



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0024374
(43) 공개일자 2019년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 11/14 (2006.01) C01B 32/158 (2017.01)
C01B 33/18 (2006.01) C12N 9/18 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/551 (2006.01)
G01N 33/92 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 11/14 (2013.01)
C01B 32/158 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2017-0111319

(22) 출원일자 2017년08월31일
심사청구일자 2017년08월31일

(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

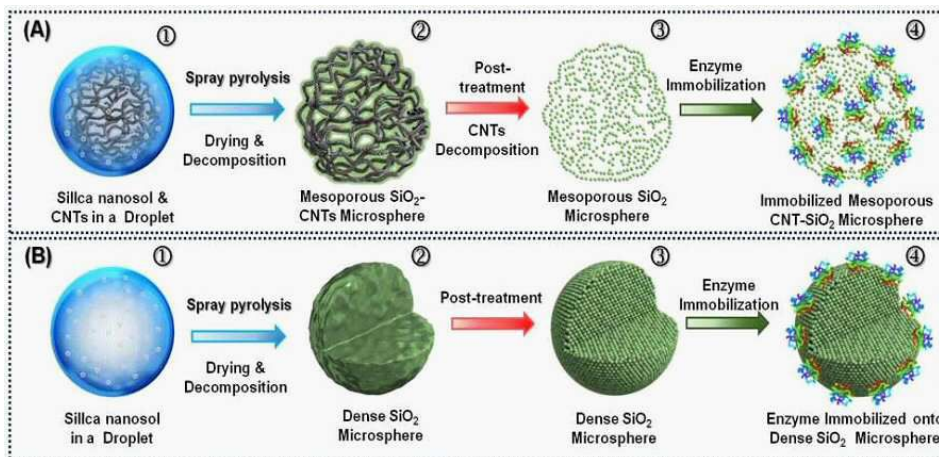
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자를 포함하는 효소 고정화용 지지체 및 이를 이용한 바이오센서

(57) 요약

본 발명은 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자를 포함하는 효소 고정화용 지지체 및 이를 이용한 바이오센서에 관한 것이다. 본 발명에 따른 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자는 효소에 대하여 높은 고정화 효과를 나타내며, 효소가 고정화된 다공성 CNT-SiO₂ 나노복합체는 바이오센서로서 표적 생체 물질을 검출하는 효과가 우수하므로, 식품 또는 의약품 관련 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C01B 33/18 (2013.01)
C12N 9/18 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
G01N 33/551 (2013.01)
G01N 33/92 (2013.01)
C01B 2202/32 (2013.01)
C01P 2004/64 (2013.01)

(72) 발명자

에속쿠마르

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

박기대

서울특별시 광진구 능동로 120, 803호(화양동, 건국대학교 신공학관)

이정임

서울특별시 광진구 능동로16길 38-5, B101호(화양동)

자히드앤워

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20153030091450
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	한국에너지기술평가원
연구사업명	에너지기술개발사업
연구과제명	바이오연료 생산을 위한 전처리-당화-발효 통합생물공정기술
기 여 율	1/1
주관기관	건국대학교 산학협력단
연구기간	2016.10.01 ~ 2017.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

다공성 CNT-SiO₂ 나노입자를 포함하는 효소 고정화용 지지체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자는 표면에 5 내지 50 nm의 기공을 하나 이상 포함하는 것을 특징으로 하는, 효소 고정화용 지지체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 다공성 CNT-SiO₂는 분무 열분해에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는, 효소 고정화용 지지체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 효소는 리파아제(lipase), HRP(horseredish peroxidase) 및 포도당 산화 효소(GOx)로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 효소 고정화용 지지체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 효소는 리파아제인 것을 특징으로 하는, 효소 고정화용 지지체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 효소는 가교결합(cross-linking)을 통해 고정화된 것을 특징으로 하는, 효소 고정화용 지지체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 가교결합은 글루타르알데히드에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 효소 고정화용 지지체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 지지체를 포함하는 효소 고정화용 조성물.

청구항 9

효소가 고정화된 다공성 CNT-SiO₂ 나노복합체를 포함하는 바이오센서.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 효소는 리파아제(lipase), HRP(horseredish peroxidase) 및 포도당 산화 효소(GOx)로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 바이오센서.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 효소는 리파아제인 것을 특징으로 하는, 바이오센서.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 바이오센서는 중성지방 또는 콜레스테롤을 검출하는 것을 특징으로 하는, 바이오센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자를 포함하는 효소 고정화용 지지체 및 이를 이용한 바이오센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 효소는 생체 촉매로서 기존의 화학 촉매에 비해서 환경친화적이고 기질특이성이 뛰어나다는 장점을 지니고 있으나, 주변 환경 조건에 매우 민감하게 활성이 변하고, 재활용이 어려우며, 만들어진 생성물과의 분리가 어렵다는 점이 상업적으로 이용하는데 있어서 한계로 작용한다. 이러한 단점을 극복하고자 제안된 하나의 방법이 효소를 고정화하는 방법이다.

[0003] 고정화된 효소는 반복 사용이 가능하고, 생성물과 효소의 분리가 용이하지만, 고정화되지 않은 효소에 비해 활성이 떨어지는 단점이 있다. 그러나 고정화된 효소는 무엇보다도 편리하게 다룰 수 있다는 점에서 다양한 상업적 적용이 가능하다.

[0004] 일반적인 효소 고정화 방법은 물리적 흡착방법 또는 화학적 방법이다. 물리적 흡착방법은 주로 이온 교환(ion-exchange) 방법을 이용하는데, 이온 교환 방법은 비독성이라는 장점이 있으나 그 결합력이 약하다는 문제점이 있다. 또한 화학적 방법은 화학 반응에 의해 공유결합을 형성시켜 효소를 고정시키기 위하여 화학시약을 사용하는 것으로, 상기 방법은 가교 결합력이 강하기는 하지만 효소의 고정화를 위해 사용하는 시약의 독성때문에 식품 또는 의약 관련 산업에는 사용하기가 힘들다는 단점이 있다. 유기 혹은 무기담체에 효소를 결합시켜서 효소를 고정화하여 재사용과 연속처리 공정을 수행하는 효소고정화는 잘 알려져 있다. 유기물(예, 셀룰로스, 나일론, 폴리아크릴아미드)이 담체로서 불리한 이유는 기계적 안정성이 좋지 않으며, 용매에 의한 부식, pH와 이온 강도에 따르는 변화와 미생물에 의한 침해로 인하여 효소와의 결합이 파괴될 수 있기 때문이다. 따라서 효소가 흡착 혹은 공유적으로 흡착하는 무기물 담체가 제안되었는데, 결합 형태는 효소의 사용조건과 형태 및 기질의 특성에 따른다. 즉, 기질이 강한 염농도이면, 흡착된 효소의 불착이 일어나기 때문에 흡착법은 적용될 수 없으며, 효소의 공유결합이 우선한다. 담체의 표면은 효소의 결합을 유도하는 특이한 기능기를 포괄하여야 한다. 대부분 담체는 기능기를 포괄할 수 없기 때문에, 표면의 전처리가 필요하다. 공유결합에 의한 고정화는 담체의 표면과 효소를 결합제 혹은 교각으로 공유결합시키는 방법으로 담체를 표면처리하거나 효소에 작용기를 도입하여야 하며, 지지된 효소의 활성도가 차폐되지 않도록 하여야 한다.

[0005] 한편, 탄소나노튜브(CNT)는 지구상에 다량으로 존재하는 탄소로 이루어진 탄소 동소체로서 하나의 탄소가 다른 탄소원자와 육각형 벌집 무늬로 결합되어 튜브형태를 이루고 있는 물질이며, 튜브의 직경이 나노미터(nm=10억분의 1미터) 수준으로 극히 작은 영역의 물질이다. CNT는 우수한 기계적 특성, 전기적 선택성, 뛰어난 전계방출 특성, 고효율의 수소저장매체 특성 등을 지니며 현존하는 물질 중 결합이 거의 없는 완벽한 신소재로 알려져 있다. 이에 CNT는 각종 장치의 전자방출원(electron emitter), VFD(vacuum fluorescent display), 백색광원, FED(field emission display), 리튬이온 2차 전지전극, 수소저장 연료전지, 나노 와이어, 나노 캡슐, 나노 핀셋, AFM/STM 팁(tip), 단전자 소자, 가스센서, 의공학용 미세부품, 고기능 복합체 등에서 무한한 응용 가능성을 보여주고 있다. CNT는 이처럼 역학적 견고성과 화학적 안정성이 뛰어나고, 반도체와 도체의 성질을 모두 띌 수 있으며, 직경이 작고 길이가 상대적으로 매우 긴 특성 때문에, 평판표시소자, 트랜지스터, 에너지 저장체 등의 소재로서 뛰어난 성질을 보이고, 나노크기의 각종 전자소자로서의 응용성이 매우 크다.

[0006] 상기 표현한 특성들을 보다 다양하게 응용하기 위해 단일벽 CNT들을 잘게 자르고, 화학적 작용기를 이용하여 다양한 물질들을 화학적으로 붙이기 시작하여 CNT의 성질을 개질하기도 하고, 더 나아가 화학적 기작에 의해 CNT의 작용기를 -SH 기로 치환한 후, 금 표면에 미세접촉 인쇄(micro contact printing) 기법을 이용하여 표면에 패턴화하거나 정전기 적 방법(electrostatic method)을 이용하여 CNT를 표면에 다중막으로 고착시킨 바 있다. 그러나 전자는 CNT의 표면 밀도가 낮고 결합력이 약하다는 단점이 있으며, 후자는 선택적으로 표면에 고정하는 패턴링 방법을 적용할 수 없다는 치명적인 단점을 가지고 있다. 따라서 새로운 형태의 표면 고정법 개발이 절실히 요구되고 있으며, 최근, CNT의 전기적, 반도체 성질 또는 구조적으로 안정한 특성을 이용하여, 바이오물질을 고정한 CNT의 전기화화적인 변화를 통한 반응검출에 대한 연구가 이루어지고 있다

[0007] 본 발명자들은 효소 고정화를 위한 지지체로서 탄소나노튜브를 연구하던 중, 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자가 효소,

특히 리파아제를 고정화시키기에 적합하며, 이를 바이오센서로서 이용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자를 포함하는 효소 고정화용 지지체를 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 상기 나노입자를 이용한 바이오센서를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자를 포함하는 효소 고정화용 지지체를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 효소가 고정화된 다공성 CNT-SiO₂ 나노복합체를 포함하는 바이오센서를 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자는 효소에 대하여 높은 고정화 효과를 나타내며, 효소가 고정화된 다공성 CNT-SiO₂ 나노복합체는 바이오센서로서 표적 생체 물질을 검출하는 효과가 우수하므로, 식품 또는 의약품 관련 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 SiO₂ 및 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자의 합성 및 효소의 고정화를 개략적으로 나타낸 도이다.

도 2는 (A)는 열분해 전 SiO₂ 나노입자, (B)는 분무 열분해 후, CNT-SiO₂ 나노입자가 CNT를 분해하여 중간 공극을 생성한 것 및 (C) 효소의 고정 후 공극이 단백질에 의해 채워진 것을 나타내는 CNT-SiO₂의 SEM 이미지이고, (D)는 SiO₂ 나노입자, (F) 고정 전 다공성 CNT-SiO₂ 입자, (G) 고정 후 다공성 CNT-SiO₂ 입자 및 (H) 다공성 CNT-SiO₂ 입자의 공극을 나타내는 TEM 이미지이다. 또한, (I) 내지 (J)는 효소 분자에 의해 채워진 CNT-SiO₂ 입자의 기공을 나타내며, (K) 내지 (O)는 각각 효소의 고정 후 CNT-SiO₂ 입자의 (K) 에너지-분산, (L) 탄소, (M) 산소, (N) 실리콘 및 (O) 질소 함량을 나타내는, X-선 분광법을 통한 분광학 이미지이다.

도 3은 SiO₂ 및 CNT-SiO₂ 나노입자의 총 표면적 및 기공 크기를 결정하기 위한 BET 분석 결과로서, (A) SiO₂ 및 CNT-SiO₂ 나노입자의 BET 표면적, (B) 효소 고정화 후 BET 표면적, (C) 효소 고정화 전 CNT-SiO₂ 기공 크기 및 (D) 효소 고정화 후 CNT-SiO₂ 기공 크기를 나타낸 도이다.

도 4는 (A) 자유 리파아제, CNT-SiO₂ 나노입자 및 리파아제가 고정화된 나노입자의 FTIR 스펙트럼, (B) 자유 효소 및 효소가 고정화된 CNT-SiO₂ 나노입자의 CD 스펙트럼 및 (C-D) SiO₂와 CNT-SiO₂의 접촉각을 정착 물 방울법으로 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 (A) 자유 SiO₂ 및 효소가 고정화된 CNT-SiO₂의 활성에 미치는 온도에 영향 및 (B) 자유 SiO₂ 및 효소가 고정화된 CNT-SiO₂의 활성에 미치는 pH의 영향을 나타낸 도이다.

도 6은 (A-C) 각각 50, 60, 및 70 °C에서 자유 효소 및 효소가 고정화된 CNT-SiO₂의 상대적 활성 및 (D) 12회의 반복되는 주기에서 SiO₂ 및 효소가 고정화된 CNT-SiO₂의 재사용성을 나타낸 도이다.

도 7은 바이오센서를 이용한 트리글리세라이드의 전류 측정 결과를 나타낸 것으로, (A) 상이한 스캔 속도에서 트리부티린(50 mgdL⁻¹)에 대한 SiO₂/GCE/리파아제 생체 전극의 전류 피크 밀도, (B) 상이한 스캔 속도에서 생성되는 전류를 보여주는 생체 전극의 선형 삽입 그래프, (C) 상이한 pH에서 SiO₂/GCE/리파아제 바이오센서의 총

전류 피크 밀도, (D) 상이한 pH에서 생성된 전류의 선형 삽입 그래프, (E) 다양한 농도의 기질에 대한 SiO₂/GCE/리파아제 바이오센서의 전류 피크 밀도 및 (F) 상이한 농도의 기질에서 생성된 전류의 선형 삽입 그래프를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자를 포함하는 효소 고정화용 지지체를 제공한다.
- [0015] 이하 본 발명에 관하여 상세히 설명한다.
- [0016] 본 발명의 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자는 표면에 5 내지 50 nm의 크기를 갖는 비교적 균일한 기공을 포함하며, 바람직하게는 상기 기공은 10 내지 12 nm의 크기를 가질 수 있다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자는 분무 열분해에 의해 제조되는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 상기 효소는 바람직하게는 리파아제(lipase), HRP(horseredish peroxidase) 또는 포도당 산화 효소(GOx)일 수 있고, 더욱 바람직하게는 리파아제일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 상기 효소는 바람직하게는 가교결합(cross-linking)을 통해 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자에 고정화될 수 있다.
- [0020] 상기 가교결합은 바람직하게는 글루타르알데히드, 3-아미노프로필트리에톡시실란(APTES), 카르보디이미드, 시아노 및 폴리에틸렌이민(PEI)에 의해 수행될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 글루타르알데히드에 의해 수행될 수 있다.
- [0021] 상기 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자는 다공성 지지체로서, 우수한 흡착성과 다양한 종류의 단백질에 대한 흡착력을 가진다.
- [0022] 본 발명에 따른 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자는 효소를 고정화시키는 효과가 우수므로, 효소 고정화용 지지체 및 이를 포함하는 효소 고정화용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 효소가 고정화된 다공성 CNT-SiO₂ 나노복합체를 포함하는 바이오센서를 제공한다.
- [0025] 상기 효소는 바람직하게는 리파아제(lipase), HRP(horseredish peroxidase) 또는 포도당 산화 효소(GOx)일 수 있고, 더욱 바람직하게는 리파아제일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 상기 바이오센서는 바람직하게는 중성지방 또는 콜레스테롤을 검출할 수 있으나, 이에 한정하지 아니한다.
- [0027] 본 발명의 바이오센서는 높은 안정성 및 높은 고정화 효율을 나타내므로, 효율적인 바이오센서로서 작용할 수 있다.
- [0029] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 실험예 및 제제예를 제시한다. 그러나 하기 실시예, 실험예 및 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0031] **준비예 1. 재료 및 시약**
- [0032] *Thermomyces lanuginosus* (단백질 21.6 mg/mL)의 리파아제는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. SiO₂ 나노입자 및 다중벽 CNT는 Nanostructured and Amorphous Materials, Inc. (Houston, TX, USA)로부터 구입하였다. Bradford 시약 및 단백질 분석 키트는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)로부터 구입하였다. 이소프로판올, *p*-니트로페놀, *p*-니트로페닐팔미테이트, 트리부티린, 및 아라비아 고무는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. *n*-에탄올, *n*-프로판올, *n*-메탄올, *n*-부탄올, 톨루엔, *n*-펜탄, *n*-헥산, 아세트산, 클로로포름, 벤젠, DMSO, 및 아세톤을 포함하는 유기용매는 Daejung Chemicals and Metals Co. Ltd. (Seoul, South Korea)으로부터

터 구입하였다. 모든 시약, 화학물질, 및 얻은 분석 등급이었으며, 수령한 그대로 사용하였다.

[0034] 실시예 1. 원-포트 분무 열분해 에 의한 CNT-SiO₂ 제조

[0035] 원-포트 분무 열분해 공정을 이용하여 CNT-SiO₂ 나노입자를 제조하였다. 먼저, 테트라에틸 오르토실리케이트 (TEOS, 95 % 순도, 0.603 g, 삼천)와 질산(3 ml, 삼천)을 500ml의 증류수에 용해시켜 실리카 콜로이드 용액을 제조한 후, TEOS의 가수분해 및 축합반응을 수행하여 콜로이드성 실리카 용액을 제조하였다. 산 처리된 CNT (1 mgmL⁻¹)를 ddH₂O 및 C₂H₅OH 용액으로 5회 세척하고 상기 콜로이드성 실리카 용액에 재분산시켜 분무 열분해에 의해 CNT-SiO₂ 복합 분말을 제조하였다. 분무 열분해에 의한 CNT-SiO₂ 분말의 형성 과정을 도 1에 개략적으로 나타내었다.

[0036] 도 1에 나타난 바와 같이, 초미세 실리카 나노졸과 잘 분산 된 CNT를 포함하는 액적 (도 1-①)을 초음파 분무기로 형성한 후, 액적을 건조시켜 실리카 나노졸과 CNT의 다공성 분말 (도 1-②)을 제조하였다. 그 후 공기 대기 하의 600 °C의 온도에서 분무 열분해(도 1-③)에 의해 CNT-SiO₂ 나노입자를 다공성 SiO₂ 분말로 전환시켰으며, 이를 도 1의 (A)에 나타내었다.

[0037] 반면, 대조군으로서 CNT가 없는 SiO₂ 나노입자를 실리카의 콜로이드 제제로부터 분무 열분해에 의해 합성하였다. 먼저 실리카 나노 졸로부터 원-포트 분무 열분해 공정으로 SiO₂ 나노입자를 합성하고, 무 탄소 SiO₂ 분말을 얻기 위해 분무 열분해 생성물을 공기 중에서 600 °C의 온도에서 10 시간 동안 후처리하였으며, 이를 도 1의 (B)에 나타내었다.

[0039] 실시예 2. 효소가 고정화된 CNT-SiO₂ 나노구조의 제조

[0040] 상기 실시예 1에서 제조된 나노입자(20 mg)를 증류수로 3 회 세척한 후, 공유 결합 고정을 위해 0.5M 글루타르알데히드 (pH 7.4) 작용기를 3시간 동안 반응시켜 부착하였다. 인산염 완충 용액(1mgmL⁻¹) 내 리파아제, HRP 및 GO의 단백질 용액을 각각 10mg의 상기 작용기가 부착된 입자로 처리하고 4 °C에서 24-48 시간 동안 연속적으로 흔들며 배양하였다. 각 효소에 대한 고정화 수율은 6 시간 간격으로 판단하였다. 그 후 고정화 효소를 원심 분리하고, 분리된 고정 효소를 인산 완충액으로 3회 세척하여 공유결합되지 않은 효소 분자를 제거하였다. 효소 침출은 세척 용액을 평가하여 계산하였다. 단백질 농도는 소혈청 알부민을 표준으로 사용하여 Bradford 염료 (Sigma)로 계산되었다. 고정화 수율 및 고정화 효율은 하기 식을 이용하여 계산하였다.

[0041] $IY (\%) = \frac{\text{고정화 효소의 총량}}{\text{첨가된 효소의 총량}} \times 100$

[0042] $IE (\%) = \frac{\text{고정화 효소의 총 활성}}{\text{자유 효소의 총 활성}} \times 100$

[0043] 효소는 다공성 입자의 표면 및 구멍 내부에 고정화되었다. 리파아제, HRP 및 GOx의 CNT-SiO₂ 나노입자에 대한 최대 단백질 로딩은 각각 SiO₂ 입자 위에 122.4, 86.4 및 78.1 mg/g이었던 것에 비해 288.2, 173.8 및 135.6 mg/g이었다. 전반적으로, CNT-SiO₂ 입자는 노출된 SiO₂ 나노입자와 비교하여 리파아제, GOx 및 HRP에 대해 각각 236.2, 173.8 및 202.9 % 더 높은 단백질 로딩을 나타내었다. 다공성 CNT-SiO₂ 나노입자는 4 °C에서 24 시간 동안 배양한 후 288.2 mg/g의 최대 단백질 로딩을 나타내었고 리파아제의 고정화 효율은 209.5 %였다. 리파아제가 세 가지 혈장 중 가장 좋은 결과를 보였기 때문에, 리파아제는 추후 실험을 위한 효소로 선정되었다.

[0045] 실시예 3. 표면 특성 및 분석

[0046] 상기 실시예 1 및 2에서 후처리 전후에 얻은 SiO₂ 및 CNT-SiO₂ 나노입자의 형태를 확인하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0047] 구체적으로, (A)는 열분해 전 SiO₂ 나노입자, (B)는 분무 열분해 후, CNT-SiO₂ 나노입자가 CNT를 분해하여 중간 공극을 생성한 것 및 (C) 효소의 고정 후 공극이 단백질에 의해 채워진 것을 나타내는 CNT-SiO₂의 SEM 이미지가

고, (D)는 SiO₂ 나노입자, (E) 고정 전 다공성 CNT-SiO₂ 입자, (F) 고정 후 다공성 CNT-SiO₂ 입자 및 (H) 다공성 CNT-SiO₂ 입자의 공극을 나타내는 TEM 이미지이다. 또한, (I) 내지 (J)는 효소 분자에 의해 채워진 CNT-SiO₂ 입자의 기공을 나타내며, 이는 투과 전자 현미경 사진에서 어두운 영역으로 나타난다. (K) 내지 (O)는 각각 효소의 고정 후 CNT-SiO₂ 입자의 (K) 에너지-분산, (L) 탄소, (M) 산소, (N) 실리콘 및 (O) 질소 함량을 나타내는, X-선 분광법을 통한 분광학 이미지를 나타내었다.

[0048] 도 2에 나타난 바와 같이, SEM 분석 결과, 높은 중형비를 갖는 CNT의 건조 때문에 분말이 약간 변형된 구형을 가짐을 보였다. 후처리인 CNT 연소에 의한 고밀도화 때문에 분말의 평균 크기를 감소시킴을 확인하였다. TEM 분석 결과, 초미세 SiO₂ 나노입자는 다공성 SiO₂ 분말을 생성하였으며(화살표로 표시), 다공성 CNT 골격이 관찰됨에 따라 크기가 30 nm 이상인 중간 기공이 형성됨을 확인하였습니다. 고정화되기 전, 기공은 쉽게 관찰되고 부피가 더 크지만, 고정 후 기공 크기는 감소하고 TEM 분석에 의해 검출하기가 어려웠다.

[0050] 실시예 4. 나노입자의 총 표면적 및 기공 크기 확인

[0051] 상기 실시예 1 및 2에서 제조된 SiO₂ 및 CNT-SiO₂ 나노입자의 총 표면적 및 기공 크기를 확인하기 위하여 TriStar 3000을 사용하여 BET(Brunauer-Emmett-Teller) 분석을 수행하였으며 그 결과를 도 3 및 하기 표 1에 나타내었다. 구체적으로, 도 3에서 (A) SiO₂ 및 CNT-SiO₂ 나노입자의 BET 표면적, (B) 효소 고정화 후 BET 표면적, (C) 효소 고정화 전 CNT-SiO₂ 기공 크기 및 (D) 효소 고정화 후 CNT-SiO₂ 기공 크기를 나타내었다.

표 1

나노입자	BET 표면적 (m ² /g)	기공 부피 (cm ³ /g)	기공 폭 (nm)	단백질 로딩(mg/g)		
				리파아제	HRP	GOx
다공성 CNT-SiO ₂	494.4	1.38	11.95	NA	NA	NA
고정화 후 다공성 CNT-SiO ₂	170.9	0.39	8.6	288	173.8	135.6
SiO ₂ 입자	19.1	0.012	4.1	122.4	86.4	78.1

[0054] 도 3 및 표 1에 나타난 바와 같이, CNT-SiO₂ 나노입자는 BET 표면적이 494.4 m²/g이고, 기공 부피가 1.38 cm³/g이고, 기공 폭이 11.95 nm이었다. 고정화 후, 다공성 CNT-SiO₂ 입자의 BET 표면적은 494.4에서 170.9 m²/g으로 감소하였고, 전체 기공 부피는 1.38에서 0.39 cm³/g로 감소하였다.

[0056] 실시예 5. FTIR 분석 및 공초점 현미경에 의한 효소 이미징

[0057] 자유 리파아제, SiO₂-결합 리파아제, 및 다공성 SiO₂ 나노입자의 FTIR 분석을 수행하여 매트릭스상의 단백질기의 존재를 확인하였다. 실험은 샘플링 모듈 (ZnSe/diamond) 및 단일반사 검출기를 장착한 ATR-FTIR 분광계 (Nicolet 6700, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 650-4000 nm의 파장 범위에서 측정하였다. ATR-FTIR 스펙트럼은 4-8 개의 스펙트럼 해상도로 32 회의 공동 스캔에서 얻어졌다. 대조군으로서 배경 스펙트럼은 각 샘플 측정에 대해 동일한 획득 매개 변수를 사용하여 획득하였으며, 그 결과를 도 4(A)에 나타내었다.

[0058] 도 4(A)에 나타난 바와 같이, CNT-SiO₂ 나노입자의 FTIR 스펙트럼은 816 및 1085 cm⁻¹의 특성 밴드를 나타내었으며, 이는 Si-O 결합의 절단면, 밴딩 및 신축에 해당한다. 1058cm⁻¹의 주요 밴드는 화학량론적 이산화규소 구조를 나타낸다. 1632 cm⁻¹에서의 밴드는 단백질의 아미드 그룹에서 C=O 신축 진동에 해당한다. 리파아제(1632 cm⁻¹)와 리파아제가 고정화된 CNT-SiO₂(1652 cm⁻¹)의 스펙트럼에서의 피크는 아미드기의 C=O의 신축 진동에 기인한

다. 이 밴드들은 아마이드 그룹에 해당하고 고정화 지지체에 존재하는 효소의 존재를 확인할 수 있다.

[0059] 리파아제의 아마이드 그룹의 N-H 결합에서의 굴곡 진동과 스트레칭은 자유 및 고정 리파아제에 대해 3427 cm^{-1} 로 나타났다. 폴리아미드 사슬의 N-H 결합 피크의 변화는 단백질에 존재하는 총 수소 결합과 설파이드 브릿지에 달려있다. 2900 과 3400 cm^{-1} 의 피크는 OH기에 해당하며 O-H 결합의 대칭 인장 진동을 나타낸다.

[0061] 실시예 6. 원형 이색 분광법 및 접촉각 측정

[0062] 자유 효소 및 CNT-SiO₂ 고정화 효소의 이차 구조는 원 편광 이색 성 (CDK) 분광법으로 평가하였다. 두 효소 제체(1.15 mg/mL^{-1})를 JASCO J-810의 CD 기기를 사용하여 UV 190-260 nm의 범위에서 CD 스펙트럼을 획득하여 분석하였다. 상기 분석은 Tris 완충액 (50 mM, pH 9.0) 내 25 °C에서 수행하였다. 효소없는 트리스 완충액을 대조군으로 사용하였고, 모든 스캔을 분석을 위해 평균 스펙트럼을 사용하여 3 회 반복하였으며, 그 결과를 도 4(B)에 나타내었다.

[0063] CD 분광법에 의해 결정된 자유 및 고정화 리파아제의 2차 구조 성분은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

단백질 시료	자유 효소	고정화된 효소
α -helix (%)	36.1	23.4
Antiparallel sheets (%)	18.4	22.5
Parallel sheets (%)	10.3	13.5
β -turns (%)	18.6	19.4
Random coils (%)	37.6	43.2

[0066] 표 2에 나타난 바와 같이, 자유 효소에 비해, 효소가 고정화된 CNT-SiO₂에서 α -나선의 양이 13 % 감소하고, β -시트 및 랜덤 코일은 약간 증가하였다.

[0067] 이러한 2차 구조 분해를 CD Pro 소프트웨어 패키지(CONTIN)로 분석하였다. 고정화된 리파아제는 220 nm에서의 평균 잔사 타원을 반사로서 원래의 α -나선 함량의 약 80 %를 유지하였다.

[0068] 자유 효소 및 고정화된 효소의 종래의 CD 분석은 자유 효소에 비해 α -나선 구조가 63 % 및 62 % 유지되었으나, 본 발명의 리파아제를 CNT-SiO₂ 나노입자에 고정화하는 것은 자유효소와 유사한 α -나선 함량을 가지며 이차 구조를 유지한다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 효소 고정화 후에 β -시트와 랜덤 코일이 증가하여 고온에서의 안정성이 향상되었음을 의미한다.

[0069] 또한, SiO₂ 및 CNT-SiO₂ 나노입자의 증가된 소수성을 확인하기 위하여, 박막을 제작하고 나노입자의 물방울과 박막의 접촉각을 분석하였다. 먼저, 나노입자의 현탁액을 여과한 후 Nefion 용액과 혼합하여 NP 박막을 제조하였다. 나노입자의 박막이 결합된 테플론 막을 12 시간 동결 건조시킨 다음 유리 슬라이드 위에 놓았다. 고정화된 부피의 물 방울 ($3\text{ }\mu\text{L}$)을 시료 표면에 첨가하고, 물 및 인터넷 필름 사이에 형성된 접촉각 분석기를 사용하여 측정하였다. 모든 측정은 삼중으로 실시하였고 물 입자가 나노입자 필름과 접촉한 직후에 각도를 측정하였으며, 그 결과를 도 4(C) 및 4(D)에 나타내었다.

[0070] 도 4(C) 및 4(D)에 나타난 바와 같이, 다공성 CNT-SiO₂ 입자의 접촉각은 SiO₂ 분말과 비교하여 19° 증가함을 확인하였다. 증가된 소수성은 소수성 아미노산 잔기와의 상호 작용을 허용함으로써 효소 분자의 형태를 변화시킨다. 본 발명에서 CNT-SiO₂ 입자의 증가된 소수성은 고정화된 효소의 활성을 증가시켰다.

[0072] 실시예 7. 고정화된 리파아제 활성화에 대한 온도 및 pH의 영향 확인

[0073] 자유 리파아제 및 고정화된 리파아제의 활성화에 미치는 온도 및 pH의 영향을 확인하기 위하여, 표준 분석 조건

하의 30-75 °C에서 가수 분해 활성을 확인하였다.

[0074] 먼저, 온도가 미치는 영향을 확인하기 위하여, 고정 및 자유 리파아제를 다양한 온도 (50, 60 및 70 °C)에서 배양하여 측정하였다.

[0075] 또한, pH가 미치는 영향을 확인하기 위하여, 고정 및 자유 리파아제를 pH 5-11인 완충액에서 4 °C에서 1 시간 동안 배양하여 측정하였다.

[0076] 자유 리파아제의 활성은 트리스 완충액 (50 mM), pH 9.0에서 30 분 간격으로 측정하였다. 유사하게, CNT-SiO₂에 고정화된 리파아제의 활성은 각 온도에서 30분 마다 계산되었다. 다양한 pH 값을 갖는 완충액, 인산 완충액(pH 5.0-8.0) 및 Tris-HCl 완충액 (pH 8.0-11.0)을 통해 최적의 pH를 결정하였다. 고정 및 자유 리파아제를 pH 7.5, 8.5 및 9.5에서 최적의 조건 하에 배양함으로써 pH 안정성을 판단하고, 잔류 활성을 1시간 마다 측정하였다. 배양하지 않은 고정화된 자유 리파아제의 상대 활성을 각각의 실험에 대한 대조군으로서 100%로 간주하였다.

[0077] 상기 실험의 결과를 각각 도 5(A) 및 5(B)에 나타내었다.

[0078] 도 5(A)에 나타낸 바와 같이, 55 °C에서 자유 리파아제의 최적 활성이 관찰되었고, SiO₂와 CNT-SiO₂에 고정화된 리파아제 모두 60 °C에서 최대 활성을 나타내었다. 고정화된 리파아제가 자유 리파아제보다 고온에서보다 안정한 것을 확인하였다.

[0079] 도 5(B)에 나타낸 바와 같이, 최적화된 온도에서 CNT-SiO₂에 고정화된 리파아제, SiO₂에 고정화된 리파아제 및 자유 리파아제에 대한 pH 최적 값은 각각 9.0, 8.5 및 8.5이었다. pH 9.0에서 고정화된 리파아제 및 자유 리파아제의 최적 활성이 관찰되었다. 알칼리 pH에서 고정화된 리파아제의 우수한 내성은 나노 기공(11.94 nm)을 갖는 다공성 CNT-SiO₂ 입자가 리파아제의 활성을 유지시키는데 적합하고 공유 결합이 체세포를 불활성화로부터 보호한다는 것을 의미한다.

[0080] CNT-SiO₂에 고정화된 효소는 자유 효소와 비교하여 넓은 pH 범위에서 높은 활성과 안정성을 나타낸다.

[0082] 실시예 8. 고정화된 리파아제의 운동 분석

[0083] 자유 및 고정화된 리파아제에 대한 운동 분석을 통해 미생물의 촉매 특성에 미치는 고정화 효과를 측정하였다. K_m , V_{max} 및 K_{cat} 을 포함하는 운동 파라미터는 기질 농도 변화 및 반응 속도 관찰을 통해 계산하였으며, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다. V_{max} 및 K_m 은 Michaelis-Menten 방정식을 사용하여 Lineweaver Burk plot으로부터 결정되었다.

표 3

[0084]

효소	V_{max}	A_m	K_{cat}	K_{cat}/A_m (mM ⁻¹ S)
자유 리파아제	98.9	0.73	51.7	70.8
CNT-SiO ₂ 에 고정화된 리파아제	381	0.48	201	419.3

[0086] 표 3에 나타낸 바와 같이, 자유 및 CNT-SiO₂에 고정화된 리파아제는 각각 98.9 및 381 U/mg의 V_{max} 값을 나타내었다. 자유 및 고정화된 리파아제의 K_m 값은 각각 0.73 및 0.48 mM이었다. K_m 값이 낮을수록 CNT-SiO₂에 고정화된 리파아제의 기질 친화성이 증가함을 알 수 있다. 자유 및 고정화된 리파아제의 K_{cat} 값은 각각 51.7 및 201 s⁻¹이었다. 전체적으로 고정화된 리파아제의 촉매 효율은 5.9 배 증가한 것을 확인하였다. 소수성 다공성 CNT-SiO₂ 입자에 대한 고정화는 리파아제의 활성을 증가시켰다. 접촉각 분석에 따르면, 다공성 나노 구조체의 소수성은 SiO₂ 입자의 소수성보다 높았으며, 이는 고정화된 표면의 V_{max} 를 3.8 배 증가시켰다. 이는 소수성 환경에서 본 발명의 리파아제의 고정화가 종래 사용된 고정화 지지체보다 더 효과적임을 의미한다. CNT-SiO₂는 기공 내부

에 강한 소수성 미세 구획을 가지고 있어 기질 친화도가 증가할 수 있다.

[0088] **실시예 9. 고정화된 리파아제의 재사용성 확인**

[0089] 리파아제는 SiO_2 및 CNT- SiO_2 입자에 결합하였고, 60 °C에서 가수 분해를 12회 반복하여 사용하였다. 각 주기 후에, 고정화된 생체 촉매를 12,000 rpm에서 5 분 동안 원심 분리하고 트리스-HCl 완충액으로 세척하여 생성물의 불순물을 제거하였다. 회수된 고정화된 생체 촉매를 12 회 반복하여 사용하였고 각 주기 후에 리파아제의 가수 분해 활성을 기록하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0090] 도 6에 나타낸 바와 같이, CNT- SiO_2 에 고정화된 리파아제는 12 주기의 가수분해 후에 원래의 활성의 95.4 %를 유지하였고, SiO_2 에 고정화된 리파아제는 원래 활성의 74.2 %를 나타냈다. 따라서, CNT- SiO_2 에 고정화된 리파아제 제제는 상당히 안정하였고, 여러번 반복적으로 재사용 될 수 있음을 확인하였다.

[0092] **실시예 10. 트리아실글리세롤 검출용 리파아제/CNT- SiO_2 /GCE 바이오센서의 제조**

[0093] 총 5 μL 의 고정화된 리파아제 현탁액을 5 μL 의 과황산 PTFE 5 % 공중합체와 혼합하였다. 유리탄소전극(GCE)을 HNO_3 로 세척하고 초순수 및 에탄올(100 %)로 세척하였다. 생체 촉매와 공중합체의 혼합물을 GCE 전극 위에 올려 놓았다. 리파아제/CNT- SiO_2 /GCE를 진공 건조기에서 60분 동안 배양한 후 트리부티린(tributyrin) 2 mL를 아라비아 고무(50 gL^{-1})가 들어있는 38 mL의 PBS와 혼합한 다음 4 °C에서 Fischer Scientific Model 100 분리기를 사용하여 30분간 초음파 처리하였다. 작용 전극인 GCE에 고정화된 리파아제와 포화 칼로멜 전극을 각각 카운터 전극 및 기준 전극으로 사용하였다.

[0094] 상기 제조된 바이오센서를 이용하여 트리글리세라이드 전류 측정을 시행하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0095] 이때, 생체 전극의 전류 피크 밀도는 하기 식을 통해 계산하였다.

$$I_p = \frac{nFQv}{4RT} = \frac{n2F2vAI^*}{4RT}$$

[0096]

[0097] 상기 식을 사용하여 계산된 GCE 생체 전극의 농도는 $1.24 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ 이고, 여기서 I_p 는 양극 피크 전류, A 는 직경 또는 표면적 (0.071 cm^2), n 은 전자의 수 T , R , F 는 각각 절대 온도, 기체 상수, 패러데이 상수이다. 산화 환원 전류 피크 밀도와 전기 화학적 반응은 cyclic voltammograms Bio-Logic SAS (SP-150, Seyssinet-Pariset, France)를 사용하여 3-전극 셀에서 측정되었다. 각 시료는 10 주기 동안 실행되었고 전류 피크 밀도는 순환 전압 전류 그래프의 형태로 나타내었다.

[0098] 도 7에 나타낸 바와 같이, 트리부티린의 경우 선형반응이 다양한 농도에서 관찰되었다.

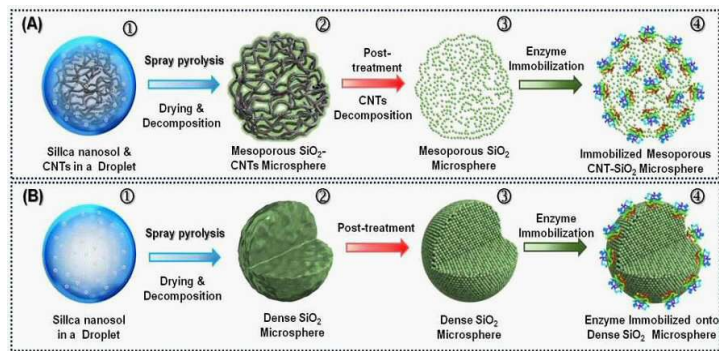
[0099] 도 7(A) 및 7(B)에 나타낸 바와 같이, 산화 환원 전류 피크 밀도가 스캔 속도에 달려 있음을 알 수 있다. 저감 감재력은 50에서 300 mgdL^{-1} 범위의 모든 트리부티린 농도에 대해 선형 반응을 보였다. 이러한 특성은 바이오 전극에서의 전자 이동이 표면 제한적 공정이라는 것을 의미한다.

[0100] 또한, 도 7(C) 및 7(D)에 나타낸 바와 같이, 리파아제/CNT- SiO_2 /GCE 생체 전극은 3 전극 셀에서 5.0에서 10.0까지 다른 pH 값을 가진 완충액에 저장되었을 때, pH가 5.0에서 9.0으로 증가함에 따라 생체 전극의 전류 응답도 증가하는 것을 확인하였다. 최대 전류 피크 밀도는 pH 9.0에서 관찰되었다. 9.0 이후에는 현재의 반응이 다시 감소했다. 이것은 리파아제/CNT- SiO_2 /GCE 바이오 센서가 pH에 민감함을 의미한다.

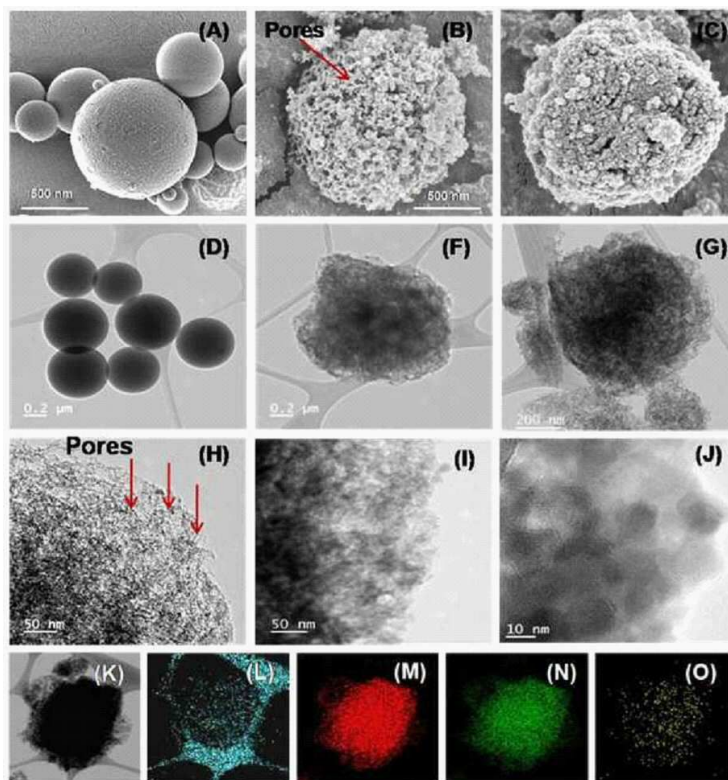
[0101] 또한, 도 7(E) 및 7(F)에 나타낸 바와 같이, 전류 피크 밀도와 트리부티린 농도 사이의 선형 관계를 확인하였다. 따라서, 리파아제가 고정화된 CNT- SiO_2 는 산업 응용 분야에서 매우 민감하고 내구성 있는 바이오 센서로서 매우 적합함을 알 수 있다.

도면

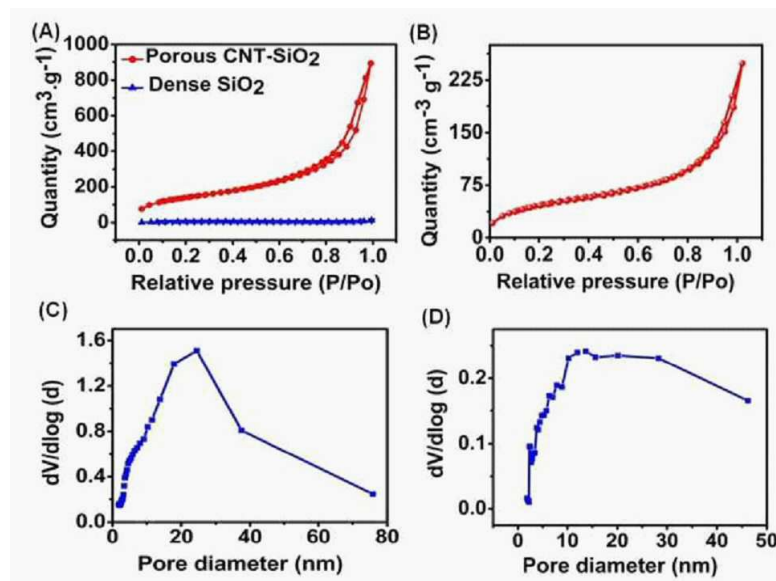
도면1



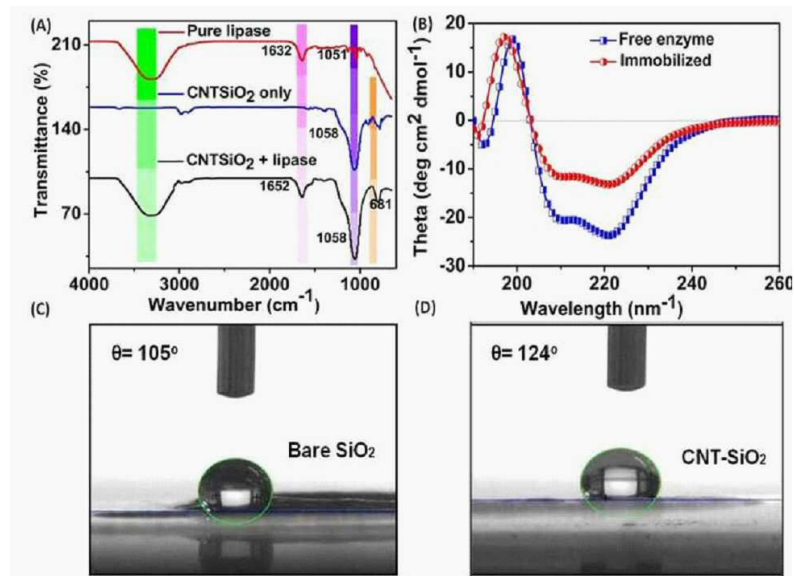
도면2



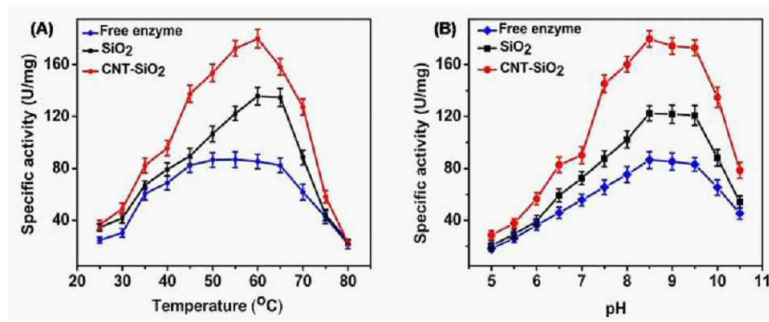
도면3



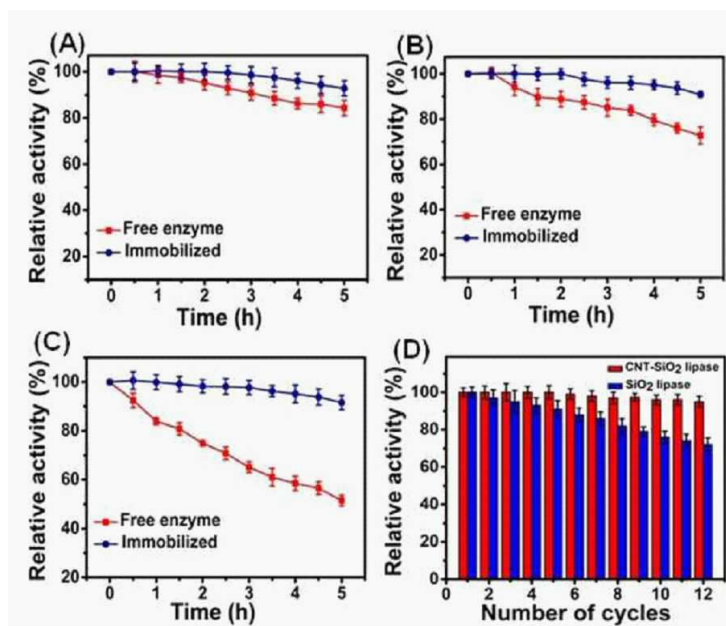
도면4



도면5



도면6



도면7

