



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년05월17일
(11) 등록번호 10-1143388
(24) 등록일자 2012년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/02 (2006.01) C12P 13/14 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0022519
(22) 출원일자 2009년03월17일
심사청구일자 2009년03월17일
(65) 공개번호 10-2010-0104236
(43) 공개일자 2010년09월29일
(56) 선행기술조사문헌
BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. 2001, VOL. 76, NO. 1, pp. 86-90*
WO2008079756 A1*
ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY. 1989, VOL. 11, pp. 467-483
JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B: ENZYMATI. 2006, VOL. 43, pp. 44-48
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
백진욱
대전광역시 유성구 배울2로 3, 대덕테크노밸리 802동 902호 (관평동)
박찬범
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 505동 802호 (전민동, 엑스포아파트)
(74) 대리인
이원희
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 7 항

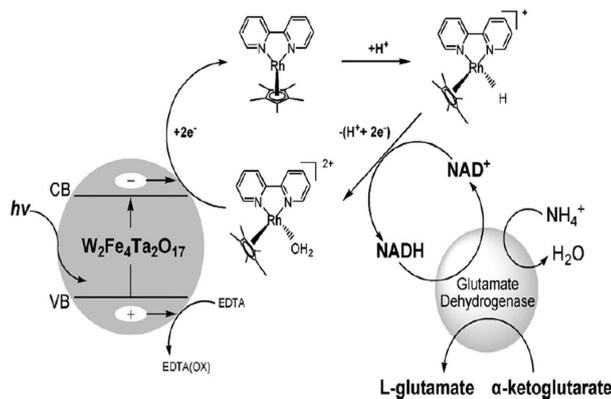
심사관 : 감유림

(54) 발명의 명칭 **가시광선 흡수 광촉매를 이용한 산화환원효소 보조인자의 재생방법 및 이를 이용한 효소반응으로 L-글루타메이트를 제조하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 가시광선 흡수 광촉매를 이용한 산화환원효소 보조인자의 재생방법 및 이를 이용한 효소반응으로 L-글루타메이트를 제조하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 반응기에 산화형의 산화환원효소 보조인자; 산화환원 매개체; 및 가시광선 흡수 광촉매를 넣고 교반하면서 가시광선을 포함하는 빛을 조사하여 환원형의 산화환원효소 보조인자를 생성시키는 단계를 포함하는 산화환원효소 보조인자의 재생방법 및 이를 이용한 효소반응으로 L-글루타메이트를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 전극 대신 가시광선을 흡수하는 광촉매를 사용함으로써 태양에너지를 사용하여 추가에너지 비용 없이 산화환원효소의 보조인자를 재생할 수 있어 경제적이고 환경친화적이므로, 대량생산 및 자동화가 가능하며, 따라서 효소공정을 사용하여 화합물을 제조하는 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이상하

전북 전주시 완산구 태평동 중앙상가아파트 다동
208호

이. 수부라마니안

8/67, 발라지 3번가, 타차나이어, 티루넬벨리
627-358, 타밀라 나두, 인도

바랏 비. 칼리

실버문 소싸이어티 플랫 12, 2층 바드한 키드 푸네
411021, 인도

이상미

대구광역시 수성구 달구벌대로 2546 (범어동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-0904-A0

부처명 지식경제부

연구사업명 화학기반 융,복합 기술 선도 연구사업

연구과제명 청정화학 촉매기술의 설계 및 실용화 기술 개발

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2009년 01월 10일 ~ 2009년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

반응기에 산화형의 산화환원효소 보조인자; (헥사메틸벤젠-2,2'-비피리딘클로로)루테튬(II) 또는 (펜타메틸사이클로펜타디에닐-2,2'-비피리딘클로로)로듐(III) 중 어느 하나의 산화환원 매개체; 및 가시광선 흡수 광촉매로서 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 을 넣고 교반하면서 가시광선을 포함하는 빛을 조사하여 환원형의 산화환원효소 보조인자를 생성시키는 단계를 포함하는 산화환원효소 보조인자의 재생방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 산화형의 산화환원효소 보조인자는 NAD^+ , $NADP^+$, FAD^+ 및 FMN^+ 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 재생방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 산화형의 산화환원효소 보조인자는 NAD^+ 인 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 재생방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 전자의 들뜸으로 광촉매 내 가전자대에 생성된 정공(h^+_{VB})을 안정화시키기 위하여 환원제를 추가하는 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 재생방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 환원제는 EDTA, 트리메틸아민(TEA), $NaBH_4$, 시트르산나트륨(Sodium Citrate)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 재생방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 환원제의 첨가량은 0.5~20 mM인 것을 특징으로 하는 산화환원효소 보조인자의 재생방법.

청구항 10

반응기에 산화형의 산화환원효소 보조인자; (헥사메틸벤젠-2,2'-비피리딘클로로)루테튬(II) 또는 (펜타메틸사이클로펜타디에닐-2,2'-비피리딘클로로)로듐(III) 중 어느 하나의 산화환원 매개체; 및 가시광선 흡수 광촉매로서 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 을 넣고 교반하면서 가시광선을 포함하는 빛을 조사하여 환원형의 산화환원효소 보조인자를 재생시키

는 단계; 및

상기 단계에서 재생된 환원형의 보조인자와, 산화환원효소로서 글루타메이트 탈수소효소 및 기질로서 알파-케토 글루타레이트를 반응시키는 단계를 포함하는 L-글루타메이트의 제조방법.

청구항 11

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 가시광선 흡수 광촉매를 이용한 산화환원효소 보조인자의 재생방법 및 이를 이용한 효소반응으로 L-글루타메이트를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 효소는 단백질로 이루어진 주효소(apoenzyme)와 조효소(coenzyme)로 이루어지며, 상기 조효소는 금속이온 여부에 따라 보조인자(cofactor) 또는 보결족(prosthetic group)으로 구분된다. 우리가 통상적으로 말하는 조효소는 엄밀하게는 보조인자(cofactor)를 말하는 것으로서, 상기 보조인자는 기질로부터 이탈된 원자나 원자단을 일시적으로 수용하여 다른 물질에 전달하는 역할을 하며 대표적으로 니코틴아미드 보조인자인 NAD, NADP와 플라빈 보조인자인 FAD, FMN 등이 있다.

[0003] 상기 니코틴아미드 보조인자와 플라빈 보조인자 또는 그들의 산화된 형태는 많은 종류의 산화환원효소(oxidoreductase)가 수행하는 산화환원 생촉매반응에 있어서 필수적인 보조인자로 이용된다. 상기 생촉매반응은 실험실 내 유기합성 및 다양한 공업 분야에서 있어서 점점 더 중요해지고 있다. 그러나 이들 보조인자의 높은 비용 때문에 많은 효소 공정을 갖는 산업이 발달되지 못하고 있다. 따라서 생촉매 반응의 효율을 높이고, 경제적이고 산업가능성이 있는 공정을 만들기 위해서는, 효소의 지속적 반응 수행을 위한 보조인자가 지속적으로 재생되어야 할 필요가 있다. 그러나, 다양한 방식으로 널리 이용되고 있는 가수분해 효소와는 달리, 산화환원 효소의 사용에 있어서 만족할만한 보조인자 재생방법이 확립되지 않아 그다지 널리 상용화되고 있지 않은 현실이다.

[0004] 이에 전기화학적 재생(electrochemical regeneration)은 기존의 제2효소/기질 재생방법을 대체할 수 있는 하나의 매력적인 방법으로 여겨져 왔다. 하지만 전기화학적 재생방법에서도 NAD(P)⁺의 NAD(P)H로의 환원이 열역학적으로 선호되는 전압조건에서도 전극과 NAD(P)⁺사이의 느린 전자전달 속도로 인하여 재생 효율이 떨어지는 단점이 있었다.

[0005] 이를 해결하기 위하여 균등질의 산화환원 매개체(mediator)를 사용하여 전극과 NAD(P)⁺사이에 전자를 전달하는 방법이 개발된 바 있으며, 일례 중 대표적으로 로듐(III) 복합체인 (펜타메틸사이클로펜타디에닐-2,2'-비피리딘 클로로)로듐(III):[Cp*Rh(bpy)H₂O]²⁺(이하 M_{ox})를 NAD(P)⁺에의 전자전달을 위한 매개체로 사용하는 방법이 개발되었다.

[0006] 상기 전자전달 매개체 중에서 로듐(III) 복합체 M_{ox}는 전기화학/화학적 과정을 거쳐 활성 환원체인 M_{red2}로 변환되어 NADH의 재생에 관여한다. M_{ox}는 두 개의 전자를 받아들여 전기화학적 변화로 M_{red1}의 상태가 된다(E-step). 이어서 상기 M_{red1}은 총 전자의 양은 변하지 않고 용액 상에서 하나의 양성자를 취함으로써 화학적인 과정을 통해 M_{red2}로 변환된다(C-step). 상기 활성 환원체인 M_{red2}는 전자 두 개와 양성자 하나를 NAD(P)⁺에 제공하여 NAD(P)H

로 변환시키고, 이때 자신은 초기상태인 M_{ox} 로 돌아가게 된다(도 1 참조).

[0007] 그러나, 전극을 사용하는 전기화학적 재생방법은 외부에서 전기에너지를 주입해야 하는 문제가 있다.

[0008] 한편, 최근 대체에너지로서 광화학에너지를 이용하여 보조인자를 재생하는 방법에 관심이 증가하고 있다. 상기 광화학 에너지는 풍부한 태양 에너지를 사용하기 때문에 깨끗하며 경제적이다.

[0009] 상기 광화학 보조인자 재생을 위하여 몇몇 연구가 진행되었는데, 구체적으로 효소 매개체로서 균질상(용해성 색소 감광제) 또는 비균질상(TiO_2/CdS 광촉매)에서 광화학 보조인자 재생 실험을 수행하였고, 그 결과 낮은 특이적 활성 및 낮은 수율, 기질 저해 및 높은 비용 등의 문제가 나타났다. 또한 균질 매개체로부터의 보조인자의 정제/분리의 어려움, 유해한 전자 대체물질 등의 문제도 나타났다. 따라서, 종래 광화학 보조인자 재생연구는 만족스럽지 못하였다.

[0010] 이에 본 발명자는 종래 산화환원효소의 보조인자의 효율적인 재생방법을 개발하고자 각고의 노력을 거듭한 결과, 메틸비올로겐, 루테늄 II 복합체 및 로듐 III 복합체로 구성되는 균으로부터 선택되는 어느 1종 이상의 산화환원 매개체에 전극 대신 가시광선을 흡수하는 광촉매를 사용함으로써 태양에너지를 사용하여 추가에너지 비용 없이 산화환원효소의 보조인자를 재생할 수 있음을 확인하고 이를 이용한 효소반응으로 L-글루타메이트를 제조하는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 산화환원 매개체에 전극 대신 가시광선을 흡수하는 광촉매를 사용함으로써 태양에너지를 사용하여 추가에너지 비용 없이 산화환원효소의 보조인자를 재생하는 방법 및 이를 이용한 효소반응으로 L-글루타메이트를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은

[0013] 반응기에 산화형의 산화환원효소 보조인자; 메틸비올로겐, 루테늄 II 복합체 및 로듐 III 복합체로 구성되는 균 으로부터 선택되는 어느 1종 이상의 산화환원 매개체; 및 가시광선 흡수 광촉매를 넣고 교반시켜 환원형의 산화 환원효소 보조인자를 생성시키는 단계를 포함하는 산화환원효소 보조인자의 재생방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생성된 환원형의 산화환원효소 보조인자에 글루타메이트탈수효소 및 기질 물질을 넣고 교반시키는 단계를 포함하는 생촉매반응에 의한 L-글루타메이트의 제조방법을 제공한다.

[0015]

효과

[0016] 본 발명에 의하면, 전극 대신 가시광선을 흡수하는 광촉매를 사용함으로써 태양에너지를 사용하여 추가에너지 비용 없이 산화환원효소의 보조인자를 재생할 수 있어 경제적이고 환경친화적이므로, 대량생산 및 자동화가 가능하며, 따라서 효소공정을 사용하여 화합물을 제조하는 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은

- [0019] 반응기에 산화형의 산화환원효소 보조인자; 메틸비올로겐, 루테늄 II 복합체 및 로듐 III 복합체로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 1종 이상의 산화환원 매개체; 및 가시광선 흡수 광촉매를 넣고 교반하면서 가시광선을 포함하는 빛을 조사하여 환원형의 산화환원효소 보조인자를 생성시키는 단계를 포함하는 산화환원효소 보조인자의 재생방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 전기화학적 환원의 대상이 되는 산화형의 산화환원효소 보조인자는 니코틴아미드 보조인자인 NAD^+ (nicotinamide adenine dinucleotide), NADP^+ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 또는 플라빈 보조인자인 FAD^+ (flavin adenine dinucleotide), FMN^+ (flavin mononucleotide)일 수 있으며, 바람직하게는 NAD^+ 일 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 산화환원 매개체로서 메틸비올로겐, 루테늄 II 복합체 및 로듐 III 복합체는 산화형의 산화환원효소 보조인자에 전자전달(electron transfer)을 위한 매개체의 용도로 사용된다.
- [0022] 상기 산화환원 매개체 중 메틸비올로겐(methyl viologen)은 NAD(P)H 에 대한 전자전달 매개체로서 플라보효소(Flavoenzyme)(Ferredoxin reductase(FDR) 또는 Lipoamide Dehydrogenase(LipDH))와 함께 간접적인 전기화학적 재생에 사용된 바 있으며(Dicosimo et al. J Org Chem (1981) 46 : 4622-4623), 루테늄(II) 복합체인 (헥사메틸벤젠-2,2'-비피리딘클로로)루테늄(II)은 케톤류의 알콜로의 환원에 전자전달을 위한 매개체로 사용된 바 있고(Ogo S, Abura T, Watanabe Y(2002) Organometallics 21:2964-2969; Yaw Kai Yan et al. J Biol Inorg Chem (2006) 11: 483-488), 로듐 (III) 복합체인 (펜타메틸사이클로펜타디에닐-2,2'-비피리딘클로로)로듐(III): $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (이하 M_{ox})은 NAD(P)^+ 에의 전자전달을 위한 매개체(K. Vuorilehto, S. Lutz, C. Wandrey, *Bioelectrochemistry* 2004, 65, 1) 및 FAD^+ 에의 전자전달을 위한 매개체(F. Hollmann et al. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 19-20(2003) 167-176)로 사용된 바 있다. 따라서, 상기 산화환원 매개체는 전자와 양성자를 전달함으로써 산화환원효소 보조인자의 재생 동역학(kinetics)을 개량하는데 사용된다.
- [0023] 이때, 상기 루테늄 II 복합체는 바람직하게는 (헥사메틸벤젠-2,2'-비피리딘클로로)루테늄(II)일 수 있고, 상기 로듐 III 복합체는 (펜타메틸사이클로펜타디에닐-2,2'-비피리딘클로로)로듐(III)을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 광촉매는 기존의 전극을 대신하여 태양광을 흡수하여 자신이 지니고 있는 전자들로 채워진 가전자대(Valance band)로부터 전자를 비어 있는 전도대(Conduction band)로 이동시킴으로써 산화환원 매개체가 전자를 잘 받아들여 화학반응을 수행하도록 하는 역할을 한다. 이때, 지구에서 이용가능한 전체 태양광 에너지 중 46%가 가시광선 영역이고 단지 4%가 자외선 영역인 바, 본 발명에서 사용되는 광촉매는 가시광선을 흡수하여 전자를 들뜨게 할 수 있는 물질인 것이 바람직하다. 상기 가시광선 흡수 광촉매로는 바람직하게 $\text{W}_2\text{Fe}_4\text{Ta}_2\text{O}_{17}$ 를 사용할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 따른 가시광선 광촉매를 이용한 산화환원효소의 보조인자 재생방법의 메카니즘은 다음과 같다.
- [0026] 구체적으로, 본 발명에서는 산화환원 매개체로 로듐 복합체(III)를 사용하였으며, 이 경우, 도 2에 나타낸 바와 같이, 광촉매인 $\text{W}_2\text{Fe}_4\text{Ta}_2\text{O}_{17}$ 가 가시광선을 흡수하여 전자가 들뜸으로써 M_{ox} 에 전자를 전달하여 M_{red1} 을 형성하며(단계 a); 상기 단계 a의 M_{red1} 는 산화되어 M_{red2} 를 형성하고(단계 b); 상기 단계 b의 M_{red2} 가 산화형 산화환원효소 보조인자에게 전자와 양성자를 전달하여 환원형 산화환원효소 보조인자를 형성하게 된다(단계 c).
- [0027] 또한, 본 발명에 있어서, 전자의 들뜸으로 광촉매 내 가전자대에 생성된 정공(h+VB)을 안정화시키기 위하여 환원제를 추가적으로 사용할 수 있다. 이때 사용되는 환원제는 EDTA, 트리메틸아민(TEA), NaBH_4 , 시트르산나트륨(Sodium Citrate) 등이 바람직하다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 환원제의 첨가량은 0.5~20 mM인 것이 바람직하다. 만일 상기 환원제의 첨가량이 0.5

mM 미만이면 반응 시스템이 불안정해져 지는 문제가 있고, 20 mM을 초과하면 수율이 오히려 감소하는 문제가 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 가시광선 흡수 광촉매를 이용한 산화환원효소 보조인자 재생 방법으로 생성된 환원형의 산화환원효소 보조인자에 산화환원효소 및 기질 물질을 넣고 교반시키는 단계를 포함하는 생촉매반응에 의한 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0030] 상기 방법은 태양에너지를 사용하여 추가에너지 비용 없이 산화환원효소의 보조인자를 재생할 수 있어 경제적이고 환경친화적이므로, 대량생산 및 자동화가 가능하며, 따라서 글루타메이트 탈수소효소 등의 산화환원효소를 이용하여 L-글루타메이트와 같은 화합물을 제조하는 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

[0031] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만, 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0032] <제조예 1> 광촉매($W_2Fe_4Ta_2O_{17}$)의 제조

[0033] 상기 광촉매 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 는 전통적인 고체상 루트를 통해 제조하였다. 구체적으로 WO_3 , Fe_2O_3 및 Ta_2O_5 를 화학양론적 원소비가 $W:Fe:Ta=1:2:1$ 이 되도록 적절한 양으로 혼합한 다음, 균질한 혼합물이 될 때까지 완전히 분쇄시켰다. 다음으로 혼합물을 순 알루미늄 도가니에 넣고 공기 중, 1000 °C에서 10시간 동안 소결시켰다. 이후, 상온으로 냉각한 다음 다시한번 완전히 분쇄시키고, 동일한 조건 하에서 소결시켰다. 이 과정을 세번 반복하여 화학적으로 균질한 결정형의 광촉매를 제조하였다.

[0034] <특성>

[0035] 제조한 광촉매의 특성을 알아보기 위하여 X선 회절, 전계방출형 주사전자현미경(FESEM) 등을 이용하여 다음과 같은 분석을 수행하였다.

[0036] (1) X선 회절

[0037] 상기 광촉매의 분말 X선 회절패턴은 Rigaku-D/MaX-2200V WRD 기기를 사용하였으며, $CuK\alpha$ 방사선(40 kV/40 mA, $\lambda=1.5405 \text{ \AA}$)은 흑연 단색화장치 및 Ni 필터를 이용하였다.

[0038] 측정된 상기 광촉매의 분말 X선 회절패턴을 도 3에 나타내었다.

[0039] 도 3을 통하여 제조된 화합물이 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 임을 확인하였다.

[0040] (2) 전계방출형 주사전자현미경(FESEM)

[0041] FESEM 이미지는 JEOL-JSM 6700F 기기로부터 얻었다.

[0042] 측정 결과를 도 4에 나타내었다.

[0043] 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 사용되는 광촉매는 크기가 1 μm 이하인 부드러운 표면의 결정형 분말로 나타났다.

[0044] (3) 원소조성분석

[0045] 상기 광촉매의 원소조성은 플라즈마-원자 방출 스펙트로미터(ICP-AES)(Jobin-Yvon Ultima-C) 기기를 이용하여 결정하였다.

[0046] 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

	원소(중량%)		
	W	Fe	Ta
측정값	31.3	18.6	30.7
초기 고정값	29.8	18.1	29.3

[0047]

[0048]

표 1에 나타난 바와 같이, 제조된 광촉매의 화학적 조성은 초기 고정값과 유사함을 알 수 있으며, 초기 고정값이 W:Fe:Ta=2.0:4.0:2.0인 바, 제조된 화합물이 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 임을 확인하였다.

[0049]

(4) 확산 반사 스펙트럼(DRS)

[0050]

확산 반사 스펙트럼은 Shimadzu UV-2450 UV-Vis 스펙트로포토미터를 이용하여 측정하였다.

[0051]

측정 결과를 도 5에 나타내었다.

[0052]

도 5에 나타난 바와 같이, 제조된 광촉매는 400-700 nm의 파장에서 흡수가 일어나는 것을 알 수 있다. 따라서 본 발명에 사용되는 광촉매는 가시광선을 흡수하여 광촉매 기능을 나타냄을 알 수 있다.

[0053]

<제조예 2> 로듐 III 복합체 M의 제조

[0054]

NAD^+ 와 광촉매와의 전자를 전달하기 위한 유기금속 매개체로 로듐 III 복합체인 (펜타메틸사이클로펜타디에닐-2,2'-비피리딘클로로)로듐(III)(이하 M이라 함; $M=[Cp^*Rh(bpy)H_2O]^+$; $Cp^*=C^5Me_5$, $bpy=2,2'$ -비피리딘)을 사용하였다. 상기 로듐 III 복합체 M은 Kelle와 Gratzel의 방법(F. Hollmann, B. Witholt, A. Schmid, *J. Mol. Catal. B* 2002, 19-20, 167)으로 합성하였다.

[0055]

<실시예 1> 로듐 III 복합체 및 광촉매($W_2Fe_4Ta_2O_{17}$)를 이용한 NADH의 재생 방법

[0056]

석영 큐벳 반응기에 인산완충용액(100 mM, pH 7.0)을 넣고, $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 5 mg, 로듐 III 복합체 M 0.2 mM, NAD 0.1 mM 및 EDTA 5/20 mM을 넣어 상온에서 교반시켰다. 반응은 아르곤 분위기 하에서 450W 할로젠 램프($\lambda \geq 420$ nm)를 이용하였다. 이후 NADH의 농도를 분광광도계(Biospec-mini, Shimadzu)를 이용하여 340 nm에서 측정하였다.

[0057]

<실시예 2> 광촉매($W_2Fe_4Ta_2O_{17}$)를 이용한 생촉매반응

[0058]

상기 생촉매반응을 위하여, 반응기에 0.1M의 인산완충용액(pH 7.0)을 넣고, $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 5 mg, 로듐 III 복합체 M 0.2 mM, NAD 0.1 mM, EDTA 5/20 mM, 알파-케토글루타메이트 1 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 5 mM 및 글루타메이트 탈수소효소 20U를 넣어 상온에서 교반시켰다. 생촉매반응으로 합성된 L-글루타메이트는 문헌(C.B. Park and D.S. Clark, *Biotechnol. Bioeng.* 2002, 78, 229)의 방법대로 마이크로플레이트 리더를 사용하여 490 nm에서 퀴논이민(quinoneimine) 염료의 비색법으로 분석하였다.

[0059]

<실험예 1> 광촉매 및 전자주개에 따른 NADH 생성량 측정

[0060]

본 발명에 따른 NADH 재생 방법에 있어서, 광촉매 및 전자주개가 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0061]

본 발명에서 사용된 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 촉매에 전자주개로서 물을 사용하거나 잘 알려진 환원제인 EDTA 5.0 mM 및 20 mM을 추가로 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 14시간 동안 반응을 수행하여 시간에 따른 NADH

의 생성량을 측정하였다.

[0062] 또한, 촉매를 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 촉매 대신 TiO_2 촉매를 사용하고 EDTA 5.0 mM을 추가로 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 14시간 동안 반응을 수행하여 시간에 따른 NADH의 생성량을 측정하였다.

[0063] 측정 결과를 표 2 및 도 6에 나타내었다.

표 2

[0064]

시간(h)	(1) TiO_2 + EDTA 5.0 mM ($C_{NADH}/\mu M$)	(2) $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ + 물 ($C_{NADH}/\mu M$)	(3) $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ + EDTA 5.0 mM ($C_{NADH}/\mu M$)	(4) $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ + EDTA 20 mM ($C_{NADH}/\mu M$)
2	0	6	13	5
5	1	5	22	20
8	2	10	23	40
10	3	13	30	43
12	5	12	32	50
14	4	13	37	57

[0065] 표 2 및 도 6에 나타낸 바와 같이, TiO_2 촉매를 사용할 경우에는 NADH의 생성량이 $0.4 \mu M$ 미만으로 거의 생성되지 않으나, $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 촉매를 사용할 경우에는 NADH의 생성량이 시간에 따라 증가하는 것을 알 수 있다. 또한, 전자주개로서 물을 사용하는 경우보다 강력한 환원제인 EDTA를 사용하는 경우에 NADH의 생성 속도가 2-3배 증가함을 알 수 있다.

[0066] <실험예 2> 광촉매에 따른 L-글루타메이트 전환율 측정

[0067] 본 발명에 사용되는 광촉매의 종류에 따른 NADH의 생성을 통한 생촉매반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0068] 촉매로서 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$, $TiO_{2-x}N_x(x=0.01)$ 또는 TiO_2 촉매를 사용하고 EDTA 5.0 mM을 추가로 첨가한 것을 제외하고는 실시예 2과 동일한 방법으로 24시간 동안 반응을 수행하여 알파-케토글루타메이트로부터 L-글루타메이트의 전환율을 측정하였다.

[0069] 합성된 L-글루타메이트의 전환율은 문헌(C.B. Park and D.S. Clark, Biotechnol. Bioeng. 2002, 78, 229)의 방법대로 마이크로플레이트 리더를 사용하여 490 nm에서 퀴논이민(quinoneimine) 염료의 비색법으로 분석하여 측정하였다.

[0070] 측정 결과를 표 3 및 도 7에 나타내었다.

표 3

[0071]

촉매	L-글루타메이트의 전환율(%)
TiO_2	0
$TiO_{2-x}N_x$	4
$W_2Fe_4Ta_2O_{17}$	15

[0072] 표 3 및 도 7에 나타낸 바와 같이, 광촉매로서 TiO_2 를 사용하는 경우에는 L-글루타메이트가 전환되지 않았고, 광촉매로서 가시광선을 흡수하는 $TiO_{2-x}N_x$ 를 사용하는 경우에는 L-글루타메이트의 전환율이 4%로 나타났으나, $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 를 사용하는 경우에는 L-글루타메이트의 전환율이 15%로 나타났다.

[0073] 따라서, 본 발명에 따른 산화환원효소 보조인자의 재생방법에 사용되는 광촉매는 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 를 사용하는 것이 바람직하다.

[0074]

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 로듐 III 복합체 M의 전기화학적 변환을 나타낸 도면이다.

[0076] 도 2는 본 발명에 따른 가시광선 흡수 광촉매를 이용한 산화환원효소 보조인자 재생방법의 모식도이다.

[0077] 도 3은 본 발명의 제조예에 따른 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 촉매의 X선 회절(XRD)스펙트럼이다.

[0078] 도 4는 본 발명의 제조예에 따른 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 촉매의 전계방출형 주사전자현미경(FESEM) 사진이다.

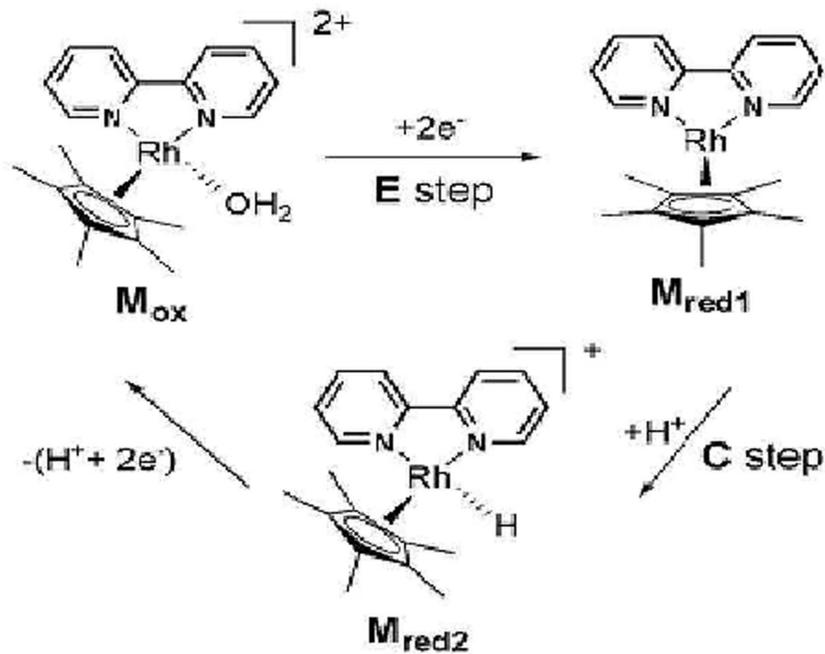
[0079] 도 5는 본 발명의 제조예에 따른 $W_2Fe_4Ta_2O_{17}$ 촉매의 확산 반사 스펙트럼(DRS)이다.

[0080] 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 광촉매 종류 및 환원제의 양에 대한 산화환원효소 보조인자의 생성량을 나타내는 그래프이다.

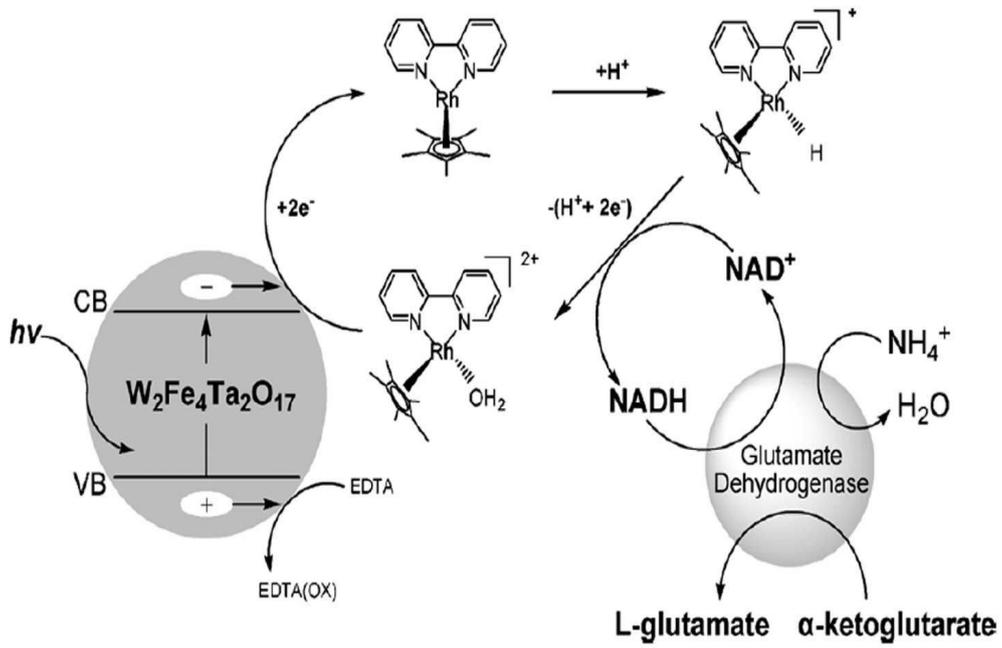
[0081] 도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 광촉매 종류에 대한 광촉매반응에 의한 L-글루타메이트의 전환율을 나타내는 그래프이다.

도면

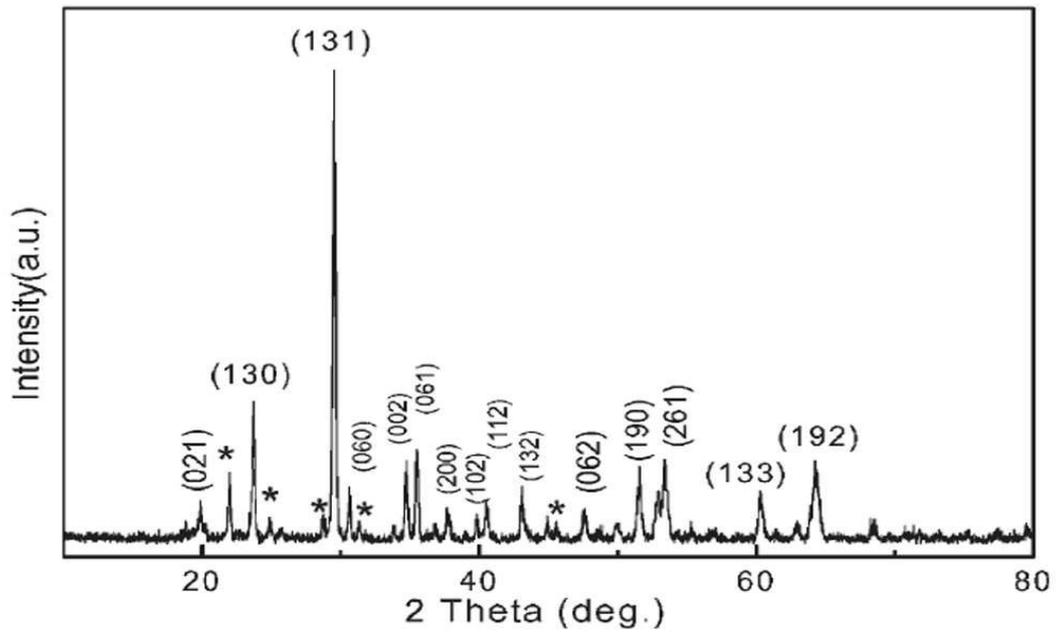
도면1



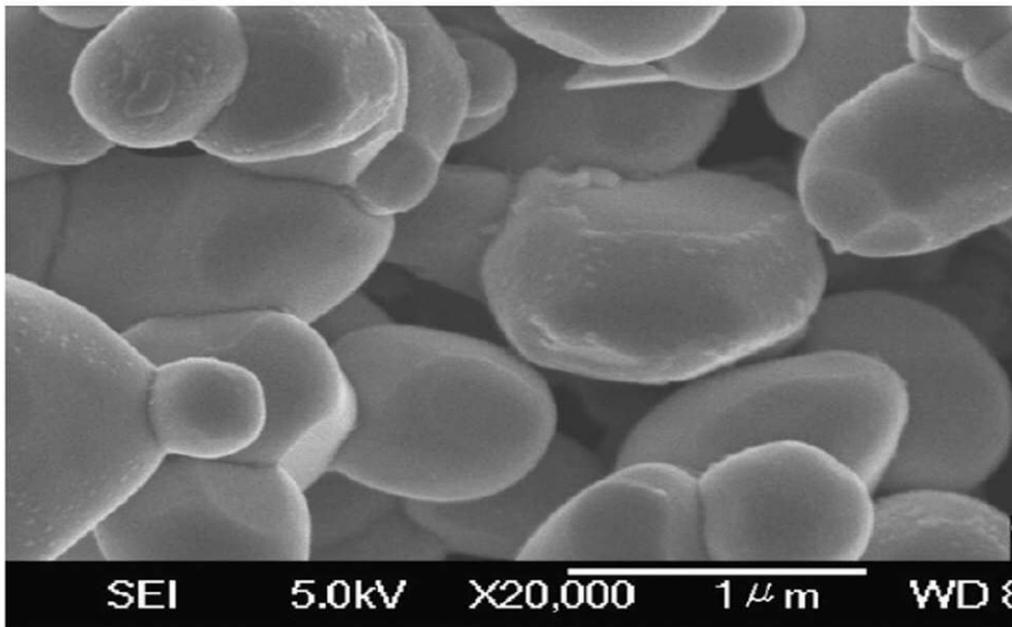
도면2



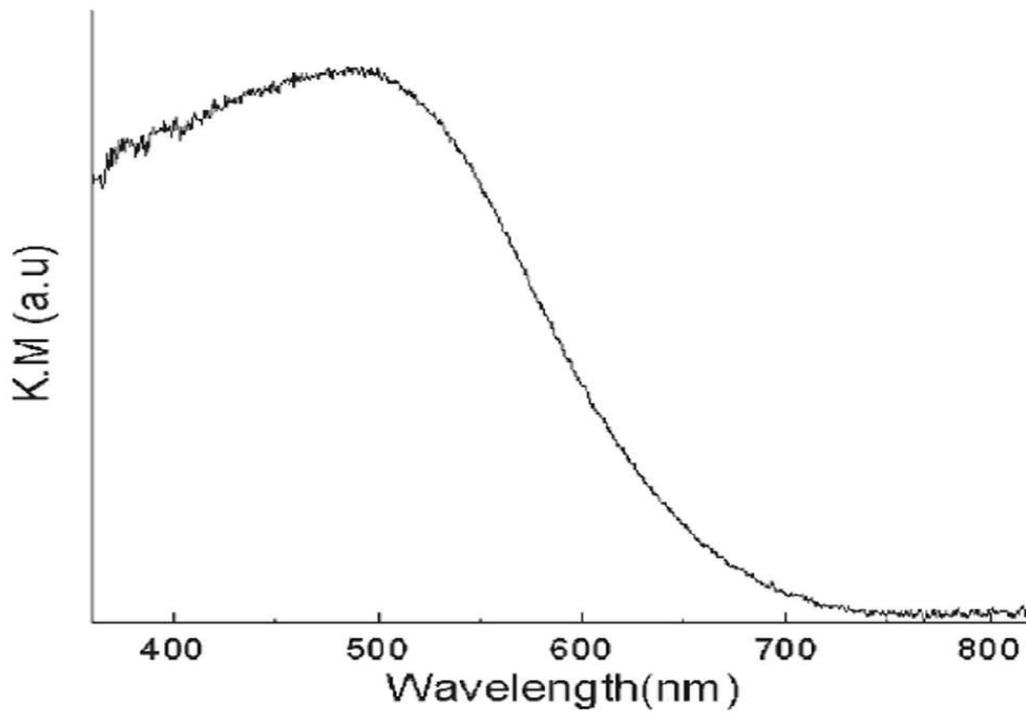
도면3



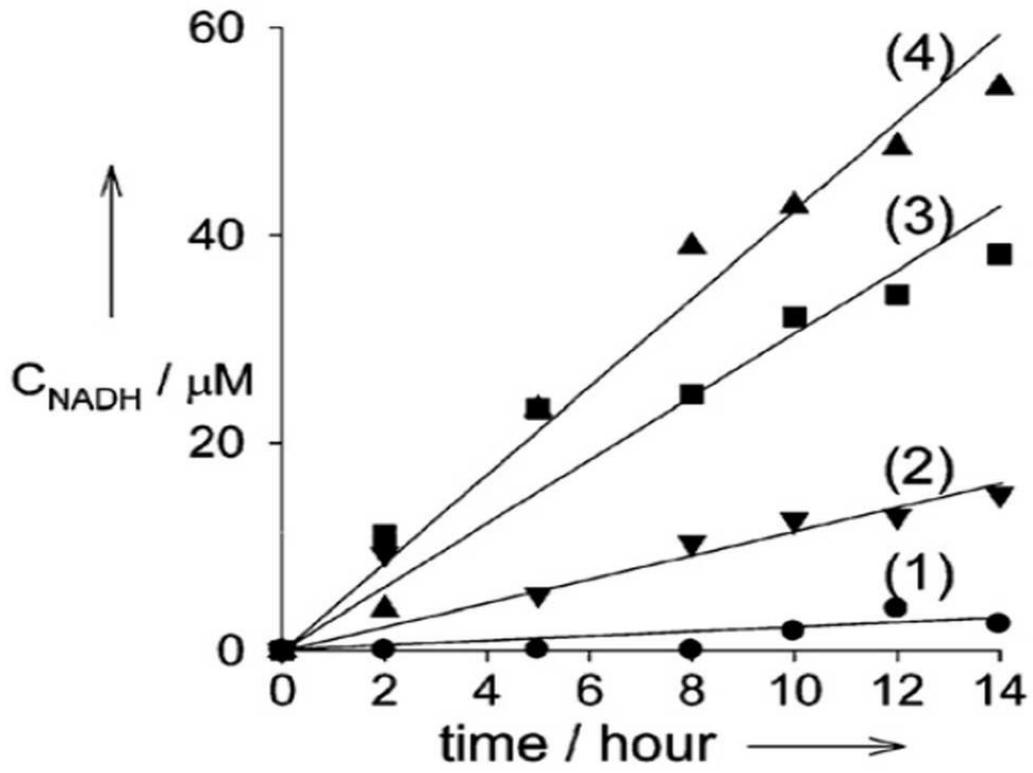
도면4



도면5



도면6



도면7

