(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0064909
(43) 공개일자 2013년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
H01F 1/37 (2006.01) *C12N 11/14* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0131527
(22) 출원일자 2011년12월09일
심사청구일자 2011년12월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
구만복
서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동)
황이택
서울특별시 성북구 안암동3가 대광아파트 7동 757호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

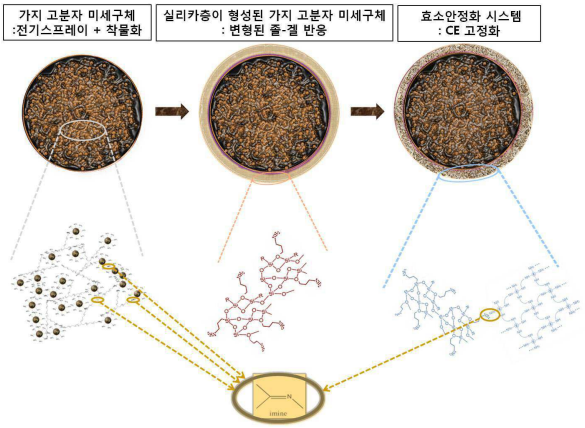
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **실리카층이 형성된 가지 고분자 미세구체**

(57) 요 약

본 발명은 실리카층이 형성된 가지 고분자 미세구체에 관한 것으로, 자석에 의해 분리할 수 있고, 기계적 강도가 향상되어 효소 고정화 담체로 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

정진양

서울특별시 서초구 효령로34길 92, 101동 703호 (방배동, 신구블레스밸리아파트)

김지훈

서울특별시 성북구 북악산로27길 28, 105호 (종암동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20110018568
부처명	한국연구재단
연구사업명	해양극지기술개발사업
연구과제명	해양 유래 개량 CA 및 PEPCase을 통한 in vitro/vivo 기반 생물전환 시스템 연구
주관기관	한양대학교 산학협력단
연구기간	2011.06.23 ~ 2012.06.22

특허청구의 범위

청구항 1

자성입자를 하나 이상 함유하는 가지 고분자 미세구체(branched polymer microsphere); 및

상기 미세구체를 둘러싸는 실리카층을 포함하는 미세복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

자성입자는 금속, 자성 물질 또는 자성 합금인 미세복합체.

청구항 3

제2항에 있어서,

자성 물질은 Co, Mn, Fe, Ni, Gd, Mo, MM'_2O_4, 및 M_xO_y 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이고, 상기 M 및 M'는 각각 독립적으로 Co, Fe, Ni, Mn, Zn, Gd, 또는 Cr을 나타내고, x 및 y는 각각 식 "$0 < x \leq 3$" 및 "$0 < y \leq 5$"을 만족하는 미세복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

가지 고분자 미세구체는 -NHS, $-NHNH_2$, 카르보닐 이미다졸(carbonyl imidazole), 니트로페닐(nitrophenyl), 이소시아네이트(isocyanate), 설포닐 클로라이드(sulfonyl chloride), 알데히드(aldehyde), 글리옥살(glyoxal), 에폭시드(epoxide), 탄산염(carbonate), 할로겐화 시안눌기(cyanuric halide), 디티오카보네이트(dithiocarbonate), 토실레이트(tosylate) 및 말레이미드(maleimide)로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 말단 작용기를 갖는 생체적합성 가지 고분자로부터 제조되는 미세복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

실리카층은 아민기를 함유하는 미세복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

미세복합체는 500 내지 8000 ㎛의 직경을 갖는 미세복합체.

청구항 7

2가의 금속이온 하에서 자성입자, 가지 고분자(branched polymer), 알기네이트 및 가교제를 혼합하여 자성-고분자 블렌드 미세구체를 제조하는 단계;

상기 자성-고분자 블렌드 미세구체의 착물화 반응을 통해 알기네이트-2가의 금속이온 착물이 제거된 자성-고분

자 미세구체를 제조하는 단계; 및

상기 자성-고분자 미세구체 및 실리카 전구체의 졸-겔 반응을 통해 상기 미세구체의 외각에 실리카층이 형성된 미세복합체를 제조하는 단계를 포함하는 미세복합체의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 자성-고분자 블렌드 미세구체를 제조하는 단계는

자성입자, 가지 고분자 및 알기네이트의 혼합 용액에 1차 초음파처리 하는 단계;

상기 혼합 용액과 가교제를 혼합하여 2차 초음파처리 하는 단계; 및

상기 단계에서 얻은 자성-고분자 용액을 2가의 금속이온 용액에 적가(滴加)하여 자성-고분자 블렌드 미세구체를 제조하는 단계를 포함하는 것인 미세복합체의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

가지 고분자는 -NHS, $-NHNH_2$, 카르보닐 이미다졸(carbonyl imidazole), 니트로페닐(nitrophenyl), 이소시아네이트(isocyanate), 설포닐 클로라이드(sulfonyl chloride), 알데히드(aldehyde), 글리옥살(glyoxal), 에폭시드(epoxide), 탄산염(carbonate), 할로겐화 시안눌기(cyanuric halide), 디티오카보네이트(dithiocarbonate), 토실레이트(tosylate) 및 말레이미드(maleimide)로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 말단 작용기를 갖는 생체적합성 가지 고분자인 미세복합체의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

1차 초음파 처리 단계는 20 내지 30℃에서 20분 내지 40분 동안 실시하는 것인 미세복합체의 제조방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

가교제는 글루타알데히드, 디알데히드 전분 및 숙신산알데히드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 미세복합체의 제조방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

가교제는 혼합 용액 100 중량부에 대하여 0.4 내지 0.6 중량부로 포함되는 미세복합체의 제조방법.

청구항 13

제8항에 있어서,

2차 초음파 처리 단계는 20 내지 30℃에서 50분 내지 2시간 실시하는 것인 미세복합체의 제조방법.

청구항 14

제8항에 있어서,

2가의 금속이온은 Ca^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Ba^{2+} 또는 Sr^{2+}인 미세복합체의 제조방법.

청구항 15

제8항에 있어서,

자성-고분자 블렌드 미세구체와 가교제를 반응시키는 단계를 더 포함하는 미세복합체의 제조방법.

청구항 16

제7항에 있어서,

실리카층은 아미노알킬실란 유도체와 실란올기 함유 실리카 전구체를 반응시켜 형성되는 미세복합체의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

아미노알킬실란 유도체는 β-아미노에틸-γ-아미노프로필메틸디메톡시실란, 아미노프로필메틸디에톡시실란, γ-아미노프로필트리메톡시실란 및 γ-아미노프로필트리에톡시실란으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 미세복합체의 제조방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

실란올기 함유 실리카 전구체는 테트라에틸 오르토실리케이트, 테트라메틸 오르토실리케이트, 메틸 트리에톡시실란, 페닐 트리에톡시실란, 디메틸 디메톡시 실란, 에틸 트리에톡시실란 및 이들의 혼합물로부터 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 미세복합체의 제조방법.

청구항 19

제1항의 미세복합체를 포함하는 효소 고정화 담체.

청구항 20

제1항의 미세복합체 및 효소를 반응시키는 단계를 포함하는 효소 고정화 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 효소 기술을 이용한 분야에서 사용할 수 있고, 자석에 의해 분리할 수 있는 실리카층이 형성된 가지 고분자 미세구체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 효소는 식품 및 제약 산업, 화학적 변형 공정, 생물적 환경 정화, 생체연료전지 등에 사용되는 용도가 다양한 특이적인 생체촉매 부류에 속한다. 최근, 효소는 바이오매스에서 유래된 촉매적 전환 기술을 위한 녹색 에너지와 지속 가능한 에너지 또는 화학물질을 개발하는데 있어서 많은 장점이 있는 것으로 알려졌다. 효소는 보통 실온, 압력, 생리적 pH, 물, 또는 심지어 유기용매에서와 같은 온화한 조건에서 기능을 수행하며, 화학적선택성, 부위선택성 및 거울상이성질선택성을 유지한다. 이러한 장점에도 불구하고, 회수, 재사용 및 산물 오염과 관련된 시행 및 저장 안정성의 부족으로 인해 그들의 적용이 제한된다. 그러나, 이들 장애물들은 일반적으로 고정화 기술을 통해 극복할 수 있다. 결합, 캡슐화 또는 고상 담체를 이용한 포획 같은 수많은 고정화 방법들과, 특정 물질과 효소의 가교결합이 보고되어 있다. 결과적으로, 특정 담체에 고정된 효소는 저장 및 시행 안정성을 향상시킬 수 있다. 또한, 재사용을 위한 분리가 간단하고 회수가 쉬우며, 활성과 선택성을 유지함으로써 효소 기반 산업 공정에 적용할 수 있다.

[0003] 효소를 위한 담체로서 회수 및 재사용 면에서 유기 고분자 고상 담체가 특히 이점이 있다. 아민으로 개질된 미세구체 또는 고분자 소재로 된 미세비드 타입은 학문적 및 산업적인 면에서 둘 다 매우 매력적이다. 이는 아민기가 효소 내 아미노산과 결합하기 위한 모이어티로 제공되어 고정화할 수 있기 때문이다. 아민기를 갖는 담체 표면의 개질은 현탁, 유화 및 침전 중합 같은 다양한 중합 기술에 의해 합성될 수 있다. 그러나, 기계적 안정성과 제한된 함량 전달로 인해 생기는 낮은 효소적 활성 때문에 이들 고분자의 담체로의 사용을 방해한다. 따라서, 많은 연구자들이 최근에 혼합 무기종들에 더욱 주의를 기울이게 되었다. 선행 연구들은 유-무기 하이브리드 구조가 독특한 특징들 즉, 무기 소재와 유기 고분자 간의 장점들, 예컨대 적절한 미세환경에서 세기, 탄성, 가소성 및 화학적 결합을 개선할 수 있음을 제시하였다. 그들 중에서, 알기네이트-실리카 복합체는 균일한 크기, 구형 형태 및 제조의 용이성으로 인해 주목하여 왔다. 실질적으로, 졸-겔 화학에 의해 실리카 층이 형성된 알기네이트 미세구체 또는 비드는 거칠고 팽창하지 않는 성분인 실리카와 유연한 생체적합 성분인 알기네이트의 결합을 허용하므로 전도유망한 것으로 보인다. 졸-겔 실리카는 실리카 쉘드, 소위 규조각으로서 알기네이트 표면 상에 형성되는데, 환경으로부터 변성을 보호할 뿐만 아니라 결합을 위한 예비 룸으로 고려될 수 있다. 더욱이, 그들의 다공성 특징으로 인해, 실리카 코팅은 효소 방출을 차단할 뿐만 아니라 작은 분자들을 위한 투과성 멤브레인으로 작용할 수 있다. 이 실리카 층이 형성된 알기네이트 미세구체가 염에 의해 유도된 팽창을 어느 정도 극복할 수 있으나, 그들은 중대한 기계적 결점이 있어 일반 산업적 효소 공정, 예컨대 매우 엄격한 진탕 조건에서 효소 활성을 유지하면서 그들을 적용하기는 불가능하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 1. 국제공개특허 제2010/078202호, 2010.07.08

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) 1. J. Biomater. Sci. Polymer Edn, vol.18(1), pp.71-80, 2007

(비특허문헌 0002) 2. Drug Delivery, vol.14, pp.129-138, 2007

(비특허문헌 0003) 3. Journal of colloid and interface science, vol.333, pp.329-334, 2009

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 기계적 강도가 향상된 가지 고분자 미세구체를 실리카층이 둘러싸는 구조의 미세복합체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 미세복합체의 효소 고정화 담체로서의 용도를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 미세복합체를 이용하여 효소를 고정하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0010] 자성입자를 하나 이상 함유하는 가지 고분자 미세구체(branched polymer microsphere); 및

[0011] 상기 미세구체를 둘러싸는 실리카층을 포함하는 미세복합체를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한

[0013] 2가의 금속이온 하에서 자성입자, 가지 고분자(branched polymer), 알기네이트 및 가교제를 혼합하여 자성-고분자 블렌드 미세구체를 제조하는 단계;

[0014] 상기 자성-고분자 블렌드 미세구체의 착물화 반응을 통해 알기네이트-2가의 금속이온 착물이 제거된 자성-고분자 미세구체를 제조하는 단계; 및

[0015] 상기 자성-고분자 미세구체 및 실리카 전구체의 졸-겔 반응을 통해 상기 미세구체의 외각에 실리카층이 형성된 미세복합체를 제조하는 단계를 포함하는 미세복합체의 제조방법을 제공한다.

[0016] 상기 자성-고분자 블렌드 미세구체를 제조하는 단계는 자성입자, 가지 고분자 및 알기네이트의 혼합 용액에 1차 초음파처리 하는 단계;

[0017] 상기 혼합 용액과 가교제를 혼합하여 2차 초음파처리 하는 단계; 및

[0018] 상기 단계에서 얻은 자성-고분자 용액을 2가의 금속이온 용액에 적가(滴加)하여 자성-고분자 블렌드 미세구체를 제조하는 단계를 포함할 수 있다.

[0019] 일 구체예에 따르면, 상기 자성-고분자 블렌드 미세구체와 가교제를 반응시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한 상기 미세복합체를 포함하는 효소 고정화 담체를 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한 상기 미세복합체 및 효소를 반응시키는 단계를 포함하는 효소 고정화 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 미세복합체는 자성입자를 포함하고 있어 자석에 의해 간단하고 쉽게 분리할 수 있어 효소 고정화 담체로 사용할 경우 회수 및 재사용이 유리한 이점이 있다.

[0023] 또한, 상기 미세복합체는 표면 실리카층에 (+) 전하를 띠는 아민기가 결합되어 있어 효소 고정화를 위한 모이어티로 작용할 수 있어 효소는 우수한 활성을 유지하면서 장기간 안정할 수 있다.

[0024] 본 발명의 미세복합체는 효소 고정에 효과적이므로 효소 기술을 적용한 다양한 분야, 예컨대 응용생물학적 제법, 생물적 환경정화, 미세규모의 효소 반응기 등 다양한 효소 응용 분야에서 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 가지 고분자 미세구체를 실리카층이 둘러싸고 있는 구조의 본 발명의 미세복합체를 제조하는 과정과 상기 미세구체에 효소를 고정하는 고정을 간략히 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 미세복합체의 SEM 사진도(a)와 이의 횡단면 SEM 사진도(b)를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 미세복합체의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 미세복합체의 EDX 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 미세복합체의 디지털 영상을 나타낸 것이다.

도 6은 고정된 카르복실 에스터라아제의 초기 활성에 대해 본 발명의 미세복합체의 사용된 수의 효과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 미세복합체에 고정된 카르복실 에스터라아제의 재사용(a) 및 저장 안정성(b)을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0027] 본 발명은 효소 고정화 담체로 사용하는 알기네이트-실리카 기반 소재의 상술한 단점을 해소하기 위해, 유-무기 하이브리드 소재의 새로운 타입으로 실리카층이 가지 고분자 미세구체를 둘러싸는 구조의 미세복합체를 개발하였고, 상기 미세복합체의 외곽(쉘)은 실리카 전구체와 시프 염기 결합에 의한 강한 화학적 이중 결합을 통해 강한 실리카 보호층을 형성함으로써 기계적 강도를 향상시킬 수 있다.

[0028] 따라서, 본 발명은 자성입자를 하나 이상 함유하는 가지 고분자 미세구체(branched polymer microsphere); 및

[0029] 상기 미세구체를 둘러싸는 실리카층을 포함하는 미세복합체를 제공한다.

[0030] 본 발명의 미세복합체는 가지 고분자 미세구체 내에 하나 이상의 자성입자가 분산되어 있고, 상기 미세구체 표면은 실리카층에 의해 코팅되어 있는 구조를 가질 수 있다.

[0031] 상기 자성입자는 가지 고분자 미세구체 내에 물리화학적 결합을 통해 분산될 수 있다. 예컨대, 상기 자성입자가 아민기 등의 작용기를 함유하도록 개질되어 가교제인 알데히드와 이민 결합(또는 시프 염기 결합)을 통해 가지 고분자 매트릭스 내에 분산되어 있을 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 미세복합체는 가지 고분자와 실리카층의 강한 화학적 이중 결합(예컨대, 이민 결합 등)을 통해 기계적 안정성이 향상되고, 실리카층은 효소 결합 부위에 대한 모이어티를 제공할 수 있는 작용기를 포함하고 있어 효소 고정화를 위한 담체로 사용할 수 있다. 아울러, 가지 고분자 미세구체 상에 자성입자가 분산되어 있어 자석에 의해 쉽고 빠르게 회수할 수 있어 재사용이 가능한 특징이 있다.

[0033] 본 명세서에서 "가지 고분자(branched polymer)"란, 고분자 화학에서 단량체 서브유닛 상의 수소원자의 치환에 의해, 그 중합체의 다른 공유결합된 사슬에 의해, 또는, 다른 타입의 사슬에 의한 그래프트 공중합체의 경우에서 가지가 형성된 고분자를 의미한다. 예컨대, 그래프트 중합체(graft polymer), 스타 중합체(star polymer), 콤 중합체(comb polymer), 브러쉬 중합체(brush polymer), 폴리머 네트워크(polymer network), 또는 덴드리머(dentrimer) 등을 포함할 수 있다. 본 명세서에서는 특히 미세구체에서 화학적 결합에 관여할 수 있는 말단 작용기를 갖는 생체적합성 가지 고분자를 포함할 수 있다. 예컨대, -NHS, $-NHNH_2$, 카르보닐 이미다졸(carbonyl imidazole), 니트로페닐(nitrophenyl), 이소시아네이트(isocyanate), 설포닐 클로라이드(sulfonyl chloride), 알데히드(aldehyde), 글리옥살(glyoxal), 에폭시드(epoxide), 탄산염(carbonate), 할로겐화 시안눌기(cyanuric halide), 디티오카보네이트(dithiocarbonate), 토실레이트(tosylate), 말레이미드(maleimide)로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 말단 작용기를 갖는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 폴리프로필렌글리콜(polypropylene glycol, PPG), 폴리옥시에틸렌(polyoxyethylene, POE), 폴리트리메틸렌 글리콜(polytrimethylene glycol), 폴리락트산(polylactic acid) 및 그 유도체, 폴리아크릴산 및 그 유도체, 폴리(아미노산), 폴리(비닐 알코올), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리포스파진(polyphosphazenes), 폴리(L-라이신)[poly(L- lysine)], 폴리알킬렌 옥사이드(polyalkylene oxide, PAO), 폴리사카라이드(polysaccharide), 덱스트란(dextran), 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol, PVA), 또는 폴리아크릴 아마이드(polyacryl amide) 등의 가지 고분자 형태를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 말단 작용기를 갖는 가지 고분자의 예로, 아민기를 함유하는 3 내지 8 암의 폴리알킬렌글리콜일 수 있다. 상기 가지 고분자의 중량평균분자량은 200 내지 100,000, 구체적으로, 1,000 내지 40,000, 보다 구체적으로 1,000 내지 10,000 일 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 가지 고분자가 상기 말단 작용기로 아민기를 갖는 경우, 아

민기는 가교제인 알데히드와 반응하여 이민 결합을 형성할 수 있다. 아울러, 상기 반응에 참여하지 않은 아민기는 효소 고정화를 위한 모이어티를 제공할 수 있어 효소를 화학적으로 미세복합체 상에 고정할 수 있다.

[0034] 본 명세서에서, "자성-고분자 블렌드 미세구체"란, 자성입자, 가지 고분자 및 알기네이트를 2가 금속이온 용액에 적가(滴加)하여 형성된 구형의 비드를 의미한다. 상기 알기네이트는 2가 금속이온과 이온 교환을 통해 겔을 형성하는 특징이 있으며, 따라서 상기 자성-고분자 블렌드 미세구체는 알기네이트-2가 금속이온 겔 내에서 가지 고분자 매트릭스 내에 자성입자가 분산되어 있는 미세구체가 박혀있는 형태를 나타낼 수 있다.

[0035] 본 명세서에서, "자성-고분자 미세구체"란, 상기 자성-고분자 블렌드 미세구체에 착물화제를 도입하여 알기네이트-2가 금속이온 겔을 용해시킴으로써 자성-고분자 블렌드 미세구체에서 알기네이트-2가의 금속이온 착물이 제거된 상태를 의미한다.

[0036] 본 명세서에서, "자성입자를 하나 이상 함유하는 가지 고분자 미세구체(branched polymer microsphere)"란, 상기 자성-고분자 미세구체 또는 가교제 처리를 통해 표면 개질된 자성-고분자 미세구체를 의미한다.

[0037] 본 명세서에서, "실리카층이 형성된 가지 고분자 미세구체"란, 상기 자성-고분자 미세구체의 표면이 실리카층에 의해 둘러싸여 있는 구조를 갖는 것으로 본 발명의 미세복합체를 의미한다.

[0038] 상기 자성입자는 자성을 가지고 있어 본 발명의 미세복합체가 자석에 의해 쉽고 빠르게 분리될 수 있도록 한다. 따라서, 미세복합체의 회수 또는 분리 비용을 줄일 수 있다.

[0039] 상기 자성입자는 자성을 가지고, 직경이 1 nm 내지 1000 nm인 입자를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하지는 않는다. 예컨대, 상기 직경을 갖는 금속, 자성 물질, 또는 자성 합금일 수 있다.

[0040] 상기 금속은 특별히 제한하지는 않으나, Pt, Pd, Ag, Cu, 또는 Au 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0041] 상기 자성 물질은 특별히 제한하지는 않으나, Co, Mn, Fe, Ni, Gd, Mo, MM'_2O_4, 또는 M_xO_y 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으며, 상기 M 및 M'는 각각 독립적으로 Co, Fe, Ni, Mn, Zn, Gd, 또는 Cr을 나타내고, x 및 y는 각각 식 "$0 < x \leq 3$" 및 "$0 < y \leq 5$"을 만족한다.

[0042] 상기 자성 합금은 특별히 제한하지는 않으나, CoCu, CoPt, FePt, CoSm, NiFe, 또는 NiFeCo 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0043] 또한, 상기 자성입자는 작용기를 갖도록 표면 개질될 수 있다. 예컨대, 상기 작용기로 아민기를 갖는 경우 가교제인 알데히드와 이민 결합을 형성할 수 있어 미세구체 내에서 화학적 결합을 통해 분산될 수 있도록 할 수 있다.

[0044] 상기 가지 고분자는 분지된 형태를 통해 미세구체의 구조적 세기를 증가시킬 수 있고, 말단 작용기를 포함하고 있어 실리카층과의 화학적 결합에 참여하거나, 효소 고정 시 모이어티로 제공할 수 있다.

[0045] 상기 가지 고분자 미세구체를 둘러싸고 있는 실리카층은 구조적 세기를 증가시킬 뿐만 아니라 (+) 전하를 띠는 아민기를 가지고 있어 기계적 안정성과 생체분자, 예컨대 효소와의 결합 기회를 증가시킬 수 있다.

[0046] 상기 가지 고분자 미세구체와 실리카층은 화학적으로 결합(예컨대, 이민 결합)되어 기계적 안정성을 향상시킬 수 있는 외부 쉘드를 형성할 수 있고, 미세복합체의 내부는 균일한 크기의 기공을 가지고 있어 화학적 확산이 일어날 수 있다.

[0047] 상기 미세복합체는 특별히 제한하지는 않으나 크기가 균일한 구형을 나타낼 수 있고, 500 내지 8000 ㎛, 보다 구체적으로 500 내지 2000 ㎛, 가장 구체적으로, 500 내지 600 ㎛의 직경을 가질 수 있다.

[0048] 본 발명은 또한

[0049] 2가의 금속이온 하에서 자성입자, 가지 고분자(branched polymer), 알기네이트 및 가교제를 혼합하여 자성-고분자 블렌드 미세구체를 제조하는 단계;

[0050] 상기 자성-고분자 블렌드 미세구체의 착물화 반응을 통해 알기네이트-2가의 금속이온 착물이 제거된 자성-고분자 미세구체를 제조하는 단계; 및

[0051] 상기 자성-고분자 미세구체 및 실리카 전구체의 졸-겔 반응을 통해 상기 미세구체의 외각에 실리카층이 형성된

미세복합체를 제조하는 단계를 포함하는 미세복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0052] 본 발명의 미세복합체의 제조방법은 가지 고분자를 포함하는 알기네이트 기반 겔을 형성하고, 화학적 착물화을 통해 알기네이트를 제거한 후 변형된 졸-겔 법을 순차적으로 수행하여 가지 고분자 매트릭스 내에 자성입자가 분산되어 있는 미세구체를 실리카층이 둘러싸고 있는 구조의 미세복합체를 제조하는 것을 특징으로 한다. 도 1을 참조하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0053] 제1단계는 자성-고분자 블렌드 미세구체를 제조하는 단계로,

[0054] 자성입자, 가지 고분자 및 알기네이트의 혼합 용액에 1차 초음파처리 하는 단계;

[0055] 상기 혼합 용액과 가교제를 혼합하여 2차 초음파처리 하는 단계; 및

[0056] 상기 단계에서 얻은 자성-고분자 용액을 2가의 금속이온 용액에 적가(滴加)하여 자성-고분자 블렌드 미세구체를 제조하는 단계를 포함할 수 있다.

[0057] 보다 구체적으로, 자성입자, 가지 고분자 및 알기네이트를 혼합한 용액을 20 내지 30℃에서 20분 내지 40분 동안 1차 초음파 처리하고, 상기 용액에 가교제를 부가하여 20 내지 30℃에서 50분 내지 2시간 동안 2차 초음파 처리 한 후 이를 2가의 금속이온 용액에 적가하여 자성-가지 고분자 미세구체가 알기네이트-2가의 금속이온 겔에 박혀있는 형태의 자성-고분자 블렌드 미세구체를 제조하는 단계이다.

[0058] 상기 자성입자는 상술한 종류의 금속, 자성 물질, 자성 합금 등을 이용하여 통상의 제조공정을 통해 입자 형태로 제조하거나, 자성비드를 사용할 수 있어 이에 특별히 제한하지는 않는다.

[0059] 또한, 가지 고분자 미세구체 내에 화학적 결합에 의한 분산을 위해 작용기로 표면 개질될 수 있다. 상기 작용기는 가교제, 가지 고분자의 말단 작용기의 종류에 따라 적절히 채택될 수 있어 특별히 제한하지는 않으나, 예컨대 아민기일 수 있다.

[0060] 상기 가지 고분자는 말단 작용기를 갖는 생체적합성 가지 고분자일 수 있으나, 종류는 전술한 바와 같다.

[0061] 상기 알기네이트는 2가의 금속이온과 반응하여 겔을 형성할 수 있는 종류라면 특별히 제한하지는 않으며, 예컨대, Na^{+}-알기네이트, K^{+}-알기네이트, PEG-알기네이트(폴리에틸렌 글리콜-알기네이트), NH_4-알기네이트, 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다.

[0062] 상기 2가의 금속이온으로 Ca^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Ba^{2+} 또는 Sr^{2+}를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0063] 상기 가교제는 자성입자, 가지 고분자, 후술하는 실리카 등의 말단 작용기와의 화학적 결합을 유도하여 미세구체 또는 미세복합체의 기계적 강도를 높일 수 있다. 상기 가교제의 종류로, 글루타알데히드, 디알데히드 전분, 숙신산알데히드 등의 폴리알데히드류를 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로 글루타알데히드를 사용하는 것이 좋다.

[0064] 일 구체예에 따르면, 가교제인 알데히드는 자성입자, 가지 고분자, 후술하는 실리카 등의 말단 작용기인 아민기와 반응하여 이민 결합을 통해 화학적 결합을 유도할 수 있다.

[0065] 상기 가교제는 기계적 강도가 우수한 미세복합체를 제조하기 위해 자성입자, 가지 고분자 및 알기네이트의 혼합 용액 100 중량부에 대하여 0.4 내지 0.6 중량부로 포함될 수 있다.

[0066] 상기 자성-고분자 블렌드 미세구체는 2차 초음파 처리를 거친 자성-고분자 용액을 2가 금속이온 용액에 적가하여 얻을 수 있다.

[0067] 상기 적가 방법은 전기스프레이, 시린지 펌핑 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0068] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 전기스프레이를 사용할 수 있다.

[0069] 상기 전기스프레이 수행 시 캐필러리 팁과 전극 콜렉터 간의 거리, 전기력, 고분자 용액의 점도 등을 변화시킴으로써 미세구체의 크기를 제어할 수 있다.

[0070] 따라서, 전기스프레이 조건은 미세구체의 크기를 고려하여 당업자 수준에서 적절히 적용할 수 있어 특별히 제한하지는 않는다. 예컨대, 일 구체예에 따르면, 3~4kV 고전압전원공급장치(Gamma high voltage Research, ES series)에서 칼슘 화합물과 가교제의 혼합 용액에 대해 팁 간의 거리를 3 내지 7 cm로 하고, 30 게이지 시린지

니들을 수직으로 고정하고 유량속도를 2 내지 3 mL/h로 셋팅하여 수행할 수 있다.

[0071] 상기에서 형성된 자성-고분자 블렌드 미세구체는 가교제와 추가로 반응시켜 미세구체 내 가교 결합을 굳히는 단계를 실시할 수 있다.

[0072] 상기 반응은 자성-고분자 블렌드 미세구체와 가교제를 혼합하여 실온에서 밤새도록 교반하여 실시할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0073] 상기 가교제의 종류 및 함량은 전술한 바와 같다.

[0074] 제2단계는 상기 자성-고분자 블렌드 미세구체의 착물화 반응을 통해 알기네이트-2가의 금속이온 착물이 제거된 자성-고분자 미세구체를 제조하는 단계이다.

[0075] 상기 단계는 금속 착물화제를 사용하여 상기 자성-고분자 블렌드 미세구체로부터 알기네이트-2가의 금속이온 겔을 용해시켜 자성-고분자 미세구체를 분리하는 것이다.

[0076] 상기 착물화제는 2가 금속이온과 착물을 형성할 수 있는 물질이라면 특별히 제한 없이 사용할 수 있으며, 예컨대, 소듐 시트레이트, 소듐 포스페이트 등을 사용할 수 있다.

[0077] 제3단계는 상기 자성-고분자 미세구체 및 실리카 전구체의 변형된 졸-겔 반응을 통해 상기 미세구체의 외각에 실리카층이 형성된 미세복합체를 제조하는 단계이다.

[0078] 상기 실리카층은 미세구체의 기계적 강도를 향상시키고, 표면에 효소를 고정하는 모이어티를 제공하기 위해 아민기를 함유할 수 있다. 이를 위해서는 가지 고분자 미세구체와 아미노알킬실란 유도체를 반응시킨 후, 여기에 실란올기 함유 실리카 전구체를 부가하여 졸-겔 공정을 통해 아민기가 도입된 실리카층을 가지 고분자 미세구체 표면에 형성할 수 있다.

[0079] 상기 아미노알킬실란 유도체는 β-아미노에틸-γ-아미노프로필메틸디메톡시실란, 아미노프로필메틸디에톡시실란, γ-아미노프로필트리메톡시실란, 또는 γ-아미노프로필트리에톡시실란 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0080] 상기 실란올기 함유 실리카 전구체는 테트라에틸 오르토실리케이트, 테트라메틸 오르토실리케이트, 메틸 트리에톡시실란, 페닐 트리에톡시실란, 디메틸 디메톡시 실란, 에틸 트리에톡시실란, 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0081] 상기 아미노알킬실란 유도체와 실란올기 함유 실리카 전구체는 1:0.5 내지 2:1의 부피비로 혼합할 수 있으나, 당업자의 이해 범위 내에서 적절히 채택될 수 있다.

[0082] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 실리카 코팅은 고분자 미세구체를 유기용매, 예컨대 헥산과 혼합하고 교반한 후 아미노알킬실란 유도체를 부가하여 진탕하고, 여기에 실란올기 함유 실리카 전구체를 부가하여 반응시킬 수 있다. 상기 실리카 코팅 후 증류수로 세척하여 실리카 잔사를 제거할 수 있다.

[0083] 본 발명은 또한 상기 미세복합체를 포함하는 효소 고정화 담체에 관한 것이다.

[0084] 본 발명의 미세복합체는 기계적 안정성이 향상되고, 가지 고분자 미세구체 내 가지 고분자의 말단 작용기 또는 실리카층이 효소 결합 부위에 대해 모이어티를 제공할 수 있는 아민기를 가지고 있어 우수한 효소 고정능을 가지므로 장기간 안정성이 있고, 진탕 조건에서도 초기 활성을 유지하면서 반복 재사용이 가능하다. 또한, 자성입자를 함유하고 있어 자석에 의해 쉽고 빠르게 분리할 수 있어 반복 재사용이 용이하여 효소 기술이 적용되는 분야, 예컨대, 응용생물학적 제법, 생물적 환경정화, 미세규모의 효소 반응기 등에 적용할 수 있다.

[0085] 일 구체예에 따르면, 모델 효소로 카르복실 에스터라아제를 사용하여 본 발명의 미세복합체에 고정할 경우, 효소의 아민기는 가교제인 알데히드에 의해 실리카 또는 가지 고분자와 시프 염기 결합을 통해 고정될 수 있다.

[0086] 일 구체예에 따르면, 모델 효소로 카르복실 에스터라아제를 사용하여 본 발명의 미세복합체에 고정할 경우, 100일 이상 초기 활성의 90% 이상을 유지하면서 안정하고, 매우 엄격한 진탕 조건에서도 반복적으로 15회 이상 재사용할 수 있다. 반면, 유리 상태의 효소의 경우 변성 및 자기분해로 인해 효소 활성이 빠른 속도로 불활성화되

며, 기존의 알기네이트 기반 비드의 경우 Na^+ 이온과의 교환으로 인해 인산염 완충용액에서 팽창되며, 뒤 이어 효소 누수와 반응 배지에서 고정된 효소의 재사용 억제가 일어나는데, 본 발명의 미세복합체의 경우 실리카층이 미세구체의 팽창을 억제하고 효소 고정화를 위한 작용기를 제공하며, 강한 기계적 안정성을 제공하여 효소의 강한 응집과 효소 침출 및 변성을 억제하여 장기간 효소 활성이 유지되고 효소 누수를 억제할 수 있다.

[0087] 또한, 통상의 방법으로 제조된 알기네이트 기반 미세구체의 경우 회수하기 위해 홀더를 사용하므로 크기가 작은 분자를 분리 또는 수집이 어렵고 미세구체의 기계적 손상을 유발할 수 있다. 반면 본 발명의 미세복합체는 자석에 의해 분리할 수 있어 이러한 기계적 손상과 고정된 효소의 누수 없이 미세복합체를 분리할 수 있는 장점이 있다. 이는 효소를 이용한 반응공정에서 재사용을 위해 반응 배지에서 미세복합체를 쉽게 분리할 수 있다는데 이점이 있다.

[0088] 상기 효소는 본 발명의 미세복합체의 실리카층에 있는 아민기와 반응할 수 있는 종류라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 예컨대 카르복실 에스터라아제 등을 사용할 수 있다.

[0089] 본 발명은 또한 상기 미세복합체 및 효소를 반응시키는 단계를 포함하는 효소 고정화 방법에 관한 것이다.

[0090] 본 발명의 효소 고정화 방법은 가교제에 의해 효소의 아민기와 미세복합체의 작용기의 공유결합을 통해 미세복합체에 효소를 고정하는 방법으로, 예컨대 가교제인 알데히드는 효소의 아민기, 실리카의 아민기, 가지 고분자의 말단 작용기들과의 반응을 유도하여 효소가 공유결합을 통해 미세복합체에 고정할 수 있도록 한다.

[0091] 상기 효소 고정화 반응의 조건은 효소의 종류에 따라 달라질 수 있어 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0092] 본 발명의 일 구체예에는 효소의 종류로 카르복실 에스터라아제를 사용할 수 있고, 상기 효소는 다음의 단계를 거쳐 고정화될 수 있다. 즉,

[0093] 효소 및 미세복합체를 혼합하고, 진탕하는 단계; 및

[0094] 가교제를 함유하는 용액을 부가하여 진탕하고, 인큐베이션하는 단계를 포함할 수 있다.

[0095] 상기 효소 및 미세복합체를 혼합하고, 정치하는 단계는 실온에서 100 내지 300 rpm에서 20분 내지 40분 동안 볼텍싱한 후, 4℃에서 50 내지 100 rpm에서 1 내지 3시간 동안 진탕하여 실시할 수 있다.

[0096] 다음으로, 상기 효소 및 미세복합체의 혼합 용액에 가교제를 함유하는 용액을 부가하여 실온에서 100 내지 300 rpm에서 1 내지 3시간 동안 진탕한 후, 4℃에서 20 내지 40 rpm에서 밤새도록 인큐베이션하여 본 발명의 미세복합체에 효소를 고정할 수 있다.

[0097] 상기 가교제의 종류와 함량은 전술한 바와 같다.

[0098] 상기 효소의 고정능은 본 발명의 미세복합체의 농도 의존적으로 증가할 수 있다.

[0099] 가교반응 후에는 적당한 완충액으로 효소가 고정화된 미세복합체를 충분하게 세정하여, 불충분한 결합을 하고 있는 이탈하기 쉬운 효소 및 잉여의 가교제를 제거할 수 있다.

[0100] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0101] <실시예 1> 가지 고분자 미세구체 외각에 실리카층이 형성된 미세복합체의 제조

[0102] 자석에 의해 분리 가능하고, 매우 안정한 가지 고분자/실리카-쉘 하이브리드 미세구체를 제조하기 위해, 전기스프레이법, 착물화 과정, TMOS 및 APTES를 부가하여 수행한 실리카 졸-겔 코팅을 거쳐 미세 크기의 고분자 미세구체를 제조하였다. 상기 실험 과정은 도 1에 도시하였다. 가지 고분자 미세구체 외각에 실리카층이 형성된 미세복합체 제조에 사용된 8 암 폴리에틸렌 글리콜 아민 (헥사글리세롤)(8 arm polyethylene glycol amine (hexaglycerol), Amine-PEG) (Mw ~10,000, Jenkem technology), 알긴산 소듐 염(alginic acid sodium salt, Sigma), 염화칼슘(calcium chloride, Aldrich), 소듐 시트레이트(sodium citrate, Sigma), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS) (Aldrich), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl

orthosilicate, TEOS) (Aldridh), 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) (Sigma-Aldrich), 글루타알데히드(glutaraldehyde, Aldrich), N,N,-디메틸포름아마이드(N,N-dimethylformamide, DMF) (99 %, Sigma-Aldrich), *p*-니트로페닐 부티레이트(*p*-nitrophenyl butyrate, Aldrich), Dynabeads M-270 Amine (Amine-magnetic beads) (Invitrogen)을 구입하여 추가 정제 없이 사용하였다. 효소 고정화를 위해 사용하는 리조퍼스 오리자(*Rhyzopus oryzae*) 유래의 카복실 에스터라아제(Carboxyl esterase (E.C 3.1.1.1)는 Biochemik Chemicals (Aldrich)에서 구입하였다.

[0103] 가지 고분자 미세구체 외각에 실리카층이 형성된 미세복합체를 제조하기 위해, 아민-PEG 30 중량부, 1 중량부의 알긴산 염 및 5 중량부의 아민-자성 비드를 증류수에 용해시키고, 25℃에서 30분 동안 초음파 처리하였다. 고분자-자성 비드 용액과 0.5 중량부의 글루타알데히드와 혼합하고, 25℃에서 60분 동안 추가로 초음파 처리하였다. 상기 단계에서 제조된 고분자-자성 비드 용액의 앨리쿼트를 10mL-주사기에 로딩하였다. 3~4kV 고전압전원공급장치(Gamma high voltage Research, ES series)에서 100mM 염화칼슘 용액과 0.5 중량부의 글루타알데히드의 혼합 용액에 대해 팁 간의 거리를 5cm로 하고, 30 게이지 시린지 니들을 수직으로 고정하고 유량속도를 2.5mL/h로 셋팅하여 전기스프레이를 수행하였다. 이로부터 얻은 전기방사 가교 결합된 알기네이트-PEG 미세구체는 염화칼슘 및 글루타알데히드의 혼합 용액에서 짧은 시간 동안 수집하고, 상기 미세구체는 가교 결합을 굳히기 위해 실온에서 밤새도록 교반하였다. 알기네이트-PEG 미세구체는 자석을 이용하여 분리하고, 증류수로 3회 이상 세척하며, 마지막으로 칼슘 착물화제로 소듐 시트레이트를 사용하여 가교 결합된 가지 고분자가 박혀 있는 Ca-알기네이트 겔을 용해시켜 가지 고분자 미세구체를 제조하였다. 실제로 전기스프레이 후 얻은 고분자 블렌드 미세구체를 100mM 소듐 시트레이트 용액에서 실온에서 15분간 인큐베이션 한 후 증류수로 몇 번 세척하고 4℃에서 저장하였다.

[0104] 자석에 의해 분리할 수 있는 가지 고분자 미세구체는 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) 및 테트라에틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS)의 변형된 졸-겔 공정에 의해 실리카 코팅되어 유-무기 하이브리드 미세구체를 얻었다.

[0105] 즉, 미세구체를 n-헥산과 혼합하고 나서 2분 동안 교반하였다. 3-아미노프로필트리에톡시실란을 부가한 후, 다시 5분 동안 진탕하고 나서, 테트라에틸 오르토실리케이트를 상기 혼합 용액에 부가하였다. 미세구체:n-헥산:APTES:TMOS의 부피비는 25:50:4:3으로 하였다. 가지 고분자/실리카-쉘 구조를 위해, 2시간 진탕을 실시하고 나서, 미세구체에 코팅되지 않은 실리카 잔사를 제거하고, 증류수로 5분 동안 계속 세척하고, 4℃에서 저장하였다.

[0106] (미세복합체의 특성 규명)

[0107] 미세구체의 형태 및 원소 분석은 scanning electron microscopy (SEM;S-2360N equiped with Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDAX), Hitachi Co. Ltd., JAPAN)에서 조사하였다. 미세구체의 Fourier transform infrared (FT-IR) 스펙트럼은 ATR 악세서리를 이용한 Infinity gold FT-IR spectrometer (Thermomattson. Co. Ltd., USA)에서 측정하였다.

[0108] <실험예 1> 미세복합체의 물리화학적 특성 규명

[0109] 상기 실시예 1에서 제조된 미세복합체의 형태를 SEM으로 분석한 결과, 도 2A에 나타난 바와 같이, 미세복합체의 평균 크기는 500 내지 600 ㎛이고, 구형이며, 균일하였다.

[0110] 균일한 구형의 고분자 미세구체가 쉽게 합성될 수 있다고는 하나, 그들의 기계적 안정성은 이온 교환으로 인해 염을 포함한 완충용액 시스템에서 안정하지 않는다. 따라서, 본 발명자들은 가지 고분자 및 자성 비드를 통해 화학적 생기능제에서 유래된 시프 염기 이중 결합이 미세구체의 팽창을 억제하는 대안일 수 있을 것으로 예상하였다. 실제로, 이민 반응 시 일어나는 노란색 변화가 강화 및 가교결합 과정 중에 관찰되었다. 결론적으로, 강화된 기계적 특징은 소듐 시트레이트 처리로부터 착물화 방법에 의해 입증된다.

[0111] 도 2B에 도시된 횡단면 사진도에서 나타난 바와 같이, 무기 실리카 코팅은 미세구체의 외부에서 형태적 변화를 유도한다. 하이브리드 미세구체의 확대도에서 나타난 바와 같이, 내부에 균일한 크기의 기공이 있다. 따라서, 미세복합체는 기계적 안정성을 향상시킬 수 있는 외부 쉘드를 형성할 수 있을 뿐만 아니라 화학적 확산에 이점이 되는 기공을 얻을 수 있다.

[0112] 도 3에 나타나 바와 같이, 미세복합체의 FT-IR 스펙트럼은 3274 cm^{-1} (N-H 스트레칭), 2869 cm^{-1} (알데히드 스트레칭), 950 cm^{-1} (에틸 알칸 벤딩), 1541 cm^{-1} (N-H (2° -아마이드) 벤딩), 및 1648 cm^{-1} (C=N 스트레치: 이민)에서 특징적인 피크를 나타냈다. 반면, 고분자 미세구체(매트릭스) 상에서 실리카 코팅을 위해 TMOS 및 APTES 혼합 기술로부터 Si-O-Si 및 C-H_3 에서 기인한 1040 cm^{-1} 및 1457 cm^{-1} 에서의 밴드의 매우 구별되는 강도가 관찰되었다.

[0113] 또한, 미세복합체의 EDX 분석 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이, Si 원소의 존재가 나타나 실리카-쉘이 확인되었다.

[0114] 자성 비드의 존재로 인해, 미세구체의 전체 색깔은 밝은 갈색을 나타내며, 그들은 미세캡슐화 과정에서 육안으로 쉽게 관찰될 수 있다. 그러나, 가교제인 글루타알데히드(GA) 처리 시 미세구체는 노란색으로 변화한다. 도 5에 나타난 바와 같이, 미세복합체는 시프 염기 결합을 의미하는 노란색을 나타냈다.

[0115] 또 다른 장점은 액체 배지로부터 미세복합체의 자석에 의한 분리 가능성이다. 도 5에 나타나 바와 같이, 미세복합체는 2초 만에 자석에 의해 분리될 수 있다. 이러한 특징, 즉 미세복합체의 자석에 의한 분리능은 생체분자-미세구체 하이브리드 분자의 적용을 가능케 하여 혼합물로부터 회수 또는 분리 비용을 줄일 수 있다.

[0116] <실시예 2> 효소가 고정된 미세복합체의 제조

[0117] 상기 실시예 1에서 제조된 미세복합체에서의 효소 고정화를 위해, 100 mM 인산염 완충용액(pH 8.0)에서 10 mg/mL로 카르복실 에스터라아제(CE) 용액을 제조하였다. 글래스 바이알에서 상기 실시예 1의 미세복합체와 1mL의 효소 용액과 혼합하고, 실온에서 200 rpm으로 30분 동안 볼텍싱하였다. 이후, 글래스 바이얼을 록커에 정치하고 4℃에서 60 rpm으로 2시간 동안 진탕하였다. 효소 응집을 위해, 우선 1.0 중량부의 글루타알데히드 및 0.5g 암모늄 설페이트를 함유하는 2mL의 용액을 상기 바이얼에 부가하여 효소를 응집시키고, 실온에서 200 rpm으로 2시간 동안 진탕기에 정치하고, 4℃의 록커(30 rpm) 상에서 밤새도록 인큐베이션 하였다. 다음날, 모든 용액을 버리고, 미세복합체에 고정된 남아있는 효소를 새로운 바이얼로 옮기고, 100mM 인산염 완충용액으로 간단히 세척하고, 글루타알데히드 상에 남아있는 결합하지 않는 작용기는100 mM Tris-HCl (pH 7.8)로 캡핑하였다. 캡핑 후, 고정된 CE는 100mM 인산염 완충용액(pH 6.5)으로 3회 세척하였다. 상기 제조된 효소-미세복합체는 2mL의 100mM 인산염 완충용액(pH 6.5)에서 분산시켜 4℃에서 저장하였다.

[0118] <실험예 2> 효소 활성 및 안정성 측정

[0119] 상기 실시예 2에서 제조된 미세복합체에 고정된 효소의 생활성은 N,N-디메틸포름아마이드에 용해시킨 *p*-니트로페닐 부티레이트의 가수분해로부터 *p*-니트로페놀의 생산을 모니터링하여 체크하였다.

[0120] 즉, N,N-디메틸포름아마이드에 용해시킨 50㎕의 50mM *p*-니트로페닐 부티레이트를 포함하는 4.95mL의 100mM 인산염 완충용액(pH 6.5)을 기질로 제조하였다. 고정된 CE는 상기 기질 용액에 분산시키고, 200 rpm에서 진탕하였다. 짧게 반응시킨 후, 시간대 별 400nm에서의 흡광도로부터 초기 활성을 계산하고, 상기 흡광도는 *p*-니트로페놀의 농도로 평균화하였다.

[0121] 효소 안정성 실험을 위해, 활성 측정 후 미세복합체에 고정된 CE를 100mM 인산염 완충용액(pH 6.5)로 3회 세척하고, 실온에서 200 rpm에서 진탕 조건에서 저장하였다. 모든 측정은 표준편차를 위해 3반복으로 수행하였다. 카르복실 에스터라아제 활성의 1 유니트(U)는 분석 조건 하에서 분당 1㎛ol *p*-니트로페놀을 방출하는 효소의 함량으로 정의하였다. 모든 시료들은 오차 분석을 위해 3반복으로 수행하였다. 결과에 대한 표준 편차는 그래프 상에서 오차 구간으로 나타내었다.

[0122] 도 5에 나타난 바와 같이, 효소 고정화 후, 미세복합체에서 색깔 변화가 일어났다. 즉, 베이지 색을 갖는 암모늄 설페이트 및 글루타알데히드는 베이지색에서 짙은 갈색으로의 변화를 유도할 수 있다. 이는 상기 미세복합체와 효소 간의 안정성을 증가시킬 수 있는 시프 염기 결합을 통해 미세구체에서 효소가 고정되어 있음을 입증하는 것이다.

[0123] 미세복합체의 수는 아민 모이어티로 인해 효소 로딩 효율에 영향을 줄 수 있기 때문에, 고정화를 위한 카르복실 에스터라아제의 농도를 고정하고 미세복합체의 함량만을 바꾸어 주었다.

[0124] 도 6에 나타나 바와 같이, 미세복합체의 수가 증가함에 따라 고정된 CE의 초기 활성 역시 증가한다. 물론, 가교결합된 CE로부터 자연스러운 변화가 효소에서의 구조적 배열에 영향을 줄 수 있다. 또한, 실리카 쉘은 기질의 CE의 활성 부위로의 자유로운 이동을 방해할 수 있어 가수분해 반응의 초기 속도는 유리 효소와 비교하여 지연될 것이다.

[0125] 그럼에도, 미세복합체의 수를 제어함으로써 훨씬 더 높은 활성을 갖는 보다 효과적인 고정화 시스템을 어느 정도 수행할 수 있다. 따라서, 미세복합체로부터 CE의 유실은 효소의 활성 유지를 억제하고, 이들 효과를 조사하여 측정하였다. 유리 CE와 고정된 CE의 안정성은 실제 효소 반응기 조건에서 정치하여 자연스런 환경을 모방하기 위해 진탕 조건(200 rpm) 하에서 수용성 완충용액에서 그들을 인큐베이션하여 측정하였다. 전형적인 산업적 효소 과정에서, 효소 반응은 매우 엄격한 조건에서 수행되며, 효소의 활성 및/또는 그러한 조건 하에서 고정화된 효소 시스템을 유지하는 것이 바람직하다.

[0126] 미세복합체에 고정된 CE는 도 7에 나타난 바와 같이 엄격한 진탕 조건 하에서 우수한 재사용 및 장기간 저장 안정성을 나타냈다. 가지 고분자/실리카 쉘은 CE가 전단응력 없이 유지되게 하는 것이 아니라 엄격한 상태를 보유하면서 저장되도록 할 수 있다.

[0127] 미세복합체에서 고정된 CE의 초기 활성을 100%로 정하고, 고정된 CE의 상대 활성은 초기 효소 활성 대비 활성 비율로 정하였다.

[0128] 도 7a에 나타난 바와 같이, 고정된 CE의 상대 활성은 잘 유지되는 반면, 유리 CE는 CE의 변성 및 자기분해로 인해 효소 활성의 빠른 불활성화를 나타냈다. 15회 반복 사용 후, 상대 활성의 90% 이상이 보존되었다. 전형적으로 균일한 구형의 알기네이트 기반 비드는 Na^+ 이온과의 교환으로 인해 인산염 완충용액에서 팽창되며, 뒤 이어 효소 누수와 반응 배지에서 고정된 효소의 재사용 억제가 일어난다. 그러나, 실리카-쉘은 미세구체의 팽창을 억제할 뿐만 아니라 효소 고정화를 위해 사용될 수 있는 작용기를 제공한다. 그러므로, 효소 누수는 효소 반응 동안 향상된 안정성과 더불어 거의 억제되었다.

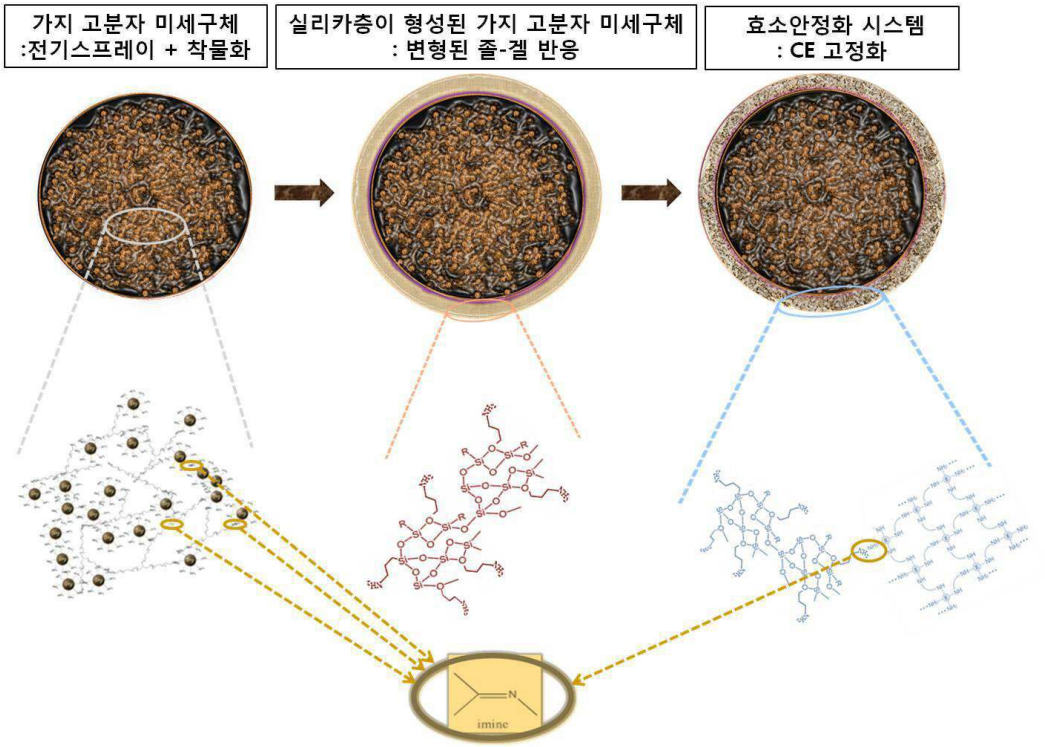
[0129] 또한, 고정된 CE의 저장 안정성을 측정한 결과, 도 7b에 나타난 바와 같이, 유리 효소의 상대 활성은 그것의 자기분해로 인해 3일 이내에 100% 에서 10%로 감소하였다. 그러나, 미세복합체에 고정된 CE의 상대 활성은 100일 동안 100%에서 90% 정도만 감소하였다. 이는 미세복합체에서 효소의 강한 응집과 효소 침출 및 변성을 억제하는 가지 고분자 미세구체의 외부 실리카-쉘로부터의 기계적 안정성 때문인 것으로 사료된다.

[0130] 또한, 미세복합체에 고정된 CE는 자석에 의해 분리 가능하였다. 전기스프레이는 미세 크기의 미세구체를 제조하기 위해 사용될 수 있으나, 일반적인 홀더를 이용하므로 크기가 작은 분자의 분리 또는 수집이 어렵고, 하이브리드 미세구체에서 기계적 손상 및 효소의 누수를 유발할 수 있다. 그러나, 자석에 의해 분리할 수 있는 미세복합체에 고정된 CE는 어떠한 손실 없이 강한 자석을 사용하여 2초 이내에 반응 용액에서 분리할 수 있다. 무엇보다도 가분성이 자석을 통해 이루어지므로 다음 재사용을 위해 반응 배지로부터 쉽게 분리할 수 있다. 이는 매우 엄격한 저장 조건에서 효소 재사용을 위한 매우 안정한 담체로서 미세복합체 기반 효소 안정화 시스템의 가능성에 대한 최초 보고이다.

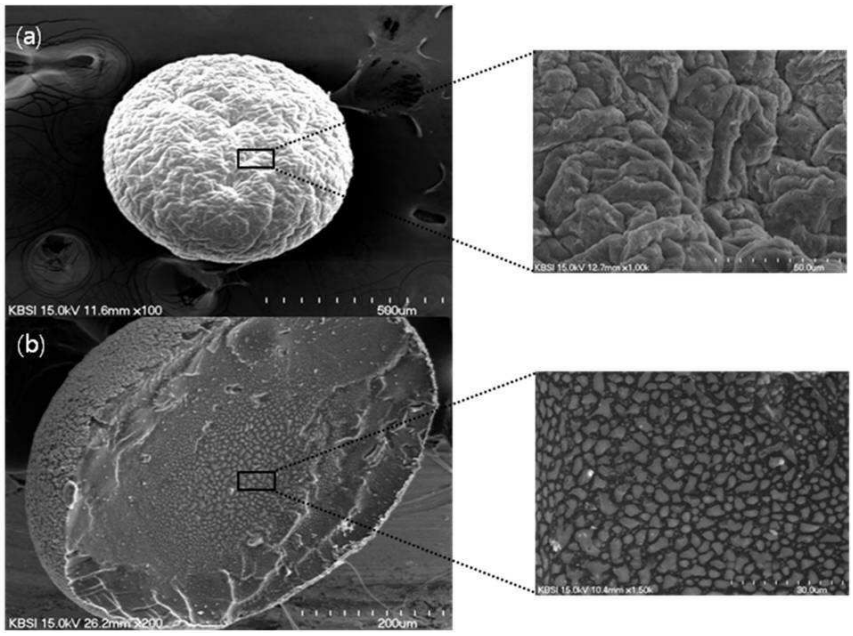
[0131] 결론적으로, 본 발명은 미세복합체를 포함하는 매우 활성적이고, 안정하며 자석에 의해 분리할 수 있는 효소 시스템을 성공적으로 제공한다. 상기 미세복합체는 보통 많은 다른 효소들에 대해 적용할 수 있으며, 효소 기술의 다양한 분야, 예컨대 응용생물학적 제법, 생물적 환경정화, 미세규모의 효소 반응기 등 다양한 효소 응용 분야에서 적용할 수 있다.

도면

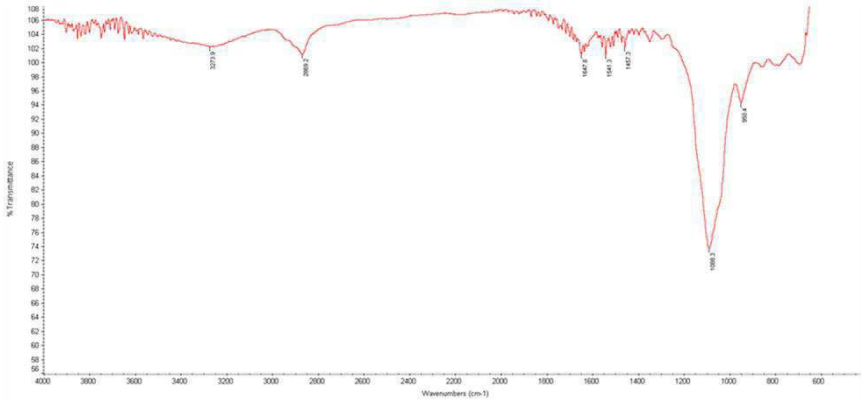
도면1


가지 고분자 미세구체
:전기스프레이 + 착물화
실리카층이 형성된 가지 고분자 미세구체
: 변형된 졸-겔 반응
효소안정화 시스템
: CE 고정화
imine

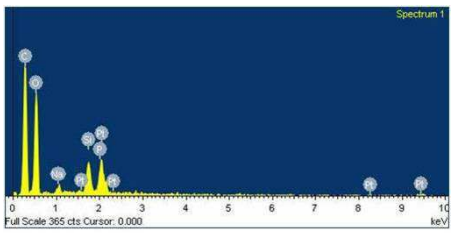
도면2


(a)
KBSI 15.0kV 11.6mm x100
500um
(b)
KBSI 15.0kV 26.2mm x200
200um

도면3

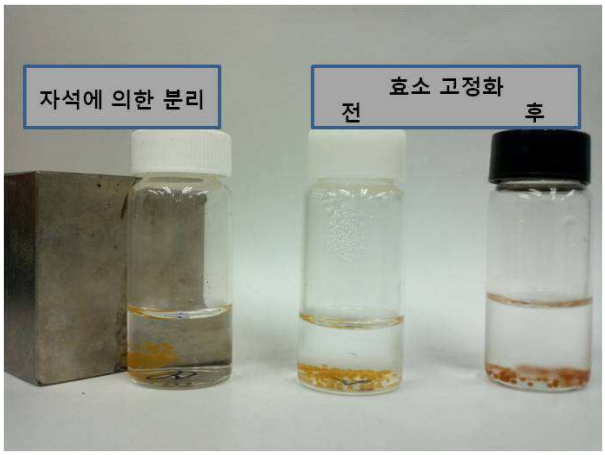


도면4

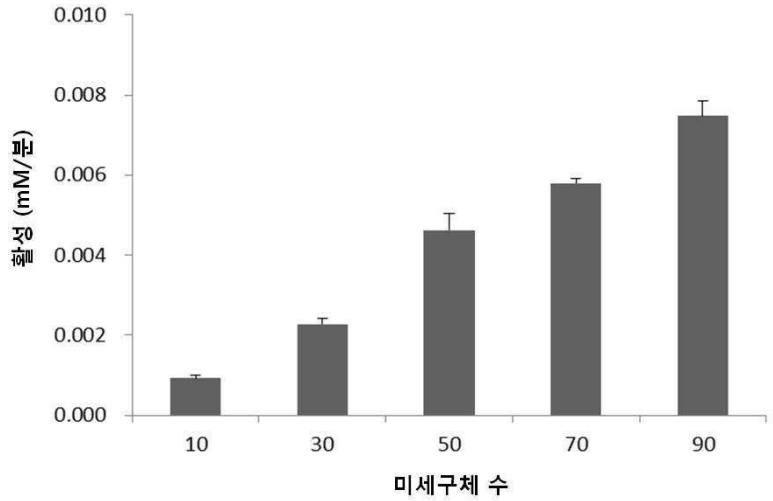


원소	무게비(%)	원자비(%)
C K	62.18	68.75
O K	37.53	31.15
Si K	0.75	0.37
P K	0.63	0.28
Na K	0.50	0.30
총	100.00	

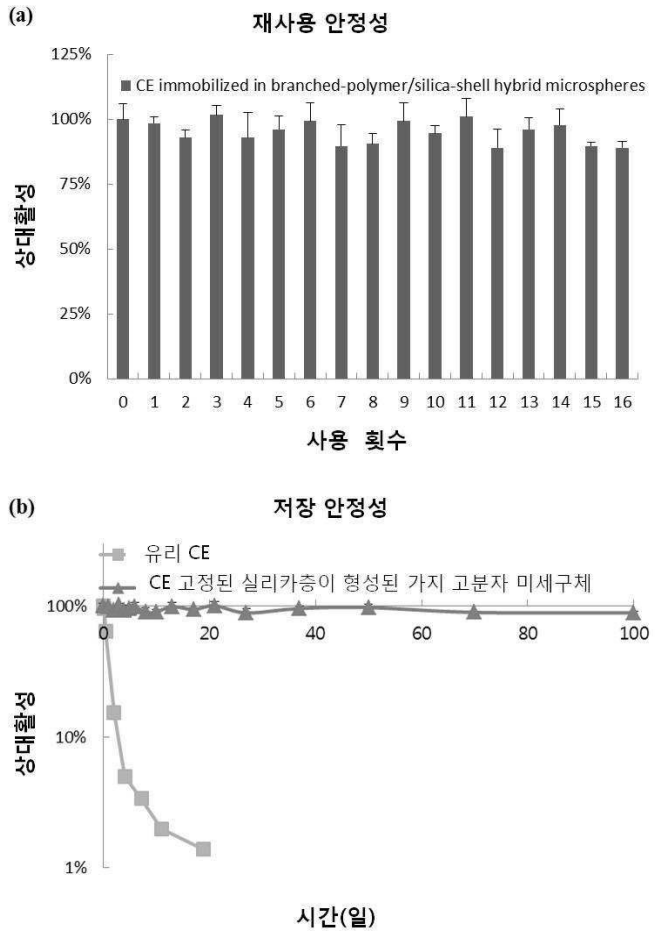
도면5



도면6


0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
활성 (mM/분)
10
30
50
70
90
미세구체 수

도면7


(a)
재사용 안정성
CE immobilized in branched-polymer/silica-shell hybrid microspheres
125%
100%
75%
50%
25%
0%
상대활성
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
사용 횟수
(b)
저장 안정성
유리 CE
CE 고정된 실리카층이 형성된 가지 고분자 미세구체
100%
10%
1%
상대활성
0 20 40 60 80 100
시간(일)