(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 11/08
C12N 11/14

(45) 공고일자 2002년11월08일
(11) 등록번호 10-0351887
(24) 등록일자 2002년08월26일

(21) 출원번호 10-1995-0705156
(22) 출원일자 1995년11월18일
번역문제출일자 1995년11월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP1994/01308
(86) 국제출원일자 1994년04월22일
(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 라트비아 마다가스카르 몽고 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로베니아 슬로바키아 트리니다드토바고 우크라이나 미국 우즈베키스탄 베트남 AP ARIPO특허 : 말라위 수단
EA 유라시아특허 : 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄
EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국 룩셈부르크 네덜란드 포르투칼 스웨덴
OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고

(65) 공개번호 특1996-0702515
(43) 공개일자 1996년04월27일
(87) 국제공개번호 WO 1994/28118
(87) 국제공개일자 1994년12월08일

(30) 우선권주장 93303917.4 1993년05월20일 EP(EP)

(73) 특허권자 로더스 크로클란 비.브이.
네덜란드 엔엘-1521 에이제트 워머비이 호게벡 1
(72) 발명자 보슬리,존,안토니
영국엔엔14 3제이티 노쓰엠프톤 케터링 이스립 케터링 로드 43
무어,스티븐,레이몬드
영국엔엔14 4유에이치 노쓰엠프톤 트랍스톤 웨인라이트 에버뉴2
(74) 대리인 주성민

*심사관 : 이처영*

**(54) 고정화리파아제**

*명세서*

*발명의 상세한 설명*

<1> 트리글리세리드, 디글리세리드, 모노글리세리드, 알킬 에스테르 또는 유리 지방산으로부터 트리글리세리드 생성 또는 기타의 에스테르 생성 및 이들 화합물을 가수분해하는 효소적 전환, 특히 유리 지방산 및 유리 알콜 또는 글리세롤의 생성은 수년 전부터 알려져 왔다.

<2> 예를 들어, 영국 특허 제 1,557,933 호에는 트리글리세리드 혼합물의 분자간 에스테르화 반응 또는 트리글리세리드와 유리 지방산의 반응에 의해 트리글리세리드를 제조하는 방법이 개시되어있다. 사용될 수 있는 효소는 무작위화 효소; 1,3-특이 효소; $\triangle^{9}$-시스 특이 효소와 같은 위치-특이 효소 등이다. 효소는 지지체 물질에 지지되어 연속 공정을 가능하게 하고, 동시에 효소의 활성도를 증가시킨다.

<3> 미합중국 특허 제 4,629,742 호 또는 유럽 특허 제 322,213 호에 따르면, 특히 효소 활성도의 향상은 효소, 바람직하게는 리파아제가 특정 공극 지름(즉, 50㎛이상)을 갖는 소수성 지지체 물질에 지지되었을 때 이루어진다. 그러나, 최상의 결과를 얻기 위해서는 효소를 고정화하는 방법에는 소수성 지지체를 극성 유기 용매로 예비처리하는 과정이 요구된다.

<4> 유럽 특허 제 424,130 호에 따르면, 소수성 지지체를 알콜로 예비처리하고, 이어서 리파아제 흡착 이전에 리파아제가 아닌 단백질을 흡착시킴으로써 더욱 향상된 효소 활성도를 얻을 수 있다.

<5> 유럽 특허 제 514,694 호에는 리파아제 주변에 미셀을 형성하기 위해 리파아제 용액에 표면 활성제를 첨가하는 캐리어 상에서의 리파아제의 고정화를 개시하고 있다. 표면 활성제는 비-이온성 표면 활성제일 수 있다. 그러나 이 제제에는 제한이 없다.

<6> 본 발명에서는 상기와 같은 용매 예비처리를 피할 수 있는지를 밝힐 목적으로 연구를 수행하였다. 본 발명의 또 다른 목적은 리파아제 효소를 어떠한 예비처리도 없이 보다 덜 복잡한 방법으로 고정화할 수 있는지를 밝히는 것인데, 반응 칼럼 자체에서 동일 반응계 고정화가 이루어질 수 있다.

<7> 본 발명의 연구 결과로서, 선행 기술에 의한 것과 대등한 효소 활성을 나타내는 신규 고정화 리

파아제 효소 조성물을 생성시키는 신규한 리파아제 고정화 방법이 고안되었다.

<8> 따라서, 본 발명은 첫째로, 소수성 지지체가 적어도 하나의 지방산 부위를 함유하며 최소한 8의 HLB(소수성 호지성 발란스; hydrophobic lipophilic balance)가를 갖는 비이온성 계면활성제와의 접촉 후에, 또는 리파아제와의 접촉과 동시에, 또는 지지체와 계면활성제의 접촉 이전에, 리파아제 효소의 수용액과 접촉시키고, 지지된 리파아제를 세척하고 세척한 물질을 건조하는 것인, 평균 공극 크기가 0.05 내지 5 ㎛인 건조, 다공성 미립자 소수성 지지체 물질장의 고정화 리파아제 효소의 제조 방법에 관한 것이다.

<9> 여기서 강조되는 것은 계면활성제가 수상에 완전히 용해되거나(맑은 용액을 형성) 또는 수상에서 안정한 현탁액을 형성(흐린 또는 불투명한 현탁액을 형성)할 수 있다는 것이다. 이 사실은 문헌[Porter's Handbook of Surfactants 1991, page 42 Ed: Blackie]에 개시되어있다.

<10> 미합중국 특허 제 4,539,294 호로부터 알 수 있듯이, 장쇄 양이온성 계면활성제는 리파아제를 고정화하는데 사용될 수 있다. 지지체로서는 Accurel® 과 같은 소수성 지지체가 언급되어 있다. 그러나, 이 방법에 의하면 극성 유기 용매 중의 계면활성제 용액이 사용되어야한다.

<11> 본 발명의 방법에 따르면, 목적하는 담지량 및 효소 활성도를 얻기 위해 지지체는 리파아제 효소의 수용액과 접촉되어야하고, 비-이온성 계면활성제는 접촉시 모든 단계에서 사용되어야한다.

<12> 가장 간단한 방법은 상기 접촉이 리파아제 효소와의 접촉과 동시에 이루어지는 것이며, 수성 리파아제 용액 또한 계면활성제를 함유하는 것이 바람직한 방법으로 표현된다. 이 방법으로, 다른 어떠한 반응물(트리글리세리드 등)도 없는 상태에서 소수성 지지체 물질이 담지된 칼럼내로 이 용액을 통과시킴으로써 고정화가 일어날 수 있기 때문에, 별도의 예비처리 단계를 피할 수 있다.

<13> 놀랍게도, 담지되고 지지된 효소를 생성시키는 지지체의 효소 담지는 고정화 과정에 있어서 1 종 이상의 지방산 부위를 포함하고, HLB-가가 8 이상인 비-이온성 계면활성제를 사용할 때에만 에스테르화 활성을 나타낸다는 사실이 발견되었다. 비-이온성 에테르 기재의 계면활성제 또는 양이온성 또는 음이온성 계면활성제의 사용으로 0의 담지량 또는 특별한 에스테르화 반응 없이 담지된 고정화 효소를 얻게 하였다.

<14> 상기한 방법에 적용될 수 있는 리파아제는 공지된 모든 리파아제이며, 칸디다안트알크티카 베타(Candida Antarctica β)와 같이 지방산과 알콜의 에스테르화 반응에 특이적인 리파아제; 휴미콜라(Humicola) 종과 같은 1,3-특이 또는 무작위 에스테르 교환 리파아제; 아마노 지(Amano G) 리파아제와 같이 부분 글리세리드의 가수분해 또는 합성에 특이적인 리파아제; 칸디다 루고사(Candida rugosa)와 같이 에스테르 또는 트리글리세리드의 가수분해에 특이적인 리파아제는 물론, $\triangle^{9}$-특이 리파아제도 사용될 수 있다. 이러한 리파아제의 예는 상기에 인용한 참고 문헌에 언급되어 있다.

<15> 소수성 지지체 물질은 미합중국 특허 제 4,629,742, 유럽 특허 제 322,213 또는 유럽 특허 제 424,130에 언급된 모든 소수성 지지체가 될 수 있다. 이들 지지체는 소수성 지지제로 되기 위해 지방족 올레핀 중합체, 산화 중합체, 이들 중합체의 혼합물 또는 예비처리된 무기 지지체로부터 선택될 수 있다. 바람직한 예비처리는 무기 물질, 바람직하게는 실리카, 알루미나, 유리 또는 세라믹을 유기 실리콘 화합물과로 실란화시켜 이루어진다.

<16> 그러나, 바람직한 지지체는 폴리스티렌, 스티렌의 공중합체, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 또는 (메트)아크릴레이트로부터 유도된 공중합체로부터 만들어진다.

<17> 비이온성 계면활성제는, 8 이상의 HLB, 바람직하게는 8 내지 20의 HLB를 가진다. 계면활성제는 또한 당(단당류, 이당류 모두와 다당류), 폴리올(예를 들어, 솔비탄 및 솔비톨) 또는 폴리에틸렌 글리콜을 계면활성제의 친수성 부분으로하여 형성될 수 있다. 비이온성 계면활성제의 다른 부분은 지방산 부위이다. 이것의 예로서는 탄소 원자 8 내지 22 개의 포화 직쇄 지방산이 있다. 매우 적합한 비이온성 계면활성제로는 특히 Tween 20® 과 같이 라우릴산으로부터 유도된 폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스테르가 있다.

<18> 수용액중에서 리파아제의 농도는 절대적이지는 않지만, 포화 농도 이하의 모든 농도가 가능하며, 지지체 물질을 기준으로 고정화 리파아제상에서, 최종 효소 농도가 1 내지 20 중량 %로 되도록하는 효소 농도로 사용할 때 바람직한 결과가 나타난다. 이와 같은 리파아제 농도는 1-1500 KLU/g, 바람직하게는 20-100 KLU/g의 담지량(KLU/g 단위로)을 나타낸다.

<19> 수용액중에서의 계면활성제의 농도는 효소에 의한 지지체의 효과적인 담지를 보장할만큼 충분하여야 한다. 계면활성제의 농도가 최소한 0.01 중량 %, 바람직하게는 0.01 내지 10 중량 %, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 5 중량 %인 수용액을 사용했을 때 매우 양호한 결과를 얻었다. 10 중량 % 이상의 계면활성제를 사용하더라도 더 유리한 결과는 얻지 못한다. 상기한 바와 같이, 이 계면활성제 용액은 또한 포화 농도까지 존재할 수 있는 용해된 리파아제 효소를 함유할 수 있다.

<20> 접촉 시간은 넓은 범위에서 다양하게 적용될 수 있다. 그러나 적합하게는, 1 내지 72 시간의 접촉 시간이 적용된다.

<21> 리파아제의 고정화는 많은 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다. 적합하게는, 지지체, 리파아제 효소 및(또는) 계면활성제 사이의 접촉은 배치 공정, 고정층에서의 연속 공정, 유동층에서의 연속 공정 또는 연속 교반 탱크에 의해 수행되며, 접촉은 리파아제 용액의 연속적인 움직임에 의해 수행된다.

<22> 고정화에 사용되는 소수성 지지체의 수분 함량은 절대적이지는 않고 대체로 매우 낮지만, 1 중량 % 미만의 수분 함량일 때 최상의 결과를 얻을 수 있음을 발견 하였다.

<23> 상기 방법을 사용하여 신규한 고정화 리파아제 효소를 제조한다. 이들 신규 지지화된 효소에서는

소량의 비이온성 계면활성제가 항상 존재한다. 이들 신규 고정화 리파아제 효소는 또한 본 발명의 일부이다.

<24> 따라서, 본 발명은 평균 공극 크기가 0.05 내지 5 ㎛인 소수성, 다공성, 건조 미립 물질상에 고정화된 리파아제 효소에 관한 것이며, 여기서 고정화 지지 효소 물질은, 적어도 하나의 지방산 부위를 함유하는 0.0001 내지 5 중량 %의 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 8 이상의 HLB, 가장 바람직하게는 8 내지 20의 HLB를 갖고, 수분 함량이 바람직하게는 10 % 이하이다.

<25> 계면활성제는 비이온성 물질이다; 바람직한 계면활성제는 특히 Tween 20®과 같이 라우릴산으로부터 유도된 폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스테르(Tweens ®)이다. 그러나, 폴리글리세롤 지방산 에스테르도 적합하다.

<26> 고정화 리파아제 효소내에서의 효소 농도는 바람직하게는 1 내지 20중량 %이다 (1-1500 KLU/g의 담지량을 나타냄).

<27> 리파아제 효소로는 선행 기술의 모든 리파아제가 가능하지만, 1) 지방산과 알콜의 에스테르화 반응에 특이적인 효소, 바람직하게는 칸디다 안트알크티카 베타(Candida Antarctica β) ; 2) 1,3-특이 또는 무작위 에스테르 교환 효소, 바람직하게는 리조뮤코 미히(Rhizomucor miehei) 또는 휴미콜라(Humicola) 종 : 3) 부분 글리세리드의 가수분해에 특이적인 효소, 바람직하게는 아마노 지(Amano G) ; 및 4) 에스테르 또는 트리글리세리드의 가수분해에 특이적인 효소, 바람직하게는 칸디다 루고사(Candida rugosa) 중에서 선택되는 효소인 고정화 리파아제 효소 물질이 선호된다.

<28> 지지체 물질은 선행 기술의 모든 소수성 지지체로부터 선택될 수 있다. 그러나, 소수성 지지체가 지방족 올레핀 중합체; 스티렌의 단일- 또는 공중합체: 산화 중합체; 상기 중합체의 혼합물; 예비처리된 무기 지지체, 바람직하게는 실리카, 알루미나, 유리 또는 세라믹과 같은 무기 지지체를 실란화한 것으로부터 선택되어지는 고정화 리파아제 효소 물질로부터 선택되었을 때 바람직한 결과가 나타난다.

<29> 지지체 물질이 스티렌의 공- 또는 단일중합체, 폴리에틸렌 또는 폴리프로필렌 중합체일 때, 최상의 고정화 리파아제 효소가 얻어진다.

<30> 지지체의 소수성에 대한 정의는 미합중국 특허 제 4,629,742 호에서 발견될 수 있고, 본 발명에서도 포함되는 것으로 간주된다. 실제로, 이 정의는 소수성 지지체 물질이 물과 접촉시 거의 물을 흡수하지 않음을 의미한다.

<31> 본 발명에 따른 고정화 리파아제 효소는 트리글리세리드, 디글리세리드 또는 에스테르의 가수분해 반응은 물론, 지방산 또는 디글리세리드 또는 트리글리세리드의 에스테르화 반응 또는 에스테르 교환 반응과 같은 모든 효소 전환 반응에 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 고정화 리파아제를 반응에 사용한다는 전제하에, 이들 반응은 또한 본 발명의 일부이다.

*실시예*

<32> **실시예**

<33> I. Tween 20을 사용한 칸디다 안트알크티카 베타의 고정화

<34> A) Tween 20 존재하의 고정화

<35> Accurel® EP100 (0.5 g)을 플라스크에 넣고, Tween 20 (0.65 s) 및 칸디다 안트알크티카 베타 리파아제 (61 mg)를 포함하는 포스페이트 완충액 (100 ml, 0.01 M, pH 7)을 가하였다. 고정화 과정은 용액의 활성도를 측정함으로써 검측되었다. 용액중의 모든 리파아제는 Accurel® 에 흡착되었다. 16 시간 후, 생촉매는 세척 및 건조되었다.

<36> B) Tween 20에 의한 예비-습윤

<37> Accurel® EP100 (0.5 g)을 플라스크에 넣고, Tween 20 (0.65 g)을 포함하는 포스페이트 완충액 (30 ml, 0.01 M, pH 7)을 가하였다. 20 분 후에, 칸디다 안트알크티카 베타 리파아제 (61.5 mg)를 포함하는 포스페이트 완충액을 가하고 고정화 과정을 수행하였다. 첨가된 모든 리파아제는 흡착되었다. 생촉매는 세척 및 건조 되었다.

<38> II 활성도 측정

<39> 미합중국 특허 제 4,629,724 호에 따라, 에스테르화 반응 활성도(표준 옥틸올레이트 합성)를 측정하고, 지지체의 에탄올 습윤에 의해 제조된 기준 촉매와 비교하였다.

| 실 시 예 | 담지량 (KLU/g) | 활성도(μmoles/min/mg) |
|---|---|---|
| I A | 21.0 | 4.9 |
| I B | 21.2 | 4.6 |
| 기 준 | 16.1 | 4.5 |

<41> 유럽 특허 제 322,213 호에 나타난 바와 같이, 담지는 효소 용액중에서 리파아제 활성도를 잃어

가며 평가되었다.

<42> III. 상이한 비이온성 계면활성제의 비교

<43> Accurel® EP100 (1.0 g)을 플라스크에 넣고, 계면활성제 (0.25 g) 및 휴미콜라 리파아제 (0.4 ml, 40,000 LU, 리포라아제 100T)를 포함하는 포스페이트 완충액 (50 ml, 0.01 M, pH 7)을 가하였다. 16 시간 후, 상등액에 존재하는 리파아제 활성도를 측정함으로써 흡착된 리파아제의 양을 결정하였다. 증류수(4x300 ml)로 반복 세척한 후에 촉매를 상온의 진공하에서 건조하고, 옥틸 올레이트 합성 분석법을 이용하여 에스테르화 반응의 활성도를 결정하였다.

<44> 1. 에스테르

| 계면활성제 | HLB | 리파아제 담지량 (KLU/g) | 에스테르화 반응의 활성도 (μmoles/min/mg) |
|---|---|---|---|
| TWEEN 20 | 16.7 | 32.8 | 0.14 |
| TWEEN 65 | 10.5 | 27 9 | 0.20 |
| TWEEN 80 | 15.0 | 31.8 | 0.27 |
| TWEEN 85 | 11.0 | 34.1 | 0.21 |
| PEG 400 모노스테아레이트 | 11 2 | 22.5 | 0.15 |

<46> 2. 에테르 기재의 비이온성 계면활성제를 사용하는 비교 실시예;

| 계면활성제 | HLB | 리파아제 담지량 (KLU/g) | 에스테르화 반응의 활성도 (μmoles/min/mg) |
|---|---|---|---|
| SYNPERONIC NP5 | 10.5 | 24.5 | 0 |
| SYNPERONIC NP10 | 13.3 | 35.1 | 0 |
| SYNPERONIC NP30 | 17.1 | 34.5 | 0 |
| BRIJ 30 | 9.7 | 0 | 0 |
| BRIJ 35 | 16.9 | 0 | 0 |
| BRIJ 56 | 12.9 | 0 | 0 |
| BRIJ 76 | 12.4 | 0 | 0 |
| Nonidet P40 | - | 27 8 | 0 |

<48> 비교 실시예 IV

<49> Accurel® EP100 (1.0 g)을 플라스크에 넣고, 계면활성제 (0.25 g) 및 휴미콜라 리파아제 (0.4 ml, 40,000 LU, 리포라아제 100T)를 포함하는 포스페이트 완충액(50 ml, 0.01 M, pH 7)을 가하였다. 16 시간 후, 상등액에 존재하는 리파아제 활성도를 측정함으로써 흡착된 리파아제의 양을 결정하였다. 증류수(4×300 ml)로 반복 세척한 후에 촉매를 상온의 진공하에서 건조하고, 옥틸 올레이트 합성 분석법을 이용하여 에스테르화 반응의 활성도를 결정하였다.

<50> 1. 음이온성 계면활성제

| 계면활성제 | 리파아제 담지량 (KLU/g) | 에스테르화 반응의 활성도 (μmoles/min/mg) |
|---|---|---|
| AOT[1] | 7.4 | 0 |
| SDS[2] | 0 | 0 |
| 나트륨 라우레이트 | 5.7 | 0 |

<52> [1] AEROSOL, OT

<53> [2] 나트륨 도데실 술페이트

<54> 2. 양이온성 계면활성제

<55> 사용되는 완충액이 Tris/HCl, 0.01 M, pH 7인 것을 제외하면 상기와 같다.

| | | |
|---|---|---|
| CTAB[1] | 21.0 | 0 |
| 도데실아민 | 25.5 | 0 |

<57> [1] 세틸 트리메틸암모늄 브로마이드

<58> 실시예 V

<59> Accurel® EP100 (1.0 g)을 플라스크에 넣고, Tween 20 (0.5 g) 및 리파아제(표 참조)를 포함하는 포스페이트 완충액 (100 ml, 0.01 M, pH 7)을 가하였다. 16 시간 후, 상등액에 존재하는 리파아제 활성도를 측정함으로써 흡착된 리파아제의 양을 결정하였다. 증류수(4×300 ml)로 반복 세척한 후에 촉매를 상온의 진공하에서 건조하고, 옥틸 올레이트 합성 분석법을 이용하여 에스테르화 반응의 활성도를 결정하였다.

| 리 파 아 제 | 리파아제 첨가된 KLU | 리파아제담지량 (KLU/g) | 에스테르화 반응의 활성도 (μmoles/min/mg) |
|---|---|---|---|
| 휴미콜라[1] | 87.2 | 83.3 | 1.18 |
| 리조뮤코 미히[2] | 21.9 | 19.2 | 0.70 |
| 칸디다 안트알크티카 베타[3] | 21.0 | 21.0 | 4.86 |

<61> [1] 리포라아제 100T, 1.0 ml, 85 KLU/ml

<62> [2] 리포자임 10,000 L, 2.0 ml, 10.5 KLU/ml

<63> [3] SP 434, 60 mg, 180 KLU/g

<64> 모든 리파아제는 노보-노르디스크

<65> 실시예 VI

<66> 비이온성 계면활성제, 동시-고정화

<67> C. 계면활성제 농도

<68> 방법

<69> Accurel® EP100 (1.0 g)을 플라스크에 넣고, TWEEN 20 (표 참조)과 휴미콜라 리파아제 (0.45 ml, 43,000 LU, 리포라아제 100T)를 포함하는 포스페이트 완충액 (50 ml, 0.01 M, pH 7)을 가하였다. 16 시간 후, 상등액에 존재하는 리파아제 활성도를 측정함으로써 흡착된 리파아제의 양을 결정하였다. 증류수(4×300 ml)로 반복 세척한 후에 촉매를 상온의 진공하에서 건조하고, 옥틸 올레이트 합성 분석법을 이용하여 에스테르화 반응의 활성도를 결정하였다.

| 계면활성제 농도 % 중량/체적 용액 | 리파아제 담지량 (KLU/g) | 에스테르화 반응의 활성도 (μmoles/min/mg) |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 |
| 0.042 | 9.6 | 0.01 |
| 0.140 | 22.2 | 0.12 |
| 0.350 | 40.4 | 0.24 |
| 0.5 | 38.1 | 0.33 |
| 0.7 | 40.7 | 0.42 |
| 1.4 | 37.5 | 0.41 |

<71> 실시예 VII

<72> 비이온성 계면활성제, 동시-고정화

<73> D. 지지체 유형

<74> 방법

<75> 지지체 (1.0 g)을 플라스크에 넣고, TWEEN 20 (0.25 g)과 휴미콜라 리파아제 (0.45 ml, 43,000 LU, 리포라아제 100T)를 포함하는 포스페이트 완충액 (50 ml, 0.01 M, pH 7)을 가하였다. 16 시간 후, 상등액에 존재하는 리파아제 활성도를 측정함으로써 흡착된 리파라제의 양을 결정하였다. 증류수(4×300 ml)로 반복 세척한 후에 촉매를 상온의 진공하에서 건조하고, 옥틸 올레이트 합성 분석법을 이용하여 에스테르화 반응의 활성도를 결정하였다.

| 지 지 체 | 계면활성제 중량 (g) | 리파아제 담지량 (KLU/g) | 에스테르화 반응의 활성도 (μmoles/min/mg) |
|---|---|---|---|
| 폴리스티렌[1] | 0 | 18.0 | 0.13 |
| 폴리스티렌[1] | 0.25 | 39.6 | 0.66 |
| 소수성 실리카[2] | 0 | 0 | 0 |
| 소수성 실리카[2] | 0.25 | 39.7 | 0.22 |

<77> [1] D2479, 영국 소재, 푸롤리트 리미티드(Prolite Ltd.)사 제공, 마크로(macro)다공성 폴리스티렌.

<78> [2] XWP 1500, 영국 소재, 그레이스(Grace)사 제공, 마크로(macro)다공성 실리카, 디클로로디메틸실란으로 처리하여 생긴 소수성.

<79> 실시예 VIII

<80> 계면활성제 유형, 예비-습윤

<81> 방법

<82> Accurel® EP100 (2.0 g)을 플라스크에 넣고, 계면활성제 (0.5 g)을 포함하는 포스페이트 완충액 (100 ml, 0.01 M, pH 7)을 가하였다. 16 시간동안의 온화한 교반 후에, 지지체를 여과에 의해 분리하고 증류수(1000 ml)로 세척하였다. 습윤 지지체를 플라스크에 넣고, 여기에 휴미콜라 리파아제 (리포라아제 100T, 180 KLU)를 포함하는 포스페이트 완충액 (200 ml, 0.01 M, pH 7)을 가하였다. 상등액에 존재하는 리파아제 활성도를 측정함으로써 흡착된 리파아제의 양을 결정하였다. 16 시간 후, 촉매를 증류수 (4x300 ml)로 세척하고 상온의 진공하에서 건조하였다. 옥틸 올레이트 합성 분석법을 이용하여 효소의 활성도를 결정하였다.

<83> 1. 에스테르

| 계면활성제 | HLB | 리파아제 담지량 (KLU/g) | 에스테르화 반응의 활성도 (μmoles/min/mg) |
|---|---|---|---|
| TWEEN 20 | 16.7 | 91.1 | 1.15 |
| TWEEN 65 | 10.5 | 76.9 | 1.01 |
| TWEEN 80 | 15.0 | 76.6 | 1.29 |

<85> 2. 에테르

| 계면활성제 | HLB | 리파아제 담지량 (KLU/g) | 에스테르화 반응의 활성도 (μmoles/min/mg) |
|---|---|---|---|
| BRIJ 30 | 9.7 | 0 | 0 |
| BRIJ 35 | 16.9 | 69.3 | 0 |
| SYNPERONIC NP30 | 17.1 | 88.5 | 0 |

<87> 계면활성제 - 화학적 조성 및 제조자

| 계면활성제 | 화학적 조성[1] | 제 조 자[2] |
|---|---|---|
| BRIJ 30 | 폴리옥시에틸렌 (4) 라우릴 에테르 | 아트라스 파우더 (Atlas Powder) |
| BRIJ 35 | 폴리옥시에틸렌 (23) 라우릴 에테르 | 아트라스 파우더 (Atlas Powder) |
| BRIJ 56 | 폴리옥시에틸렌 (10) 세틸 에테르 | 아트라스 파우더 (Atlas Powder) |
| BRIJ 76 | 폴리옥시에틸렌 (10) 스테아릴 에테르 | 아트라스 파우더 (Atlas Powder) |
| SYNPERONIC NP5 | 폴리옥시에틸렌 (10) 노닐페닐 에테르 | 아이. 씨. 아이. (I.C.I ) |
| SYNPERONIC NP10 | 폴리옥시에틸렌 (10) 노닐페닐 에테르 | 아이. 씨. 아이 (I.C.I.) |
| SYNPERONIC NP30 | 폴리옥시에틸렌 (30) 노닐페닐 에테르 | 아이. 씨. 아이. (I.C.I.) |
| Nonidet P40 | 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르 | 쉘 케미칼즈 (Shell Chemicals) |
| TWEEN 20 | 폴리옥시에틸렌 (20) 솔비탄 모노라우레이트 | 아트라스 케미칼즈 (Atlas Chemicals) |
| TWEEN 65 | 폴리옥시에틸렌 (20) 솔비탄 트리스테아레이트 | 아트라스 케미칼즈 (Atlas Chemicals) |
| TWEEN 80 | 폴리옥시에틸렌 (20) 솔비탄 모노올레이트 | 아트라스 케미칼즈 (Atlas Chemicals) |
| TWEEN 85 | 폴리옥시에틸렌 (20) 솔비탄 트리올레이트 | 아트라스 케미칼즈 (Atlas Chemicals) |
| PEG 400 모노스테아레이트 | 폴리에틸렌 글리콜 400 모노스테아레이트 | 우니케마 비브이사 제공 (Unichema BV) |
| Aerosol OT | 나트륨 술포숙신산의 디옥틸 에스테르 | 비디에이치사 제공 (BDH, Poole, UK) |

<89> [1] 괄호 안의 숫자는 폴리옥시에틸렌 사슬내의 반복 단위의 개수이다.

<90> [2] 다른 지시가 없는 한 모든 계면활성제는 영국 소재, 플루카 케미칼즈(Fluka Chemicals)사에 의해 제공된다.

## *(57) 청구의 범위*

### 청구항 1

고정화 지지된 리파아제 효소 물질이, 하나 이상의 지방산 부위를 함유하며 HLB-가가 8 이상인 0.0001 내지 5 중량 %의 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 고정화된 리파아제의 수분 함량이 바람직하게는 10 중량% 이하인, 평균 공극 크기가 0.05 내지 5 ㎛인 소수성, 다공성, 건조 미립 물질상에 고정화된 리파아제 효소 물질.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 계면활성제가 폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스테르 또는 폴리글리세롤 지방산 에스테르인 고정화 리파아제 효소 물질.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 지지체 물질을 기준으로한, 효소 농도가 1 내지 20 중량%인 고정화 리파아제 효소 물질.

### 청구항 4

제1 또는 2항에 있어서, 효소가 1) 지방산과 알콜의 에스테르화 반응에 특이적인 효소, 2) 1,3-특이 또는 무작위 에스테르 교환 효소, 3) 부분 글리세리드의 가수분해에 특이적인 효소, 및 4) 에스테르 또는 트리글리세리드의 가수분해에 특이적인 효소로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 고정화 리파아제 효소 물질.

**청구항 5**

제1 또는 2항에 있어서, 소수성 지지체가:

-지방족 올레핀계 중합체;

-스티렌의 단일- 또는 공중합체

-산화 중합체;

-상기 중합체의 혼합물: 및

-예비처리된 무기 지지체로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 고정화 리파아제 효소 물질.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 지방족 올레핀 중합체가 폴리에틸렌 또는 폴리프로필렌인 고정화 리파아제 효소 물질.

**청구항 7**

소수성 지지체를, 하나 이상의 지방산 부위를 함유하며 8 이상의 HLB-가를 갖는 비이온성 계면활성제와의 접촉 후에, 또는 리파아제와의 접촉과 동시에, 또는 지지체와 계면활성제의 접촉 이전에, 리파아제 효소의 수용액과 접촉시키고, 지지된 리파아제를 세척하고 세척한 물질을 건조하는 것인, 평균 공극 크기가 0.05 내지 5 ㎛인 건조, 다공성 미립자 소수성 지지체 물질상에 고정화된 리파아제 효소의 제조 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 리파아제의 수용액이 사용되며, 리파아제의 농도가 포화 농도 이하인 방법.

**청구항 9**

제7항에 있어서, 소수성 지지체가 계면활성제의 농도가 0.01 내지 10 중량 %이며, 또한 임의로는 포화 농도 이하로 용해된 리파아제를 함유하는 계면활성제 수용액과 접촉하는 것인 방법.

**청구항 10**

제7 내지 9항 중 어느 한 항에 있어서, 수성 리파아제 용액과 지지체 물질 사이의 접촉 시간이 1 내지 72 시간인 방법.

**청구항 11**

제7항에 있어서, 지지체, 리파아제 효소 및(또는) 계면활성제 사이의 접촉이 배치 공정, 고정층에서의 연속 공정, 유동층에서의 연속 공정 또는 연속 교반 탱크에 의해 수행되며, 접촉이 리파아제 용액의 연속적인 움직임에 의해 수행되는 것인 방법.

**청구항 12**

제7항에 있어서, 사용되는 소수성 지지체 물질의 수분 함량이 1 중량 % 미만으로 사용되는 방법.

**청구항 13**

제1항 또는 2항에 따른 고정화되어 지지된 리파아제 효소의 존재하에 반응이 수행되는, 트리글리세리드, 디글리세리드 또는 에스테르의 가수분해 반응, 또는 지방산 또는 디글리세리드 또는 트리글리세리드의 에스테르화 반응 또는 에스테르 교환 반응을 위한 방법.

**청구항 14**

제 4항에 있어서, 효소가 1) 칸디다 안트알크티카 베타(Candida Antarctica β), 2) 리조뮤코 미히(Rhizomucor miehei) 또는 휴미콜라(Humicola)종, 3) 아마노 지(Amano G), 및 4) 칸디다 루고사(Candida rugosa)로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 고정화 리파아제 효소 물질.

**청구항 15**

제 5항에 있어서, 예비처리된 무기 지지체가 실리카, 알루미나, 유리 및 세라믹으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 고정화 리파아제 효소 물질.

*요약*

본 발명은 소수성 지지체 물질상에 효소를 고정화시키는 새로운 방법에 관한 것이다. 이 방법에서는 비-이온성 계면활성제가 사용된다. 상기 방법의 결과로 소수성 지지체 상에 신규한 고정화 리파아제가 생성된다.