

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0002384 (43) 공개일자 2011년01월07일
(51) Int. Cl. <i>C12N 11/14</i> (2006.01) <i>C12N 9/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0059961 (22) 출원일자 2009년07월01일 심사청구일자 2009년07월01일	(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내 (72) 발명자 이중현 광주광역시 동구 학동 아남아파트 101-1807호 김려화 광주광역시 남구 방림동 436-1 삼일아파트 3동 505호 (74) 대리인 우길제	

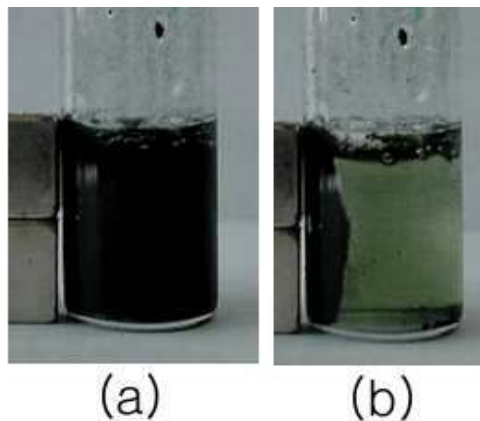
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 고정화 효소 제조방법

(57) 요약

본 발명에서는, 나노수준과 같은 작은 입자크기를 가지면서도 반응혼합물로부터 용이하게 분리될 수 있는 고정화 효소를 제조하기 위한 개선된 고정화 효소 제조 방법을 제공하고자 한다. 본 발명에서 제공하는 고정화 효소 제조 방법은, (a) 자성입자의 존재하에서 아닐린 단량체를 중합하여, 자성 폴리아닐린 입자를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 자성 폴리아닐린 입자와 효소를 크로스링커(cross-linker)를 매개체로 하여 결합시키므로써, 상기 효소를 상기 자성 폴리아닐린 입자에 담지시키는 단계;를 포함한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

본 발명에서 제공하는 고정화 효소 제조 방법은,

- (a) 자성입자의 존재하에서 아닐린 단량체를 중합하여, 자성 폴리아닐린 입자를 생성시키는 단계; 및
- (b) 상기 자성 폴리아닐린 입자와 효소를 크로스링커(cross-linker)를 매개체로 하여 결합시키므로써, 상기 효소를 상기 자성 폴리아닐린 입자에 담지시키는 단계;

를 포함하는 고정화 효소 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 크로스링커는, 폴리아닐린의 아민기와 이미노(imino) 결합을 할 수 있는 작용기; 및, 효소의 아민기와 이미노(imino) 결합을 할 수 있는 작용기를 갖는 화합물인 것을 특징으로 하는 고정화 효소 제조 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 크로스링커는, 글루타르알데하이드(glutaraldehyde), EDC(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride), 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 고정화 효소 제조 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 효소는, 가수분해효소, 전이효소, 분해효소, 이성질화효소 또는 합성효소인 것을 특징으로 하는 고정화 효소 제조 방법.

청구항 5

자성 폴리아닐린 입자; 및

크로스링커(cross-linker)를 매개체로 하여 상기 자성 폴리아닐린 입자에 결합된 효소;를

포함하는 고정화 효소.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 고정화 효소의 입자크기가 50 nm 내지 1000 nm 인 것을 특징으로 하는 고정화 효소.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고정화 효소 (immobilized enzyme) 제조방법 및 고정화 효소에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 대체에너지 개발의 필요성이 대두됨에 따라, 바이오 에탄올을 생산하는 공정이 개발되고 있다. 그러나, 대부분의 바이오 에탄올 생산 공정이 식량 유래의 탄소원을 사용함에 따라, 식량가격의 상승으로 경제적인 부담이 증가하고 있다. 이러한 문제의 해결을 위해, 비곡물 유래의 바이오 에탄올 생산을 위한 기술개발이 시도되고 있다. 그러한 대안 중의 하나가 해조류를 이용한 바이오 에탄올 생산이다.

[0003] 해조류는 대기 중의 이산화탄소를 저감시킬 수 있는 유력한 수단 중의 하나인 것으로 주목받고 있다. 즉, 바다에서 해조류를 배양하면, 해조류는 그 생육과정에서 대기 중의 이산화탄소를 흡수한다. 대부분의 해조류는 1년 생으로서 1년 동안 80 cm 이상 자라며 질량도 크게 늘어난다. 해조류를 이용한 이산화탄소 저감이 지속가능하기 위해서는, 생육된 해조류가 수확되어야 하고, 수확된 해조류는 소비되어야 한다. 따라서, 다량으로 수확되는 해

조류를 산업적으로 이용할 수 있는 방안을 강구하는 것이 필요하다. 그러한 대안 중의 하나가 해조류를 이용한 바이오 에탄올 생산이다.

[0004] 해조류를 이용한 바이오 에탄올 생산 공정의 효율성은, 해조류에 함유된 다당류를 먼저 단당류로 가수분해함으로써, 제고될 수 있다. 또한, 다당류의 가수분해는 효소와 같은 생체촉매를 이용하는 생물화학공정에 의하여 효과적으로 이루어질 수 있다.

[0005] 이러한 생물화학공정은, 산업적 수요에 부응하기 위해서, 대규모로 운영될 필요가 있다. 생물화학공정을 대규모로 운영하기 위해서는 다량의 효소가 필요하다. 효소를 1회용으로 소모한다면, 효소를 생체촉매로서 사용하는 생물화학공정의 경제성이 심각하게 저하될 수 있다. 따라서, 효소를 여러 번 재사용하기 위한 효소 고정화 기술의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0006] 효소의 고정화는, 효소가 생물화학공정의 반응혼합물로부터 용이하게 분리될 수 있도록 하기 위하여, 담체에 효소를 담지시키는 것을 의미한다. 그에 따라, 담체에 담지된 효소를 "고정화 효소 (immobilized enzyme)"라 부른다. 담체는 입자크기가 크므로, 고정화 효소는 반응혼합물로부터 용이하게 분리될 수 있다. 또한, 담체는 입자크기가 크므로, 고정화 효소는 고정상 베드에 용이하게 고정될 수 있다. 따라서, 고정화 효소는 회분식 반응기뿐만아니라 연속식 반응기에도 이용될 수 있다. 이러한 고정화 효소의 예가 WO 2007/104268 호 등에 개시되어 있다.

[0007] 그러나, 종래의 고정화 효소에 있어서는, 효소가 입자크기가 큰 담체에 담지됨에 따라, 담체 내부 깊숙히 담지된 효소는 반응에 참여하기가 어려워지게 된다. 결국, 종래의 고정화 효소의 실질 활성은, 담지된 효소의 총 활성보다 저하될 수 밖에 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 종래의 고정화 효소에서 발생하는 상기의 문제점은, 입자크기가 작은, 예를 들어 나노수준의 크기의 담체를 사용함으로써 해결될 수 있다. 그러나, 담체의 입자크기가 작아질수록, 고정화 효소의 실질 활성은 증가하겠지만, 고정화 효소를 반응혼합물로부터 분리하기가 더욱 어려워진다. 따라서, 나노수준과 같은 작은 입자크기의 담체를 사용하게 되면, 고정화 효소의 본래의 목적(즉, 재이용을 위하여 반응혼합물로부터 용이하게 분리될 수 있을 것)을 달성하기가 어렵게 된다.

[0009] 그리하여, 본 발명에서는, 나노수준과 같은 작은 입자크기를 가지면서도 반응혼합물로부터 용이하게 분리될 수 있는 고정화 효소를 제조하기 위한 개선된 고정화 효소 제조 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

[0010] 본 발명에서 제공하는 고정화 효소 제조 방법은,

[0011] (a) 자성입자의 존재하에서 아닐린 단량체를 중합하여, 자성 폴리아닐린 입자를 생성시키는 단계; 및

[0012] (b) 상기 자성 폴리아닐린 입자와 효소를 크로스링커(cross-linker)를 매개체로 하여 결합시키므로써, 상기 효소를 상기 자성 폴리아닐린 입자에 담지시키는 단계;

[0013] 를 포함한다.

[0014] 본 발명에서 제공하는 고정화 효소는,

[0015] 자성 폴리아닐린 입자; 및

[0016] 크로스링커(cross-linker)를 매개체로 하여 상기 자성 폴리아닐린 입자에 결합된 효소;를

[0017] 포함한다.

[0018] 이하에서는, 본 발명의 고정화 효소 제조 방법을 상세하게 설명한다.

[0019] 본 발명의 고정화 효소 제조 방법은,

[0020] (a) 자성입자의 존재하에서 아닐린 단량체를 중합하여, 자성 폴리아닐린 입자를 생성시키는 단계; 및

- [0021] (b) 상기 자성 폴리아닐린 입자와 효소를 크로스링커(cross-linker)를 매개체로 하여 결합시키므로써, 상기 효소를 상기 자성 폴리아닐린 입자에 담지시키는 단계;
- [0022] 를 포함한다.
- [0023] (a)단계에서는, 자성입자의 존재하에서 아닐린 단량체를 중합시킨다. 예를 들어, 자성입자가 현탁되어 있는 반응매질 상에서 아닐린 단량체를 중합시킨다. 그리하여, 아닐린 단량체가 중합되어 폴리아닐린 입자를 형성하는 과정에서, 반응매질 상에 현탁되어 있는 자성입자가 폴리아닐린 입자 내로 혼입된다. 또는, 자성입자를 핵으로 하여, 자성입자의 표면에서 폴리아닐린이 성장하므로써, 자성입자가 폴리아닐린으로 코팅될 수 있다. (a)단계에서 생성되는 폴리아닐린 입자는, 폴리아닐린 입자에 혼입된 자성입자로 인하여, 자성을 띠게 된다.
- [0024] 자성입자로서는, 예를 들면, Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , CoFe_2O_4 , MnFe_2O_4 , FePt , CoPt , Fe_3S_4 , 등이 사용될 수 있다. 자성입자의 입자크기는, 예를 들면, 약 20 nm 내지 약 500 nm 일 수 있다. 이러한 범위의 입자크기를 갖는 자성입자는 자성나노입자의 범주에 속한다.
- [0025] 자성입자의 사용량은, 예를 들면, 아닐린 단량체 100 중량부를 기준으로 하여, 약 0.67 중량부 내지 약 1.33 중량부일 수 있다. 자성입자의 사용량이 너무 작으면, 제조된 고정화 효소에 충분한 자성을 부여하기가 어렵다. 자성입자의 사용량이 너무 크면, 폴리아닐린 입자에 혼입되지 않고 유리되는 자성입자의 양이 과도하게 증가한다.
- [0026] 아닐린의 중합반응은 중합개시제에 의하여 용이하게 개시될 수 있다. 또한, 아닐린의 중합반응은 촉매에 의하여 촉진될 수 있다. 따라서, (a)단계는, 중합개시제, 촉매, 또는 이들의 조합을 함유하는 반응매질 상에서 진행될 수 있다.
- [0027] 중합개시제로서는, 예를 들면, 무기과산화물, 유기과산화물, 하이드로 과산화물, 아조화합물, 산화환원제, 유기금속시약, 등이 사용될 수 있다. 구체적인 예를 들면, 중합개시제로서, 암모늄퍼옥시디설페이트, 암모늄퍼설페이트, 포타슘퍼설페이트, 포타슘디크로메이트, 포타슘퍼망가네이트, 페릭클로라이드, 삼염화철, 이염화구리, 과황산칼륨, 과산화수소, 이산화망간, 중크롬산칼륨, 요오드산칼륨, 염화제2철, 과망간산칼륨, 브롬산칼륨, 염소산칼륨 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다.
- [0028] 촉매로서는, 예를 들면, 산촉매, 등이 사용될 수 있다. 구체적인 예를 들면, 촉매로서, 염산, 황산, 질산, 인산, 메틸설포산, 도데실벤젠설포산, 클로로설포산, 트리플루오로설포산 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다.
- [0029] 반응매질로서는, 예를 들면, 물, 완충용액, 유기용매, 이온성 액체(ionic liquid), 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다. 완충용액으로서는, 예를 들면, 포스페이트 버퍼(osphate buffer), 트리스 버퍼(tris buffer), 글리신 버퍼(glycine buffer) 등이 사용될 수 있다. 유기용매로서는, 예를 들면, THF(tetrahydrofuran), DMF(dimethylformamide) 등이 사용될 수 있다. 이온성 액체로서는, 예를 들면, 1-부틸-4-메틸피리디늄 테트라플루오로보레이트(1-Butyl-4-methylpyridinium tetrafluoroborate), 1,3-디메틸이미다졸리움 메틸 설페이트(1,3-Dimethylimidazolium methyl sulfate), 테트라펜틸암모늄 티오시아네이트(Tetrapentylammonium thiocyanate), 테트라부틸포스포늄 p-톨루엔설포네이트(Tetrabutylphosphonium p-toluenesulfonate), 1-(3-시아노프로필)-3-메틸이미다졸리움 클로라이드(1-(3-Cyanopropyl)-3-methylimidazolium chloride), 등이 사용될 수 있다.
- [0030] 수계의 반응매질을 사용하는 경우, (a)단계의 중합반응은 교반기에 의한 현탁중합의 형태를 띌 수 있다. 또는, 수계의 반응매질을 사용하는 경우, (a)단계의 중합반응은 유화제의 첨가에 의한 유화중합의 형태를 띌 수 있다. 유화제로서는, 예를 들면, 알킬설포산, 알킬벤젠설포산, 알킬카르복실산, 알킬나프탈렌설포산, 알킬아민, 알킬 3급 아민, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 플루오로알킬카르복실산, 퍼플루오로알킬 카르복실산, 퍼플루오로알킬벤젠설포산, 퍼플루오로알킬 3급 암모늄, 퍼플루오로알킬폴리옥시에틸렌 에탄올, 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다.
- [0031] (a)단계의 반응온도는 특별히 한정되지 않는다. (a)단계의 반응은 상온에서도 효과적으로 잘 진행되므로, 굳이 높은 온도에서 진행시킬 필요는 없다. 예를 들면, (a)단계의 반응온도는 약 20 °C 내지 약 40 °C 일 수 있다.
- [0032] (a)단계의 반응시간도 특별히 한정되지 않는다. 다만, (a)단계의 반응시간에 따라 자성 폴리아닐린 입자의 크기가 증가할 수 있으므로, 원하는 입자크기를 얻기 위하여 (a)단계의 반응시간을 적절히 조절할 수 있다. (a)단계

의 반응시간은, 예를 들면, 약 30 분 내지 약 90 분일 수 있다.

- [0033] (a)단계에서 생성되는 자성 폴리아닐린 입자의 입자크기는, 예를 들면, 약 50 nm 내지 약 1000 nm 일 수 있다. 바람직하게는, (a)단계에서 생성되는 자성 폴리아닐린 입자의 입자크기는, 약 100 nm 내지 약 500 nm 일 수 있다. 자성 폴리아닐린 입자의 크기가 너무 작으면, 자석을 사용하더라도, 자성 폴리아닐린 입자를 분리하는데 소요되는 시간이 과도하게 길어질 수 있다. 자성 폴리아닐린 입자의 크기가 너무 크면, 비표면적이 작아지므로 많은 효소를 고정화 하기에 적합하지 않을 수 있다. 자성 폴리아닐린 입자의 크기는 (a)단계의 반응시간을 적절히 선택함으로써 조절될 수 있다. 또한, 제조된 자성 폴리아닐린 입자의 크기가 과도하면, 예를 들어, 초음파 분쇄와 같은 분쇄방법을 이용하여 원하는 크기로 조절 수도 있다.
- [0034] (a)단계에서 제조된 자성 폴리아닐린 입자는, 산화철 분말이 폴리아닐린 나노파이버에 끼워 들어가는 형태, 또는, 산화철 입자의 표면에 폴리아닐린이 코팅된 형태를 가질 수 있다.
- [0035] (b)단계에서는, (a)단계에서 얻은 자성 폴리아닐린 입자와 효소를 크로스링커(cross-linker)를 매개체로 하여 결합시키므로써, 상기 효소를 상기 폴리아닐린 자성입자에 담지시킨다.
- [0036] 크로스링커는, 폴리아닐린의 아민기에 대하여, 예를 들면 이미노(imino) 결합에 의하여 결합할 수 있는 작용기(ex. 아민기); 및, 효소의 아민기에 대하여, 예를 들면, 이미노(imino) 결합에 의하여 결합할 수 있는 작용기(ex. 아민기)를 갖는 화합물을 의미한다. 크로스링커로서는, 예를 들면, 글루타르알데하이드(glutaraldehyde), EDC(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride), 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다.
- [0037] 효소로서는, 예를 들면, 가수분해효소, 산화환원효소, 전이효소, 분해효소, 이성질화효소, 합성효소, 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다. 가수분해효소로서는, 예를 들면, 라이신엔자임(lysing enzyme), 인버타제, 아밀라아제, 말타아제, 수크라아제, ATPase, 셀룰라제 등이 사용될 수 있다. 산화환원효소로서는, 예를 들면, 옥시다아제, 탈수소효소, 글루코스옥시다제 등이 사용될 수 있다. 전이효소로서는, 예를 들면, 크레아틴키나아제, 아미노기전이효소, 등이 사용될 수 있다. 분해효소로서는, 예를 들면, 카탈라아제, 카복실라아제, 젖산분해효소, 설탕분해효소 등이 사용될 수 있다. 이성질화효소로서는, 예를 들면, 6탄당 인산이성질화효소, 라이페이즈 등이 사용될 수 있다. 합성효소로서는, 예를 들면, 시트르산 합성효소, 글루탐산 합성효소, 에스테르 합성효소 등이 사용될 수 있다.
- [0038] 바람직하게는, 효소로서, 효소활성 부위 부근에 아민작용기가 적게 위치하고 있는 효소가 사용될 수 있다. 효소활성 부위 부근에 아민 작용기가 많으면, 효소활성 부위가 고정화시 막혀버리므로, 효소의 기능을 하기가 어렵게 될 수 있다. 그리하여, 바람직하게는, 효소로서, 예를 들면, 가수분해효소, 전이효소, 분해효소, 이성질화효소, 합성효소가 사용될 수 있다.
- [0039] (b)단계는, 예를 들면, 버퍼용액, 물, 유기용매, 이온성 액체 등과 같은 반응매질 상에서 수행될 수 있다. 버퍼용액으로서, 예를 들면, 시트레이트-포스페이트 버퍼, 트리스(tris)-버퍼, 글리신(glycine)-버퍼 등이 사용될 수 있다. 유기용매로서는, 예를 들면, 아세톤, 헥산, 옥탄올, 에탄올, 메탄올 등이 사용될 수 있다. 이온성 액체로서는, 예를 들면, 1-부틸-4-메틸피리디늄 테트라플루오로보레이트(1-Butyl-4-methylpyridinium tetrafluoroborate), 1,3-디메틸이미다졸리움 메틸 설페이트(1,3-Dimethylimidazolium methyl sulfate), 테트라펜틸암모늄 티오시아네이트(Tetrapentylammonium thiocyanate), 테트라부틸포스포늄 p-톨루엔술포네이트(Tetrabutylphosphonium p-toluenesulfonate), 1-(3-시아노프로필)-3-메틸이미다졸리움 클로라이드(1-(3-Cyanopropyl)-3-methylimidazolium chloride), 등이 사용될 수 있다. 한편, 반응매질은 코팩터(co-factor)를 더 함유할 수도 있다. 코팩터로서는, 예를 들면, NADH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide H), ATP(adenosine triphosphate), ADP(adenosine diphosphate), GTP(guanosine triphosphate) 등이 사용될 수 있다.
- [0040] 자성 폴리아닐린 입자, 크로스링커 및 효소의 사용량은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면, 크로스링커의 사용량은, 자성 폴리아닐린 입자 100 중량부를 기준으로 하여, 약 0.5 내지 약 2 중량부일 수 있다. 예를 들면, 효소의 사용량은, 자성 폴리아닐린 입자 100 중량부를 기준으로 하여, 약 10 내지 약 1000 중량부일 수 있다. 바람직하게는, 주어진 자성 폴리아닐린 입자에 효소를 최대한으로 담지시킬 수 있는데 필요한 양의 크로스링커 및 효소를 사용할 수 있으며, 이는 시행착오법에 의하여 용이하게 결정될 수 있다.
- [0041] (b)단계의 반응온도는, 예를 들면, 약 25 ℃ 내지 약 50 ℃ 일 수 있다. 반응온도가 너무 낮으면, 크로스링커와 폴리아닐린의 결합반응 및 크로스링커와 효소의 결합반응이 효과적으로 진행되기 어렵다. 반응온도가 너무 높으면

면, 효소의 변성이 발생할 수 있다.

- [0042] (b)단계의 반응시간은, 예를 들면, 약 5 분 내지 약 120 분일 수 있다. 반응온도가 낮은 경우에는 반응시간이 길어도 무방하나, 반응온도가 높은 경우에는 효소의 활성도가 저하될 수 있으므로 반응시간을 짧게 하는 것이 바람직하다.
- [0043] 이하에서는, 본 발명의 고정화 효소를 상세하게 설명한다.
- [0044] 본 발명에서 제공하는 고정화 효소는,
- [0045] 자성 폴리아닐린 입자; 및
- [0046] 크로스링커(cross-linker)를 매개체로 하여 상기 자성 폴리아닐린 입자에 결합된 효소;를
- [0047] 포함한다.
- [0048] 자성 폴리아닐린 입자는 자성입자를 함유하는 폴리아닐린 입자를 의미한다. 예를 들어, 자성 폴리아닐린 입자는, 자성입자가 현탁되어 있는 반응매질 상에서 아닐린 단량체를 중합시키므로써, 아닐린 단량체가 중합되어 폴리아닐린 입자를 형성하는 과정에서, 반응매질 상에 현탁되어 있는 자성입자가 폴리아닐린 입자 내로 혼입되어서 생성되거나, 또는, 자성입자를 핵으로 하여, 자성입자의 표면에서 폴리아닐린이 성장하므로써, 자성입자가 폴리아닐린으로 코팅되어 생성될 수 있다.
- [0049] 자성입자로서는, 예를 들면, Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , CoFe_2O_4 , MnFe_2O_4 , FePt , CoPt , Fe_3S_4 , 등이 사용될 수 있다. 자성입자의 입자크기는, 예를 들면, 약 20 nm 내지 약 500 nm 일 수 있다. 이러한 범위의 입자크기를 갖는 자성입자는 자성나노입자의 범주에 속한다.
- [0050] 자성입자의 함량은, 예를 들면, 아닐린 단량체 100 중량부를 기준으로 하여, 약 0.67 중량부 내지 약 1.33 중량부일 수 있다.
- [0051] 자성 폴리아닐린 입자의 입자크기는, 예를 들면, 약 50 nm 내지 약 1000 nm 일 수 있다. 바람직하게는, 자성 폴리아닐린 자성입자의 입자크기는, 약 100 nm 내지 약 500 nm 일 수 있다. 자성 폴리아닐린 입자의 입자크기가 너무 작으면, 자석을 사용하더라도 고정화 효소의 회수가 용이하지 않을 수 있다. 자성 폴리아닐린 입자의 입자크기가 너무 크면, 비표면적이 작아져서 담지되는 효소의 양이 작아질 수 있다.
- [0052] 크로스링커는, 폴리아닐린의 아민기에 대하여, 예를 들면 이미노(imino) 결합에 의하여 결합할 수 있는 작용기(ex. 아민기); 및, 효소의 아민기에 대하여, 예를 들면, 이미노(imino) 결합에 의하여 결합할 수 있는 작용기(ex. 아민기)를 갖는 화합물을 의미한다. 크로스링커로서는, 예를 들면, 글루타르알데하이드(glutaraldehyde), EDC(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride), 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다.
- [0053] 효소로서는, 예를 들면, 가수분해효소, 산화환원효소, 전이효소, 분해효소, 이성질화효소, 합성효소, 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다. 가수분해효소로서는, 예를 들면, 라이싱엔자임(lysing enzyme), 인버타제, 아밀라아제, 말타아제, 수크라아제, ATPase, 셀룰라제 등이 사용될 수 있다. 산화환원효소로서는, 예를 들면, 옥시다아제, 탈수소효소, 글루코스옥시다제 등이 사용될 수 있다. 전이효소로서는, 예를 들면, 크레아틴키나아제, 아미노기전이효소, 등이 사용될 수 있다. 분해효소로서는, 예를 들면, 카탈라아제, 카복실라아제, 젖산분해효소, 설탕분해효소 등이 사용될 수 있다. 이성질화효소로서는, 예를 들면, 6탄당 인산이성질화효소, 라이페이즈 등이 사용될 수 있다. 합성효소로서는, 예를 들면, 시트르산 합성효소, 글루탐산 합성효소, 에스테르 합성효소 등이 사용될 수 있다.
- [0054] 바람직하게는, 효소로서, 효소활성 부위 부근에 아민작용기가 적게 위치하고 있는 효소가 사용될 수 있다. 효소활성 부위 부근에 아민 작용기가 많으면, 효소활성 부위가 고정화시 막혀버리므로, 효소의 기능을 하기가 어렵게 될 수 있다. 그리하여, 바람직하게는, 효소로서, 예를 들면, 가수분해효소, 전이효소, 분해효소, 이성질화효소, 합성효소가 사용될 수 있다.
- [0055] 효소의 담지량은, 예를 들면, 자성 폴리아닐린 입자 5 mg 을 기준으로 하여, 약 10 내지 약 100 mg 일 수 있다. 바람직하게는, 효소의 담지량은, 예를 들면, 자성 폴리아닐린 입자 2 mg 을 기준으로 하여, 약 10 내지 약 20 mg 일 수 있다. 더욱 바람직하게는, 효소의 담지량은, 주어진 자성 폴리아닐린 입자에 최대한으로 담지될 수 있

는 양이다.

- [0056] 최종적으로 고정화 효소의 입자크기가 너무 작으면, 자석을 사용하더라도 고정화 효소의 회수가 용이하지 않을 수 있다. 최종적으로 고정화 효소의 입자크기가 너무 크면, 비표면적이 작아져서 효소의 활성 사이트의 활용도가 작아질 수 있다. 그리하여, 고정화 효소의 입자크기는 약 50 nm 내지 약 1000 nm 인 것이 바람직하다.

효 과

- [0057] 본 발명에서 제조된 고정화 효소는 우수한 활성을 발휘하며, 원심분리 및 필터링과 같은 번거로운 분리공정에 의하지 않고도, 자석에 의하여 반응혼합물로부터 신속하고도 효과적으로 분리될 수 있다. 더욱이, 원심분리 및 필터링과 같은 분리공정으로는, 나노수준의 입자크기를 갖는 고정화 효소를 효과적으로 분리하기가 어렵다. 그러나, 본 발명에서 제조된 고정화 효소는 나노수준의 입자크기를 갖더라도, 자석에 의하여 반응혼합물로부터 신속하고도 효과적으로 분리될 수 있다. 뿐만아니라, 회수된 후에도 우수한 활성을 유지할 수 있다. 그에 따라, 효소의 효과적인 재사용이 매우 용이하게 되어, 값비싼 효소의 경제적인 활용이 가능하게 된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0058] <실시예>
- [0059] 실시예 1 --- 고정화 효소의 제조
- [0060] 자성 폴리아닐린 나노파이버 제조
- [0061] 100 ml 의 1M HCl 수용액에 15 g 의 아닐린(aniline) 단량체(시그마-알드리치사 제품)와 0.1 g 의 산화철 분말(시그마-알드리치사 제품, Fe₂O₃, 입자크기: 20~100 nm)을 투입한 후, 중합개시제로서 4.56 g 의 암모늄퍼옥시디설페이트(ammonium peroxydisulfate)(시그마-알드리치사 제품)를 첨가한 다음, 격렬히 교반하면서, 25 ℃ 에서, 60 분 동안, 폴리아닐린을 합성하였다. 합성된 폴리아닐린 자성입자를 증류수로 4회 세척하였다.

- [0062] 효소 고정화
- [0063] 1 ml 의 시트레이트-포스페이트 버퍼(50 mM, pH 5.0)에, 5 mg 의 자성 폴리아닐린 입자와 80 mg 의 라이싱엔자임(lysing enzyme)(시그마-알드리치사 제품)을 투입한 후, 25 ℃ 에서 30 분 동안 200 rpm 으로 교반하였다. 상 기 혼합물에, 1 ml 의 글루타르알데하이드 용액(시그마-알드리치사 제품, 용매 : 시트레이트-포스페이트 버퍼, 농도 : 1 wt%)를 첨가한 후, 4 ℃ 에서 17 시간 동안 30 rpm 으로 교반하였다. 이렇게 얻은 반응액으로부터, 고정화 효소 (즉, 라이싱엔자임이 고정된 폴리아닐린 자성입자)를, 자석을 이용하여, 분리하였다. 이렇게 얻은 고정화 효소를, 시트레이트-포스페이트 버퍼(50 mM, pH 5.0) 및 트리스-HCl 용액 (100 mM, pH 7.9)로 세척하여, 고정화 되지 않은 효소와 반응되지 않은 글루타르알데하이드를 제거하였다. 세척된 고정화 효소를 80 ℃ 에서 24 시간 동안 건조시켰다. 건조된 고정화 효소는 82.1 mg 이었다. 건조된 고정화 효소를 냉장고(4 ℃)에 보관하였다.

- [0064] 실시예 2 --- 고정화 효소의 활성 확인
- [0065] 실시예 2에서는 커들란(curdlan)(β -1,3-glucan, 일본 다케다(Takeda)사 제품)을 기질로 사용하여 실시예 1에서 제조된 고정화 효소의 활성을 확인하였다.
- [0066] 먼저, 100 mg 의 커들란과 80 mg 의 고정화 효소를 2 ml 의 반응매질(50 mM 소듐 시트레이트 버퍼 (sodium citrate buffer), pH 5.0)에 투입하였다. 그 다음, 55 ℃ 의 반응온도에서, 150 rpm 의 교반조건하에, 2 시간 동안, 커들란을 글루코스로 분해하는 반응을 진행시켰다. 2 시간 동안의 반응 완료 후, 반응혼합물로부터 고정화 효소를 자석을 이용하여 분리한 후 (실시예 3 참조), 반응혼합물의 상청액의 글루코스 농도를 측정한 결과는 10 g/l 이었다. 글루코스의 농도 측정은 DNS법(3,5-dinitrosalicylic acid 발색시약 첨가 후 580 nm 에서 흡광도 분석)으로 수행되었다.

- [0067] 실시예 3 --- 고정화 효소의 회수

[0068] 실시예 3에서는, 2 시간 동안의 반응이 완료된 실시예 2의 반응혼합물로부터, 자석(15 M G0e)을 이용하여, 고정화 효소를 회수하였다.

[0069] 도 1은 고정화 효소의 회수과정을 보여주는 사진이다. 도 1의 (a)는 반응혼합물이 담긴 용기의 외벽에 자석을 근접시킨 순간의 반응혼합물의 사진이다. 도 1의 (a)에 나타난 바와 같이, 고정화 효소는 반응혼합물 중에 고르게 분산되어 있다. 도 1의 (b)는 반응혼합물이 담긴 용기의 외벽에 자석을 근접시킨 후 0.5 분이 경과한 후의 반응혼합물의 사진이다. 도 2의 (b)에 나타난 바와 같이, 고정화 효소는 자석에 의하여 반응혼합물로부터 신속하고도 효과적으로 분리되었으며, 반응혼합물은 매우 맑은 상태를 보였다.

[0070] 도 1의 (b)의 용기로부터 상청액을 따라낸 후, 분리된 고정화 효소를 소듐 시트레이트 버퍼(50 mM, pH 5.0)로 세척한 후, 80 °C 에서 24 시간 동안 건조시켜다. 분리된 고정화 효소의 무게를 측정한 결과는 78 mg 이었다. 이는 95 wt% 의 회수율을 의미한다.

[0071] 실시예 4 --- 회수된 고정화 효소의 재사용 (재사용 횟수 1회)

[0072] 실시예 4에서는 커들란(curdlan)(β -1,3-glucan, 일본 다케다(Takeda)사 제품, 상품명 : 커들란)을 기질로 사용하여 실시예 3에서 회수된 고정화 효소의 활성을 확인하였다.

[0073] 100 mg 의 커들란과 80 mg 의 회수된 고정화 효소를 2 ml 의 반응매질(50 mM 소듐 시트레이트 버퍼 (sodium citrate buffer), pH 5.0)에 투입하였다(이때, "회수된 고정화 효소"의 부족분은, 실시예 1 내지 3의 별도 수행을 통하여 얻은 "회수된 고정화 효소"로부터 보충되었다). 그 다음, 55 °C 의 반응온도에서, 150 rpm 의 교반 조건하에, 2 시간 동안, 커들란을 글루코스로 분해하는 반응을 진행시켰다. 2 시간 동안의 반응 완료 후, 반응혼합물로부터 고정화 효소를 자석을 이용하여 분리한 후, 반응혼합물의 상청액의 글루코스 농도를 측정한 결과는 8.9 g/l 이었다.

[0074] 실시예 5 --- 회수된 고정화 효소의 활성 변화

[0075] 실시예 3 및 실시예 4의 과정을 반복하면서, 회수된 고정화 효소의 활성 변화를 측정하였으며, 그 결과를 표 1에 나타내었다. 표 1의 글루코스 농도는, 2 시간 동안의 반응 완료 후 반응혼합물의 상청액으로부터 측정된 글루코스 농도이다. 또한, 표 1에서, 재사용 횟수에 따른 고정화 효소의 상대활성을, 초기 사용에서 측정된 글루코스 농도를 기준으로 한 글루코스 농도의 백분율로 표시하였다.

표 1

[0076]

재사용 회수	글루코스 농도 (g/l)	고정화 효소 상대활성(%)
0 회 (초기사용)	10	100
1 회	8.9	89.0
2 회	8.64	86.4
3 회	8.08	80.8
4 회	7.58	75.8
5 회	7.16	71.6
6 회	7.28	72.8
7 회	7.56	75.6
8 회	7.66	76.6
9 회	7.58	75.8
10 회	7.48	74.8

[0077] 표 1에 나타난 바와 같이, 10 회의 재사용 후에도 본 발명의 고정화 효소는 74.8 % 의 활성을 유지하였다.

산업이용 가능성

[0078] 본 발명의 고정화 효소는, 효소를 생체촉매로서 사용하는 다양한 생물화학공정에 사용될 수 있으며, 나아가, 생물화학공정의 효율 및 경제성을 제고시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0079] 도 1은, 본 발명의 고정화 효소의 회수과정을 보여주는 사진이다.

도면

도면1

