(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0069275
(43) 공개일자 2012년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 11/14 (2006.01) *C12N 9/90* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0130759
(22) 출원일자 2010년12월20일
심사청구일자 2010년12월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김승욱
서울특별시 노원구 공릉2동 737번지 삼익아파트 104동 905호
송윤석
경기도 부천시 원미구 계남로 329, 아태리치빌아파트 503호 (춘의동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이지

전체 청구항 수 : 총 11 항

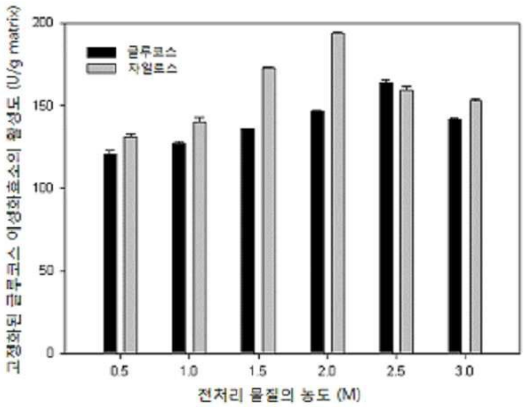
(54) 발명의 명칭 **전처리를 통한 글루코스 이성화효소의 고정화 방법**

(57) 요 약

본 발명은 전처리를 통한 글루코스 이성화효소의 고정화 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 글루코스 이성화효소를 단당류와 반응시키는 전처리 과정을 거침으로써 글루코스 이성화효소의 활성부위를 보호한 뒤 담체에 고정화 시키는 고정화 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따라 전처리된 글루코스 이성화효소를 담체에 고정화하였을 경우, 고정화 후에도 높은 활성도를 유지할 수 있으며, 재사용시에도 활성도 감소가 적은 글루코스 이성화효소의 고정화 방법을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

정유리

경기도 부천시 원미구 중동로 108, 펠리스카운티 110동 1004호 (중동)

박철환

서울특별시 성북구 동소문로29길 63, 동선빌라 B동 402호 (동선동5가)

특허청구의 범위

청구항 1

공유결합법으로 글루코스 이성화효소를 담체에 고정화시키는 방법에 있어서, 고정화 전에 글루코스 이성화효소를 단당류와 반응시키는 전처리 과정을 거치는 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 단당류는 5탄당 또는 6탄당인 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 5탄당은 자일로스이고, 상기 6탄당은 글루코스인 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 전처리 과정에서의 단당류의 농도는 0.5 M 내지 3.0 M인 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 전처리 과정은 50℃ 내지 80℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 전처리 과정은 15분 내지 120분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 전처리 과정은 50 rpm 내지 250 rpm의 교반속도로 수행되는 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 고정화는 전처리 과정의 온도를 낮추면서 수행되는 것을 특징으로 하는 고정화 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 고정화는 15℃ 내지 25℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 고정화는 6시간 내지 30시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법.

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 담체는 실리카 담체인 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 전처리를 통한 글루코스 이성화효소의 고정화 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 단당류를 글루코스 이성화효소와 반응시키는 전처리를 거침으로써 글루코스 이성화효소의 활성부위를 보호한 뒤 담체에 고정화시켜 담체와 글루코스 이성화효소의 고정화 시 활성도가 감소하는 현상을 방지하여 효소가 활성도를 유지할 수 있도록 하는 고정화 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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 분석용으로도 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-럭소스(L-lyxose), D-알로스(D-allose) 그리고 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 지지

물질의 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.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 상술한 종래기술 상의 문제점을 해결할 수 있는 고정화 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과 글루코스 이성화효소를 단당류와 반응시키는 전처리 과정을 거침으로써 글루코스 이성화효소와 담체의 공유결합을 통한 고정화 시에 발생하는 활성도 감소 현상을 방지할 수 있는 방법을 알아내고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0006] 결국, 본 발명의 목적은 담체에 글루코스 이성화효소를 고정화시키기 전에 5탄당 또는 6탄당과 글루코스 이성화효소를 반응시켜 글루코스 이성화효소가 고정화 후에도 활성을 유지할 수 있는 글루코스 이성화효소의 전처리 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는 공유결합법으로 글루코스 이성화효소를 담체에 고정화시키는 방법에 있어서, 고정화 전에 글루코스 이성화효소를 단당류와 반응시키는 전처리 과정을 거치는 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법이 제공된다.

[0008] 본 발명에 따른 글루코스 이성화효소의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 단당류는 5탄당 또는 6탄당일 수 있다.

[0009] 본 발명에 따른 글루코스 이성화효소의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 5탄당은 자일로스이고, 상기 6탄당은 글루코스일 수 있다.

[0010] 본 발명에 따른 글루코스 이성화효소의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 전처리 과정에서의 단당류의 농도는 0.5 M 내지 3.0 M일 수 있다.

[0011] 본 발명에 따른 글루코스 이성화효소의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 전처리 과정은 50℃ 내지 80℃의 온도에서 수행될 수 있다.

[0012] 본 발명에 따른 글루코스 이성화효소의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 전처리 과정은 15분 내지 120분 동안 수행될 수 있다.

[0013] 본 발명에 따른 글루코스 이성화효소의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 전처리 과정은 50 rpm 내지 250 rpm의 교반속도로 수행될 수 있다.

[0014] 본 발명에 따른 글루코스 이성화효소의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 고정화는 전처리 과정의 온도를 낮추면서 수행될 수 있다.

[0015] 본 발명에 따른 글루코스 이성화효소의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 고정화는 15℃ 내지 25℃의 온도에서 수행될 수 있다.

[0016] 본 발명에 따른 글루코스 이성화효소의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 고정화는 6시간 내지 30시간 동안 수행될 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 글루코스 이성화효소의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 담체는 실리카 담체일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따르면, 글루코스 이성화효소의 고정화 시 발생하는 활성 감소를 방지하여 고정화 후에도 효소가

활성을 유지할 수 있으며, 재사용 시에도 활성도의 감소가 적다. 따라서, 고가인 글루코스 이성화효소를 식품 및 청량음료 산업의 고과당 생산 공정, 에탄올 및 희귀 단당류 생산 연구, 및 생물촉매 산업에 효과적으로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 실시예 9 및 10에서 각각의 전처리 물질의 농도에 따른 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성을 나타낸 그래프이다.

도 2는 실시예 11에서 전처리 과정의 온도에 따른 고정화된 글루코스 이성화효소의 상대적 활성도를 나타낸 그래프이다.

도 3은 실시예 12에서 전처리 과정의 반응시간에 따른 고정화된 글루코스 이성화효소의 상대적 활성도를 나타낸 그래프이다.

도 4는 실시예 13에서 전처리 과정의 교반속도에 따른 고정화된 글루코스 이성화효소의 상대적 활성도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 시험예 1 내지 5로부터 최적화된 조건 및 비교예 1에 따라 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명의 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0021] 본 발명에서는 공유결합법으로 글루코스 이성화효소를 담체에 고정화시키는 방법에 있어서, 고정화 전에 글루코스 이성화효소를 단당류와 반응시키는 전처리 과정을 거치는 것을 특징으로 하는 글루코스 이성화효소의 고정화 방법이 제공된다.

[0022] 본 발명에 따른 글루코스 이성화효소를 담체에 고정화 시키는 방법은 우선, 담체를 3-아미노프로필트리에톡시실란과 반응시켜 표면에 아민기를 생성한 뒤 상기 아민기가 형성된 담체를 글루타르알데히드와 반응시켜 표면에 알데히드기가 형성된 담체를 제조한다. 여기서 상기 담체는 당업계에 알려진 모든 담체가 사용가능하며, 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면 실리카 담체일 수 있다.

[0023] 이후, 글루코스 이성화효소를 단당류와 반응시킨다. 고정화 시 글루코스 이성화효소의 활성부위와 담체표면의 알데히드기와의 공유결합 형성을 저해하고, 글루코스 이성화효소의 활성부위를 제외한 부분의 아민기와 공유결합 형성을 유도하기 위해 상기 단당류와 반응시키는 전처리 과정을 수행한다. 여기서 상기 단당류는 5탄당 또는 6탄당이 사용될 수 있으며, 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면 상기 5탄당은 자일로스이며, 6탄당은 글루코스일 수 있다. 상기와 같은 단당류와 글루코스 이성화효소를 반응시키는 전처리 과정을 수행하였을 경우, 글루코스 이성화효소의 고정화 시 효소의 활성이 가장 높게 유지될 수 있으며, 글루코스 이성화효소의 3차 구조를 보다 효과적으로 유지시킬 수 있다.

[0024] 상기 전처리 과정에서 단당류는 0.5 M 내지 3.0 M 농도일 수 있으며, 보다 바람직하게는 1.5 M 내지 3.0 M일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 단당류가 5탄당일 경우에는 1.5 M 내지 2.5 M일 수 있으며, 6탄당일 경우에는 2.0 M 내지 3.0 M일 수 있다.

[0025] 도 1을 참조하면, 자일로스로 전처리한 경우, 자일로스 농도가 1.5 M일 때 효소의 활성도가 급격히 증가하여 2.0 M일 때 정점을 나타내었으며, 2.5 M 이상에서는 효소의 활성이 감소하였다. 또한, 글루코스로 전처리한 경우, 글루코스의 농도가 2.5 M을 정점으로 2.0 M 내지 3.0 M 구간에서 매우 높은 활성을 나타냄을 알 수 있

다.

[0026]

[0027] 상기 전처리 과정의 온도는 50℃ 내지 80℃일 수 있다. 보다 바람직하게는 50℃ 내지 70℃일 수 있으며, 가장 바람직하게는 55℃ 내지 65℃일 수 있다.

[0028] 도 2를 참조하면, 50℃ 내지 70℃ 구간에서 고정화된 글루코스 이성화효소의 상대적 활성도가 약 80% 이상이며, 55℃ 내지 65℃ 구간에서는 약 90% 이상의 상대적 활성도를 나타내고 있다.

[0029] 상기 전처리 과정은 5분 내지 120분 동안 수행될 수 있다. 보다 바람직하게는 15분 내지 90분 동안 수행될 수 있으며, 가장 바람직하게는 30분 내지 60분 동안 수행될 수 있다.

[0030] 도 3을 참조하면, 15분 내지 90분 구간에서 약 80% 이상의 고정화된 글루코스 이성화효소의 상대적 활성도를 나타내고 있으며, 30분 내지 60분 구간에서 약 90% 이상의 상대적 활성도를 나타내고 있다.

[0031] 상기 전처리 과정의 교반속도는 30 rpm 내지 300 rpm일 수 있다. 보다 바람직하게는 50 rpm 내지 250rpm 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 150 rpm 내지 250 rpm일 수 있다.

[0032] 도 4를 참조하면, 50 rpm 내지 250 rpm 구간에서 약 80% 이상의 고정화된 글루코스 이성화효소의 상대적 활성도를 나타내고 있으며, 150 rpm 내지 250 rpm 구간에서 약 90% 이상의 상대적 활성도를 나타내고 있다.

[0033] 이후, 상기에서 제조된 담체에 전처리된 글루코스 이성화효소를 고정화시킨다. 본 발명의 고정화는 단당류와 반응시켜 전처리 과정을 거친 글루코스 이성화효소 용액에 담체가 첨가되면서 개시된다. 글루코스 이성화효소의 고정화는 담체의 알데히드기와 전처리된 글루코스 이성화효소의 아민기가 반응하여 이민결합을 형성함으로써 공유결합을 통해 수행될 수 있다. 이 때, 고정화는 15℃ 내지 25℃의 온도에서 수행될 수 있으며, 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면 20℃일 수 있다. 고정화 반응은 상기 전처리 과정의 온도(50℃ 내지 80℃)에서 상기 고정화 온도(15℃ 내지 25℃)로 온도를 낮추면서 반응을 수행하는 것이 바람직하다. 또한, 고정화 시간은 6시간 내지 30시간 동안 수행될 수 있으며, 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면 고정화 시간은 12시간일 수 있다.

[0034] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다 할 것이다.

[0035] **실시예 1: 담체의 제조**

[0036] 건조된 실리카겔 1 g을 15%(v/v) 3-아미노프로필트리에톡시실란의 아세톤(acetone) 용액 20 mL에 첨가한 뒤 50℃에서 2시간 동안 교반하여 반응하였다. 반응 후 실리카겔을 증류수로 세척한 다음 60℃에서 2시간 동안 건조하였다. 2.6 M 글루타르알데히드 용액 1.6 mL에 건조된 실리카겔 및 100 mM 인산완충용액(pH 8.0) 18.4 mL을 첨가한 뒤 20℃에서 2시간 동안 반응하였다. 반응이 끝난 뒤 실리카겔을 증류수로 세척한 다음 60℃에서 2시간 동안 건조하여 활성화된 실리카 담체를 제조하였다.

[0037] **글루코스 이성화효소의 전처리**

[0038] 실시예 2: 글루코스와 글루코스 이성화효소의 반응을 통한 전처리

[0039] 스트렙토마이세스 루비지노수스(*Streptomyces rubiginosus*)로부터 유래한 글루코스 이성화효소는 미국의 햄프톤 리서치(Hampton Research, USA)사로부터 구입하였다. 200 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 상기 글루코스 이성화효소 400 U, 20 mM $MgSO_4?7H_2O$, 1 mM $CoCl_2?6H_2O$와 전처리 물질인 2.0 M의 글루코스를 첨가하여 10 mL의 반응 용액을 제조하였다. 상기 반응 용액을 60℃, 150 rpm에서 30분간 반응시켜 글루코스 이성화효소를 전처리

하였다.

[0040] 실시예 3: 여러 농도의 글루코스와 글루코스 이성화효소의 반응을 통한 전처리

[0041] 전처리 물질로 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M, 2.0 M, 2.5 M 및 3.0 M의 글루코스를 각각 반응시킨 것 외에는 상기 실시예 2의 방법과 동일하게 글루코스 이성화효소를 전처리하였다.

[0042] 실시예 4: 여러 농도의 자일로스와 글루코스 이성화효소의 반응을 통한 전처리

[0043] 전처리 물질로 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M, 2.0 M, 2.5 M 및 3.0 M의 자일로스를 각각 반응시킨 것 외에는 상기 실시예 2의 방법과 동일하게 글루코스 이성화효소를 전처리하였다.

[0044] 실시예 5: 여러 온도에서의 자일로스와 글루코스 이성화효소의 반응을 통한 전처리

[0045] 전처리 물질로 2.0 M의 자일로스를 사용하고, 상기 반응용액의 온도를 각각 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃ 및 80℃로 반응시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 2의 방법과 동일하게 글루코스 이성화효소를 전처리하였다.

[0046] 실시예 6: 여러 반응시간 동안 자일로스와 글루코스 이성화효소의 반응을 통한 전처리

[0047] 전처리 물질로 2.0 M의 자일로스를 사용하고, 상기 반응용액을 각각 15분, 30분, 45분, 60분, 75분, 90분, 105분 및 120분 동안 반응시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 2의 방법과 동일하게 글루코스 이성화효소를 전처리하였다.

[0048] 실시예 7: 여러 교반속도에서의 자일로스와 글루코스 이성화효소의 반응을 통한 전처리

[0049] 전처리 물질로 2.0 M의 자일로스를 사용하고, 상기 반응용액을 각각 50 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm 및 250 rpm의 교반속도로 45분 동안 반응시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 2의 방법과 동일하게 글루코스 이성화효소를 전처리하였다.

[0050] **전처리된 글루코스 이성화효소의 고정화**

[0051] 실시예 8: 글루코스로 전처리된 글루코스 이성화효소의 고정화

[0052] 상기 실시예 1에서 제조된 활성화된 실리카 담체 500 mg을 상기 실시예 2에서 전처리된 글루코스 이성화효소 용액에 첨가한 뒤 글루코스 이성화효소의 고정화를 위하여 60℃에서 20℃로 온도를 낮추면서 12시간 동안 반응하였다. 상기 반응액을 여과하고, 200 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 세척한 뒤 실온에서 건조하여 담체에 고정화된 글루코스 이성화효소를 제조하였다.

[0053] 실시예 9: 여러 농도의 글루코스로 전처리된 글루코스 이성화효소의 고정화

[0054] 상기 실시예 1에서 제조된 활성화된 실리카 담체 500 mg을 상기 실시예 3에서 제조된 각각의 글루코스 이성화효소 용액에 첨가한 뒤 글루코스 이성화효소의 고정화를 위하여 60℃에서 20℃로 온도를 낮추면서 12시간 동안 반응하였다. 상기 반응액을 여과하고, 200 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 세척한 뒤 실온에서 건조하여 각각의 담체에 고정화된 글루코스 이성화효소를 제조하였다.

[0055] 실시예 10: 여러 농도의 자일로스로 전처리된 글루코스 이성화효소의 고정화

[0056] 상기 실시예 1에서 제조된 활성화된 실리카 담체 500 mg을 상기 실시예 4에서 제조된 각각의 글루코스 이성화효소 용액에 첨가한 뒤 글루코스 이성화효소의 고정화를 위하여 60℃에서 20℃로 온도를 낮추면서 12시간 동

안 반응하였다. 상기 반응액을 여과하고, 200 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 세척한 뒤 실온에서 건조하여 각각의 담체에 고정화된 글루코스 이성화효소를 제조하였다.

[0057] 실시예 11: 여러 온도에서 자일로스로 전처리된 글루코스 이성화효소의 고정화

[0058] 상기 실시예 1에서 제조된 활성화된 실리카 담체 500 mg을 상기 실시예 5에서 제조된 각각의 글루코스 이성화효소 용액에 첨가한 뒤 글루코스 이성화효소의 고정화를 위하여 각각의 전처리 온도에서 20℃로 온도를 낮추면서 12시간 동안 반응하였다. 상기 반응액을 여과하고, 200 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 세척한 뒤 실온에서 건조하여 각각의 담체에 고정화된 글루코스 이성화효소를 제조하였다.

[0059] 실시예 12: 여러 반응시간 동안 자일로스로 전처리된 글루코스 이성화효소의 고정화

[0060] 상기 실시예 1에서 제조된 활성화된 실리카 담체 500 mg을 상기 실시예 6에서 제조된 각각의 글루코스 이성화효소 용액에 첨가한 뒤 글루코스 이성화효소의 고정화를 위하여 60℃에서 20℃로 온도를 낮추면서 12시간 동안 반응하였다. 상기 반응액을 여과하고, 200 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 세척한 뒤 실온에서 건조하여 각각의 담체에 고정화된 글루코스 이성화효소를 제조하였다.

[0061] 실시예 13: 여러 교반속도에서 자일로스로 전처리된 글루코스 이성화효소의 고정화

[0062] 상기 실시예 1에서 제조된 활성화된 실리카 담체 500 mg을 상기 실시예 7에서 제조된 각각의 글루코스 이성화효소 용액에 첨가한 뒤 글루코스 이성화효소의 고정화를 위하여 60℃에서 20℃로 온도를 낮추면서 12시간 동안 반응하였다. 상기 반응액을 여과하고, 200 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 세척한 뒤 실온에서 건조하여 각각의 담체에 고정화된 글루코스 이성화효소를 제조하였다.

[0063] 실시예 14: 고정화 시간을 증가시킨 글루코스로 전처리된 글루코스 이성화효소의 고정화

[0064] 고정화 시간을 24시간으로 증가시킨 것 외에는 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 담체에 고정화된 글루코스 이성화효소를 제조하였다.

[0065] **비교예 1: 전처리 하지 않은 글루코스 이성화효소의 고정화**

[0066] 상기 실시예 1에서 제조된 활성화된 실리카 담체 500 mg을 글루코스 이성화효소 용액에 첨가한 뒤 글루코스 이성화효소의 고정화를 위하여 60℃에서 20℃로 온도를 낮추면서 12시간 동안 반응하였다. 상기 반응액을 여과하고, 200 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 세척한 뒤 실온에서 건조하여 담체에 고정화된 글루코스 이성화효소를 제조하였다.

[0067] **비교예 2: 고정화 시간을 증가시킨 전처리 하지 않은 글루코스 이성화효소의 고정화**

[0068] 고정화 시간을 24시간으로 증가시킨 것 외에는 상기 비교예 1과 동일한 방법으로 담체에 고정화된 글루코스 이성화효소를 제조하였다.

[0069] **담체에 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도 측정**

[0070] 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도는 하기와 같이 글루코스로부터 전환된 과당의 농도에 의해 측정되었다. 200 mM 인산완충용액(pH 7.0) 10 mL에 0.2 M 글루코스, 20 mM $MgSO_4?7H_2O$, 1 mM $CoCl_2?6H_2O$ 그리고 상기 실시예 8 내지 14 또는 비교예 1 및 비교예 2에서 제조된 각각의 고정화된 글루코스 이성화효소 100 mg을 첨가하여 55℃, 100 rpm 하에서 30분 동안 반응한 뒤 20%(v/v)의 HCl 2 mL를 첨가하여 반응을 종결하였다. 상기 반응액 1 mL와 아세트산 (acetic acid, glacial) 100 mL에 티오우레아(thiourea) 0.25g, 레조르시놀(resorcinol) 0.1 g을 첨가하여 제조한 레조르시놀 시약 1 mL 및 30%(v/v)의 HCl 4 mL를 첨가하여 80℃에서

10분간 반응하였다. 그 후, 반응액을 냉각시키고 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 기준 곡선(standard curve)에 대입하여 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도를 측정하였고, 1유닛(unit)의 효소 활성도는 1분간 1 μmol의 글루코스를 과당으로 전환시키는 효소의 양으로 계산하였다.

[0071] 시험예 1: 글루코스를 이용한 글루코스 이성화효소의 전처리가 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도에 미치는 영향

[0072] 상기 실시예 8, 실시예 14, 비교예 1 및 비교예 2에서 고정화 시킨 글루코스의 활성도를 상기와 같은 방법으로 측정한 결과 하기 표 1과 같았다.

표 1

[0073]

분류	전처리 물질	고정화 시간	활성도(U/g matrix)
실시예 8	2.0 M 글루코스	12시간	154.8
비교예 1	-		102.4
실시예 14	2.0 M 글루코스	24시간	130.6
비교예 2	-		89.9

[0074] 상기 표 1에서 보여지는 바와 같이 글루코스 이성화효소를 담체에 고정화시켰을 때, 글루코스 이성화효소를 전처리하지 않고 고정화 시킨 비교예 1 및 비교예 2의 활성도는 각각 102.4 U/g matrix 및 89.9 U/g matrix로 측정되었다. 반면 글루코스로 전처리를 수행한 뒤 고정화시킨 실시예 8 및 실시예 14의 경우 활성도는 각각 154.8 U/g matrix 및 130.6 U/g matrix로 측정되었으며, 이것은 각각의 비교예 보다 각각 51.2% 그리고 45.3% 증가된 것으로 비교예 1 및 비교예 2보다 실시예 8 및 실시예 14에서 월등히 증가되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 전처리 유무에 상관 없이 12시간 동안 고정화 한 것이 24시간 동안 고정화 하였을 때 보다 활성도가 높음을 확인할 수 있었다.

[0075] 시험예 2: 여러 농도의 자일로스 또는 글루코스를 이용한 글루코스 이성화효소의 전처리가 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도에 미치는 영향

[0076] 상기 실시예 9 및 10에서 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도를 상기 활성도 측정 방법과 같이 측정한 결과, 도 1에서 보여지는 바와 같이 여러 농도의 전처리 물질로 글루코스 이성화효소를 전처리한 뒤 담체에 고정화시켰을 때, 자일로스 또는 글루코스로 전처리한 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도는 각각 2.0 M 또는 2.5 M까지 전처리 물질 농도의 증가에 따라 활성도 또한 증가하였다. 그 중에서도 2.0 M 자일로스로 전처리한 뒤 고정화시킨 글루코스 이성화효소의 활성도는 194.0 U/g matrix이었으며, 이는 2.5 M 글루코스로 전처리한 뒤 고정화시킨 글루코스 이성화효소의 활성도인 164.2 U/g matrix 보다 더 높은 활성도를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] 시험예 3: 여러 온도에서 자일로스를 이용한 글루코스 이성화효소의 전처리가 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도에 미치는 영향

[0078] 상기 실시예 11에서 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도를 상기 활성도 측정 방법과 같이 측정한 결과, 도 2에서 보여지는 바와 같이 글루코스 이성화효소를 담체에 고정화시켰을 때, 50℃에서 60℃까지 전처리 온도의 증가에 의하여 전처리된 고정화 글루코스 이성화효소의 활성도는 증가하였다. 그러나 65℃에서 80℃사이에서 전처리된 고정화 글루코스 이성화효소의 활성도는 점차 감소하였다. 그 중에서 60℃에서 전처리된 고정화 글루코스 이성화효소의 활성도는 226.5 U/g matrix로 측정되었고, 다른 온도에서 전처리한 뒤 고정화 시킨 글루코스 이성화효소들과 비교하였을 때 가장 높은 활성도를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0079] 시험예 4: 여러 반응시간 동안 자일로스를 이용한 글루코스 이성화효소의 전처리가 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도에 미치는 영향

[0080] 상기 실시예 12에서 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도를 상기 활성도 측정 방법과 같이 측정한 결과,

도 3에서 보여지는 바와 같이 글루코스 이성화효소를 담체에 고정화시켰을 때, 45분 동안 전처리를 수행한 뒤 고정화시킨 글루코스 이성화효소의 활성도는 248.3 U/g matrix로 측정되었고, 이는 다른 반응시간 동안 전처리한 뒤 고정화된 글루코스 이성화효소들과 비교하여 가장 높은 활성도를 보였다. 그러나 105분 또는 120분 동안 전처리를 수행한 뒤 고정화시킨 글루코스 이성화효소의 활성도는 45분 동안 전처리를 수행한 경우와 비교하였을 때, 급격한 감소를 나타내었다. 특히 120분 동안 전처리를 수행한 경우는 45분 동안 전처리를 수행한 경우와 비교하여 53.6%의 감소를 나타내었다.

[0081] 시험예 5: 여러 교반속도에서 자일로스를 이용한 글루코스 이성화효소의 전처리가 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도에 미치는 영향

[0082] 상기 실시예 13 에서 고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도를 상기 활성도 측정 방법과 같이 측정한 결과, 도 4에서 보여지는 바와 같이 글루코스 이성화효소를 담체에 고정화시켰을 때, 50 rpm에서 200 rpm까지 전처리 교반속도의 증가에 따라 전처리한 뒤 고정화시킨 글루코스 이성화효소의 활성도는 증가하였다. 그러나 250 rpm에서는 200 rpm과 비교하여 전처리한 뒤 고정화시킨 글루코스 이성화효소의 활성도 증가는 관찰되지 않았다. 그 중, 200 rpm에서 전처리한 뒤 고정화시킨 글루코스 이성화효소의 활성도는 254.9 U/g matrix이었고, 이것이 다른 교반속도로 전처리한 뒤 고정화 시킨 글루코스 이성화효소들과 비교하여 가장 높은 활성도를 가짐을 알 수 있었다.

[0083] **담체에 고정화된 글루코스 이성화효소의 단백질량 측정**

[0084] 담체에 고정화된 글루코스 이성화효소의 단백질량은 고정화 전 글루코스 이성화효소 용액에서의 전체 단백질량과 고정화 후 글루코스 이성화효소 용액에 남아있는 단백질량의 차이에 의해 계산하였다. 단백질량의 측정은 바이오-라드 단백질 분석 키트 (Bio-Rad protein assay reagent, Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 제조사에서 제공한 분석절차에 따라 수행하였으며, 750 nm에서 흡광도 측정 후, 그 값을 기준 곡선에 대입하여 글루코스 이성화효소의 용액 내의 단백질량을 측정하였다.

[0085] 시험예 6: 글루코스를 이용한 글루코스 이성화효소의 전처리가 글루코스 이성화효소의 고정화된 단백질량에 미치는 영향

[0086] 상기 실시예 8, 실시예 14, 비교예 1 및 비교예 2에서 고정화 시킨 글루코스 이성화효소의 고정화된 단백질량을 상기와 같은 방법으로 측정한 결과 하기 표 2와 같았다.

표 2

[0087]

분류	전처리 물질	고정화 시간	담체에 고정화된 단백질량(mg/g matrix)
실시예 8	2.0 M 글루코스	12시간	0.25
비교예 1	-		0.23
실시예 14	2.0 M 글루코스	24시간	0.32
비교예 2	-		0.29

[0088] 상기 표 2에서 보여지는 바와 같이 글루코스 이성화효소를 담체에 고정화시켰을 때, 글루코스 이성화효소를 전처리하지 않고 고정화 시킨 비교예 1 및 비교예 2의 담체에 고정화된 단백질량은 각각 0.23 mg/g matrix 및 0.29 mg/g matrix로 측정되었다. 반면 글루코스로 전처리를 수행한 뒤 고정화시킨 실시예 8 및 실시예 14의 경우 담체에 고정화된 단백질량은 각각 0.25 mg/g matrix 및 0.32 mg/g matrix로 측정되었다. 상기와 같이 담체에 고정화된 단백질량의 차이는 전처리 유?무에 관계없이 유사한 값을 나타내었고, 24시간 동안 고정화 한 것이 12시간 동안 수행된 것 보다 더 높은 고정화된 단백질량의 값을 나타낸 것으로 보아 전처리한 후 고정화 시킨 글루코스 이성화효소의 활성도 증가가 고정화된 단백질량의 차이에 의한 것이 아님을 확인할 수 있었다.

[0089] **시험예 7: 자일로스로 전처리한 후 담체에 고정화 시킨 글루코스 이성화효소의 재사용시 활성도 변화 측정**

[0090] 상기 시험예 1 내지 5에서 가장 높은 활성도를 나타낸 조건인 2.0 M 자일로스를 사용하여 60℃, 200 rpm에서 45분 동안 전처리를 수행한 뒤 12시간 동안 고정화시킨 글루코스 이성화효소와 상기 비교예 1에서 고정화된 글루코스 이성화효소를 상기 시험예 1에서 수행한 방법을 10회 반복하면서 활성도 변화를 관찰하였다. 고정화된 글루코스 이성화효소는 30분 동안 기질인 글루코스를 과당으로 전환시켰고, 단일 배치(batch) 반응이 끝난 후, 고정화된 글루코스 이성화효소는 원심분리에 의하여 수거되었다. 상기와 같이 수거한 고정화된 글루코스 이성화효소는 200 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 수 차례 세척한 후, 다음 배치 반응에 재사용되었다.

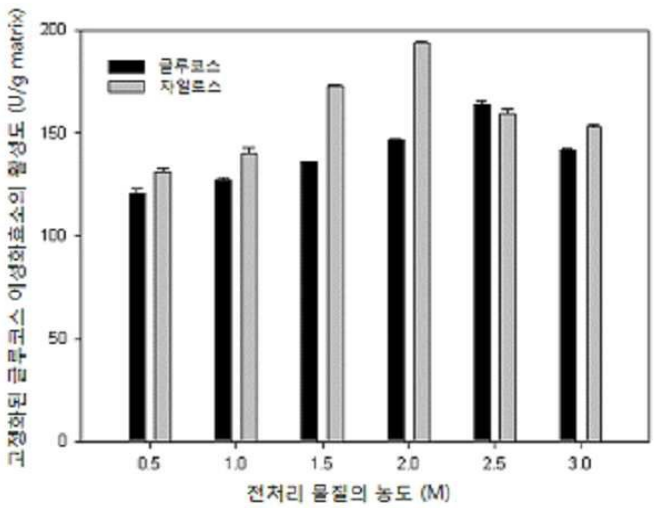
[0091] 그 결과, 도 5에서 보여지는 바와 같이 2.0 M 자일로스를 사용하여 60℃, 200 rpm에서 45분 동안 전처리를 수행한 뒤 12시간 동안 고정화시킨 글루코스 이성화효소와 비교예 1의 초기 활성도는 각각 261.4 U/g matrix 및 108.7 U/g matrix이었다. 10회 재사용하였을 때, 전처리된 고정화 글루코스 이성화효소의 활성도는 196.6 U/g matrix이었고, 비교예 1인 전처리되지 않은 고정화 글루코스 이성화효소의 활성도는 76.4 U/g matrix이었다. 이것은 각각 초기 활성도와 비교하여 전처리된 고정화 글루코스 이성화효소는 75.2% 및 비교예 1은 70.3%의 활성도가 유지되었음을 확인할 수 있었다.

[0092] 이를 통하여 2.0 M 자일로스를 사용하여 60℃, 200 rpm에서 45분 동안 전처리를 수행한 뒤 12시간 동안 고정화시킨 글루코스 이성화효소의 경우, 여러 번 재사용에도 불구하고 그 활성도가 높게 유지됨을 확인할 수 있었고, 이로써 본 발명의 고정화 전 전처리 방법이 매우 효과적임을 확인할 수 있었다.

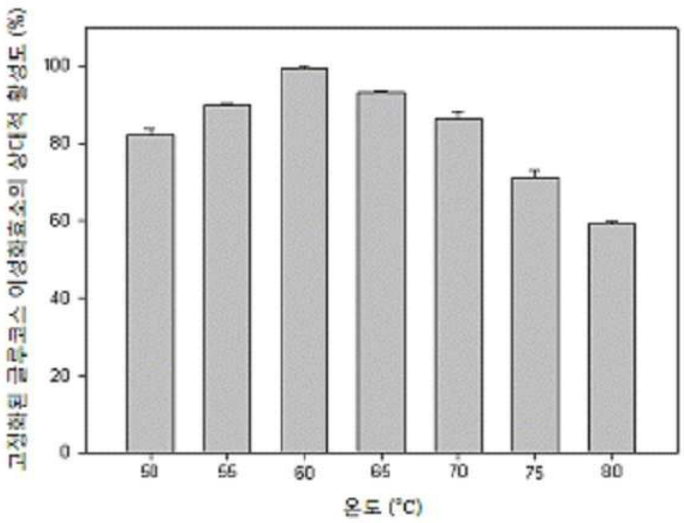
[0093] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항 들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

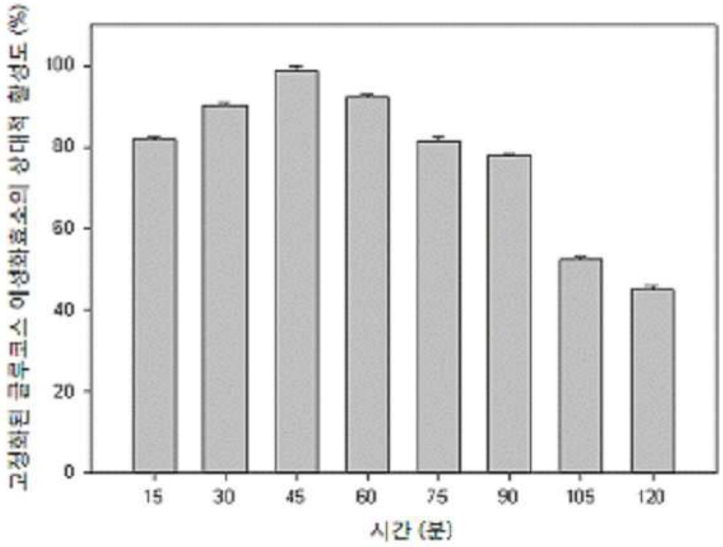
도면1



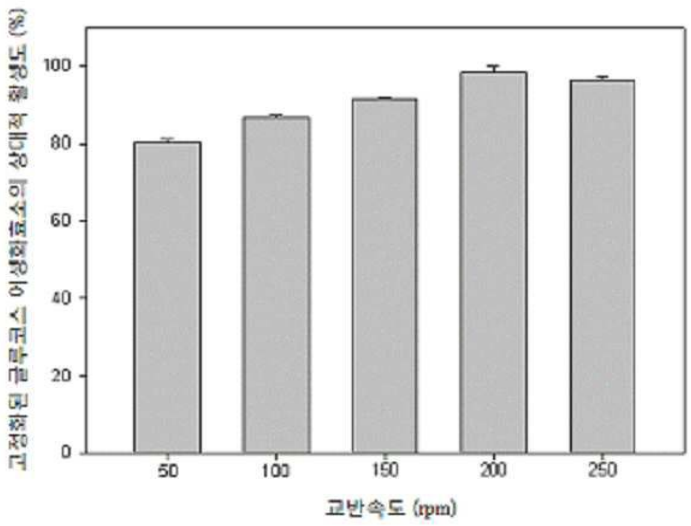
도면2


고정화된 글루코스 이성화효소의 상대적 활성도 (%)
0
20
40
60
80
100
50
55
60
65
70
75
80
온도 (°C)

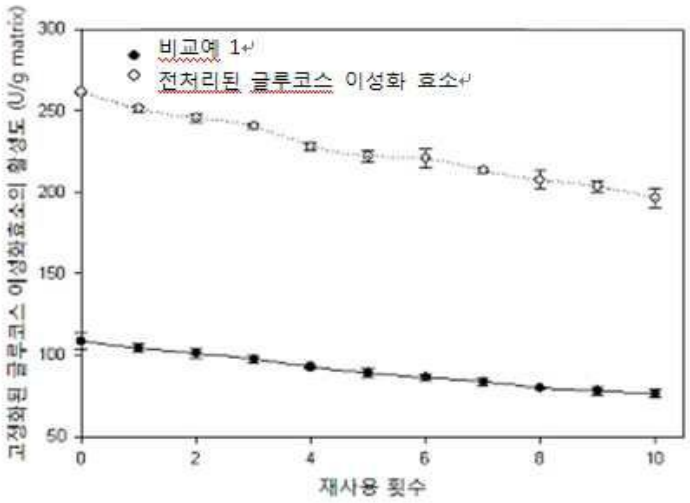
도면3


고정화된 글루코스 이성화효소의 상대적 활성도 (%)
0
20
40
60
80
100
15
30
45
60
75
90
105
120
시간 (분)

도면4


고정화된 글루코스 이성화효소의 상대적 활성도 (%)
0
20
40
60
80
100
50
100
150
200
250
교반속도 (rpm)

도면5


고정화된 글루코스 이성화효소의 활성도 (U/g matrix)
300
250
200
150
100
50
0
2
4
6
8
10
재사용 횟수
비교예 1
전처리된 글루코스 이성화 효소