(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0065878
(43) 공개일자 2012년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 11/14 (2006.01) *C07K 17/14* (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0127213
(22) 출원일자 2010년12월13일
심사청구일자 2010년12월13일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김승욱
서울특별시 노원구 공릉동 737, 삼익아파트 104동 905호
송윤석
서울특별시 양천구 은행정로5길 54-1 (신정동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이지

전체 청구항 수 : 총 9 항

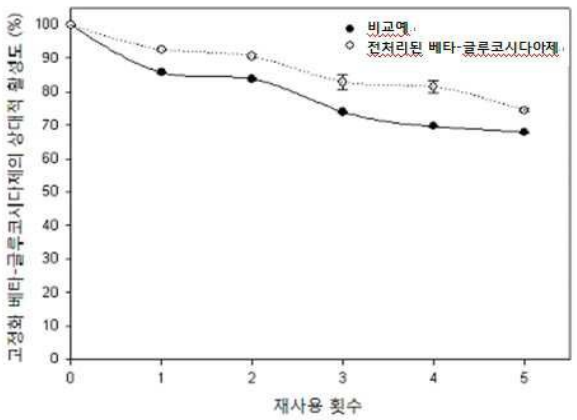
(54) 발명의 명칭 **전처리를 통한 베타-글루코시다아제의 고정화 방법**

(57) 요 약

본 발명은 전처리를 통한 베타-글루코시다아제의 고정화 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 베타-글루코시다아제를 저해제인 단당류, 기질인 이당류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종으로 반응시키는 전처리 과정을 거침으로써 베타-글루코시다아제의 활성부위를 보호한 뒤 담체에 고정화 시키는 고정화 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따라 전처리된 베타-글루코시다아제를 담체에 고정화시켰을 경우, 고정화 후에도 높은 활성도를 유지할 수 있으며, 재사용시에도 활성도 감소가 적은 베타-글루코시다아제의 고정화 방법을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

정유리

경기도 부천시 원미구 중동로 108, 110동 1004호 (중동, 팰리스카운티)

박철환

서울특별시 성북구 동소문로29길 63, 동선빌라 B동 402호 (동선동5가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	309016-5
부처명	농림수산식품부
연구사업명	농림기술개발사업
연구과제명	바이오매스 활용을 위한 전처리 및 당화공정 시스템 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.04.10 ~ 2011.04.09

특허청구의 범위

청구항 1

공유결합법으로 베타-글루코시다아제를 담체에 고정화시키는 방법에 있어서, 고정화시키기 전에 베타-글루코시다아제를 당류와 반응시키는 전처리 과정을 거치는 것을 특징으로 하는 베타-글루코시다아제의 고정화 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 당류는 단당류, 이당류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에선 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 베타-글루코시다아제의 고정화 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 단당류는 글루코스이고, 상기 이당류는 셀로비오스인 것을 특징으로 하는 베타-글루코시다아제의 고정화 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 전처리 과정에서의 당류의 농도는 0.01 M 내지 2.0 M인 것을 특징으로 하는 베타-글루코시다아제의 고정화 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 담체는 실리카 담체인 것을 특징으로 하는 베타-글루코시다아제의 고정화 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 전처리 과정은 30℃ 내지 70℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 베타-글루코시다아제의 고정화 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 전처리 과정은 과정은 50 rpm 내지 200 rpm의 교반속도로 수행되는 것을 특징으로 하는 베타-글루코시다아제의 고정화 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 전처리 과정은 과정은 5분 내지 60분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 베타-글루코시다아제의 고정화 방법.

청구항 9

제 6항에 있어서,

상기 고정화 방법은 온도를 상기 전처리 과정의 온도에서 20℃로 낮추면서 고정화하는 것을 특징으로 하는 베타-글루코시다아제의 고정화 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 전처리를 통한 베타-글루코시다아제의 고정화 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 단당류, 이당류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종과 베타-글루코시다아제를 반응시키는 전처리 과정을 거침으로써 베타-글루코시다아제의 활성부위를 보호한 뒤 담체에 고정화시킴으로써 담체와 베타-글루코시다아제의 고정화 시 활성도가 감소하는 현상을 저해시켜 높은 활성도를 유지할 수 있는 고정화 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 효소를 이용한 생물공정은 화학공정에 비해 온화한 반응조건에서 반응이 진행되어 화학공정에 비해 에너지가 절약되며, 공정이 단순하여 공정비용이 적게 드는 장점이 있다. 하지만 이용되는 효소의 가격이 고가이며, 효소의 낮은 안정성이 낮은 것이 극복해야 할 단점이다. 이러한 문제를 해결하고 공정비용의 감소를 위해 효소의 고정화가 널리 이용되고 있다. 효소를 고정화하면 반응에 사용한 효소를 다음 반응에 재사용할 수 있어 효소의 높은 가격 문제를 해결하여 공정비용을 감소시킬 수 있으며, 고정화하지 않는 효소보다 안정성이 증대되어 공정에 더 효율적으로 이용할 수 있다.

[0003] 베타-글루코시다아제(β-glucosidase)는 폭 넓은 기질특이성을 가지기 때문에 식품, 화학, 세척제 및 직물업 등 전분을 소당으로 분해하는 분야와 와인 생산공정에서 이용도가 높은 효소이며, 대장균, 곰팡이, 포유동물, 식물 등 모든 생명체에서 아릴-, 알킬-β-글루코시드, 셀로비오스(cellobiose) 등의 다양한 기질을 가수분해하는 반응을 수행하기 때문에 바이오연료(biofuel) 분야에서 중요한 효소로 인식되고 있다.

[0004] 또한, 베타-글루코시다아제를 이용하여 글리코시드(glycoside) 유도체로부터 글루코스(glucose)를 유리시키는 반응에 관한 연구가 점차 증가하는 추세에 있다. 이 반응산물은 생리적 활성을 가지고 있어 부가가치가 높기 때문에 큰 주목을 받고 있는 효소이다. 그러나 베타-글루코시다아제는 고가이기 때문에 연구 및 제품 생산을 위하여 고정화된 베타-글루코시다아제의 제조가 필수적이다.

[0005] 효소를 고정화시키는 방법으로는 흡착법, 공유결합법, 가두기법 등의 다양한 방법이 사용되고 있다. 상기 방법들 중 흡착법과 가두기법은 간단한 방법으로 효소를 고정화할 수 있는 장점이 있지만, 고정화된 효소의 유실과 기질 및 생성물의 확산저항이 존재하는 문제점이 있다. 또한 공유결합법은 담체와 효소와의 강한 결합력을 형성할 수 있어 널리 이용되고 있지만, 공유결합이 담체와 효소의 활성부위에 형성될 수 있어 활성부위의 손상을 초래하여 효소의 고정화 후에 활성도가 현저히 낮아지는 문제점이 있어 효소의 고정화 후에도 활성도가 유지되는 고정화 기술 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 상술한 종래기술 상의 문제점을 해결할 수 있는 고정화 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과 베타-글루코시다아제를 당류로 전처리하는 과정을 거침으로써 베타-글루코시다아제와 담체의 공유결합을 통한 고정화 시에 발생하는 활성도 감소 현상을 저해시킬 수 있는 방법을 알아내고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0007] 결국, 본 발명의 목적은 공유결합법으로 담체에 베타-글루코시다아제를 고정화시키기 전에 단당류, 이당류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종과 베타-글루코시다아제를 반응시켜 베타-글루코시다아제의 활성부위를 보호하여 고정화 시 담체와 베타-글루코시다아제의 활성부위와의 공유결합을 차단함으로써 베타-글루코시다아제의 활성을 유지하면서 고정화가 가능하며, 재사용 시에도 활성도를 높게 유지할 수 있는 베타-글루코시다아제를 고정화시키기 전에 베타-글루코시다아제의 전처리 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는 공유결합법으로 베타-글루코시다아제를 담체에 고정화시키는 방법에 있어서, 고정화시키기 전에 베타-글루코시다아제를 당류와 반응시키는 전처리 과정을 거치는 것을 특징으로 하는 베타-글루코시다아제의 고정화 방법이 제공된다.

[0009] 본 발명에 따른 베타-글루코시다아제의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 당류는 단당류, 이당류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종일 수 있다.

[0010] 본 발명에 따른 베타-글루코시다아제의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 단당류는 글루코스이고, 상기 이당류는 셀로비오스일 수 있다.

[0011] 본 발명에 따른 베타-글루코시다아제의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 전처리 과정에서의 당류의 농도는 0.01 M 내지 2.0 M일 수 있다.

[0012] 본 발명에 따른 베타-글루코시다아제의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 담체는 실리카 담체일 수 있다.

[0013] 본 발명에 따른 베타-글루코시다아제의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 전처리 과정은 30℃ 내지 70℃의 온도에서 수행될 수 있다.

[0014] 본 발명에 따른 베타-글루코시다아제의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 전처리 과정은 50 rpm 내지 200 rpm의 교반속도로 수행될 수 있다.

[0015] 본 발명에 따른 베타-글루코시다아제의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 전처리 과정은 5분 내지 60분 동안 수행될 수 있다.

[0016] 본 발명에 따른 베타-글루코시다아제의 고정화 방법의 일 실시예에 따르면, 상기 고정화 방법은 온도를 상기 전처리 과정의 온도에서 20℃로 낮추면서 고정화할 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 베타-글루코시다아제의 고정화 방법에 의하면, 공유결합법으로 고정화시키기 전에 알로스테릭 효소인 베타-글루코시다아제의 활성부위와 결합할 수 있는 저해제인 단당류, 기질인 이당류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종과 반응시키는 전처리 과정을 거침으로써 고정화 시 발생하는 활성도 감소 현상을 저해시켜 높은 활성도를 유지할 수 있으며, 재사용 시에도 활성도의 감소가 적어 고가의 효소를 효율적으로 사용할 수 있으므로 생물 촉매 산업에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 실시예 7 및 비교예에 따라 고정화된 베타-글루코시다아제의 재사용시 활성도 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명의 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0020] 본 발명에서는 공유결합법으로 베타-글루코시다아제를 담체에 고정화시키는 방법에 있어서, 고정화시키기 전에 베타-글루코시다아제를 당류와 반응시키는 전처리 과정을 거치는 것을 특징으로 하는 베타-글루코시다아제의 고정화 방법이 제공된다.

[0021] 본 발명에 따른 공유결합법으로 베타-글루코시다아제를 담체에 고정화시키는 방법은 우선, 담체를 3-아미노프로필트리에톡시실란과 반응시켜 표면에 아민기를 생성한 뒤 상기 아민기가 형성된 담체를 글루타르알데히드와 반응시켜 표면에 알데히드기가 형성된 담체를 제조한다. 여기서 상기 담체는 당업계에 알려진 모든 담체가 사용가능하며, 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면 실리카 담체일 수 있다.

[0022] 이후, 베타-글루코시다아제를 당류와 반응시킨다. 베타-글루코시다아제는 알로스테릭 효소로서, 고정화 시 베타-글루코시다아제의 활성부위와 담체표면의 알데히드기와의 공유결합 형성을 저해하고, 베타-글루코시다아제의 활성부위를 제외한 부분의 아민기와 공유결합을 형성을 유도하기 위해 상기 당류로 전처리 과정을 수행한다. 여기서 상기 당류는 단당류, 이당류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종일 수 있다. 상기 단당류로는 글루코스, 이당류로는 셀로비오스가 사용될 수 있으며, 바람직하게는 글루코스와 셀로비오스의 혼합물을 사용할 수 있다. 여기서 단당류인 글루코스는 베타-글루코시다아제의 저해제로 작용하며, 이당류인 셀로비오스는 기질로 작용하게 된다. 따라서 알로스테릭 효소인 베타-글루코시다아제의 특성을 고려하였을 때 단당류와 이당류의 혼합물을 사용할 경우 베타-글루코시다아제 고정화 시 효소의 활성이 가장 높게 유지될 수 있으며, 베타-글루코시다아제의 3차 구조를 보다 효과적으로 유지시킬 수 있다.

[0023] 상기 전처리 과정은 단당류 또는 이당류를 사용할 경우 0.01 M 내지 2.0 M 농도의 단당류 또는 이당류를 사용하여 수행될 수 있으며, 단당류와 이당류의 혼합물을 사용하는 경우에도 각각 0.01 M 내지 2.0 M 농도의 단당류 및 이당류가 혼합된 혼합물을 사용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 단당류, 이당류 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종의 농도는 0.1 M 인 것이 바람직하다.

[0024] 또한, 상기 전처리 과정은 30℃ 내지 70℃의 온도에서 50 rpm 내지 200 rpm의 교반속도로 5분 내지 60분 동안 수행될 수 있다.

[0025] 이후, 상기에서 제조된 담체에 전처리된 베타-글루코시다아제를 고정화시킨다. 베타-글루코시다아제의 고정화는 담체의 알데히드기와 전처리된 베타-글루코시다아제의 아민기가 반응하여 이민결합을 형성함으로써 공유결합을 통해 수행될 수 있다. 이때, 고정화를 위해서 온도를 상기 전처리 과정의 온도에서 20℃로 낮추면서 반응을 수행할 수 있다. 실리카 담체에 베타-글루코시다아제를 고정화하기 위한 최적의 온도는 20℃이므로 전처리 온도에서 20℃로 온도를 낮추면서 고정화하는 것이 바람직하다.

[0026] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다 할 것이다.

[0027] **실시예 1: 담체의 제조**

[0028] 건조된 실리카겔 1 g을 15%(v/v) 3-아미노프로필트리에톡시실란의 아세톤(acetone) 용액 20 mL에 첨가한 뒤 50℃에서 2시간 동안 교반하여 반응하였다. 반응 후 실리카겔을 증류수로 세척한 다음 60℃에서 2시간 동안 건조하였다. 2.6 M 글루타르알데히드 용액 1.6 mL에 건조된 실리카겔 및 100 mM 인산완충용액(pH 8.0) 18.4

mL를 첨가한 뒤 20℃에서 2시간 동안 반응하였다. 반응이 끝난 뒤 실리카겔을 증류수로 세척한 다음 60℃에서 2시간 동안 건조하여 활성화된 실리카 담체를 제조하였다.

[0029] **베타-글루코시다아제의 전처리**

[0030] 실시예 2: 글루코스와 베타-글루코시다아제의 반응을 통한 전처리

[0031] 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)로부터 유래한 베타-글루코시다아제는 미국의 노보자임(Novozymes, USA)사로부터 구입하였다. 50 mM 구연산완충용액(pH 4.8)에 글루코스 0.1 M 및 베타-글루코시다아제 1,225 U을 첨가하여 혼합용액 50 mL를 제조하였다. 상기 혼합용액을 50℃, 100 rpm에서 20분간 반응하여 베타-글루코시다아제를 전처리하였다.

[0032] 실시예 3: 셀로비오스와 베타-글루코시다아제의 반응을 통한 전처리

[0033] 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)로부터 유래한 베타-글루코시다아제는 미국의 노보자임(Novozymes, USA)사로부터 구입하였다. 50 mM 구연산완충용액(pH 4.8)에 셀로비오스 0.1 M 및 베타-글루코시다아제 1,225 U을 첨가하여 혼합용액 50 mL를 제조하였다. 상기 혼합용액을 50℃, 100 rpm에서 20분간 반응하여 베타-글루코시다아제를 전처리하였다.

[0034] 실시예 4: 글루코스 및 셀로비오스의 혼합물과 베타-글루코시다아제의 반응을 통한 전처리

[0035] 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)로부터 유래한 베타-글루코시다아제는 미국의 노보자임(Novozymes, USA)사로부터 구입하였다. 50 mM 구연산완충용액(pH 4.8)에 글루코스 0.1 M과 셀로비오스 0.1 M의 혼합물 및 베타-글루코시다아제 1,225 U을 첨가하여 혼합용액 50 mL를 제조하였다. 상기 혼합용액을 50℃, 100 rpm에서 20분간 반응하여 베타-글루코시다아제를 전처리하였다.

[0036] **전처리된 베타-글루코시다아제의 고정화**

[0037] 실시예 5: 글루코스로 전처리된 베타-글루코시다아제의 고정화

[0038] 실시예 1에서 제조된 활성화된 실리카 담체를 상기 실시예 2에서 제조된 베타-글루코시다아제 용액에 첨가한 뒤 베타-글루코시다아제의 고정화를 위하여 50℃에서 20℃로 온도를 낮추면서 12시간 동안 반응하였다. 반응 후 반응용액을 여과한 뒤 50 mM 구연산완충용액(pH 4.8)으로 세척하고 실온에서 건조하여 담체에 고정화된 베타-글루코시다아제를 제조하였다.

[0039] 실시예 6: 셀로비오스로 전처리된 베타-글루코시다아제의 고정화

[0040] 실시예 1에서 제조된 활성화된 실리카 담체를 상기 실시예 3에서 제조된 베타-글루코시다아제 용액에 첨가한 뒤 베타-글루코시다아제의 고정화를 위하여 50℃에서 20℃로 온도를 낮추면서 12시간 동안 반응하였다. 반응 후 반응용액을 여과한 뒤 50 mM 구연산완충용액(pH 4.8)으로 세척하고 실온에서 건조하여 담체에 고정화된 베타-글루코시다아제를 제조하였다.

[0041] 실시예 7: 글루코스 및 셀로비오스의 혼합물로 전처리된 베타-글루코시다아제의 고정화

[0042] 실시예 1에서 제조된 활성화된 실리카 담체를 상기 실시예 4에서 제조된 베타-글루코시다아제 용액에 첨가한 뒤 베타-글루코시다아제의 고정화를 위하여 50℃에서 20℃로 온도를 낮추면서 12시간 동안 반응하였다. 반응 후 반응용액을 여과한 뒤 50 mM 구연산완충용액(pH 4.8)으로 세척하고 실온에서 건조하여 담체에 고정화된 베타-글루코시다아제를 제조하였다.

[0043] **비교예: 전처리하지 않은 베타-글루코시다아제의 고정화**

[0044] 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)로부터 유래한 베타-글루코시다아제는 미국의 노보자임(Novozymes, USA)사로부터 구입하였다. 50 mM 구연산완충용액(pH 4.8)에 베타-글루코시다아제 1,225 U을 첨가하여 혼합용액 50 mL를 제조하였다. 실시예 1에서 제조된 활성화된 실리카 담체를 베타-글루코시다아제 용액에 첨가한 뒤 20℃의 온도에서 12시간 동안 반응하였다. 반응 후 반응용액을 여과한 뒤 50 mM 구연산완충용액(pH 4.8)으로 세척하고 실온에서 건조하여 담체에 고정화된 베타-글루코시다아제를 제조하였다.

[0045] **시험예 1: 담체에 고정화된 베타-글루코시다아제의 활성도 측정**

[0046] 상기 실시예 5 내지 7 및 비교예에서 고정화시킨 베타-글루코시다아제의 활성도는 하기와 같이 측정되었다.

[0047] 1 mM p-NPG가 포함된 50 mM 구연산완충용액(pH 4.8) 0.9 mL에 상기 실시예 5 내지 7 및 비교예에서 제조된 실리카 담체에 고정화된 베타-글루코시다아제 10 mg을 각각 첨가하여 50℃, 150 rpm에서 20분간 반응하였다. 이후 1.0 M의 Na_2CO_3 1 mL를 첨가하여 반응을 종결한 뒤 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 기준곡선(standard curve)에 대입하여 고정화된 베타-글루코시다아제의 활성도를 측정하였고, 1분간 1 μmol의 p-NPG를 p-nitrophenol로 가수분해하는 효소의 양으로 베타-글루코시다아제의 1유닛(unit, U) 활성도를 계산하였다. 계산된 활성도는 하기 표 1에 나타내었다.

[0048] **시험예 2: 담체에 고정화된 베타-글루코시다아제의 단백질량 측정**

[0049] 상기 실시예 5 내지 7 및 비교예에서 고정화시킨 베타-글루코시다아제의 단백질량은 고정화 전의 베타-글루코시다아제 용액에서의 단백질량과 고정화 후 남아있는 단백질량의 차이를 이용하여 계산하였고, 실리카 담체에 고정화된 단백질량은 하기와 같이 브래드포드법 (Bradford method)을 사용하여 계산하였다.

[0050] 브래드포드 용액 3 mL에 0.1 mL의 베타-글루코시다아제 용액을 첨가하여 1분간 교반한 뒤, 10분간 실온에서 방치하여 발색반응을 안정화시킨 후 발색정도를 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 측정된 흡광도를 기준곡선에 대입하여 베타-글루코시다아제 용액 내의 단백질량을 측정하였다. 측정된 단백질량은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0051]

분류	전처리 물질 및 농도	활성도 (U/g matrix)	담체에 고정화된 단백질량 (mg/g matrix)
실시예 5	0.1 M 글루코스	24.9	1.88
실시예 6	0.1 M 셀로비오스	26.0	1.82
실시예 7	0.1 M 글루코스 + 0.1 M 셀로비오스	27.2	1.84
비교예	-	19.3	1.91

[0052] 상기 표 1에서 보여지는 바와 같이 베타-글루코시다아제를 전처리하지 않고 고정화 시킨 비교예의 활성도는 19.3 U/g matrix인 반면, 각각의 전처리 물질로 전처리를 수행 뒤 고정화시킨 실시예 5 내지 7의 경우, 활성도는 각각 24.9, 26.0 및 27.2 U/g matrix이였으며, 이것은 비교예 보다 각각 29.0%, 34.7% 및 42.0% 증가된 것으로 비교예에 비해 월등히 증가되었음을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 저해제인 0.1 M 글루코스와 기질인 0.1 M 셀로비오스의 혼합물로 전처리하였을 때, 가장 탁월함을 확인할 수 있었다. 또한 담체에 고정화된 단백질량의 차이는 전처리 유?무에 관계없이 유사한 값을 나타낸 것으로 보아 전처리된 고정화 베타-글루코시다아제의 활성도 증가가 고정화된 단백질량의 차이에 의한 것이 아님을 알 수 있었다.

[0053] **시험예 3: 글루코스와 셀로비오스의 혼합물로 전처리한 후 담체에 고정화 시킨 베타-글루코시다아제의 재사용 시 활성도 변화 측정**

[0054] 상기 실시예 7 및 비교예에서 고정화시킨 베타-글루코시다아제를 상기 실험예 1에서 수행한 방법을 5회 반복한 뒤 활성도 변화를 관찰하였다. 고정화된 베타-글루코시다아제는 20분 동안 기질인 p-NPG를 가수분해시켰고, 단일 배치(batch) 반응이 끝난 후, 고정화된 베타-글루코시다아제는 원심분리에 의하여 수거

되었다. 상기와 같이 수거한 고정화된 베타-글루코시다아제는 50 mM 구연산완충용액(pH 4.8)으로 수 차례 세척한 뒤, 다음 배치(batch) 반응에 재사용되었다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0055]

분류	초기 활성도	5회 재사용 후 활성도
실시예 7	26.7 U/g matrix	20.0 U/g matrix
비교예	18.4 U/g matrix	12.6 U/g matrix

[0056] 상기 표 2에서 바와 같이 전처리된 베타-글루코시다아제를 담체에 고정화 시킨 실시예 7의 경우 5회 재사용하였을 경우 초기활성도는 26.7 U/g matrix이었으며 5회 재사용 후 활성도는 20.0 U/g matrix이었다. 반면 전처리하지 않은 베타-글루코시다아제를 담체에 고정화시킨 비교예의 경우 초기 활성도는 18.4 U/g matrix이었으며 5회 재사용후 활성도는 12.6 U/g matrix이었다.

[0057] 도 1에는 실시예 7 및 비교예에서 고정화된 베타-글루코시다아제의 재사용시 활성도 변화를 나타낸 그래프로서, 도 1을 참조하면 초기활성도와 비교해봤을 때 전처리된 베타-글루코시다아제를 담체에 고정화시킨 실시예 7의 경우 74.5%의 활성도가 유지되었고, 전처리하지 않은 베타-글루코시다아제를 담체에 고정화 시킨 비교예의 경우 초기활성도와 비교해봤을 때 67.9%의 활성도가 유지되었음을 확인할 수 있었다.

[0058] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항 들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

