

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0136752 (43) 공개일자 2012년12월20일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 19/12 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01) C12N 11/08 (2006.01) A23L 1/236 (2006.01)		(71) 출원인 세종대학교산학협력단 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(21) 출원번호	10-2011-0055888	(72) 발명자
(22) 출원일자	2011년06월10일	유상호
심사청구일자	2011년06월10일	서울특별시 송파구 올림픽로 435, 219동 1401호 (신천동, 파크리오)
		왕렌
		서울특별시 성북구 개운사2길 13-24, 103호 (안암동5가)
		(74) 대리인
		특허법인태백

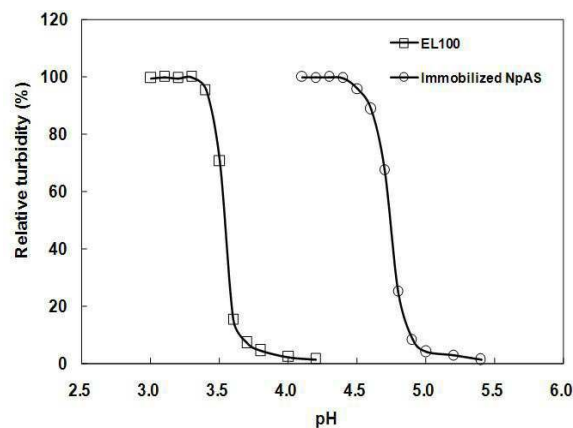
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 pH 민감성 고분자 담체에 고정된 고정화 효소를 이용한 투라노즈의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 아밀로수크라제(amylosucrase)를 pH 민감성 고분자 담체에 고정화시킨 고정화 효소를 이용한 투라노즈(turanose)의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 기질로서 수크로즈(sucrose) 및 프룩토스(fructose)를 이용하고, 상기 고정화 효소를 첨가하여 효소 반응을 수행하는 단계; 및 효소 반응물을 정제하여 투라노즈를 분리하는 단계를 포함하는 투라노즈의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100007827

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기본연구지원사업(유형1)

연구과제명 차세대 건강기능성 감미료의 생촉매 전환기법 개발 및 최적 생산공정 설계

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

아밀로수크라제를 pH 민감성 고분자 담체에 고정화시킨 고정화 효소를 이용한 투라노즈의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 pH 민감성 고분자 담체는 pH 변화에 따라 자동적으로 침전하는 pH 의존성 자동침전제로서, 메타크릴산-메틸메타크릴레이트 공중합체(유드라짓 L100 및 S100), 메타크릴산-메틸아크릴레이트 공중합체(MPM-05) 및 메타크릴산-메틸아크릴레이트-메틸메타크릴레이트 공중합체(MPM-06)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것인 투라노즈의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

기질로서 수크로즈 및 프룩토스를 이용하고, 아밀로수크라제를 pH 민감성 고분자 담체에 고정화시킨 고정화 효소를 첨가하여 효소 반응을 수행하는 단계; 및

효소 반응물을 정제하여 투라노즈를 분리하는 단계를 포함하는 투라노즈의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 효소 반응은 30 - 40℃의 온도 및 6.0 - 8.5의 pH에서 12 - 120 시간 동안 수행하는 것인 투라노즈의 제조방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 수크로즈 및 프룩토즈의 농도는 각각 0.1 - 5.0 M인 것인 투라노즈의 제조방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 수크로즈의 농도는 0.5 - 2.0 M 이며, 프룩토즈의 농도는 0.5 - 1.0 M 인 투라노즈의 제조방법.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 정제는 이온-교환 크로마토그래피, 활성탄을 이용한 컬럼 크로마토그래피 또는 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피 중에서 선택된 것을 통해 이루어지는 것인 투라노즈의 제조방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된 투라노즈를 포함하는 감미료.

명세서

기술분야

본 발명은 pH 민감성 고분자 담체에 고정된 고정화 효소를 이용한 투라노즈의 제조방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 투라노즈(Turanose)는 자연적으로 벌에서 생기는 환원성 이당류로서 수크로즈 단맛의 약 반에 해당하는 단맛을 나타내며, 수크로즈의 유사체이며 3-O- α -D-글루코피라노실-D-프루토스의 화학적 구조를 지닌다.
- [0003] 투라노즈는 치아 우식 유발 미생물에 의해 발효되지 않기 때문에 칼로리 없는 감미료로서 사용될 수 있으며, 따라서 음식, 화장품 및 약학 산업계에서 중요한 역할을 수행할 수 있다. 그러나 이를 다량으로 편리하게 생산할 수 있는 방법의 부재로 인해 산업적 규모로의 투라노즈의 적용은 극히 제한되어 있으며, 현재까지는 화학적 합성법 보다는 효소적 합성법이 주로 알려져 있다.
- [0004] *Neisseria polysaccharea*로부터 얻어진 아밀로수크라제(NpAS)는 글리코사이드 하이드롤라제의 패밀리에 13으로부터 얻어진 독특한 글루칸수크라제로서, 반응 배지에서 프루토스를 유리하면서 수크로즈로부터 선행 α -(1,4)-글루칸의 합성을 촉진하는 효소로서 알려져 있다. 투라노즈는 트레할로스와 마찬가지로 이러한 효소 반응의 부산물로 알려져 있으며, 유리된 프루토스의 글루코실 트랜스퍼반응을 통해 합성된다.
- [0005] 그러나, NpAS의 산업적 응용을 위해서는 극복해야 할 중요한 결점 중의 하나가 불량한 안정성이다. NpAS의 반감기는 30℃에서 단지 21시간이며, 48시간 후 완전하게 비활성화 된다고 보고되어 있다 Potocki De Montalk, Remaud-Simeon, Willemot, Planchot, & Monsan, 1999; Potocki De Montalk, Remaud-Simeon, Willemot, Sarcabal, Planchot, & Monsan, 2000).
- [0006] 이러한 문제점을 개선하기 위하여, 종래에는 막-고정화 NpAS가 알려져 있다(Biotechnology Progress 18(5): 964-968, 2002). 그러나 얻어진 막-고정화 NpAS는 고정화되지 않은 NpAS와 비교하여 낮은 효소 활성을 나타내었다.
- [0007] 이에, 본 발명의 발명자들은 NpAS를 EL100과 같은 pH 의존성 자동침전제에 공유적 또는 비공유적으로 결합시켜 고정화 NpAS를 합성하였고, 이렇게 얻어진 고정화 NpAS는 투라노즈의 생합성에 매우 유용하며 특히 안정성과 재사용성이 향상됨에 따라 안정하면서 경제적으로 투라노즈를 생합성할 수 있다는 점에 착안하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 따라서 본 발명은 고정화 효소를 이용하여 안정하면서 경제적으로 투라노즈를 합성하는 합성방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아밀로수크라제를 pH 민감성 고분자 담체에 고정화시킨 고정화 효소를 이용한 투라노즈의 제조방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 발명자들은 종래 α -(1,4)-글루칸의 합성을 촉진하는 효소인 아밀로수크라제를 사용하여 반응의 부산물인 투라노즈를 합성하기 위한 방법을 연구하던 중, 수크로즈 기질과 프루토스 기질의 양을 모두 증가시키면 반응 주 산물인 α -(1,4)-글루칸의 합성이 저해되고 투라노즈 합성이 효과적으로 증가된다는 점을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0011] 상기 아밀로수크라제는 미생물 *Neisseria polysaccharea*, *Deinococcus geothermalis* 및 *Alteromonas macleodii*로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 미생물로부터 유래되며, 특히 *Neisseria polysaccharea*로부터 유래된 것일 수 있으며, 상기 미생물은 미국특허 제6265635호에 개시된 방법에 따라 분리될 수 있다.
- [0012] 상기 미생물 *Neisseria polysaccharea*는 미생물이 자라서 효소인 아밀로수크라제를 생산할 수 있는 조건 하에서 배양되며, 일반적으로 약 37℃의 온도 및 pH 7.0 내지 7.2에서 분리되고 배양된다. 배양 시간은 미생물이 충분히 증식할 수 있는 한 제한이 없지만, 예를 들어 24 내지 48시간 동안 배양할 수 있다. 미생물 배양이 완료된 후, 보편적인 고액 상분리 방법에 의해 배양물로부터 세포를 모을 수 있다. 예를 들어, 4℃에서 원심분리하여

상등액을 제거하여 세포를 수득할 수 있다.

- [0013] 특히, 상기 미생물 *Neisseria polysaccharea*로부터 유래된 아밀로수크라제 유전자를 숙주세포, 예를 들어 대장균, 바실러스, 유산균, 곰팡이류 내에서 재조합 단백질체로 발현시켜 얻을 수 있다.
- [0014] 세포성 효소원은 보편적인 방법을 따라 세포로부터 추출된 조효소를 사용할 수 있다. 예를 들어, 초음파 또는 호모게네이션을 이용한 분쇄법으로 세포로부터 효소를 추출하고 상기 추출물을 원심분리 또는 막 여과를 통해 처리함으로써 조효소를 얻을 수 있다. 조효소를 추가적인 처리없이 사용하거나 보편적인 방법으로 정제하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 조효소 추출물을 여과하여 불용성 물질을 제거하고 상기 여과물을 니켈-니트릴로트리 아세트산(Ni-NTA) 친화성 컬럼에 통과시켜 재조합 His₆-태그된 아밀로수크라제를 정제하고, 4℃에서 Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices를 이용하여 상기 아밀로수크라제를 용출시켜 전기영동적으로 균질한 효소를 얻을 수 있다.
- [0015] 정제 효소는 직접 이용되거나 또는 보편적인 방법에 의해 담체 물질에 고정화되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 이온 교환체에 대한 결합법, 수지 및 막에 대한 공유결합 및 흡착법 등의 방법이 사용될 수 있다. 이러한 고정화를 통해 합성촉매로서 효소를 쉽게 회수할 수 있고 여러 번 사용할 수 있다. 효소의 정제공정이 일반적으로 많은 시간과 고비용이 소요되기 때문에 효소의 고정과 재사용은 상당한 비용 절감에 기여할 수 있다.
- [0016] 본 발명에 따른 정제 아밀로수크라제의 활성은 다음과 같이 측정할 수 있다. 즉, 기질로서 0.1M 수크로스를 함유한 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0) 900 μ l에 효소 용액 100 μ l을 첨가하고, 상기 혼합물을 35℃에서 30분 동안 반응시키며, 상기 반응 혼합물을 100℃에서 10분 동안 가열하여 효소 반응을 중단시킨다. 프락토스를 표준물질로 사용한 디니트로살리실산(DNS) 방법을 이용하여 상기 반응 혼합물 중으로 유리된 프락토스의 양을 분석한다. 아밀로수크라제 활성 1 unit는 분석 조건에서 분당 1 μ mol 프락토스 생산을 촉진시키는 효소의 양으로서 정의된다.
- [0017] 상기 pH 민감성 고분자 담체는 pH 변화에 따라 자동적으로 침전하는 pH 의존성 자동침전제로서, 메타크릴산-메틸메타크릴레이트 공중합체(유드라짓 L100 및 S100), 메타크릴산-메틸아크릴레이트 공중합체(MPM-05) 및 메타크릴산-메틸아크릴레이트-메틸메타크릴레이트 공중합체(MPM-06)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 pH 의존성 자동침전제로서 유드라짓 L100 (EL100)을 사용할 수 있으며, 상기 EL100은 메타크릴산과 메틸메타크릴레이트의 공중합체로서, 무독하고 저렴하며 상업적으로 사용가능하다. EL100은 독특한 pH 의존성 자동침전 특성으로 인하여 효소 고정화용 담체로서 폭넓게 사용되고 있다. 공유적으로든 비공유적으로든 EL100에 결합된 효소는 효소 반응 동안에는 용해성 형태로 이용되고, 반응혼합물의 pH를 낮춤으로써 효소 반응 후 불용성 형태로 회수될 수 있다.
- [0019] 특히, 상기 pH 의존성 자동침전제는 4.0 - 9.0의 pH에서는 용해성이지만, 2.5 - 3.3의 pH에서는 불용성일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 제조방법은 기질로서 수크로스 및 프락토스를 이용하고, 아밀로수크라제를 pH 민감성 고분자 담체에 고정화시킨 고정화 효소를 첨가하여 효소 반응을 수행하는 단계; 및 효소 반응물을 정제하여 투라노스를 분리하는 단계를 포함하여 수행될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 효소 반응은 30 - 40℃의 온도 및 6.0 - 8.5의 pH에서 12 - 120 시간 동안 수행하는 것이 바람직하다. 만약, 효소 반응이 상기 조건을 벗어나면 효소 안정성 저하, 글루칸 생산수율 저하, 고정화 효소 재사용 효율 저하 등의 문제가 야기될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 수크로스 및 프락토스의 농도는 각각 0.1 - 5.0 M일 수 있으며, 보다 구체적으로 수크로스의 농도는 0.5 - 2.0 M 이며, 프락토스의 농도는 0.5 - 1.0 M일 수 있다. 상기 범위를 벗어날 경우 효과적인 투라노스 생산이 곤란한 문제가 야기될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 효소 반응물을 정제하는 단계에서는 생산된 투라노스의 정제 회수를 위하여, 다양한 고순도 정제방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 이온-교환 수지 크로마토그래피, 활성탄을 이용한 컬럼 크로마토그래피, 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피, 분별결정법 등을 이용하여 고순도 투라노스를 갖는 산물을 효소 반응 혼합물로부터 쉽게 정제할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 투라노스를 포함하는 감미료를 제공한다.

[0025] 투라노즈는 치아 우식 유발 미생물에 의해 발효되지 않기 때문에 칼로리 없는 감미료로서 매우 유용하게 사용될 수 있으며, 특히 음식물, 화장품 및 의약품 등 산업계에서 중요한 감미료 또는 첨가제의 역할을 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따르면 NpAS를 EL100과 같은 pH 의존성 자동침전제에 결합시켜 얻어진 고정화 NpAS는 효소 자체의 열안정성을 향상시키면서도 효소 활성을 유지하므로, 고정화 NpAS를 이용하여 안정하면서도 경제적으로 투라노즈를 생합성 할 수 있다. 따라서 이러한 투라노즈는 음식물, 화장품 및 의약품 등 산업계에서 중요한 칼로리 없는 감미료 또는 첨가제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 pH 변화에 따른 고정화 NpAS의 침강 거동을 나타낸 것이다.
 도 2는 고정화 NpAS와 고정화되지 않은 NpAS의 효소 활성에 대한 온도의 영향을 나타낸 것이다.
 도 3은 고정화 NpAS(B)와 고정화되지 않은 NpAS(A)의 효소 활성에 대한 pH의 영향을 나타낸 것이다.
 도 4는 40℃에서 고정화 NpAS와 고정화되지 않은 NpAS의 열안정성을 나타낸 것이다.
 도 5는 고정화된 NpAS 및 고정화되지 않은 NpAS의 동력학 계수 측정을 위한 Lineweaver-Burk plot이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0029] <실험예>

[0030] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0031] 1. 실험 재료

[0032] 평균분자량이 1.35×10^5 Da인 EL100를 Röhme Pharma Co. (Darmstadt, Germany)로부터 구매하여 사용하였다. 글루코즈, 프룩토즈, 수크로즈 및 말토오즈는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 투라노즈는 TCI (Tokyo, Japan)로부터 구입하였고, 트레할로스는 Mitsui Sugar Co., Ltd. (Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. 다른 사용된 화학물질은 분석용 등급이다.

[0033] 2. NpAS 효소 준비 및 정제

[0034] *Neisseria polysaccharea* (ATCC 43768)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입되었고, 유전자 클로닝, 발현, 효소 추출 및 정제는 선행문헌(Jung et al., 2009)에 개시된 대로 수행하였다. 얻어진 효소의 단백질 함량을 소형청알부민을 표준물질로 사용하여 로리법으로 분석한 결과, 2.17 mg/ml로 나타났다.

[0035] 3. 고정화 NpAS의 제조

[0036] 평균분자량이 1.35×10^5 Da인 EL100를 Röhme Pharma Co. (Darmstadt, Germany)로부터 구매하여 사용하였다. NpAS의 고정화는 종래 알려진 방법(Enzyme and Microbial Technology 27(9): 672-679, 2000)의 약간의 변형에

따라 수행되었다. 50 mg의 EL100을 100 mM 트리스 용액 25mL에 완전히 용해시켰다. 그후, 1M HCl을 첨가하여 상기 용액의 pH를 7.0으로 조정하였고, 증류수로 총 부피를 50 mL로 조정하였다. 이러한 고분자 용액 5 mL에 2 mL의 NpAS (2.60U/mL)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 교반한 후, 0.1 M HCl을 적가하여 상기 용액의 pH를 4.3으로 조정하였다. 3,000g에서 10분 동안 원심분리하여 얻어진 침전물을 고정된 NpAS로서 회수하였다. 희석 HCl (pH 4.3)으로 2회 세정하고, 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.0)에서 재용해시킨 후, 얻어진 고정화 NpAS를 이후 실험에 사용하였다.

[0037] <실시예 1> 고정화 NpAS의 활성 분석

[0038] 효소 분석은 0.1M 수크로스를 기질로 사용하여 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에서 35℃, 30분 동안 수행되었다. NpAS 활성 1 unit (U)는 분석 조건에서 분당 1 μmol 환원당의 유리를 촉진시키는 효소 양에 상응한다 (Emond et al., 2008). 이러한 반응에서 유리된 환원당 양은 디니트로살리실산 (DNS) 방법(Journal of Biological Chemistry 108: 51-54, 1935)을 통해 표준물질로 프룩토스를 이용하여 결정하였다. 단백질 농도는 소혈청알부민을 표준물질로 사용하여 로리법 (Lowry method; J Biol Chem 193: 265-275, 1951)에 의해 측정되었다.

[0039] 고정화 NpAS의 단백질 및 활성 회수 수율은 각각 95.3% 및 85.4% 이었고, 고정화 NpAS의 약 90%가 효소 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 고정화 NpAS는 1.08 U/mg 단백질의 높은 특이활성을 나타내었다.

[0040] <실시예 2> 고정화 NpAS의 침강 거동

[0041] EL100 및 고정화 NpAS의 침강 거동은 pH 함수로서 470 nm에서 각 현탁액의 탁도를 측정하여 평가하였다(Journal of Biotechnology 42(1): 75-84, 1995).

[0042] 그 결과, 도 1과 같이 pH 4.2 이상의 EL100 용액은 470 nm에서 어떠한 흡광도를 나타내지 않았고, 완전히 용해되었다. 그러나, pH 감소에 따라 고분자가 용액에서 침전되기 시작하여 상대적 탁도가 증가되었다. pH 3.3 이하에서 EL100 분산액은 최대 탁도를 나타내었고, 고분자는 전혀 용해되지 않았다. 고정화 NpAS의 용해-불용 전이 곡선은 더 높은 pH에서 유의성있게 이동되었고, 고정화 NpAS는 pH 5.4 이상에서는 완전히 용해되었고, pH 4.4 이하에서는 용해되지 않았다.

[0043] 이러한 결과로부터, 용해-불용 전이 곡선의 유의적인 이동은 높은 흡광도에 기인한 것이며, 0.84 mg 단백질/mg 고분자에 도달하였다. 그러나, 더 높은 수준으로의 이러한 침강 pH 이동은 NpAS가 pH 적가에 의해 비가역적으로 변성될 기회를 감소시키기 때문에 NpAS의 활성 회수에 유용하였다.

[0044] <실시예 3> 고정화 NpAS의 온도 및 pH 의존도 검토

[0045] 고정화 NpAS의 효소 반응을 위한 최적 온도 및 최적 pH를 다음과 같이 검토하였다. 즉, 최적 반응온도는 20 내지 55℃의 온도에서의 효소 활성을 측정하여 결정하였다. 또한, 고정화되지 않은 NpAS와 고정화 NpAS의 pH 의존도를 pH 4.0 내지 10.0을 포함하는 다양한 완충액 시스템 (50 mM 소듐 아세테이트 완충액, 50 mM 소듐 포스페이트 완충액, 50 mM Tris-HCl 완충액, 및 50 mM 글리신-NaOH 완충액)에서 효소 활성을 측정하여 평가하였다.

[0046] 고정화되지 않은 NpAS와 고정화 NpAS는 온도 및 pH에 대하여 유사한 의존 프로파일을 나타내었다. 즉, 도 2와 같이 둘다 42.5℃에서 가장 좋은 활성을 나타내었다. 그리고, pH 의존도와 관련하여, 도 3과 같이 둘다 50 mM Tris-HCl 완충액의 pH 8.5에서 가장 좋은 활성을 나타내었다. Tris-HCl 완충액의 pH가 8.5에서 7.0으로 감소하면 효소 활성은 유의성있게 감소하였고, pH 7.0에서는 단지 약 60%의 효소 활성을 나타내었다. 한편, 종래 알려진 문헌(Potocki-Veronese et al., 2005; Rolland-Sabate, Colonna, Potocki-Veronese, Monsan, & Planchot, 2004; Ryu et al., 2010)에 의하면 NpAS 반응을 위한 완충액 조건이 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)이었기 때문에 이를 선택하여 향후 실험을 진행하였다.

[0047] <실시예 4> 고정화 NpAS의 열안정성 평가

[0048] 고정화되지 않은 NpAS와 고정화 NpAS를 40℃ 수욕 상에서 100 시간 동안 열처리하여 고정화 NpAS의 열안정성을

평가하였다. 이렇게 열처리된 효소를 모아 정해진 시간 간격으로 효소 활성을 측정하였다. 결과를 도 4에 나타내었다.

[0049] 도 4와 같이, 고정화 NpAS는 고정화되지 않은 NpAS와 비교하여 열안정성이 유의성있게 증가되었다. 40℃에서 96 시간 배양 후, 고정화 NpAS에서는 약 76%의 효소 활성이 남아있는 반면, 고정화되지 않은 NpAS는 완전하게 비활성화 되었다. 배양시간의 변화에 따른 잔류 효소 활성의 자연로그를 플로팅하여 고정화되지 않은 NpAS의 1차 비활성화 반응속도를 확인하였고, 비활성화 속도 상도 (k_i)는 $2.74 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ 이었다. 고정화 NpAS와 관련하여, 다면적인 비활성화 패턴을 관찰하였다. 시간을 3개의 단계(0-6 시간, 6-24 시간, 및 24-100 시간)로 나누어 1차 비활성화 반응속도를 적용하고, 비활성화 속도 상수를 각각 산출하였다. 배양 제1단계(0-6 시간) 동안, 고정화된 NpAS는 재빨리 $1.36 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ 의 상대적으로 높은 k_i 를 갖는 촉매 활성의 8%를 손실시켰고, 이는 고정화되지 않은 효소의 약 반에 해당한다. 그러나, 배양 제2단계(6-24 시간) 동안, k_i 는 $0.4 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ 으로 유의성있게 감소되었다. 24 시간이 경과하면 비활성화 속도는 추가적으로 느려지며, 배양 제3단계(6-24 시간)의 k_i 는 $0.15 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ 으로 고정화되지 않은 효소의 약 5%로 나타났다. k_i 의 점진적 감소는 온도에 대한 고정화된 NpAS의 불균일한 감수성을 나타낸다.

[0050] 본 발명에서 고정화되지 않는 NpAS에서는 3시간 배양 후 많은 양의 침전물이 관찰되는 반면, 고정화 NpAS에서는 100시간 배양 후 조차도 어떠한 침전물을 관찰할 수 없었다. 이는 EL100 고분자에 대한 NpAS의 비-공유 결합이 효과적으로 단백질 응집을 방지하여 효소의 활성형을 안정화시킴을 시사한다. 고정화되지 않은 NpAS는 42.5℃에서 비록 가장 좋은 효소 활성을 나타낼지라도, 40℃에서 나쁜 열안정성을 나타내었다. 따라서, 72시간 배양 동안 효소 비활성화의 효과를 최소화 하기 위하여, 투라노즈 생산을 위한 효소 반응은 최적 온도인 42.5℃에서 수행하지 않고, 35℃에서 수행하였다.

[0051] <실시예 5> $V_{\max}$ 및 K_m 측정

[0052] 고정화된 NpAS 및 고정화되지 않은 NpAS의 동력학 계수, 즉 미카엘리스 상수(K_m) 및 최대속도($V_{\max}$)는 다양한 농도의 수크로즈(0.02-0.7 M)를 효소와 함께 배양시키는 방법을 통해 Lineweaver-Burk plot으로 측정되었다.

[0053] 각각의 효소의 초기 반응 속도는 다양한 농도의 수크로즈(0.02-0.7 M)와 함께 35℃에서 50mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0)에서 측정되었다. 결과를 도 5에 나타내었다.

[0054] 도 5의 Lineweaver-Burk plot에서 볼 수 있는 바와 같이, 고정화된 NpAS 및 고정화되지 않은 NpAS 모두는 수크로즈가 단독 기질로 사용되었을 때 일반적인 미카엘리스-멘텐 양상을 보이지 않았고, 수크로즈 양을 두 부분으로 나눔으로써 각각 다른 두개의 미카엘리스-멘텐 방정식을 얻을 수 있었다. 그러므로 $V_{\max}$ 및 K_m 값은 각각 계산되었고, 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

효소	초기 수크로즈 농도(mM)	K_m (mM)	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol 환원당} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 단백질)
NpAS	>82.63	33.82	1.39
	<82.63	3.13	1.03
고정화 NpAS	>76.12	33.59	1.28
	<76.12	2.90	0.92

[0056] 초기 수크로즈 농도가 82.63 mM 미만일 때, 고정화되지 않은 NpAS의 미카엘리스 상수(K_m)는 3.13 mM 이었고, 최대속도($V_{\max}$)는 $1.03 \mu\text{mol 환원당}/(\text{min} \cdot \text{mg 단백질})$ 이었으며, 반면 초기 수크로즈 농도가 82.63 mM 이상일 때, 고정화되지 않은 NpAS의 미카엘리스 상수(K_m)는 33.82 mM 이었고, 최대속도($V_{\max}$)는 $1.39 \mu\text{mol 환원당}/(\text{min} \cdot \text{mg 단백질})$ 로 나타났다.

[0057] 고정화된 NpAS에서 고정화되지 않은 NpAS값과 비교하여 거의 동일한 $V_{\max}$ 및 K_m 값이 측정되었으며, 이는 EL100

폴리머상의 NpAS와의 비공유 결합은 효소 자체의 동력학적 특성에 영향을 미치지 않음을 시사한다.

<실시예 6> 고정화 NpAS에 의한 투라노즈의 반복 생산

기질로서 1.0 M 수크로즈 및 0.75 M 프룩토스를 사용하고, 400 U/L의 효소 활성으로 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)에서 35℃에서 고정화된 NpAS에 의해 투라노즈를 반복 생산하였다. 72시간 효소 반응 후, 0.2ml의 반응 혼합물을 회수하고 효소를 불활성화 시키기 위해 끓는 수욕 상에서 10분동안 열을 가하고 그 후 HPAEC에 의한 당 분석 전까지 4℃에서 보관되었다.

고정화 NpAS의 재사용은 다음과 같이 수행되었다: 반응 혼합물의 점도를 낮추기 위해 증류수로 2배 희석한 후, 0.1 M HCl을 첨가하여 pH를 4.0으로 조정하였고, 3,000g에서 10분 동안 원심분리하여 고정화 NpAS으로서 침전물을 모았다. 침전물을 희석 HCl (pH 4.0)으로 2회 세정한 후, 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.0)에서 재용해시켰고, 고정화된 NpAS는 다음 반응 사이클에 사용되었다. 활성(단백질) 회수 수율(%)은 활성(단백질) 회수량/활성(단백질) 사용량 x 100 으로 계산되었다. 안정성 지표는 재생 반응 동안 고정화 NpAS의 단백질에 대한 활성의 회수 수율비로서 정의하였다.

그 결과, 하기 표 2에 각 반응 주기 후 단백질 및 활성 회수 수율을 정리하였다.

표 2

고정화 NpAS	활성 회수 수율 (%)	단백질 회수 수율 (%)	안정성 지표
0 cycle	85.4±0.7	95.3±1.4	0.90
1 st cycle	84.7±2.0	87.4±1.0	0.97
2 nd cycle	80.7±2.2	92.3±3.7	0.87
3 rd cycle	79.3±4.3	92.5±1.1	0.86
4 th cycle	77.2±0.5	91.5±1.9	0.84
5 th cycle	78.5±0.3	89.8±2.9	0.87

표 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 고정화 NpAS는 반복적인 효소 반응 동안 우수한 안정성을 나타내었다. 효소 단백질의 회수 수율도 87% 내지 92%로 우수하였고, 이들의 활성 회수 수율은 77% 내지 85%로 나타났다. 따라서, 단백질 회수 수율에 대한 효소 활성 회수 수율의 비율로서 정의되는 안정성 지표는 0.84 내지 0.97 로 높게 관찰되었다.

각 반응 주기 후 단백질의 손실(7-13%)은 pH 변화에 따른 EL100 고분자로부터 효소 단백질의 유리에서 기인할 수 있다. 약하게 결합된 효소 분자는 다른 분자보다 쉽게 유리될 수 있으므로, 다른 주기보다 첫번째 반응 주기에서 보다 낮은 단백질 회수 수율을 보인다. 그러나 첫번째 주기의 활성 회수 수율은 다른 주기보다 높는데, 이는 약하게 결합되어 있던 효소가 EL100으로부터 유리된 후 불락되어있던 내부-층 효소 분자의 일부가 다시 반응하기 때문이다. 이는 첫번째 주기의 안정성 지표가 가장 높은 이유까지 설명해준다.

<실시예 7> HPSEC을 이용한 당 분석

고정화 NpAS의 재사용성을 평가하기 위해 반응 산물의 당 함량을 HPSEC를 통해 분석하였다.

글루코즈, 프룩토즈, 수크로즈, 투라노즈 및 트레할로스의 정량화가 ED 전기화학 검출기((Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 사용한 PAD (pulsed amperometric detection)와 함께 HPSEC(high-performance anion-exchange chromatography)를 통해 이루어졌다.

CarboPac™ PA1 분석 컬럼(4×250 mm, Dionex)과 이의 가드 컬럼(4×50 mm, Dionex)의 온도는 30℃로 유지되었다. 주입 전, 반응 산물을 증류수로 적정하게 희석하고, 시린지 필터(0.45μm)로 여과시켰다. 주입 부피는 25μl였으며, 1.0 mL/min의 유속에서 150mM NaOH 용액을 사용하여 각각의 당의 용출을 수행하였다.

결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

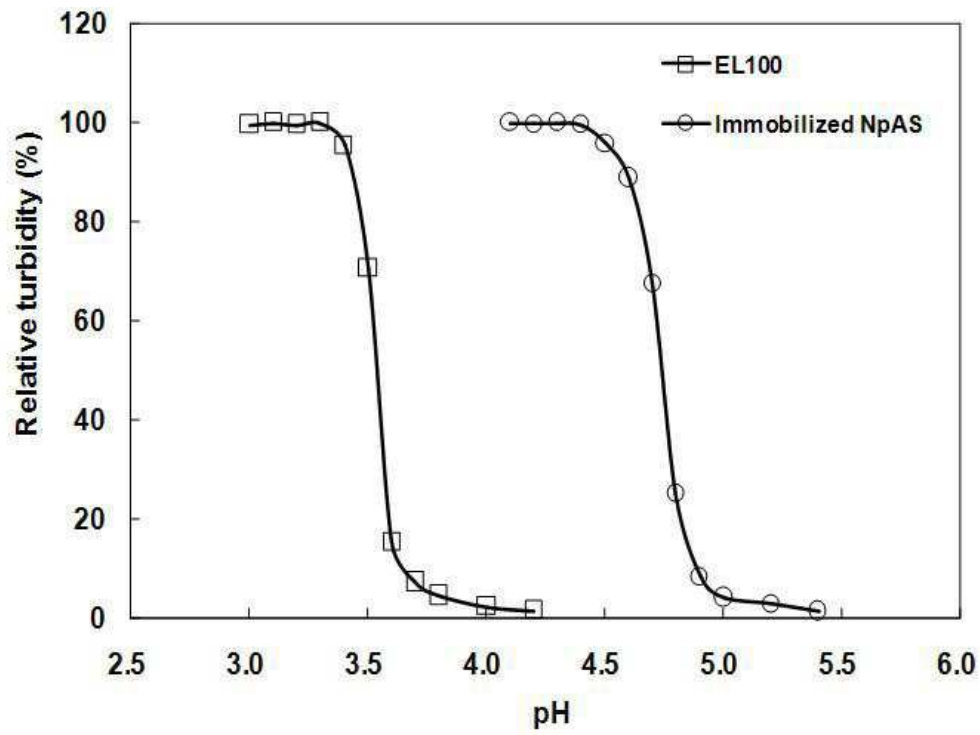
효소	당 함량 (10^{-2} M)				투라노즈 수율(%)
	글루코즈	프룩토즈	트레할로스	투라노즈	
고정화되지 않은 NpAS	2.6 ± 0.0^a	97.4 ± 0.4	10.2 ± 0.1	66.7 ± 0.8	66.7 ± 0.8
고정화 NpAS (1 st cycle)	2.0 ± 0.2	97.9 ± 0.3	10.2 ± 0.1	67.4 ± 1.1	67.4 ± 1.1
고정화 NpAS (2 nd cycle)	2.7 ± 0.0	100.1 ± 2.0	10.6 ± 0.2	67.5 ± 1.0	67.5 ± 1.0
고정화 NpAS (3 rd cycle)	2.4 ± 0.2	96.4 ± 0.6	10.6 ± 0.1	66.3 ± 0.3	66.3 ± 0.3
고정화 NpAS (4 th cycle)	2.6 ± 0.0	95.9 ± 0.6	10.8 ± 0.1	66.4 ± 0.7	66.4 ± 0.7
고정화 NpAS (5 th cycle)	3.0 ± 0.1	97.9 ± 0.4	11.2 ± 0.1	66.8 ± 0.3	66.8 ± 0.3

도 3을 참조하면, 총 다섯번의 주기 동안 고정화된 NpAS를 사용한 반복적인 투라노즈의 생산 수율은 일정하게 나타났고(약 67%), 고정화되지 않은 NpAS를 사용한 경우와 거의 차이가 없었다. 이는 고정화된 NpAS에 의해 안정적인 투라노즈의 생산이 가능하다는 것을 시사한다.

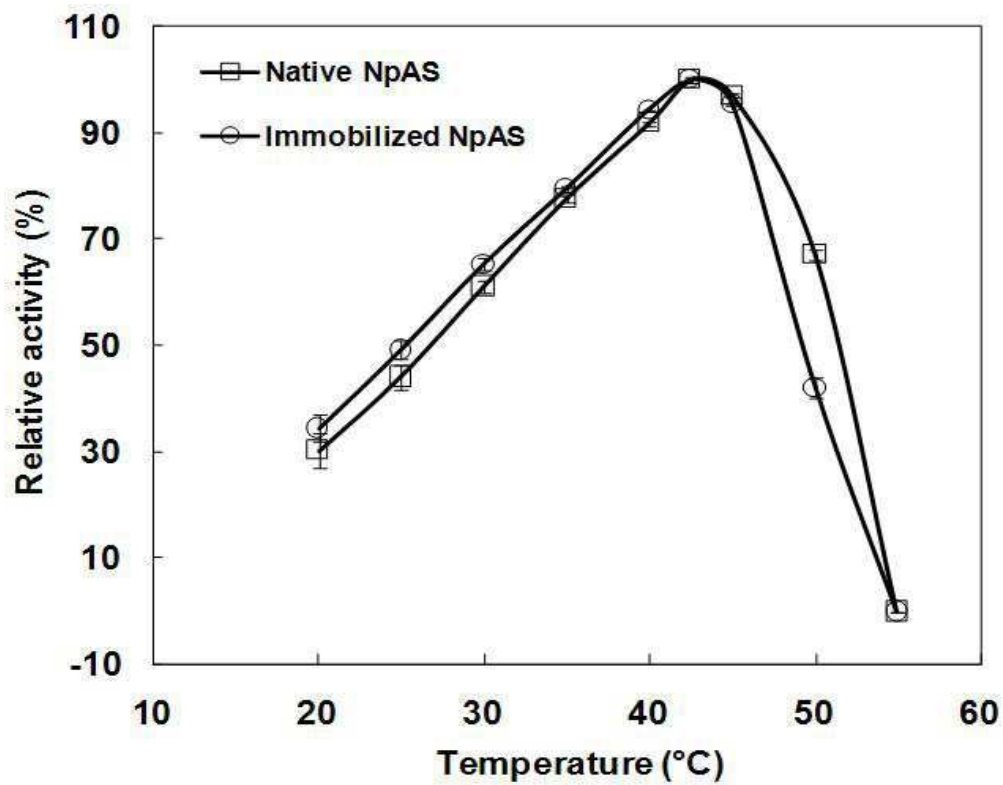
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

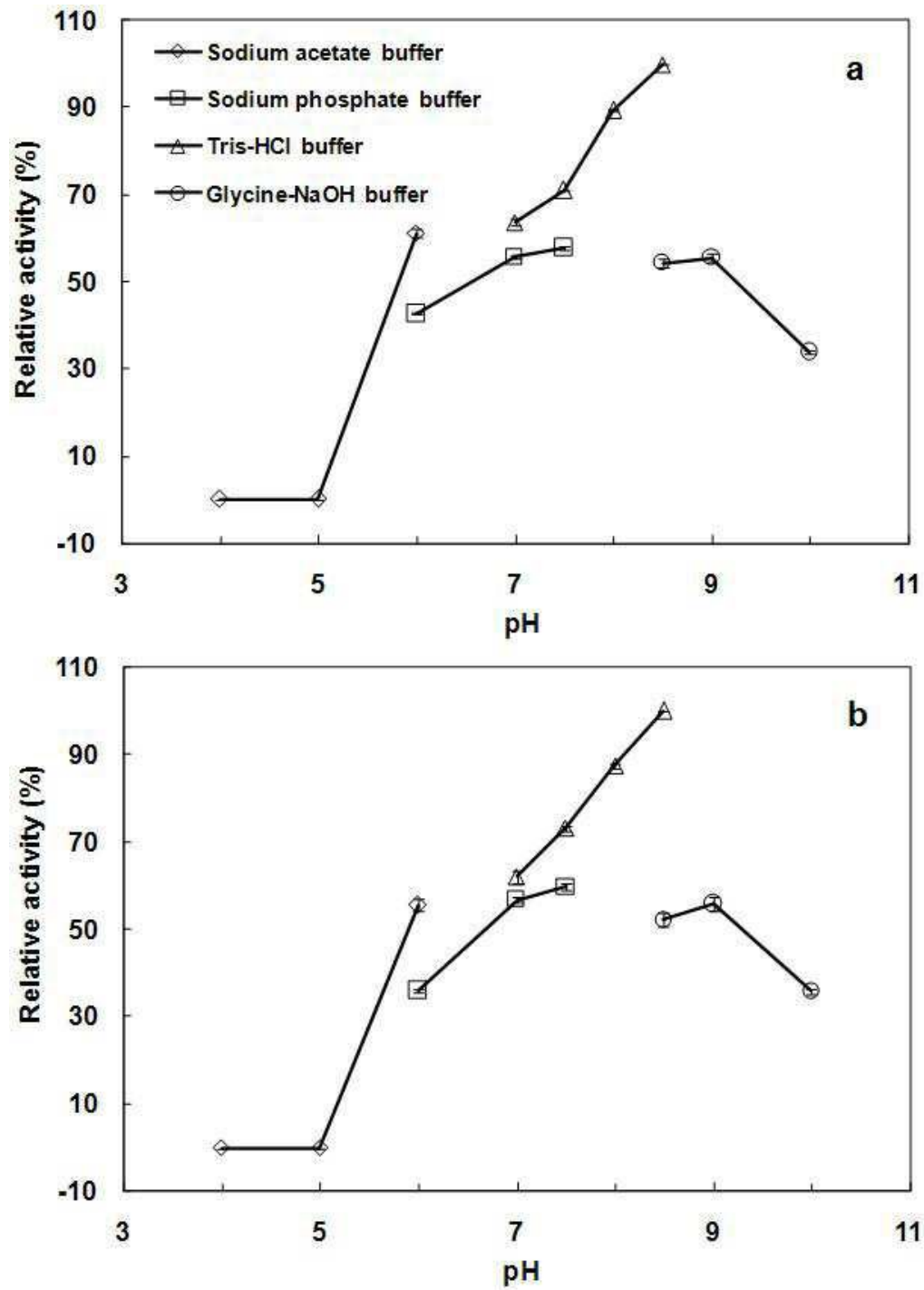
도면1



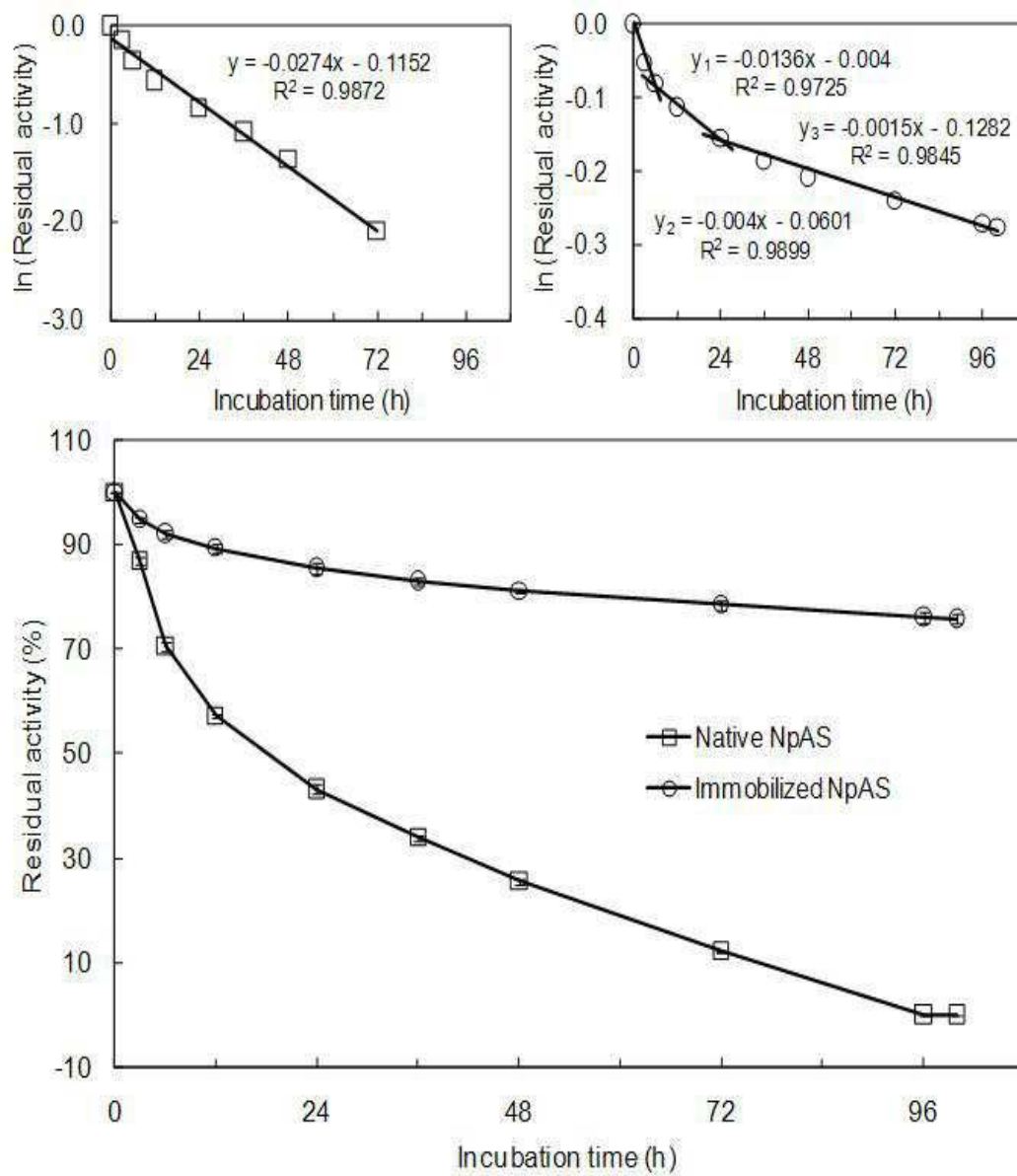
도면2



도면3



도면4



도면5

