



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월10일  
(11) 등록번호 10-1492224  
(24) 등록일자 2015년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 11/14 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-0043185  
(22) 출원일자 2013년04월18일  
심사청구일자 2013년04월18일  
(65) 공개번호 10-2014-0125248  
(43) 공개일자 2014년10월28일  
(56) 선행기술조사문헌  
J Mol Catal B Enzym., Vol. 33, Nos. 1-2,  
Pages 43-50 (2005.05.03.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
한국화학연구원  
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)  
(72) 발명자  
황인택  
충남 계룡시 업사면 연화동길 17,  
임희경  
대전 유성구 어은로 57, 130동 202호 (어은동, 한  
빛아파트)  
(릿면에 계속)  
(74) 대리인  
양부현

전체 청구항 수 : 총 5 항

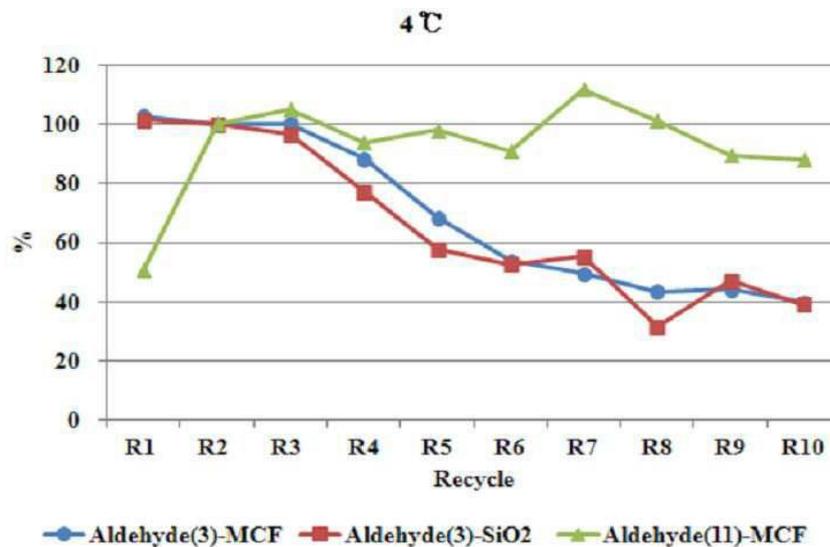
심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 이용한 효소 고정화 방법

(57) 요약

본 발명은 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 이용한 효소 고정화 방법을 제공한다. 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 고정화된 효소 및 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 포함하는 효소고정화용 담체를 제공한다. 본 발명에 따르면 효소의 고정화 시 발생하는 활성 감소를 방지하여 고정화 후에도 효소가 활성을 유지할 수 있으며, 재사용 시에도 활성도의 감소를 줄일 수 있다. 본 발명의 효소 고정화 방법을 이용하여 다양한 효소를 고정화시킴으로써 식품, 세제, 섬유필프 및 피혁공업, 화학공업, 의약품 등의 산업에 효과적으로 활용할 수 있다.

대표도 - 도4b



(72) 발명자

**이기인**

대전 유성구 어은로 57, 113동 305호 (어은동, 한빛아파트)

**박노중**

대전 유성구 엑스포로 501, 107동 204호 (전민동, 청구나래아파트)

**황영규**

대전 유성구 가정로 65, 110동 101호 (신성동, 대림두레아파트)

**송하영**

대전 유성구 궁동로72번길 9, 207호 (궁동)

**김달례**

부산 부산진구 당감로 80, 1동 1203호 (부암동, 삼성래미안아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1003557420120310060001164510035546201203

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 지식경제기술혁신사업

연구과제명 바이오매스 화학/생물 전환공정을 통한 플랫폼 바이오화학소재의 생산기술 개발

기여율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2012.04.01 ~ 2013.03.31

---

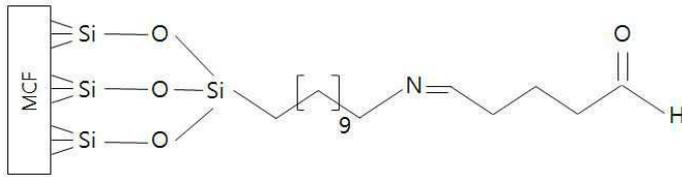
**특허청구의 범위**

**청구항 1**

다음 단계를 포함하는 베타글루코시다아제 고정화 방법:

(a) 메조포러스(mesoporous) 담체로서 MCF(mesoporous cellular foam)에 알데하이드 화합물을 공유결합시켜 다음의 화학식 1로 표시되는 알데하이드기 기능기화(aldehyde-functionalized) 메조포러스 담체를 제조하는 단계; 및

**화학식 1**



(b) 상기 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체의 알데하이드기를 통하여 베타글루코시다아제를 담체에 공유결합시켜 베타글루코시다아제를 고정화 하는 단계.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제 1 항에 있어서, 상기 고정화 단계는 0-30℃의 온도에서 실시하는 것을 특징으로 하는 고정화 방법.

**청구항 5**

제 1 항에 있어서, 상기 고정화 단계는 10-25시간 동안 실시하는 것을 특징으로 하는 고정화 방법.

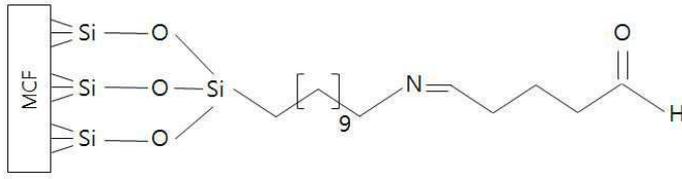
**청구항 6**

제 1 항, 제 4 항 및 제 5 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 고정화된 베타글루코시다아제.

**청구항 7**

메조포러스(mesoporous) 담체로서 MCF(mesoporous cellular foam)에 알데하이드 화합물이 공유결합된 다음의 화학식 1로 표시되는 알데하이드기 기능기화(aldehyde-functionalized) 메조포러스 담체를 포함하는 효소고정화용 담체:

**화학식 1**



**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 이용한 효소 고정화 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 효소를 이용한 생물공정은 화학공정에 비해 온화한 반응조건에서 반응이 진행되어 화학공정에 비해 에너지가 절약되며, 공정이 단순하여 공정비용이 적게 드는 장점이 있다. 하지만 이용되는 효소의 가격이 고가이며, 효소의 낮은 안정성이 극복해야 할 단점이다. 이러한 문제를 해결하고 공정비용의 감소를 위해 효소의 고정화가 널리 이용되고 있다. 효소를 고정화하면 반응에 사용한 효소를 다음 반응에 재사용할 수 있어 효소의 높은 가격 문제를 해결하여 공정비용을 감소시킬 수 있으며, 고정화하지 않는 효소보다 안정성이 증대되어 공정에 더 효율적으로 이용할 수 있다.

[0003] 효소 고정화는 공업용뿐만 아니라 의료 및 분석용으로 많이 응용되고 있다. 공업용 응용의 예로는 고정화된 글루코스 이성화효소(glucose isomerase)가 있다. 과당은 포도당보다 2 배정도 당도가 높기 때문에 청량음료의 감미료로 사용된다. 이러한 과당을 생산하기 위하여 고정화된 글루코스 이성화효소를 이용하여 포도당을 과당(fructose)으로 전환시키는 공정이 산업화되어 있다. 또한, 글루코스 이성화효소는 헤미셀룰로스(hemicellulose)로부터 에탄올(ethanol) 생산과 L-글루코스(L-glucose), L-프락토스(L-fructose), L-리보스(L-ribose), L-릭소스(L-lyxose), D-알로스(D-allose) 및 L-갈락토스(L-galactose) 같은 희귀 단당류 생산에서의 적용 가능성 때문에 큰 주목을 받고 있는 효소이다. 더불어 글루코스 이성화효소는 매우 고가이기 때문에 연구 및 제품 생산을 위하여 효과적으로 고정화시키는 기술개발에 대한 필요성이 매우 높다.

[0004] 효소를 고정화 시키는 방법으로는 흡착법, 공유결합법, 가두기법 등의 다양한 방법이 사용되고 있다. 상기 방법들 중 흡착법과 가두기법은 간단한 방법으로 효소를 고정화할 수 있는 장점이 있지만, 고정화된 효소의 유실과 기질 및 생성물의 확산저항이 존재하는 문제점이 있다. 또한 공유결합법은 효소를 공유결합에 의해 지지물질의 표면에 부착시키는 방법으로 담체와 효소와의 강한 결합력을 형성할 수 있어 널리 이용되고 있지만, 공유결합이 담체와 효소의 활성부위에 형성될 수 있어 활성부위의 손상을 초래하여 효소의 고정화 후에 활성도가 현저히 낮아지는 문제점이 있다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

**발명의 내용**

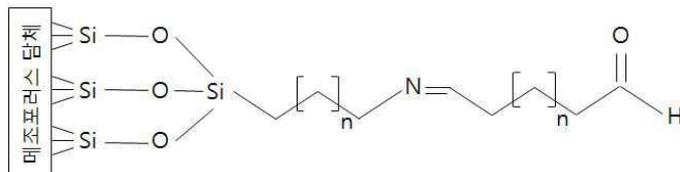
**해결하려는 과제**

- [0006] 본 발명자들은 효소를 효율적으로 고정화하여 활성 저하 없이 재활용 할 수 있는 고정화 방법을 개발하고자 예의 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체의 알데하이드기를 통하여 효소를 담체에 공유결합시켜 효소를 고정화시키면 재활용 시에도 효소가 높은 활성을 유지한다는 것을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0007] 따라서, 본 발명의 목적은 효소의 고정화 방법을 제공하는데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 방법에 의해 고정화된 효소를 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 효소고정화용 담체를 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

**과제의 해결 수단**

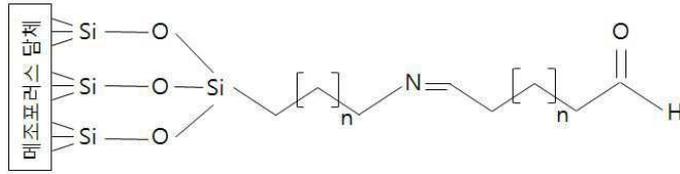
- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 효소 고정화 방법을 제공한다:
- [0012] (a) 메조포러스(mesoporous) 담체에 알데하이드 화합물을 공유결합시켜 다음의 화학식 1로 표시되는 알데하이드기 기능기화(aldehyde-functionalized) 메조포러스 담체를 제조하는 단계; 및

**화학식 1**



- [0014] 상기 화학식 1에서, n은 1 내지 10의 정수이다.
- [0015] (b) 상기 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체의 알데하이드기를 통하여 효소를 담체에 공유결합시켜 효소를 고정화 하는 단계.
- [0017] 본 발명자들은 효소를 효율적으로 고정화하여 활성 저하 없이 재활용 할 수 있는 고정화 방법을 개발하고자 예의 노력하였고 그 결과, 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체의 알데하이드기를 통하여 효소를 담체에 공유결합시켜 효소를 고정화시키면 재활용 시에도 효소가 높은 활성을 유지한다는 것을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0018] 본 발명에 따르면, 효소의 고정화 시 발생하는 활성 감소를 방지하여 고정화 후에도 효소가 활성을 유지할 수 있으며, 재사용 시에도 활성도의 감소를 줄일 수 있다. 따라서, 본 발명의 효소 고정화 방법을 이용하여 다양한 효소를 고정화시킴으로써 식품, 세제, 섬유필프 및 피혁공업, 화학공업, 의약품 등의 산업에 효과적으로 활용할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 효소 고정화에 이용되는 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체는 다음의 화학식 1로 표시된다.

**화학식 1**



[0021]

[0022]

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 표시하는 상기 화학식 1에서 n은 1 내지 10의 정수이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 표시하는 상기 화학식 1에서 n은 1 내지 9의 정수이다.

[0023]

상기 화학식 1에서, 아미노기는 시스형(cis-form)으로 결합되어 있다.

[0024]

본 발명에 따르면, 본 발명에서 효소 고정화에 이용되는 메조포러스 담체는 제한된 표면적을 갖기 때문에 분자량이 큰 효소를 담체 표면에 결합시키기 어려우므로 탄소 체인을 결합시켜 효소가 효과적으로 결합할 수 있도록 한다.

[0025]

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 효소가 고정화 되는 메조포러스 담체는 실리카, 메조포러스 유리비드, 조절-동공 유리(controlled-pore glass), 메조포러스 세라믹, 메조포러스 알루미늄, 메조포러스 카본 또는 메조포러스 티타니아이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 효소가 고정화되는 메조포러스 담체는 MCF(mesoporous cellular foam)이다.

[0026]

본 발명에서 효소 고정화에 이용되는 메조포러스 담체는 기공(porous)을 갖는 물질로 기공의 크기에 따라 0.2 내지 2 nm의 기공을 갖는 마이크로포러스(microporus), 2 내지 50 nm의 기공을 갖는 메조포러스(mesoporous) 및 50-1,000 nm의 기공을 갖는 매크로포러스(macroporous) 물질로 분류된다.

[0027]

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 효소가 고정화되는 메조포러스 담체의 기공(porous) 지름은 2-50 nm이며, 표면적은 50-1,000 m<sup>2</sup>/g이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 효소가 고정화되는 메조포러스 담체의 기공 지름은 10-50 nm이며, 표면적은 250-1,000 m<sup>2</sup>/g이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 효소가 고정화되는 메조포러스 담체의 기공 지름은 20-50 nm이며, 표면적은 500-1,000 m<sup>2</sup>/g이다.

[0028]

본 발명의 방법에 의해 고정화되는 효소는 특별히 제한되지 않으며, 가수분해효소, 산화-환원 효소, 트랜스퍼라아제, 라이아제(lyases), 이소머라아제 및 리가아제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 의해 고정화되는 효소는 가수분해효소의 일종인 베타글루코시다아제이다.

[0029]

본 발명의 구체적인 일 실시예에 따라 효소 고정화 과정을 설명하면 다음과 같다: MCF를 합성하여 건조시킨 다음, 3-아미노프로필 트리에톡시실레인 또는 11-아미노운데실 트리에톡시실레인과 반응시켜 MCF에 아민기를 결합시킨다. 이어, 아민기가 결합된 MCF를 글루타르알데하이드와 반응시켜 알데하이드기를 결합시킨다. 그런 다음, 베타글루코시다아제를 처리한 다음 일정 시간 동안 반응시켜 고정화를 완료한다.

[0030]

이렇게 고정화된 베타글루코시다아제 효소는 고정화 후에도 효소 활성이 높게 유지되며, 10회 재사용 시에도 활성도가 초기 활성의 90%에 가까운 활성을 나타냈다.

[0031]

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 효소를 고정화 시키는 단계는 0-30℃의 온도에서 10-25시간 동안 실시한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명에서 효소를 고정화 시키는 단계는 0-15℃의 온도에서 15-25시간 동안 실시한다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명에서 효소를 고정화 시키는 단계는 2-7℃의 온도에서 15-20시간 동안 실시한다.

[0032]

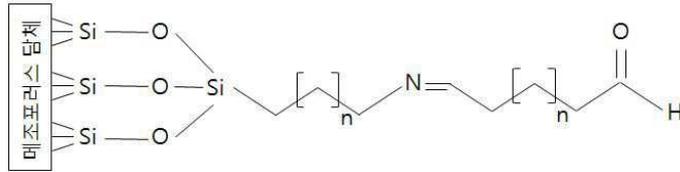
본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 고정화 방법에 의해 고정화된 효소를 제공한다.

[0033]

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 메조포러스(mesoporous) 담체에 알데하이드 화합물이 공유결합된 다음의 화학식 1로 표시되는 알데하이드기 기능기화(aldehyde-functionalized) 메조포러스 담체를 포함하는 효소고정화용 담체를 제공한다:

[0034]

**화학식 1**



[0035]

[0036]

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 표시하는 상기 화학식 1에서 n은 1 내지 10의 정수이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 표시하는 상기 화학식 1에서 n은 1 내지 9의 정수이다.

[0037]

상기 화학식 1에서, 아미노기는 시스형(cis-form)으로 결합되어 있다.

[0038]

본 발명의 효소고정화용 담체는 당업계에 공지된 다양한 형태로 제조될 수 있으며, 본 발명의 일 구현예에 따르면 본 발명의 효소고정화용 담체는 파우더(powder), 펠렛(pellet), 거품(foam), 하니콤(honeycomb), 구(sphere), 플라스틱, 섬유(fiber) 또는 직물(fabric) 형태로 제조된다.

[0039]

본 발명의 효소고정화용 담체는 상기 고정화 방법에서 이용하고 있는 것으로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

**발명의 효과**

[0040]

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0041]

(a) 본 발명은 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 이용한 효소 고정화 방법을 제공한다.

[0042]

(b) 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 고정화된 효소 및 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 포함하는 효소고정화용 담체를 제공한다.

[0043]

(c) 본 발명에 따르면 효소의 고정화 시 발생하는 활성 감소를 방지하여 고정화 후에도 효소가 활성을 유지할 수 있으며, 재사용 시에도 활성도의 감소를 줄일 수 있다.

[0044]

(d) 본 발명의 효소 고정화 방법을 이용하여 다양한 효소를 고정화시킴으로써 식품, 세제, 섬유필프 및 피혁공업, 화학공업, 의약품 등의 산업에 효과적으로 활용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0045]

도 1은 본 발명의 효소 고정화 담체를 나타내는 화학식이다.

도 2는 본 발명의 효소 고정화 담체에 효소가 결합된 형태를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 효소 고정화 방법에 의해 고정화된 효소(베타글루코시다아제)의 활성 측정 결과이다.

도 4는 효소 고정화 단계의 온도에 따른 고정화 효소의 활성을 측정한 결과이다. (a) 23℃, (b) 4℃.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0046]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0047]

**실시예**

[0048]

**실시예 1: 담체를 이용한 효소 고정화**

[0049]

효소는 분리 정제에 많은 비용과 시간이 소요되며 또한 한번 사용된 효소는 반응산물과 분리가 어려워 1회용으로 사용되기 때문에 고가에 판매되는 품목 중 하나이다. 이러한 문제를 만회하기 위한 방법으로 담체에 효소

를 고정화하여 효소를 한번 구입하는 비용으로 10번 이상 재활용함으로써 효소 가격 경쟁력에 효과가 드러날 것이라 여겨져 실험을 진행하였다. 효소 고정화에 이용된 담체는 유기담체의 경우, 내구성이 약해 여러 번 사용하는 데 어려움이 따르므로 내구성이 강한 무기담체 중 가격이 저렴하면서 이용이 편한 MCF(Mesoporous Cellular Foam)를 담체 지지대로 선발하여 사용하였다.

[0050] 1-1. MCF 합성

[0051] 100 ml 폴리프로필렌 병에 0.279 mmol P123(Sigma-Aldrich)의 1.62 g을 옮기고 13.32 mmol 아세트산의 0.8 g과 1,852 mmol 3차 증류수(de-ionized water)의 33.33 g을 혼합한 것에 용해시켰다. 완전히 용해시킨 후 이 용액을 유조(oil bath)에서 60℃, 1시간 동안 반응 시켰다. 또 다른 용액은 물 33.33 g에 실리카 공급원으로서 11 mmol 규산나트륨(Sigma-Aldrich) 2.67 g을 녹여 준비했다. 이 최종 용액의 물 구성은 Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> : P123 : H<sub>2</sub>O : 아세트산 = 1 : 0.025 : 336.4 : 1.21 이었다. 이 최종 용액을 준비된 또 다른 용액에 떨어뜨렸다. 이것을 60℃에서 1시간 동안 숙성시키고 100℃에서 12시간 동안 반응시킨 다음, 상온까지 냉각시켰다. 침전된 하얀색 생성물은 물과 함께 여과되었고 에탄올은 100℃에서 12시간 동안 휘발시켰다. 최종 생성물은 550℃에서 3시간 동안 열처리를 통해 수득하였다.

[0052] 1-2. MCF에 아민(Amine) 접합

[0053] 300℃에서 12시간 동안 건조한 MCF 1 g에 N<sub>2</sub> 가스의 유속 5 CC/분 조건 하에 톨루엔 80 ml을 추가하였다. 5 mmol 3-아미노프로필 트리에톡시실란(aminopropyl triethoxysilane)(Sigma-Aldrich) 또는 11-아미노운데실 트리에톡시실란(aminoundecyl triethoxysilane)(Sigma-Aldrich) 1.11 g을 그 용액에 천천히 떨어뜨렸다. 5분 동안 섞어준 후 이 혼합물을 100℃로 가열하고 그 온도에서 24 시간 동안 환류 상태 하에 유지시켰다. 최종 생성물은 물과 에탄올과 함께 여과를 통해 얻었다.

[0054] 1-3. MCF에 알데하이드 접합

[0055] 아민 접합된 MCF 0.5 g에 50 ml 물을 넣어주고 2 mmol 글루타르알데히드(물에서 50 wt %)의 0.4 g을 그 혼합물에 주입하였다. 5분 동안 상온에서 교반시켜준 후 그 혼합물을 60℃로 가열한 후 24시간 동안 그 온도에서 유지시켰다. 이 최종 생성물은 물, 에탄올과 함께 여과되었다. 이러한 방법을 이용하여 그림 8과 같은 4가지 종류의 담체를 최종 생성하였다. 에폭시(3)-MCF, 알데히드(3)-MCF, 알데히드(11)-MCF, 알데히드(3)-SiO<sub>2</sub> 명칭의 의미는 앞의 에폭시와 알데히드는 작용기이며 (3) 또는 (11)은 작용기와 지지대 사이의 탄소 수이고 MCF 또는 SiO<sub>2</sub>는 지지대를 의미한다.

[0056] 본 발명의 실시예 및 도면에 기재된 에폭시(3)-MCF, 알데히드(3)-MCF, 알데히드(11)-MCF, 알데히드(3)-SiO<sub>2</sub>에서 탄소수를 나타내는 (3) 및 (11)은 청구항 및 발명의 상세한 설명에서 메조포러스 담체에 공유결합하는 알데하이드 화합물의 탄소수 9개 및 탄소수 17개와 각각 대응된다.

[0057] 1-4. 효소 고정화

[0058] 위와 같은 방법으로 제작된 담체에 효소를 고정화시키는 실험을 진행하였다. 정제한 효소 10 과 담체(에폭시(3)-MCF, 알데히드(3)-MCF, 알데히드(3)-SiO<sub>2</sub>, 알데히드(11)-MCF) 10 mg을 인산완충용액(PBS) 300 에 잘 섞어주고 20시간 동안 반응시켰다(도 1). 이 때 조건은 23℃, 60 rpm 또는 4℃ 냉장보관으로 하였다. 반응물을 컬럼(Genet Bio)에 옮기고 4,000 rpm으로 원심분리한 후 그 여과액에 pNPG와 증류수를 섞고 10분, 40℃에서 반응시킨 후 흡광도 400 nm로 측정하였다(첫 번째 세척 용액은 W1). 컬럼에 PBS용액을 첨가하고 원심분리하여 그 여과액을 다시 pNPG와 증류수를 섞고 10분, 40℃에서 반응시킨 후 흡광도 400 nm로 측정하였다(두 번째 세척 용액은 W2). W2의 방법을 반복하였다(W3). 컬럼 내부에 남아있는 담체-효소에 pNPG와 증류수를 섞고 10분, 40℃에서 반응시킨 후 4,000 rpm으로 원심분리하고 그 여과액의 흡광도를 400 nm에서 측정하였다(첫 번째 재활용 용액은 R1). R1의 방법을 반복하였다(R2-R10).

[0059]

**실시예 2: 담체를 이용한 효소 고정화**

[0060]

도 2는 에폭시(3)-MCF; A, 알데히드(3)-MCF; B, 알데히드(3)-SiO<sub>2</sub>; C, 알데히드(11)-MCF; D의 담체에 신규 베타 글루코시다아제가 고정화되는 과정을 나타낸 것이다.

[0061]

*2-1. 에폭시(3)-MCF*

[0062]

도 3a-3b를 보면 에폭시(3)-MCF를 이용한 23℃, 4℃에서의 고정화한 결과, 고정화되지 못하고 모두 세척 용액 속에서 베타글루코시다아제 활성이 나타났다. 즉, 첫 번째 세척액의 경우 가장 강한 활성이 나타났으며, 점차 활성이 약해지는 것으로 나타났다. 3회 세척이 끝난 후 재활용 1회(R1) 단계부터는 23℃ 반응의 경우 활성이 거의 나타나지 않았고 4℃ 반응의 경우 약간의 활성이 나타났지만 매우 약하였다. 이 결과로 볼 때, 에폭시(3)-MCF에는 베타글루코시다아제가 고정화되지 않았기 때문에 세척 단계에서 효소가 대부분 세척된 것으로 판단되었다.

[0063]

*2-2. 알데히드(3)-MCF*

[0064]

알데히드(3)-MCF의 경우 23℃, 4℃ 반응 모두 첫 번째 세척액(W1)에서 약한 활성이 나타났고, 두 번째와 세 번째 세척액(W2, W3)등 단계를 거칠수록 활성이 더욱 약해지는 것으로 나타났다. 3회 세척이 끝난 후 재활용 1회(R1) 단계부터 R3까지 매우 강한 활성을 보이거나 R4부터는 조금씩 활성이 약해지는 것을 볼 수 있었다. R4까지는 처음 활성의 90%까지 유지 하였으나 R10에서 23℃는 처음 활성의 30%로 4℃는 40%까지 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 이로 미루어보아 23℃가 R4-R9까지는 4℃보다 활성이 조금 높았지만 R9부터 급격히 감소하였고 4℃는 R6-10까지 50%에서 서서히 40% 정도로 활성이 감소되는 것으로 나타났다. 세척 단계에서 베타글루코시다아제가 알데히드(3)-MCF에 고정화되지 않고 빠져나가는 것이 조금 있었지만, R1부터 강한 활성을 나타내는 것으로 보아 알데히드(3)-MCF에 베타글루코시다아제가 고정화된 것을 알 수 있었다. 하지만 R4부터 조금씩 활성이 약해지므로 고정화가 되지만 4회 재활용 후에는 서서히 고정화된 베타글루코시다아제와 알데히드(3)-MCF가 서로 분리되거나 혹은 효소가 불활성화 되는 것으로 판단된다.

[0065]

*2-3. 알데히드(3)-SiO<sub>2</sub>*

[0066]

알데히드(3)-SiO<sub>2</sub>를 이용한 고정화 결과 세척 단계에서는 23℃, 4℃ 반응 모두 활성이 거의 나타나지 않는 것으로 보였다. 재활용 단계에서는 알데히드(3)-MCF와 마찬가지로 R1-R3은 처음 활성과 비교하여 거의 100%에 가까운 활성을 나타내었지만 R4부터 활성이 약해지는 것을 볼 수 있었다. R4부터는 23℃ 반응의 경우 서서히 활성이 약해지다가 R10에서는 처음 활성의 30% 이하로, 4℃ 반응의 경우 23℃ 반응보다 R4부터 급격히 활성이 약해지다가 R5-R7은 처음 활성의 50-60%로 유지하였지만 그 후 다시 활성이 약해져 R10에서는 처음 활성의 약 40%로 나타났다. 이로 미루어 보아 알데히드(3)-MCF와 마찬가지로 베타글루코시다아제는 알데히드(3)-SiO<sub>2</sub> 담체에 고정화되었지만 재활용 4회 이후부터는 서서히 고정화된 베타글루코시다아제와 알데히드(3)-MCF가 서로 분리되거나 혹은 효소가 불활성화 되는 것으로 판단되며, R10의 활성을 비교하였을 때 23℃보다 4℃ 반응한 것이 조금 더 활성이 강한 것을 알 수 있다. 하지만 R10에서 조금 더 활성이 강한 4℃라도 결국 처음 활성의 40% 밖에 미치지 못했다.

[0067]

알데히드(3)-SiO<sub>2</sub>와 알데히드(3)-MCF의 차이점은 SiO<sub>2</sub>와 MCF의 지지대 차이로 SiO<sub>2</sub>의 경우 MCF보다 표면적이 매우 작아 알데히드 체인을 붙일 수 있는 면적이 MCF에 비해 매우 협소하여 알데히드 체인이 적게 붙어있었다. 그로인해 알데히드(3)-MCF보다는 고정화 효소의 재활용성이 약하게 나타나는 것으로 생각된다.

[0068]

*2-4. 알데히드(11)-MCF*

[0069]

알데히드(11)-MCF의 경우 탄소수가 다른 것들에 비해 더 많아 소수성의 성질을 크게 나타내어 완충용액에 떠있는 형태로 실험하였다. 실험 시 완충용액 위에 떠 있다가 뚜껑을 열 때마다 가루형태로 조금씩 날아가 소실되

있으며 완충용액에 녹아있는 기질과 만나게 하기 위하여 피펫을 이용하여 섞어주었지만 바로 완충용액 위로 떠올라 실험에 어려움이 있었다.

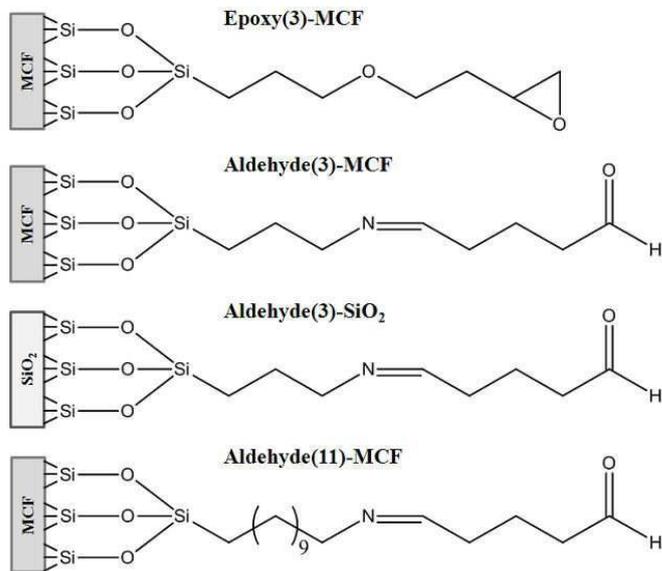
[0070] 실험결과 세척 단계에서는 23℃, 4℃ 반응 모두 활성이 거의 나타나지 않는 것으로 보였지만 재활용 단계에서는 R1의 값이 23℃, 4℃ 둘 다 R2에 비해 활성이 매우 낮다가 R2부터 높아져 R3로 이어져 나가는 것을 볼 수 있었다. R1의 활성이 낮게 측정된 이유는 위에 기술한 이 실험에 대한 어려움으로 말미암아 실험적 오류가 있었던 것으로 생각된다. 그리하여 도 4a-b는 R2를 처음 활성 100%로 설정하여 작성하였다.

[0071] 23℃의 경우 R2-R8까지는 조금씩 활성이 떨어지지만 처음 활성의 80%까지 유지하는 것으로 나타났고 그 후 R9부터 급격히 떨어져 R10에서는 처음 활성의 60%이하로 떨어졌다. 하지만 4℃의 경우 그래프가 처음 활성의 100% 사이에서 오르락내리락하다가 R10에서는 처음 활성의 90%에 가까운 활성을 보였다. 결과적으로 알데히드(11)-MCF가 다른 3종류의 담체보다 고정화가 단단하게 일어난다는 것을 알 수 있으며 23℃보다는 4℃로 반응시켰을 때 매우 효과적인 고정화가 이루어지는 것으로 판단되었다. 하지만 실험 시 알데히드(11)-MCF가 소수성의 성질을 나타내어 완충용액에 녹지 않아 다루기가 까다롭고 알데히드(11)-MCF가 녹을 수 있는 친유성 용매를 사용할 시에는 정제된 효소가 불활성화 되므로 이용이 불가능하였다. 하지만 완충용액에 녹지 않으면서도 고정화가 잘되었고 활성 반응도 충분히 확인할 수 있었으므로 실험에는 문제가 없는 것으로 판단되었다. 또한 완충용액에 녹지 않고 위에 가루형태로 떠있으니 담체를 분리해 내는데 용이할 것으로 판단되었다.

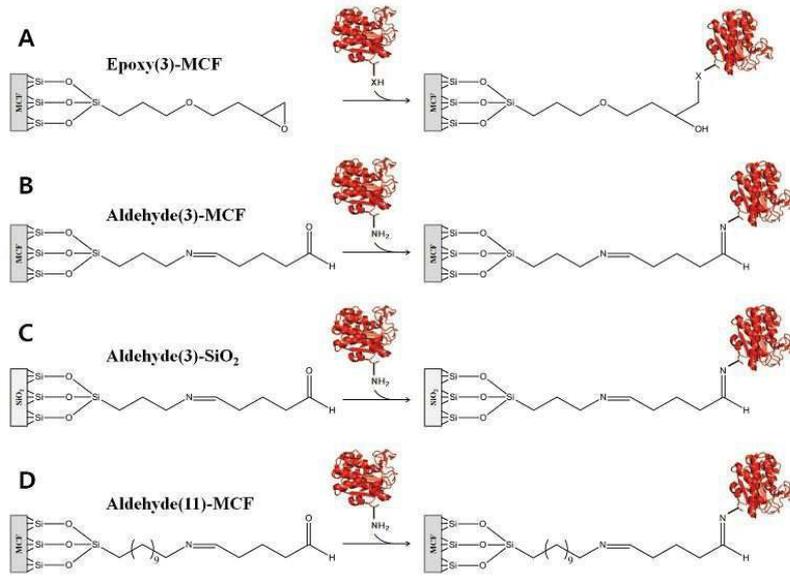
[0072] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

**도면**

**도면1**



도면2



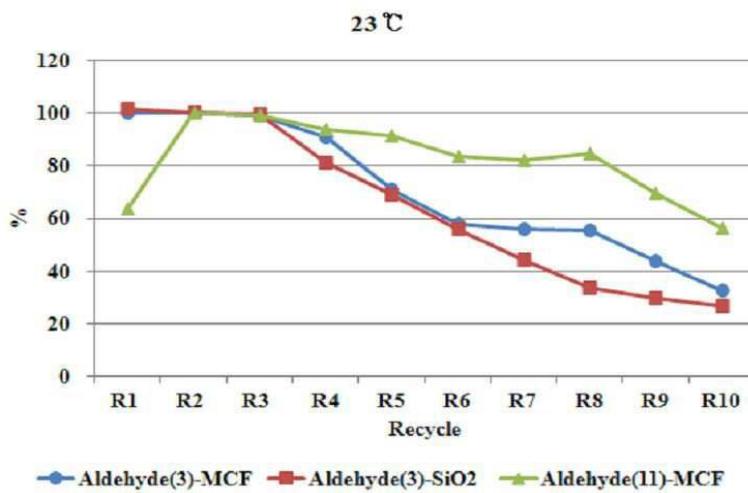
도면3a

	Epoxy(3)-MCF		Aldehyde(3)-MCF		Aldehyde(3)-SiO <sub>2</sub>		Aldehyde(11)-MCF	
	23 °C	4 °C	23 °C	4 °C	23 °C	4 °C	23 °C	4 °C
<b>W1</b>								
<i>A<sub>420nm</sub></i>	3.532	3.905	0.678	0.505	0.153	0.149	0.145	0.143
<b>W2</b>								
<i>A<sub>420nm</sub></i>	2.216	2.539	0.421	0.362	0.145	0.144	0.146	0.144
<b>W3</b>								
<i>A<sub>420nm</sub></i>	0.436	0.515	0.273	0.298	0.143	0.143	0.147	0.150
<b>R1</b>								
<i>A<sub>420nm</sub></i>	0.229	0.362	3.926	3.934	3.994	3.991	2.334	1.778
<b>R2</b>								
<i>A<sub>420nm</sub></i>	0.334	0.606	3.912	3.829	3.928	3.935	3.666	3.495
<b>R3</b>								
<i>A<sub>420nm</sub></i>	0.255	0.421	3.874	3.835	3.910	3.800	3.638	3.671
<b>R4</b>								
<i>A<sub>420nm</sub></i>			3.561	3.353	3.180	3.033	3.446	3.258

도면3b

	Epoxy(3) -MCF		Aldehyde(3) -MCF		Aldehyde(3) -SiO <sub>2</sub>		Aldehyde(11) -MCF	
	23℃	4℃	23℃	4℃	23℃	4℃	23℃	4℃
R5								
A <sub>410nm</sub>			2.767	2.617	2.718	2.275	3.344	3.427
R6								
A <sub>410nm</sub>			2.269	2.061	2.194	2.070	3.064	3.178
R7								
A <sub>410nm</sub>			2.185	1.889	1.730	2.182	3.006	3.912
R8								
A <sub>410nm</sub>			2.164	1.664	1.318	1.244	3.107	3.538
R9								
A <sub>410nm</sub>			1.712	1.69	1.169	1.882	2.651	3.132
R10								
A <sub>410nm</sub>			1.275	1.519	1.051	1.539	2.062	3.080

도면4a



도면4b

