

효소 고정화를 위한 실리카 나노세공 입자의 표면개질

¹조형민 · ²김종길 · ²김호건 · † ^{1,3}이은규

¹한양대학교 바이오테크놀로지학과 생물공정연구소, ²한양대학교 응용화학 및 무기소재연구소

³한양대학교 마이크로바이오칩센터

(접수 : 2006. 6. 6., 게재승인 : 2006. 10. 20.)

Surface Modification of Nano Porous Silica Particle for Enzyme Immobilization

Hyung Min Cho¹, Jong Kil Kim², Ho Kun Kim², and Eun Kyu Lee^{1,3†}

¹Bioprocessing Research Laboratory, Department of Bionanotechnology, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea

²Inorganic Advanced Material Laboratory, Department of Applied Chemistry, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea

³Micro Biochip Center, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea

(Received : 2006. 6. 6., Accepted : 2006. 10. 20.)

The objectives of this study were to develop nano-pore silica particles and to modify its surface for use as an enzyme immobilization matrix. Sol-gel reaction was used to produce silica particles of various nano pore sizes with hydroxyl groups on their surfaces. The surface was modified with aldehyde that was confirmed by fluorescence imaging. Trypsin was covalently immobilized by reductive amination. Surface density of the immobilized trypsin was ca. 350 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, which was approximately 17- and 35-fold higher than those from the surfaces with hydroxyl and amine group, respectively. About 90% of the initial enzyme activity was maintained after the 12th use of repeated use. When compared with the commercial matrices, the nano-pore silica particle was superior in terms of immobilization yield and specific activity. This study suggests the nano porous silica particles can be used as enzyme immobilization matrix for industrial applications.

Key Words : Immobilization, enzyme activity, surface modification, fluorescence image, nano-pore silica

서 론

효소 고정화에 이용되는 지지체들은 dextran, agarose 등 대부분 유기 고분자 화합물로 구성되었다. 하지만 이는 기계적 물성에 한계가 있으며, 고온, 고압에서 구조가 파괴되는 단점을 갖고 있다. 이와 같은 문제로 인하여 유기 화합물에 비해 견고하며 기계적 물성이 우수한 금속 및 비금속 무기 산화물이 대규모 공정용 산업적 지지체로 연구 개발되고 있는 추세이다(1).

일반적으로 다공성 물질은 높은 비표면적을 가지고 있어 산업적으로 흡착제나 촉매 등으로 널리 이용되고 있으며, 최근에는 nano 크기의 미세 세공을 가지는 나노세공성(nano porous) 소재 이용연구가 활발히 진행되고 있다(2-5).

대표적인 나노 크기 다공성 재료인 zeolite는 여러 산업분야에서 반응촉매제로서 널리 이용되고 있으나 공극크기가 1.2~1.5 nm 정도로 작기 때문에 바이오산업용 크로마토그래피나 효소촉매 담체 등의 고기능성 용도로는 적합하지 않다. 세공소재가 바이오산업 용도로 이용되기 위해서는 세공 크기가 2~50 nm 정도로 제어되어야 하고 또한 세공 크기 분포가 좁아야 한다. 이러한 소재로서 가장 적합한 것이 gel 형태의 나노세공 실리카이다. 실리카는 원래 단순 기능 용도로 사용되어 왔으나 $\text{Si}(\text{OH})_4$ 의 축합중합에 의해 효소 고정화에 필요한 세공을 나노미터 수준까지 제어가 용이하다는 장점을 이용하여 바이오산업에 응용하는 연구가 최근에 시작되었다. 실리카는 세공 크기를 위의 조건에 맞게 제어할 수 있어 다공성이 가능하며, 세공크기가 나노미터인 경우 비표면적이 상대적으로 넓어져 고농도의 효소 고정화에 있어 유리한 점을 갖는다. 또한 기계적 강도가 우수하며 경제적으로 제조할 수 있는 등의 장점이 있다.

본 연구에서는 규산나트륨을 이용한 sol-gel 공정에 의하여 고기능성 나노세공 실리카를 제조하기 위한 최적 합성

† Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory, Department of Bionanotechnology, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea

Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779

E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

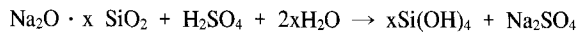
조건을 확립하고자 하였다. 이를 위하여 규산나트륨의 산 분해과정을 연속 공정에 의하여 수행하였고, 이때 농도, pH, 온도 등의 변수를 변화시키면서 합성되는 나노세공 실리카의 물성과의 관계를 조사하였다. 이 연구 결과는 고 기능성 실리카의 세공 크기, 형태, 세부구조 등을 제어하여 이상적인 나노 세공체의 제조를 가능하게 하는데 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

고정화 목적 효소로는 트립신을 사용하였다. 트립신 표면의 아민기와 실리카 표면 사이의 공유결합을 유도하기 위하여(6) 실리카를 알데하이드기로 표면 개질을 시도하였으며, 이를 Lucifer yellow dye와 반응시킨 후 confocal microscopy를 사용하여 결과를 확인하였다. 표면 개질된 실리카 위에 트립신을 고정화시켜 실리카의 공극크기와 표면 기능기에 따른 고정화 양을 측정하였고, 또한 고정화된 효소의 활성을 측정하였다. 이 결과를 다른 상용화되어 있는 지지체와 비교하여 실리카 지지체의 산업화 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

나노 세공 실리카 제조

100℃ 이하에서 silicate 수용액과 무기산을 반응시켜 침전된 실리카를 제조하였다. 제조를 위한 monomer는 Si(OH)₄이며, 이 monomer들은 water-glass 용액과 황산 수용액의 반응으로 생성된다.



10℃ 이하로 제어된 규산나트륨과 황산이 노즐 속에서 순간적으로 일정하게 정량적으로 만남으로 해서 혼합한 후 gelling시 primary 입자들이 균일하게 형성되도록 하였다 (Fig. 1). 또한 sol-gel 과정을 거쳐 실리카 표면을 Si-OH (silanol)기로 만들어 주었다.

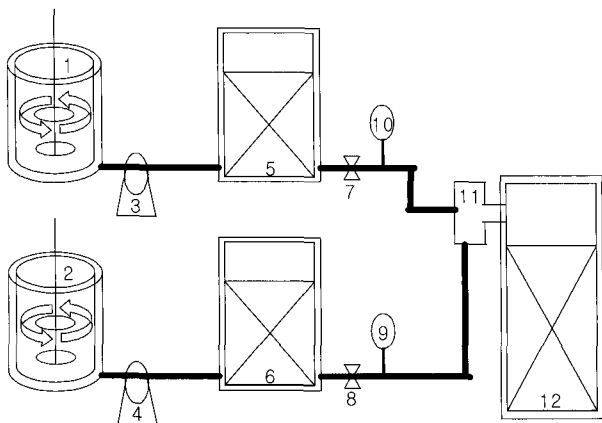


Figure 1. Reaction system of silica hydrosol (1, 2: Vessel for sodium silicate and sulphuric acid, 3, 4: Injection pump, 5, 6: Air adsorption tank, 7, 8: Flow control valve, 9, 10: flow meter, 11: Reaction nozzle, 12: hydrosol tank).

Polymerization과 purification 공정

Gelling 반응이 진행된 슬러리를 고상 및 액상을 분리한 후 Fig. 1과 같은 시스템에서 요구되는 물성을 제어하기 위해 온도 및 유량제어, 산 및 알칼리 처리가 요구되는 물성이 될 때까지 진행하여 Na⁺, SO₄²⁻ 이온을 제거함과 동시에 실리카의 중합 정도를 제어하였다(Fig. 2).

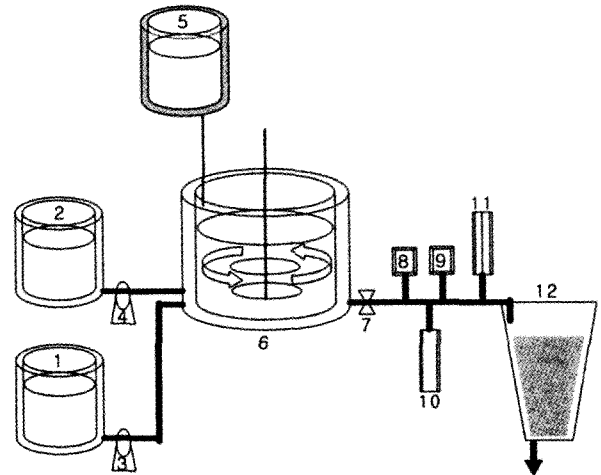


Figure 2. Polymerization process (1, 2: vessel for acid and base solution, 3, 4: pump, 5: Vessel for DI water, 6: Polymerization Tank, 7: Flow control valve, 8, 9, 10, 11: sensor for liquid (pH, conductivity, temperature, 12: Separation tank).

BET 면적 측정

다공성 나노크기로 제조된 실리카 입자의 비표면적을 측정하였다. 비표면적 측정기 (ASAP 2020, Micromeritics, USA)를 이용하여 시료 0.1~0.2 gram 정도 평량한 후 250℃에서 3시간 동안 처리한 후 무게를 측정하였고, BET (Braunauer Emmett Teller) 표면적 측정기를 이용하여 각각의 입자를 최소한 50 point까지 측정하였다.

표면개질

4가지의 다른 평균 공극 크기 (8, 10, 14, 50 nm)의 실리카를 표면 개질하였다. 우선 실리카의 표면을 깨끗하게 하기 위해 35% HCl과 absolute methanol (1 : 1) 혼합용액에 30분간 반응을 시켰다. 반응 후 증류수로 세척한 후, 97% H₂SO₄와 30분간 반응시켰다. 다시 증류수로 세척하고, 10분간 70℃에서 가열하였다. 그 후 1%(v/v) trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine solution (DETA, Aldrich, St. Louis, USA)의 1 mM acetic acid 용액과 상온에서 20분간 반응시켜 실리카 표면을 아민 silanization하였다. Silanization된 실리카를 질소 가스로 건조시킨 후, 120℃에서 5분간 가열시켰다. 마지막으로 표면에 알데하이드기를 나타내기 위해 12.5% (v/v) glutaraldehyde solution in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)와 14시간 동안 상온에서 반응시켰다(7, 8).

표면개질 확인

알데하이드기로 표면개질시킨 silica의 개질 여부를 확인하기 위하여 Lucifer yellow ethylenediamine (Molecular

Probes, Netherlands)과 반응시켰다. Lucifer yellow는 아민기를 갖고 있어 알데하이드기를 갖는 물질과 반응하여 강한 형광을 나타내는 dye이다(Fig. 3)(9). Lucifer yellow 수용액(3 mg/ml)과 silica bead를 90분간 빛을 차단한 채 상온에서 반응시킨 후, 0.1 M sodium phosphate buffer (SPB, pH 7.2)로 5차례 세척하였다. 형광 발광 여부는 confocal microscopy (TSC SL, Leica, Germany)를 사용하여 관찰하였다.

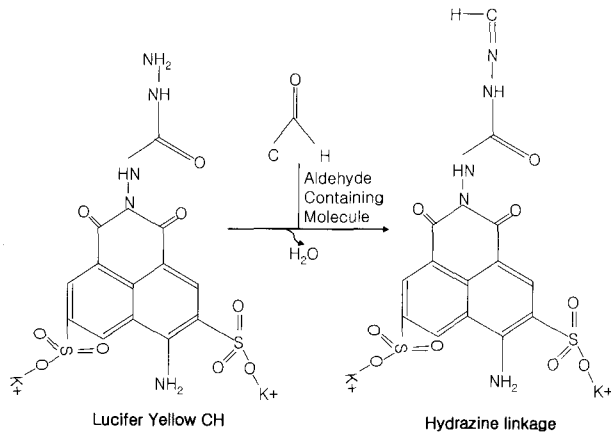


Figure 3. Mechanism of Lucifer yellow reaction(9).

효소 고정화

트립신 (Sigma, St. Louis, USA)의 농도는 Langmuir plot을 제외한 모든 실험에서 0.1 M sodium bicarbonate buffer (pH 10.0)에 녹여 1 mg/ml을 만들어 사용하였으며, 사용된 실리카는 공극 크기 별 비교를 제외한 모든 실험에서 50 nm 공극 크기인 실리카를 사용하였다. 트립신을 알데하이드기로 표면 개질된 실리카 위에 고정화시키기 위해 상온에서 3시간동안 반응을 시켜주었으며, 트립신의 아민기와 실리카의 알데하이드간의 원활한 공유결합을 유도하며 생성된 Schiff's base를 안정화시키기 위해 환원제인 95% sodium cyanoborohydride (NaBH₃CN, Aldrich, St. Louis, USA) 1 mg/ml 용액 20 μ l를 첨가하였다. 반응 후, 용액의 상층액을 분리한 후 단백질 정량분석하여, 각 조건에 따른 고정화 양을 측정하였다(10).

효소 활성 측정

재사용에 따른 고정화 트립신의 활성 변화를 측정하였다. 고정화된 트립신 용액 10 μ l, 기질로서 a-N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide hydrochloride (BAPNA, Sigma, St. Louis, USA) in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, USA) 20 mg/ml 용액 40 μ l, 상온 buffer인 0.1 M ammonium carbonate (pH 8.0) 200 μ l를 tube에서 15분간 상온에서 반응시킨 후, UV spectrophotometer를 이용 405 nm에서 흡광도를 분석하였다. 한 번 측정된 트립신은 washing buffer인 0.1 M sodium carbonate (pH 10.0)를 사용 3차례 세척하였다. 이와 같은 과정을 반복하면서 각 단계의 활성을 측정하였다.

다른 지지체와 실리카의 비교

다른 지지체에 트립신을 고정화하여 실리카에 고정화된

트립신의 활성 및 고정화량을 비교하였다. 지지체로는 zirconia, glycidyl-methacrylate, kieselgel silica, EU dragit S-100, PVCA, chitosan을 사용하였다. 다만, 사용된 버퍼, 기질 등은 동일하지는 않았다(13-17).

결과 및 고찰

나노세공 실리카 제조

위 반응에 의해 생성된 Si(OH)₄ monomer들은 수용액 중에서 과포화되어 핵이 발생되고, 계속 deposition되어 핵들이 성장한다. 동시에 핵들 상호 간에도 Si-OH (silanol) group들에 의한 축합 중합반응이 일어나서 비교적 중합도가 큰 고분자 물질이 형성되고, 이 고분자 물질이 1차 입자를 형성하게 되는데 이때 3차원 망목구조로 되면서 수 nm에서 수십 nm까지의 나노세공을 갖는 실리카가 만들어지게 된다. 이와 같은 반응에 의해 제조된 후 졸-겔 과정을 거쳐 Si-OH (silanol) 표면이 얻어진다(7, 8). 실리카 겔 표면의 -OH group은 surface coverage가 흡착의 거동을 결정하고, 그에 따라 표면의 반응성을 결정하기 때문에 매우 중요하다. 표면에 존재하는 Si-OH의 형태는 geminal silanol이며 밀도는 8-9 개/nm²이다.

실리카 제조시 정량 반응 시스템을 이용하면 황산과 규산나트륨 용액의 유량 제어가 자동으로 제어될 수 있고, regulator가 부착된 소형 저장조에서 일정압으로 조정되어 특수한 노즐로 공급되어 gelling시 1차 입자들의 균일한 형성을 유도할 수 있다.

BET 면적 측정

BET 면적 측정은 밀폐된 용기 내에서 다른 조건의 변화 없이 온도의 변화로 인한 압력의 변화를 측정함으로써 기체 부피를 계산하여 분자의 개수, 원하는 고체의 표면, 기공 등에게까지 응용하는 원리이다. 반응식은 다음과 같다.

$$\frac{P/P_0}{Va/(1-P/P_0)} = \frac{1}{VmC} = \left(\frac{C-1}{VmC}\right)\left(\frac{P}{P_0}\right)$$

여기서 C = free energy of adsorption term for monolayer adsorption

P₀ = primary pressure

P = pressure

V_a = amount of adsorbed volume of the gas removed by adsorption,

V_m = specific adsorbed volume

실험에 사용된 공극 크기 별 실리카의 BET를 측정된 결과 공극크기가 증가할수록 BET, 즉 비표면적은 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

표면개질 확인

실리카 표면이 알데하이드기로 개질되었는지 확인하기 위해 세 가지 다른 기능을 가진 표면의 실리카를 lucifer

yellow와 반응시켰다. 하이드록실기는 아주 미세한 형광을 보이고, 아민기는 전혀 형광을 검출할 수 없는 반면, 알데하이드기의 표면은 강한 형광을 나타내는 것을 볼 수 있다. 이 결과로 보아 표면 개질이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

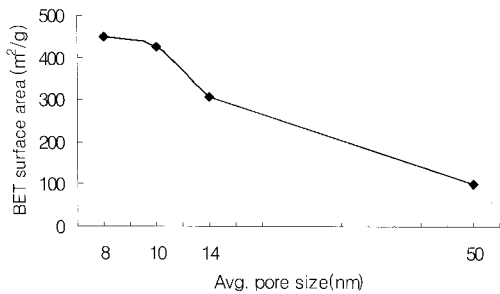


Figure 4. Variations of the BET surface area with respect to average pore size of silica.

효소고정화를 위한 최적 농도

알데하이드기로 표면 개질된 실리카 위에 고정화를 위한 최적의 트립신 농도를 찾기 위해, 0.2, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 2.2, 2.5, 2.9, 3.3 mg/ml의 트립신 용액을 silica 위에 고정화시켜 주었다. 고정화량은 2.2 mg/ml 이상의 농도에서는 포화된 것을 볼 수 있다(Fig. 5). 그러므로 최대 고정화를 위한 트립신 농도는 2.2 mg/ml이라 할 수 있다. 하지만, 이 실험에서는 이미 상용화되고 있는 다른 bead와의 결과 비교를 위해 1 mg/ml에서 고정화를 하였다(11).

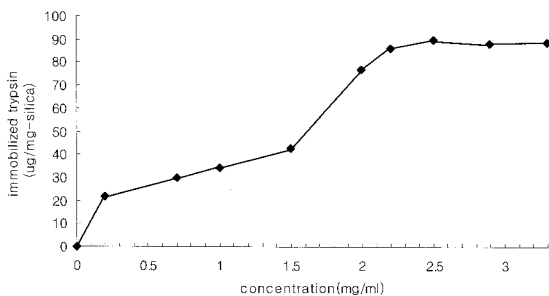


Figure 5. Isotherm curve for immobilization of trypsin.

Toyopearl bead와 실리카 상에서의 효소 고정화

이 실험에서 사용된 silica bead의 상용화 가능성을 증명하기 위해 비교 목적으로 사용된 지지체는 Toyopearl AF-Formyl-650M (Tosoh, Yamaguchi, Japan)이다. 이 지지체는 다공성 (평균 공극직경은 100 nm)으로 평균지름이 65 µm이며, 표면이 알데하이드기로 되어있다. 비교를 위해 두 가지 모두 동일 농도와 양의 트립신을 사용하였다. 실험 결과 두 경우의 차이는 거의 없다고 볼 수 있다(Table 1). 특히 고정화된 효소의 활성도 거의 비슷하여 실리카도 효소 활성을 유지할 수 있는 지지체임을 확인하였다. 고정화와 활성의 두 가지 비교를 통하여 상용화 bead와 큰 차이가 나

지 않음을 볼 수 있으며, 이를 바탕으로 silica bead의 상용화 가능성을 확인할 수 있었다.

Table 1. Comparison of trypsin immobilization to silica and Toyopearl bead (S: Silica, TB: Toyopearl bead, I: immobilized trypsin)

	immobilization (µg/m ²)	specific activity (U/mg-trypsin)	Relative activity (immofree) (%)
S-I	351	1602	34
TB-I	370	1200	37

공극크기와 표면 기능기가 고정화에 미치는 영향

공극 크기 영향에 대한 실험에는 각 10, 14, 50 nm의 평균 공극 크기를 갖는 실리카를 사용하였다. 10, 14 nm 공극 크기 실리카에서는 고정화 양이 미미하였으나, 50 nm 공극 크기 실리카에서는 18배 정도 많은 350 µg/m²이 고정화되어 상대적으로 매우 높은 고정화 양을 보여준다. 이는 트립신의 직경이 2~3 nm 정도일지라도 세공영역을 활용한 고농도 고정화를 위해서는 목적 효소보다 수십여 배 크기의 pore가 필요하다는 것을 보여준다(11).

또한, 표면 기능기의 차이에 따른 고정화 양에 대해서도 알아보았다. 일반적으로 효소 고정화는 효소의 아민기와 지지체의 알데하이드기간의 공유결합에 의해 일어난다고 알려져 있다. 실제로 이러한 이론이 어느 정도의 차이를 보여주는지 알아보기 위하여 서로 다른 기능기에서 고정화 실험을 해보았다. 하이드록실, 아민, 알데하이드기를 나타내는 세 가지 silica에 동일 조건에서 고정화하여 그 결과를 비교하였다. 알데하이드 표면 실리카에서는 트립신이 350 µg/m²가 고정화되어 하이드록실 표면보다는 17배, 아민기 표면보다는 35배 높은 결과를 나타냈다. 이는 표면이 아민기를 나타내는 경우는 트립신과 electrostatic 결합 형태를 보이는 반면에 표면이 알데하이드기를 나타내는 경우는 트립신의 아민기와 쉽게 공유결합을 형성하기 때문이라 할 수 있다. 이는 공유결합에 의한 효소 고정화 이론을 수치상으로 증명해 주었으며, 원활한 고정화를 위해서는 표면 개질이 매우 중요한 단계임을 보여주었다.

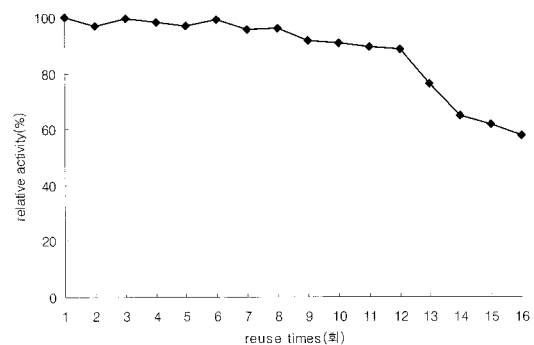


Figure 6. Relative activity through reuse.

재사용을 통한 활성 변화

효소 재사용 시 활성의 변화를 측정하였다. 약 12회 재

사용까지는 효소 활성이 서서히 감소하여 초기 활성의 약 90% 수준을 유지하였으나 12회 이후부터는 활성의 뚜렷한 저하 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 하지만 약 10회까지의 재사용에도 초기 활성 대비 약 90%의 활성을 유지하였으므로 실리카 담체에 공유결합을 통해 고정화된 경우 효소 재사용에도 유리하다 할 수 있다(12).

세공크기가 효소 활성에 미치는 영향

평균 공극 크기가 10, 50 nm인 나노세공 실리카를 이용하여 공극 크기가 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 각 실리카를 동일한 조건으로 고정화한 활성의 변화를 측정해 보았다. 평균 공극이 50 nm 실리카에 고정화된 트립신이 10 nm에 비해 1.7배 높은 활성을 나타냈다. 이는 고정화 효소의 양이 증가할 뿐 아니라 기질의 확산, 효소반응 등에 큰 공극이 물질전달 측면에서 긍정적인 영향을 미치기 때문으로 사료된다.

다른 지지체와 실리카의 비교

실리카 외에 다른 담체들에 트립신을 고정화시켜 고정화 양과 트립신의 활성에 대해 비교하였다. 실리카가 다른 두 가지 지지체들에 비해 높은 고정화 양을 보임을 알 수 있다(Table 2). 또한, 활성 관련 비교를 보아도 실리카가 다른 지지체들에 비하여 specific activity와 재사용에 따른 활성의 감소율 역시 월등하게 좋음을 알 수 있다. 이는 실리카는 효소 고정화에 있어서 상당히 좋은 특성을 갖게 하는 지지체임을 보여주는 결과이다(13-17).

Table 2. Comparison of silica with other supports in: (a) immobilization amount, (b) specific activity, and (c) relative activity through reuse times

(a)			
	immobilization (ug/m ²)		
silica	351		
zirconia	200		
glycidyl-methacrylate	341		
(b)			
	specific activity (Unit/mg)		
silica	0.341		
glycidyl-methacrylate	0.145		
PVCA	0.126		
(c)			
support	silica vs EUdragit S-100	silica vs commercial kieselgel silica	silica vs chitosan
relative activity (silica, other support) (%)	99.5 , 81	99.2 , 40	98.4 , 60
reuse times	3	6	4

요 약

대규모 산업공정을 위한 효소 고정화 담체로서 나노세공 실리카의 상용화 가능성을 조사하였다. 정량반응 시스

템을 이용하여 1차 입자의 생성조건을 변화시킴으로써 여러 세공크기를 갖는 나노세공 실리카를 만들었으며, 비표면적, 세공 용적, 공극 크기 등의 물성 제어를 하였다. 실리카와 효소 사이의 원활한 공유결합을 유도하기 위해, 실리카의 표면을 알데하이드기로 개질하였으며, Lucifer yellow라는 형광 dye를 이용하여 표면 개질을 확인하였다. 실리카 위에 목적 효소인 트립신을 각 조건에 따라 고정화 시킨 결과 충분한 고정화를 위해서는 50 nm 정도의 공극 크기가 필요함을 알았고, 표면 차이에 따른 고정화 차이를 통해 고정화에 있어 표면개질의 중요성을 볼 수 있었다. 또 재사용 시 고정화된 트립신의 활성 변화를 관찰, 활성이 90%까지 유지되는 동안 10회 이상의 반복 사용이 가능함을 확인하였다. 이를 통하여 고정화 효소 시스템의 산업적 이용을 위한 가능성을 확인하였다. 실리카의 상용화 가능성을 평가하기 위하여 현재 상용화 되고 있는 지지체와 유사한 조건에서 실험 후 결과를 비교해 본 결과 나노세공 실리카의 효소 고정화용 지지체로서의 상용화 가능성을 발견할 수 있었다.

감 사

본 연구는 산업자원부 “효소 담지용 나노세공 금속산화물 지지체의 합성 및 응용기술 개발과제” (중기거점기술개발사업)의 연구비 지원을 받아 행하여졌습니다. 또한 교육인적자원부, 산업자원부, 노동부의 출연금으로 수행한 최우수실험실지원사업의 지원에도 감사드립니다.

REFERENCES

- Alonso, N., F. L. Gallego, L. Betancor, A. Hidalgo, C. Mateo, J. M. Guisan, and R. F. Lafuente (2005), Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method, *J. Mol. Catal.* **35**, 57-61.
- Zhao, X. S., G. Q. Lu, and G. J. Millar (1996), Advanced in mesoporous molecular sieve MCM-41, *Ind. Eng. Chem. Res.* **35**, 2075-2090.
- Beck, J. S. and J. C. Valtuli (1996), characterization and application of mesoporous molecular sieve, *Sol. Stat. & Mater. Sci.* **1**, 76-87.
- Oye, G., J. Sjoblom, and M. Stoker (2001), characterization and potential application of new material in mesoporous range, *Adv. Coll. Int. Sci.* **89-90**, 439-466.
- Regis, Ed. (1998), Nanotechnology, *Hanseung*, Seoul.
- Taylor, R. H., S. M. Fournier, B. L. Simons, H. Kaplan, and M. A. Hefford (2005), Covalent protein immobilization on glass surfaces: Application to alkaline phosphatase, *J Biotechnol.* **118**, 265-269.
- Cordek, J., X. Wang, and W. Tan (1999), Direct Immobilization of Glutamate Dehydrogenase on Optical Fiber Probes for Ultrasensitive Glutamate Detection, *Anal. Chem.* **71**, 1529-1533.
- Xi, F., J. Wu, Z. Jia, and X. Lin (2005), Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead, *Process Biochem.* **40**, 2833-2840.
- Debashis P., P. M. Padmaja, L. K. Apurba, and D. Anindya

- (2005), Interaction of Lucifer yellow with cetyltrimethyl ammonium bromide micelles and the consequent suppression of its non-radiative processes, *Chem. Phys. Lett.* **402**, 564.
10. Danczyk, R., B. Krieder, A. North, T. Webster, H. HogenEsch, and A. Rundell (2003), Comparison of Antibody Functionality Using Different Immobilization Methods, *Biotechnol. Bioeng.* **12**, 215-223.
 11. Suh, C. W., M. Y. Kim, J. B. Choo, J. K. Kim, H. K. Kim, and E. K. Lee (2004), Analysis of protein adsorption characteristics to nano-pore silica particles by using confocal laser scanning microscopy, *J. Biotechnol.* **112**, 267-277.
 12. Park, S. W., S. Y. Choi, K. H. Chung, S. I. Hong, and S. W. Kim (2002), Characteristics of GL-7-ACA acylase immobilized on silica gel through silanization, *Biochem. Eng. J.* **11**, 87-93.
 13. Malmsten, M. and A. Larsson (2000), Immobilization of trypsin on porous glycidyl methacrylate beads: effects of polymer hydrophilization, *Colloids Surf.* **18**, 277-284.
 14. Goradia, D., J. Cooney, B. K. Hodnett, and E. Magner (2005), The adsorption characteristics, activity and stability of trypsin onto mesoporous silicates, *J. Mol. Catal.* **32**, 231-239.
 15. Kumar, A. and M. N. Gupta (1998), Immobilization of trypsin on an enteric polymer Eudragit S-100 for the biocatalysis of macromolecular substrate, *J. Mol. Catal.* **5**, 289-294.
 16. Huckel, M., H. J. Wirth, and T. W. Hearn (1996), Porous zirconia: a new support material for enzyme immobilization, *J. Biochem. Biophys. Methods.* **31**, 165-179.
 17. Ding, L. and B. Qu (2001), New supports for enzyme immobilization based on the copolymers of poly and α - ω -poly, *Reactive & Functional Polymers* **49**, 67-76.