



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0053277
(43) 공개일자 2012년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 11/04 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01) C12P 19/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0114464

(22) 출원일자 2010년11월17일

심사청구일자 2010년11월17일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

유상호

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 219동 1401호 (신천동, 파크리오)

왕렌

서울특별시 성북구 개운사2길 13-24, 103호 (안암동5가)

박천석

경기도 성남시 분당구 수내동 한양아파트 506동 107호

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 8 항

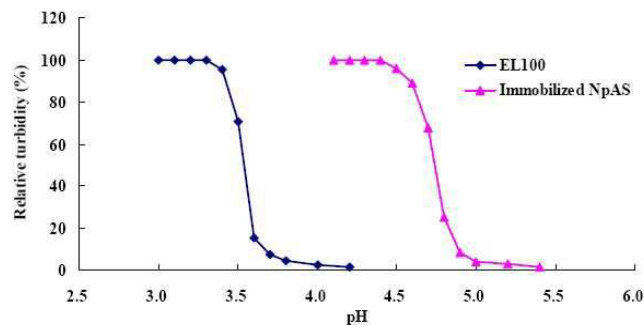
(54) 발명의 명칭 pH 민감성 고분자 담체에 고정된 고정화 효소 및 상기 고정화 효소를 이용한 선형 알파-1, 4-글루칸의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 pH 민감성 고분자 담체에 고정된 고정화 효소 및 상기 고정화 효소를 이용한 선형 α -(1,4)-글루칸의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 pH 민감성 고분자 담체 예를들어 유드라짓 L100에 *Neisseria polysaccharea* 유래 아밀로수크라제(NpAS)를 고정화시켜 얻은 고정화 효소 및 상기 고정화 효소를 이용하여 선형 α -(1,4)-글루칸의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 고정화 효소는 효소 자체의 열안정성을 향상시키면서도 효소 활성을 유지하므로, 고정화 효소를 이용하여 안정하면서 경제적으로 선형 α -(1,4)-글루칸을 생합성할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100301-061-066-001-02-00

부처명 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린21사업

연구과제명 친환경 생촉매 전환기법을 통한 고부가가치 난소화성 말토텍스트린 개발

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2007.04.01 ~ 2010.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

아밀로수크라제를 pH 민감성 고분자 담체에 고정화시킨 것을 특징으로 하는 고정화 효소.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 아밀로수크라제는 미생물 *Neisseria polysaccharea*, *Deinococcus geothermalis* 및 *Alteromonas macleodii*로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 미생물로부터 유래된 것을 특징으로 하는 고정화 효소.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 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 것을 특징으로 하는 고정화 효소.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 따른 고정화 효소를 이용한 선형 α -1,4-글루칸의 제조방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

기질로서 수크로스를 이용하고, 상기 고정화 효소를 첨가하여 효소 반응을 수행하는 단계;

상기 효소 반응물을 원심분리 하여 침전물을 분리하는 단계; 및

상기 침전물을 세정하고 동결건조 하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 선형 α -1,4-글루칸의 제조방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 효소 반응은 30 - 40℃의 온도 및 6.0 - 8.5의 pH에서 12 - 120 시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 선형 α -1,4-글루칸의 제조방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 불용성 선형 α -1,4-글루칸 제조를 위한 상기 수크로스의 농도는 0.1 - 1.0 M인 것을 특징으로 하는 선형 α -1,4-글루칸의 제조방법.

청구항 8

기질로서 수크로스를 이용하고, 청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 따른 고정화 효소를 첨가하여 효소 반응을 수행하는 단계;

상기 효소 반응물을 원심분리한 후 얻어진 상등액의 pH를 3.8 - 4.0으로 조정하는 단계; 및

상기 효소 반응물을 원심분리한 후 얻어진 침전물을 세정하는 단계

를 포함하는 고정화 효소의 회수방법.

명세서

기술분야

본 발명은 pH 민감성 고분자 담체에 고정된 고정화 효소 및 상기 고정화 효소를 이용한 선형 알파-1,4-글루

칸의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] *Neisseria polysaccharea*로부터 얻어진 아밀로수크라제(NpAS)는 글리코사이드 하이드롤라제의 패밀리 13으로부터 얻어진 독특한 글루칸수크라제로서, 반응 배지에서 프락토스를 유리하면서 수크로스로부터 선형 α -(1,4)-글루칸의 합성을 촉진하는 효소로서 알려져 있다. 이렇게 합성된 선형 α -(1,4)-글루칸은 식품, 화장품 및 의약품에서 각각 저항성 전분, UV 필터 및 방출제어기질로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0003] α -(1,4)-글루칸의 합성에 관여되는 다른 효소들과 달리, NpAS는 글루코실 공여체로서 ADP-글루코즈 또는 UDP-글루코즈와 같은 값비싼 뉴클레오타이드-활성화 당을 필요로 하지 않기 때문에 아밀로폴리사카라이드의 산업적인 합성과 구조 변형에 매우 매력적인 생촉매로서 간주되어 왔다.
- [0004] 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(FEBS Letters 471(2-3): 219-223, 2000; J. Bacteriol. 181(2): 375-381, 1999).
- [0005] 이러한 문제점을 개선하기 위하여, 종래에는 막-고정화 NpAS가 알려져 있다(Biotechnology Progress 18(5): 964-968, 2002). 글리시딜 메타크릴레이트의 이질 광개시 그래프트 중합을 통해 정밀여과막 상에 공유적인 효소 고정화를 위한 예폭시기를 생성하였다. 이렇게 얻어진 막-고정화 NpAS는 고정화되지 않은 NpAS와 비교하여 낮은 효소 활성을 나타내었다. 게다가, 선형 α -(1,4)-글루칸은 강한 사슬-사슬 간 회합 경향이 있어 침전을 야기하며, 따라서 막-고정화 NpAS로부터 선형 α -(1,4)-글루칸 산물을 분리하기 용이하지 않은 문제가 있다.
- [0006] 따라서, NpAS의 안정성을 향상시키고, 경제적으로 선형 α -(1,4)-글루칸을 합성할 수 있는 공정의 개발이 필요하다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 NpAS를 EL100과 같은 pH 의존성 자동침전제에 공유적 또는 비공유적으로 결합시켜 고정화 NpAS를 합성하였고, 이렇게 얻어진 고정화 NpAS는 선형 α -(1,4)-글루칸 생합성에 매우 유용하며 특히 안정성과 재사용성이 향상됨에 따라 안정하면서 경제적으로 선형 α -(1,4)-글루칸을 생합성할 수 있다는 점에 착안하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 선형 α -(1,4)-글루칸을 생합성하는 데에 유용한 NpAS의 안정성과 재사용성을 향상시킬 수 있는 고정화 효소 및 이의 제조방법을 제공하는 데에 있다.
- [0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 고정화 효소를 이용하여 안정하면서도 경제적으로 선형 α -(1,4)-글루칸을 합성하는 합성방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아밀로수크라제를 pH 민감성 고분자 담체에 고정화시킨 것을 특징으로 하는 고정화 효소를 제공한다.
- [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, 예를들어 24 내지 48시간 동안 배양할 수 있다. 미생물 배양이 완료된 후, 보편적인 고액 상분리 방법에 의해 배양물로부터 세포를 모을 수 있다. 예를들어, 4℃에서 원심분리하여 상등액을 제거하여 세포를 수득할 수 있다.
- [0013] 특히, 상기 미생물 *Neisseria polysaccharea*로부터 유래된 아밀로수크라제 유전자를 숙주세포, 예를들어 대장균, 바실러스, 유산균, 곰팡이류 내에서 재조합 단백질체로 발현시켜 얻을 수 있다.

- [0014] 세포성 효소원은 보편적인 방법을 따라 세포로부터 추출된 조효소를 사용할 수 있다. 예를들어, 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. 예를들어, 조효소 추출물을 여과하여 불용성 물질을 제거하고 상기 여과물을 니켈-니트릴로 트리아세트산(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. 예를들어, 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 일실시예에 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. NpAS의 효소 반응에 의해 생산되는 선형 α -(1,4)-글루칸은 반-결정성 침전 형태로서 회수된다. 따라서, pH 의존성 자동침전제는 이러한 생전환 공정을 위해 매우 유용하다.
- [0019] 특히, 상기 pH 의존성 자동침전제는 4.0 - 9.0의 pH에서는 용해성이지만, 2.5 - 3.3의 pH에서는 불용성일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 pH 민감성 고분자 담체를 용해시킨 용액의 pH를 5.0 - 10.0 으로 조정하는 단계(제1단계); 상기 고분자 용액에 아밀로수크라제를 첨가하여 교반하는 단계(제2단계); 상기 반응물의 pH를 3.0 - 4.3으로 조정하는 단계(제3단계); 상기 반응물을 원심분리 하여 침전물을 분리하는 단계(제4단계); 및 상기 침전물을 세정하는 단계(제5단계)를 포함하는 것을 특징으로 하는 고정화 효소의 제조방법을 제공한다.
- [0021] 상기 제1단계는 pH 민감성 고분자 담체, 예를들어 EL100을 트리스 용액과 같은 용매로 용해시킨 고분자 용액의 pH는 5.0 - 10.0으로 조정되지만, 보다 바람직하게는 6.0 - 8.0일 수 있다. 만약, 고분자 용액의 pH가 상기 범위를 벗어나면 공중합체인 고분자의 화학구조 안정성에 문제가 야기될 수 있다.
- [0022] 또한, 상기 제2단계는 상기 고분자 용액 100 중량부에 아밀로수크라제 22 내지 176 중량부를 첨가하여 교반하며, 보다 바람직하게는 44 - 88 중량부일 수 있다. 만약, 아밀로수크라제가 상기 함량 범위를 벗어나면 담체 및 효소 간 고정화 반응 효율성 저하의 문제가 야기될 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 제3단계는 반응물의 pH를 3.0 - 4.3으로 조정하지만, 보다 바람직하게는 3.8 - 4.3일 수 있다. 만약, 반응물의 pH가 상기 범위를 벗어나면 고정화 효소의 비가역적인 불활성화, 고분자 담체 회수율 저하 등의 문제가 야기될 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 제4단계는 3,000 - 5,000 g에서 10 - 20 분 동안 원심분리 하여 침전물을 분리하며, 상기 제5단계는 침전물을 희석 HCl 용액 (pH 4.0 - 4.3) 등으로 2 -3 번 세정한다.
- [0025] 본 발명에 따른 고정화 효소의 제조방법에서 사용된 아밀로수크라제와 pH 민감성 고분자 담체에 관한 구체적인

인 기술은 앞서 기술한 바와 동일하다.

- [0026] 또한, 본 발명은 아밀로수크라제를 pH 민감성 고분자 담체에 고정화시킨 고정화 효소를 이용한 선형 α -1,4-글루칸의 제조방법을 제공한다.
- [0027] 보다 상세하게는, 본 발명은 기질로서 수크로스를 이용하고, 상기 고정화 효소를 첨가하여 효소 반응을 수행하는 단계; 상기 효소 반응물을 원심분리 하여 침전물을 분리하는 단계; 및 상기 침전물을 세정하고 동결건조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 선형 α -1,4-글루칸의 제조방법을 제공한다.
- [0028] 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.
- [0029] 상기 원심분리는 5,000 - 7,000 g에서 10 - 20 분 동안 수행하여 침전물을 분리하며, 상기 침전물을 정제수 등으로 5 - 10번 세정하고 동결건조 한다.
- [0030] 특히, 불용성 선형 α -1,4-글루칸 제조를 위하여 기질인 수크로스의 농도는 0.1 - 1.0 M인 것이 바람직하며, 상기 범위를 벗어날 경우 효과적인 불용성 글루칸 생산이 곤란한 문제가 야기될 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은 기질로서 수크로스를 이용하고, 아밀로수크라제를 pH 민감성 고분자 담체에 고정화시킨 고정화 효소를 첨가하여 효소 반응을 수행하는 단계; 상기 효소 반응물을 원심분리한 후 얻어진 상등액의 pH를 3.8 - 4.0 으로 조정하는 단계; 및 상기 효소 반응물을 원심분리한 후 얻어진 침전물을 세정하는 단계를 포함하는 고정화 효소의 회수방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명에 따르면, NpAS를 EL100과 같은 pH 의존성 자동침전제에 결합시켜 얻어진 고정화 NpAS는 효소 자체의 열안정성을 향상시키면서도 효소 활성을 유지하므로, 고정화 NpAS를 이용하여 안정하면서 경제적으로 선형 α -(1,4)-글루칸을 생합성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 pH 변화에 따른 고정화 NpAS의 침강 거동을 나타낸 것이고,
 도 2는 고정화 NpAS와 고정화되지 않은 NpAS의 효소 활성에 대한 온도의 영향을 나타낸 것이고,
 도 3은 고정화 NpAS(B)와 고정화되지 않은 NpAS(A)의 효소 활성에 대한 pH의 영향을 나타낸 것이고,
 도 4는 40℃에서 고정화 NpAS와 고정화되지 않은 NpAS의 열안정성을 나타낸 것이고,
 도 5는 고정화 NpAS와 고정화되지 않은 NpAS에 의해 각각 생산된 선형 α -(1,4)-글루칸의 고성능 크기 배제 크로마토그래피를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0035] <실시예 1> NpAS 효소 준비 및 정제

[0036] 1. 재조합 *E. coli* BL21의 스탭 배양물 준비

- [0037] *Neisseria polysaccharea* 아밀로수크라제 뉴클레오타이드 서열에 기초한 2개의 프라이머를 이용한 PCR을 통해 *Neisseria polysaccharea* ATCC 43768으로부터 NpAS에 대응하는 유전자를 얻었다. 즉, 상기 PCR 반응은 주형인 *N. polysaccharea* 게놈 DNA와 2개의 올리고뉴클레오타이드 (서열번호 1: NPAS1 5'- GGA TCC GAT GTT GAC CCC CAC GCA GCA A -3'; 및 서열번호 2: NPAS2 5'- GGC AAG CTT CAG GCG ATT TCG AGC CAC AT -3')를 이용하여 수행되었다.

- [0038] 그 결과 얻어진 PCR 산물을 T-easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에서 클로닝하고, PCR 반응 시 어떠한 실수 존재 여부를 DNA 시퀀싱을 통해 확인하였다. *Bam*HI and *Hind*III를 이용하여 인서트를 자른 후, 얻어진 단편을 동일 효소로 처리된 pRSET-B 벡터로 삽입시켜 NpAS 발현 벡터인 pRSET-NpAS를 얻었다. 효율적인 유전

자 발현을 위하여 상기 pRSET-NpAS으로 *E. coli* BL21을 형질전환시켰다.

2. 효소 준비

1% (w/v) 박토티립톤, 0.5% (w/v) 이스트 추출물, 0.5% (w/v) 염화나트륨, 및 물로 구성된 액체 영양배양 배지를 pH 7.0으로 조정하였다. 500ml의 배양배지를 120℃에서 15분 동안 멸균시킨 1000ml Erlenmeyer 플라스크에 담은 후, 냉각시키고 앞서 준비된 재조합 *E. coli* BL21의 스타크 배양물로 접종한 후 0.01% (w/v) 암피실린의 존재 하 37℃에서 배양하였다. 세포의 광학밀도가 약 0.6에 도달하였을 때, 0.1M 이소프로필-β-D-치오 칼락토포라노사이드 1ml를 배양물에 첨가하여 유전자 발현을 유도하였다. 16℃에서 12시간 동안 배양한 후, 4℃에서 20분 동안 5,500×g에서 원심분리하여 세포를 수확하였다.

3. 효소 정제

앞서 준비된 배양물을 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0) 50ml에서 완전하게 재현탁시킨 후, 초음파 분쇄기 (Sonic Dismembrator 550, Fisher Scientific Co.) Model D100을 이용하여 세포를 파괴시켰다. 얻어진 혼합물을 4℃에서 20분 동안 11,000×g에서 원심분리하여 세포성 잔해를 제거하였다. 얻어진 상등액을 0.45μm 시린지 필터를 통해 여과시킨 후, 5ml의 여과액을 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA) 친화성 컬럼을 통해 통과시켜 재조합 His₆-태그된 아밀로수크라아제를 정제하였다. His₆-태그된 아밀로수크라아제를 용출하기 전에 Ni-NTA 친화성 컬럼을 20ml 세정 완충액(50mM Tris, 300mM 염화나트륨, 20mM 이미다졸, pH 7.0)으로 먼저 세정한 후, 5ml의 용출 완충액(50mM Tris, 300mM 염화나트륨, 250mM 이미다졸, pH 7.0)을 이용하여 아밀로수크라아제 단백질을 용출시킨 후, 4℃에서 Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, Billerica, USA)를 이용하여 농축시켰다. 전기영동적으로 단일 단백질 밴드를 갖는 효소를 얻었다. 이때, 얻어진 효소의 단백질 함량을 소혈청알부민을 표준물질로 사용하여 로리법으로 분석한 결과, 2.20 mg/ml로 나타났다. SDS-PAGE 분석을 통해 분자량이 76 kDa인 것으로 확인되었다.

<실시예 2> 고정화 NpAS의 제조

평균분자량이 1.35×10^5 Da인 EL100를 Röhnm 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 (2.53U/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. 회석 HCl (pH 4.3)으로 2회 세정하고, 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.0)에서 재용해시킨 후, 얻어진 고정화 NpAS를 이후 실험에 사용하였다.

<실시예 3> 고정화 NpAS의 활성 분석

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. 이러한 반응에서 유리된 환원당 양은 디니트로살리실산 (DNS) 방법(Journal of Biological Chemistry 108: 51-54, 1935)을 통해 표준물질로 프락토스를 이용하여 결정하였다. 단백질 농도는 소혈청알부민을 표준물질로 사용하여 로리법 (Lowry method; J Biol Chem 193: 265-275, 1951)에 의해 측정되었다.

고정화 NpAS의 단백질 및 활성 회수 수율은 각각 95.7% 및 86.7%이었고, 고정화 NpAS의 약 91%가 효소 활성을 나타냄을 알 수 있다. 또한, 고정화 NpAS는 1.04 U/mg 단백질의 높은 특이활성을 나타내었다.

<실시예 4> 고정화 NpAS의 침강 거동

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

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.

- [0051] 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.
- [0052] <실시예 5> 고정화 NpAS의 온도 및 pH 의존도 검토
- [0053] 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.
- [0054] 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 문헌들에 의하면 NpAS 반응을 위한 완충액 조건이 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)이었기 때문에 이를 선택하여 향후 실험을 진행하였다.
- [0055] <실시예 6> 고정화 NpAS의 열안정성 평가
- [0056] 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.
- [0057] 도 4와 같이, 고정화 NpAS는 고정화되지 않은 NpAS와 비교하여 열안정성이 유의성있게 증가되었다. 96시간 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 단계로 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 고정화되지 않은 효소의 약 5%로 나타났다. k_i 의 점진적 감소로부터 온도에 대한 고정화된 NpAS의 불균일한 감수성을 나타낸다. 고정화되지 않은 NpAS에서는 3시간 배양 후 많은 양의 침전물이 관찰되는 반면, 고정화 NpAS에서는 100시간 배양 후조차도 어떠한 침전물을 관찰할 수 없었다.
- [0058] EL100 고분자에 대한 NpAS의 결합은 효과적으로 단백질 응집을 방지하므로, 효소의 활성형을 안정화시켰다. 고정화되지 않은 NpAS는 42.5℃에서 비록 가장 좋은 효소 활성을 나타낼지라도, 40℃에서 나쁜 열안정성을 나타내었다. 따라서, 산물의 특성에 대한 효소 비활성화의 효과를 최소화 하기 위하여, 선형 α -(1,4)-글루칸의 생산을 위한 효소 반응은 최적 온도인 42.5℃에서 수행하지 않고, 35℃에서 수행하였다.
- [0059] <실시예 7> 고정화 NpAS에 의한 선형 α -(1,4)-글루칸의 반복 생산
- [0060] 고정화 NpAS의 재사용 능력을 검토하기 위하여, 다음과 같이 α -(1,4)-글루칸의 반복적인 생산을 수행하였다. 기질로서 0.1 M 수크로스를 사용하고, 400 U/L의 효소 활성으로 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)에서 35℃에서 고정화된 NpAS에 의해 선형 α -(1,4)-글루칸을 반복 생산하였다. 18시간 효소 반응 후, 반응혼합물을 5,000g에서 10분 동안 원심분리 하였다. 상등액을 주의깊게 모아 고정화 NpAS를 재사용하고, 침전물을 증류수로 5회 세정한 후, 동결건조하고 칭량하였다. 고정화 NpAS의 재사용은 다음과 같이 수행되었다: 0.1 M HCl을 첨가하여 모아진 상등액의 pH를 4.0으로 조정하였고, 3,000g에서 10분 동안 원심분리하여 고정화 NpAS로서 침전물을 모았다. 침전물을 희석 HCl (pH 4.0)으로 2회 세정한 후, 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.0)에서 재용해시켰다. 안정성 지표는 재생 반응 동안 고정화 NpAS의 단백질에 대한 활성의 회수 수율비로서 정의하였다.
- [0061] 그 결과, 하기 표 1에 각 반응 주기 후 단백질 및 활성 회수 수율을 정리하였다. 고정화 NpAS는 반복적인 효

소 반응 동안 좋은 안정성을 나타내었다. 효소 단백질의 약 71-75%만 각 반응 주기 후 회수되었을지라도 이들의 대부분은 효소 활성을 유지하였다. 따라서, 단백질 회수 수율에 대한 효소 활성 회수 수율의 비율로서 정의되는 안정성 지표는 0.93 내지 0.96으로 높게 관찰되었다.

[0062] 각 반응 주기 후 단백질의 유의한 손실 (25-29%)은 원심분리에 의해 pH 변화에 따른 EL100 고분자로부터 효소 단백질의 유리 뿐 아니라, 선형 α -(1,4)-글루칸 침전물로부터 효소를 함유한 상등액의 불완전한 분리에 일부 기인할 수 있다. 게다가, α -(1,4)-글루칸 응집체는 5 μ m 미만의 직경을 지닌 작은 입자를 함유하고, 느슨한 기공 구조를 나타내므로, 표면에 흡착될 뿐 아니라, 고정화된 NpAS 내로의 트래핑이 어느 정도 단백질 회수 수율을 감소시킬 수 있다.

표 1

효소	효소 활성 회수 수율(%)	단백질 회수 수율(%)	안정성 지표
고정화 NpAS	86.7 $\pm$ 0.4 ^b	95.7 $\pm$ 1.3	0.91
고정화 NpAS (1회 재사용)	70.5 $\pm$ 1.2	74.4 $\pm$ 1.3	0.95
고정화 NpAS (2회 재사용)	66.9 $\pm$ 1.5	72.2 $\pm$ 0.8	0.93
고정화 NpAS (3회 재사용)	68.8 $\pm$ 0.2	71.3 $\pm$ 0.3	0.96
고정화 NpAS (4회 재사용)	69.4 $\pm$ 0.8	72.6 $\pm$ 0.9	0.96

[0064] 표 2로부터, 고정화된 NpAS에 의해 반복적으로 생산되는 선형 α -(1,4)-글루칸의 수율은 거의 일정하였고, 고정화되지 않은 NpAS에 의해 생산되는 산물과 비교하여도 차이가 없었다.

표 2

효소	수율 (%)	HPSEC 피크	
		분자량 (M_w , kDa)	DP _{peak}
고정화되지 않은 NpAS	26.4 $\pm$ 0.4	34.6 $\pm$ 0.7	214 $\pm$ 4
NpAS	26.6 $\pm$ 0.6	36.3 $\pm$ 0.6	224 $\pm$ 3
고정화 NpAS (1회 재사용)	26.1 $\pm$ 0.3	33.7 $\pm$ 0.8	208 $\pm$ 5
고정화 NpAS (2회 재사용)	25.7 $\pm$ 0.4	29.9 $\pm$ 0.2	185 $\pm$ 1
고정화 NpAS (3회 재사용)	25.2 $\pm$ 0.5	28.8 $\pm$ 0.3	178 $\pm$ 2

[0066] <실시예 8> HPSEC을 이용한 선형 α -(1,4)-글루칸의 분자량 분포

[0067] 고정화 NpAS에 의해 생산된 선형 α -(1,4)-글루칸 산물의 특성을 조사하기 위하여 HPSEC를 통해 분자량 분포를 분석하였다.

[0068] 0.5 mL의 증류수로 동결건조된 선형 α -(1,4)-글루칸 (50 mg)을 골고루 적신 후, 4.5 mL의 디메틸설폭사이드 (DMSO)를 첨가하였다. 이러한 현탁액을 수욕상에서 1시간 동안 가열하면서 기계적으로 교반한 후, 실온에서 12시간 동안 추가적으로 교반하였다. 이러한 분산액 1 mL를 6 mL의 에탄올과 반응시켜 선형 α -(1,4)-글루칸을 침전시켰다. 7,000g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 주의깊게 제거한 후, 선형 α -(1,4)-글루칸 펠렛을 끓는 물 (10 mL)에서 재용해시키고, 끓는 수욕 상에서 30분 동안 추가적으로 교반하였다. 뜨거운 시료 용액을 시린지 필터 (0.45 μ m)를 통해 여과한 후, Shodex OHpak SB-804 및 SB-802.5 컬럼 (Showa Denko, Tokyo, Japan)을 이용하여 고성능 크기 배제 크로마토그래피 (HPSEC) 시스템 (Summit HPLC system, Dionex, USA)에 주입하여 분자량을 측정하였다.

[0069] 이때, 주입된 시료 여과액의 최종 농도는 1.0 mg/mL이었고, 주입 부피는 50 μ L이었다. RI 검출기의 온도를 30 $^{\circ}$ C로 고정하면서 상기 컬럼을 50 $^{\circ}$ C로 유지하였다. 1.0 mL/min의 유속에서 HPLC용 물 (J. T. Baker,

Phillipsburg, NJ, USA)을 사용하여 용출을 수행하였다. 글루코즈, 말토트리오즈, 말토펜타오즈, 말토헥타오즈와 P5 ($M_w = 5.8 \times 10^3$), P10 ($M_w = 11.8 \times 10^3$), P20 ($M_w = 22.8 \times 10^3$), P50 ($M_w = 47.3 \times 10^3$), P100 ($M_w = 11.2 \times 10^4$), and P200 ($M_w = 21.2 \times 10^4$)를 포함한 일련의 폴루란 표준물질 (Showa Denko, Tokyo, Japan)을 이용하여 표준 곡선을 얻었다.

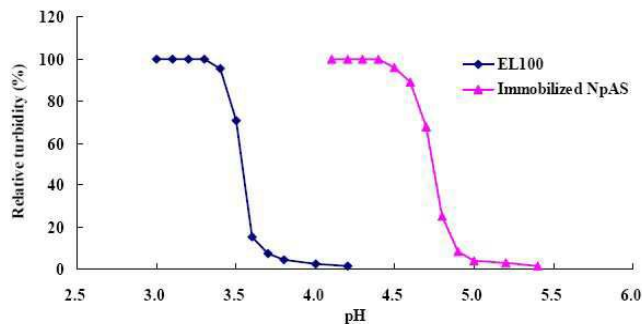
[0070] 도 5와 같이, 고정화 NpAS와 고정화되지 않은 NpAS에서 생산된 선형 α -(1,4)-글루칸 산물 모두 비슷한 HPSEC 프로파일을 나타내었으며, 분자량과 피크 용출 시간에서의 관련 DP (중합도)를 표 2에 나타내었다. 표준곡선을 기초로 하여, 고정화되지 않은 NpAS에 의해 생산된 선형 α -(1,4)-글루칸 산물은 980 내지 235,000 Da의 폭넓은 분자량 분포를 나타내며, 이는 DP 6 내지 DP 1,451의 사슬 길이 분포와 상응한다. 고정화된 NpAS에서는 최초 이용은 고정화되지 않은 NpAS와 동일한 특성을 갖는 선형 α -(1,4)-글루칸 산물을 생산하였다. 흥미롭게도 재사용 시간이 증가함에 따라 14.73 분의 솔더 피크(DP 61에 상응)에서 약간의 증가 뿐 아니라, 피크 DP에서의 약간의 감소가 관찰되었다.

[0071]

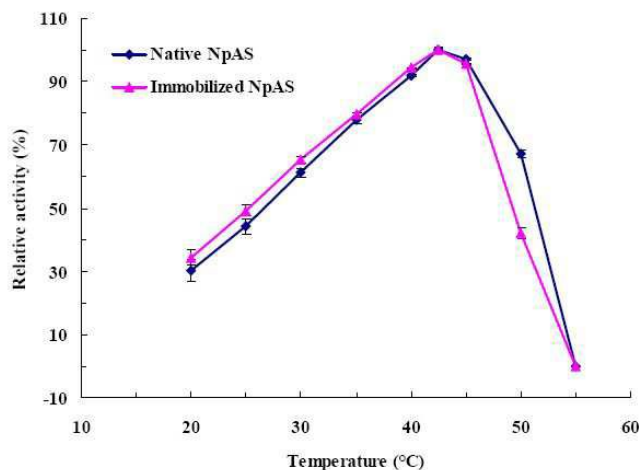
[0072] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

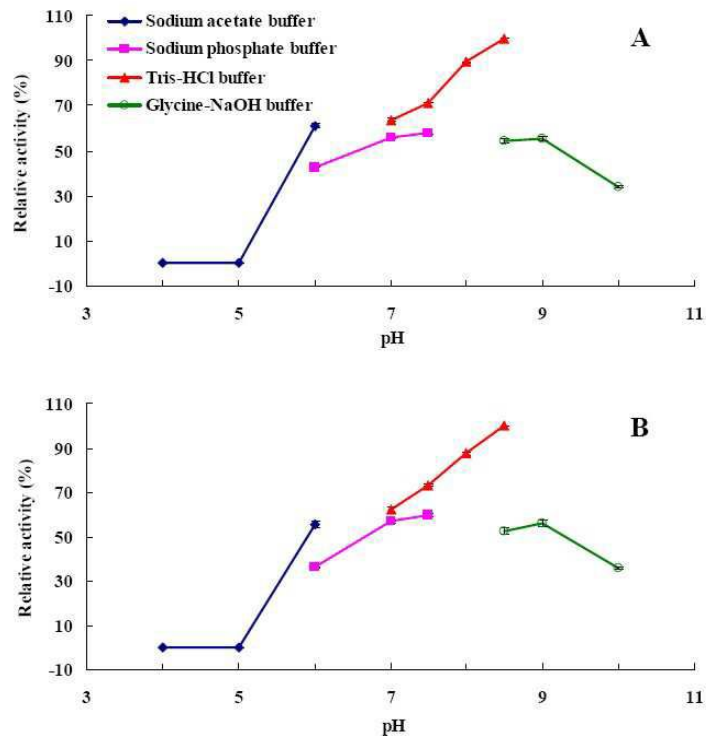
도면1



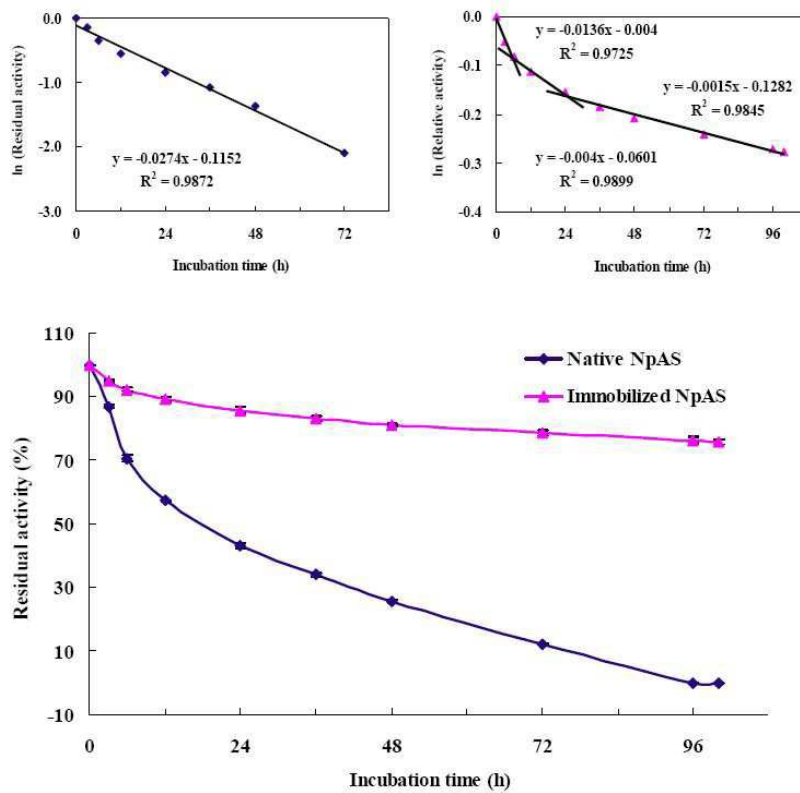
도면2



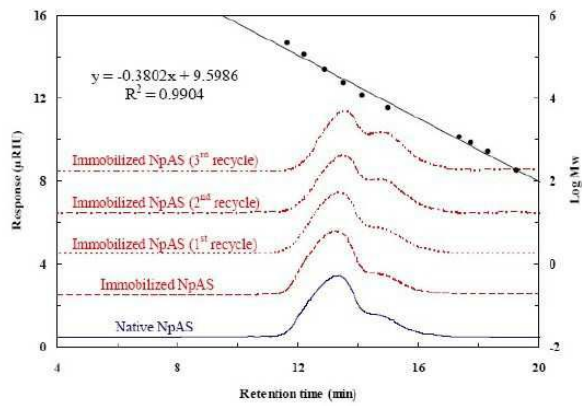
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Industry-Academia Cooperation Group Of Sejong University
 - <120> Immobilized enzyme using pH-sensitive polymer and preparation method of linear alpha-1,4-glucans using the same
 - <130> DP-2010-0649
 - <160> 2
 - <170> Kopatent In 1.71
 - <210> 1
 - <211> 28
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> NPAS1
 - <400> 1
- ggatccgatg ttgaccccca cgcagcaa
- <210> 2
 - <211> 29
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence

28

- <220><223> NPAS2
 - <400> 2
- ggcaagcttc aggcgatttc gagccacat

29