



(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

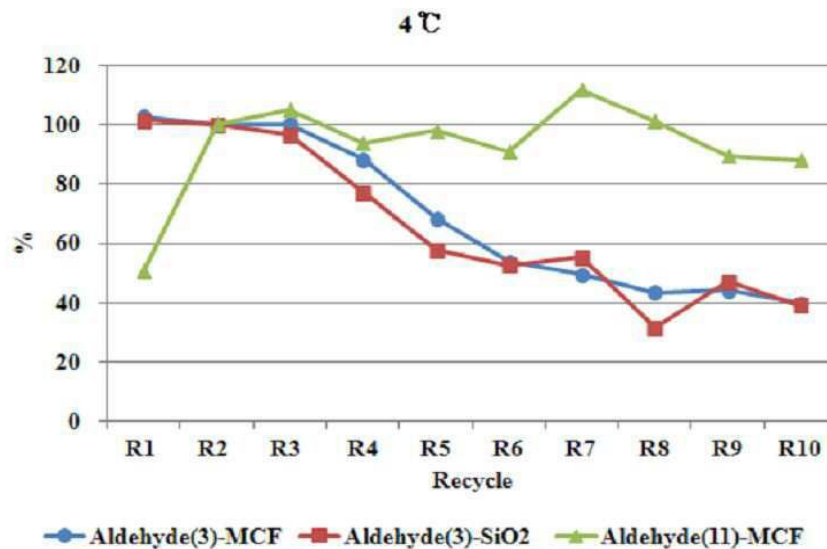
심사관 : 김남경

(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

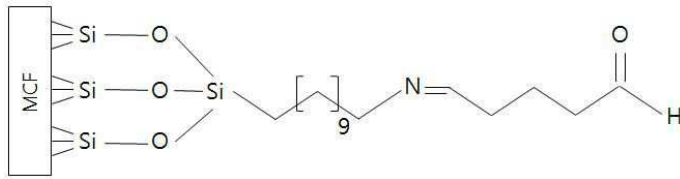
특허청구의 범위

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.

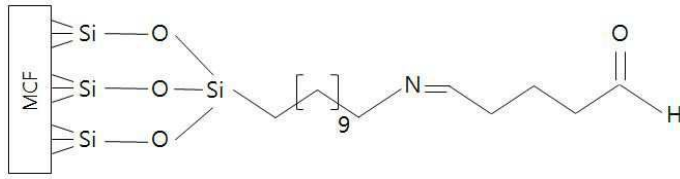
청구항 6

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

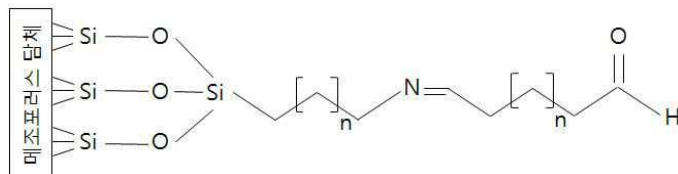
해결하려는 과제

- [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

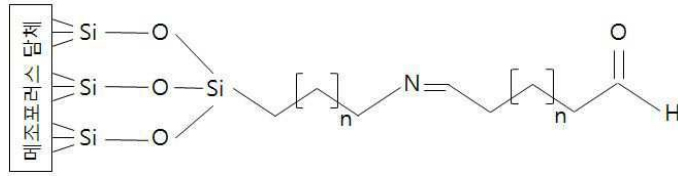
- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 효소 고정화 방법을 제공한다:
- [0012] (a) 메조포러스(mesoporous) 담체에 알데하이드 화합물을 공유결합시켜 다음의 화학식 1로 표시되는 알데하이드기 기능기화(aldehyde-functionalized) 메조포러스 담체를 제조하는 단계; 및

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 n 은 1 내지 10의 정수이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 표시하는 상기 화학식 1에서 n 은 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^2/g 이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 효소가 고정화되는 메조포러스 담체의 기공 지름은 10-50 nm이며, 표면적은 250-1,000 m^2/g 이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 효소가 고정화되는 메조포러스 담체의 기공 지름은 20-50 nm이며, 표면적은 500-1,000 m^2/g 이다.

[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°C의 온도에서 10-25시간 동안 실시한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명에서 효소를 고정화 시키는 단계는 0-15°C의 온도에서 15-25시간 동안 실시한다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명에서 효소를 고정화 시키는 단계는 2-7°C의 온도에서 15-20시간 동안 실시한다.

[0032]

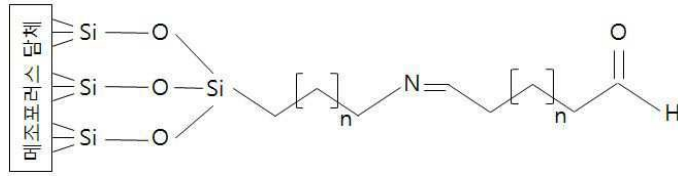
본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 고정화 방법에 의해 고정화된 효소를 제공한다.

[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 n 은 1 내지 10의 정수이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 알데하이드기 기능기화 메조포러스 담체를 표시하는 상기 화학식 1에서 n 은 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 Na₂SiO₃ : P123 : H₂O : 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 N₂ 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)-SiO₂ 명칭의 의미는 앞의 에폭시와 알데히드는 작용기이며 (3) 또는 (11)은 작용기와 지지대 사이의 탄소 수이고 MCF 또는 SiO₂는 지지대를 의미한다.

[0056] 본 발명의 실시예 및 도면에 기재된 에폭시(3)-MCF, 알데히드(3)-MCF, 알데히드(11)-MCF, 알데히드(3)-SiO₂에서 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)-SiO₂, 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)-SiO₂; 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)-SiO₂

[0066]

알데히드(3)-SiO₂를 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)-SiO₂ 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)-SiO₂와 알데히드(3)-MCF의 차이점은 SiO₂와 MCF의 지지대 차이로 SiO₂의 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.

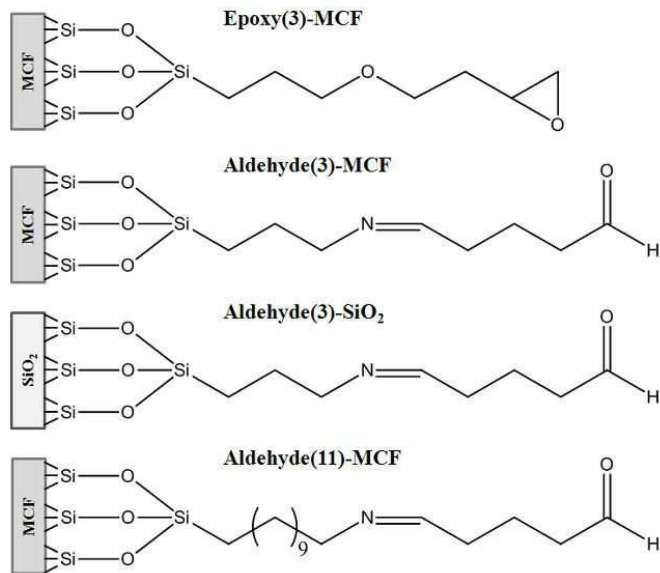
[0070] 실험결과 세척 단계에서는 23℃, 4℃ 반응 모두 활성이 거의 나타나지 않는 것으로 보였지만 재활용 단계에서는 R1의 값이 23℃, 4℃ 둘 다 R2에 비해 활성이 매우 낮다가 R2부터 높아져 R3로 이어져 나가는 것을 볼 수 있었다. R1의 활성이 낮게 측정된 이유는 위에 기술한 이 실험에 대한 어려움으로 말미암아 실험적 오류가 있었던 것으로 생각된다. 그리하여 도 4a-b는 R2를 처음 활성 100%로 설정하여 작성하였다.

[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.

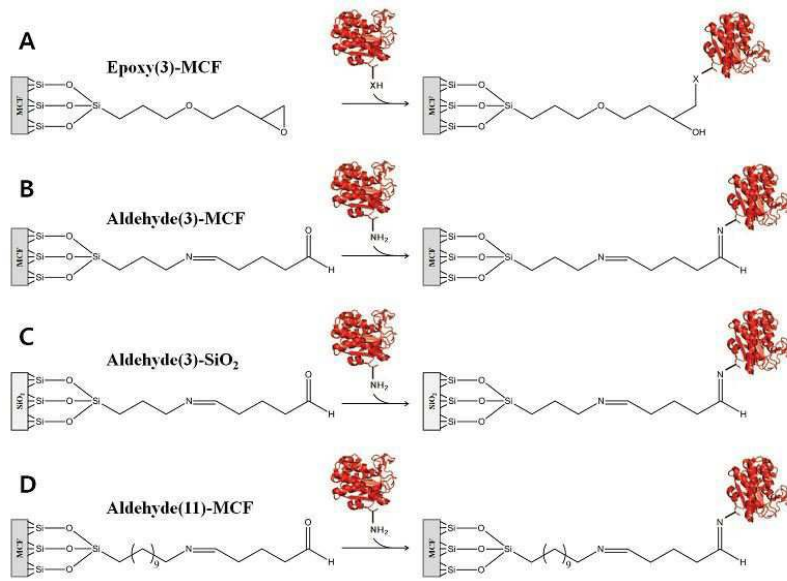
[0072] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



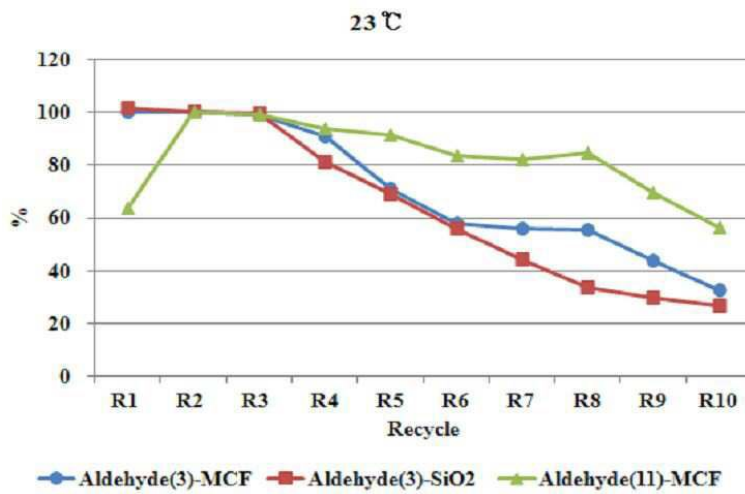
도면3a

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

도면3b

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

도면4a



도면4b

