

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 9월 1일 (01.09.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/105820 A2

(51) 국제특허분류:

C12M 1/40 (2006.01) G01N 33/538 (2006.01)
C12N 11/08 (2006.01) G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/60 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/001280

(22) 국제출원일: 2011년 2월 24일 (24.02.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2010-0018252 2010년 2월 26일 (26.02.2010) KR
10-2011-0015786 2011년 2월 23일 (23.02.2011) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 서울특별시 성북구 안암동 5가 1, 136-701 Seoul (KR).

(72) 발명자: 겸

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김중배 (KIM, Jung-bae) [KR/KR]; 서울특별시 강남구 역삼 2동 래미안펜타빌아파트 101동 1501호, 135-082 Seoul (KR). 이상원 (LEE, Sang Won) [KR/KR]; 서울특별시 성북구 안암동 래미안아파트 106동 503호, 136-071 Seoul (KR). 전승현 (JUN, Seung-Hyun) [KR/KR]; 서울특별시 송파구 가락 2동 186번지, 138-162 Seoul (KR). 장문석 (JANG, Mun-Seock) [KR/KR]; 서울특별시 송파구 석촌동 171-15 201호, 138-190 Seoul (KR). 김병찬 (KIM, Byoung Chan) [KR/KR]; 서울특별시 관악구 청림동 1717 관악푸르지오아파트 104동 2201호, 151-764 Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 서울특별시 중구 신당 2동 353-18 두지빌딩 4층, 100-828 Seoul (KR).

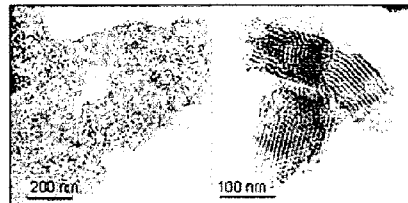
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,

[다음 쪽 계속]

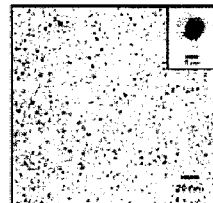
(54) Title: ENZYME COLUMN AND METHOD FOR MANUFACTURING SAME

(54) 발명의 명칭 : 효소컬럼 및 그 제조방법

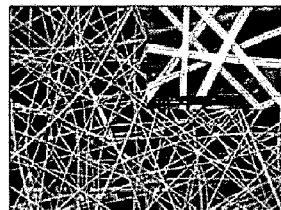
【도 1】



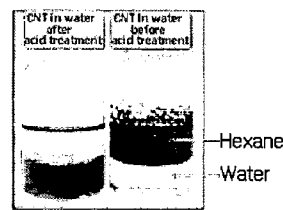
Nanoporous Materials



Magnetic Nanoparticles



Electrospun Nanofibers



Carbon Nanotubes

(57) Abstract: The present invention relates to an enzyme column and to a method for manufacturing same, and more particularly, to an enzyme column in which polymer nanofibres, which can maximize the hydrolysis efficiency of a sample flowing in the column, are dispersed in the column by dispersing polymer fibers in the column to increase inter-fiber space between fibers, thereby maximizing the amount of an enzyme to be immobilized on the fiber and stabilizing activity, and to a method for manufacturing same.

(57) 요약서: 본 발명은 효소컬럼 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 고분자 섬유를 컬럼내부에 분산시켜 섬유 간 공간(inter-fiber space)을 증가시키고 이를 통해 섬유에 고정화되는 효소의 양을 극대화하고 활성을 안정화함으로써, 컬럼 내 흐르는 샘플의 가수분해 효율성을 최대화시킬 수 있는 고분자 나노섬유가 컬럼내부에서 분산된 효소컬럼 및 그 제조방법에 관한 것이다.



WO 2011/105820 A2



EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

【명세서】**【발명의 명칭】**

효소컬럼 및 그 제조방법

【기술분야】

<1> 본 발명은 효소컬럼 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 고분자 섬유를 컬럼 내부에서 충분히 분산시켜 섬유 간 공간(inter-fiber space)을 증가시키고, 이를 통해 섬유에 고정화되는 효소의 양을 극대화하고 활성을 안정화하며 컬럼 내 흐르는 샘플의 바이패스를 줄임으로써, 효소반응의 효율성을 최대화시킬 수 있는 고분자 섬유가 컬럼 내부에서 잘 분산된 효소컬럼 및 그 제조방법에 관한 것이다.

<2>

【배경기술】

<3> 효소는 생명체의 화학반응을 촉진시키는 나노미터(2 ~ 20nm) 크기의 생촉매(biocatalyst)이다. 효소는 아미노산으로 이루어진 선형 생고분자(linear biopolymer)로서 생명체의 진화에 의하여 한 가지 형태의 구조로 자가조립(self-assembly) 되는데, 이 접힘 과정(folding)에 의해 효소의 유용한 성질인 효소 선택성을 결정짓는 결합주머니(binding pocket)가 형성된다. 이 효소의 선택성은 이미 아주 다양한 분야에서 쓰이고 있고, 새로운 학문의 발전에 따라 그 응용분야가 점점 넓어지고 있다. 예를 들면, 효소는 제약, 정밀화학, 식품 및 세제산업 등에서 널리 사용되고 있으며, 바이오센서, 바이오정화, 바이오화학전환 등에서도 오랜 응용의 역사를 가지고 있다. 근래에는 바이오디젤 생산, 프로테오믹 분석에서의 트립신 가수분해(trypsin digestion), 폴리메라아제 사슬 반응(polymerase chain reaction), 바이오 연료전지 등에서 효소의 새로운 응용이 확산되고 있는 실정이다.

<4> 한편, 1990년대 이후, 나노 테크놀로지가 급속히 발전함에 따라 높은 표면적비를 가진 다양한 나노 구조 물질, 예를 들어, 고분자 나노섬유(polymer nanofibers), 나노세공성 물질(nanoporous materials), 자성 나노입자(magnetic nanoparticles) 등이 개발되었다(도 1 참조). 이러한 나노 구조 물질의 다양한 장점 중 하나는 나노미터 크기를 컨트롤할 수 있다는 것이다. 예를 들어, 나노세공성 물질에서의 공극의 크기, 나노섬유나 나노튜브의 두께 조절, 나노입자의 입자 크기 등을 균일하게 조절할 수 있다. 이러한 균일한 크기의 나노 물질과 이와 비슷한 크기의 효소 입자들은 나노 물질의 다른 장점인 전도성 및 자성 등의 성질과 결합되

어 나노 바이오 촉매 시스템에서의 효소의 특성, 특히 효소의 활성이나 안정성을 향상시킬 수 있다.

<5> 상술한 바와 같이, 효소는 매우 다양한 산업 분야에서 응용될 수 있는데, 이러한 효소는 상대적으로 비싼 촉매이므로 고정화된 효소를 통한 효소의 재사용과 회수는 경제적으로 중요한 역할을 한다. 또한, 고정화된 효소의 사용은 반응기의 설계나 컨트롤을 매우 간편하게 할 수 있도록 한다. 따라서, 고정화 방법은 산업적인 생촉매로서의 효소의 사용에서 필수적인 요소라 할 수 있다. 나노 구조 물질을 이용한 일반적인 효소 고정화 방법으로는 단순 흡착(adsorption)이나 공유결합을 이용한 효소 부착(covalent attachment)의 방법이 사용되고 있다. 나노 구조 물질들이 제공하는 높은 표면적은 효소의 담지량을 높여주고, 더불어 단위 무게당 효소 활성을 높여주는 효과를 나타낼 수 있다. 하지만, 그 효소 안정성에 있어서는 아직 많은 문제점들을 가지고 있다.

<6> 한편, 고분자 섬유의 표면에 고정화된 효소를 포함하는 효소컬럼은 단백질 가수분해 공정 뿐 아니라 DL-아미노산 광분해를 통한 L-아미노산 생산, 포도당의 과당 변환을 통한 이성화당 생산, 세파로스포린 C의 유기산 제거를 통한 7-아미노 세파로스포린산 생산, L-알라닌, 아크릴로니트릴의 가수분해를 통한 아크릴아미드, 과당을 이용한 팔라티노즈 및 프룩토올리고당 생산, 식물유를 이용한 카카오버터 및 지방산 생산, DL-아스파라긴산의 광분해를 통한 D-아스파라긴산 생산, 액화전분을 이용한 말토올리고당 생산, 아미노산을 이용한 아스파탐 생산, RS-이부프로펜 광분해를 통한 R-이부프로펜 생산, 기름을 이용한 바이오디젤 생산 등의 생산의 용도로 사용되고 있다.

<7> 그러나, 종래의 고분자 섬유에 고정화된 효소를 포함하는 효소컬럼은 컬럼 내부에 팩킹된 고분자 섬유가 컬럼을 가득 채우지 못하고, 반응물을 컬럼 내부로 흘러 주었을 때 바이패스(bypass) 현상이 나타나게 된다. 이로 인해, 반응물이 효소와 만날 수 있는 기회가 줄어들어 효소 반응의 효율이 급격하게 떨어지는 문제가 있었다.

<8>

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

<9> 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 첫번째 해결하려는 과제는, 컬럼 내 고분자 섬유를 분산시켜 이를 통해 바이패스 현상을 차단하여 컬럼 내부를 관류하는 샘플의 반응효율성을 최대화시킬 수 있는 효소 컬

럼의 제조방법을 제공하는 것이다.

<10> 본 발명의 두번째 해결하려는 과제는 상기 제조방법을 통해 제조된 효소컬럼을 제공하는 것이다.

<11>

【기술적 해결방법】

<12> 상술한 첫번째 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일실시예에 따른 효소컬럼의 제조방법은, 1) 컬럼 내에 고분자 섬유를 팩킹(packing)하는 단계; 2) 상기 컬럼 내에 팩킹된 고분자 섬유를 알코올 용액으로 처리하여 상기 고분자 섬유를 컬럼내부에 분산시켜 섬유 간 공간(inter-fiber space)을 증가시키는 단계; 3) 상기 컬럼 내에 처리된 알코올 용액을 제거하는 단계; 및 4) 상기 컬럼 내에 팩킹된 고분자 섬유에 효소를 첨가하여 상기 고분자 섬유의 표면에 효소를 고정화하는 단계;를 포함한다.

<13> 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 고분자 섬유는 고분자 나노섬유 또는 고분자 마이크론 섬유이며 3차원 네트워크 구조를 가질 수 있다.

<14> 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 고분자 섬유는 상기 고분자 섬유는 폴리비닐알콜, 폴리아크릴로니트릴, 나일론, 폴리에스테르, 폴리우레탄, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 셀룰로오스, 키토산, 폴리락틱산, 폴리락틱-co-글리콜산, 폴리글리콜산 폴리카프로락톤, 콜라겐, 폴리아닐린 및 폴리(스티렌-co-무수말레산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

<15> 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 알코올 용액은 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있으며, 상기 알코올 용액의 농도는 15 ~ 100%(v/v)일 수 있다.

<16> 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 3) 단계는 건조단계를 포함하지 않으면서 컬럼 내부를 수세하는 것을 통해 수행될 수 있다.

<17> 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 4) 단계에서 고분자 섬유의 표면에 효소를 고정화시키기 위하여 컬럼 내부에 가교결합제를 첨가할 수 있다.

<18> 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 가교결합제는 디이소시아네이트, 디안하이드라이드, 디에폭사이드, 디알데히드, 디이미드, 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필카보디이미드 및 글루타르알데히드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

<19> 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 효소는 트립신, 키모

트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신 등의 프로테아제, 리파아제, 페록시다아제 (호스래디시 퍼록시데이즈, 소이빈 퍼옥시데이즈, 클로로 퍼옥시데이즈, 망간 퍼옥시데이즈), 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

<20> 상술한 두번째 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일실시예에 따른 효소컬럼은 컬럼; 및 상기 컬럼의 내부에 팩킹되되, 알코올 용액으로 처리되어 컬럼 내 분산되고 섬유간 공간(inter-fiber space)이 증가된 고분자 섬유를 포함한다.

<21> 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 고분자 섬유는 고분자 나노섬유 또는 고분자 마이크론 섬유이며 3차원 네트워크 구조를 가질 수 있다.

<22> 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 고분자 섬유는 폴리비닐알콜, 폴리아크릴로니트릴, 나일론, 폴리에스테르, 폴리우레탄, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 셀룰로오스, 키토산, 폴리락틱산, 폴리락틱-co-글리콜산, 폴리글리콜산, 폴리카프로락톤, 콜라겐, 폴리아닐린 및 폴리(스티렌-co-무수말레산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

<23> 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 고분자 섬유의 표면에 효소가 고정될 수 있으며, 이 경우 상기 효소는 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신 등의 프로테아제, 리파아제, 페록시다아제 (호스래디시 퍼록시데이즈, 소이빈 퍼옥시데이즈, 클로로 퍼옥시데이즈, 망간 퍼옥시데이즈), 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 포도당 이성화 효소 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

<24> 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 효소컬럼은 단백질의 가수분해 공정 및 DL-아미노산 광분할을 통한 L-아미노산 생산, 포도당의 과당 변환을 통한 이성화당 생산, 세파로스포린 C의 유기산 제거를 통한 7-아미노세파로스포린산 생산, L-알라닌, 아크릴로니트릴의 가수분해를 통한 아크릴아미드, 과당을 이용한 팔라티노스 및 프룩토올리고당 생산, 식물유를 이용한 카카오버터 및 지방산 생산, DL-아스파라긴산의 광분할을 통한 D-아스파라긴산 생산, 액화전분을 이용한 말토올리고당 생산, 아미노산을 이용한 아스파탐 생산, RS-이부프로펜 광분할을 통한 R-이부프로펜 생산, 기름을 이용한 바이오디젤 생산 등의 생산에 이용될 수 있다.

<25>

【유리한 효과】

<26>

본 발명의 효소 컬럼은 컬럼 내 효소가 고정된 고분자 섬유가 분산되므로 고분자 섬유간 공간을 극대화시켜 단백질 등의 샘플이 컬럼을 통과할 때 바이패스를 예방해주며, 동시에 트립신과 같은 효소의 적재량과 활성을 극대화함으로써 가수분해 효율성을 극대화할 수 있다. 또한, 효소컬럼에 비하여 반응시간을 획기적으로 저감할 수 있다.

<27>

나아가, 종래의 액상 가수분해(in-solution digestion) 방법 또는 상용화되고 있는 효소비드나 키트 등에 비하여, 재사용이 손쉬워지고 트립신 가수분해 공정에서의 실시간(on-line) 가수분해 공정이나 자동화 공정을 가능하게 해 줄 수 있다. 또한 트립신 뿐 아니라 산업적으로 응용될 수 있는 다양한 효소에도 적용이 가능하므로 효소를 이용한 산업적 생산에서 요구되는 효소 활성 및 안정성을 확보할 수 있다.

<28>

【도면의 간단한 설명】

<29>

도 1은 종래의 나노 물질의 구조를 나타낸 것이다.

<30>

도 2는 통상의 단백질 가수분해를 개략적으로 나타낸 것이다.

<31>

도 3은 전기방사방법을 이용한 PS + PSMA 나노 섬유의 생산공정을 개략적으로 나타낸 것이다.

<32>

도 4는 고분자 섬유를 이용한 효소 고정화를 개략적으로 나타낸 것이다.

<33>

도 5는 (a) 알코올 처리하지 않은 고분자 나노섬유에 효소 코팅방법을 이용한 컬럼(EC-TR/NF-column), 및 (b) 알코올 처리한 고분자 나노섬유에 효소 코팅방법을 이용한 컬럼(EC-TR/EtOH-NF-column)을 나타낸 그래프이다.

<34>

도 6은 본 발명의 일구체예로서 0 ~ 59일 동안 CA-TR/NF를 통한 LC-MS/MS를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

<35>

도 7은 본 발명의 일구체예로서 0 ~ 59일 동안 CA-TR/EtOH-NF를 이용하여 LC-MS/MS를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

<36>

도 8은 본 발명의 일구체예로서 0 ~ 59일 동안 EC-TR/NF를 이용하여 LC-MS/MS를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

<37>

도 9는 본 발명의 일구체예로서 0 ~ 59일 동안 EC-TR/EtOH-NF를 이용하여 LC-MS/MS를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

<38>

도 10은 본 발명의 일구체예로서 59일 후 LC-MS/MS의 결과를 나타낸 그래프

이다.

<39> 도 11은 본 발명의 일구체예로서 (a) 0.1 ml/h, (b) 0.5 ml/h, (c) 1 ml/h, (d) 5 ml/h에서 LC/MS-MS를 나타낸 그래프이다.

<40> 도 12는 본 발명의 일구체예로서 (a) EC-TR/NF 컬럼, 및 (b) EC-TR/EtOH-NF 컬럼에서 LC/MS-MS를 나타낸 그래프이다.

<41> 도 13은 열적안정성을 확인하기 위해 EC-TR/EtOH-NF, 상용화 트립신 비드, 자유효소를 50°C의 고온조건에서 교반한 후, 단백질 가수분해 능력을 비교한 그래프이다.

<42> 도 14는 알콜의 농도에 따른 나노섬유의 분산정도를 측정한 사진이다.

<43>

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

<44> 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

<45> 상술한 바와 같이, 종래의 고분자 섬유에 고정화된 효소를 포함하는 효소컬럼은 컬럼내부에 팩킹된 고분자 섬유가 컬럼을 가득 채우지 못하고, 반응물을 컬럼 내부로 흘러 주었을 때 유압에 의해 고분자 섬유가 압축되어 컬럼 내 빈 공간(고분자 섬유로 충전되지 않은 공간)이 발생할 뿐 아니라, 고분자 섬유가 압축되므로 섬유와 섬유간에 섬유간 공간(inter-fiber space)가 감소하게 되어 결국 바이패스(bypass) 현상이 나타나게 된다. 이로 인해, 반응물이 컬럼을 통과하는 동안 나노섬유에 고정화된 효소와 접촉하지 못해 반응하지 못하고 빠져나가게 되어 가수분해 효율이 급격하게 떨어지는 문제가 있었다.

<46> 이에, 본 발명의 일구현예에 따른 효소컬럼의 제조방법은, 1) 컬럼 내에 고분자 섬유를 팩킹(packing)하는 단계; 2) 상기 컬럼 내에 팩킹된 고분자 섬유를 알코올 용액으로 처리하여 상기 고분자 섬유를 컬럼내부에 분산시켜 섬유 간 공간(inter-fiber space)을 증가시키는 단계; 3) 상기 컬럼 내에 처리된 알코올 용액을 제거하는 단계; 및 4) 상기 컬럼 내에 팩킹된 고분자 섬유에 효소를 첨가하여 상기 고분자 섬유의 표면에 효소를 고정화하는 단계;를 포함하여 상술한 문제의 해결을 모색하였다.

<47> 이를 통해 효소 컬럼은 컬럼 내 효소가 고정된 고분자 섬유가 분산되므로 고분자 섬유간 공간을 극대화시켜 단백질 등의 샘플이 컬럼을 통과할 때 바이패스를 예방해주며, 동시에 트립신과 같은 효소의 적재량과 활성을 극대화함으로써 가수분해 효율성을 극대화할 수 있다. 또한, 기존의 단백질을 가수분해하는 방법에 비하여 가수분해 시간을 획기적으로 저감할 수 있다.

<48>

먼저, 1) 단계로서 컬럼 내에 고분자 섬유를 팩킹(packing)하는 단계를 수행한다. 본 발명에 일구현예에 따르면, 사용가능한 컬럼은 목적 및 용도에 따라 적절한 직경, 형상 및 재질을 가질 수 있으며, 바람직하게는 목적에 따라 원통형의 50 nm ~ 1m의 다양한 직경을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 컬럼의 길이 역시 적절하게 조절하여 사용할 수 있다.

<49>

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 컬럼의 내부에 효소를 고정화시키기 위하여 고분자 섬유가 패킹된다. 이 때, 사용되는 고분자 섬유는 효소컬럼에 사용할 수 있는 것이면, 종류 및 직경의 제한이 없지만, 바람직하게는 마이크로 섬유, 나노섬유를 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 나노섬유를 사용하는 것이 섬유의 비표면적을 넓혀 고정화되는 효소의 양을 극대화하는데 매우 유리하다.

<50>

한편, 상기 고분자 섬유는 섬유와 섬유사이에 섬유간 공간(inter-fiber space)을 포함하는 3차원 네트워크 구조를 가질 수 있으며, 이를 위하여 상기 고분자 섬유는 전기방사 또는 용융방사를 통해 제조될 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 고분자 섬유의 재질로는 폴리비닐알콜, 폴리아크릴로니트릴, 나일론, 폴리에스테르, 폴리우레탄, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 셀룰로오즈, 키토산, 폴리락틱산, 폴리락틱-co-글리콜산, 폴리글리콜산, 폴리카프로락톤, 콜라겐, 폴리아닐린, 폴리(스티렌-co-무수말레산) 및 이들의 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 전기방사 또는 용융방사로 제조된 3차원 네트워크 구조를 가지는 나노섬유를 사용하는 것이 고분자 섬유간 공간을 극대화시켜 단백질 등의 샘플이 컬럼을 통과할 때 바이패스를 예방해주며, 동시에 트립신과 같은 효소의 적재량과 활성을 극대화하는데 대단히 유리하다.

<51>

한편, 상기 고분자 섬유는 컬럼내부에 팩킹되며, 상기 컬럼에 나노섬유를 고정화하는 방법은 통상의 방법에 의하나, 바람직하게는 컬럼의 양단에 상기 고분자 섬유를 고정시키거나, 고분자 섬유를 물리적으로 압착하여 팩킹함으로써 컬럼의 앞쪽에서 고분자 섬유가 유압에 의해 압착되어 빈공간이 생기지 않도록 고정할 수 있다. 또한 컬럼 내부의 유리에 아미노프로필 트리메톡시실란(aminopropyl trimethoxysilane) 등을 이용해 유리의 표면을 개질한 후 나노섬유를 팩킹하게 되면, 나노섬유의 무수 말레산(maleic anhydride)기와 표면 개질된 유리의 아미노기가 화학적 반응을 형성하여 나노섬유가 컬럼 내부에 고정될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며 당업계에 알려진 다양한 방법을 통해 컬럼 내부에 고분자 섬유가 패킹될 수 있음은 당업자에게 자명하다.

<52> 다음, 2) 단계로서 상기 컬럼 내에 팩킹된 고분자 섬유를 알코올 용액으로 처리하여 상기 고분자 섬유를 컬럼내부에 분산시켜 섬유 간 공간(inter-fiber space)을 증가시킨다. 구체적으로 도 4를 참조하면 고분자 섬유가 팩킹된 컬럼의 내부에 알코올 용액을 첨가하면, 고분자 섬유가 컬럼내부에 넓게 분산되어 섬유와 섬유 사이에 공간(inter-fiber space)이 현저하게 증가하게 된다. 그 결과 단백질과 같은 샘플이 컬럼을 통과하는 경우 바이패스(bypass)가 개선되므로 반응시간이 현저하게 줄어들 뿐 아니라, 효소와 결합할 수 있는 고분자 섬유의 표면적이 증대되어 훨씬 많은 양의 효소를 고분자 섬유의 표면에 고정화시킬 수 있게 된다.

<53> 도 5의 (a)는 알콜처리를 하지 않은 컬럼이고, 도 5의 (b)는 알콜처리를 한 컬럼으로서 a 부분은 컬럼의 외벽부분이고 b 부분이 중공부분으로서 고분자 섬유가 위치하고 반응이 수행되는 부분이다. 이 경우 알콜처리를 실시한 효소컬럼(도 5b)은 컬럼의 내부를 가득 채울 정도로 넓게 분산되는 반면에, 알콜처리를 실시하지 않은 효소컬럼(도 5a)은 고분자 섬유가 분산되지 못하고 뭉쳐있어 섬유간 공간이 매우 작은 것을 알 수 있다.

<54> 한편, 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 상기 알콜처리를 통해 컬럼의 내부를 고분자 섬유가 가득채울 정도로 고분자 섬유가 넓게 분산되는 것이 바이패스를 방지하고 효율을 극대화시키는데 매우 유리하다. 구체적으로 분산된 고분자 섬유가 컬럼의 내부를 가득채우지 못하는 경우 컬럼의 내벽과 고분자 섬유 사이에 이격된 공간이 형성되므로 이후 컬럼 내부에 반응물을 흘려주는 경우 일부 반응물은 고분자 섬유에 고정된 효소와 반응하지 않고 상기 이격된 공간으로 흘러나가게 되어 효율이 떨어지게 된다. 또한, 고분자 섬유가 충분히 분산되지 않으면 섬유간 공간이 작아져서 반응효율이 떨어지는 문제가 발생할 수 있다.

<55> 한편, 상기 알콜처리단계는 반드시 컬럼에 고분자 섬유를 패킹한 이후 수행되어야 한다. 만일 고분자 섬유를 알콜처리하고 이후 컬럼내부에 고분자 섬유를 패킹하는 경우 패킹과정에서 분산된 고분자 섬유가 다시 수축되어 섬유간 공간이 작아지는 문제가 발생한다. 특히 도 5b와 같이 반응효율을 극대화시키기 위하여 컬럼 내부의 중공이 작은 것을 사용하는 경우에는 패킹과정에서 고분자 섬유가 컬럼의 내벽과 접촉하여 섬유간 공간이 현저하게 작아지는 문제가 발생할 수 있는 것이다.

<56> 한편 본 발명에 사용될 수 있는 알콜은 고분자 섬유의 섬유간 공간을 증대시킬 수 있는 것이면 종류의 제한이 없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 상기 알코올 용액은 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올 및 부틸알콜로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

<57>

한편, 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면 상기 알코올 용액의 농도는 15 ~ 100%(v/v)인 것이 고분자 섬유의 분산효과를 극대화하는데 매우 유리하다(실시예 6 참조).

<58>

다음, 3) 단계로서 상기 컬럼 내에 처리된 알코올 용액을 제거하는 단계를 수행한다. 만일 상기 2) 단계에서 처리된 알코올을 제거하지 않는 경우 효소의 안정성이 낮아지며 효소에 따라 알코올에 민감한 효소반응에 나쁜 영향을 미쳐 효소가 변성되거나 생성물의 수율이 저해될 수 있고 시간이 지나면서 다시 분산된 고분자 섬유의 섬유간 공간이 줄어들 수 있으므로 반드시 2) 단계에서 처리된 알코올을 제거하는 단계를 수행하여야 한다. 이를 위하여, 통상의 수세를 통한 세척방법, 가열 등의 건조단계를 통한 알코올 증발시키는 방법이 있으나, 건조단계를 수행하는 경우 컬럼내부에 분산된 고분자 섬유가 다시 수축될 가능성이 있으므로 수세를 통하여 알코올을 제거하는 것이 바람직하다.

<59>

다음, 4) 단계로서 상기 컬럼 내에 팩킹된 고분자 섬유에 효소를 첨가하여 상기 고분자 섬유의 표면에 효소를 고정화하는 단계를 수행한다. 본 발명에 적용될 수 있는 효소는 고분자 섬유에 고정화될 수 있는 것이면 종류의 제한없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 상기 효소는 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신) 등의 프로테아제, 리파아제, 펙톡시다아제 (호스래디시 펙톡시데이즈, 소이빈 펙톡시데이즈, 클로로 펙톡시데이즈, 망간 펙톡시데이즈), 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상, 통상적으로 트립신은 효소컬럼의 지표로 사용된다. 즉 트립신이 사용될 수 있는 효소컬럼은 다른 종류의 효소역시 충분하게 사용될 수 있는 것이다. 바람직하게는 이 때 사용될 수 있는 효소는 그 크기가 1nm 이상일 수 있다.

<60>

한편, 고분자 섬유의 표면에 효소를 고정화시키는 방법은 제한이 없으며, 바람직하게는 컬럼 내부에 효소를 첨가하여 고분자 섬유와 효소간의 흡착 및/또는 공유결합을 통해 고분자 섬유의 표면에 효소를 고정화시킬 수 있다. 보다 바람직하게는 가교결합제를 첨가하여 효소간에 가교결합을 형성하여 고분자 섬유의 표면에 효소를 고정화시키는 방법을 통해 효소를 고분자 섬유의 표면에 응집시키고 이를 통해 고정화를 수행할 수 있는데 이를 효소 코팅이라 한다. 이 때 사용될 수 있는 가교결합제는 효소의 활성을 저해하지 않고서 효소 간에 가교결합을 형성할 수 있는 것이면 종류의 제한 없이 사용될 수 있다. 이의 구체적인 예로는 디이소시아네

이트, 디안하이드라이드, 디에폭사이드, 디알데히드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르알데히드, 이들의 혼합물 등을 들 수 있고, 글루타르알데히드가 보다 바람직하나, 이에만 한정되는 것은 아니다.

<61> 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 효소의 아미노기가 붙을 수 있는 고분자 나노섬유(polymer nanofiber)를 전기방사를 통해 제작한 후, 알코올을 이용한 간단한 처리를 해주게 되면 고분자 나노섬유(nanofiber)가 분산되어 표면적 및 섬유 내 공간(inter-fiber space)이 증가한다. 이렇게 분산된 고분자 나노섬유(nanofiber)는 효소가 붙을 수 있는 표면적을 증가시켜 단위 무게의 고분자 나노섬유(nanofiber)당 효소가 붙을 수 있는 양이 증가하게 된다.

<62> 그 뒤, 수세를 통해 첨가된 알코올을 제거한 후, 효소인 트립신 용액을 흘려주고, 글루타르알데히드(glutaraldehyde)와 트립신 혼합액을 컬럼 내로 흘려주어 가교결합 시켜주면, 컬럼 내에서 고분자 나노섬유(nanofiber)에 효소가 코팅된다. 이러한 방법의 장점은 고분자 나노섬유(nanofiber)를 알코올 처리를 통해 분산시키지 않을 경우, 단백질 용액을 컬럼 내 흘려주었을 때, 유압에 의해 고분자 나노섬유(nanofiber)가 압축되어 컬럼 내 빈 공간이 발생하여 단백질 용액이 바이패스되어 가수분해 효율성이 감소한다(도 5의 (a) 참조). 반면에, 고분자 나노섬유(nanofiber)를 알코올 처리를 통해 분산시키게 되면 단백질 용액을 컬럼 내 흘려주었을 때 유압이 발생해도 고분자 나노섬유(nanofiber)가 분산되어 컬럼 내 가득 차 있기 때문에 바이패스를 예방하여 가수분해 효율성을 최대화할 수 있다(도 5의 (b) 참조).

<63> 상술한 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 효소컬럼은 컬럼 및 상기 컬럼의 내부에 팩킹되되, 알코올 용액으로 처리되어 컬럼 내 분산되고 섬유간 공간(inter-fiber space)이 증가된 고분자 섬유를 포함한다. 또한 이렇게 제조된 효소컬럼의 고분자 섬유의 표면에 목적하는 효소를 고정화시킬 수 있다.

<64> 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 상기 알코올처리를 통해 컬럼의 내부를 고분자 섬유가 가득채울 정도로 고분자 섬유가 넓게 분산되는 것이 바이패스를 방지하고 효율을 극대화시키는데 매우 유리하다. 구체적으로 고분자 섬유가 컬럼의 내부를 가득채우지 못하는 경우 컬럼의 내벽과 고분자 섬유 사이에 이격된 공간이 형성되므로 이후 컬럼 내부에 반응물을 흘려주는 경우 일부 반응물은 고분자 섬유에 고정된 효소와 반응하지 않고 상기 이격된 공간으로 흘러나가게 되어 효율이 떨어지게 된다. 또한, 고분자 섬유가 충분히 분산되지 않으면 섬유간 공간이 작아져서 반응효율이 떨어지는 문제가 발생할 수 있다.

<65> 이를 통해 단백질과 같은 샘플이 컬럼을 통과하는 경우 바이패스(bypass)가 개선되므로 반응시간이 현저하게 줄어들 뿐 아니라, 효소와 결합할 수 있는 고분자 섬유의 표면적이 증대되어 훨씬 많은 양의 효소를 고분자 섬유의 표면에 고정화시킬 수 있게 된다. 이를 통해 현저한 활성의 증대를 도모할 수 있게 된다. 나아가, 종래의 알콜처리를 하지 않은 효소컬럼, 액상 가수분해(in-solution digestion) 방법 또는 효소비드에 비하여 활성의 지속력이 현저하게 개선되며, 반응물질과 효소와의 접촉이 긴밀하게 이루어지므로 반응시간이 감소시킬 수 있다.

<66> 본 발명의 효소컬럼은 단백질 가수분해 컬럼의 용도 뿐 아니라 DL-아미노산 광분할을 통한 L-아미노산 생산, 포도당의 과당 변환을 통한 이성화당 생산, 세파로스포린 C의 유기산 제거를 통한 7-아미노세파로스포린산 생산, L-알라닌, 아크릴로니트릴의 가수분해를 통한 아크릴아미드, 과당을 이용한 팔라티노즈 및 프룩토올리고당 생산, 식물유를 이용한 카카오버터 및 지방산 생산, DL-아스파라긴산의 광분할을 통한 D-아스파라긴산 생산, 액화전분을 이용한 말토올리고당 생산, 아미노산을 이용한 아스파탐 생산, RS-이부프로펜 광분할을 통한 R-이부프로펜 생산, 기름을 이용한 바이오디젤 생산 등의 생산으로 폭넓게 활용될 수 있다.

<67> 상기와 같이, 본 발명에 따른 효소 컬럼은 빠른 시간 내에 표적 단백질을 가수분해 시킴으로써 전체 프로테오믹 분석시간을 줄일 수 있을 뿐 아니라, 효소 코팅방법을 사용하여 효소활성이 안정화되어 컬럼의 수명이 크게 증가하므로 프로테오믹 분석 산업에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 효소 컬럼은 단백질 가수분해뿐만 아니라, 생물전환(bioconversion), 바이오정화(bioremediation), 바이오센서(biosensors), 고과당 콘시럽(high fructose corn syrup) 생산, 제약업(pharmaceutical industry), 식품산업(food industry), 화학산업(chemical industry) 등) 등 다양한 효소의 응용에 사용될 수 있다.

<68>

【발명의 실시를 위한 형태】

<69> 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

<70> <실시예 1> 효소컬럼의 제작

<71> 1-1. 재료의 준비

<72> (1) 효소

<73> 효소 고정화를 위한 효소는 돼지 췌장(porcine pancreas)에서 유래된 고순도

의 트립신(trypsin)을 사용하였다. 트립신은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

<74> (2) 고분자 나노섬유 (polymer nanofiber)

<75> 고분자 나노섬유를 만들기 위한 고분자는 PS(molecular weight(MW) = 950,400) 와 폴리(스티렌-co-무수말레산)(Poly(styrene-co-maleic anhydride), PSMA, Mw = 224,000)을 사용하였고, 고분자를 녹이기 위한 유기용매는 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran, THF)과 아세톤(acetone)을 사용하였다. 이들 재료는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

<76> (3) 버퍼(buffer) 및 화학 물질

<77> 버퍼는 인산염 버퍼(phosphate buffer, PB) 10, 100mM, pH 7.9를 사용하였고, 효소 코팅을 사용하기 위해 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 사용하였다. 효소 코팅 후 고분자 나노섬유에 있는 무수말레산(maleic anhydride) 기를 막아주기 위해 트리스 버퍼(Tris buffer) 100mM, pH 7.9를 사용하였다. 효소의 활성 및 물성 측정을 위해 반응기질로 Na-벤조일-L-아르기닌 4-니트로아닐라이드 하이드로클로라이드(Na-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride, L-BAPNA)를 사용하였다. 프로테오믹 분석에서 단백질 가수분해 공정에서 사용되는 모델 단백질은 엔올라아제(enolase)를 사용하였고 이들은 모두 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

<78> 1-2. 사용기기

<79> 고분자 나노섬유를 생산하기 위해서는 고분자 용매를 전기방사 방법을 이용하는데, 이를 위해 고전압 공급장치(high-voltage supply)과 실린지 펌프(syringe pump, PHD-2000 Infusion, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)를 사용하였다.

<80> 효소 촉매 특성을 확인하기 위해 효소 코팅방법을 이용해 고정화된 트립신과 반응기질인 L-BAPNA를 반응시켜 나온 생성물은 분광광도계(spectrophotometer, Shimadzu, UV-2450)를 이용해 측정하였다. 단백질 가수분해를 위해 고정화된 효소를 이용해 모델 단백질을 가수분해시킨 후 나오는 가수분해된 펩타이드는 nanoAQUITY UPLC (Waters)와 7-tesla LTQ-FT(Thermo)를 사용하였다.

<81> 2-1. 트립신 가수분해 컬럼의 제작

<82> (1) 전기방사 방법을 이용한 PS + PSMA 나노섬유의 준비 및 고분자 나노섬유의 알코올 처리

<83> 효소 고정화를 위한 나노섬유는 폴리스티렌(polystyrene, PS)과 폴리(스티렌-co-무수말레산)(Poly(styrene-co-maleic anhydride), PSMA)를 사용하게 되는데,

PSMA의 무수말레산(maleic anhydride)에 효소의 아민(amine) 그룹과 공유결합으로 고정화된다.

<84> 도 3은 전기방사 방법을 이용한 PS + PSMA 나노섬유의 생산에 대해 나타내었다. PS + PSMA 나노섬유의 생산방법은 다음과 같다. 상온에서 PS와 PSMA를 2 : 1 무게 비로 섞은 후 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran, THF)에 녹인 후, 자성 교반기(magnetic stirrer)를 이용해 3시간 정도 섞어주었다. 그 후, 고분자 용액의 점성을 낮춰주기 위해 아세톤(acetone) 용액을 섞어준 후, 고분자 용액을 30 게이지 스테인레스 스틸 니들(gauge stainless steel needle)이 있는 5ml 시린지(syringe)에 담았다. 전압의 운용 조건은 7kV이며, 시린지 펌프(syringe pump)를 이용해 유속은 0.1 ml/hr로 진행하였다. 전기방사를 통해 나온 나노섬유는 깨끗한 알루미늄 호일에 모았다.

<85> 분산된 나노섬유를 만들기 위한 알코올 처리 과정은 다음과 같다. 50% v/v 알코올 용액(에탄올)이 들어있는 바이알(vial)에 나노섬유를 넣은 후, 200rpm에서 10분간 셰이킹(shaking) 시켰다. 나노섬유가 완전히 분산되면 용액 상에 알코올이 완전히 제거될 때까지 건조과정 없이 씻어주었다. 분산된 나노섬유는 트립신 고정화 전까지 버퍼 용액에 보관하였다.

<86> (2) 고분자 나노섬유를 이용한 효소 고정화

<87> 나노섬유(NF)를 이용한 효소(트립신) 고정화는 다음과 같은 4가지 종류를 이용해 진행되었다.

<88> [알코올 처리되지 않은 나노섬유를 이용한 공유결합 효소고정화 방법(CA-TR/NF), 알코올 처리된 나노섬유를 이용한 공유결합 효소고정화 방법(CA-TR/EtOH-NF), 알코올 처리되지 않은 나노섬유를 이용한 효소코팅 방법(EC-TR/NF), 알코올 처리된 나노섬유를 이용한 효소코팅 방법(EC-TR/EtOH-NF)].

<89> 도 4는 고분자 나노섬유를 이용한 트립신 고정화에 대한 개념도이다. 트립신 고정화를 위해 같은 무게(5mg)의 알코올 처리되지 않은 나노섬유(NF)와 알코올 처리한 나노섬유(EtOH-NF)를 준비한 후, 트립신 용액(10 mg/ml, 10mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 7.9))에 배양하였다. 트립신 용액과 나노섬유가 들어있는 바이알(vial)을 30분간 200rpm으로 셰이킹(shaking) 한 후, 트립신을 나노섬유에 공유결합을 이용해 고정화하기 위해 4℃에서 2시간 동안 배양하였다. 이후 효소 코팅(EC-TR)의 합성을 위해, 가교결합제인 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 용액(0.5% w/v)을 넣은 후, 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다.

<90> 공유결합 효소고정화 방법(covalent attached trypsin, CA-TR)을 위해서는

글루타르알데히드(glutaraldehyde) 용액 대신 버퍼 용액을 넣어주었다. 하룻밤 동안 배양한 생촉매 나노섬유(CA-TR, EC-TR)는 100mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 7.9)로 씻어준 후, 나노섬유에 남아있는 반응하지 않은 알데히드(aldehyde) 그룹을 막아주기 위해 100mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 7.9)를 이용해 30분 동안 셰이킹(shaking) 시켰다. 이렇게 완성된 생촉매 나노섬유는 10mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 7.9)로 완전히 씻어준 후 4℃에 보관하였다.

<91>

(3) 고정화된 트립신의 활성 측정

<92>

생촉매 나노섬유의 트립신 활성의 측정은 수용액 버퍼 내에서의 트립신의 반응기질인 L-BAPNA의 가수분해를 통해 측정하였다. L-BAPNA 용액은 L-BAPNA를 DMF를 이용해 용해시킨 용액(10 mg/ml in DMF)을 10mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 7.9)를 이용하여 1/100 희석시켜 사용하였다. 나노 구조 물질에 고정화된 효소(enzyme)의 경우에는 실시간으로 측정이 불가능하므로 10ml의 L-BAPNA 용액에 생촉매 나노섬유를 넣어 200rpm으로 반응시킨 후, 시간별로 100ul씩 샘플을 취하여 측정하는 방법을 사용하였다. 그 후, 10mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 7.9)를 이용해 1/10로 희석한 후 생성물의 농도를 410nm에서 분광광도계(spectrophotometer)로 흡광도를 측정하였다.

<93>

(4) 생촉매 나노섬유를 이용한 단백질 가수분해

<94>

생촉매 나노섬유를 이용해 프로테오믹 분석에서의 단백질 가수분해 공정에 적용시키기 위해 실험을 진행하였다. 가수분해할 단백질은 모델 단백질인 엔올라아제(enolase)를 사용하였고, 가수분해 방법은 액상 가수분해(in-solution digestion) 방법을 사용하였다. 실험방법은 다음과 같다.

<95>

생촉매 나노섬유가 들어있는 바이알(vial)에 2ml의 엔올라아제(enolase) 용액(0.1 mg/ml in 100mM 암모늄 바이카보네이트(ammonium bicarbonate, pH 8.0))을 넣어준 후, 200rpm 및 상온에서 밤새 동안 반응시켰다. 반응 후, 1.5ml의 상층액(supernatant)을 새로운 바이알(vial)에 넣은 후 더 이상의 반응을 막아주기 위해 포름산(formic acid)을 넣어주었다. 만들어진 샘플은 LC-MS/MS를 이용한 분석 전까지 -70℃에 보관하였다. 사용된 생촉매 나노섬유는 깨끗이 씻어준 후 다음 사용 시까지 4℃에 보관하였다.

<96>

(5) 효소 컬럼을 이용한 단백질 가수분해

<97>

기존의 액상 가수분해(in-solution digestion) 방법은 시간이 오래 걸리는 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 나노섬유를 크로마토그래피

컬럼(chromatography column)에 넣어준 후 효소 코팅방법을 이용해 효소 컬럼을 제작하였다. 효소 컬럼은 단백질 용액을 일정한 속도로 컬럼 내로 흘려줄 수 있는 실린지 펌프(syringe pump)와 연결되어 있다. 크로마토그래피 컬럼 내에는 나노섬유가 컬럼 밖으로 나오지 못하도록 컬럼의 입구와 출구에 프리트(frit)가 구성되어 있어, 효소 컬럼에 의해 분해된 생성물 용액만 밖으로 나올 수 있다. 효소 컬럼 제작은 알코올 처리하지 않은 나노섬유에 효소 코팅방법을 이용한 컬럼(EC-TR/NF-column)과 알코올 처리한 나노섬유에 효소 코팅방법을 이용한 컬럼(EC-TR/EtOH-NF-column) 두 가지 방법으로 제작하였다(도 5).

<98>

먼저 고분자 나노섬유를 크로마토그래피 컬럼에 채운 후, EC-TR/EtOH-NF-column의 경우, 나노섬유를 컬럼 내에서 분산시키기 위해 50% v/v 알코올 용액을 1 ml/h 유속으로 밤새 동안 흘려주었다. 10mM 인산염 버퍼(phosphate buffer, pH 7.9)를 이용해 컬럼 내 더 이상 알코올 용액이 남아있지 않도록 세척한 후, 트립신 용액(10 mg/ml in 10mM 인산염 버퍼(phosphate buffer, pH 7.9))을 나노섬유가 들어있는 컬럼 내로 2.5 ml/h 유속으로 2시간 동안 흘려주었다. 효소 코팅 합성을 위해 트립신과 글루타르알데히드(glutaraldehyde)가 함께 들어있는 용액을 10 분간 흘려준 후, 50분간 배양시켰다. 이후 효소 코팅방법과 마찬가지로 반응되지 않은 나노섬유의 알데히드(aldehyde) 그룹을 막아주기 위해 100mM Tris-HCl(pH 7.9)를 이용해 1시간 동안 반응시켰다. 이렇게 만들어진 효소 컬럼은 PB 버퍼를 이용해 5 ml/h 유속으로 깨끗이 씻어준 후, 사용 시까지 상온에 보관하였다.

<99>

<실시에 2> 트립신 가수분해 컬럼의 활성측정

<100>

자유 효소(Free enzyme)의 경우에는 효소(enzyme)가 물에 녹기 때문에 분광광도계(spectrophotometer)를 이용해 실시간으로 측정이 가능하나, 나노 구조 물질에 고정화된 효소(enzyme)의 경우에는 실시간으로 측정이 불가능하므로 200rpm으로 반응시킨 후, 시간별로 100ul씩 샘플을 취하여 측정하는 방법을 사용하였다. 그 후, 10mM 인산나트륨(sodium phosphate, pH 7.9)를 이용해 1/10로 희석한 후 410nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다.

<101>

【표 1】

<102>

	EC-TR/NF	EC-TR/EtOH-NF	EC-TR/NF에 대한 EC-TR/EtOH-NF 비율
초기 활성도 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	0.053	0.65	8.2
K_m (μM)	129.9	1066.0	8.3
V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	0.076	1.63	21.7

<103>

표 1은, EC-TR/EtOH-NF의 초기 활성도 EC-TR/NF의 초기 활성도, kinetic 값에 대해 나타내었다. 먼저 EC-TR/EtOH-NF의 초기 활성도는 EC-TR/NF의 초기 활성에 비해 약 8.2 배 높은 것을 확인할 수 있다. 이는 알코올 처리를 통해 나노섬유가 퍼짐으로써 표면적이 증가하였기 때문에, 나노섬유에 함유된 무수말레산(maleic anhydride) 그룹이 수용액상에 많이 노출되어 있다는 것을 증명하는 것이다. 효소의 아민기가 무수말레산(maleic anhydride)에 고정화되기 때문에, 이는 분산된 나노섬유가 트립신을 고정화할 수 있는 능력이 향상되는 것을 의미하며, 분산된 나노섬유 위에 효소 코팅을 하는 것은 기존의 나노섬유에 효소 코팅을 하는 것에 비해 효소 담지량이 크게 향상되는 것이다.

<104>

고정화된 효소의 반응속도 상수(V_{max} 와 K_m)는 michaelis-menten 분석을 통해 구할 수 있다. 효소 코팅은 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 처리를 통해 크로스링킹(crosslinking) 되었기 때문에, 흡광도를 이용한 방법이나 BCA 방법으로는 정확한 담지량을 측정할 수가 없다. 또한, 초기 활성을 측정하는 방법 역시 반응 도중 질량 이동 한계(mass transfer limitation)의 영향을 받기 때문에 정확한 담지량을 측정할 수 없다. 따라서, V_{max} 를 구함으로써 고정화된 효소의 담지량을 측정하는 것은 비교적 정확한 효소 담지량을 구할 수 있는 방법이 될 수 있다.

<105>

실험 결과, EC-TR/EtOH-NF의 V_{max} 는 EC-TR/NF의 V_{max} 에 비해 약 21.7 배 높은 것을 확인할 수 있었다. V_{max} 에서 전환수(Turnover number, k_{cat})가 고정화 시스템에서 일정하다고 가정하였을 때, 최대 속도 값(Maximum velocity value, V_{max})는 효소 담지량에 비례한다고 볼 수 있다($V_{max} = k_{cat} \times [E]_0$). 따라서, 이는 알코올 처리를 통해 나노섬유가 퍼짐으로써 표면적이 증가하였기 때문에, 분산된 나노섬유에 붙은 트립신의 담지량이 기존의 나노섬유에 붙은 트립신의 담지량에 비해 19배 이상 높은 것을 확인할 수 있다.

<106>

K_m 는 효소가 기질과 반응할 때 물질 전달 저항을 알 수 있는 정보이다. K_m 값이 낮을수록 물질 전달 저항이 낮은 것으로 효소와 기질의 반응 효율이 높은 것이라 볼 수 있다. 실험 결과, EC-TR/EtOH-NF의 K_m 는 EC-TR/NF의 K_m 에 비해 약 5.8배 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 분산된 나노섬유에는 많은 양의 가교결합(crosslinking)된 트립신이 붙어있기 때문에 물질 전달 저항은 높은 것을 확인할 수 있다.

<107>

<실시예 3> 효소컬럼의 안정성, 효율성 및 재사용 가능성 측정

<108>

트립신은 프로테오믹 분야에서 단백질을 분석하기 위한 과정 중, 트립신 가수분해 공정을 통해 단백질을 펩타이드로 만들어 주는 과정에 응용될 수 있다. 이번 실험에서는 고정화된 트립신을 이용해 프로테오믹 분석에서의 트립신 가수분해 공정에 대한 응용가능성에 대해 알아보았다. 이를 위해 모델 단백질인 엔올라아제(enolase)를 이용해 4가지 다른 고정화된 트립신(EC-TR/EtOH-NF, EC-TR/NF, CA-TR/EtOH-NF, CA-TR/EtOH-NF)의 가수분해 효율성(efficiency), 안정성(stability), 재사용가능성(reusability)에 대한 실험을 진행하였다.

<109>

엔올라아제(Enolase) 가수분해 후, 가수분해된 생성물이 함유된 용액은 LC-MS/MS 분석을 위해 -70℃에서 보관하고, 사용한 고정화된 트립신은 더 이상 가수분해된 잔류 단백질이 남아있지 않을 때까지 버퍼(buffer)로 세척(washing)한 후 다음 사용 시까지 4℃에 보관하였다. LC-MS/MS를 통한 프로테오믹 분석에서는, 기존의 엔올라아제(enolase) 가수분해를 통해 엔올라아제(enolase)가 가수분해되어 나온 펩타이드를 데이터베이스(database)로 정리하고, LC-MS/MS 분석에 의해 검출된 펩타이드의 피크 면적(peak area)를 기존의 데이터베이스(database)와 비교하여 가수분해의 효율성을 확인하였다. 본 실험에서는 LC-MS/MS 분석에 의해 검출된 펩타이드의 피크 면적(peak area) 중, 데이터베이스(database)를 통해 엔올라아제(enolase)의 가수분해되어 나온 펩타이드라고 확인할 수 있는 대표적인 펩타이드 5개를 선별하여 이들의 면적(area) 합을 구해서 가수분해 효율성을 결정하였다.

<110>

59일 동안 분석한 4가지 종류의 고정화된 트립신을 반복해서 사용하여 엔올라아제(enolase)를 가수분해한 후 엔올라아제(enolase)가 가수분해된 펩타이드를 LC-MS/MS를 통해 분석한 결과는 다음과 같다. 먼저 공유결합 효소고정화 방법(CA/EtOH-NF 와 CA/NF)의 경우, 초기 가수분해 효율성도 효소코팅의 효율성에 비해 낮은 것을 볼 수 있으며, 재사용시 시간이 지남에 따라 효율성도 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 6 및 7 참조). 이는 공유결합 효소고정화 방법의 낮은 안정성의 결과로, 엔올라아제(enolase)가 액상 가수분해(in-solution digestion) 실험 조건에서 완전히 가수분해(digestion)되지 않았다는 것을 증명하는 것이다. 반면, 나노섬유와 분산된 나노섬유에서의 공유결합 효소고정화 방법(CA/EtOH-NF 와 CA/NF)을 비교해보면 CA/EtOH-NF의 상대적인 안정성이 더 높은 것을 볼 수 있다. 이는 알코올 처리를 통해 나노섬유가 퍼짐으로써 표면적이 증가하여 더 많은 효소가 붙어있으므로, 효소가 시간이 지남에 따라 활성을 잃어버리지만 활성을 유지하고 있는 남은 효소가 기존의 나노섬유에 붙어있는 효소에 비해 상대적으로 많기 때문으로 분석할 수 있다.

<111> 효소 코팅방법을 사용할 경우, 59일 동안 재사용할 경우에도 높은 가수분해 효율성을 유지하는 것을 볼 수 있다(도 8 및 9 참조). 또한, 분산된 나노섬유를 이용한 효소 코팅방법(EC/EtOH-NF)는 기존의 나노섬유를 이용한 효소 코팅방법(EC/NF)에 비해 약 3배 정도 높은 가수분해 효율성을 나타내는 것을 확인할 수 있다(도 10 참조).

<112> 이를 통해 효소 코팅방법은 공유결합 효소고정화 방법에 비해 높은 안정성 및 활성을 유지하고 있는 것을 확인할 수 있으며, 분산된 나노섬유를 이용할 경우, 고정화된 효소의 양이 많기 때문에 기존의 나노섬유를 이용한 결과에 비해 높은 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 효소고정화 방법은 실제 응용 분야인 프로테오믹 분석에서의 트립신 가수분해 공정에 성공적으로 응용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

<113> <실시예 4> 구체적인 트립신 가수분해 컬럼의 제작

<114> 생촉매적 나노섬유(Biocatalytic nanofiber)를 이용한 액상 가수분해(in-solution digestion)의 경우, 단백질 가수분해시 뛰어난 가수분해 효율성을 나타내었으나, 가수분해를 위한 시간이 12시간 이상으로 효율적인 실제 응용을 위해서는 가수분해를 위한 시간을 줄여야 하는 문제를 가지고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위한 많은 노력들이 이루어지고 있는데 여전히 효소안정화가 문제가 되므로, 이번 연구에서는 효소안정화와 가수분해 시간을 줄일 수 있는 해결책을 제시하기 위해 효소코팅 방법을 이용한 효소 컬럼(enzymatic column)을 제작하고 이를 단백질 가수분해 공정에 적용시켜 보았다.

<115> 도 5에서는 단백질 가수분해를 위한 효소 컬럼 시스템에 대한 전체 그림 및 기존의 나노섬유에서 효소코팅 방법을 이용한 효소 컬럼(EC-TR/NF column)과 알코올 처리를 통한 분산된 나노섬유에서 효소 코팅방법을 이용한 효소 컬럼(EC-TR/EtOH-NF column)의 차이에 대해 나타내었다.

<116> 효소 코팅방법을 이용한 효소 컬럼 시스템은 기존의 액상 가수분해(in-solution digestion) 방법에 비해 가수분해 시간을 획기적으로 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다(5분 이내). 또한, 효소코팅 방법이 효소를 안정화시키기 때문에 재사용시에도 가수분해 효율성을 유지할 수 있는 장점을 가지고 있다.

<117> 그러나, EC-TR/NF 컬럼(column)은 계속해서 사용함에 따라 유체 압력(fluid pressure)에 의해 컬럼 내의 나노섬유가 압착(compress)되어 빈 공간이 생기고, 이에 따라 컬럼 내에 흐르는 유체가 빈 공간으로 바이패스(bypass)되므로 단백질 가수분해 효율성이 감소하게 된다. 반면, EC-TR/EtOH-NF 컬럼은 컬럼 내에서 나노섬

유가 완전히 분산되어 나노섬유가 압착되어 빈 공간이 생기는 현상을 막아주어 바이패스를 예방하여 재사용시에도 높은 단백질 가수분해 효율성을 가질 수 있다.

<118>

먼저 엔올라아제(enolase) 용액을 컬럼 내에 흘려주는 속도를 결정하기 위해 EC-TR/NF 컬럼에 유속(flow rate)을 변화(0.1 ~ 5 ml/h)시켜 주며 엔올라아제(enolase)를 가수분해시켜 가수분해된 정도를 LC/MS-MS로 분석하였다. 그 결과 유속(flow rate)을 줄임에 따라 엔올라아제(enolase)가 더 많이 가수분해되는 것을 확인하였다(도 11 참조.). 이는 유속(flow rate)이 감소할수록 엔올라아제(enolase) 용액이 컬럼 내에 체류하는 시간이 증가하므로 엔올라아제(enolase)가 트립신과 접촉하는 시간이 증가하여 더 많이 가수분해된다고 볼 수 있다. 이러한 결과를 통해 최종 유속(flow rate)를 2 μ l/min으로 결정하였다.

<119>

도 12에서는 기존의 나노섬유에서 효소 코팅방법을 이용한 효소 컬럼(EC-TR/NF column)과 알코올 처리를 통한 분산된 나노섬유에서 효소 코팅방법을 이용한 효소 컬럼(EC-TR/EtOH-NF column)을 이용해 엔올라아제(enolase) 가수분해를 수행한 결과를 나타내었다. 100 ng/ μ l의 엔올라아제(enolase) 용액을 2 μ l/min의 속도로 효소 컬럼 내에 흘려주면, 체류시간은 5분 이내로 줄일 수 있었다. 컬럼을 통과한 유출물(effluent)은 가수분해된 펩타이드 조각의 확인을 위해 LTQ-FT 질량 분광계(mass spectrometer)로 분석하였다. 또한, 시퀀스 범위(sequence coverage) 분석을 위해서 시퀀스 검색(sequence search) 결과로 나온 IDed 펩타이드를 검증(validation) 하기 위해 ISB에서 제공하는 TPP라는 파이프라인(pipeline)에서 펩타이드 예지 도구(peptide prophet tool)를 사용하였다.

<120>

EC-TR/NF 컬럼의 경우에는, 크로마토그래피(chromatography) 분석 결과 엔올라아제(enolase)라고 확신할 수 있는 피크(peak)가 비교적 명확하게 나타난 것을 볼 수 있었으며, 24개의 엔올라아제(enolase)로부터 잘린 특정 펩타이드를 확인할 수 있었으며, 68.4%의 아미노산 시퀀스 범위(amino acid sequence coverage)를 확인하였다. 반면, EC-TR/EtOH-NF 컬럼의 경우에는, 크로마토그래피(chromatography) 분석 결과 엔올라아제라고 확신할 수 있는 피크(peak)가 매우 명확하게 나타난 것을 볼 수 있었으며, 33개의 엔올라아제(enolase)로부터 잘린 특정 펩타이드를 확인할 수 있었으며, 80.5%의 아미노산 시퀀스 범위(amino acid sequence coverage)를 확인하였다(표 2 참조.). 이러한 결과를 통해 효소 코팅방법을 이용한 효소 컬럼은 가수분해 시간을 획기적으로 줄임과 동시에 효율적인 단백질 가수분해 결과를 얻을 수 있었으며, EC-TR/EtOH-NF 컬럼의 경우 유체 압력에 의해 나노섬유가 압착되어 빈 공간이 생기는 현상을 막아주어 바이패스를 예방하므로 보다 더 높은 가수분해

효율성을 나타내는 것을 증명할 수 있었다.

<121> 【표 2】

	확인된 펩타이드 수	프로테인 범위(%)	면적
EC-TR/NF	24	68	2.5.E+07
EC-TR/EtOH-NF	33	81	4.2.E+07

<122> <실시예 5> 효소컬럼의 지속력 측정

<123> EC-TR/EtOH-NF의 가수분해 수행능력을 기존에 사용하는 방법인 액상 가수분해(in-solution digestion) 방법과 현재 상용화되어 판매하고 있는 트립신 비드(trypsin bead)와 비교하기 위해, 각각의 샘플을 50의 고온조건에서 6시간동안 250 rpm에서 교반한 후, 모델 단백질인 엔올라아제를 가수분해시켰다. 각각 같은 시간에서, 액상 가수분해(in-solution digestion 방법, free trypsin을 이용해 트립신: 단백질 = 1: 50 비율로 섞어 12시간 동안 가수분해 하는 방법)에 사용되는 free trypsin은 일정량을 채취하여 사용하였고, 상용화 트립신 비드(프로메가, V9012)와 EC-TR/EtOH-NF은 샘플을 깨끗이 씻은 후, 같은 샘플을 재사용하였다.

<124> 도 13은 열적안정성을 확인하기 위해 EC-TR/EtOH-NF, 상용화 트립신 비드, 자유효소를 50℃의 고온조건에서 교반한 후, 단백질 가수분해 능력을 비교한 그래프로서 세로축은 가수분해된 펩타이드의 양을 LC-MS/MS라는 기계를 통해 면적으로 계산해준 값이다. 이를 통해 EC-TR/EtOH-NF의 초기 가수분해능력은 액상 가수분해(in-solution digestion) 방법과 상용화 trypsin bead에 비해 약간 높은 것으로 나타났다. 또한 60 시간 동안 250 rpm, 50℃에서 반응시킨 후, 다시 가수분해를 시킨 결과, EC-TR/EtOH-NF의 가수분해 능력은 그대로 유지하는 것을 알 수 있으나, free trypsin과 상용화 trypsin bead는 가수분해 능력이 현저하게 감소한 것을 볼 수 있었다. 이 결과는 EC-TR/EtOH-NF는 상온 뿐 아니라 50℃의 고온 조건에서도 가수분해 수행능력의 손실 없이 재사용이 가능하다는 것을 의미한다.

<125> <실시예 6> 알콜농도에 따른 나노섬유의 분산정도 측정

<126> 알콜 처리에 따른 나노섬유의 분산정도를 측정하기 위해 1 mg의 나노섬유를 다양한 농도의 에탄올 용액(0 ~ 100% v/v)으로 처리한 후, 분산정도를 확인해보았다. 도 14는 농도에 따라 나노섬유를 알콜처리한 후 물로 수세하고 알콜을 제거하고 촬영한 사진이다. 그 결과, 1 mg의 나노섬유와 알콜 용액이 들어있는 유리병을 5분간 볼텍싱 및 10분간 흔들어 주었을 때, 알콜 농도 10%(v/v) 이하에서는 혼합 후 나노섬유의 구조에 큰 차이가 없었다. 반면에 알콜의 농도가 높아질수록 나노섬유는 쉽게 분산되는 것을 볼 수 있었으며, 알콜 농도 20%(v/v) 이상에서는 나노섬유가 분산되는 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 분산된 나노섬유는 알콜을 제거하기

위해 물로 수세한 후에도 분산되는 정도는 변하지 않고 분산된 상태로 유지된 것을 볼 수 있었다(도 14 참조). 알콜 처리를 통해 분산된 나노섬유가 알콜을 제거한 후에도 분산된 모양을 유지하는 것은 효소고정화를 위해 버퍼 상에서 반응을 진행해도 나노섬유의 모양을 유지하므로 고정화되는 효소의 양을 증가시킬 수 있다.

<127>

결국, 기존의 연구되었던 고분자 나노섬유를 이용한 효소안정화 방법을 더욱 확장하여 고분자 나노섬유를 알코올 처리를 통해 분산시켜 표면적을 증가시킴으로써, 기존의 방법에 비해 고정화된 효소의 양을 증가시켜 효율성을 높이고 이를 효소코팅 방법을 사용하여 안정화시킬 수 있었다. 이렇게 만들어진 고정화된 효소를 액상 가수분해(in-solution digestion) 방법을 이용하여 59일 동안 수행한 결과 효소 코팅방법을 사용하면 높은 단백질 가수분해 효율을 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

<128>

또한, 가수분해 시간을 단축시키기 위해 효소 코팅방법을 이용한 효소 컬럼을 제작하여 단백질을 가수분해시킨 결과, 가수분해 시간을 기존의 시간(4 ~ 12시간)에 비해 획기적으로 줄일 수 있는 동시에(체류시간: 5분 이내) 높은 가수분해 효율을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 효소 코팅을 이용한 효소 컬럼 시스템은 높은 안정성을 유지하면서 가수분해 시간도 줄일 수 있는 방법이다. 이러한 시스템의 개발을 통해 향후 실제 응용에 활용되기 위한 다양한 실험, 즉 실제 단백질의 사용, 저농도의 단백질에서의 가수분해 효율성 확인 등을 연구를 통해 최적화된 시스템의 개발을 연구할 수 있다.

<129>

【산업상 이용가능성】

<130>

본 발명의 고정화된 효소를 포함하는 효소컬럼은 빠른 시간 내에 표적 단백질을 가수분해 시킴으로써 전체 프로테오믹 분석시간을 줄일 수 있다. 또한 효소 코팅방법을 사용하여 효소활성이 안정화되어 컬럼의 수명이 크게 증가하므로 프로테오믹 분석 산업에 유용하게 이용될 수 있다.

<131>

<132>

【청구의 범위】**【청구항 1】**

- 1) 컬럼 내에 고분자 섬유를 팩킹(packing)하는 단계;
- 2) 상기 컬럼 내에 팩킹된 고분자 섬유를 알코올 용액으로 처리하여 상기 고분자 섬유를 컬럼내부에 분산시켜 섬유 간 공간(inter-fiber space)을 증가시키는 단계;
- 3) 상기 컬럼 내에 처리된 알코올 용액을 제거하는 단계; 및
- 4) 상기 컬럼 내에 팩킹된 고분자 섬유에 효소를 첨가하여 상기 고분자 섬유의 표면에 효소를 고정화하는 단계;를 포함하는 효소컬럼의 제조방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 고분자 섬유는 고분자 나노섬유 또는 고분자 마이크론 섬유이며 3차원 네트워크 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 효소컬럼의 제조방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서,

상기 고분자 섬유는 상기 고분자 섬유는 폴리비닐알콜, 폴리아크릴로니트릴, 나일론, 폴리에스테르, 폴리우레탄, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 셀룰로오스, 키토산, 폴리락틱산, 폴리락틱-co-글리콜산, 폴리글리콜산, 폴리카프로락톤, 콜라겐, 폴리아닐린 및 폴리(스티렌-co-무수말레산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소컬럼의 제조방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 알코올 용액은 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 효소컬럼의 제조방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서,

상기 알코올 용액의 농도는 15 ~ 100%(v/v)인 것을 특징으로 하는 효소컬럼의 제조방법.

【청구항 6】

제1항에 있어서,

상기 3) 단계는 건조단계를 포함하지 않으면서 컬럼 내부를 수세하는 것을 특징으로 하는 효소컬럼의 제조방법.

【청구항 7】

제1항에 있어서,

상기 4) 단계에서 고분자 섬유의 표면에 효소를 고정화시키기 위하여 컬럼 내부에 가교결합제를 첨가하는 것을 특징으로 하는 효소컬럼의 제조방법.

【청구항 8】

제7항에 있어서,

상기 가교결합제는 디이소시아네이트, 디안하이드라이드, 디에폭사이드, 디알데히드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드 및 글루타르알데히드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 효소컬럼의 제조방법.

【청구항 9】

제1항에 있어서,

상기 효소는 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 펙톡시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소컬럼의 제조방법.

【청구항 10】

컬럼; 및 상기 컬럼의 내부에 팩킹되되, 알코올 용액으로 처리되어 컬럼 내 분산되고 섬유간 공간(inter-fiber space)이 증가된 고분자 섬유를 포함하는 효소컬럼.

【청구항 11】

제10항에 있어서, 상기 고분자 섬유는 고분자 나노섬유 또는 고분자 마이크로 섬유이며 3차원 네트워크 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 효소컬럼.

【청구항 12】

제10항에 있어서,

상기 고분자 섬유는 상기 고분자 섬유는 폴리비닐알콜, 폴리아크릴로니트릴, 나일론, 폴리에스테르, 폴리우레탄, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 셀룰로오즈, 키토산, 폴리락틱산, 폴리락틱-co-글리콜산, 폴리글리콜산 폴리카프로락톤, 콜라겐, 폴리아닐린 및 폴리(스티렌-co-무수말레산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소컬럼.

【청구항 13】

제10항에 있어서, 상기 고분자 섬유의 표면에 효소가 고정된 것을 특징으로 하는

효소컬럼.

【청구항 14】

제13항에 있어서,

상기 효소는 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 파파인, 서몰리신, 리파아제, 펙톡시다아제, 티로시나아제, 라카아제, 셀룰라아제, 자일라나제, 락타아제, 유기 포스포하이드롤레이즈, 콜린에스테라아제, 당산화효소, 알코올 탈수소 효소, 포도당 탈수소 효소, 및 포도당 이성화 효소로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소컬럼.

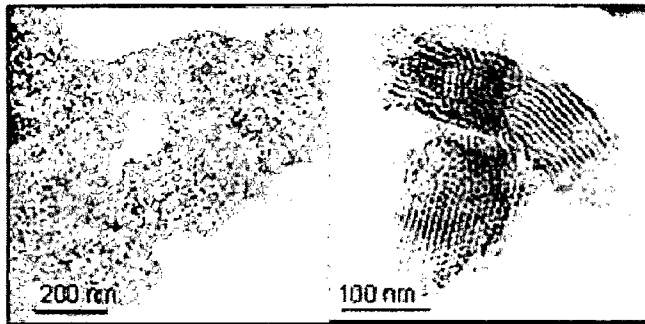
【청구항 15】

제10항에 있어서,

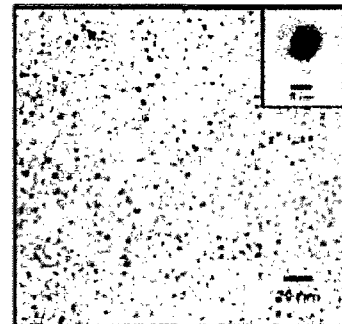
상기 효소컬럼 내부가 섬유간 공간(inter-fiber space)이 증가된 고분자 섬유로 가득찬 것을 특징으로 하는 효소컬럼.

【도면】

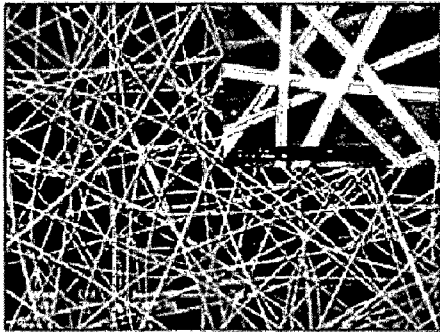
【도 1】



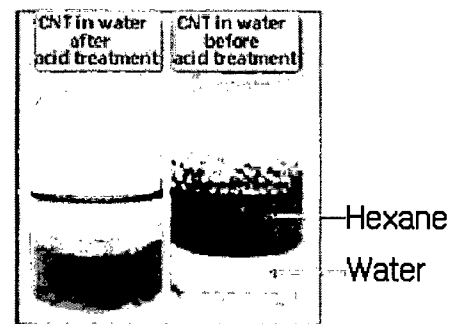
Nanoporous Materials



Magnetic Nanoparticles

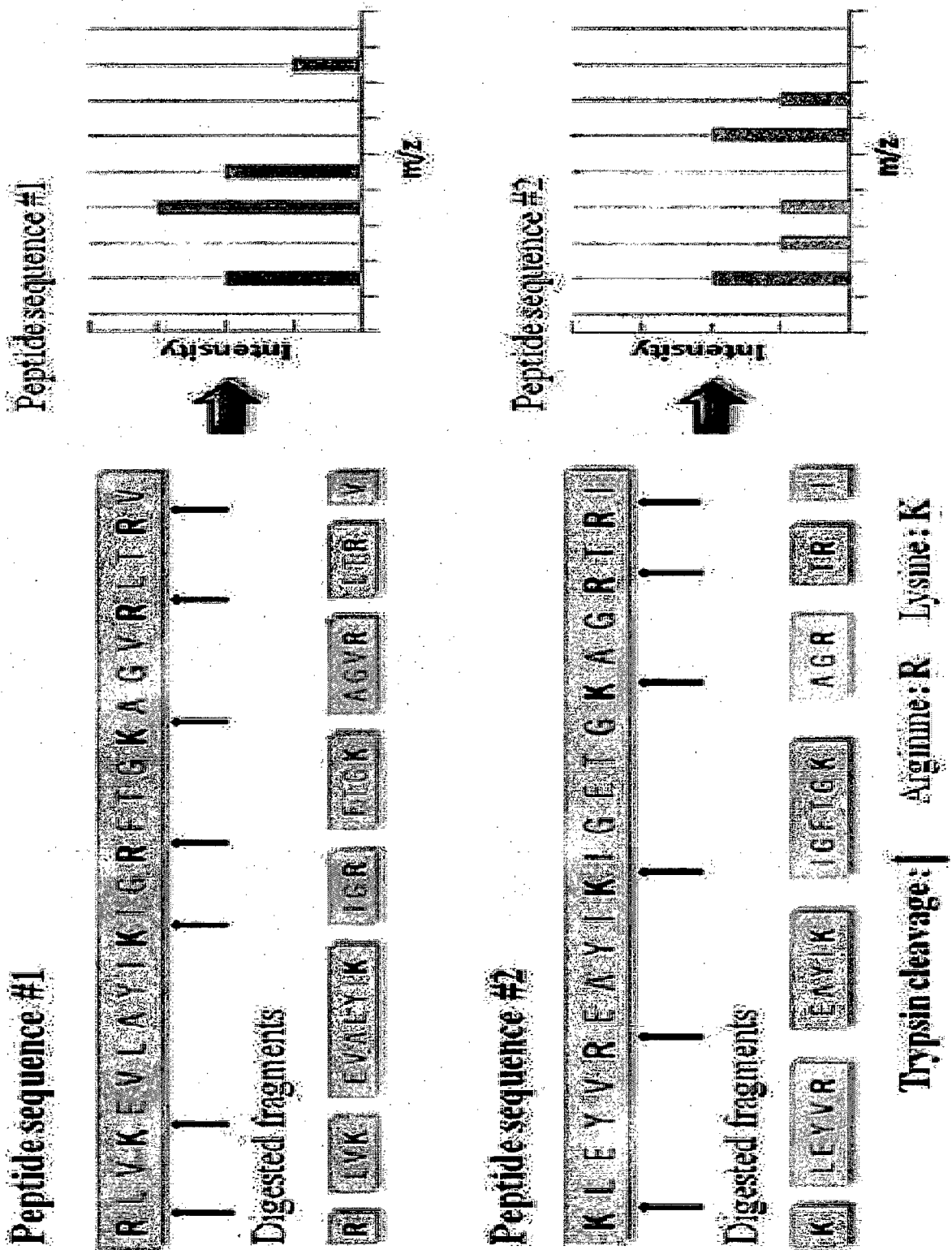


Electrospun Nanofibers

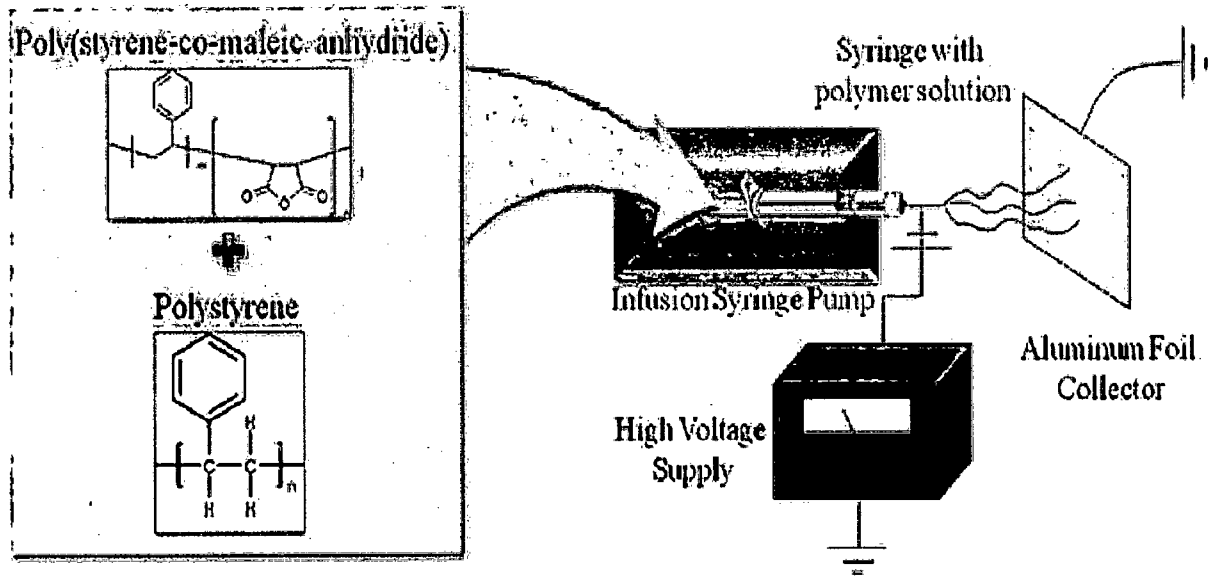


Carbon Nanotubes

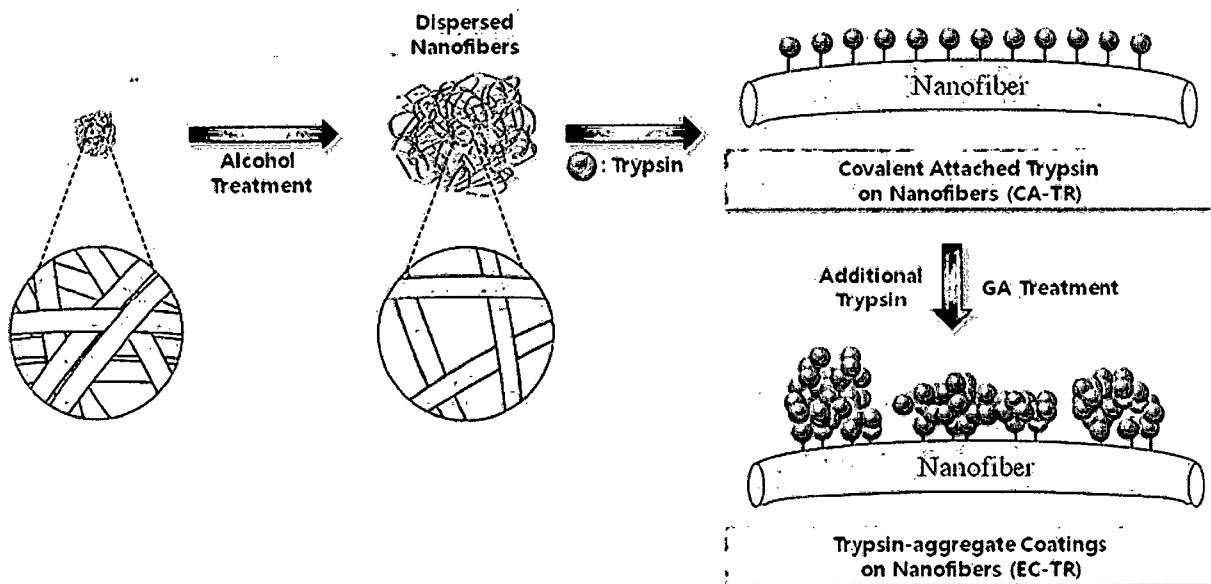
[도 2]



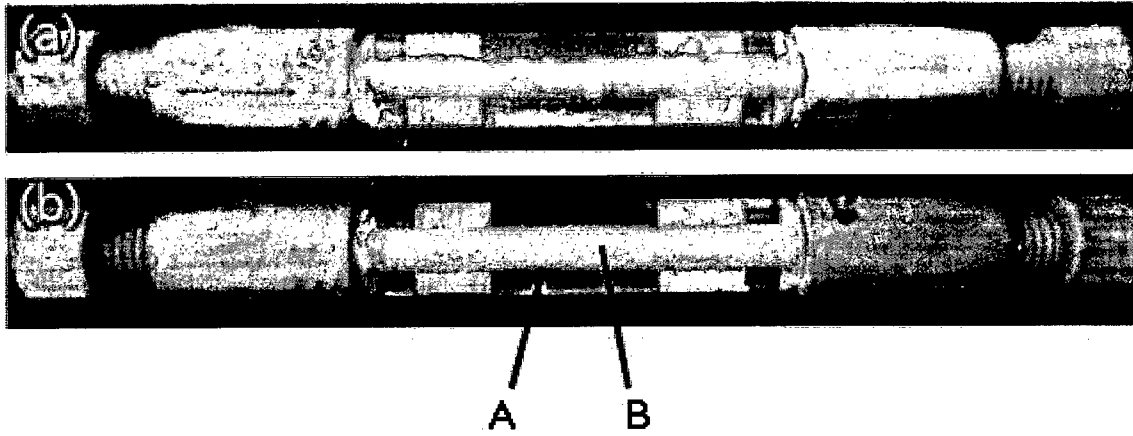
【도 3】



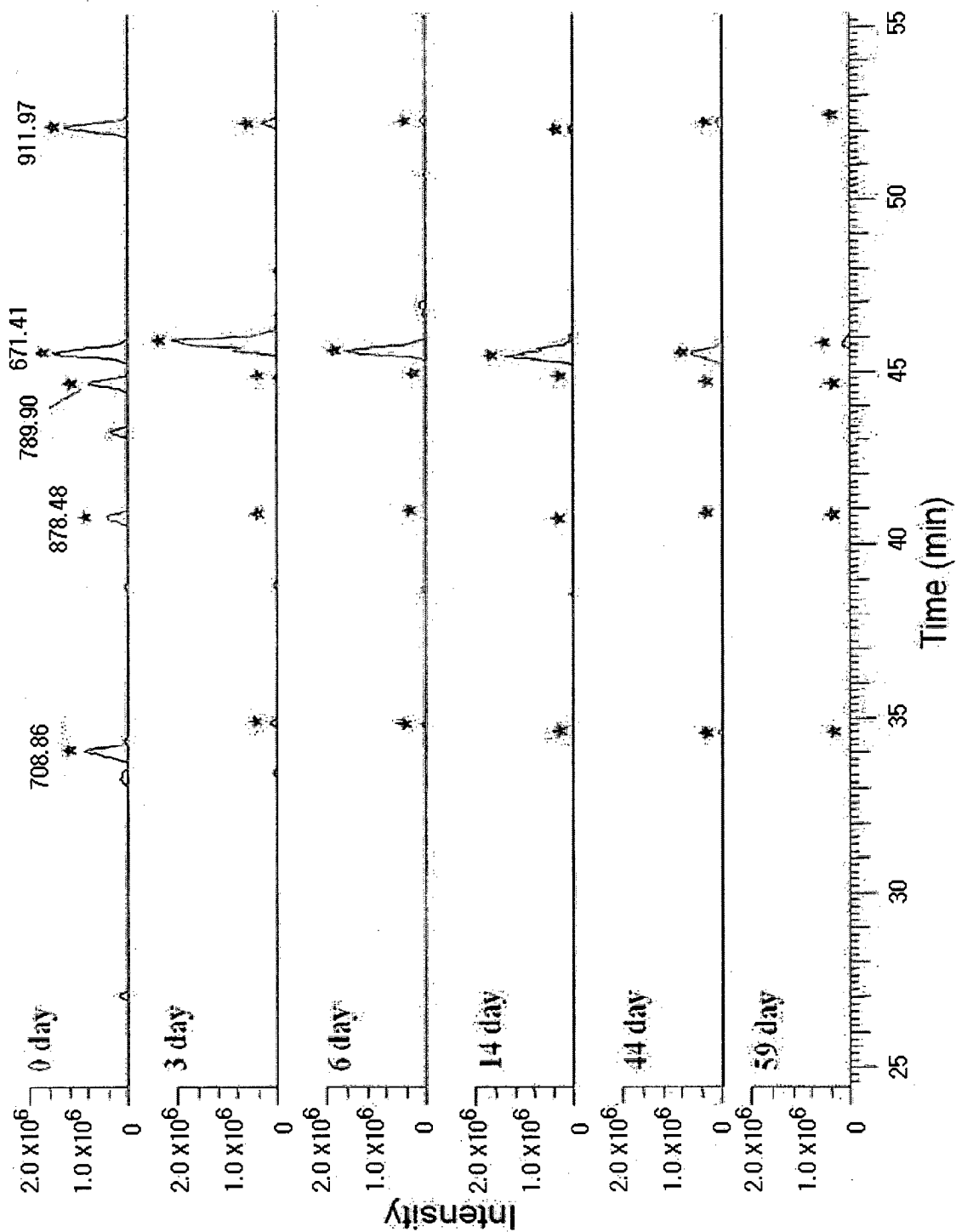
【도 4】



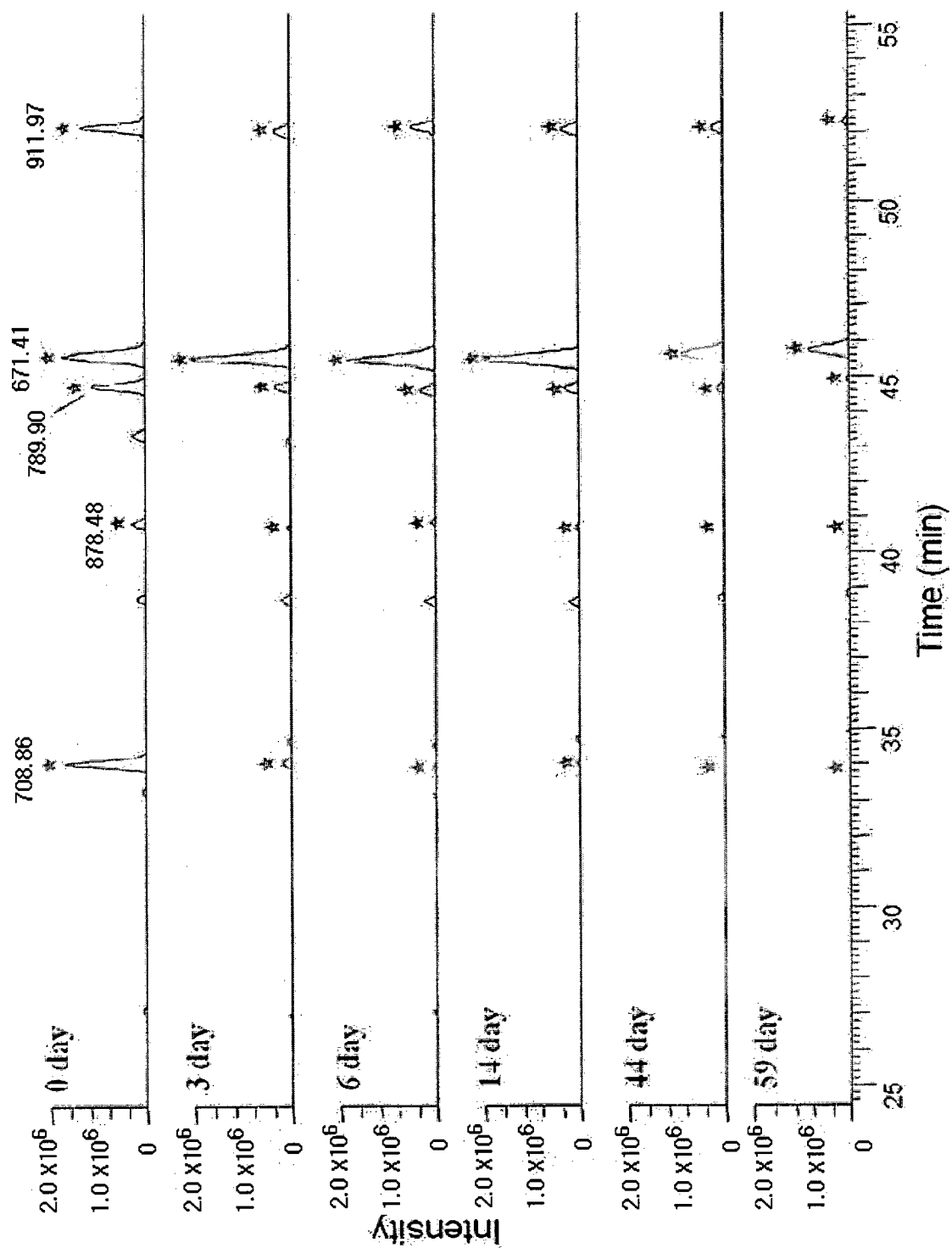
【도 5】



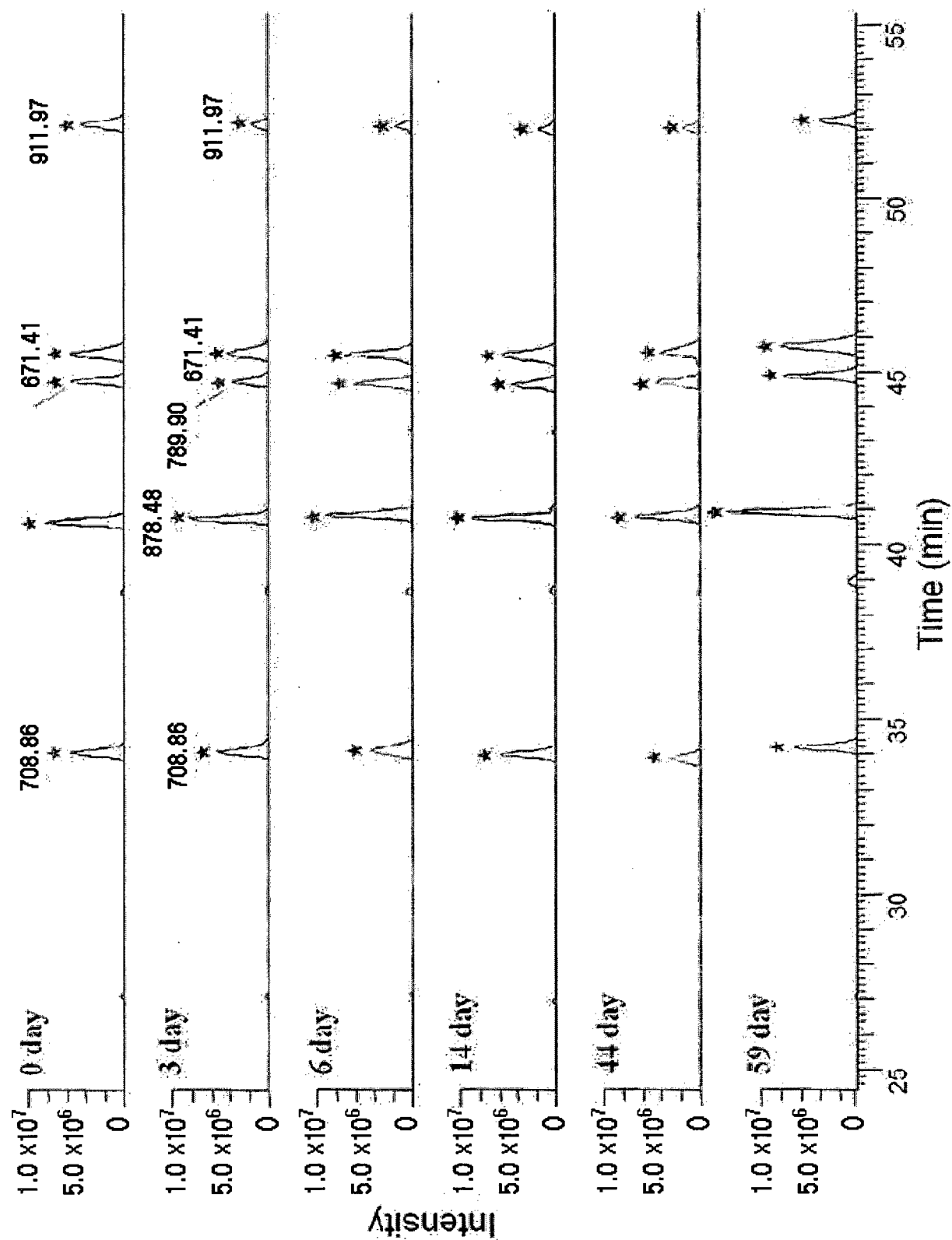
【F 6】



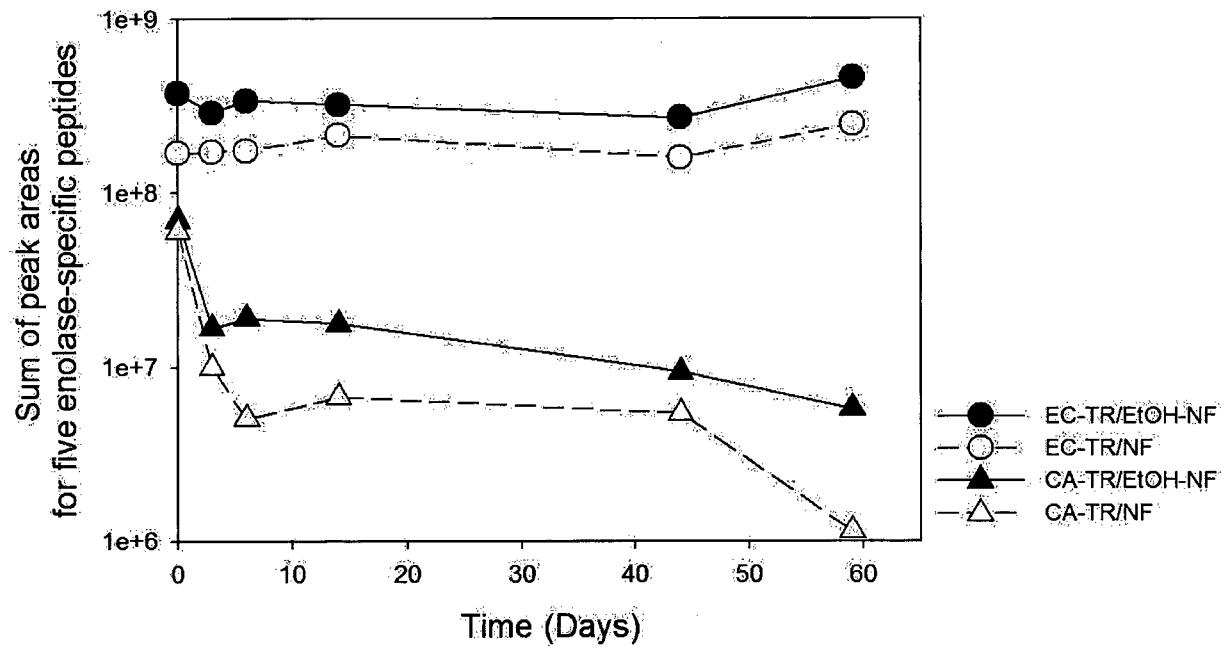
【도 7】



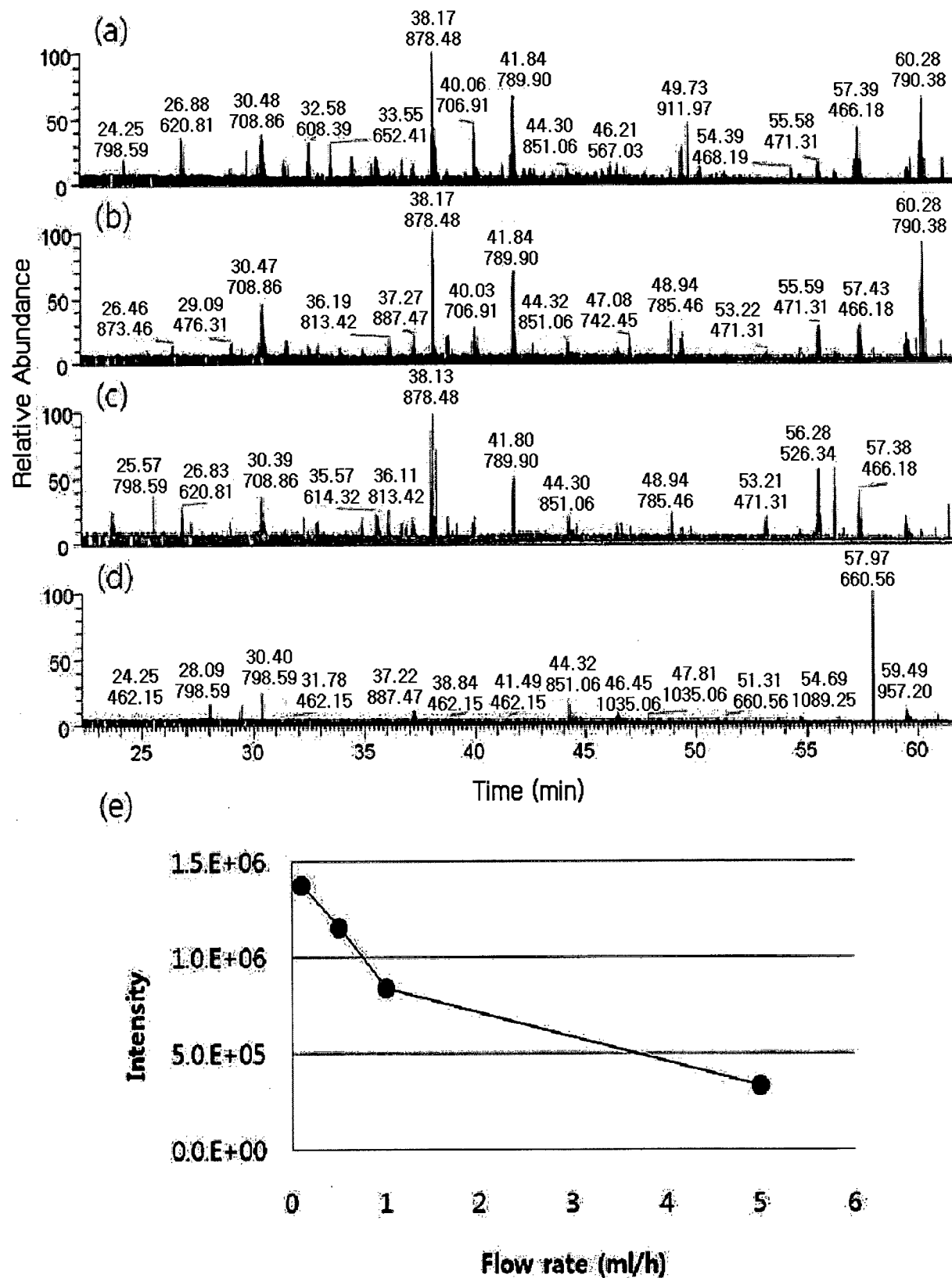
【도 9】



【도 10】

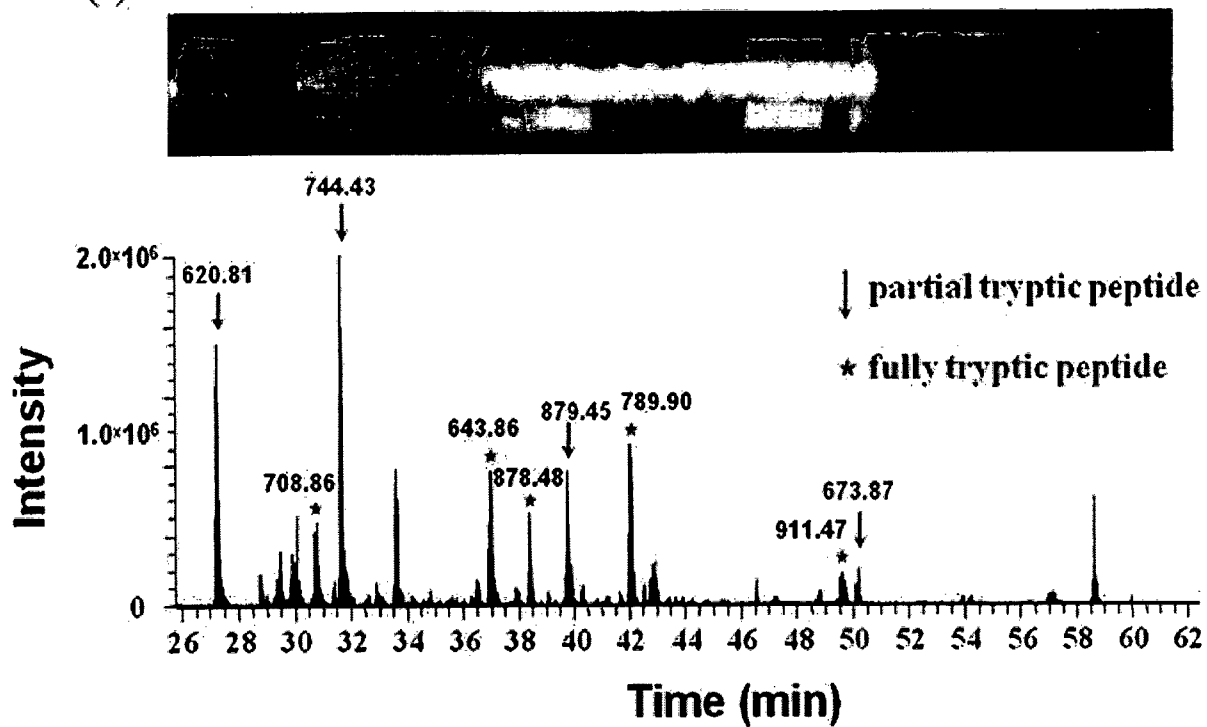


【도 11】

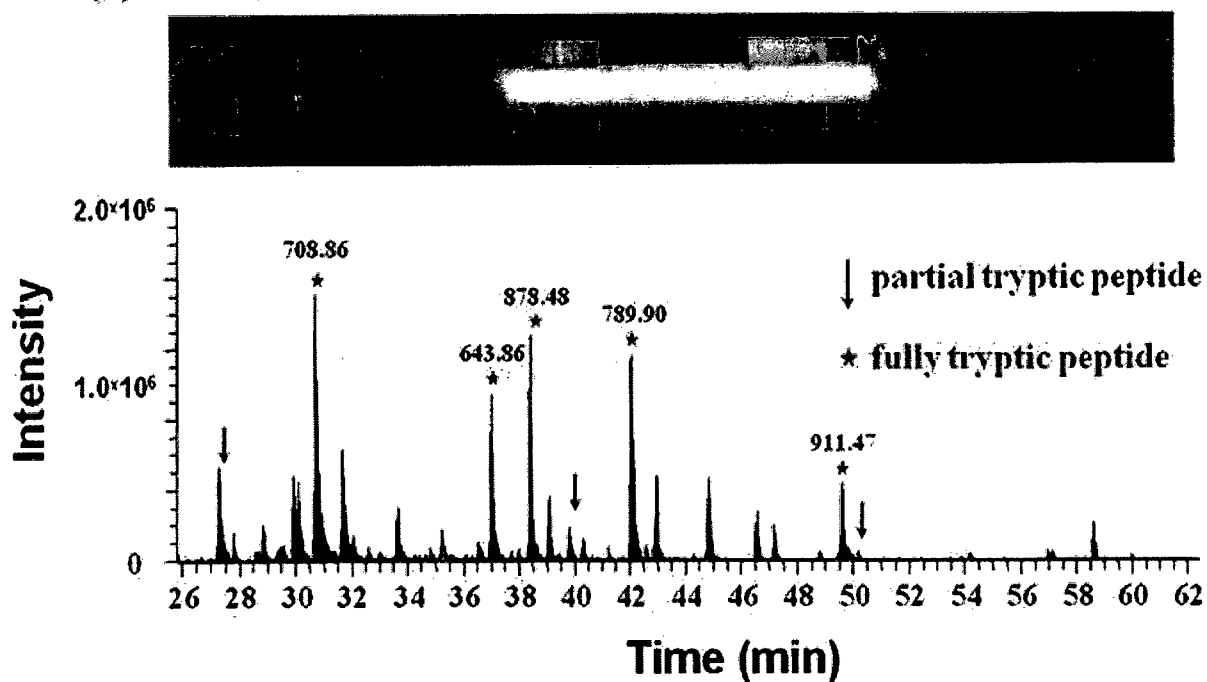


【도 12】

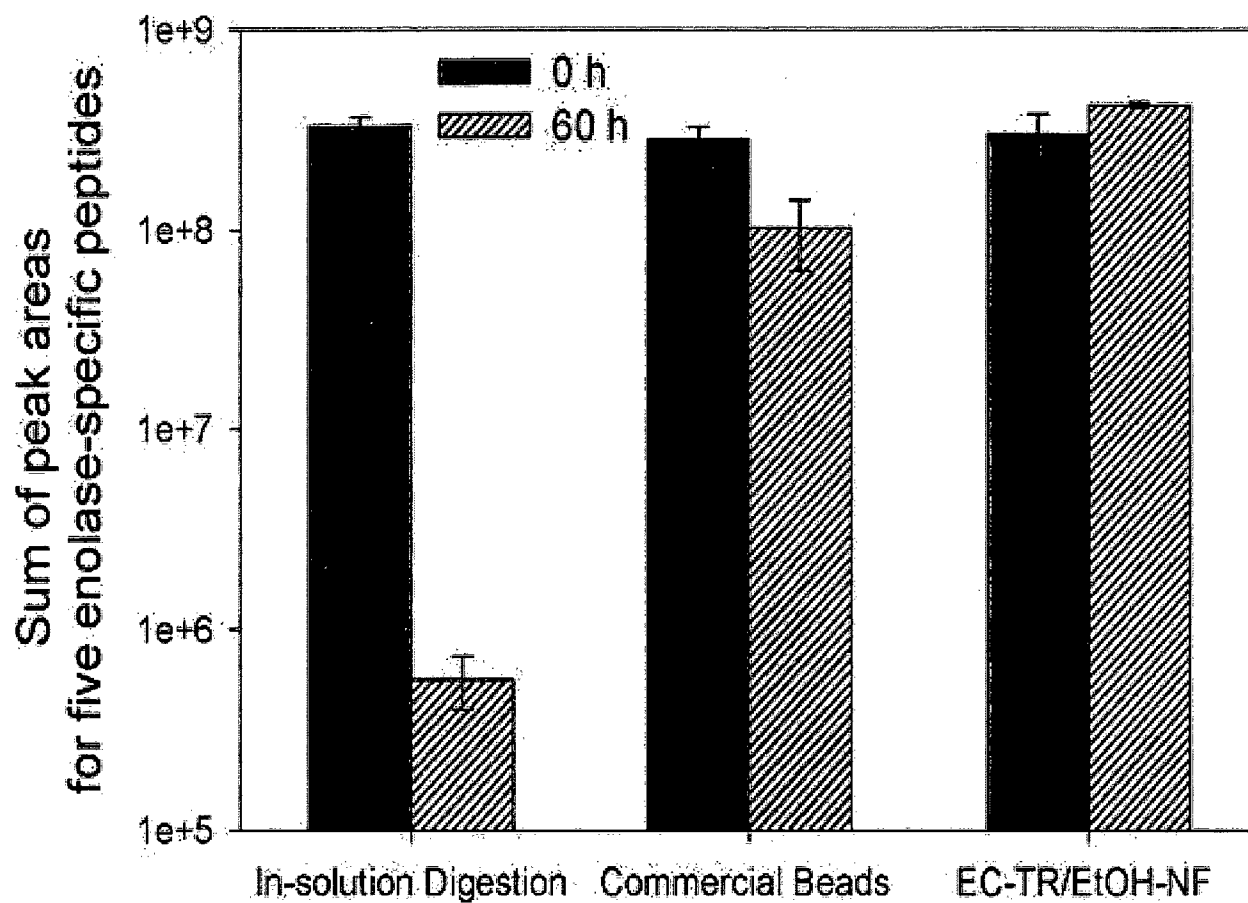
(a) EC-TR/NF Column



(b) EC-TR/EtOH-NF Column



【도 13】



【도 14】

