



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0003761
(43) 공개일자 2012년01월11일

(51) Int. Cl.

C12N 11/14 (2006.01) C12N 9/96 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0064542
(22) 출원일자 2010년07월05일
심사청구일자 2010년07월05일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 종암로 1 (안암동5가, 고려대역)

(72) 발명자

김승욱

서울특별시 노원구 공릉로46길 32, 104동 905호
(공릉동, 삼익아파트)

송광호

경기도 성남시 분당구 정자로 143, 209동 402호
(정자동, 한솔마을)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

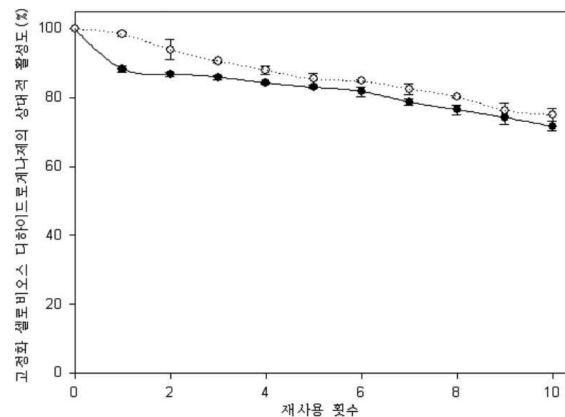
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 셀로비오스 디하이드로게나제를 담체에 고정화시키기 전에 전처리하는 방법

(57) 요약

본 발명은 셀로비오스 디하이드로게나제를 공유결합(covalent binding)을 이용하여 담체에 고정화시키기 전에 전처리하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로 셀로비오스 디하이드로게나제를 담체에 고정화시키기 전에 셀로비오스 디하이드로게나제 용액에 단당류, 이당류, 다당류 또는 이들의 혼합물을 첨가하여 반응시키는 전처리 과정을 통하여 공유결합에 의한 셀로비오스 디하이드로게나제의 고정화 시 발생하는 활성도의 감소를 억제하고 여러 번 재사용할 경우에도 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성을 유지할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

한성욱

서울특별시 성북구 길음로 119, 210동 201호 (길음동, 길음뉴타운)

송윤석

경기도 부천시 원미구 계남로 329, 아태리치빌아파트 503호 (춘의동, 춘의동 리치빌)

김은지

경기도 남양주시 오남읍 양지로240번길 38, 207동 1003호 (남양주양지e-편한세상 2단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090083923

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 한국연구재단 핵심연구지원(협동연구)사업

연구과제명 고효성 당화효소 생산 에탄올 발효균주 개발과 다양한 배양시스템의 공정최적화를 통한
고효율 수송용 바이오에탄올 생산공정에 관한 연구

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2009년 09월 01일 ~ 2010년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

공유결합법으로 셀로비오스 디하이드로게나제를 담체에 고정화시키기 전에 셀로비오스 디하이드로게나제를 하나 이상의 당류와 반응시키는 전처리 과정을 거친 후, 셀로비오스 디하이드로게나제를 담체에 고정화시키는 것을 특징으로 하는 셀로비오스 디하이드로게나제의 고정화 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 당류는 단당류, 이당류 또는 다당류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 단당류는 글루코스 또는 갈락토스이고, 상기 이당류는 셀로비오스, 락토스 또는 말토스이고, 상기 다당류는 셀룰로스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서 상기 고정화는 15 내지 60℃에서 6-18시간 동안 반응시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 고정화는 55℃에서 20℃로 하강시키면서 반응시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 담체는 실리카겔인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 담체의 표면에 셀로비오스 디하이드로게나제의 이동성을 제한하는 효소 고정화(enzyme immobilization)에 관한 것으로, 셀로비오스 디하이드로게나제를 공유결합(covalent binding)을 이용하여 담체에 고정화시키기 전에 전처리하는 방법에 관한 것이다. 셀로비오스 디하이드로게나제를 담체에 고정화시키기 전에 셀로비오스 디하이드로게나제 용액(solution)에 단당류(monosaccharide), 이당류(disaccharide), 다당류(polysaccharide) 또는 이들의 혼합물을 첨가하여 반응시키는 전처리 과정을 통하여 공유결합에 의한 셀로비오스 디하이드로게나제의 고정화 시 발생하는 활성도(activity) 감소를 억제할 수 있는 방법이다.

배경기술

[0002] 셀로비오스 디하이드로게나제(cellobiose dehydrogenase)는 미생물에 의한 셀룰로스(cellulose) 분해반응에서 세포외부로 분비되는 효소로서 여러 미생물들이 셀로비오스 디하이드로게나제를 생산한다고 보고되었고, 바이오연료(biofuel) 생산 분야에 사용하기 위하여 미생물로부터의 생산과 특성파악에 관한 연구가 점차 증가하는 추세에 있는 등 그 산업적 가치는 날로 증가하고 있다. 그러나 현재까지 미생물에 의한 셀로비오스 디하이드로게

나제의 생산량이 매우 낮고, 상업적으로 판매되는 셀로비오스 디하이드로게나제 제품이 없는 상황이기 때문에 셀로비오스 디하이드로게나제가 이용되는 생물공정에 관한 연구 및 적용을 위하여 고정화 셀로비오스 디하이드로게나제의 제조가 필수적이지만 담체에 셀로비오스 디하이드로게나제의 고정화에 관한 연구는 전무한 상황이다.

[0003] 효소 고정화는 흡착법, 공유결합법, 가두기법 등 다양한 방법이 사용되고 있다. 그 중, 흡착법과 가두기법은 간단한 방법으로 효소를 고정화할 수 있다는 장점이 있는 반면, 고정화된 효소의 유실과 기질 및 생성물의 확산 저항이 존재하는 등의 문제점을 가지고 있다. 그리고 공유결합법은 담체와 효소와의 강한 결합력 때문에 넓이 이용되고 있지만, 담체와 효소 사이의 공유결합이 효소의 활성부위(active site)에 형성될 수 있어 활성부위의 손상 때문에 효소 고정화 후 활성도가 현저히 낮아지는 문제점을 가지고 있다.

[0004] 이에 따라 본 발명자들은 공유결합법을 이용한 셀로비오스 디하이드로게나제의 고정화 시에 활성부위의 보호를 위하여 효소와 전처리물질의 반응을 통한 전처리 방법을 연구한 결과, 전처리 물질로 단당류, 이당류, 다당류 또는 이들의 혼합물을 사용하였을 때 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도가 증가되었음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 셀로비오스 디하이드로게나제를 담체에 고정화시키기 전에 셀로비오스 디하이드로게나제의 기질인 당류를 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성 부위에 결합시키기 위하여 셀로비오스 디하이드로게나제를 당류와 반응시키는 전처리 과정을 거침으로써 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성을 높게 유지할 수 있을 뿐만 아니라 여러 번 재사용시에도 활성을 높게 유지할 수 있는 효소 고정화시 셀로비오스 디하이드로게나제의 전처리 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 공유결합법으로 셀로비오스 디하이드로게나제를 담체에 고정화시키기 전에 셀로비오스 디하이드로게나제를 하나 이상의 당류와 반응시키는 전처리 과정을 거친 후, 셀로비오스 디하이드로게나제를 담체에 고정화시키는 것을 특징으로 하는 셀로비오스 디하이드로게나제의 고정화 방법을 제공한다.

[0007] 본 발명에서, 상기 공유결합법은 셀로비오스 디하이드로게나제를 담체에 고정화시키는 방법으로서, 다음과 같은 단계들로 수행될 수 있다.

[0008] 담체를 3-아미노프로필트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane)으로 처리하여 표면에 아민기(-NH₂)를 생성하는 단계, 상기 아민기가 생성된 담체 표면에 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 처리하여 알데히드기(-CHO)를 생성하는 단계, 및 상기 담체 표면의 알데히드기와 셀로비오스 디하이드로게나제의 아민기(-NH₂)를 이민 결합(imine bond)을 통하여 고정화하는 단계를 포함한다.

[0009] 본 발명에서 상기 '전처리'는 기질과 효소의 반응을 통한 효소 활성부위의 보호를 위한 것으로, 효소 고정화 단계에서 담체 표면의 알데히드기와 효소의 아민기가 결합할 때, 효소의 활성에 영향을 미치지 않는, 효소의 활성부위 이외에 존재하는 아민기에 담체 표면의 알데히드기가 결합하도록 하기 위하여 효소와 기질을 반응시켜 활성부위에 기질을 결합시킴으로써 효소의 활성부위를 보호하는 것을 의미한다. 이러한 전처리를 통한 효소 활성부위의 보호는 담체 표면과 효소 활성부위와의 공유결합을 저지시켜 담체에 효소 고정화 후 효소의 활성도를 높게 유지시킬 수 있는 장점이 있다.

[0010] 또한, 상기 전처리에 사용되는 물질은 효소의 활성부위에 결합할 수 있는 어떠한 물질도 사용할 수 있으나, 셀로비오스 디하이드로게나제의 기질로서 사용될 수 있는 당류, 바람직하게는 단당류, 이당류 또는 다당류일 수 있다. 이러한 기질을 이용한 전처리는 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 3차 구조를 더 효과적으로 유지시킬 수 있는 장점이 있다.

- [0011] 특히, 상기 단당류는 글루코스 또는 갈락토스이고, 상기 이당류는 셀로비오스, 락토스 또는 말토스이고, 상기 다당류는 셀룰로스가 더욱 바람직하다.
- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 기질은 하나의 기질(당류)을 이용할 수도 있으나, 본 발명의 실험예에서 확인한 바와 같이, 전처리에 사용된 기질들 수의 증가에 따라 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도가 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다. 특히 상기 언급된 여섯 가지의 기질(셀로비오스, 락토스, 셀룰로스, 글루코스, 갈락토스, 말토스)을 이용하여 전처리하는 경우 가장 높은 활성도를 나타내었다 (표 2 참조).
- [0013] 본 발명에서, 상기 전처리는 효소를 하나 이상의 당류와 반응시키게 되는데, 이때 사용된 기질(당류)의 최종 농도가 100 내지 200 mM 농도 하에서 수행될 수 있으며, 두 가지 이상의 기질을 사용하는 경우에도 사용된 모든 기질들 농도의 합은 100 내지 200 mM 농도이다. 바람직하게는 사용된 기질(당류)의 최종 농도는 150 mM이다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 전처리에 사용되는 기질(당류)은 글루코스(glucose), 갈락토스(galactose), 셀로비오스(cellobiose), 락토스(lactose), 말토스(maltose) 및 셀룰로스로 구성된 군에서 선택된 하나 이상이며 이들 기질의 농도의 합은 150 mM로 하였다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 담체에 전처리된 셀로비오스 디하이드로게나제의 고정화 시, 15 내지 60℃에서 6-18시간 동안 반응시킬 수 있다. 본 발명의 셀로비오스 디하이드로게나제는 30 내지 70℃에서 활성도를 나타내는데, 실제 최대 활성도는 55℃이다. 따라서 상기 고정화는 55℃에서 20℃로 하강시키면서 반응시키는 것이 바람직하다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 고정화 온도는 55℃에서 20℃로 온도를 하강시키면서 고정화하는 것이 20℃에서 고정화하는 것 보다 더 높은 효소 활성도를 나타내었다 (표 1 및 표 2 참조).
- [0017] 본 발명의 셀로비오스 디하이드로게나제 고정화 방법은 담체에 공유결합법으로 고정화시키는 방법으로 당업계에 알려진 것이면 어느 것이나 사용 가능하며 담체 역시 당업계에 알려진 것이면 어느 것이나 가능하다. 구체적인 예로는 실리카 겔 등을 들 수 있다.

발명의 효과

- [0018] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 공유결합을 이용하여 담체에 셀로비오스 디하이드로게나제 고정화 시, 고정화 전에 효소의 활성부위와 결합할 수 있는 기질 등에 의한 전처리 과정을 수행함으로써 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도와 재사용의 안정성을 향상시킬 수 있으며, 이로 인하여 고정화된 효소를 효율적으로 사용할 수 있는 효과가 있으므로 효소를 이용한 생물촉매 산업에 그 파급효과가 클 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명에 따른 전처리 과정을 거친 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제를 재사용할 경우의 활성도 변화를 나타낸 그래프이다. ○는 여섯 가지의 기질(셀로비오스, 락토스, 셀룰로스, 글루코스, 갈락토스, 말토스)을 이용하여 전처리하고 55℃에서 20℃로 온도를 하강시키면서 고정화시킨 실험구이고 ●는 전처리 하지 않고 55℃에서 20℃로 온도를 하강시키면서 고정화시킨 대조구이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0021] 실시예 1: 셀로비오스 디하이드로게나제의 제조

- [0022] 코니포라 푸티아나(*Coniophora puteana*) KCTC 6720은 PDB(potato dextrose broth)배지에서 26℃, 150 rpm 조건에서 3일 동안 중균 배양 후, 배양한 중균을 생산배지에 10%(v/v)의 비로 접종하였다. 그 생산배지 조성은 다음과 같다. 증류수 1L 기준에 2.6 g (NH₄)₂HPO₄, 1.1 g KH₂PO₄, 2 g 2,2-dimethylsuccinic acid, 1 g yeast extract, 1 g polypepton, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 10 mg FeSO₄ · 7H₂O, 56 mg CaCl₂, 6.0 mg ZnSO₄ · 7H₂O, 1.0 mg

CoCl₂ · 6H₂O, 10 g Avicel을 포함한다. 상기 생산배지에서 8일간 배양하여 셀로비오스 디하이드로게나제를 생산하였다.

[0023] 그 후, 코니포라 푸티아나 배양액 1 L를 CF/C filter를 이용하여 감압여과 하여 세포를 제거하였다. 세포를 제거한 셀로비오스 디하이드로게나제 배양액을 4℃에서 12시간 동안 80%(g/v)의 암모늄설페이트(ammonium sulfate)를 첨가하여 셀로비오스 디하이드로게나제를 침전시켰다. 이를 4℃에서 8,000 rpm으로 25분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전된 셀로비오스 디하이드로게나제를 100 mM 나트륨-아세트산 완충용액(pH 4.0) 500 mL에 녹여 셀로비오스 디하이드로게나제 수용액을 제조하였다. 이 수용액을 한외여과(ultrafiltration)와 투석여과(diafiltration)를 이용하여 200 mL로 농축하였고, 단백질 이외의 물질을 제거하여 셀로비오스 디하이드로게나제가 부분 정제된 용액을 얻었다.

[0024] **실시예 2: 셀로비오스 디하이드로게나제 고정화를 위한 담체의 제조**

[0025] 건조된 실리카겔 1 g을 15%(v/v) 3-아미노프로필트리에톡시실란의 아세톤(acetone) 용액 20 mL에 첨가한 후 일정한 교반과 함께 50℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기와 같이 반응된 실리카겔을 증류수로 세척한 다음 60℃에서 2시간 동안 건조시켰다. 건조된 실리카겔은 2.6 M 글루타르알데히드 용액 1.6 mL와 함께 100 mM 인산완충용액(pH 8.0) 18.4 mL에 첨가되었고, 20℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 활성화된 실리카겔을 증류수로 세척한 다음 60℃에서 2시간 동안 건조시켰다.

[0026] **실시예 3: 한 가지의 기질을 이용한 셀로비오스 디하이드로게나제의 전처리**

[0027] 4.58 U/L의 셀로비오스 디하이드로게나제 수용액 4 mL와 각각의 기질(글루코스, 갈락토스, 셀로비오스, 락토스, 말토스 또는 셀룰로스) 수용액 3 mL, 그리고 2,6-디클로로페놀-인도페놀(2,6-dichlorophenol-indophenol) 용액 3 mL를 혼합하여 최종 10 mL의 반응 수용액(reaction mixture)을 제조하였다. 각 기질의 최종농도는 150 mM이었고, 6-디클로로페놀-인도페놀의 최종농도는 15 mM이었다. 상기 반응 수용액을 55℃에서 10분간 반응시켜 셀로비오스 디하이드로게나제를 전처리하였다.

[0028] **실시예 4: 한 가지의 기질을 이용하여 전처리된 셀로비오스 디하이드로게나제의 고정화**

[0029] 상기 실시예 2에서 제조한 활성화된 실리카겔 300 mg을 상기 실시예 3에서 전처리한 각각의 셀로비오스 디하이드로게나제 용액에 첨가하였고, 효소의 고정화를 위하여 20℃ 또는 55℃에서 20℃로 하강시키면서 12시간 동안 반응시켰다. 상기 반응액을 여과하였고, 0.1 M 나트륨-아세트산 완충용액(pH 4.0)으로 세척한 후, 실온에서 건조시킴으로써 각각의 고정화 셀로비오스 디하이드로게나제를 제조하였다.

[0030] **실시예 5: 두 가지 이상의 기질들을 이용한 셀로비오스 디하이드로게나제의 전처리**

[0031] 상기 실시예 3에서와 같이, 4.58 U/L의 셀로비오스 디하이드로게나제 수용액 4 mL와 두 가지 이상의 기질들(글루코스, 갈락토스, 셀로비오스, 락토스, 말토스 또는 셀룰로스)이 포함된 기질 수용액 3 mL, 그리고 2,6-디클로로페놀-인도페놀 용액 3 mL를 혼합하여 최종 10 mL의 반응 수용액을 제조하였다. 각 반응 수용액에 포함된 모든 기질의 최종농도 합은 150 mM이었고, 6-디클로로페놀-인도페놀의 최종농도는 15 mM이었다. 상기 반응 수용액을 55℃에서 10분간 반응시켜 셀로비오스 디하이드로게나제를 전처리하였다.

[0032] **실시예 6: 두 가지 이상의 기질을 이용하여 전처리된 셀로비오스 디하이드로게나제의 고정화**

[0033] 상기 실시예 4에서와 같이, 상기 실시예 2에서 제조한 활성화된 실리카겔 300 mg을 상기 실시예 5에서 전처리한 각각의 셀로비오스 디하이드로게나제 용액에 첨가하였고, 효소의 고정화를 위하여 20℃ 또는 55℃에서 20℃로 하강시키면서 12시간 동안 반응시켰다. 상기 반응액을 여과하였고, 0.1M 나트륨-아세트산 완충용액(pH 4.0)으로 세척한 후, 실온에서 건조시킴으로써 각각의 고정화 셀로비오스 디하이드로게나제를 제조하였다.

[0034] 실시예 7: 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도 측정

[0035] 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도는 전자 수용체인 2,6-디클로로페놀-인도페놀의 흡광도 감소로 측정하였다. 3 mM의 2,6-디클로로페놀-인도페놀 0.1 mL, 300 mM의 락토스 0.1 mL, 0.1 M의 나트륨-아세트산 완충용액(pH 4.0) 0.8 mL, 그리고 상기 실시예 4와 6에서 제조된 각각의 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제 10 mg을 첨가하여 55℃에서 5분간 반응시킨 후 520 nm에서 반응 전, 후의 흡광도 감소를 측정하였다. 감소된 흡광도를 기준 곡선(standard curve)에 대입하여 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도를 측정하였고, 1유닛(unit)의 효소 활성도는 1분간 1 μmol의 2,6-디클로로페놀-인도페놀을 환원시키는 효소의 양으로 계산하였다.

[0036] 실시예 8: 담체에 고정화된 단백질량 측정

[0037] 담체에 고정화된 단백질량은 효소 고정화 전 효소 용액에서의 전체 단백질량과 효소 고정화 후 남아있는 단백질량의 차이에 의하여 계산하였고, 담체에 고정화된 단백질량의 측정은 브래드포드법(Bradford method)을 사용하였다. 브래드포드 용액 3 mL에 0.1 mL의 효소 용액을 첨가하여 1분간 교반하였고, 10분간 실온에서 방치하여 발색반응을 안정화시킨 후 발색정도를 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 기준 곡선(standard curve)에 대입하여 효소 용액 내의 단백질량을 측정하였다.

[0038] 실험예 1: 한 가지 기질을 이용한 셀로비오스 디하이드로게나제의 전처리가 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도에 미치는 영향

[0039] 상기 실시예 4에서 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도를 상기 실시예 7과 같이 관찰하였으며, 대조구로서 상기 실시예 3과 같은 전처리를 수행하지 않은 셀로비오스 디하이드로게나제를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 고정화시킨 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도를 관찰하였다.

[0040] 상기 실시예 3과 같이 전처리 물질을 달리하여 고정화시킨 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도를 조사한 결과, 하기 표 1과 같았다.

[0041] [표 1]

[0042] 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제 활성도에 여러 가지 전처리 물질이 미치는 영향

물질	고정화 온도 (°C)	활성도 (U/g matrix)	물질	고정화 온도 (°C)	활성도 (U/g matrix)
셀로비오스	20	1.08	셀로비오스	55→20	1.36
락토스		1.19	락토스		1.65
셀룰로스		1.46	셀룰로스		1.84
글루코스		1.33	글루코스		1.58
갈락토스		1.21	갈락토스		1.50
말토스		1.49	말토스		1.35
대조구 (비전처리)		1.05	대조구 (비전처리)		1.34

[0044] 그 결과, 상기 표 1에서 보는 바와 같이 셀로비오스 디하이드로게나제를 담체에 고정화시켰을 때, 전처리하지 않은 고정화 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도는 각각 1.05 U/g matrix (고정화온도 20℃) 및 1.34 U/g matrix (고정화온도 55→20℃)인 것을 관찰하였다. 그러나 전처리를 한 후 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성은 대조구들 보다 모든 실험구들에서 탁월하게 증가되었음을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 셀룰로스를 이용하여 전처리하였을 때 각각 1.46 U/g matrix (고정화온도 20℃) 및 1.84 U/g matrix (고정화온도 55→20℃)의 가장 높은 활성도를 나타내었고, 이것은 각각의 대조구들 보다 각각 39.0% 및 37.3% 증가된 것이며, 특히 55℃에서 20℃로 온도를 하강시키면서 고정화하는 것이 20℃에서 고정화하는 것 보다 더 탁월함을 확인할 수 있었다.

[0045] 실험예 2: 두 가지 이상의 기질들을 이용한 셀로비오스 디하이드로게나제의 전처리가 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도에 미치는 영향

[0046] 상기 실시예 6에서 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도를 상기 실시예 7과 같이 관찰하였다.

[0047] 상기 실시예 5와 같이 두 가지 이상의 전처리 물질로 전처리한 후 고정화시킨 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도를 조사한 결과, 하기 표 2와 같았다.

[0048] [표 2]

[0049] 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제 활성도에 두 가지 이상의 전처리 물질이 미치는 영향

물질	고정화 온도 (°C)	활성도 (U/g matrix)
셀로비오스+락토스	20	1.35
셀로비오스+락토스+셀룰로스		1.41
셀로비오스+락토스+셀룰로스+글루코스		1.51
셀로비오스+락토스+셀룰로스+글루코스+갈락토스		1.68
셀로비오스+락토스+셀룰로스+글루코스+갈락토스+말토스		2.15
셀로비오스+락토스	55→20	1.40
셀로비오스+락토스+셀룰로스		1.64
셀로비오스+락토스+셀룰로스+글루코스		1.72
셀로비오스+락토스+셀룰로스+글루코스+갈락토스		1.96
셀로비오스+락토스+셀룰로스+글루코스+갈락토스+말토스		2.17

[0050]

[0051] 그 결과, 상기 표 2에서 보는 바와 같이 셀로비오스 디하이드로게나제를 담체에 고정화시켰을 때, 상기 표 1의 대조구들 보다 모든 실험구들에서 탁월하게 증가되었음을 확인할 수 있었고, 이에 더하여 표 2에서 전처리에 사용된 기질들 수의 증가에 따라 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도가 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다. 그 중에서도 여섯 가지의 기질(셀로비오스, 락토스, 셀룰로스, 글루코스, 갈락토스, 말토스)을 이용하여 전처리하였을 때 각각 2.15 U/g matrix (고정화온도 20°C) 및 2.17 U/g matrix (고정화온도 55→20°C)로서 가장 높은 활성도를 나타내었고, 이것은 상기 실험예 1의 표 1에서 각각의 대조구들 보다 각각 104.8% 및 61.9% 증가된 것이며, 특히 55°C에서 20°C로 온도를 하강시키면서 고정화하는 것이 20°C에서 고정화하는 것 보다 더 탁월함을 확인할 수 있었다.

[0052] 따라서 상기 실험예에 의거하여 공유결합을 이용한 셀로비오스 디하이드로게나제의 고정화 시 이러한 전처리 방법이 효소의 활성을 증가시키는데 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0053] 실험예 3: 전처리한 후 고정화시킨 셀로비오스 디하이드로게나제의 재사용 시 활성도 변화 조사

[0054] 상기 실시예 6과 같이 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제 중 상기 실험예 2에서 가장 탁월한 활성도를 나타낸 여섯 가지의 기질(셀로비오스, 락토스, 셀룰로스, 글루코스, 갈락토스, 말토스)을 이용하여 전처리하였고, 55°C에서 20°C로 온도를 하강시키면서 고정화시킨 실험구와, 상기 실험예 1에서 55°C에서 20°C로 온도를 하강시키면서 고정화시킨 대조구를 사용하여 상기 실시예 7에서 수행한 것과 동일한 방법을 10회 반복하면서 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도 변화를 관찰하였다. 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제는 5분 동안 기질인 락토스를 산화시킴과 동시에 2,6-디클로로페놀-인도페놀을 환원시켰고, 단일 배치(batch) 반응이 끝난 후 고정화된 셀로비오스 디하이드로게나제는 원심분리에 의하여 수거되었다. 상기와 같이 수거된 고정화 셀로비오스 디하이드로게나제는 0.1 M 나트륨-아세트산 완충용액(pH 4.0)으로 수차례 세척한 후 다음 배치 반응에 재사용되었다.

[0055] 그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이 10회 재사용하였을 때, 초기 활성도와 비교하여 각각 실험구인 전처리된 고정화 셀로비오스 디하이드로게나제는 75.1%, 그리고 대조구인 비전처리된 고정화 셀로비오스 디하이드로게나제는 71.6%의 활성도가 유지됨을 확인할 수 있었다.

[0056] 도 1에서, 실험구와 대조구의 초기 활성도(재사용 횟수 0)는 각각 1.90 U/g matrix, 및 1.25 U/g matrix로 재

사용 실험을 실시하였다. 그 후, 10회 재사용 실험을 수행했을 때, 초기 활성도와 비교하여 각각 75.1%, 71.6%의 활성도가 남은 것이다. 따라서 전처리된 고정화 효소의 더 높은 활성도 때문에 10회 재사용 후에도 더 높은 활성도를 유지할 수 있고, 재사용 시 전처리에 의하여 급격한 활성도의 감소가 관찰되지 않은 것으로 미루어 전처리가 고정화 효소의 재사용에 탁월한 효과가 있는 것으로 판단하였다,

[0057] 이를 통하여 여섯 가지의 기질(셀로비오스, 락토스, 셀룰로스, 글루코스, 갈락토스, 말토스)을 이용하여 전처리하였고, 55℃에서 20℃로 온도를 하강시키면서 고정화시킨 셀로비오스 디하이드로게나제의 경우 여러 번 재사용에도 불구하고 그 활성도가 높게 유지됨을 확인할 수 있었고, 이로써 본 발명의 고정화 전 전처리 방법이 매우 효과적임을 확인할 수 있었다.

[0058] 실험예 4: 셀로비오스 디하이드로게나제의 전처리가 고정화된 단백질량에 미치는 영향

[0059] 상기 실험예 2와 3의 모든 실험구와 대조구에 고정화된 단백질량을 확인하기 위하여 상기 실시예 8과 같이 관찰하였다.

[0060] 그 결과, 실시예 4와 6에서 모든 실험구와 대조구의 제조를 위하여 첨가된 단백질의 농도는 7.65 ± 0.17 mg/mL이었고, 담체에 효소의 고정화 과정이 종결된 후 모든 실험구와 대조구 각각의 효소 용액에는 남아있는 단백질이 검출되지 않았다. 이를 통하여 각각의 고정화를 위한 효소 용액 내의 단백질은 100% 담체에 고정화 되었고, 전처리된 고정화 셀로비오스 디하이드로게나제의 활성도 증가가 고정화된 단백질량의 차이에 의한 것이 아님을 확인할 수 있었다.

도면

도면1

