

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0124194 (43) 공개일자 2013년11월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C09D 5/16 (2006.01) C09D 201/00 (2006.01) C09D 7/12 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호	10-2013-0044481	(72) 발명자 김중배 서울특별시 강남구 역삼2동 래미안펜타빌@ 101동 1501호
(22) 출원일자	2013년04월22일	이병수 서울특별시 성북구 안암동1가 삼성래미안아파트 103동 1503호
심사청구일자	2013년04월22일	연경민 서울특별시 강동구 성내3동 386-3 진성하우스 20 1호
(30) 우선권주장	1020120046693 2012년05월03일 대한민국(KR)	(74) 대리인 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 14 항

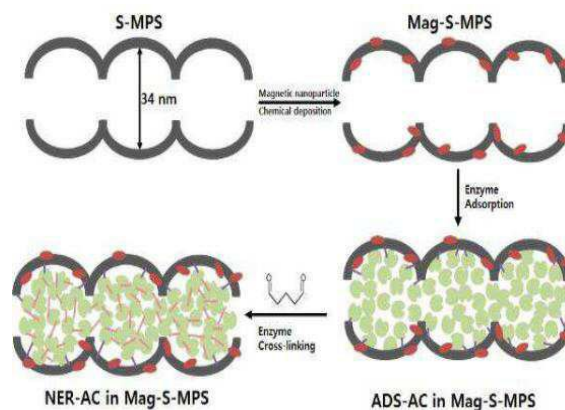
(54) 발명의 명칭 방오용 도료 조성물

(57) 요약

본 발명의 방오효소-다공성 담체 복합체를 포함하는 방오용 도료 조성물은 지나치게 낮은 방오효소의 활성으로 산업적용의 제한을 받았던 기존의 방오효소-기질 복합체에 비하여 향상된 방오 성능을 얻을 수 있어 산업 적용 가능성을 높일 뿐만 아니라, 단가가 저렴한 지지체를 이용하여 경제성 문제도 해결할 수 있다.

또한, 페인트 물질로 널리 사용되고 있는 각종 폴리머 물질과 혼합하여 도료 물질로 개발 후 사용하게 되면, 방오 물질이 사용되는 각종 산업분야(해운 항만 산업, 유체 운송 산업, 수질 처리 산업 등)에 효과적인 적용이 가능하여 환경오염으로 문제가 되어 사용이 제한되고 있는 기존의 화학적 방오물질을 대체하는 물질로 사용이 가능하다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011K000833
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신기술 융합형 성장동력사업
연구과제명	고활성, 고안정 나노-단백질 원천기술 개발 및 ELISA에서의 응용
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.07.01 ~ 2012.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20118510020020-11-1-000
부처명	지식경제부
연구사업명	에너지국제공동연구사업
연구과제명	이산화탄소의 전황공정 개발을 위한 효소 고정화 및 안정화
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.12.01 ~ 2012.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

다공성 담체 및 상기 담체의 기공 내부에 담지되는 방오효소를 포함하는 방오효소-다공성 담체 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다공성 담체는 자성 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방오효소-다공성 담체 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 다공성 담체는 실리카, 알루미나, 니오비움, 탄탈륨, 지르코늄, 카본, 마그네슘, 및 티타늄으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방오효소-다공성 담체 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 방오효소는 아실라제, 락토나제, 프로테아제, 펩톡시데아제, 아미노펩티다아제, 포스파타아제, 트랜스아미나아제, 세린-엔도펩티다아제, 시스테인-엔도펩티다아제 및 메탈로엔도펩티다아제로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이것들의 혼합인 것을 특징으로 하는 방오효소-다공성 담체 복합체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 방오효소-다공성 담체 복합체를 포함하는 방오용 도료조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 방오효소-다공성 담체 복합체를 0.01~50%로 포함하는 것을 특징으로 하는 방오용 도료 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 도료는 아크릴, 에폭시, 우레탄, 실리케이트 및 폴리에스테르로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이것들의 혼합인 것을 특징으로 하는 방오용 도료 조성물.

청구항 8

방오효소-다공성 담체 복합체를 포함하는 방오용 도료 조성물을 제조하는 방법에 있어서,

- (1) 다공성 담체의 기공내부에 방오효소를 흡착시키는 단계;
- (2) 상기 방오효소가 흡착된 다공성 담체에 가교결합제를 첨가하여 방오효소간에 가교결합을 형성하여 방오효소-다공성 담체 복합체를 형성하는 단계; 및
- (3) 상기 방오효소-다공성 담체 복합체를 도료와 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방오용 도료 조성물을 제조하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 다공성 담체에 자성나노입자를 담지하는 단계를 전처리로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방오용 도료 조성물을 제조하는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 가교결합제는 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르알데하이드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신 이미드 에스테르) 및 디에시드 클로라이드로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 방오용 도료 조성물을 제조하는 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 다공성 담체는 실리카, 알루미늄, 니오비움, 탄탈륨, 지르코늄, 카본, 마그네슘, 및 티타늄으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방오용 도료 조성물을 제조하는 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 방오효소는 아실라제, 락토나제, 프로테아제, 펩톡시테아제, 아미노펩티다아제, 포스파타아제, 트랜스아미나아제, 세린-엔도펩티다아제, 시스테인-엔도펩티다아제 및 메탈로엔도펩티다아제로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이것들의 혼합인 것을 특징으로 하는 방오용 도료 조성물을 제조하는 방법.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 방오효소-다공성 담체 복합체를 0.01~50%로 포함하는 것을 특징으로 하는 방오용 도료 조성물을 제조하는 방법.

청구항 14

제8항에 있어서, 상기 도료는 아크릴, 에폭시, 우레탄, 실리케이트, 폴리에스테르로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이것들의 혼합인 것을 특징으로 하는 방오용 도료 조성물을 제조하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 방오용 도료 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 종래의 방오효소를 포함하는 방오 조성물에 비하여 훨씬 많은 양의 방오효소가 담지된 방오용 도료 조성물에 관한 것이다

배경기술

[0002] 방오도료 조성물은 해수 침적 도막의 표면 오염을 유발하는 해양 생물의 부착과 성장을 방지하거나 제어하는 것을 그 목적으로 한다. 선체 바닥(선저부), 수중 구조물 등은 장기간 수중에 노출되는 경우 조개, 굴, 갑각동물 및 삿갓조개와 같은 동물류, 파래(해초)와 같은 식물류 및 수중 박테리아와 같은 각종 수서 생물이 표면에 부착, 증식하여 외관이 불량해지거나 그 기능을 상실하게 된다. 특히 선저부에 이러한 수서 생물이 부착하여 증식하면 선박 외판 전체의 표면 조도가 증가하여 선속이 저하되거나 연료 소비가 증가할 수 있다. 수서 생물을 선저부로부터 제거하기 위해서는 필요 이상의 노력과 오랜 작업 시간이 필요하다. 또한 수중 구조물에 부착하여 번식하는 박테리아 위에 점액(진흙 물질)이나 슬라임(slime) 등이 부착하여 박테리아를 부패시키는 경우나, 점착성을 갖는 대형 생물이 수중 구조물(예:철강 구조물)에 부착, 번식하여 수중 구조물의 부식 방지 도막을 손상시키는 경우, 수중 구조물의 강도나 기능을 저하시켜 수명을 현저히 단축시키는 문제점이 있다.

[0003] 이러한 문제를 방지하기 위하여, 선저부에는 방오성이 뛰어난 방오도료로서 트리부틸주석메타크릴레이트, 메틸메타크릴레이트 등의 공중합체 및 아산화구리(Cu_2O)를 포함하는 방오도료 조성물을 도장하는 것이 일반적이다.

[0004] 이 방오도료 조성물을 구성하는 공중합체는 해수 중에서 가수분해되어, 비스트리부틸주석옥사이드($\text{Bu}_3\text{Sn}-\text{OSnBu}_3$ (Bu는 부틸기)) 또는 트리부틸주석할로젠화물(Bu_3SnX (X는 할로젠 원자))과 같은 유기 주석 화합물을 방출하여 방오효과를 나타낸다. 또한 상기 공중합체는 가수분해성 자기연마형(self-polishing) 도료이기 때문에, 가수분해된 공중합체 자체도 수용성으로 바뀌어 해수 중에 용해됨으로써, 선저부 도막 표면에는 수지 잔류물이 남지 않고 지속적으로 활성을 갖는 표면을 유지한다.

[0005] 그러나 전술한 유기 주석 화합물은 그 독성이 매우 강하고 해양 오염, 기형 어류 또는 기형 조개의 발생, 먹이사슬을 통한 수중 생태계의 파괴 등을 일으킬 가능성이 높다. 이러한 문제점으로 인하여 종래의 유기 주석계 방오도료를 대체할 수 있는 비주석계(tin free) 방오도료의 개발이 요구되었다.

[0006] 최근, 주석을 대체하기 위하여 아연, 구리, 실릴, 실리콘, 이산화동 등 다양한 물질과 마모성이 좋은 재료 등이

사용되고 있다. 기존의 도료는 산기 함유 고분자에 금속아세테이트와 같이 메탈 에스테르 화합물을 혼합하여 부분적으로 겔화된 바인더를 이용하는 것이다. 이러한 바인더는 필름 형성 능력 및 저장성 등이 나빠 크랙이 발생하거나 연마성이 떨어지고 고점도화로 적용이 어려운 면이 있었다. 또한 종래의 아크릴 고분자에 아크릴산 아연과 같이 메탈 에스테르 화합물을 혼합하여 부가중합한 타입은 마모도 조절이 양호하지 않아 장기 마모성에서 불안하다는 문제점이 있었다.

[0007] 또한 결정적으로 이들 물질들 역시 중금속 등을 포함하고 있어 생태계에 악영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

[0008] 이에, 한국특허출원 제2001-7010883호에서는 에폭시 또는 유리섬유에 방오효소 또는 이를 생산하는 미생물을 포함하는 선박 방오용 조성물을 개시하였다. 또한 한국특허출원 2002-7012611호에서는 로진과 방오효소를 포함하는 방오용 조성물을 개시하고 있으며 로진은 방오효소의 고정화 효과를 가지며 방오효소가 외부로 배출하는 것을 방지하는 역할을 수행한다. 그러나, 이들 종래기술들은 모두 지지체에 고정되는 방오효소의 양이 극히 적어 방오효과가 낮을 뿐 아니라 시간이 경과하면 방오효소가 외부로 쉽게 유출되어 방오효과가 급격히 떨어지는 문제가 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상술한 바와 같이 기존의 방오효소를 포함하는 방오용 도료조성물은 지나치게 낮은 활성으로 인해 실제 산업에 적용하였을 때 방오 성능이 현저하게 낮을 뿐 아니라 오랜 시간이 경과하는 경우 방오 효과가 급격하게 떨어지는 문제점이 있었다.

[0010] 이에, 본 발명은 상술한 문제를 극복하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 해결하려는 과제는 종래의 방오효소를 포함하는 방오용 조성물에 비하여 현저하게 많은 양의 방오효소를 포함하며 시간이 경과하여도 방오효소가 외부로 거의 유출되지 않는 방오용 조성물을 포함하는 방오용 도료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 상술한 문제를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 해결하려는 과제는 다공성 담체 및 상기 담체의 기공 내부에 담지되는 방오효소를 포함하는 방오효소-다공성 담체 복합체를 제공한다.

[0012] 본 발명에 따른 일 구체예로서, 본 발명은 방오효소-다공성 담체를 도료에 혼합한 도료 조성물을 제공한다.

[0013] 여기서, 상기 방오효소는 다공성 담체 내부에 담지되어 가교결합에 의하여 복합체를 형성할 수 있다.

[0014] 상기 다공성 담체는 실리카, 알루미늄, 니오비움, 탄탈륨, 지르코늄, 카본, 마그네슘, 및 티타늄으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0015] 상기 방오효소는 아실라제, 락토나제, 프로테아제, 퍼옥시테아제, 아미노펩티다아제, 포스파타아제, 트랜스아미나아제, 세린-엔도펩티다아제, 시스테인-엔도펩티다아제 및 메탈로엔도펩티다아제로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 상기 다공성 담체는 자성나노입자를 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 다공성 담체 내부의 기공크기는 1 ~ 1000nm 일 수 있다.

[0018] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 다공성 담체는 내부에 효소와 공유결합할 수 있는 작용기를 포함할 수도 있고, 포함하지 않을 수도 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 방오효소-다공성 담체 복합체는 전체 도료조성물에 대하여 0.01 ~ 50 중량% 포함될 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 따른 도료 조성물을 제조하는 방법은 다음의 단계를 포함한다:

[0021] (1) 다공성 담체의 기공내부에 방오효소를 흡착시키는 단계;

[0022] (2) 상기 방오효소가 흡착된 다공성 담체에 가교결합제를 첨가하여 방오효소간에 가교결합을 형성하여 다공성 담체-방오효소 복합체를 형성하는 단계; 및

- [0023] (3) 상기 다공성 담체-방오효소 복합체를 도료와 혼합하는 단계
- [0024] 상기에서 방오효소 복합체는 그 직경이 다공성 담체 기공의 입구크기보다 클 수 있다. 따라서, 다공성 담체의 기공으로부터 쉽게 탈출하지 못하고 담체 내에 안정적으로 고정화될 수 있다.
- [0025] 또는, 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 (1) 단계에서 다공성 담체에 효소와 가교결합제를 동시에 첨가하여 방오효소 복합체를 제조할 수도 있다.
- [0026] 상기 가교결합제는 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르알데하이드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미드 에스테르) 및 디에시드 클로라이드로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명의 방오효소-다공성 담체 복합체를 포함하는 방오용 도료 조성물은 지나치게 낮은 방오효소의 활성으로 산업적용의 제한을 받았던 기존의 방오효소-기질 복합체에 비하여 향상된 방오 성능을 얻을 수 있어 산업 적용 가능성을 높일 뿐만 아니라, 단가가 저렴한 지지체를 이용하여 경제성 문제도 해결할 수 있다.
- [0028] 또한, 페인트 물질로 널리 사용되고 있는 각종 폴리머 물질과 혼합하여 도료 물질로 개발 후 사용하게 되면, 방오 물질이 사용되는 각종 산업분야(해운 항만 산업, 유체 운송 산업, 수질 처리 산업 등)에 효과적인 적용이 가능하여 환경오염으로 문제가 되어 사용이 제한되고 있는 기존의 화학적 방오물질을 대체하는 물질로 사용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 구형 다공성 실리카를 자성-다공성 실리카로 만든 후 방오효소를 고정화시키는 공정을 나타내는 모식도이다.
- 도 2는 상업적으로 구매가 가능한 구형 다공성 실리카 물질(좌)과 자성나노입자를 화학적으로 부착시킨 자성-다공성 실리카(우)의 이미지를 나타낸 것이다.
- 도 3은 방오효소-자성-다공성 실리카 방오물질을 자석에 의해 형성된 자기장을 이용하여 용액에서 분리되는 모습을 촬영한 사진이다.
- 도 4는 형광-분광광도계를 이용한 방오효소(Free AC), 방오효소가 흡착된 자성-다공성 실리카 복합체(ADS-AC/Mag-S-MPS), 방오효소가 흡착 후 가교결합된 자성-다공성 실리카 복합체(NER-AC/Mag-S-MPS)의 초기 활성(initial rate)을 측정한 값을 나타낸 것이다.
- 도 5는 바이오필름이 형성되는 조건하에서 방오효소가 흡착 후 가교결합된 자성-다공성 실리카 복합체(NER-AC/Mag-S-MPS)의 방오작용을 확인하기 위해 진행한 실험으로, 오염이 그대로 진행되는 조건(a, wastewater + S. Aeruginosa), 오염이 진행되는 조건에 자성-다공성 실리카 물질을 넣은 조건(b, wastewater + S. Aeruginosa + Mag-S-MPS), 오염이 진행되는 조건에 방오효소-자성-다공성 실리카 물질을 넣은 조건(c, wastewater + S. Aeruginosa + NER-AC/Mag-S-MPS)을 비교한 결과이다. 그래프는 각각의 조건에서 오염이 유도된 분리막 필터(membrane filter)의 투수도를 확인하여 초기 투수도 값에 대해 시간에 따른 상대 투수도 값을 나타낸 것이다.
- 도 6은 투수도 측정을 위해 설치한 장비 모식도이다.
- 도 7은 도 5에 나타난 각각의 조건을 통해 오염이 유도된 분리막의 표면을 공초점 주사 현미경을 통해 관찰한 결과 이미지를 나타낸 것이다.
- 도 8은 일정 유량으로 분리막 필터를 통과하는 흐름을 유도하였을 때, 바이오필름 형성에 의해 변화하는 투과압력(trans-membrane pressure, TMP)을 측정하기 위한 장치를 나타낸 모식도이다.
- 도 9는 도료만을 분리막 필터에 도포한 조건과 방오효소-자성-다공성 실리카와 도료의 혼합물을 분리막 필터에 도포한 조건의 바이오필름 형성에 따른 투과압력(trens membrane pressure, TMP)을 측정한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적

으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0031] 용어 '방오효소(antifouling enzyme)'라 함은 방오 조성물에 포함되어 생물학적 방오 작용을 통해 물질의 표면에 오염물질이 부착 및 성장하는 것을 방지하는 효소를 의미한다. 예를 들어, 생물학적 오염물질의 표면 부착 및 성장은 독특한 신호전달 체계(quorum sensing system)에 의해 진행되며 신호전달 물질(quorum sensing materials)은 N-acyl homoserine lactone (AHL) 계열의 화합물인데 방오효소는 이 화합물을 가수분해 하여 신호전달을 불능화(quorum quenching) 시키는 작용을 한다. 한편, 한국특허출원 제2001-7010883호 및 한국특허출원 2002-7012611호에 개시된 방오효소는 본 발명에 포함될 수 있다.

[0032] 용어 '다공성 담체'라 함은 내부에 1 ~ 1000nm 크기의 다수의 기공을 갖는 담체를 의미하며 기공의 크기에 따라 마이크로포러스(microporous, pore < 2 nm), 메조포러스(mesoporous, 2 nm < pore < 50 nm), 매크로포러스(macroporous, pore > 50 nm) 물질로 구분할 수 있다.

[0033] 도 1은 다공성 담체의 기공 내부에 효소를 담지하는 단계를 나타내는 모식도이다.

[0034] 먼저 다공성 담체의 기공 내부에 나노자성입자를 담지한 후 효소를 다공성 담체의 내부로 충전한다. 그러면 도 1의 우측 하단과 같이 다공성 담체의 기공 내부에 효소들이 흡착된다. 그러나 다공성 담체의 내부에 흡착된 일부 효소들을 제외하고 나머지 효소들은 별다른 결합없이 기공내부에 포함된 상태이므로 외부에서 액체가 유입되거나 외압이 가해지는 경우에는 흡착된 일부효소를 제외하고 나머지 효소들은 다공성 담체의 외부로 유출하게 된다. 또한 흡착된 일부효소들 역시 시간이 지날수록 흡착력이 감소하여 결국 외부로 유출하게 된다. 이로 인해, 다공성 담체의 효소의 안정성이 떨어지게 되는 것이다.

[0035] 이에 대하여, 기공내부에 포함된 효소들에 대하여 가교결합제를 첨가하면 기공내부에 흡착된 효소들 및 흡착되지 않은 효소들간에 가교결합이 형성되어 효소복합체가 형성된다. 그 결과 가교결합된 효소복합체는 다공성 담체의 기공 입구의 크기보다 더 커지게 되며 그 결과 현저하게 많은 양의 효소가 다공성 담체의 내부에 담지될 수 있을 뿐 아니라 시간이 경과하여도 상기 기공 내부에 방오효소 집합체가 위치하게 되므로 다공성 담체의 내부를 효소와 공유결합할 수 있는 작용기를 형성하도록 개질하지 않아 다공성 담체와 방오효소간의 공유결합과 같은 직접적인 결합관계가 형성되지 않는다 하더라도 방오효소 집합체가 다공성 담체 내부에 장기간 구비될 수 있는 것이다.

[0036] 먼저, 본 발명에 사용되는 다공성 담체를 설명한다. 통상적으로 효소를 담지하는데 사용되는 다공성 담체라면 제한없이 사용될 수 있다. 바람직하게는 상기 다공성 담체는 실리카, 알루미늄, 니오비움, 탄탈륨, 지르코늄, 카본, 마그네슘, 및 티타늄으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며 MPS (mesoporous silica), MCM (mobil composition of matter), SBA (Santa Barbara materials), CNS (MPS with cyano-funtional groups), OMC (ordered mesoporous carbon), MCF-C (mesocellular carbon foam) 또는 SCMS (supplementary cementitious materials)의 형태로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 MCF (mesocellular foam) 일 수 있다.

[0037] 한편, 본 발명에 사용될 수 있는 방오효소는 다공성 담체 내부에 담지되어 도료 내에서 방오효과를 발생시킬 수 있는 것이면 제한없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 아실라제, 락토나제, 프로테아제, 퍼옥시데아제, 아미노 펩티다아제, 포스파타아제, 트렌스아미나아제, 세린-엔도펩티다아제, 시스테인-엔도펩티다아제 및 메탈로엔도펩티다아제로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 혼합하여 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0038] [준비예]

[0039] 자성-다공성 실리카 물질 제조

[0040] 방오효소 고정화를 위한 자성-다공성 실리카는 다공성 실리카 물질에 화학적 흡착법(chemical deposition)을 이용하여 자성나노입자(magnetic nanoparticle)를 고정하는 방법을 사용하였다. 1 g의 구형 메소포러스 실리카(spherical mesoporous silica)와 0.5 g의 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 를 20 ml의 에탄올에 녹여 준비하였다. 상온 조건에서 에탄올 용액이 다 증발될 때까지 교반을 하고 남은 샘플을 100 °C에서 400 °C까지 분당 3 °C를 올려 주면서 완전 건조 시키면 자성-다공성 실리카를 준비하였다.

[0041] [비교예]

[0042] 방오효소 흡착방법을 이용한 방오효소 고정방법(Enzyme adsorption, ADS)에 따라 방오효소-자성-다공성 복합체

제조

[0043] 실시예 1에서 제조된 자성-다공성 실리카와 방오효소(아실라아제, acylase, AC)를 혼합하여 방오효소가 흡착(enzyme adsorption)된 자성-다공성 실리카를 합성하였다. 구체적으로 상기 실시예 1에서 제조된 자성-다공성 실리카 10 mg과 1.5 ml 의 방오효소를 2 ml의 centrifuge tube에서 혼합해 주며, 이때 방오효소는 100 mM의 인산완충액에 2 mg/ml의 농도로 준비하여 사용하였다. 준비된 방오효소-자성-다공성 실리카 혼합물은 상온에서 30 분 동안 교반기를 이용하여 50 rpm으로 교반하여 주었다. 이 과정을 통해 방오효소는 자성-다공성 실리카 공극 표면에 흡착을 하게 된다. 미 부착된 방오효소를 제거하고 고분자 나노섬유에 남아있는 미 반응 방오효소 부착 작용기를 캡핑(capping) 해주기 위해, 원심 분리 후 상등액을 제거하고 100 mM 트리스 완충액을 이용하여 30분 동안 교반기를 이용하여 200 rpm 으로 교반시켜 주었다. 캡핑 반응 종료 후, 남은 트리스 완충액을 제거하기 위해 100mM 인산완충액을 이용하여 씻어 주었다.

실시예 1

[0044] **방오효소 흡착 후 가교결합방법을 이용한 방오효소-자성-다공성 실리카 복합체 제조**

[0045] 실시예 1에서 제조된 자성-다공성 실리카와 방오효소(아실라아제, acylase, AC)를 혼합하여 방오효소가 흡착 후 가교결합시키는 방법을 이용한 방오효소고정방법(nanoscale enzyme reactor, NER)으로 복합체를 합성하였다. 구체적으로 상기 준비예에서 제조된 자성-다공성 실리카와 방오효소(아실라아제, acylase, AC)를 혼합하여 방오효소가 흡착(enzyme adsorption)된 자성-다공성 실리카를 합성하였다. 구체적으로 상기 제조예에서 제조된 자성-다공성 실리카 10 mg과 1.5 ml 의 방오효소를 2 ml의 centrifuge tube에서 혼합해 주며, 이때 방오효소는 100 mM의 인산완충액에 2 mg/ml의 농도로 준비하여 사용하였다. 준비된 방오효소-자성-다공성 실리카 혼합물은 상온에서 30분 동안 교반기를 이용하여 50 rpm으로 교반하여 주었다. 이 과정을 통해 방오효소는 자성-다공성 실리카 공극 표면에 흡착을 하게 된다. 이후 흡착된 방오효소간의 공유결합을 통한 가교결합을 유도하기 위해 가교결합제인 글루타알데히드를 전체부피의 0.1 %가 되도록 첨가해 주었다. 충분한 가교결합을 위해 상온 조건에서 2시간동안 로커를 이용하여 50rpm으로 교반시켜 주었다. 미 부착된 방오효소를 제거하고 자성-다공성 실리카에 남아있는 미 반응 방오효소 부착 작용기를 캡핑(capping) 해주기 위해, 원심 분리 후 상등액을 제거하고 100 mM 트리스 완충액을 이용하여 30분 동안 교반기를 이용하여 200 rpm 으로 교반시켜 주었다. 캡핑 반응 종료 후, 남은 트리스 완충액을 제거하기 위해 100mM 인산완충액을 이용하여 씻어 주었다. 이러한 과정을 통해 제조된 방오효소가 흡착 후 나노효소반응기 방법을 이용한 방오효소-자성-다공성 실리카 복합체 (NER-AC/Mag-S-MPS)는 사용시까지 4℃에 보관하면 활성의 감소 없이 사용시까지 보관이 가능하다.

실시예 2

[0046] **방오효소-자성-다공성 실리카 복합체의 방오효소 활성 및 안정성 측정**

[0047] 상기 실시예 1 및 비교예를 통해 제조된 방오효소가 흡착된 자성-다공성 실리카 복합체(ADS-AC/Mag-S-MPS), 방오효소 흡착 후 나노효소반응기(nanoscale enzyme reactor, NER) 방법(가교결합)을 이용한 방오효소-자성-다공성 실리카 복합체(NER-AC/Mag-S-MPS)의 방오효소 활성을 형광-분광광도계 (Spectrofluorophotometer, Shimadzu RF-5301)를 이용하여 측정하였다.

[0048] 구체적으로 4℃에서 보관중이던 방오효소-고분자 나노섬유 복합체를 100 mM 인산완충액을 이용하여 자성-다공성 실리카 무게 기준 0.5 mg/ml로 희석시켜 준비하였다. 그리고 반응 용액으로 10 mM의 N-아세틸-L-메티오닌을 준비하며 이때의 용액 조성은 1.9125 mg의 N-아세틸-L-메티오닌을 100mM 인산완충액에 용해시켜 사용한다. 이렇게 만들어진 두 가지 용액을 이용하여 방오효소의 활성을 측정하였다. 방오효소의 활성을 측정하기 위해 1 ml의 방오효소-자성-다공성 실리카 복합체와 1 ml의 10 mM의 N-아세틸-L-메티오닌 용액을 혼합하여 정해진 시간동안 교반 조건에서 N-아세틸-L-메티오닌의 분해반응을 진행하였다. N-아세틸-L-메티오닌은 방오효소에 의해 아세트산과 L-메티오닌으로 분해되고, 분해된 L-메티오닌은 0.1 mg의 o-프탈알데히드(OPA)를 50 mM 나트륨 보레이트 완충액에 녹인 OPA 용액과 반응하여 형광을 띄게 된다. 시간에 따라 OPA물질과 결합이 가능한 L-메티오닌의 양이 많아지며 이에 따라 형광-분광광도계 상에서 나타나는 형광값 또한 증가한다.

[0049] 도 4는 Free AC, ADS-AC/Mag-S-MPS, NER-AC/Mag-S-MPS 샘플의 활성을 측정한 결과를 활성 확인 첫 날의 활성값을 100으로 했을 때 활성의 상대값을 그래프로 나타낸 것이다.

[0050] 도 4를 통해 확인할 수 있듯이, 방오효소 흡착 후 가교결합 방법을 이용한 방오효소-자성-다공성 실리카 복합체(NER-AC/Mag-S-MPS)가 방오효소 활성 안정성이 가장 뛰어난 것으로 확인이 되었다. 방오효소-고분자 나노섬유

복합체를 실온조건 100mM 인산완충액에서 교반기를 이용하여 200rpm으로 지속적으로 교반시켜 주면서 활성을 측정
한 결과, free AC, ADS-AC의 활성반감기는 각각 1일, 5일 미만인 것으로 확인 되었지만 NER-AC는 33일이 지난
시점까지 활성이 80% 이상 유지되어 안정화된 활성을 보여주고 있다.

실시예 3

[0051] 오염이 유도된 분리막 필터의 투수도 확인을 통한 방오횜소-자성-다공성 실리카 복합체의 바이오필름 형성 억제
성능 확인.

[0052] 상기 실시예 1을 통해 제조된 방오횜소-자성-다공성 실리카 복합체(NER-AC/Mag-S-MPS)의 방오횜소 활성을 분리
막 필터에 오염이 유도되는 조건을 조성한 뒤 분리막 필터 표면에 발생한 바이오필름에 의해 결정되는 투수도의
변화를 관찰 하였다.

[0053] 구체적으로 오염이 그대로 진행되는 조건(a, wastewater (39.5 ml) + S. Aeruginosa (0.5 ml)), 오염이
이 진행되는 조건에 자성-다공성 실리카 물질을 넣은 조건(b, wastewater (38.7 ml) + S. Aeruginosa (0.5 ml)
+ Mag-S-MPS (0.8 ml of 0.5 mg/ml)), 오염이 진행되는 조건에 방오횜소-자성-다공성 실리카 물질을 넣은 조건
(c, wastewater (38.7 ml) + S. Aeruginosa (0.5 ml) + NER-AC/Mag-S-MPS (0.8 ml of 0.5 mg/ml))의 샘플을
준비하여 1일 간격으로 분리막 필터를 회수하였다. 회수한 분리막은 도 6에 나타난 장치를 이용하여, 10 kPa의
압력에 의해 10 ml의 증류수가 분리막을 통과하는 시간을 측정하였다. 도 5를 통해 나타난 그래프는 각각의 조
건에서 오염이 유도된 분리막 필터(membrane filter)의 투수도를 확인하여 초기 투수도 값에 대해 시간에 따른
상대 투수도 값을 나타낸 것이다. 투수도를 측정한 결과, 오염이 그대로 진행되는 조건(a, wastewater (39.5
ml) + S. Aeruginosa (0.5 ml)), 오염이 진행되는 조건에 자성-다공성 실리카 물질을 넣은 조건(b, wastewater
(38.7 ml) + S. Aeruginosa (0.5 ml) + Mag-S-MPS (0.8 ml of 0.5 mg/ml))은 3일 이후 초기 값의 50 % 미만 상
대 투수도를 보여주었으나 오염이 진행되는 조건에 방오횜소-자성-다공성 실리카 물질을 넣은 조건(c,
wastewater (38.7 ml) + S. Aeruginosa (0.5 ml) + NER-AC/Mag-S-MPS (0.8 ml of 0.5 mg/ml))은 일주일 이상
50 %이상의 상대 투수도를 유지 하였으며, 도 5의 다른 샘플에서 나타난 급격한 흐름의 감소가 관찰되지
않았다. 이러한 결과는 NER-AC/Mag-S-MPS 샘플의 뛰어난 방오횜 효과를 나타내는 것이다.

실시예 4

[0054] 오염이 유도된 분리막 필터의 바이오필름 확인을 통한 방오횜소-자성-다공성 실리카 복합체의 바이오필름 형성
억제 성능 확인.

[0055] 상기 실시예 1을 통해 제조된 방오횜소-자성-다공성 실리카 복합체(NER-AC/Mag-S-MPS)의 방오횜소 활성을 분리
막 필터에 오염이 유도되는 조건을 조성한 뒤 분리막 필터 표면에 발생한 바이오필름의 표면을 CLSM (confocal
laser scanning microscope) 이미지를 확인하였다.

[0056] 구체적으로 오염이 그대로 진행되는 조건(a, wastewater (39.5 ml) + S. Aeruginosa (0.5 ml)), 오염이 진행되
는 조건에 자성-다공성 실리카 물질을 넣은 조건(b, wastewater (38.7 ml) + S. Aeruginosa (0.5 ml) + Mag-S-
MPS (0.8 ml of 0.5 mg/ml)), 오염이 진행되는 조건에 방오횜소-자성-다공성 실리카 물질을 넣은 조건(c,
wastewater (38.7 ml) + S. Aeruginosa (0.5 ml) + NER-AC/Mag-S-MPS (0.8 ml of 0.5 mg/ml))의 샘플을 준비
하여 1일 간격으로 분리막 필터를 회수하여 CLSM (confocal laser scanning microscope) 이미지를 확인하였고
그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0057] 도 7에서 확인할 수 있듯이, 방오횜소 흡착 후 나노효소반응기(nanoscale enzyme reactor, NER) 방법을 이용한
방오횜소-자성-다공성 실리카 복합체(NER-AC/Mag-S-MPS)가 포함된 샘플에서는 CLSM 이미지에서 녹색으로 표현되
는 바이오필름의 색 농도와 색 분포 비교를 통해 바이오필름 형성이 억제 되는 것이 관찰되었다.

실시예 5

[0058] 분리막 필터의 표면에 방오횜소-자성-다공성 실리카 복합체가 혼합된 도료 조성물을 도포하여 바이오필름 형성
억제 성능 확인.

[0059] 상기 실시예 1을 통해 제조된 방오횜소-자성-다공성 실리카 복합체(NER-AC/Mag-S-MPS)를 도료에 혼합하여 분리
막 필터의 표면에 도포한 뒤, 분리막 필터에 오염이 유도되는 조건을 조성한 뒤 일정 유량으로 분리막 필터를
투과하는 조건에서 바이오필름 형성 유무에 따라 변화하는 압력을 측정하였다.

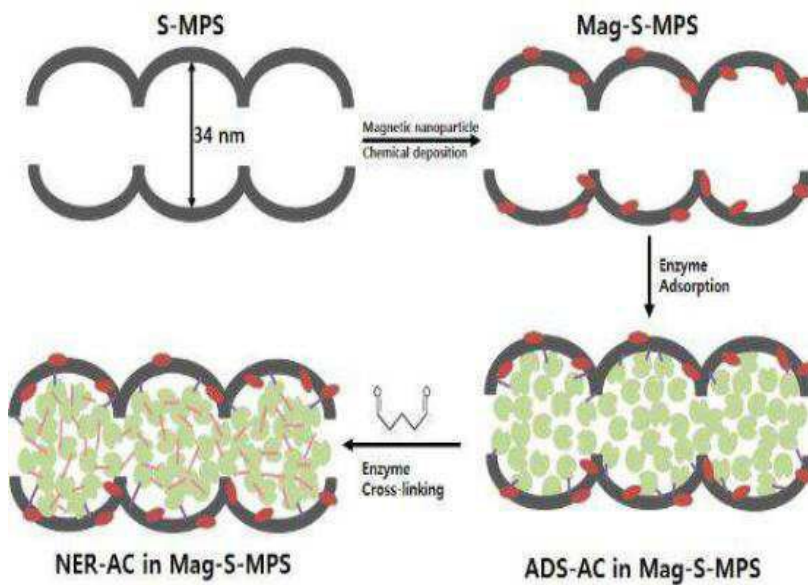
[0060] 구체적으로 도 8의 장치를 이용하여 분리막 필터에 일정 유량으로 흐름을 형성시켜주면, 분리막 필터 표면에 발생하는 바이오필름에 의해 저하되는 유량의 흐름을 초기 설정 유량으로 유지시켜 주기 위한 압력(trans-membrane pressure, TMP)이 증가하게 된다. 도 9의 실험 결과를 통해 도료만 도포된 분리막 필터의 경우 시간이 지남에 따라 형성되는 바이오필름에 의해 TMP가 증가되는 것이 관찰된 반면, 방오효소-자성-다공성 실리카가 혼합된 도료를 도포한 분리막 필터의 경우 바이오필름 형성이 억제되어 TMP 증가 추세가 둔화되는 결과를 확인할 수 있었다.

산업상 이용가능성

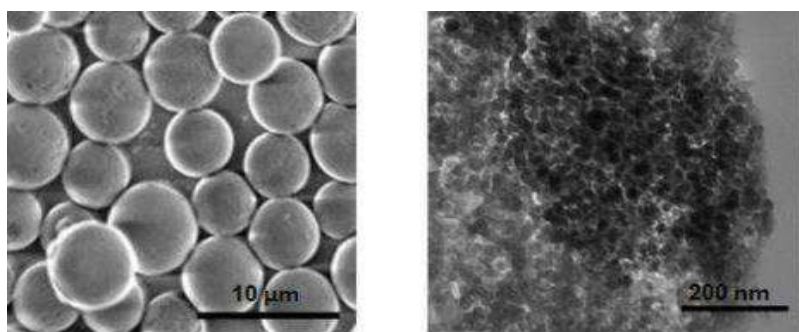
[0061] 본 발명의 방오용 도료 조성물은 생물의 부착과 성장을 방지하거나 제어하는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면

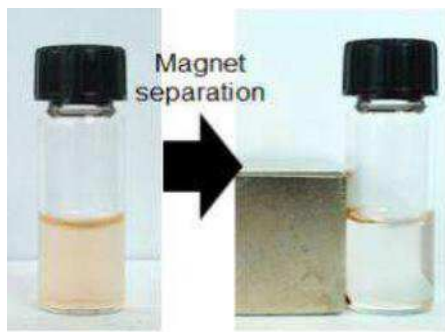
도면1



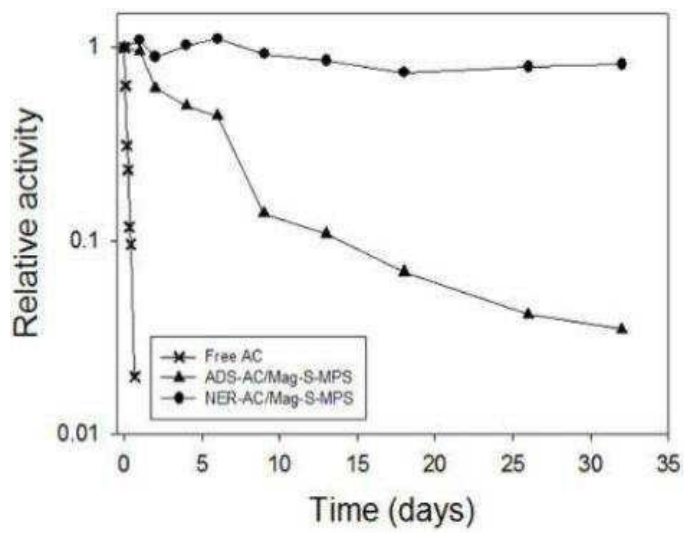
도면2



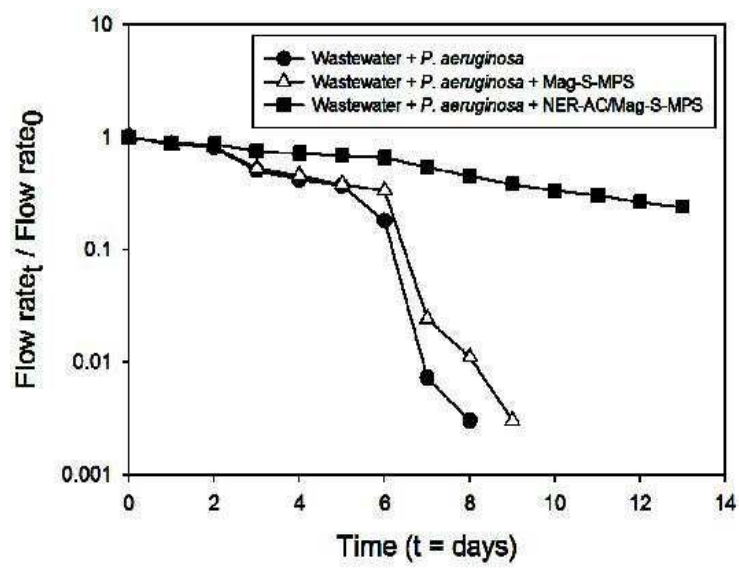
도면3



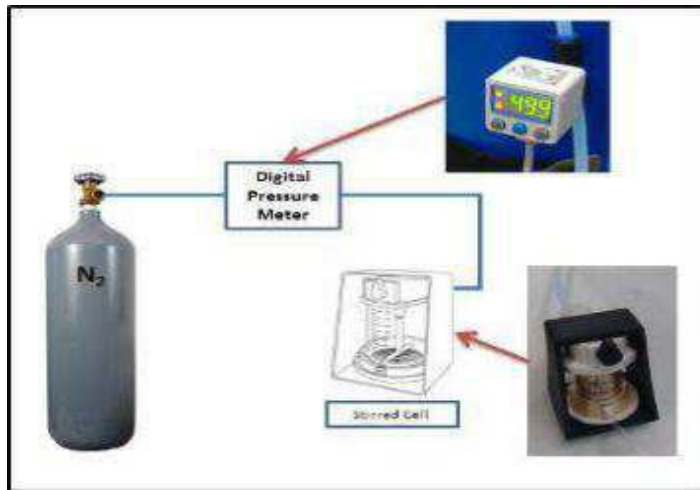
도면4



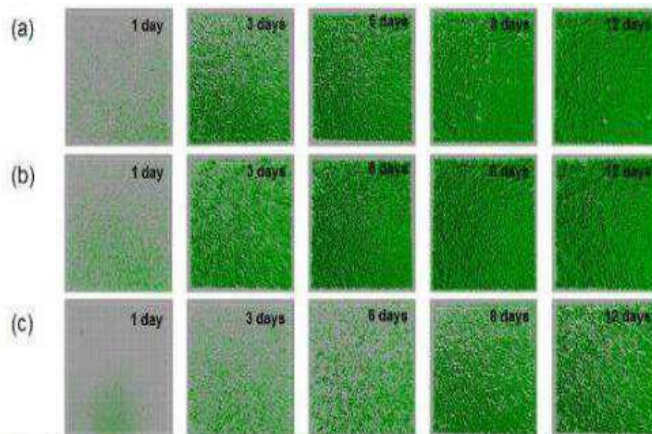
도면5



도면6

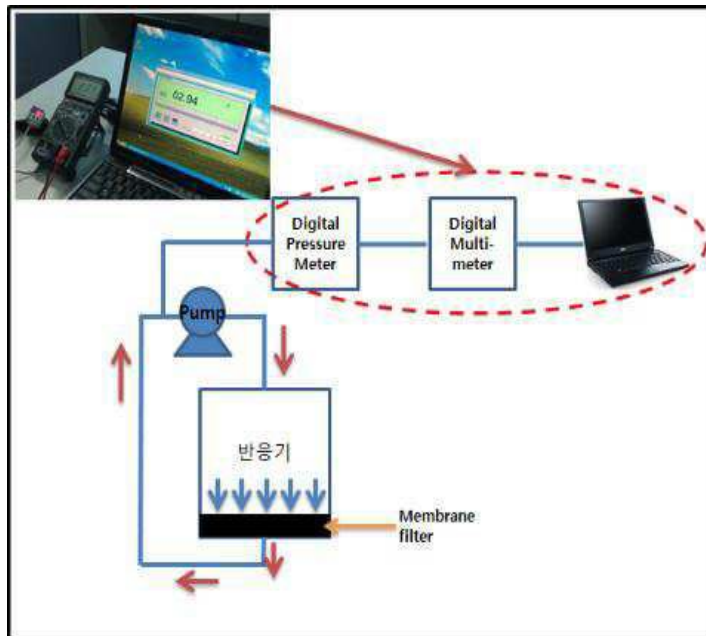


도면7



CLSM blend mode images (1214 $\mu\text{m} \times 1214 \mu\text{m}$) of *P. aeruginosa* biofilms on the (a) raw membrane filter, (b) mag-S-MPS + membrane filter and (c) acylase immobilized mag-S-MPS + membrane filter.

도면8



도면9

