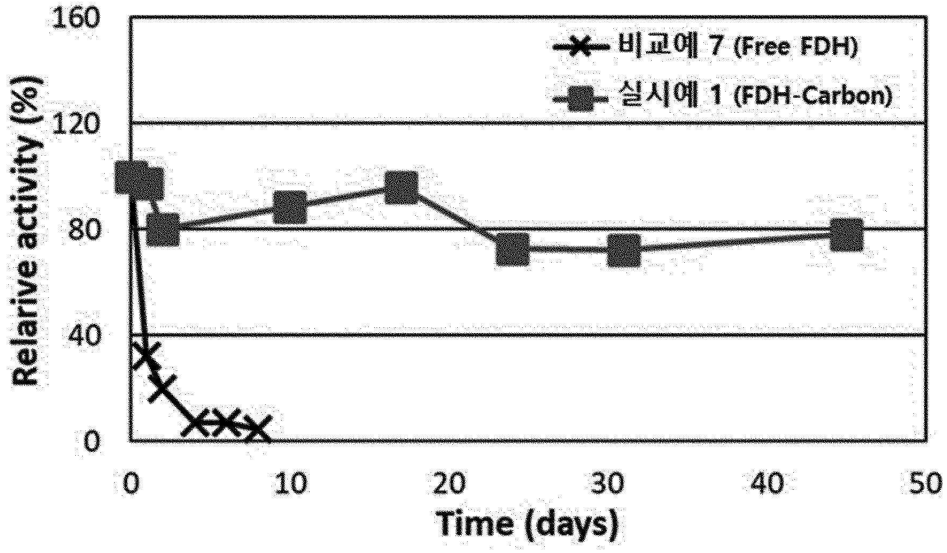
도면3b


0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Activity (A348/min)
per mg support
0.2
0.5
비교예 3
(CA-Silica)
실시예 3
(CA-Carbon)

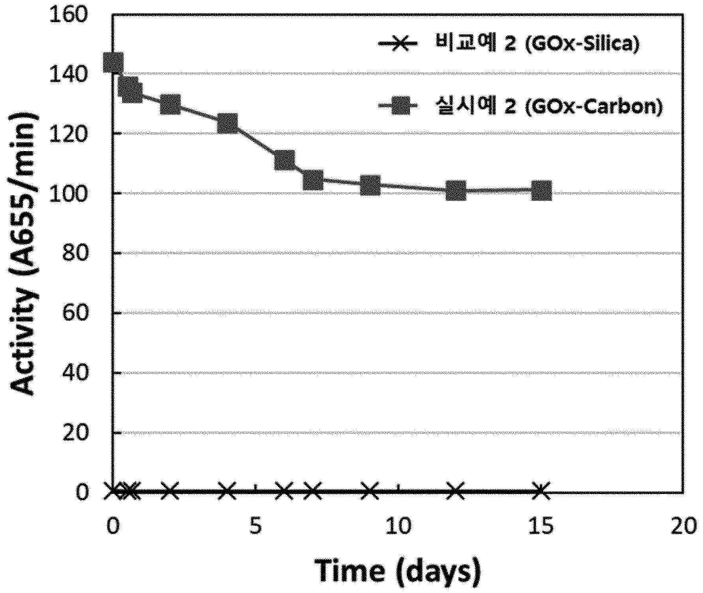
도면3c


700
600
500
400
300
200
100
0
Activity (ΔIntensity/min)
per mg support
75
583
비교예 4
(AC-Silica)
실시예 4
(AC-Carbon)

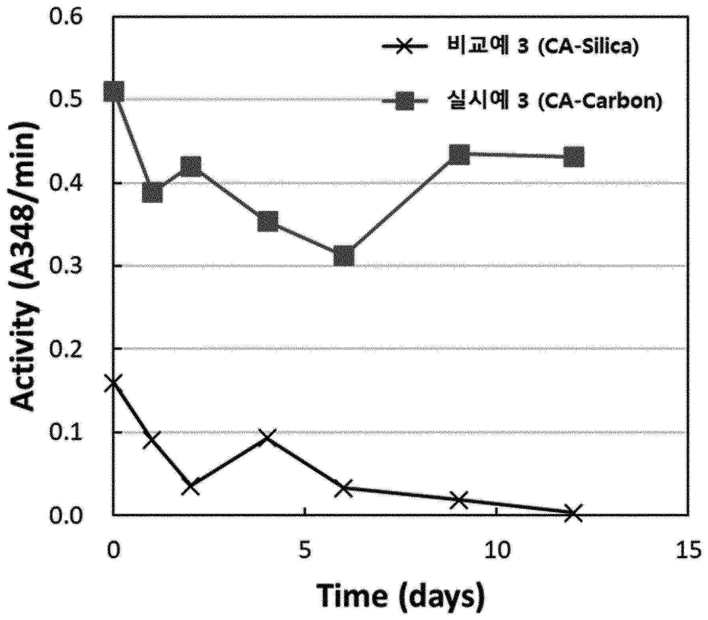
도면4


160
120
80
40
0
Relarive activity (%)
0
10
20
30
40
50
Time (days)
비교예 7 (Free FDH)
실시예 1 (FDH-Carbon)

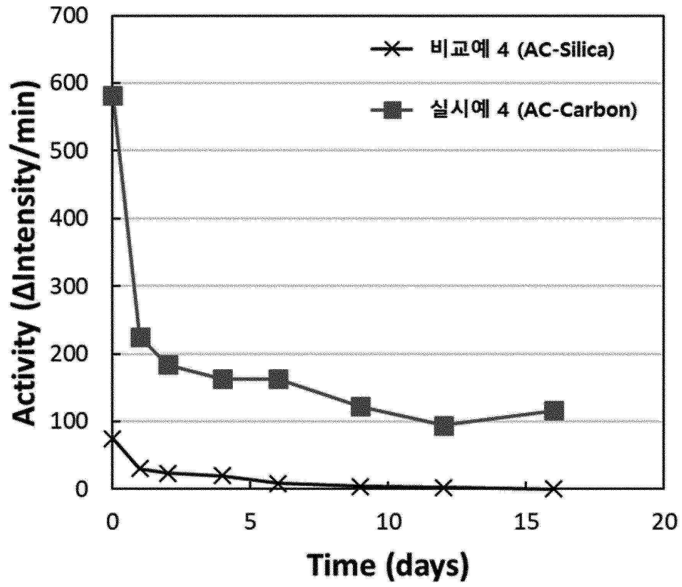
도면5a


160
140
120
100
80
60
40
20
0
Activity (A655/min)
0
5
10
15
20
Time (days)
비교예 2 (GOx-Silica)
실시예 2 (GOx-Carbon)

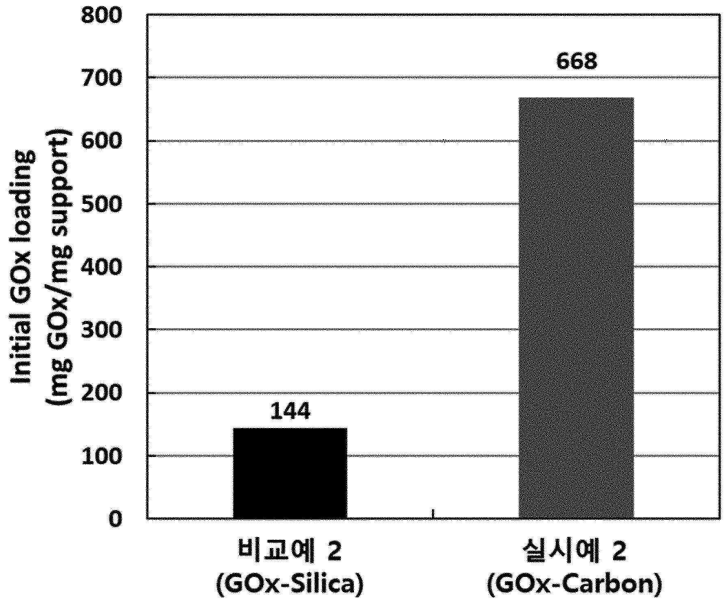
도면5b


비교예 3 (CA-Silica)
실시예 3 (CA-Carbon)
Activity (A348/min)
Time (days)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0
5
10
15

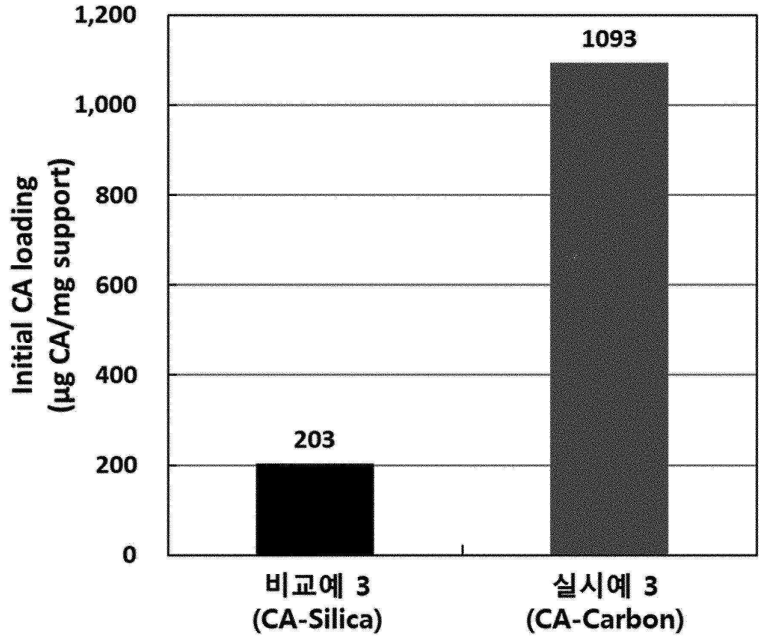
도면5c


비교예 4 (AC-Silica)
실시예 4 (AC-Carbon)
Activity (ΔIntensity/min)
Time (days)
0
100
200
300
400
500
600
700
0
5
10
15
20

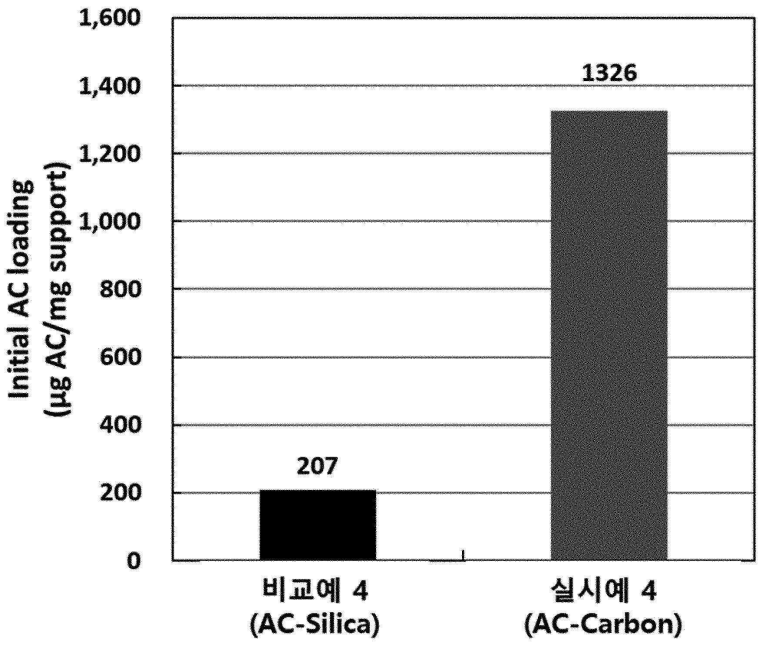
도면6a


800
700
600
500
400
300
200
100
0
Initial GOx loading
(mg GOx/mg support)
668
144
비교예 2
(GOx-Silica)
실시예 2
(GOx-Carbon)

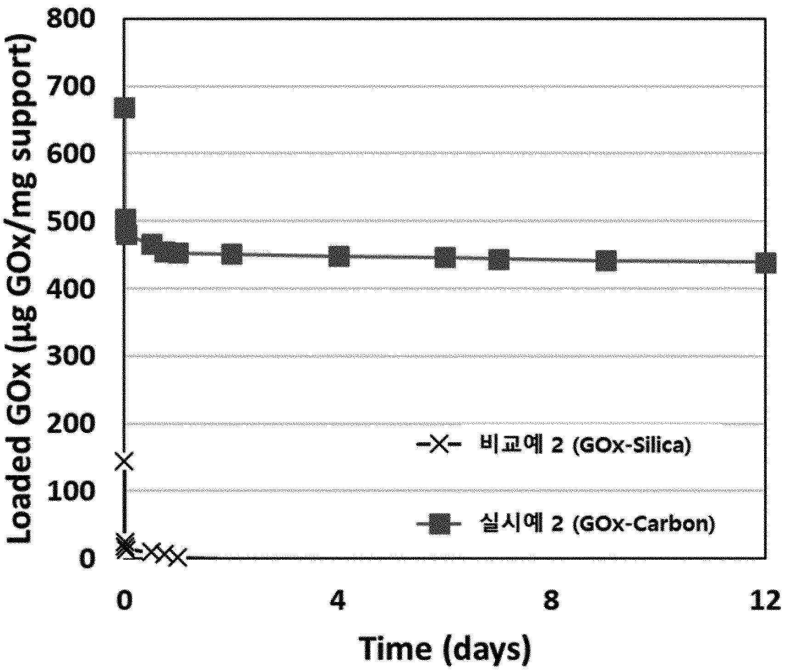
도면6b


1,200
1,000
800
600
400
200
0
Initial CA loading
(μg CA/mg support)
1093
203
비교예 3
(CA-Silica)
실시예 3
(CA-Carbon)

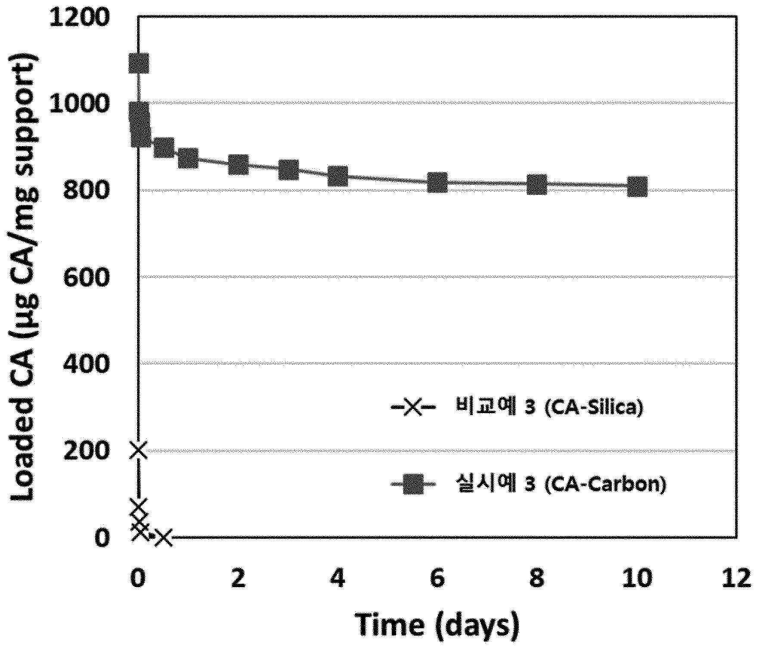
도면6c


1,600
1,400
1,200
1,000
800
600
400
200
0
Initial AC loading
(μg AC/mg support)
1326
207
비교예 4
(AC-Silica)
실시예 4
(AC-Carbon)

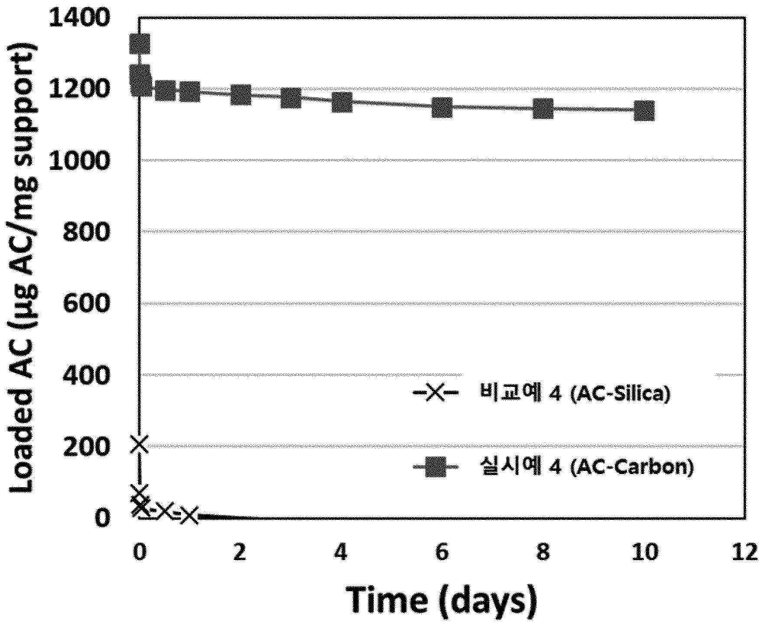
도면7a


800
700
600
500
400
300
200
100
0
Loaded GOx (μg GOx/mg support)
비교예 2 (GOx-Silica)
실시예 2 (GOx-Carbon)
0
4
8
12
Time (days)

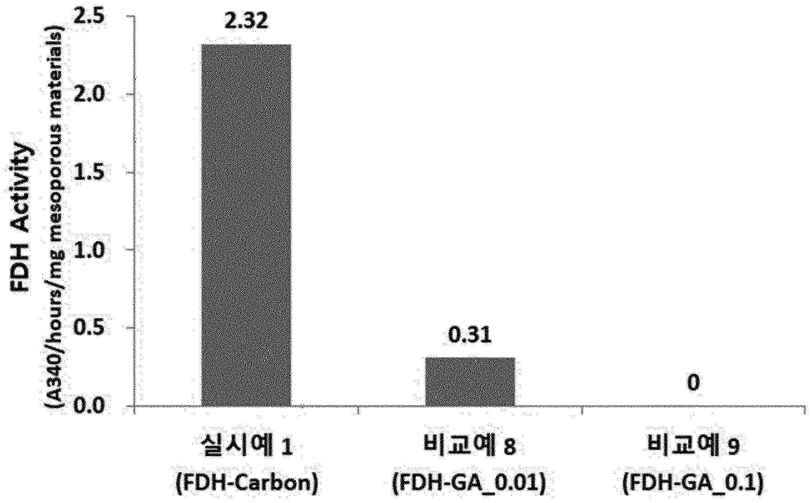
도면7b


Loaded CA (μg CA/mg support)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
12
Time (days)
비교예 3 (CA-Silica)
실시예 3 (CA-Carbon)

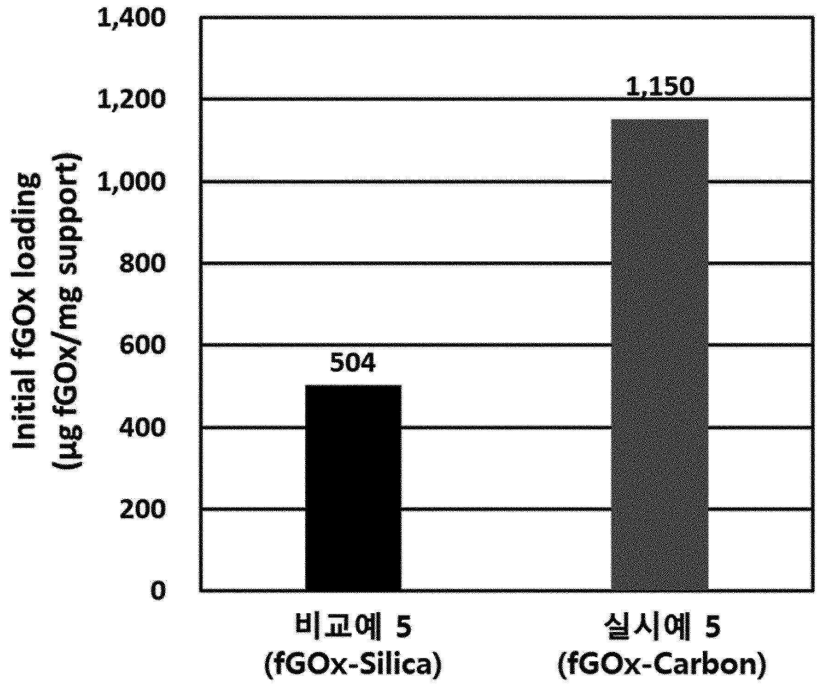
도면7c


Loaded AC (μg AC/mg support)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
12
Time (days)
비교예 4 (AC-Silica)
실시예 4 (AC-Carbon)

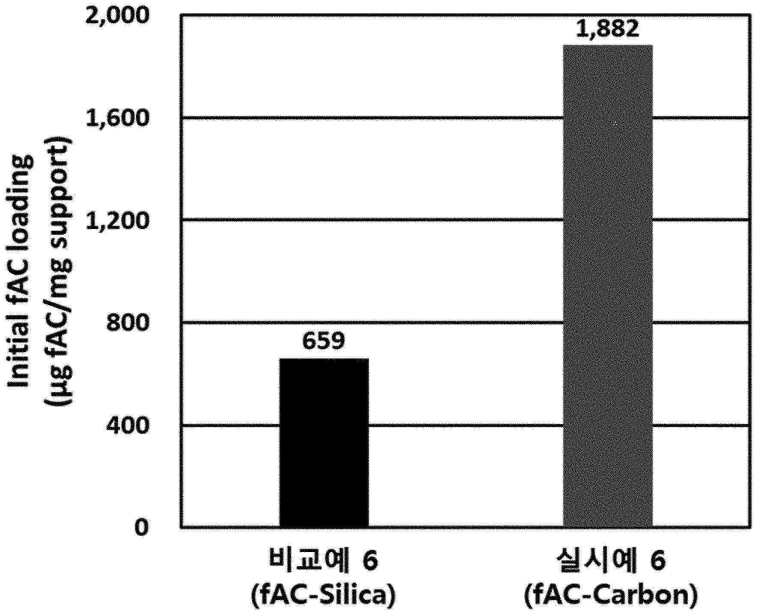
도면8


FDH Activity
(A340/hours/mg mesoporous materials)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
2.32
0.31
0
실시예 1
(FDH-Carbon)
비교예 8
(FDH-GA_0.01)
비교예 9
(FDH-GA_0.1)

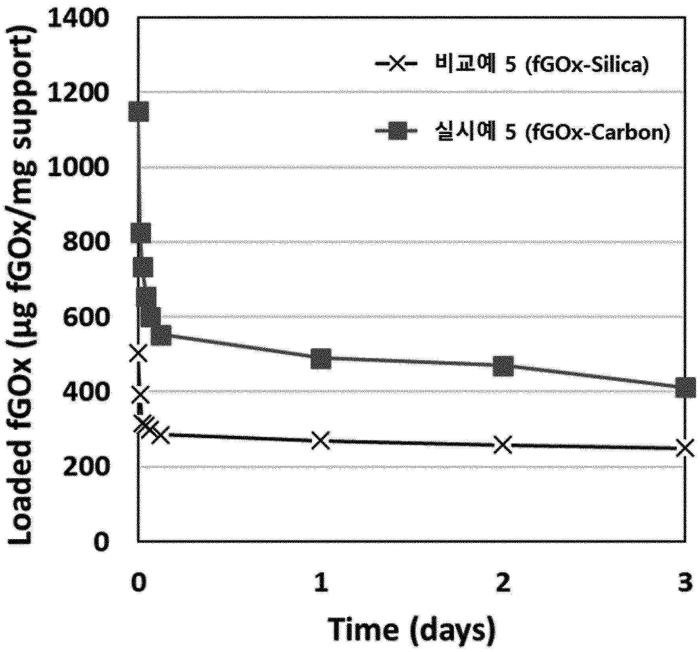
도면9a


Initial fGOx loading
(μg fGOx/mg support)
1,400
1,200
1,000
800
600
400
200
0
504
1,150
비교예 5
(fGOx-Silica)
실시예 5
(fGOx-Carbon)

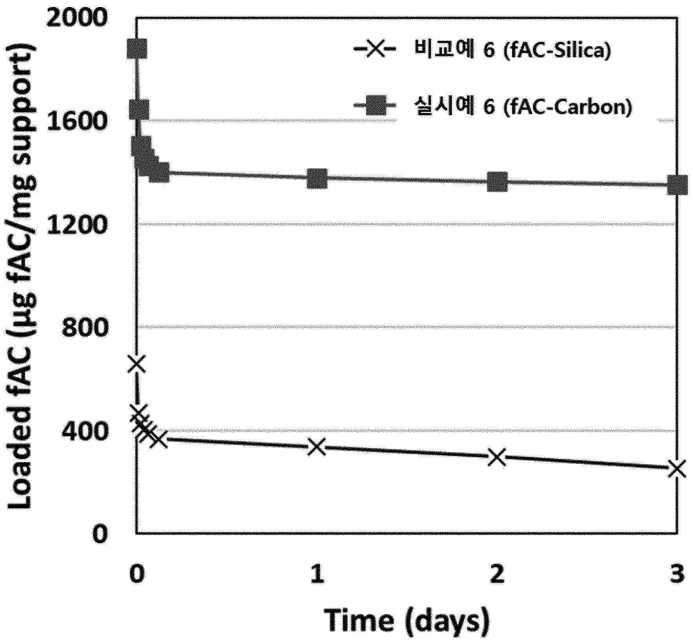
도면9b


2,000
1,600
1,200
800
400
0
Initial fAC loading
(μg fAC/mg support)
659
1,882
비교예 6
(fAC-Silica)
실시예 6
(fAC-Carbon)

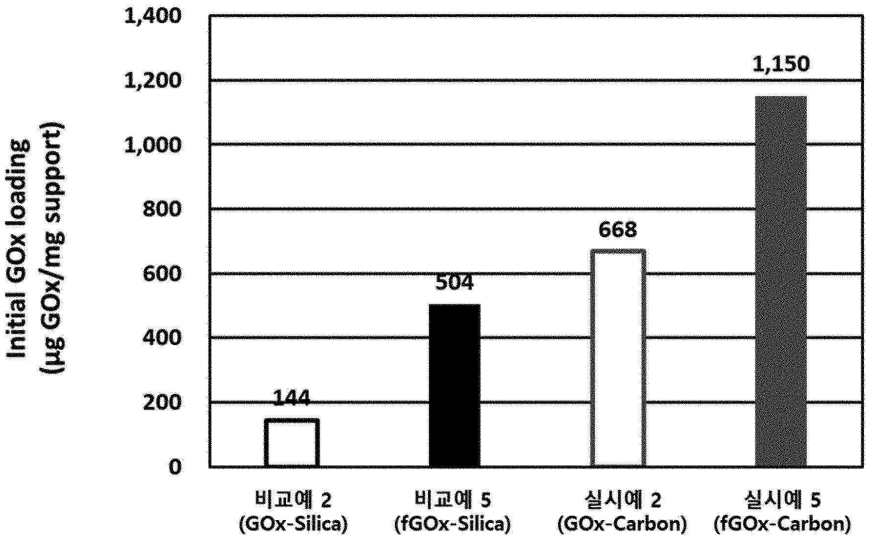
도면10a


1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Loaded fGOx (μg fGOx/mg support)
비교예 5 (fGOx-Silica)
실시예 5 (fGOx-Carbon)
0
1
2
3
Time (days)

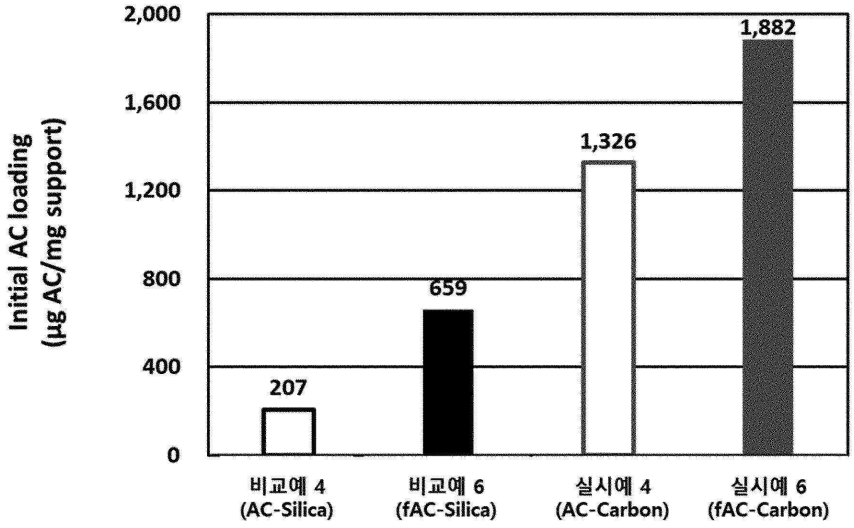
도면10b


2000
1600
1200
800
400
0
Loaded fAC (µg fAC/mg support)
비교예 6 (fAC-Silica)
실시예 6 (fAC-Carbon)
0
1
2
3
Time (days)

도면11a


1,400
1,200
1,000
800
600
400
200
0
Initial GOx loading (µg GOx/mg support)
144
504
668
1,150
비교예 2 (GOx-Silica)
비교예 5 (fGOx-Silica)
실시예 2 (GOx-Carbon)
실시예 5 (fGOx-Carbon)

도면11b


Initial AC loading
(μg AC/mg support)
2,000
1,600
1,200
800
400
0
207
659
1,326
1,882
비교예 4
(AC-Silica)
비교예 6
(fAC-Silica)
실시예 4
(AC-Carbon)
실시예 6
(fAC-Carbon)