



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0135104
(43) 공개일자 2016년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 11/00 (2006.01) C12N 9/96 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 11/00 (2013.01)
C12N 9/96 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0059055
(22) 출원일자 2016년05월13일
심사청구일자 2016년05월13일
(30) 우선권주장
1020150066940 2015년05월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김중배
서울특별시 강남구 역삼로 309, 101동 1501호 (역삼동, 래미안펜타빌아파트)
유지성
서울특별시 성북구 종암로24가길 53 106동 1903호
김현일
서울특별시 성북구 안암로9가길 87-3 302호 (안암동5가)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

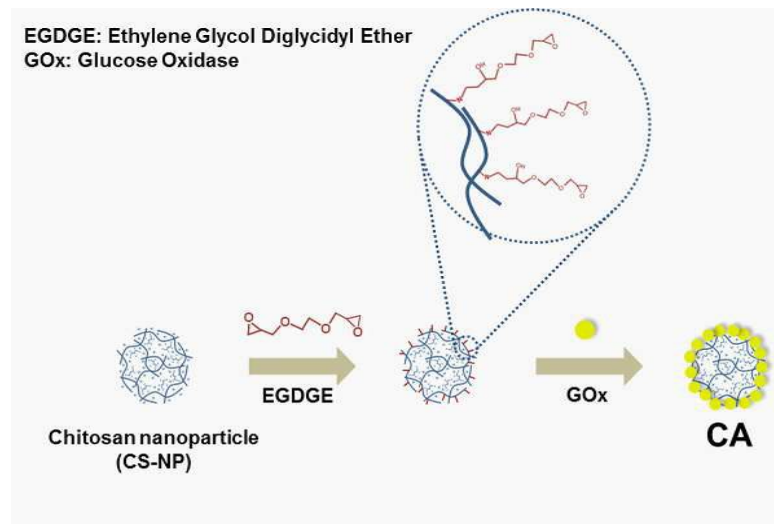
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 생체적합형 효소 복합체의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 생체적합형 효소 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 생체적합성이 우수함에 따라 인체에 무해하고, 종래의 결합체에 비해 효소간에 더욱 많은 가교결합을 유도하여 효소의 부착력이 강하며, 한정된 영역에 더욱 많은 효소를 집적시킬 수 있는 동시에 부착되는 효소들은 효소활성 발현에 영향을 받지 않아 장기간 안정적으로 효소특성을 발현할 수 있는 효과를 나타내는 생체적합형 효소 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20142020200980
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	한국에너지기술평가원
연구사업명	에너지기술개발사업
연구과제명	나노바이오촉매 기반 고효율 이산화탄소 전환 및 활용 기술 개발
기 여 율	1/10
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2015.10.01 ~ 2016.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2014043032
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	글로벌연구실사업
연구과제명	미생물 오염 방지 및 제거를 위한 나노바이오촉매 소재 개발
기 여 율	5/10
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2015.08.01 ~ 2016.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2014M3A7B4052193
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	나노소재원천기술개발사업
연구과제명	나노섬유 기반 3차원 복합구조 담체 및 전달기술 개발
기 여 율	4/10
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2015.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

생체적합성 효소접착제 및 효소를 각각 준비하는 단계; 및

생체적합성 효소접착제를 통해 효소를 고정화시키는 단계;를 포함하는 생체적합형 효소 복합체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생체적합형 효소접착제는 도파민, 도파민 유래 카테콜기를 포함하는 화합물, 제니핀(genipin) 및 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르(EGDGE, ethylene glycol diglycidyl ether) 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 생체적합형 효소 복합체의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 효소는 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 펩톡시다아제, 티로시나아제, 카카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 포도당 이성화 효소 및 양고추냉이 과산화수소 중에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 생체적합형 효소 복합체의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 효소는 비응집 효소 또는 효소 응집체인 것을 특징으로 하는 생체적합형 효소 복합체의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 효소 응집체는, 암모늄 설페이트(ammonium sulfate), 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알코올, 아세톤, 폴리에틸렌글리콜, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐포스페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 설페이트 및 포타슘 포스페이트 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 석출화제로 효소를 응집시켜서 제조되는 것을 특징으로 하는 생체적합형 효소 복합체의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 효소접착제 및 효소를 각각 준비하는 단계 전에,

지지체를 준비하는 단계; 및

상기 지지체를 개질시켜서 표면이 개질된 지지체를 제조하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 생체적합형 효소 복합체의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 지지체는 고분자섬유, 그래핀, 모노리식 컬럼, 탄소 페이퍼, 탄소 나노 튜브, 세공성 실리카, 고분자 비드 및 키토산 나노입자 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 생체적합형 효소 복합체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 생체적합형 효소 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 생체적합성이 우수함에 따라 인체에 무해하고, 종래의 결합제에 비해 효소간에 더욱 많은 가교결합을 유도하여 효소의 부착력이 강하며, 한정된 영역에 더욱 많은 효소를 집적시킬 수 있는 동시에 부착되는 효소들은 효소활성 발현에 영향을 받지 않아 장기간 안정적으로 효소특성을 발현할 수 있는 효과를 나타내는 생체적합형 효소 복합체 및 이의 제

[0001]

조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 친환경 생촉매인 효소의 선택성은 효소결합 면역흡착 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR), 혈당센서, 제약공정 등의 광범위한 분야에서 성공적으로 사용되고 있으며, 최근에는 이산화탄소 포집, 바이오연료전지, 바이오센서, 단백질 가수분해, 방오(antifouling) 등 다양한 분야에서 그 응용이 제안되고 있다. 하지만 효소 자체의 불안정성으로 인해 이러한 효소의 다양한 응용이 많은 제한을 받고 있다.
- [0003] 즉, 효소는 바이오 센서, 바이오연료전지, 효소컬럼, 효소면역흡착 분석법(ELISA), 바이오 정화기기, Antifouling용 도료(방오제) 등 다양한 분야에 사용가능하나, 효소의 구조적 변성에 의한 불안정성 문제로 인하여 장기간 지속적인 활용이 불가능하다는 단점이 있다. 따라서, 이를 해결하기 위하여 효소를 표면에 고정시키고 효소 간의 가교결합을 유도함으로써, 효소 담지량을 극대화하고 효소 불안정성을 해결할 수 있다.
- [0004] 한편, 종래에 사용되는 가교결합을 통한 효소 부착 및 고정방법에 따르면, 단순 흡착을 통해 효소를 부착시키거나, glutaraldehyde (GA), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)와 같은 가교결합제를 활용하여 표면 부착 혹은 효소간의 가교결합을 유도한다. 그러나, 단순 흡착의 경우 효소가 화학적으로 결합된 것이 아니기 때문에 효소가 쉽게 누출되어 응용성을 저해할 수 있다.
- [0005] 이때, GA 및 EDC와 같은 가교결합제를 활용하면 임의의 표면에 효소를 화학적으로 부착시키고, 효소 간의 화학적 결합을 유도할 수 있어 효소 누출을 방지하고 안정성을 크게 향상시킬 수 있다. 하지만 상기 GA 및 EDC와 같은 가교결합제와 이를 용해시킬 용매제는 생체 적합성이 떨어지는 문제점이 있어, 결합에 활용된 가교결합제 및 합성 이후에 잔류한 가교결합제 및 용매제에 의해 생체 부착 혹은 체내 흡수/삽입이 요구되는 다양한 응용이 제한될 수 있다.
- [0006] 즉, 효소는 친환경 생촉매로서, 효소가 생체 부착 또는 체내 흡수 및 삽입시 안정적으로 고정되고 생체 내에서 무해한 경우 화장품 소재, 질병 진단/치료용 생체 소재, 체내 삽입이 가능한 바이오센서 및 바이오 연료전지의 전극 소재, 의료용 방오소재, 치석 제거용 소재 등에 다양한 용도로서 적용되어 사용할 수 있다.
- [0007] 구체적으로, 용도의 일례로 화장품분야의 패치에 적용되어 피부가 접촉되는 기간 동안 피부에 이로운 물질을 생산하거나 해로운 물질을 분해하는 효소 반응을 반복적으로 유도하거나, 생분해(biodegradation) 가능한 생적합 가교제를 활용하여 시간에 따라 생분해되어 효소 혹은 효소가 포함된 화장성분이 피부에 지속적으로 전달될 수 있는 기능을 제공할 수 있다.
- [0008] 이에 본 발명의 발명자들은 생체 부착 혹은 체내 흡수/삽입이 요구되는 다양한 응용이 제한될 수 있는 문제점을 극복하기 위한 방안을 연구하던 중, 종래의 효소 고정화 방법에 비해 생체 적합성이 향상되어 생체 내에서의 효소집적도와 안정성이 우수한 효소접착용 조성물에 대해 발견하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) KR 10-2013-0136991 A (공개일 2013.12.13)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 해결하려는 과제는 생체적합성이 우수함에 따라 인체에 무해하고, 종래의 결합제에 비해 효소간에 더욱 많은 가교결합을 유도하여 효소의 부착력이 강하며, 한정된 영역에 더욱 많은 효소를 집적시킬 수 있는 동시에 부착되는 효소들은 효소활성 발현에 영향을 받지 않아 장기간 안정적으로 효소특성을 발현할 수 있는 효과를 나타내는 생체적합형 효소 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상술한 과제를 해결하기 위해 본 발명은 생체적합성 효소접착제 및 효소를 각각 준비하는 단계 및 생체적합성 효소접착제를 통해 효소를 고정화시키는 단계를 포함하는 생체적합성 효소 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 생체적합성 효소접착제는 도파민, 도파민 유래 카테콜기를 포함하는 화합물, 제니핀(genipin) 및 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르(EGDGE, ethylene glycol diglycidyl ether) 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 효소는 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 펙톡시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 포도당 이성화 효소 및 양고추냉이 과산화수소 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 효소는 비응집 효소 또는 효소 응집체일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 효소 응집체는, 암모늄 설페이트(ammonium sulfate), 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알콜, 아세톤, 폴리에틸렌글리콜, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐포스페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 설페이트 및 포타슘 포스페이트 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 석출화제로 효소를 응집시켜서 제조될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 생체적합성 효소접착제 및 효소를 각각 준비하는 단계 전에, 지지체를 준비하는 단계 및 상기 지지체를 개질시켜서 표면이 개질된 지지체를 제조하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 지지체는 나노섬유 및 키토산 나노입자 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명의 생체적합성 효소 복합체 및 이의 제조방법은 생체적합성이 우수함에 따라 인체에 무해하고, 종래의 결합제에 비해 효소간에 더욱 많은 가교결합을 유도하여 효소의 부착력이 강하며, 한정된 영역에 더욱 많은 효소를 집적시킬 수 있는 동시에 부착되는 효소들은 효소활성 발현에 영향을 받지 않아 장기간 안정적으로 효소특성을 발현할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 고분자 나노섬유이다.
- 도 2는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 키토산 나노입자를 개질하는 흐름도이다.
- 도 3a는 효소 접착전 나노섬유의 사진이고, 도 3b는 실시예 1에 따른 효소 복합체의 사진이다.
- 도 4는 실시예 1에 따른 효소 복합체의 접착능력을 나타낸 그래프이다.
- 도 5 ~ 13는 각각 실시예 2 ~ 28 및 비교예 1 ~ 5에 따른 효소 복합체의 활성 측정 그래프이다.
- 도 14는 실시예 13 ~ 16 및 비교예 5에 따른 효소 복합체의 안정성을 측정한 그래프이다.
- 도 15는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른, 공유접합체로 효소를 고정하는 흐름도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0021] 상술한 바와 같이 종래에 사용되는 방식에 따르면, 단순 흡착을 통해 효소를 부착시키거나, glutaraldehyde (GA), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)와 같은 가교결합제를 활용하여 표면 부착 혹은 효소간의 가교결합을 유도한다. 그러나, 단순 흡착의 경우 효소가 화학적으로 결합된 것이 아니기 때문에 효소가 쉽게 누출되어 응용성을 저해할 수 있다. 한편, GA 및 EDC와 같은 가교결합제를 활용하면 임의의 표면에 효소를 화학적으로 부착시키고, 효소 간의 화학적 결합을 유도할 수 있어 효소 누출을 방지하고 안정성을 크게 향상시킬 수 있다. 하지만 가교결합제와 이를 용해시킬 용매제의 생체 적합성이 떨어지며, 결합에 활용된 가교결합제 및 합성 이후에 잔류한 가교결합제 및 용매제에 의해 생체 부착 혹은 체내 흡수/삼입이 요구되는 다양한 응용이

제한될 수 있다.

- [0022] 이에 본 발명은 생체적합성 효소접착제 및 효소를 각각 준비하는 단계 및 생체적합성 효소접착제를 통해 효소를 고정화시키는 단계를 포함하는 생체적합형 효소 복합체의 제조방법을 제공하여 상술한 문제의 해결을 모색하였다. 이를 통해 종래의 발명과는 달리 생체적합성이 우수함에 따라 인체에 무해하고, 종래의 결합제에 비해 효소 간에 더욱 많은 가교결합을 유도하여 효소의 부착력이 강하며, 한정된 영역에 더욱 많은 효소를 집적시킬 수 있는 동시에 부착되는 효소들은 효소활성 발현에 영향을 받지 않아 장기간 안정적으로 효소특성을 발현할 수 있는 효과를 달성할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 제조방법에 따른 효소 복합체는 지지체를 포함할 수도 있고, 포함하지 않을 수도 있다.
- [0025] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 지지체를 포함하는 경우, 상기 생체적합성 효소접착제 및 효소를 각각 준비하는 단계 전에, 지지체를 준비하는 단계 및 상기 지지체를 개질시켜서 표면이 개질된 지지체를 제조하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0026] 한편, 상기 지지체는 생체 접촉이 필요하거나 생체 내에 흡수 및 삼입될 수 있는 물질이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 평면형, 구형, 비드형, 다각형 및 다공형 중에서 선택된 1종의 지지체일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 나노섬유 및 키토산 나노입자 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0027] 상기 지지체로 나노섬유를 사용하는 경우, 상기 나노섬유는 통상적으로 나노섬유를 제조할 수 있는 방법에 의해 제조된 나노섬유라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 전기방사를 통해 제조된 나노섬유일 수 있다.
- [0028] 그리고, 상기 지지체로 키토산 나노입자를 사용하는 경우, 상기 키토산 나노입자는 키토산, 트리폴리포스페이트(TPP)와 폴리소르베이트(polysorbate)를 포함하는 계면활성제를 1 : 0.01 ~ 10 : 1 ~ 20 의 중량비로, 바람직하게는 1 : 0.01 ~ 0.3 : 5 ~ 15의 중량비로 혼합 및 반응시켜서 제조할 수 있다. 만일 상기 키토산 나노섬유 및 트리폴리포스페이트의 중량비가 1 : 0.01 미만이면 나노 입자가 형성이 되지않는 문제가 발생할 수 있고, 중량비가 1 : 10 을 초과하면 응집현상이 발생하여 키토산 나노입자의 제조가 용이하지 않은 문제가 발생할 수 있다. 또한, 만일 상기 키토산 나노섬유 및 계면활성제의 중량비가 1 : 20 을 초과하면 거품이 과하게 발생하는 문제가 발생할 수 있다.
- [0030] 다음, 상기 지지체를 개질시켜서 표면이 개질된 지지체를 제조하는 단계를 설명한다.
- [0031] 도 2는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 키토산 나노입자를 개질하는 흐름도인데, 상기 지지체가 키토산 나노입자인 경우, 상기 개질은 상기 키토산 나노입자를 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르와 반응시키는 단계 및 반응시킨 키토산 나노입자를 효소와 반응시켜서 공유접합체(CA, covalent attachment)를 제조하는 단계를 포함하여 수행할 수 있다.
- [0032] 한편, 상기 키토산 나노입자 100 중량부에 대하여 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르가 1 ~ 1000 중량부, 바람직하게는 110 ~ 550 중량부 일 수 있다. 만일 상기 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르가 1 중량부 미만이면 키토산 나노입자의 표면이 잘 개질되지 않는 문제가 발생할 수 있고, 1000 중량부를 초과하면 뭉침현상이 발생함에 따라 공유접합체의 제조가 용이하지 않은 문제가 발생할 수 있다. 또한, 상기 키토산 나노입자 100 중량부에 대하여 효소가 1 중량부 이상, 바람직하게는 효소가 100 ~ 1000 중량부일 수 있다. 만일 상기 효소가 1 중량부 미만이면 공유접합체의 제조가 용이하지 않은 문제가 발생할 수 있다.
- [0034] 다음, 상기 생체적합성 효소접착제 및 효소를 각각 준비하는 단계를 설명한다.
- [0035] 상기 생체적합형 효소접착제는 효소를 생체 접촉이 필요하거나 생체 내에 흡수 및 삼입될 수 있는 생체 적합형 물질을 사용하는 것이 좋고, 바람직하게는 도파민, 도파민 유래 카테콜기를 포함하는 화합물, 제니핀(genipin) 및 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르(EGDGE, ethylene glycol diglycidyl ether) 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 발명에 따르면 생체 내에서 안전하게 도입 가능하면서도 현저하게 많은 양의 효소가 지지체에 담지 및 고정될 수 있을 뿐만 아니라, 지지체 없이도 현저하게 많은 양의 효소가 담지된 효소 복합체를 제조할 수 있으며, 외부 충격으로부터 고정된 효소가 쉽게 유출되지 않으므로 장기간이 경과한 후에도 그 안정성이 유지된다.

- [0037] 그리고, 상기 효소는 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 펠크시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 포도당 이성화 효소 및 양고추냉이 과산화수소 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 트립신 및 글루코산화효소 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0038] 한편, 상기 효소는 비응집 효소 또는 효소 응집체일 수 있는데, 상기 비응집 효소는 트립신을 포함할 수 있고, 상기 효소 응집체는 글루코산화효소를 포함 할 수 있다.
- [0039] 상기 효소 응집체는 암모늄 설페이트(ammonium sulfate), 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알콜, 아세톤, 폴리에틸렌글리콜, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐포스페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 설페이트 및 포타슘 포스페이트 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 석출화제로, 바람직하게는 암모늄 설페이트(ammonium sulfate), 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올 및 부틸알콜 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 석출화제로, 더욱 바람직하게는 암모늄 설페이트를 포함하는 석출화제로 효소를 응집시켜서 제조될 수 있다.
- [0041] 다음, 생체적합형 효소접착제를 통해 효소를 고정화시키는 단계를 설명한다.
- [0042] 상기 고정화시키는 단계는 통상적으로 효소 복합체를 제조할 수 있는 방법이라면 제한 되지 않는다.
- [0043] 먼저, 지지체를 포함하는 경우를 설명한다.
- [0044] 지지체를 포함하고 상기 효소가 비응집효소인 경우, 상기 고정화시키는 단계는 개질된 지지체 100 중량부에 대하여 비응집효소 1 중량부 이상, 생체적합성 효소 접착제 1 중량부 이상을 반응시켜서 수행할 수 있으며, 바람직하게는 비응집효소 100 ~ 1000 중량부 및 생체적합성 효소 접착제 100 ~ 2000 중량부를 반응시켜서 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 만일, 상기 개질된 지지체 100 중량부에 대하여 비응집효소가 1 중량부 미만이면, 목적하는 수준의 효소활성이 나타나지 않는 문제가 발생할 수 있고, 생체적합성 효소 접착제가 1 중량부 미만이면, 효소가 잘 고정되지 않는 문제가 발생할 수 있다.
- [0046] 그리고, 상기 효소가 효소 응집체인 경우, 상기 고정화시키는 단계는 효소 및 석출화제를 1 : 1 ~ 150 의 중량비로, 바람직하게는 1 : 75 ~ 125 의 중량비로 반응시켜서 효소응집체를 제조하는 단계 및 상기 개질된 지지체 100 중량부에 대하여 효소응집체 1 중량부 이상 및 생체적합성 효소 접착제를 1 중량부 이상을, 바람직하게는 효소응집체 100 ~ 1000 중량부 및 생체적합성 효소 접착제를 100 ~ 2000 중량부를 반응시켜서 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 만일 상기 효소응집체를 제조하는 단계에서 효소 및 석출화제의 중량비가 1 : 1 미만이면 효소의 석출이 잘 되지않는 문제가 발생할 수 있다. 또한, 만일 상기 개질된 지지체 100 중량부에 대하여 효소응집체가 1 중량부 미만이면 목적하는 수준의 효소활성이 나타나지 않는 문제가 발생할 수 있고, 생체적합성 효소 접착제가 1 중량부 미만이면 효소가 잘 고정되지 않는 문제가 발생할 수 있다._
- [0049] 다음, 지지체를 포함하지 않는 경우를 설명한다.
- [0050] 지지체를 포함하지 않는 경우, 상기 고정화시키는 단계는 효소 100 중량부에 대하여 석출화제를 100 ~ 15000 중량부, 바람직하게는 7500 ~ 12500 중량부로 반응시켜서 효소응집체를 제조하는 단계 및 상기 효소응집체 및 생체적합형 효소접착제를 1 : 0.1 ~ 5 의 중량비로, 바람직하게는 1 : 1 ~ 2 의 중량비로 반응시키는 단계를 포함할 수 있다. 만일 상기 효소응집체를 제조하는 단계에서 효소 100 중량부에 대하여 석출화제가 100 중량부 미만이면 효소의 석출이 잘 되지않는 문제가 발생할 수 있다. 또한, 만일 상기 효소응집체 및 생체적합형 효소접착제의 중량비가 1 : 0.1 미만이면 효소가 잘 고정되지 않는 문제가 발생할 수 있다.
- [0052] 한편, 상기 고정화 시키는 단계는 통상적인 효소 고정화 조건이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 1℃ ~ 10℃에서 13 ~ 21 시간 동안 25 ~ 75 rpm으로, 보다 바람직하게는 2℃ ~ 7℃에서 15 ~ 19 시간 동안 바람직하게는 35 ~ 65 rpm으로 혼합 및 반응시켜서 효소 복합체를 제조할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0054] 이하, 본 발명을 하기 실시예들을 통해 설명한다. 이때, 하기 실시예들은 발명을 예시하기 위하여 제시된 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0055] **[실시예]**

[0056] **준비예 1: 나노섬유**

[0057] 폴리스티렌 및 스티렌말레익 안하이드라이드 공중합체를 1 : 0.5 의 중량비로 포함하는 방사용액을 7 kV의 전압 및 0.1 ml/hour의 유속 조건에서 전기방사하여 나노섬유를 제조하였다.

[0059] **준비예 2: 키토산 나노입자**

[0060] 키토산, 트리폴리포스페이트(TPP) 및 폴리소르베이트(polysorbate)를 1 : 0.12 : 11의 중량비로 4℃에서 17시간 동안 50 rpm으로 랙킹(racking)하며 반응시켜서 키토산 나노입자를 제조하였다.

[0062] **실시예 1 : 효소 복합체의 제조**

[0063] 준비예 1에 따른 상기 나노섬유를 에탄올 처리를 통해, 도 3a와 같은 섬유 공간이 확장된 고분자 나노섬유를 제조하였다. 그 후 나노섬유 100 중량부에 대하여, 생체적합형 효소접착제로 도파민 200 중량부 및 효소로 글루코산화효소 100 중량부를 반응시켜서 도 3b와 같은 효소 복합체를 제조하였다.

[0065] **실시예 2**

[0066] 준비예 2에 따른 상기 키토산 나노입자 100 중량부에 대하여 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르 110 중량부 및 글루코산화효소 500 중량부를 준비하였다. 상기 키토산 나노입자 및 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르를 반응시키고, 반응시킨 키토산 나노입자를 상기 글루코산화효소와 반응시켜서 공유접합체를 제조하였다.

[0067] 그 후 글루코산화효소 및 석출화제로 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 1 : 125 의 중량비로 반응시켜서 글루코산화효소 응집체를 제조하고, 공유접합체 100 중량부에 대하여 글루코산화효소 응집체 500 중량부 및 제니핀 1400 중량부를 4℃에서 17시간 동안 50 rpm으로 랙킹(racking)하며 반응시켜서 효소 복합체를 제조하였다.

[0069] **실시예 3**

[0070] 준비예 2에 따른 상기 키토산 나노입자 100 중량부에 대하여 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르 110 중량부 및 트립신 500 중량부를 준비하였다. 상기 키토산 나노입자 및 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르를 반응시키고, 반응시킨 키토산 나노입자를 상기 트립신과 반응시켜서 공유접합체를 제조하였다.

[0071] 그 후 공유접합체 100 중량부에 대하여 트립신 500 중량부 및 제니핀 1400 중량부를 4℃에서 17시간 동안 50 rpm으로 랙킹(racking)하며 반응시켜서 효소 복합체를 제조하였다.

[0073] **실시예 4**

[0074] 준비예 1에 따른 상기 나노섬유를 에탄올 처리를 통해, 도 3a와 같은 섬유 공간이 확장된 고분자 나노섬유를 제조하였다. 그 후 글루코산화효소 및 석출화제로 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 1 : 20 의 중량비로 반응시켜서 글루코산화효소 응집체를 제조하고, 나노섬유 100 중량부에 대하여 글루코산화효소 응집체 6000 중량부 및 EGDGE 3450 중량부를 25 ℃에서 6일 동안 100 rpm으로 셰이킹(shacking)하며 반응시켜서 효소 복합체를 제조하였다.

[0076] **실시예 5**

- [0077] 준비예 2에 따른 상기 키토산 나노입자 100 중량부에 대하여 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르 460 중량부 및 글루코스산화효소 5000 중량부를 준비하였다. 상기 키토산 나노입자 및 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르를 반응시키고, 반응시킨 키토산 나노입자를 상기 글루코스산화효소와 반응시켜서 공유접합체를 제조하였다.
- [0078] 그 후 글루코스산화효소 및 석출화제로 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 1 : 75 의 중량비로 반응시켜서 글루코스산화효소 응집체를 제조하고, 공유접합체 100 중량부에 대하여 글루코스산화효소 응집체 5000 중량부 및 EGDGE 460 ~ 4370 중량부를 35℃에서 4시간 동안 50 rpm으로 랙킹(racking)하며 반응시켜서 효소 복합체를 제조하였다.
- [0080] **실시예 6**
- [0081] 실시예 5와 동일하게 실시하되, 글루코스산화효소 및 석출화제로 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 1 : 100 의 중량비로 반응시켜서 제조하였다.
- [0083] **실시예 7**
- [0084] 실시예 5와 동일하게 실시하되, 글루코스산화효소 및 석출화제로 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 1 : 125 의 중량비로 반응시켜서 제조하였다.
- [0086] **실시예 8**
- [0087] 실시예 5와 동일하게 실시하되, 석출화제를 사용하지 않고 제조하였다.
- [0089] **실시예 9**
- [0090] 실시예 5와 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 EGDGE 460 중량부를 반응시켜서 제조하였다.
- [0092] **실시예 10**
- [0093] 실시예 6과 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 EGDGE 460 중량부를 반응시켜서 제조하였다.
- [0095] **실시예 11**
- [0096] 실시예 7과 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 460 중량부를 반응시켜서 제조하였다.
- [0098] **실시예 12**
- [0099] 실시예 9와 동일하게 실시하되, 석출화제를 사용하지 않고 제조하였다.
- [0101] **실시예 13**
- [0102] 실시예 5와 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 EGDGE 862.5 중량부를 반응시켜서 제조하였다.
- [0104] **실시예 14**
- [0105] 실시예 6과 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 EGDGE 862.5 중량부를 반응시켜서 제조하였다.

- [0107] **실시예 15**
- [0108] 실시예 7과 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 EGDGE 862.5 중량부를 반응시켜서 제조하였다.
- [0110] **실시예 16**
- [0111] 실시예 13와 동일하게 실시하되, 석출화제를 사용하지 않고 제조하였다.
- [0113] **실시예 17**
- [0114] 준비예 2에 따른 상기 키토산 나노입자 100 중량부에 대하여 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르 460 중량부 및 글루코스산화효소 5000 중량부를 준비하였다. 상기 키토산 나노입자 및 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르를 반응시키고, 반응시킨 키토산 나노입자를 상기 글루코스산화효소와 반응시켜서 공유접합체를 제조하였다.
- [0115] 그 후 글루코스산화효소 및 석출화제로 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 1 : 75 의 중량비로 반응시켜서 글루코스산화효소 응집체를 제조하고, 공유접합체 100 중량부에 대하여 글루코스산화효소 응집체 5000 중량부 및 EGDGE 460 ~ 4370 중량부를 35℃에서 8시간 동안 50 rpm으로 랙킹(racking)하며 반응시켜서 효소 복합체를 제조하였다.
- [0117] **실시예 18**
- [0118] 실시예 17과 동일하게 실시하되, 글루코스산화효소 및 석출화제로 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 1 : 100 의 중량비로 반응시켜서 제조하였다.
- [0120] **실시예 19**
- [0121] 실시예 17과 동일하게 실시하되, 글루코스산화효소 및 석출화제로 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 1 : 125 의 중량비로 반응시켜서 제조하였다.
- [0123] **실시예 20**
- [0124] 실시예 17과 동일하게 실시하되, 석출화제를 사용하지 않고 제조하였다.
- [0126] **실시예 21**
- [0127] 실시예 17과와 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 EGDGE 460 중량부를 반응시켜서 제조하였다.
- [0129] **실시예 22**
- [0130] 실시예 18과 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 EGDGE 460 중량부를 반응시켜서 제조하였다.
- [0132] **실시예 23**
- [0133] 실시예 19와 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 EGDGE 460 중량부를 반응시켜서 제조하였다.
- [0135] **실시예 24**

- [0136] 실시예 21와 동일하게 실시하되, 석출화제를 사용하지 않고 제조하였다.
- [0138] **실시예 25**
- [0139] 실시예 17와 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 EGDGE 862.5 중량부를 반응시켜서 제조하였다.
- [0141] **실시예 26**
- [0142] 실시예 18과 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 EGDGE 862.5 중량부를 반응시켜서 제조하였다.
- [0144] **실시예 27**
- [0145] 실시예 19와 동일하게 실시하되, 공유접합체 100 중량부에 대하여 EGDGE 862.5 중량부를 반응시켜서 제조하였다.
- [0147] **실시예 28**
- [0148] 실시예 25와 동일하게 실시하되, 석출화제를 사용하지 않고 제조하였다.
- [0150] **비교예 1**
- [0151] 준비예 1에 따른 상기 나노섬유를 에탄올 처리를 통해, 도 3a와 같은 섬유 공간이 확장 된 고분자 나노섬유를 제조하였다.
- [0153] **비교예 2**
- [0154] 준비예 2에 따른 상기 키토산 나노입자 100 중량부에 대하여 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르 110 중량부 및 글루코스산화효소 500 중량부를 준비하였다. 상기 키토산 나노입자 및 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르 를 반응시키고, 반응시킨 키토산 나노입자를 상기 글루코스산화효소와 반응시켜서 공유접합체를 제조하였다.
- [0156] **비교예 3**
- [0157] 준비예 2에 따른 상기 키토산 나노입자 100 중량부에 대하여 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르 110 중량부 및 트립신 500 중량부를 준비하였다. 상기 키토산 나노입자 및 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르를 반응시키고, 반응시킨 키토산 나노입자를 상기 트립신과 반응시켜서 공유접합체를 제조하였다.
- [0159] **비교예 4**
- [0160] 준비예 1에 따른 상기 나노섬유를 에탄올 처리를 통해, 도 3a와 같은 섬유 공간이 확장 된 고분자 나노섬유를 제조하고, 상기 나노섬유 100 중량부에 대하여 글루코스산화효소 6000 중량부를 반응시켜서 효소 복합체를 제조하였다.
- [0162] **비교예 5**
- [0163] 준비예 2에 따른 상기 키토산 나노입자 100 중량부에 대하여 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르 460 중량부 및 글루코스산화효소 5000 중량부를 준비하였다. 상기 키토산 나노입자 및 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르를 반

응시시키고, 반응시킨 키토산 나노입자를 상기 글루코스산화효소와 반응시켜서 공유접합체를 제조하였다.

[0165] **실험예 1: 활성 측정**

[0166] TMB, glucose, horseradish peroxid를 혼합한 혼합물 및 실시예 2 ~ 28 및 비교예 2 ~ 5에 따른 효소복합체를 9 : 1 의 중량비로 반응시킨 후, 23℃에서 파장 655 nm의 조사하여 혼합물에 발색 반응이 일어나는 시간을 측정하여 활성을 측정하였다.

[0167] 도 5는 실시예 2 및 비교예 2에 따른 효소 복합체의 활성 측정 그래프 인데, 도 5에서 볼 수 있듯이 실시예 2에 따른 효소 복합체의 활성이 비교예 2에 따른 효소 복합체의 활성에 비하여 높은 것을 알 수 있다.

[0168] 또한, 도 6은 실시예 3 및 비교예 3에 따른 효소 복합체의 활성 측정 그래프 인데, 도 6에서 볼 수 있듯이 실시예 3에 따른 효소 복합체의 활성이 비교예 3에 따른 효소 복합체의 활성에 비하여 현저히 높은 것을 알 수 있다.

[0169] 또한, 도 7는 실시예 4 및 비교예 4에 따른 효소 복합체의 활성 측정 그래프 인데, 도 7에서 볼 수 있듯이 실시예 4에 따른 효소 복합체의 활성이 비교예 4에 따른 효소 복합체의 활성에 비하여 현저히 높은 것을 알 수 있다.

[0170] 또한, 도 8은 실시예 5 ~ 8 및 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성 측정 그래프 인데, 도 8에서 볼 수 있듯이 실시예 5 ~ 8에 따른 효소 복합체의 활성이 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성에 비하여 높은 것을 알 수 있다.

[0171] 또한, 도 9는 실시예 9 ~ 12 및 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성 측정 그래프 인데, 도 9에서 볼 수 있듯이 실시예 9 ~ 12에 따른 효소 복합체의 활성이 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성에 비하여 높은 것을 알 수 있다.

[0172] 또한, 도 10은 실시예 13 ~ 16 및 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성 측정 그래프 인데, 도 10에서 볼 수 있듯이 실시예 13 ~ 16에 따른 효소 복합체의 활성이 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성에 비하여 높은 것을 알 수 있다.

[0173] 또한, 도 11은 실시예 17 ~ 20 및 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성 측정 그래프 인데, 도 11에서 볼 수 있듯이 실시예 17 ~ 20에 따른 효소 복합체의 활성이 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성에 비하여 높은 것을 알 수 있다.

[0174] 또한, 도 12는 실시예 21 ~ 24 및 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성 측정 그래프 인데, 도 12에서 볼 수 있듯이 실시예 21 ~ 24에 따른 효소 복합체의 활성이 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성에 비하여 높은 것을 알 수 있다.

[0175] 또한, 도 13은 실시예 25 ~ 28 및 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성 측정 그래프 인데, 도 10에서 볼 수 있듯이 실시예 25 ~ 28에 따른 효소 복합체의 활성이 비교예 5에 따른 효소 복합체의 활성에 비하여 높은 것을 알 수 있다.

[0177] **실험예 2: 접착능력 측정**

[0178] 실시예 1 및 비교예 1에 따른 효소복합체에 대하여 하기 관계식 1에 따라 접착능력을 측정하였다.

[0179] [관계식 1]

[0180]
$$\text{접착능력} = (\text{반응시킨 효소량} - \text{세척 후 감소한 효소량}) / (\text{반응시킨 효소량})$$

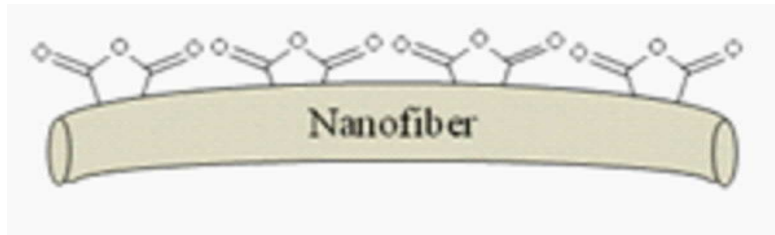
[0181] 구체적으로, 도 4는 실시예 1 및 비교예 1에 따른 효소 복합체의 접착능력을 나타낸 그래프인데, 도 4에서 볼 수 있듯이 실시예 1 에 따른 효소 복합체는 비교예 1에 따른 효소 복합체에 비하여 접착능력이 3배 이상 향상된 것을 알 수 있다.

[0183] **실험예 3: 효소 안정성 측정**

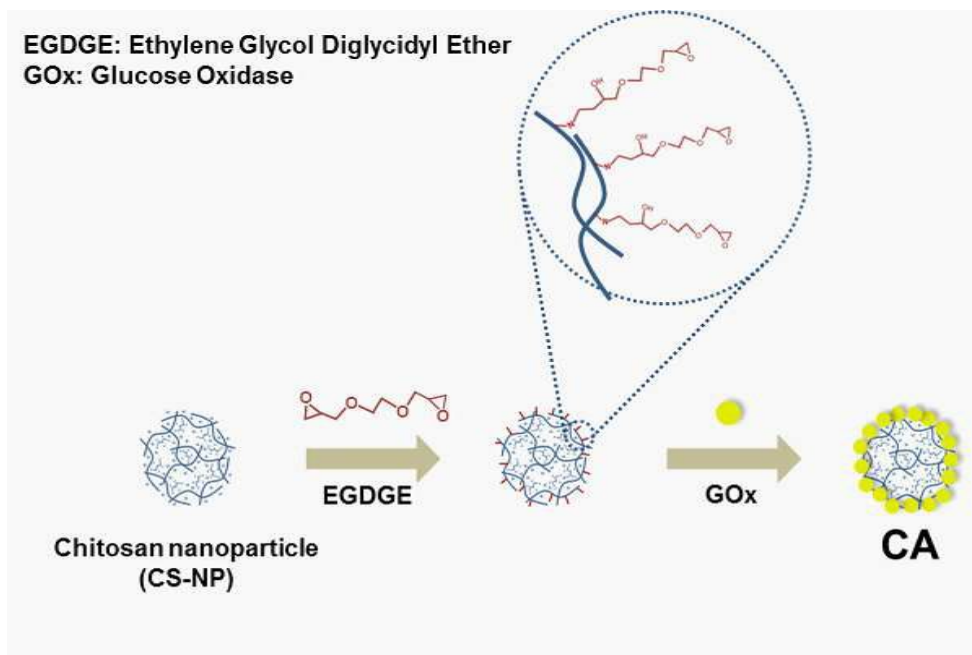
- [0184] 실시예 13 ~ 16 및 비교예 5에 따른 효소 복합체를 60° C의 고온에서 보관 했을 때, 효소 활성 변화에 따른 효소 안정성을 측정하였다.
- [0185] 도 14에서 볼 수 있듯이, 실시예 13 ~ 16 에 따른 효소 복합체는 비교예 5에 따른 효소 복합체에 비하여 안정성이 약 20% 이상 향상된 것을 알 수 있다.

도면

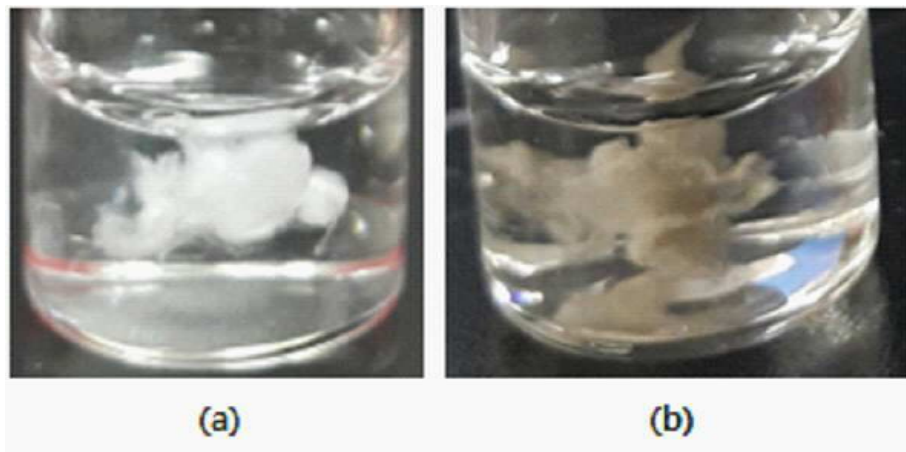
도면1



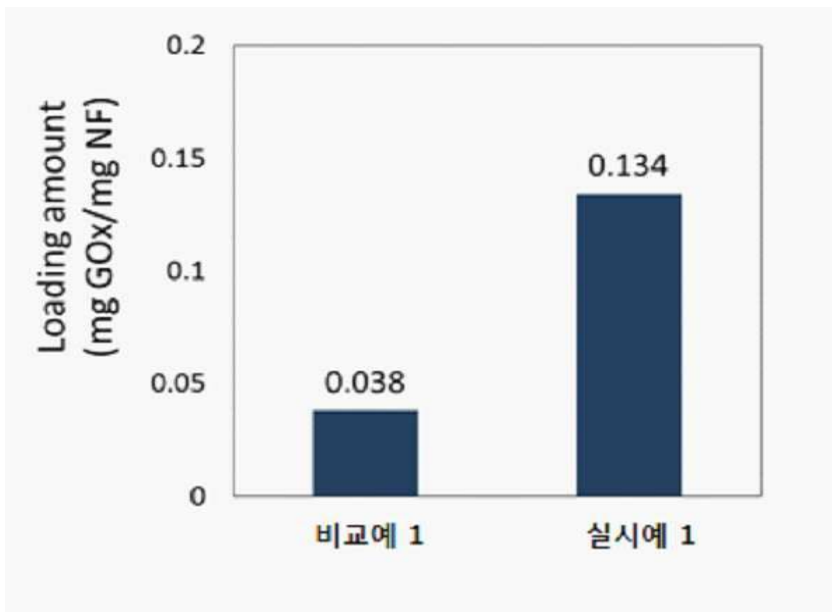
도면2



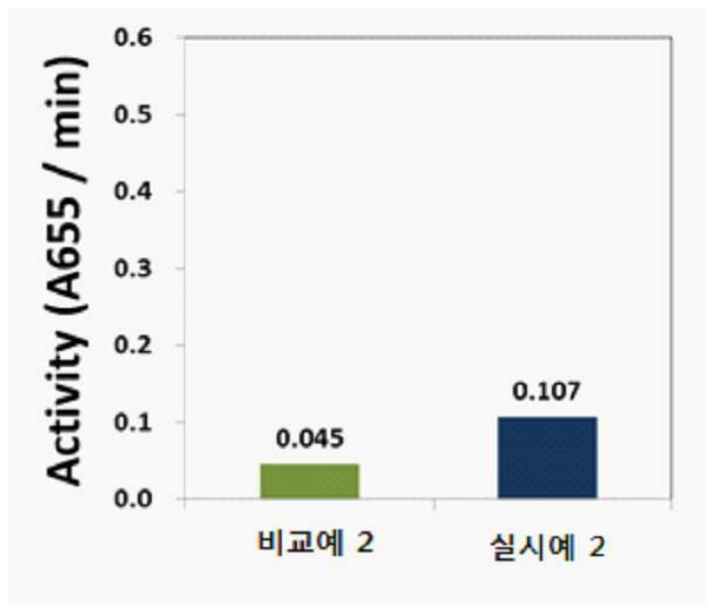
도면3



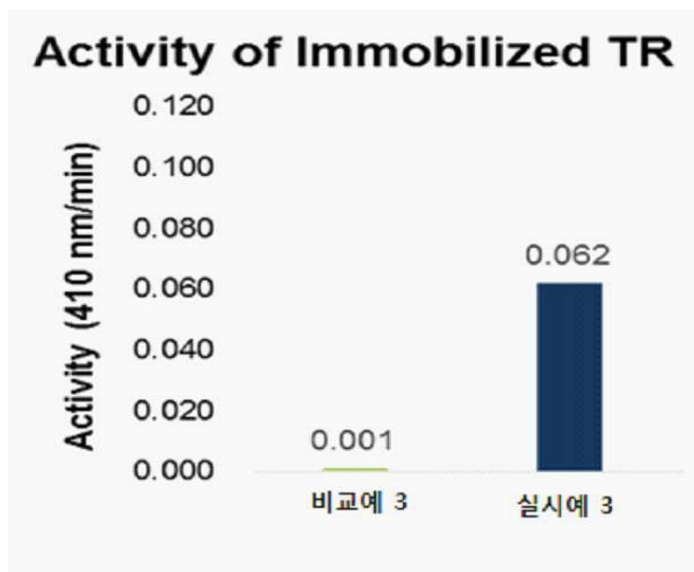
도면4



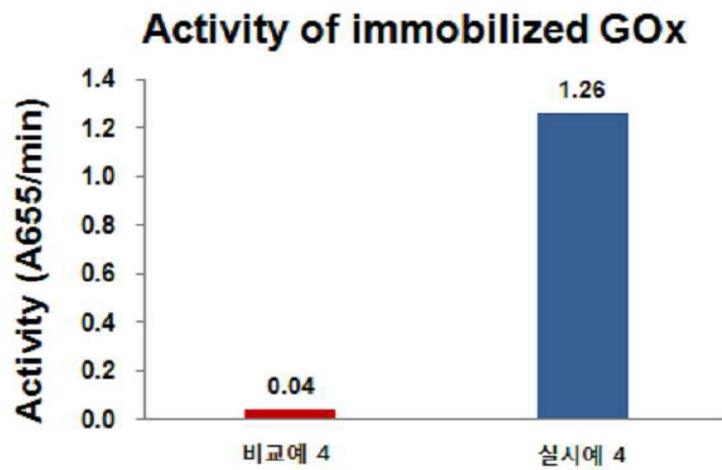
도면5



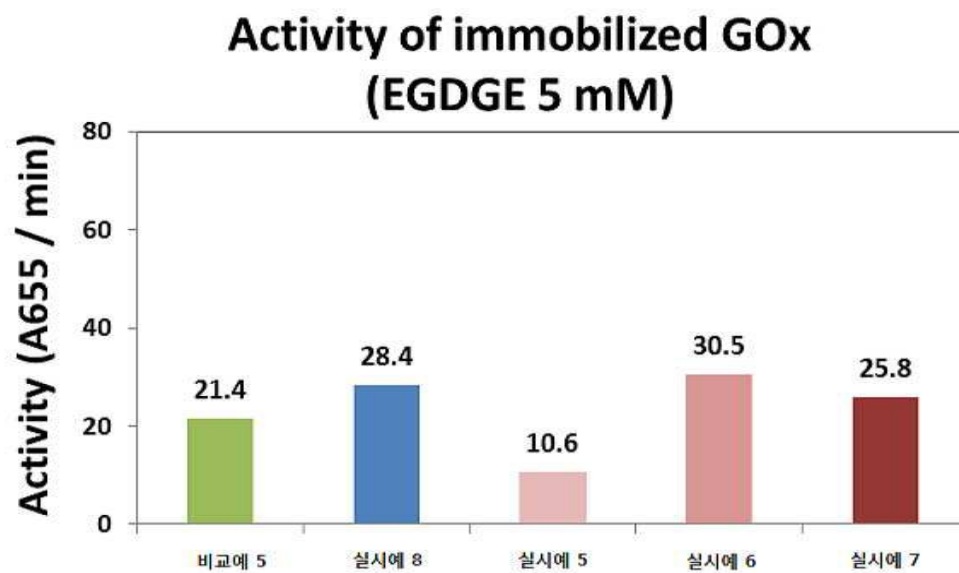
도면6



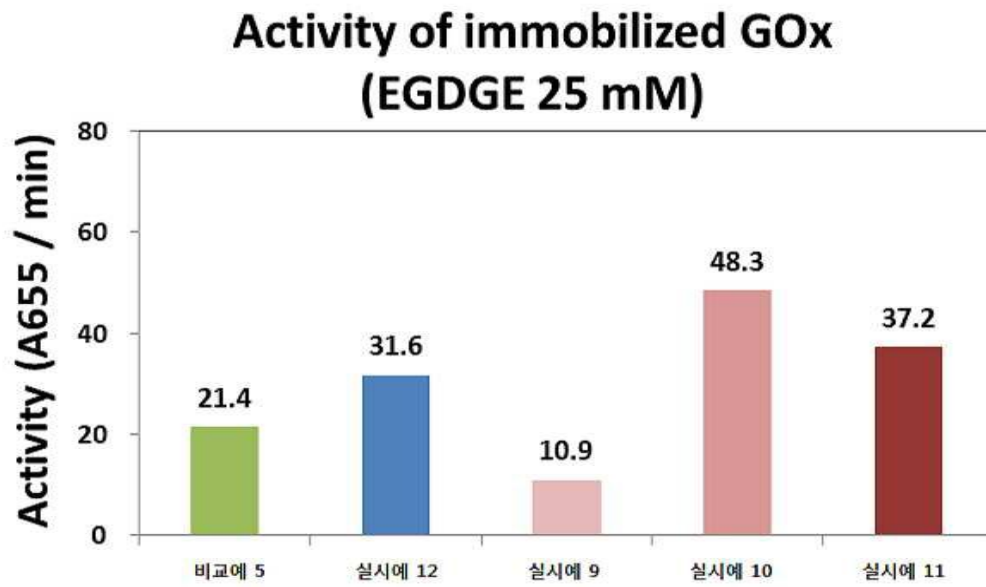
도면7



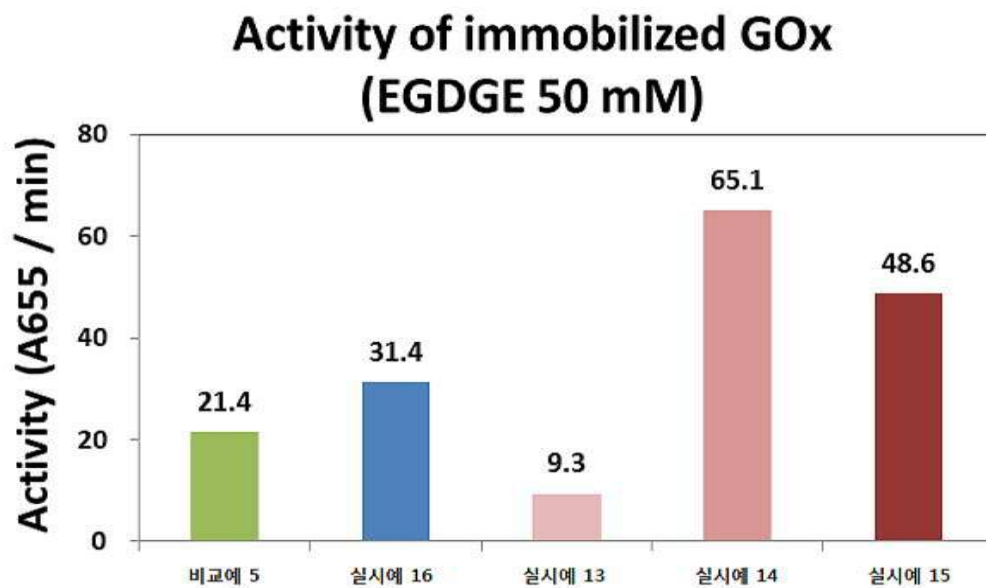
도면8



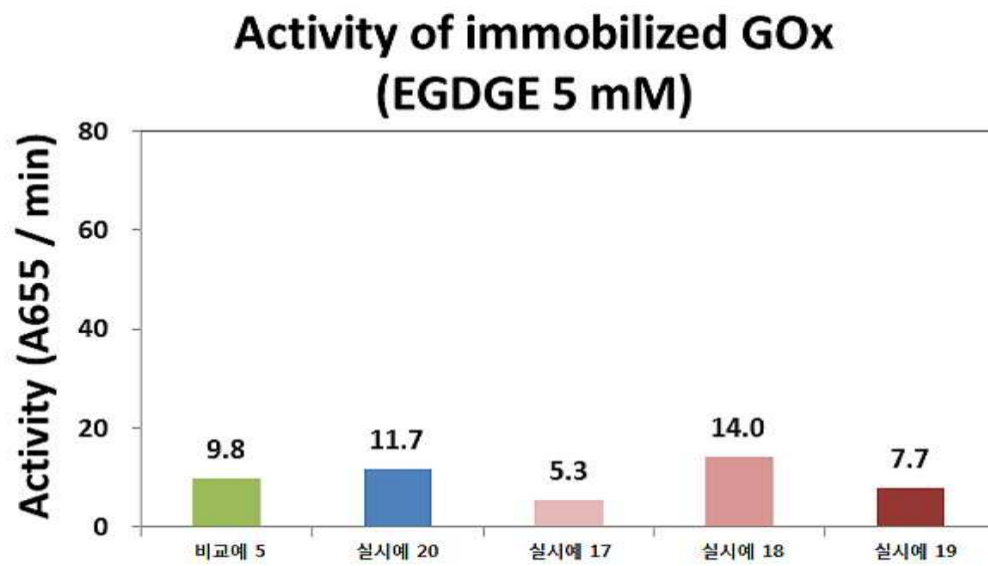
도면9



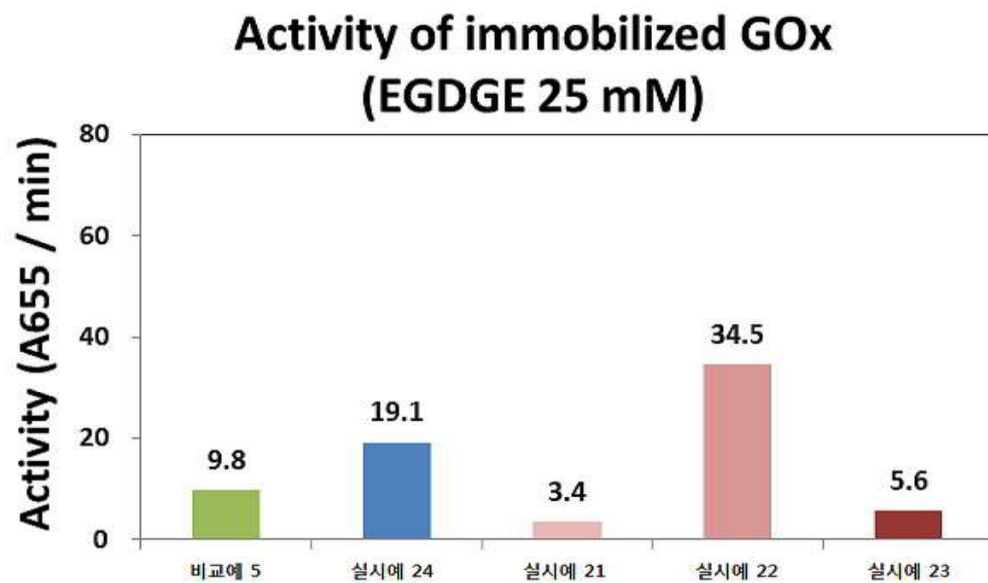
도면10



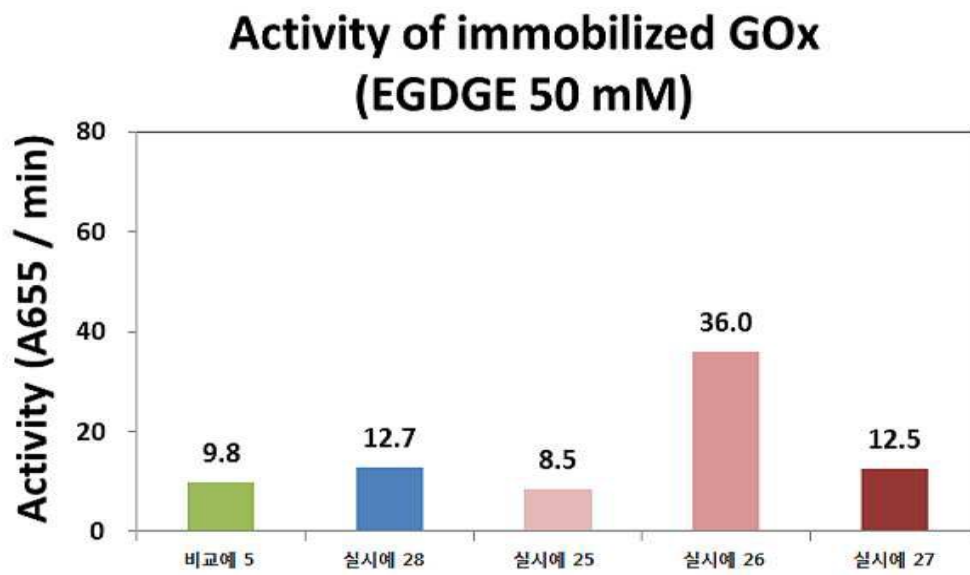
도면11



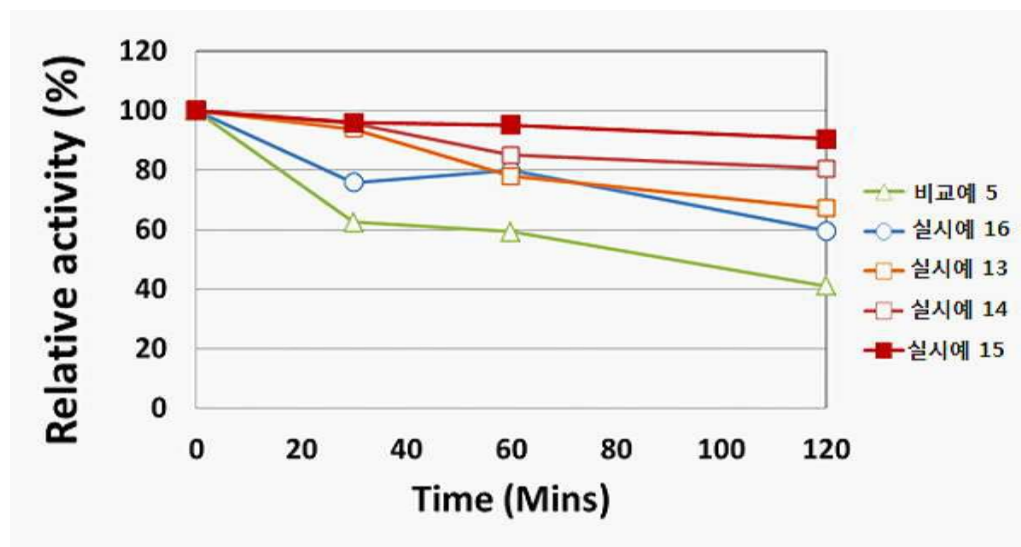
도면12



도면13



도면14



도면15

