

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0093090 (43) 공개일자 2014년07월25일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 9/00 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01) C12P 19/00 (2006.01)	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)	
(21) 출원번호 10-2013-0005451	(72) 발명자 박천석 경기 남양주시 와부읍 덕소로116번길 49, 106동 1303호 (현대홈타운아파트)	
(22) 출원일자 2013년01월17일 심사청구일자 2013년01월17일	서동호 충북 청주시 흥덕구 성봉로169번길 41-2, (개신 동) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 손민	

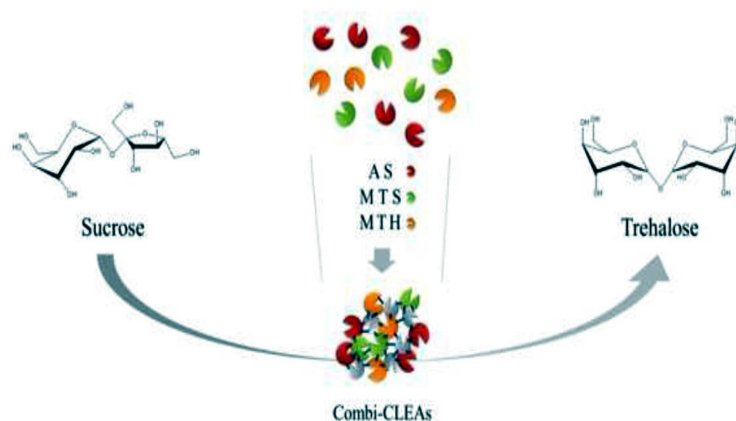
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **가교결합 효소를 이용한 설탕으로부터 트레할로스를 제조하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 설탕으로부터 트레할로스를 생산하는 가교결합된 효소 복합체의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 가교결합된 효소복합체, 및 상기 방법으로 제조된 가교결합된 효소 복합체를 설탕과 반응시키는 단계를 포함하는, 설탕으로부터 트레할로스를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 트레할로스 제조방법은 아밀로수크라아제(AS), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(MTS), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(MTH), 글루코르알데하이드 및 소혈청알부민으로 만들어진 고정화 효소 combi-CLEAs를 이용하여 설탕으로부터 트레할로스를 생산할 수 있으며, 이 고정화 효소 combi-CLEAs의 효소촉매활성은 수행과정의 변화없이 재사용이 가능하여 열의 안정성이 높아 다단계 효소 반응이 필요한 산업용 생물전환에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정종현

서울 강서구 양천로57길 37, 402동 504호 (가양동,
가양4단지아파트)

정동현

서울 양천구 오목로23길 36, (신정동)

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 아밀로수크라아제(Amylosucrase), 말토올리고실트레할로스 합성효소(Maltooligosyltrehalose synthase), 및 말토올리고실트레할로스 트레할로하이드롤라아제(Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase)를 침전제로 침전시키는 단계; 및

(b) 상기 침전제에 글루타르알데하이드(Glutaraldehyde) 및 소혈청 알부민(Bovine serum albumin)을 첨가하여 가교결합된 효소 복합체를 제조하는 단계; 를 포함하는, 설탕으로부터 트레할로스(Trehalose)를 생산하는 가교결합된 효소 복합체의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 아밀로수크라아제는 데이노코커스 제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 제조방법

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 말토올리고실트레할로스 합성효소 또는 말토올리고실트레할로스 트레할로하이드롤라아제는 브레비박테리움 헬볼럼(*Brevibacterium helvolum*)으로부터 유래한 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 침전제는 아세톤인 것인 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 아밀로수크라아제: 말토올리고실트레할로스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제는 1:1 내지 8.5:1 중량비로 포함되는 것인 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 아밀로수크라아제: 말토올리고실트레할로오스 합성효소: 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제는 1:0.5:0.5 내지 8.5:0.5:0.5 중량비로 포함되는 것인 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 글루타르알데하이드는 7 내지 50 mM 농도로 첨가되는 것인 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 소혈청 알부민의 농도는 a) 단계에서 첨가되는 아밀로수크라아제에 대해 1.5 내지 3 배로 첨가되는 것인 제조방법.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 따라 제조된 설탕으로부터 트레할로스를 생산하는 가교결합된 효소 복합체.

청구항 10

아밀로수크라아제(Amylosucrase), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(Maltooligosyltrehalose synthase), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase)가 가교결합된 효소 복합체를 설탕과 반응시키는 단계를 포함하는, 설탕으로부터 트레할로스를 제조하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 효소 복합체에서 아밀로수크라아제: 말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제는 1:1 내지 8.5:1 중량비로 포함되는 것인 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 효소 복합체에서 아밀로수크라아제: 말토올리고실트레할로오스 합성효소: 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제는 1:0.5:0.5 내지 8.5:0.5:0.5 중량비로 포함되는 것인 방법.

청구항 13

제 10항에 있어서, 상기 효소 복합체는 a) 아밀로수크라아제, 말토올리고실트레할로오스 합성 효소, 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 아세톤으로 침전시키는 단계; b) 상기 a) 단계에서 침전된 효소들에 글루타르알데하이드 및 소혈청 알부민을 첨가하는 단계를 포함하여 제조되는 것인 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 글루타르알데하이드는 7 내지 50 mM농도로 첨가되는 것인 방법.

청구항 15

제 13항에 있어서, 상기 소혈청 알부민의 농도는 a) 단계에서 첨가되는 아밀로수크라아제에 대해 1.5 내지 3 배 이상으로 첨가되는 것인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 설탕으로부터 트레할로스를 생산하는 가교결합된 효소 복합체의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 가교결합된 효소복합체, 및 상기 방법으로 제조된 가교결합된 효소 복합체를 설탕과 반응시키는 단계를 포함하는, 설탕으로부터 트레할로스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0002]

배경기술

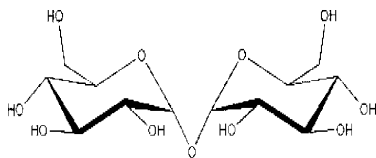
[0003] 친환경 산업 및 지속 가능한 산업에서 생물전환에 대한 유용한 도구로서 생체촉매에 대한 요구는 증가하고 있다. 생체촉매는 반응 공정과정에서 많은 장점들을 제공하기 때문에 수많은 연구들이 고정화된 생체촉매를 만

드는 데에 기울어져 왔다. 고정화된 생체촉매의 재사용 능력은 고정이라는 이점을 배가한다. 가장 일반적으로 이용되는 고정 방법은 고형 운반자에 효소를 부착하거나 효소를 유기성 또는 무기성 폴리머 젤로 봉합하는 것이다. 비촉매성 매트릭스에 고정된 효소의 장점에도 불구하고, 반응의 수율 및 생산성은 단순히 운반자의 비촉매성 부분의 존재 때문에 감소할 수 있다. 최근, 고형 운반자에 대한 기존 방법의 대안으로서 가교-결합 효소 응집(cross-linked enzyme aggregates, CLEAs)에 많은 관심을 가지게 되었다.

[0004] 최근, CLEAs가 연쇄 반응을 촉진할 수 있음이 드러났다. CLEAs의 이러한 형태를 combi-CLEAs라고 한다. Combi-CLEAs에서, 효소의 이질성 집단은 동시에 같은 응집으로 엮일 수 있고 그들은 다목적 연속 또 비연속 생체변환을 수행한다. Dalal 등은 리파아제(lipase), α -아밀라아제(α -amylase), 및 포스포리파아제(phospholipase) A2를 포함한 다른 성질의 효소를 교차-결합하여 만들어진 Combi-CLEAs가 좋은 다효소 활성 및 반복적인 이용에 대한 안정성을 나타내는 것을 보였다 (Dalal et al., 2007a). 또한, 브제르칸데라 어더스타(*Bjerkandera adusta*)에서 유래한 퍼옥시다아제 및 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)에서 유래한 글루코오스 옥시다아제로 생성된 combi-CLEAs는 H_2O_2 에 대해 높은 안정성을 보였고 네 가지 내분비계 교란 물질을 효과적으로 제거할 수 있었다(Taboada-Puig et al., 2011).

[0005] 트레할로스(trehalose)는 하기 화학식 1에서 보는 바와 같이 포도당(glucose) 두 분자가 1, 1 결합을 이루고 있는 비환원성 이당류로서, 식물뿐만 아니라 미생물에도 많이 존재하는 물질이다.

화학식 1



[0006]

[0007] 트레할로스는 수분 유지 작용이 있어, 화장품, 식품 및 의약품 등의 광범위한 분야에서 각광을 받고 있다. 하지만 현재까지 경제적이고 효율적인 트레할로스의 제조 방법이 구축되지 않아 광범위한 활용이 제한되고 있는 상황이다.

[0008] 기존의 트레할로스 합성 방법은 말토올리고실트레할로오스 합성효소(Maltooligosyltrehalose synthase)를 사용하여 아밀로오스 말단의 말토오스 단위를 트레할로스로 만든 후, 합성된 트레할로스를 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase)를 이용하여 가수분해하는 방법이 있다.

[0009] 말토오스를 원료로 하고 말토오스-트레할로오스 전환효소를 사용하여 트레할로스를 생산하는 방법 및 효소적 방법에 의해 상대적으로 설탕으로부터 트레할로스를 생산하는 방법이 보고되어 있다.

[0010] 그런데, 상기의 방법들은 기질로 아밀로오스 또는 말토오스를 사용하거나 클로닝 및 정제를 통한 전환효소를 이용함으로써 상대적으로 높은 비용이 요구되는 문제점들을 안고 있다.

[0011] 따라서, 비교적 저렴한 기질과 안정성이 높고 열에 안정하고 재사용이 가능한 전환효소를 사용하여 트레할로스를 생산하는 방법의 개발이 필요하다.

[0012] 이러한 배경 하에 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 세가지 다른 효소, 아밀로수크라아제(Amylosucrase), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(Maltooligosyltrehalose synthase), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase)를 글루타르알데하이드(glutaraldehyde) 및 소혈청 알부민(Bovine Serum Albumin)으로 가교결합시킨, 가교결합 효소를 제조하고, 이를 설탕으로부터 트레할로스를 제조하는데 전환효소로 사용하는 경우, 가격이 저렴한 설탕으로부터 트레할로스를 대량 생산할 수 있으며, 재사용이 가능함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 하나의 목적은 설탕으로부터 트레할로스를 생산하는 가교결합 효소 복합체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명이 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 설탕으로부터 트레할로스를 생산하는 가교결합된 효소 복합체를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조된 가교결합효소 복합체를 설탕과 반응시키는 단계를 포함하는, 설탕으로부터 트레할로스를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서 본 발명은 아밀로수크라아제(Amylosucrase), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(Maltooligosyltrehalose synthase), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase)를 침전제로 침전시키는 단계; 및 (b) 상기 침전제에 글루타르알데하이드(glutaraldehyde) 및 소혈청 알부민(Bovine Serum Albumin)을 첨가하여 가교결합된 효소 복합체를 제조하는 단계; 를 포함하는, 설탕으로부터 트레할로스(Trehalose)를 생산하는 가교결합 효소 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0017] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 설탕으로부터 트레할로스를 생산하는 가교결합된 효소 복합체를 제공한다.
- [0018] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 제조된 가교결합된 효소 복합체를 설탕과 반응시키는 단계를 포함하는, 설탕으로부터 트레할로스를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0019] 기존에는 말토오스 또는 아밀로오스를 기질로 하는 트레할로스를 제조하였기 때문에 상대적으로 높은 비용이 요구되는 문제점이 있었다. 이에 본 발명자들은 비용이 저렴한 설탕을 기질로 하는 트레할로스를 생산하는 방법을 개발하였으며, 특히, 3가지 효소를 가교결합시켜 제조된 효소복합체를 사용하여 복잡한 효소처리단계를 단순화하여 효율적인 트레할로스를 생산할 수 있도록 하였다.
- [0020] 또한, 본 발명에서는 설탕으로부터 트레할로스의 생산 효율을 높이기 위한 효소복합체의 제조에 있어서 최적의 효소 침전제, 가교결합제, 및 반응조건들을 규명하였다. 상기 방법으로 제조된 효소복합체는 재사용이 가능하고, 열에 안정성이 매우 우수함을 확인하며, 설탕에 반응시켰을 때, 기존의 공지된 방법에 비해 설탕의 생산량이 매우 높음을 확인하였다.
- [0021] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.
- [0022] 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 아밀로수크라아제(Amylosucrase), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(Maltooligosyltrehalose synthase), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase)를 침전제로 침전시키는 단계; 및 (b) 상기 침전제에 글루타르알데하이드(Glutaraldehyde) 및 소혈청 알부민(Bovine Serum Albumin)을 첨가하여 가교결합된 효소 복합체를 제조하는 단계; 를 포함하는, 설탕으로부터 트레할로스를 생산하는 가교결합 효소 복합체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명의 "트레할로스(α -D-glucopyranosyl-[1-1]- α -D-glucopyranose)"는 곤충, 세균, 곰팡이, 효모 그리고 일부 식물체 등에서 발견되는 비환원성 이당류이다(Elbein et al., Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 30: 227-256, 1974).
- [0024] 트레할로스는 환원성 탄수화물의 저장형태이기도 하지만 주로 영양분의 고갈, 고온, 건조, 산소 결핍, 삼투압

등 다양한 종류의 바람직하지 못한 물리적 화학적 외부 충격에서 비롯되는 나쁜 영향으로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Eleutherio et al., Cryobiology 30: 591-596, 1993).

- [0025] 트레할로스는 건조과정에서 단백질과 세포막의 인지질과 수소결합을 하여 세포의 구조를 그대로 유지하게 해 주며, 식품의 경우 고유의 풍미, 색상, 질감 등을 유지할 수 있게 한다(Crowe et al., Science 223: 701-703, 1984). 따라서 건조식품의 경우 색과 풍미를 보존하는 식품첨가제로서 이용할 수 있을 뿐만 아니라 가용수분을 감소시킴으로써 식품의 저장성을 향상시킬 수 있기도 하다.
- [0026] 트레할로스 합성 반응 경로는 효모와 대장균에서 가장 잘 알려져 있는데, 이들의 유전자는 이미 분리가 되었고 그 구조도 결정이 되어 있다(De Virgilio et al., Eur. J. Biochem. 212: 315-323, 1993; Kaasen et al., Gene 145: 9-15, 1994). 이외에도 라이소비움 속(*Rhizobium* sp.) 등 근류균에서 트레할로스 합성 활성이 측정되었다(Mueller et al., Physiol. Plant. 90: 86-92, 1994). 이들 미생물들의 트레할로스 합성에는 두 개의 단백질이 촉매하는 두 단계의 효소반응으로 구성되어 있다. 첫 번째 효소는 말토올리고실 트레할로스 합성효소(maltooligosyltrehalose synthase, MTSase)로서, 말토올리고당(maltooligosaccharide)의 환원말단에 존재하는 $\alpha(1\rightarrow4)$ 글리코시딕 결합을 $\alpha(1\rightarrow1)$ 글리코시딕 결합으로 전환시켜 말토올리고실 트레할로스(maltooligosyltrehalose)를 생성한다. 두 번째 효소는 말토올리고실트레할로스 가수분해효소(maltooligosyltrehalose trehalohydrolase: MTHase)로서, MTSase에 의해 생성된 말토올리고실 트레할로스의 말토올리고실 부위와 트레할로스 부위 간의 $\alpha(1\rightarrow4)$ 글리코시딕 결합을 가수분해하여 포도당(glucose)의 단위가 2개 적어진 말토올리고당과 트레할로스를 생산한다.
- [0027] 이들 두 개의 유전자로부터 얻은 두 가지 효소를 한 반응용기에 동시에 넣고 초기기질과 반응시킬 경우, 첫 번째 효소로부터 생산된 중간생산물, 즉 말토올리고실 트레할로스(maltooligosyltrehalose)가 일단은 용액 중으로 확산(diffusion)되므로, 일정 농도에 이를 때까지 두 번째 효소와 반응하기 어렵게 된다. 장시간 각각의 효소를 필요한 일정 농도로 유지하여야 하며, 최종생성물의 양에 제약이 있을 수 있고, 따라서 생산량의 일관성을 유지하기 힘들다.
- [0028] 본 발명의 사용된 "가교결합효소"는 아밀로수크라아제, 말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 동시에 첨가하여 반응을 유도할 수 있고, 아밀로수크라아제를 먼저 첨가하여 반응을 유도한 후, 말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 순차적으로 첨가하여 반응을 유도할 수도 있다. 바람직하게는 아밀로수크라아제, 말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 동시에 첨가하여 반응을 유도할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 사용되는 "아밀로수크라아제(AS)"는 설탕을 기질로 사용하여 설탕을 포도당과 과당으로 가수분해하는 효소인데, 생성된 포도당을 이용하여 알파-1,4-결합을 가지고 있는 수용체 물질 또는 포도당 단 분자에 새로운 포도당을 전이시켜주는 효소로써 불용성 또는 수용성 다당체를 생산하는 것으로 알려져 있다.
- [0030] 상기 아밀로수크라아제는 시판되는 것을 사용하거나, 또는 미생물로부터 분리하여 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 구체적인 일례로서, 상기 아밀로수크라아제는 데이노코커스 제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*)로부터 유래한 것 뿐만 아니라 아밀로수크라아제의 특성을 가지는 모든 효소를 포함한다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 말토올리고실트레할로오스 합성효소(Maltooligosyltrehalose synthase)는 아밀로수크라아제의 작용에 의해 설탕으로부터 생성된 알파-1, 4-결합의 아밀로오스의 말단에 존재하는 말토오스 단위를 트레할로스로 변환시켜주는 역할을 한다. 또한 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase)는 상기 합성된 트레할로스를 아밀로오스로부터 가수분해하는 효소이다.
- [0032] 아밀로수크라아제의 작용에 의해 설탕으로부터 생성된 알파-1,4-결합의 아밀로오스의 말단에 존재하는 말토오스 단위는 말토올리고실트레할로오스 합성효소에 의해 트레할로스로 변환되고, 이어 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제에 의해 가수분해되는 것으로 알려져 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 말토올리고실트레할로오스 합성효소 또는 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제는 시판되는 것을 사용하거나, 또는 미생물로부터 분리하여 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 구체적인 일례로서, 상기 말토올리고실트레할로오스 합성효소 또는 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제는 브레비박테리움 헬볼럼(*Brevibacterium helvolum*)으로부터 유래한 것 뿐만 아니라 말토올리고실트레할로스 합성효소 또는 말토올리고실트레할로스 트레할로하이드롤라아제의 특성을 가지는 모든 효소를 포함한다.

- [0034] 본 발명의 일실시예에서는 데이노코커스 올리고실트레제오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*) 및 브레비박테리움 헬볼림(*Brevibacterium helvolum*)으로부터 유래한 아밀로수크라아제, 말토올리고실트레할로오스 합성효소 또는 말토할로오스 트레할로하이드롤라아제를 이용하여 가교결합된 효소복합체를 제조하였다.
- [0035] 본 발명의 효소복합체의 제조방법에서, 상기 (a)단계는 침전제를 사용하여, 아밀로수크라아제(Amylosucrase), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(Maltooligosyltrehalose synthase), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(Maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase)를 물리적 침전시키는 단계이다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어 "침전"은 여러 가지 염, 유기용매, 또는 비이온성 중합체에 의한 단백질의 3차원 구조를 건드리지 않고 단백질 분자의 물리적 응집을 거대분자 구조로 유도하는 것을 의미한다. 침전제에는 아세톤(acetone), 아세토니트릴(acetonitrile), n-부탄올(*n*-butanol), DME, DMSO, 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 1-프로판올(1-propanol), 및 2-프로판올(2-propanol) 등과 같은 유기용매가 포함될 수 있다. 상기 침전제의 종류에 따라 효소 응집형태, 효소 안정성 및 효소 활성이 달라질 수 있으므로, 최적의 물리적 침전을 이루는 침전제 선택이 중요하다.
- [0037] 본 발명의 효소침전제는 아세톤(acetone), DME 및 2-프로판올(2-propanol)을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 아세톤을 사용할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일실시예에서는 박막크로마토그래피(Thin layer chromatography) 및 고속 음이온교환 크로마토그래피(High performance anion-exchange chromatography, HPAEC)방법으로 상기 침전물의 효율 및 트레할로스 생성량을 측정한 결과, 아세톤이 처리된 효소의 활성이 DME 및 2-프로판올(2-propanol)보다 높게 나타나 트레할로스 생성량이 많음을 확인할 수 있었다(도 2).
- [0039] 본 발명에서 아밀로수크라아제: 말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제의 교차결합을 위한 최적 농도는 0.5:1 내지 8.5:1 중량비로 제조할 수 있으며 바람직하게는 1:1 내지 8:1 중량비로 제조할 수 있다. 더욱 바람직하게는 2:1 내지 8:1 중량비로 교차결합을 시킬 수 있다. 또한 아밀로수크라아제: 말토올리고실트레할로오스 합성효소: 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제는 1:0.5:0.5 내지 8.5:0.5:0.5 중량비로 제조할 수 있으며 바람직하게는 1:1.5:0.5 내지 8:0.5:0.5 중량비로 제조할 수 있다. 더욱 바람직하게는 2:0.1:0.1 내지 8:0.5:0.5 중량비로 교차결합을 제조할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일실시예에서는 상기 효소들의 최적농도를 8:0.5:0.5 중량비로 하여 교차결합 응집물을 제조한 결과 아밀로수크라아제 중량이 높아질수록 트레할로스의 생성량이 증가함을 확인하였다(도 3).
- [0041] 상기 (b)단계는 침전제에 의해 침전된 효소를 글루타르알데하이드 및 소혈청 알부민을 이용하여 가교결합시키는 단계이다.
- [0042] 본 발명에서 사용되는 "글루타르알데하이드"는 탄소원자수 5개의 지방족 디알데하이드로서, 일반적으로 조직고정제로 사용하고 있다. 또한 글루타르알데하이드는 효소를 응집시키는데 사용되지만 고농도로 처리할 경우 효소응집력을 떨어뜨린다.
- [0043] 특히, 아밀로수크라아제는 글루타르알데하이드에 의하여 활성부위가 상처받기 쉬워 활성을 잃게 되고 또한 효과적으로 가교결합이 되지 않는 경우가 생겨 세척과정에서 유실되는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 글루타르알데하이드의 양을 조절하는 것이 중요하다.
- [0044] 본 발명의 가교결합효소를 제조하는 단계에서 효소응집제로 7 내지 50 mM 농도로 글루타르알데하이드를 첨가할 수 있다. 바람직하게는 상기 제조단계에 7 내지 20 mM 농도의 글루타르알데하이드를 첨가할 수 있으며 더욱 바람직하게는 10mM 농도로 글루타르알데하이드를 첨가할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일실시예에서는, 주사전자현미경 이미지에 의한 가교결합효소를 제조하는 단계에서 첨가된 글루타르알데하이드의 효과를 분석해본 결과, 10mM 글루타르알데하이드를 첨가한 가교결합효소 복합체의 표면이 효소가 질들이 이동하기에 용이한 크기의 구멍들이 존재함을 확인하였다(도 5).
- [0046] 본 발명에서 사용되는 "소혈청알부민"은 혈장 내에 다량 함유되어 있는 단백질로서 총 단백질의 약 60%를 차지하고 있으며 효소의 불활성 물질이다.
- [0047] 효소 불활성 물질은 글루타르알데하이드의 처리에 의한 효소활성 부위 근처에 있는 아미노그룹 간의 과도한 교차결합을 차단하여 안정적으로 트레할로스를 생성할 수 있다. 상기 효소 불활성 물질에는 소혈청알부민, 계란알부민, 헤모글로빈 및 피브로넥틴과 같은 아민기를 가진 물질 등이 있으며 바람직하게는 소혈청알부민이 사용될

수 있다.

- [0048] 본 발명에서는 아밀로수크라아제, 말토올리고실트레할로오스 합성 효소, 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 이용한 가교결합효소 복합체 제조 단계에서 아밀로수크라아제에 대해 1.5 내지 3 배 이상의 농도로 소혈청알부민을 첨가할 수 있다. 바람직하게는 아밀로수크라아제에 대해 1.5 내지 2배 이상의 농도로 소혈청알부민을 첨가할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 아밀로수크라아제에 대해 2배 농도로 소혈청알부민을 첨가할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일실시예에서는, 아밀로수크라아제, 말토올리고실트레할로오스 합성 효소, 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 이용한 가교결합 단계에서 아밀로수크라아제에 대해 2배 농도로 소혈청알부민을 첨가하여 트레할로스 생성에 효과적임을 확인하였다(도 4).
- [0050] 또 하나의 양태로서 본 발명은 상기 방법으로 제조된 설탕으로부터 트레할로스를 생산하는 가교결합된 효소 복합체에 관한 것이다.
- [0051] 상기 방법으로 제조된 가교결합된 복합체는 여과 및 원심분리에 의해 간단히 7주기까지 재사용할 수 있으며 바람직하게는 5주기까지 설탕으로부터 트레할로스를 제조하는데 재사용 할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일실시예에서는 아밀로수크라아제, 말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 동시에 첨가하여 반응을 유도한 가교결합효소를 설탕에 이용하여 트레할로스를 제조하였다(도 1).
- [0053] 상기 트레할로스 제조에 이용된 가교결합효소는 원심분리에 의해 반응혼합물에서 분리하여 재사용한 결과, 가교결합효소의 활성이 5주기까지 유지됨을 확인할 수 있었다(도6).
- [0054] 또 다른 양태로서, 본 발명은 아밀로수크라아제(Amylosucrase), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(Maltooligosyltrehalose synthase), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase) 가교결합 효소 복합체를 설탕과 반응시키는 단계를 포함하는, 설탕으로부터 트레할로스를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0055] 본 발명의 상기 트레할로스 제조방법은 아밀로수크라아제: 말토올리고실트레할로오스 합성효소 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제가 1:1 내지 8.5:1 중량비로 포함되는 가교결합된 효소복합체를 이용할 수 있다.
- [0056] 또한 상기 효소 복합체에서 아밀로수크라아제: 말토올리고실트레할로오스 합성효소: 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제는 1:0.5:0.5 내지 8.5:0.5:0.5 중량비로 포함된 가교결합된 효소복합체를 이용한 트레할로스 제조할 수 있다.
- [0057] 본 발명에서 상기 효소 복합체는 a) 아밀로수크라아제, 말토올리고실트레할로오스 합성 효소, 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제를 아세톤으로 침전시키는 단계; b) 상기 a) 단계에서 침전된 효소들에 글루타르알데하이드 및 소혈청 알부민을 첨가하는 단계를 포함하여 제조할 수 있다.
- [0058] 상기 글루타르알데하이드는 7 내지 50 mM농도로 첨가될 수 있으며, 상기 소혈청 알부민의 농도는 a) 단계에서 첨가되는 아밀로수크라아제에 대해 1.5 내지 3 배 이상으로 첨가될 수 있다.
- [0059] 가교결합효소에 첨가된 효소복합체의 중량비, 글루타르알데하이드 농도, 소혈청알부민의 농도 등은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0060] 본 발명에서는 기질의존성을 측정하기 위하여 초기 단독기질로서 50mM 내지 350mM 설탕농도를 이용할 수 있으며 바람직하게는 80 mM 내지 200mM 설탕농도를 이용할 수 있다. 더욱 바람직하게는 초기 설탕농도를 100 mM 로 이용할 수도 있다.
- [0061] 본 발명의 일실시예에서는 단독 기질로서 100 mM 이상의 설탕을 이용하여 7.8 % 내지 8 % 전환수율을 나타냄으로써 비교적 일정하게 유지되고 있음을 확인하였다(도 7).
- [0062] 상기 생성된 트레할로스는 설탕이 포함된 반응액으로 분리되어 정제될 수 있다. 또한 본 발명의 아밀로수크라아제(Amylosucrase), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(Maltooligosyltrehalose synthase), 및 말토올리고실트

레할로오스 트레할로하이드롤라아제(Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase)와 가교결합된 효소복합체는 재사용이 가능하기 때문에 한 종류의 효소복합체를 가지고 상기 단계를 반복하여 트레할로스를 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0063]

본 발명에 따른 트레할로스 제조방법은 아밀로수크라아제(AS), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(MTS), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(MTH), 글루코르알데하이드 및 소혈청알부민으로 만들어진 고정화 효소 combi-CLEAs를 이용하여 설탕으로부터 트레할로스를 생산할 수 있으며, 이 고정화 효소 combi-CLEAs의 효소촉매활성은 수행과정의 변화없이 재사용이 가능하여 열의 안정성이 높아 다단계 효소 반응이 필요한 산업용 생물전환에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0064]

도 1은, 가교결합효소를 이용한 설탕으로부터 트레할로스를 제조하는 방법을 모식적으로 나타낸 도이다.

도 2는, 아밀로수크라아제(AS), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(MTS), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(MTH)로 만들어진 combi-CLEAs에서 효소활성 침전에 대한 다양한 유기 용매의 효과를 나타낸 도이다. Combi-CLEAs는 8:1의 효소 비율[DGAS:(BvMTS 및 BvMTH)], 2 배의 BSA 및 10 mM 글루타르알데하이드로 만들어진 것이다. 상기 반응은 0.2 mg combi-CLEAs 및 100 mM 수크로오스(sucrose)로 24 시간 동안 37 °C에서 실시한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은, 아밀로수크라아제(AS), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(MTS), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(MTH)로 만들어진 combi-CLEAs에서 효소 비율의 효과를 나타낸 도이다. DGAS의 양은 고정된 (BvMTS 및 BvMTH) 농도로 변화시킨 것이다. 다른 효소 반응 조건들은 도 1과 동일하게 처리하였다.

도 4는, 아밀로수크라아제(AS), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(MTS), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(MTH)로 만들어진 combi-CLEAs에 대한 BSA의 효과를 나타낸 도이다. BSA 농도를 제외하고 다른 효소 반응 조건들은 도 1과 동일하게 처리하였다.

도 5는, 아밀로수크라아제(AS), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(MTS), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(MTH)로 만들어진 combi-CLEAs의 주사 전자 현미경(SEM) 이미지를 나타낸 도이다. 입자 크기는 20 μm (배율 5,000 $\times$) 스케일의 마이크로그래프로 측정하였다. Combi-CLEAs는 0 mM(A), 10 mM(B), 40 mM(C), 및 80 mM(D) 글루타르알데하이드로 제조하였다.

도 6은, Combi-CLEAs의 재사용성을 나타낸 도이다. 반응은 37°C에서 15 시간 동안 교반하며, 0.2 mg combi-CLEAs 및 100 mM의 수크로오스로 실시하였다.

도7은, 아밀로수크라아제(AS), 말토올리고실트레할로오스 합성효소(MTS), 및 말토올리고실트레할로오스 트레할로하이드롤라아제(MTH)로 만들어진 combi-CLEAs의 서로 다른 기질(수크로오스) 농도에 따른 전환 수율을 나타낸 도이다. 전환 수율은 생산된 트레할로스 및 소비된 수크로오스 사이의 비율로 계산하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065]

이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0066]

실시예 1: 화학물질

[0067]

글루타르알데하이드(Grade I) 및 소 혈청 알부민(BSA)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, 수크로오스는 Duchefa Biochemistry (Haarlem, Netherlands)에서 구입하였다. 아세톤(Aceton), 아세톤니트릴(Acetonitrile), n-부탄올(n-butanol), 디메토시에탄(DME, Dimethoxyethane), 디메틸 설폭사이드(DMSO, Dimethyl sulfoxide), 에탄올(Ethanol), 메탄올(Methanol), 1-프로판올(1-propanol) 및 2-프로판올(2-propanol)을 포함한 본 발명에 쓰인 다른 모든 화학물질은 분석용 등급이며 Sigma-Aldrich 또는 Junsei

Chemical Co. Ltd.(Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

실시예 2: 효소 제조방법

데이노코쿠스 제오써르마리스(*Deinococcus geothermalis*)에서 유래한 아밀로수크라제(DGAS) 유전자를 가진 재조합 대장균(*Escherichia coli*)의 제작은 공지된 방법에 의해 실시하였다(Seo et al., 2012).

말토올리고실트레할로제 합성효소(BvMTS) 및 말토올리고실트레할로제 트레할로하이드로라제(BvMTH) 유전자는 브레비박테리움 헬보룸(*Brevibacterium helvolum*)에서 획득하였으며 성공적으로 대장균에서 발현됨을 확인하였다.

pHCDGAS를 가진 대장균 MC1061 세포는 암피실린(100 μ g/ml)이 첨가된 1 l Luria - Bertani(LB) 배지에서 37 $^{\circ}$ C에서 15 시간 동안 200 rpm으로 교반하면서 배양하였다.

pET21-BvMTS 또는 pET21-BvMTH를 가진 대장균 BL21(DE3)은 처음에는 암피실린(100 μ g/ml)이 첨가된 1 l LB 배지에서 600 nm에서의 광학밀도가 0.55에 이를 때까지 배양하였다. 상기 배양액에 1 mM 이소프로필- β -D-티오갈락토시드(IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactoside)를 첨가한 다음 18 $^{\circ}$ C에서 18 시간 동안 배양하였다. 각각의 효소를 포함하고 있는 상기 세포들은 4 $^{\circ}$ C에서 25 분 동안 2,000 $\times$ g로 원심분리함으로써 수득한 다음 20 mM 소듐 포스페이트(sodium phosphate), 500 mM NaCl, 및 20 mM 이미다졸(imidazole)로 구성된 완충액 A(pH 7.5)으로 재현탁하였다. 세포 현탁액은 얼음 위에서 초음파처리(Sonifier 450, Branson, Danbury, CT, USA; 출력 4로 10초 동안 6 번, 일정하게)를 통하여 분해하였고, 생성된 세포 파편들은 4 $^{\circ}$ C에서 20 분 동안 15,000 $\times$ g로 원심분리하여 제거하였다.

고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC) 시스템(GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)을 이용하여 저온실에서 조효소를 정제하였다. 상기 조효소는 완충액 A와 평형을 이룬 0.45 μ m 필터가 장착된 HisTrapTM HP 크로마토그래피 컬럼(GE Healthcare Bio-Sciences AB)으로 여과하였다. 상기 컬럼에 부착된 단백질은 20 mM에서 500 mM 사이의 이미다졸 선형 그래디언트로 추출하였다. 상기 정제된 효소는 50 mM 소듐 포스페이트 완충액(sodium phosphate buffer, pH 7)에 대응하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 투석한 다음 투석된 용액은 Vivaspin column(30,000 MWCO; Sartorius Stedim Biotech. GmbH, Göttingen, Germany)을 이용하여 동일한 완충액으로 최종농도 10 mg/ml이 되도록 농축하였다. 단백질 농도는 BSA를 표준으로 하여 BCA protein assay kit(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용한 BCA(bicinchoninic acid) 방법으로 측정하였다. SDS-PAGE를 실시하여 효소 순도를 확인하였고 각각의 효소는 combi-CLEAs(cross-linked enzyme aggregate) 제조에 사용하기 전 적절한 농도로 희석하여 사용하였다.

실시예 3: 유기용매에 의한 효소침전

CLEAs 준비 과정의 첫 번째 단계에서 단백질을 응집하기 위한 적절한 물질을 고르는 것은 필수적이다. 여러 가지 염, 유기용매, 또는 비이온성 중합체는 단백질의 3차원 구조를 건드리지 않고 단백질 분자의 물리적 응집을 거대분자 구조로 유도하기 위해 이용하였다 (Brown and Glatz, 1987).

DGAS-BvMTS-BvMTH의 성공적인 교차-결합을 위해 적합한 침전 물질 및 교차-결합 물질의 최적 농도를 측정하였다.

아세톤(acetone), 아세토니트릴(acetonitrile), n-부탄올(n-butanol), DME, DMSO, 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 1-프로판올(1-propanol), 및 2-프로판올(2-propanol) 각각을 포함하는 3.6 ml 차가운 유기용매를 1.2 ml 효소 혼합물 시료에 한방울씩 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 유지시킨 다음, 10,000 $\times$ g에서 5 분 동안 원심분리하여 효소를 침전시켰다. 효소 혼합물에는 세 가지 효소 DGAS, BvMTS 및 BvMTH의 비율이 8:0.5:0.5로 들어 있었다. 또한 전체 효소의 농도는 4.5 mg이고 9 mg의 BSA가 혼합물에 포함되어 있었다. 상기 효소혼합물의 상층액을 제거하고 침전제는 50 mM 소듐 포스페이트 완충액(pH 7)에 재용해하였다. 남아 있는 효소의 활성은 재용해한 다음 측정하였다.

상기 유기용매 측정방법으로 아세톤, 아세토니트릴, n-부탄올, DME, DMSO, 에탄올, 메탄올, 1-프로판올, 및 2-프로판올을 포함하는 아홉 가지의 서로 다른 유기용매를 침전제로서 조사한 결과 세 가지 침전제(아세톤, 2-프로판올 및 DME)를 제외하고, 조사한 나머지 침전제는 효소 활성의 전손실을 초래함을 확인하였다(도 2).

- [0079] 침전제의 효율 및 트레할로스의 양을 측정하기 위하여 박막 크로마토그래피 (thin layer chromatography, TLC) 및 고속 음이온 교환 크로마토그래피(high performance anion-exchange chromatography, HPAEC)를 실시하였다.
- [0080] TLC 분석은 110 °C에서 30 분 동안 활성화한 후에 Whatman K5F 실리카 젤 플레이트(Whatman, Kent, UK)를 가지고 실시하였다. 반응혼합물을 플레이트에 2 μ l씩 로딩한 다음 DGAS를 위해 이소프로필 알코올-에틸 아세테이트-물(3:1:1, v/v/v), BvMTS 및 BvMTH를 위해 프로필 알코올-아세톤-아세트산(2:2:1, v/v/v) 전개액에 전개시켰다. 상승전개는 실온에서 1회 반복하였다. 상기 플레이트를 후드에서 건조시킨 후 0.3 % (w/v) N - (1 - 나프틸) - 에틸렌디아민 및 5 % (v/v) H₂SO₄가 포함된 메탄올에 빠르게 적셔서 전개하였다. 상기 플레이트를 건조하여 반응 점들을 시각화하기 위해 110°C에서 10 분 동안 오븐에 넣어 두었다.
- [0081] HPAEC 분석은 시료를 ED50 전기화학 검출기가 장착된 Dionex HPAEC 모델 DX-600 시스템(Dionex Co.)에 연결된 CarboPac MA1 컬럼(0.4 × 25 cm; Dionex Co., Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 상기 HPAEC 분석에 의한 다양한 반응생성물의 분리는 60분 이상 등용매 완충액 A(614 mM NaOH)으로 실시하였으며 유속은 0.4 ml/min로 유지하였다.
- [0082] 아세톤 및 2-프로판올에 의한 상기 응집은 반응 후에 비슷한 양의 트레할로스(24 시간 동안 각각 6.8 및 6.6 mM)를 생산하였지만, DME에 의해 만들어진 교차-결합된 효소들은 약 32 % 미만의 트레할로스를 생산(24 시간 동안 4.63 mM) 하였다. 또한 2-프로판올로 얻어진 효소 응집은 냉장고에 저장하여 끈끈해져 실험에 거의 사용할 수 없었다.
- [0083] 2-프로판올에 의해 침전된 상기 효소 응집과 달리, 트레할로스는 아세톤에 의해 만들어진 효소 응집에 의해 반응 24 시간 이후에도 계속해서 합성되었다. 게다가 HPAEC 분석을 통하여 아세톤에 의해 만들어진 효소 응집에 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스 이성질체 및 중간물질과 같은 비교적 작은 양의 반응 부산물이 존재함을 확인하였다.
- [0084] 각 유기용매는 효소 침전에 서로 다른 영향을 미쳤으며, 아세톤은 본 발명에서 가장 좋은 침전제로 확인되었다. 더욱이, 침전제의 종류는 효소 응집의 형태, 안정성 및 활성에 영향을 미치는데, 본 실험에서는 세 가지 서로 다른 효소(DGAS, BvMTS, 및 BvMTH)가 동시에 아세톤에 의해 침전됨으로써, 아세톤이 한 용기에서, 여러 단계의 효소 작용에 사용되는 멀티-효소에 해당하는 combi-CLEAs의 제조에 적용할 수 있는 적합한 침전제임을 확인할 수 있었다.
- [0085] **실시예 4: CLEAs 형성에 효소비율의 효과**
- [0086] BvMTS 및 BvMTH는 말토올리고사카라이드(maltoooligosaccharides)를 트레할로스로 전환하는데 관여하는 효소이다. BvMTS는 말토올리고사카라이드(maltoooligosaccharides)와 반응하여 말단 글루코오스의 내분자 트랜스글루코실레이션(transglucosylation)에 의해 말토올리고실 트레할로제(maltoooligosyl trehalose)를 형성한다. 중간물질의 트레할로스 부분은 BvMTH에 의해 절단되어 트레할로스 및 짧은 말토올리고사카라이드를 제공하기 위해 제공한다(Kim et al., 2000). 서로 다른 양의 BvMTS 및 BvMTH를 실험에 사용하여 말토펜토오스를 기질로 하여 정제된 효소로 트레할로스를 생산하기 위하여 최적 비율을 확인하였다. 14:1로부터 1:14까지의 BvMTS:BvMTH 비율에서 생산된 트레할로스의 양은 서로 상당히 유사하게 나타났다. 따라서, 추후실험에는 같은 양의 BvMTS 및 BvMTH를 사용하였다.
- [0087] DGAS는 트레할로스를 형성하기 위하여 BvMTS 및 BvMTH의 기질로 사용되는 말토올리고사카라이드 생성에 관여한다.
- [0088] DGAS 및 [BvMTS 및 BvMTH] 사이의 비율은 combi-CLEAs를 이용한 트레할로스의 효율적 생성에 대단히 중요하다.
- [0089] 따라서, DGAS:[BvMTS 및 BvMTH] 비율을 0.25:1에서 8:1까지로 설정하여 트레할로스 생성량을 측정하였다. 그 결과 DGAS의 증가는 트레할로스의 높은 합성을 야기함을 확인하였다(도 3).
- [0090] 구체적으로, DGAS:[BvMTS 및 BvMTH] 비율이 8:1일 때, 24 시간 동안 반응에서 6.62 ± 0.13 mM 트레할로스가 생성되었고 1:1의 비율에서는 0.5 ± 0.04 mM 트레할로스가 생성되었다. 상기 언급된 비율보다 높은 DGAS 비율은 트레할로스의 생성량을 증가시키진 않았지만, 8:1의 비율에서 생성된 트레할로스량과 비교적 유사하게 관찰되었다. 상기 실험결과를 토대로, DGAS:[BvMTS 및 BvMTH]의 비율 8:1 을 combi-CLEAs 제조에 적용하였다.

[0091] 실시예 5: 단백질 공급원으로서 BSA 효과

[0092] 상기 유기용매로 침전된 효소들에 글루타르알데하이드를 첨가하여 효소들을 가교결합시켰다. 다만 몇몇 효소들은 응집하기 위해 필요한 고농도의 글루타르알데하이드에 약한 것으로 알려져 있다(Mateo et al., 2004). 이로 인한 효소의 낮은 활성은 CLEAs 형성에 효율성을 떨어뜨린다. 이에 글루타르알데하이드가 효소 활성 부위 또는 그 인근의 아미노산과 반응하는 것을 방지하여 효소들의 과도한 교차-결합을 막아 줄 수 있는 불완전 단백질(이하 단백질 공급원이라 명함)이 필요하다.

[0093] 본 발명자는 DGAS가 글루타르알데하이드 처리에 민감한 반면 BvMTS 및 BvMTH 보다 안정적임을 확인하였다. 1.5 unit의 DGAS는 상당히 많은 양의 불용성 α -글루칸 및 말토올리고사카라이드를 일반적으로 생성하는 것으로 알려져 있으나, 단백질 공급원을 첨가하지 않고 제조된 0.2 mg의 교차-결합된 DGAS(ca 1.5 units)를 100 mM의 수크로오스와 표준 반응 조건에서 반응시켰을 때, α -글루칸 합성은 일어나지 않았다.

[0094] 그러나, 0.2 mg 또는 1.5 unit의 DGAS 교차-결합 과정에서 DGAS와 동일한 양의 BSA(0.2 mg)를 첨가하면 DGAS 응집 및 100 mM 수크로오스와 반응에서 α -글루칸의 양이 두드러지게 생성됨을 확인하였다.

[0095] 상기 실험결과는 BSA가 DGAS에 단백질 공급원으로 잘 작동한다는 것을 의미한다. DGAS에 대해 2배 이상의 BSA를 첨가(2, 3, 4, 및 5 배)하더라도, 생성되는 α -글루칸의 양적 변화는 일어나지 않았다. DGAS와는 달리, BvMTS 및 BvMTH는 BSA에 의해 영향을 받지 않았다. BSA의 첨가 없이 10 mM 글루타르알데하이드에 의해 생성된 0.5 mg BvMTS 및 BvMTH(각 0.25 mg)의 응집은 반응 혼합물에서 트레할로스 및 다른 부산물을 생산함(말토올리고사카라이드)으로써 상당한 양의 효소 활성을 나타내었다. 또한, DGAS에 대해 5 배의 BSA 첨가는 BvMTS 및 BvMTH 응집에 의한 트레할로스 생성을 막지 못하였다. 이와 같은 결과는 combi-CLEAs 과정에서 단백질 공급원으로서 BSA의 활용성을 나타낸 것이다.

[0096] DGAS, BvMTS 및 BvMTH를 이용한 combi-CLEAs에 BSA의 단백질 공급원 효과를 확인하기 위하여, DGAS:(BvMTS and BvMTH)가 8:1에 해당하는 4 mg DGAS, 0.25 mg BvMTS 및 0.25 mg BvMTH를 함유한 3.6 ml 효소 용액으로부터 효소응집을 제조하였다. 10 mM 글루타르알데하이드가 교차-결합 물질로 이용된 반면, BSA 농도는 0 mg에서 22.5 mg까지 변화시켰다. 즉, BSA 함량은 사용된 전체 효소의 0 내지 5배에 해당하였다.

[0097] 첨가된 효소의 총량에 비해 2배 많은 BSA를 첨가한 경우 트레할로스의 생산력이 가장 높았다. 또한 최적함량보다 적은 BSA 첨가는 트레할로스의 생산에 비효과적임을 확인하였다(도 4). 세척 용액에서 유의적인 양의 효소 활성이 관찰되었는데 이는 일반적으로 BSA에 의해 이루어지는 안정적인 응집을 이루기 위한 자유 아미노 잔기의 부족으로 세척 단계에서 효소가 유출됨을 암시한다(Cabana et al., 2007). BSA의 농도가 높은 경우에, 효소 활성 위치의 어떤 부분이 BSA 및 효소 사이의 과도한 교차-결합에 의해 입체적으로 저해됨을 확인하였다.

[0098] 이상의 설명으로부터 전체 효소 함량보다 2 배 많은 BSA량을 첨가하는 것이 본 발명의 combi-CLEAs 형성에 단백질 공급원으로서 BSA의 최적농도임을 알 수 있었다.

[0099] 또한 BSA의 첨가 없이 제조된 combi-CLEAs는 약 1 mM 트레할로스를 생산할 수 있음을 확인하였다. 이러한 실험 결과를 통하여 DGAS 자체는 10 mM 글루타르알데하이드의 존재 하에서 그 활성을 상실할지라도, combi-CLEAs는 그 효소 활성을 유지하고 있다는 것을 확인하였다. 본 발명에서는 combi-CLEAs를 형성하기 위해 DGAS가 첨가된 BvMTS 및 BvMTH가 BSA와 유사하게 단백질 공급원으로 작용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0100] 실시예 6: combi-CLEAs를 이용한 트레할로스 생산에 글루타르알데하이드의 영향

[0101] combi-CLEAs를 이용한 트레할로스 생산을 최대화 하기 위한 최적의 글루타르알데하이드의 농도를 알아보고자, 여러 농도 범위의 글루타르알데하이드(1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 및 100 mM)를 사용하였다.

[0102] combi-CLEAs를 제조하기 위하여 상기 다른 농도의 글루타르알데하이드 용액을 유기용매로 침전된 효소 용액에 첨가하였다. 혼합물은 4 °C에서 4 시간 동안 250 rpm으로 일정하게 흔들며 주었다. 침전된 펠렛들은 10,000 ×g에서 5 분 동안 원심분리하여 취득하였다. 반응하지 않은 글루타르알데하이드는 펠렛을 50 mM의 소듐 포스페이트 완충액(pH 7)으로 세척하여 제거하였으며 제조된 combi-CLEAs는 4°C에 동일한 완충액을 사용하여 저장하였다.

[0103] 각 글루타르알데하이드의 농도에서 효소응집체의 교차결합 형성 정도를 확인한 결과, 5 mM 이하의 글루타르알데하이드에서, 효소의 교차-결합은 형성되지 않았고 응집은 세척단계에서 풀어졌다. 글루타르알데하이드의 첨가는

효소 분자들의 교차-결합으로 인하여 구조적 안정성을 증가시켰다.

- [0104] 따라서, 본 발명의 combi-CLEAs 제조에 5 mM 이상의 글루타르알데하이드가 필요함을 알 수 있었다.
- [0105] 또한, 효소 응집을 위하여 더 많은 양의 글루타르알데하이드를 첨가하면, 트레할로스 생산량이 더 적어짐을 확인하였다. 이러한 결과는 글루타르알데하이드가 효소활성 위치에 있는 미세환경에서 아미노산 측쇄와 상호작용할 수 있고 이것이 효소활성을 잃도록 할 수 있음을 암시하는 것이다(Betancor et al., 2006; Lopez-Gallego et al., 2005; Migneault et al., 2004). 세 가지 효소(DGAS, BvMTS, 및 BvMTH)의 개별적인 글루타르알데하이드 응집 실험을 통하여 DGAS가 글루타르알데하이드에 가장 민감하고 생성물의 형태를 잃는데 책임이 있음을 확인하였다.
- [0106] 이상의 결과로부터 본 발명에서는 combi-CLEAs를 이용한 트레할로스의 최대 생산을 위하여 글루타르알데하이드의 최적 농도는 10 mM임을 확인하였다.
- [0107] 또한 글루타르알데하이드에 의한 combi-CLEAs의 생성을 주사전자현미경(SEM) 이미지를 통하여 확인하였다(도 5).
- [0108] 주사전자현미경(SEM)의 이미지를 관찰하기 위하여 시료를 무수 아세톤으로 건조시킨 다음 현미경 슬라이드 위의 탄소 테이프 위에 올려놓고 진공상태에서 금으로 코팅하였다. 입자의 크기는 20 μm unit의 스케일 바를 가진 마이크로그래프로 측정하였고(배율 5,000 $\times$) 이미지 스캐닝은 Tabletop Microscope TM 3000(Hitachi, Tokyo, Japan)으로 실시하였다.
- [0109] 서로 다른 농도의 글루타르알데하이드에서 combi-CLEAs의 생성을 상기 주사전자현미경 이미지를 통하여 비교한 결과 combi-CLEAs의 표면에 상당한 차이가 있음을 확인하였다(도 5).
- [0110] 10 mM 글루타르알데하이드를 처리한 경우, combi-CLEAs의 표면은 효소 기질(수크로오스 및 말토올리고사카라이드)이 이동하기에 용이할 것 같은 비교적 많은 수의 구멍을 나타내었다. 글루타르알데하이드 농도가 증가함에 따라, combi-CLEAs의 표면(10 mM glutaraldehyde)에 나타난 작은 구멍은 사라지고 표면은 다소 끈끈한 외형으로 변하는 것을 확인하였다(도 5). 효소 입자의 크기는 CLEAs의 내부 효소들과 접촉하는 기질의 대량 이동에 영향을 줄 수 있다.
- [0111] 고정된 효소의 입자 크기가 너무 크면, CLEAs의 내부 효소는 기질과의 복합체를 형성할 기회를 잃게 되고, 이러한 이유로, 상기 효소는 그 활성을 소모하게 된다(Schoevaart et al., 2004; Yu et al., 13 2006). 상기 실험 결과 10 mM 글루타르알데하이드로 만들어진 combi-CLEAs의 입자 모양이 효소-기질 상호작용을 위해 적합한 것으로 확인하였다.

[0112] 실시예 7: CLEAs의 회복 및 안정성

- [0113] 본 발명의 CLEAs의 주요 장점은 반응 배지로부터 간단히 분리할 수 있다는 점이다. 이는 효소의 완전한 회복을 유도하고 비용 측면에서 효율적으로 산업에 사용할 수도 있다. 효소들 각각을 사용한 경우와는 다르게 결합된 CLEAs는 여과 또는 원심분리에 의해 재사용이 가능하다.
- [0114] combi-CLEAs에서 트레할로스를 생산하는 효소(DGAS, BvMTS 및 BvMTH)의 재사용성을 측정하기 위해, CLEAs를 10,000 $\times\text{g}$ 에서 원심분리하여 수집하였다. 상기 수집된 CLEAs는 소듐 포스페이트 완충액(sodium phosphate buffer, pH 7)으로 두 번 세척하고 효소 활성을 측정하기 위해 신선한 반응 혼합물에 다시 재현탁하였다. 잔효성은 첫 번째 주기의 원래 효소 활성과 비교함으로써 측정하였다.
- [0115] 세 가지 효소(DGAS, BvMTS, 및 BvMTH)로 만들어진 combi-CLEAs의 8주기까지 재사용성을 실험하였다(도 6). 각 주기 후에, combi-CLEAs는 원심분리(10,000 $\times\text{g}$, 10 분)하여 반응 혼합물에서 분리하였다. 분리된 combi-CLEAs는 다음 주기에서 세척하여 재반응시켰다.
- [0116] 도 6에 나타난 바와 같이, combi-CLEAs 활성은 5 주기까지 잘 유지되었고 6주기, 7주기 및 8 주기에서 각각 약 87 %, 61 % 및 41 %로 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 40 mM 글루타르알데하이드로 만들어진 combi-CLEAs에서 얻어진 결과물에서도 유사하였다.

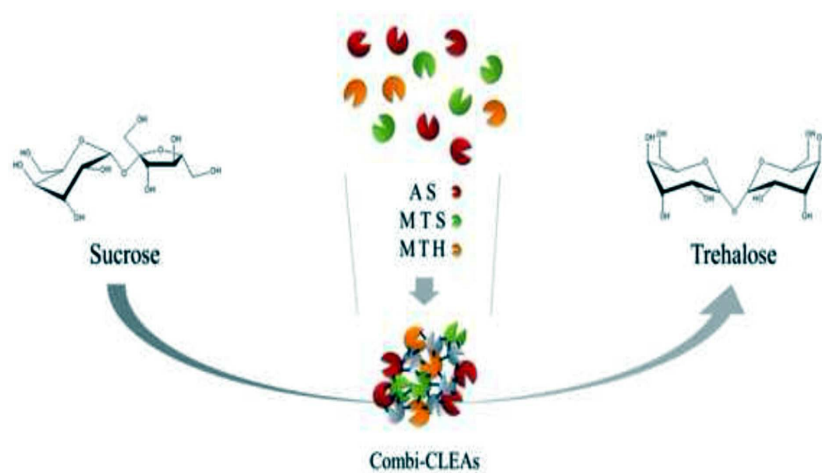
[0117] **실시예 8: 기질 의존성**

[0118] 초기 기질 농도가 생산성에 미치는 효과를 측정하기 위하여 단독 기질로서 50 mM 내지 400 mM 범위의 수크로오스를 이용하여 측정하였다. 수크로오스 농도가 높아질 때 트리할로스 순생산량이 증가할지라도, 전환수율은 100 mM 이상의 수크로오스 농도에서 7.8 % 내지 8 %로 비교적 일정하게 유지함을 확인하였다(도 7).

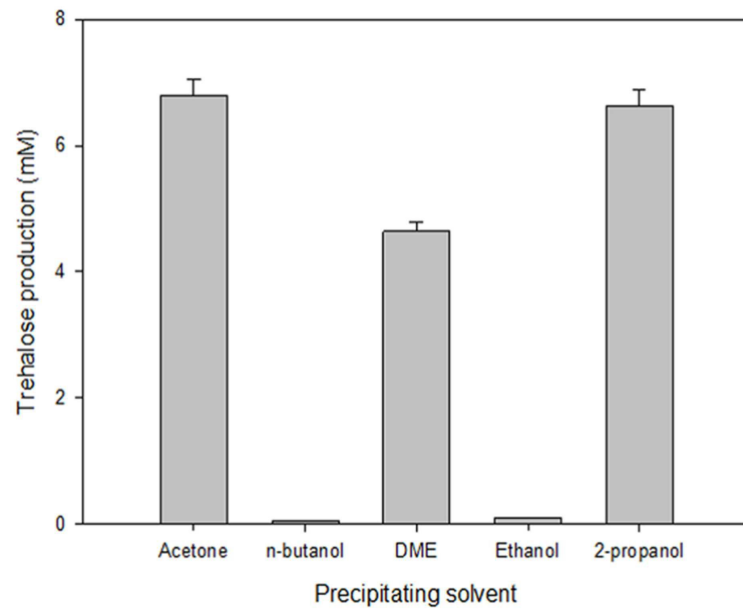
[0119] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

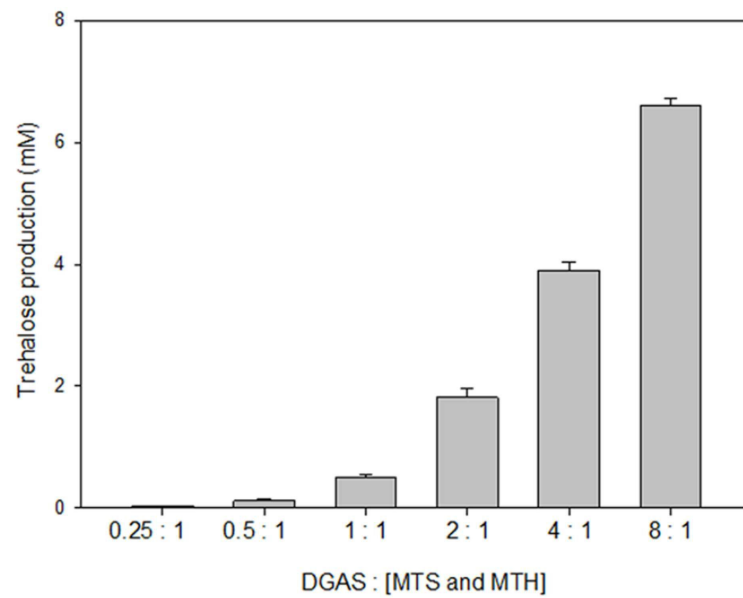
도면1



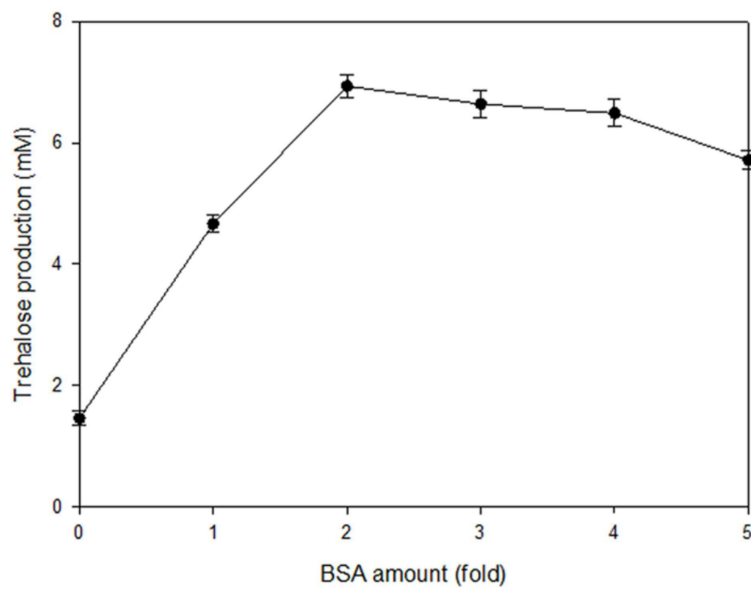
도면2



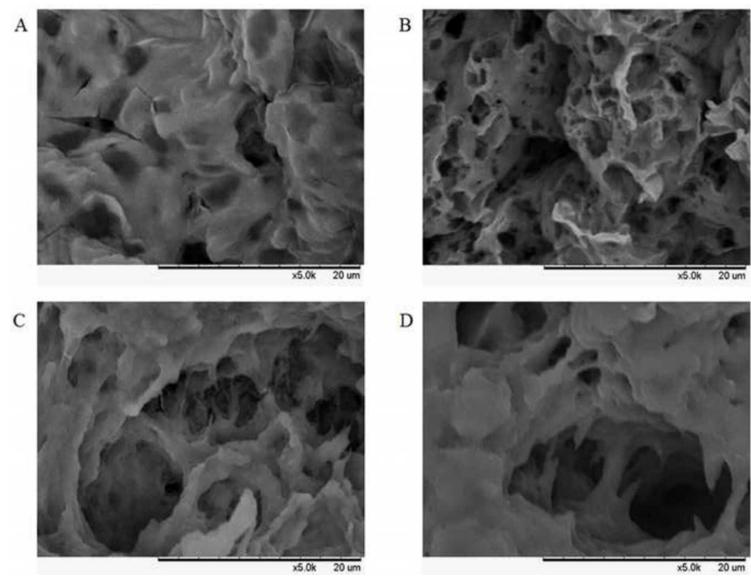
도면3



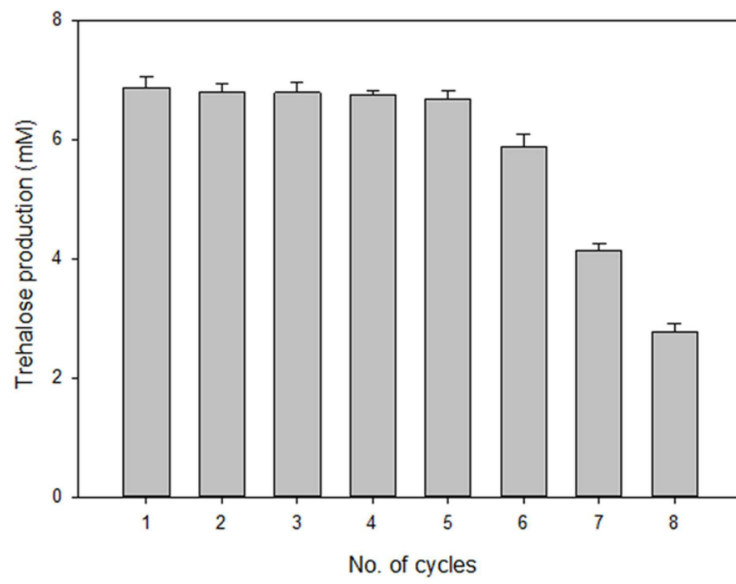
도면4



도면5



도면6



도면7

