

Fe₃O₄ 자성 나노입자에 고정화된 재조합 Levansucrase를 이용한 Levan의 합성

노현정, 이우일*
건양대학교 의료신소재학과

Synthesis of Levan using Recombinant Levansucrase Immobilized onto Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles

Hyeon-Jeong Noh, Woo-Yiel Lee*
Department of Biomedical Materials, Konyang University

요약 본 연구에서는 유전자 재조합을 통하여 *Bacillus subtilis* 유래의 levansucrase를 *Escherichia coli*를 이용하여 발현하였으며, Fe₃O₄ 자성 나노입자 (MNP)의 표면에 고정화하였다. MNP는 공침법을 통해 간단히 합성하였으며, 표면을 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES)를 이용해 amino group으로 개질하였다. FT-IR, SEM, TEM, VSM 및 XRD를 이용하여 분석한 MNP는 약 20 nm 매끄러운 구형 표면을 가지며 초상자성 물질로써 거동하였다. 효소 고정 시 최적 조건을 탐색하기 위해 (1) 가교제로 사용된 glutaraldehyde (GA)의 농도와 (2) 가교 시간, (3) MNP와 levansucrase의 비율 (w/w)을 다양한 변수로 조절하여 분석하였으며, 고정화 효소의 최대 recovery activity는 20 mM의 GA, 고정화 반응 3 시간, 2:1의 자성 나노입자와 효소의 비율 조건에서 각각 86.9±2.8%, 90.2±2.3% 및 84.8±1.6%로 나타났다. 다양한 온도 및 pH 범위에서 고정화 효소의 안정성을 비교하였으며, 20~50℃의 온도에서 열안정성이 향상되었음을 확인하였다. DNS method를 통해 비교한 자유 및 고정화된 levansucrase의 활성도는 자유 levansucrase의 활성도(3.99 unit/mL)에 비하여 고정화된 levansucrase의 활성도가 3.41 unit/mL로 비교적 낮았으나, 고정된 levansucrase는 5회 재사용 후에도 초기 활성의 60.6±3.5%를 유지하였다. 따라서, 본 연구는 levan의 생산 공정 차원에서 더 효율적인 공급이 가능할 것으로 생각한다.

Abstract In this study, recombinant levansucrase from *Bacillus subtilis 168* was expressed in *Escherichia coli* and immobilized onto the surface of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles (MNPs). The MNPs were synthesized by coprecipitation, and the surface was modified with amino groups from 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). The synthesized MNPs were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), vibrating sample magnetometry (VSM), and X-ray diffraction (XRD). The particles obtained were approximately 20 nm, had a smooth spherical surface, and behaved as superparamagnetic materials. Optimal enzyme immobilization was attained with 20 mM glutaraldehyde (crosslinking) and 3 h crosslinking at a 2:1 ratio of MNP to protein (w/w). The recovery activity of the immobilized enzyme reached 86.9±2.8%, 90.2±2.3%, and 84.8±1.6%, respectively. Improved thermal stability was observed at temperatures from 20°C to 50°C. Our results also determined that the activity of immobilized levansucrase is 3.41 units/mL, which is slightly lower than free levansucrase (3.99 units/mL). However, the immobilized levansucrase retained 60.6±3.5% of the initial activity even after five recycling cycles. Thus, we conclude that the procedure presented is a more efficient and straightforward levan preparation method.

Keywords : Recombinant Levansucrase, Immobilization, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles, *Bacillus Subtilis*, Levan

본 연구는 2022년도 정부(산업통상자원부)의 재원으로 한국산업기술평진원의 '바이오융복합기술 전문인력 양성사업(No. P0017805)'과 건양대학교의 지원을 받아 수행된 연구임.

*Corresponding Author : Woo-Yiel Lee(Konyang Univ.)

email: lee0519@konyang.ac.kr

Received November 29, 2022

Revised December 27, 2022

Accepted January 6, 2023

Published January 31, 2023

1. 서론

많은 천연다당류는 생체적합성, 생분해성, 무독성 및 생리활성 등으로 인해 산업적으로 많이 사용되어왔다[1]. 그 중 levan은 fructose 분자가 β-2,6 glycoside 결합으로 연결된 수용성 fructan으로 특정 미생물 및 식물 종에서 발견되는 천연다당류이다[2]. 천연 fructan의 두 종류 중 다른 하나인 inulin과 비교하여 높은 분자량을 가지며 수용성의 fructan인 levan은 유사한 분자량을 가진 다른 다당류에 비해 낮은 고유 점도를 가지며 산성 및 알칼리성 매질에서 열적 안정성과 높은 보습력을 나타낸다[3]. 이러한 Levan은 설탕을 원재료로 사용하여 생산 가능하며 다른 bio-polymer와 비교하여 산업적 가치가 높은 소재라고 할 수 있다. 그럼에도 불구하고 levan의 상업적 이용은 대량의 알코올 처리와 효소 억제 등의 다운스트림 공정에서의 병목 현상으로 인해 규모 확대가 저해되어 극히 일부에 불과하다[4].

Levan의 생합성에 필요한 levansucrase (EC 2.4.1.10)는 자당에 특이성을 보이는 세포 외 효소로, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus reuteri*, *Zymomonas mobilis*와 같은 많은 박테리아 종에서 발견되었다[5-7]. 그 중 *Bacillus subtilis* 168 (*B. subtilis*)에서 유래된 levansucrase는 52,971 Da의 질량과 473개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 이중 29번째 까지의 아미노산은 signal peptide로 세포 외 분비에 관여한다[8]. 단백질을 세포질 막의 단백질 송출 시스템으로 보내는 짧은 아미노산인 signal peptide는 *E. coli*에서 발현 시 문제인 불용성 봉입체를 방지할 수 있으며, 후속 정제 및 다운스트림 단계를 줄여 전체 생산 비용을 획기적으로 감소시킬 수 있다. 하지만 많은 levan 형성 미생물들과 마

찬가지로 *B. subtilis* 또한 가수분해 효소인 levansucrase를 동시에 생산하며, levansucrase 자체도 가수분해와 전이효소 활성에 대해 Michaelis-Menten 동역학을 따르기 때문에 이러한 특성은 천연 미생물의 발효에 의한 levan 생산에 악영향을 초래한다[9].

효소는 화학적 촉매와 비교하여 기질 및 생성물에 대한 특이성이 높다는 장점이 있지만 온도나 pH와 같은 반응 조건의 변화에 민감하며, 대부분의 효소는 구형의 단백질로 물에 용해되어 회분식 공정에서 재사용하기 힘들다는 단점이 있다[10]. 이를 해결하기 위한 방안 중 하나인 효소 고정화는 반응 중에 효소를 쉽게 분리할 수 있고, 물리·화학적으로 쉽게 변형할 수 있는 다양한 지지체를 이용하여 효소의 pH 및 열 안정성과 저장 안정성을 증가시킬 수 있어 효소의 한계점을 극복하는 방안으로 꾸준히 연구되고 있다[11-14]. 현재까지 levan을 생산하기 위한 levansucrase의 고정화는 glyoxyl agarose-IDA, chitosan 및 Sepabeads EC, vinyl sulfone-activated silica, titanium-activated magnetite 및 수산화인회석 등의 다양한 지지체를 사용하는 효소 고정 기술이 연구되었다[15-19]. 효소 고정화 시 지지체로서의 Fe₃O₄ 자성 나노입자(MNP)는 자석을 이용하여 효소의 분리가 용이하며 단위 질량당 높은 최대 표면적을 가지므로 효소 고정화를 위한 이상적인 지지체이다[20-22]. MNP가 가지는 ferrimagnetic 특성은 외부의 자력이 없을 때 응집을 방지하므로 용액에서 빠르게 분산되며, 생체적합성 또한 높아 다양한 생화학 제품의 분리 및 약물 전달과 같은 다양한 용도로 활용되고 있다[23].

본 연구는 *B. subtilis*의 gDNA로부터 signal peptide가 포함된 levansucrase 유전자(*sacB*)를 획득하여 재조합 levansucrase의 세포 외 발현을 유도하였다. 합성된

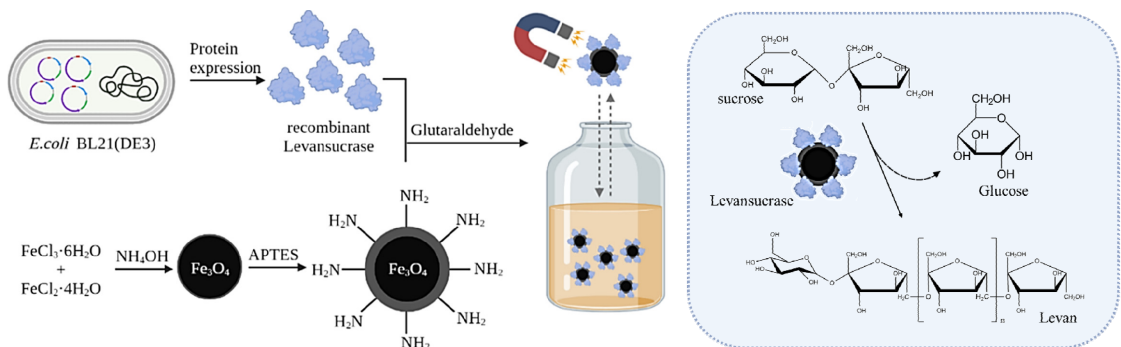


Fig. 1. Schematic representation of the synthesis of levan using recombinant levansucrase which immobilized on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles.

levansucrase는 GA를 가교제로 사용하여 APTES로 표면이 개질된 Fe₃O₄ MNP에 고정하였으며, 고정화 전후의 MNP를 FT-IR과 SEM, TEM, XRD, VSM으로 분석하였다. 또한 다양한 반응 조건에서 고정화 효소의 열안정성 및 pH 안정성을 평가하였으며 초기 활성과 잔류 활성 측정을 통해 재사용성을 평가하였다. 연구에 대한 간략한 모식도를 Fig. 1에 나타내었다.

2. 실험방법

2.1 재료

*B. subtilis*의 gDNA로부터 *sacB*를 cloning 하기위한 primer는 GenoTech, Corp. (Republic of Korea)에 의뢰하여 합성하였다. Sucrose, FeCl₂·4H₂O, FeCl₃·6H₂O, AP特斯 및 GA는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. His-tagged 단백질을 정제하기 위한 Ni-NTA agarose는 QIAGEN (Hilden, Germany)의 제품을 사용하였으며, 합성된 Fe₃O₄ MNP의 구조 분석을 위해 ALPHA-P ATR FT-IR (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA), Libra 200 MC TEM (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 및 Apero 2 SEM (Thermo Fisher Scientific, Inc.)를 사용하였다. 그밖에 사용된 다른 모든 화학 물질은 biotechnology grade를 사용하였다.

2.2 재조합 levansucrase의 cloning과 발현

Levansucrase를 코딩하는 유전자 *sacB*는 *B. subtilis*의 gDNA를 주형으로 하여 PCR을 통해 얻었으며, 사용된 primer는 Table 1과 같이 설계하였다. 재조합 levansucrase의 세포 외 발현을 유도하기 위해 signal peptide sequence를 포함하여 forward primer를 설계하였으며, 정제의 용이성을 위하여 6X his tag sequence를 reverse primer에 추가하였다. PCR 반응을 통해 증폭된 *sacB*는 1% agarose gel을 통해 확인하였으며, pRSET A 벡터에 삽입하여 Fig. 2와 같이 pRSLevB-His를 구축하였다. 재조합 levansucrase의 발현은 구축된 발현벡터로 형질 전환된 *E. coli* BL21(DE3)을 ampicilin (100 µg/mL)이 포함된 LB 배지에서 O.D₆₀₀이 0.6에 도달할 때까지 175 rpm, 37°C에서 배양하였으며, 1.0 mM의 IPTG를 첨가한 후 6시간 추가 배양하였다. 배양된 형질전환체는 4°C, 4,000

×g에서 15분간 원심분리하여 가용성 단백질을 분리하였으며, BioLogic LP System (BIO-RAD, USA)을 이용한 Ni-NTA를 통해 재조합 단백질을 정제하였다[26]. Ni-NTA agarose resin을 column에 충전한 후 buffer 1 (20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, 10 mM imidazole, pH 7.8)을 첨가하여 평형화하여 levansucrase 발현 혼합물을 loading 하였다. 이후 buffer 2 (20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, 20 mM imidazole, pH 6.0)을 첨가하여 column을 세척하였으며, buffer 3 (20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, 300 mM imidazole, pH 4.0)을 첨가하여 his tag가 결합된 levansucrase를 용출하였다. 각 단계에서 용출된 단백질은 10% SDS-PAGE gel을 통해 분석하였다.

Table 1. Primer design for amplification of *sacB*.

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
Forward primer (pF)	GAATTC CATATG ATGAACA TCAAAAAGTTTGCAAAAACA
Reverse primer (pR)	CATGCCATGGATGATGATGATGATGATGTTT GTAACTGTTAAATTGTCC

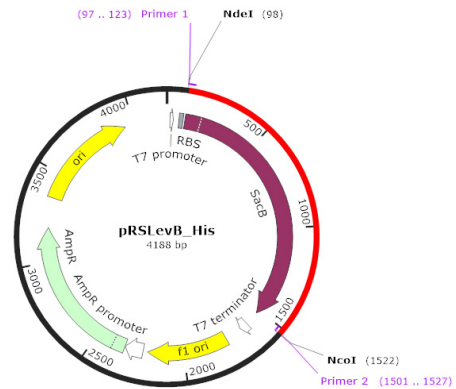


Fig. 2. Schematic map of the pRSLevB-His vector.

2.3 자성 나노입자의 합성 및 표면 개질

효소 고정화를 위한 지지체로서의 Fe₃O₄ MNP는 공침법을 기초로 합성하였다[24]. FeCl₂·4H₂O (1 g)와 FeCl₃·6H₂O (2 g)을 100 mL의 증류수에 용해하여 90°C에서 10분간 교반한 후 pH가 12에 도달할 때까지 NaOH (25~30 wt%)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 90°C에서 30분간 추가 교반 후 28°C까지 냉각시킨 흑색 침전물을 자석으로 수집하여 90°C 진공 오븐에서 건조한

후, MNP의 표면 개질 반응을 Stöber process에 따라 수행하였다[25]. 합성된 Fe₃O₄ 1.25 g을 50% ethanol 50 mL에 분산시켜 600 rpm에서 연속 교반하면서 APTES 용액 5 mL를 적가하였다. 이후 50°C, 1,000 rpm에서 3시간 동안 교반하여 생성된 용액을 원심분리하여 얻어진 입자는 사용 전까지 28°C의 진공 데시케이터에 보관하였다.

2.4 재조합 levansucrase의 고정화

Amino기로 코팅된 Fe₃O₄ MNP를 PBS 완충액 (50 mM, pH 7.0)에 최종농도가 50 mg/mL가 되도록 녹인 후 혼합물을 40 kHz에서 10분간 초음파 처리하였다. 최대 효소 고정화를 위해 (1) 가교제로 사용된 GA의 농도 (10, 20, 30, 40, 50 mM), (2) 고정화 반응 시간 (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 시간), (3) MNP와 효소의 비율 (0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 5:1) (w/w)의 변화에 따른 최적 조건을 탐색하였다. 각 조건에서의 효소의 recovery activity는 생성된 Fe₃O₄-APTES-GA- Levansucrase 복합체를 자석으로 회수하여 PBS 완충액으로 3회 세척하여 측정 및 비교하였다. 입자에 대한 고정화 효소의 양은 배지의 초기 단백질 함량과 최종 단백질 함량의 차이에 따라 Eq. (1)과 같이 계산하였다.

$$\text{Immobilization (\%)} = \frac{P1 \times V1 - P2 \times V2}{P2 \times V2} \times 100 \quad (1)$$

where P1 and P2 denote the initial and final protein concentration (mg/mL), and V1 and V2 denote the initial and final reactant volume (mL), respectively.

효소 활성의 회복률(%)은 고정된 효소의 활성과 자유 효소의 활성 비율로 계산하였다. MNP의 표면에 존재하는 amine기와 levansucrase의 존재는 400-4,000 cm⁻¹의 파장에서 FT-IR 분광기를 이용하여 확인하였다.

2.5 고정화에 따른 Fe₃O₄ MNP의 기기 분석

합성된 Fe₃O₄ MNP와 효소가 고정된 Fe₃O₄ MNP의 형태는 SEM과 TEM으로 특성화하였으며, 자기적 특성은 VSM (model 730; Lake Shore, Westerville, OH, USA)을 이용해 평가하였다. 자력계는 순수한 니켈을 사용하여 보정하였으며 1T의 외부 자기장을 인가하였다. Fe₃O₄ 및 효소 고정 Fe₃O₄의 XRD 패턴은 CuK α 방사선 소스가 있는 Philips X'pert 회절계를 사용하여 측정하였다.

2.6 자유 및 고정화 levansucrase의 활성 분석

Levansucrase 용액의 단백질 함량은 bicinchoninic acid (BCA) protein assay로 정량화하였다[27]. 재조합 levansucrase와 고정화된 levansucrase의 활성도는 효소 반응을 실시한 후 부산물로 발생하는 glucose를 DNS method를 통해 분석하였다[28]. 효소 반응은 50 mM sodium phosphate 완충액 (pH 5.5)에서 1%의 sucrose를 기질을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하여 진행되었으며, acetic acid를 첨가하여 효소를 배양한 후 DNS 용액과 각 효소 반응물을 1:1 비율로 혼합한 용액을 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Levansucrase 활성의 1 단위 (Unit)은 분당 sucrose로부터 1 μ mol의 환원당을 방출하는 효소의 양으로 나타내었다.

2.7 고정화 levansucrase의 효소 반응

2.7.1 pH와 온도의 영향

다양한 pH값에서 자유 및 고정된 levansucrase의 활성을 비교하여 최적 pH를 확인하기 위해 sucrose 5 g을 기질로 사용하여 levan 합성 반응을 진행하였다. 효소를 다양한 pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)로 조절된 반응 buffer 50 mL에 첨가하여 25°C에서 효소 반응을 수행하였으며 반응 완료 후 최종 부피의 2.5배의 ethanol을 첨가하였다. 이후 용액을 여과하여 합성된 levan의 무게를 칭량하였으며, 최적 pH 조건에서의 levansucrase의 활성을 100%로 정의하여 효소의 상대적 활성을 계산하였다.

Levan 합성의 가장 효율적인 온도를 결정하기 위해 앞서 결정된 pH 조건에서 levan 합성 반응을 수행하였다. 상기와 동일한 방법으로 levan 합성 반응을 진행하였으며, 서로 다른 온도 (20~50°C)에서 24시간 배양하였다. 반응 종료 후 levan을 분리 정제 하여 최적 온도에서 levansucrase의 활성을 100%로 정의하여 상대적 활성을 계산하였다.

두 가지의 반응 매개변수인 pH와 온도는 효소 단위 (0.5 unit/mL)와 반응 완충액 (20 mM acetate buffer) 및 반응 시간을 24시간으로 일정하게 유지하면서 측정하였다.

2.7.2 pH 및 열 안정성 평가

자유 및 고정화 효소의 pH 안정성과 열 안정성은 각 조건에서 1시간 동안 배양하여 전후의 효소 활성을 측정하여 평가하였다. pH에 대한 안정성은 25°C에서 상이한

pH (4.0~8.0)의 완충용액에서 배양한 후 유리 및 고정된 효소의 잔류 활성을 측정하였다. 효소의 열 안정성은 pH 6으로 조정된 완충용액에서 다양한 온도 범위 (20~50℃)에 따른 효소의 잔류 활성을 비교하여 분석하였다.

2.8 고정화 levansucrase의 재사용성

고정화된 levansucrase의 재사용성에 대한 활성 시험은 7회에 걸쳐 진행되었으며, 1%의 sucrose를 기질로 하여 적절한 반응 조건에서 배양하여 고정화 효소의 반응을 수행하였다. 각 cycle 후 MNP에 고정된 levansucrase를 자석으로 회수한 후 PBS buffer로 3회 세척하여 새로운 반응 혼합물에 재현탁하였다. 효소의 잔류 활성은 첫 번째 cycle의 효소 활성을 100%로 설정하였다.

2.9 통계 처리

결과로 제시된 수치는 모두 3회 반복 실시한 후 평균 ±표준편차(mean ±SD)로 나타내었다. 통계적 유의성은 t-test 및 ANOVA를 이용하여 분석하였다(p <0.05=*, p <0.01=**, p <0.001=***).

3. 결과 및 고찰

3.1 pRSLevB-His 발현 벡터의 구축

*E. coli*를 이용한 재조합 단백질은 고농도 배양이 가능하다는 장점이 있지만 봉입체 형태로 발현되어 protein refolding이 필요하다는 단점이 있다. 따라서 levansucrase의 secreted expression을 유도하기 위해 *B. subtilis* gDNA에 존재하는 고유한 signal peptide가 포함된 sacB를 PCR을 통해 확보하여 이를 agarose gel 전기영동을 통해 분석하였으며, 1,500 bp 부근에서 선명한 밴드가 관찰되어 sacB가 올바르게 증폭됨을 확인하였다. 증폭된 sacB는 pRSET A 벡터에 삽입 후 *E. coli*에 cloning하였으며 각각의 형질전환체를 colony PCR 및 제한 효소 분석을 진행하여 pRSLevB-His 벡터의 구축이 성공적으로 이루어졌음을 확인하였다.

3.2 재조합 levansucrase의 발현 및 정제

선별된 형질전환체에서 발현된 단백질을 10% SDS-PAGE 전기영동 분석을 통하여 확인하였으며, 약 50 kDa에서 levansucrase가 발현되었음을 관찰하였다. N-terminal에 위치한 signal peptide의 존재로 인해 세포 외 발현이 관찰되었으며, C-terminal에 추가한 6X His tag를 이용하여 Ni-NTA affinity chromatography를 수행하였다. Fig. 3의 SDS-PAGE gel의 Lane 3에서 보이는 50 kDa의 단일 밴드를 통해 재조합 levansucrase의 성공적인 정제를 확인하였으며, BCA assay ($R^2 \geq 0.998$)를 통해 정량한 재조합 levansucrase는 42.5 μ g/mL로 확인되었다.

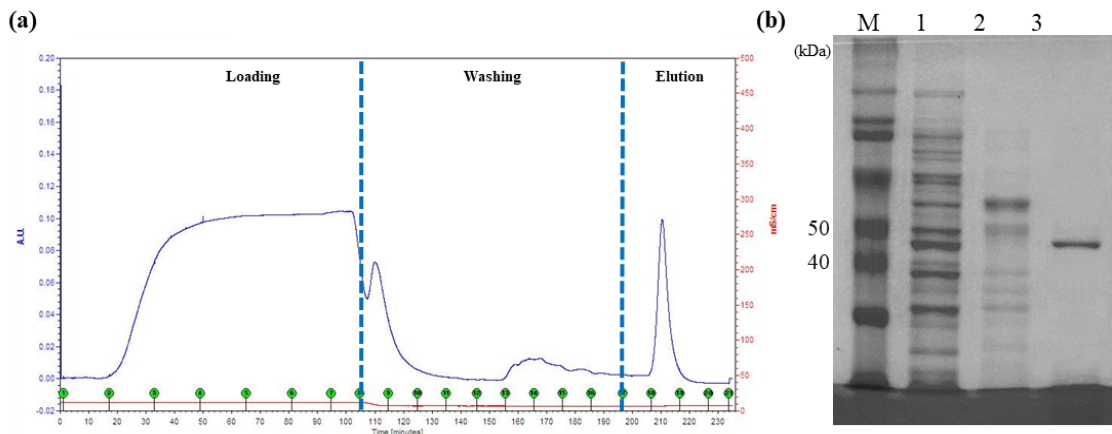


Fig. 3. (a) Chromatogram of the purification process of levansucrase through Ni-NTA affinity chromatography, (b) SDS-PAGE analysis for recombinant levansucrase purified and fractionated using Ni-NTA (Lane M: protein marker, Lane 1: pRSLevB-His/BL21(DE3) expression solution, Lane 2: protein fraction eluted with 20 mM imidazole, Lane 3: recombinant levansucrase eluted with 300 mM imidazole).

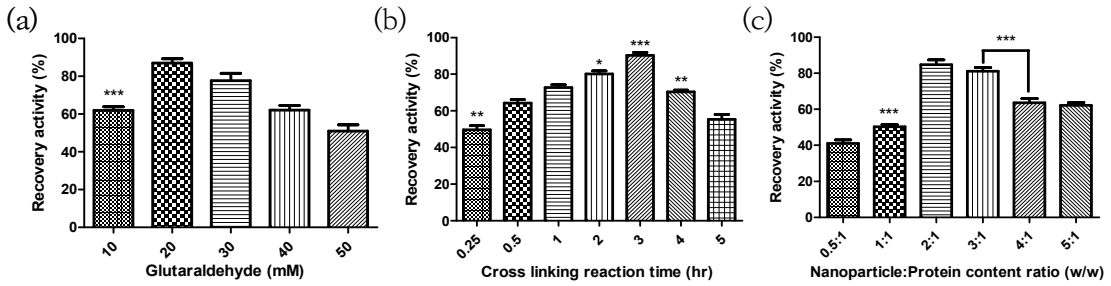


Fig. 4. Effect of (a) concentration of GA, (b) cross-linking reaction time, and (c) ratio (w/w) of amounts of nanoparticles to enzyme on enzyme activity recovery in the immobilization reaction.

3.3 고정화 조건에 따른 효소의 활성 측정

MNP에 대한 효소 고정화의 최적 조건을 조사하기 위해 GA 농도, 고정화 반응 시간 및 levansucrase와 나노입자의 비율 (w/w)에 대한 영향을 조사하였다. 고정화된 levansucrase의 recovery activity는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 20 mM의 GA, 3시간의 가교 시간 및 MNP와 단백질 비율 (w/w)이 2:1일 때 각각 86.9±2.8%, 90.2±2.3% 및 84.8±1.6%의 최대 recovery activity를 나타냈다. 20 mM 이상의 GA 농도를 사용하여 고정화된 levansucrase의 recovery activity가 감소한 이유는 GA의 반응성 말단기의 분자 내 가교 때문일 수 있으며 이는 이전 보고서의 결과와 유사하다[29]. 최적의 반응 시간은 지지체 표면의 활성 부위가 효소에 충분히 결합되어 포화 수준에 도달함을 의미하며, 고정된 levansucrase의 recovery activity는 3시간 후 최대 활성을 나타냈다. 3시간 이후 고정된 효소의 recovery activity의 감소는 지지체 표면에 포화된 효소로 인한 물질전달 저항의 결과로 보인다[30]. 또한 많은 양의 효소가 지지체에 고정되면 효소 분자 사슬이 주변 단백질 분자와 충돌하여 이전에 보고된 바와 같이 효소 이동도가 감소할 수 있다[31].

최적화된 조건을 바탕으로 잔류 용액의 단백질 농도를 측정하였으며, 14.16 µg/mL의 잔류 단백질이 측정됨에 따라 고정화된 levansucrase의 양은 28.34 µg/mL로 계산되었다. 자유 및 고정화 levansucrase의 활성을 DNS method를 통해 비교하였으며 자유 levansucrase는 3.99 unit/mL의 활성을 나타내었으나 고정화된 levansucrase는 3.41 unit/mL로 비교적 낮은 활성을 보였다. 이러한 결과는 Fig. 4와 같이 전체 고정화 조건에서 recovery activity가 약간 감소하는 것과 일치한다. 고정화로 인해 효소의 활성이 감소하는 단점이 있지만, 용이한 효소의 회수과정으로 반복사용이 가능하다는 장점이 산업계의 주목이 될 수 있다.

3.4 고정화에 따른 Fe₃O₄ MNP의 기기 특성화

3.4.1 Fe₃O₄-levansucrase의 고정화

재조합 levansucrase의 MNP 결합 여부를 확인하기 위해 Fe₃O₄ MNP와 효소를 가교한 MNP의 작용기를 FT-IR을 통해 분석하였다. 순수한 MNP의 spectrum에서 보이는 539 cm⁻¹의 peak는 Fe-O-Fe 결합을 나타내며, 1,049 cm⁻¹에서 보이는 Si-O-Si의 비대칭 신축 peak는 APTES에 의해 Fe₃O₄ MNP의 표면이 성공적으로 개질됨을 나타낸다 (Fig. 5). 자유 효소의 FT-IR peak와 비교하여, 고정화 된 MNP의 spectrum에서 보이는 1414 cm⁻¹의 -COO- peak와 1643, 1664 cm⁻¹의 C=N 진동 peak를 가지며, levansucrase의 -NH₃⁺ 신축진동에 기인한 2,948 및 2,888 cm⁻¹의 peak가 고정화 된 MNP의 spectrum에서 나타남을 통해 성공적인 효소 고정을 확인하였다.

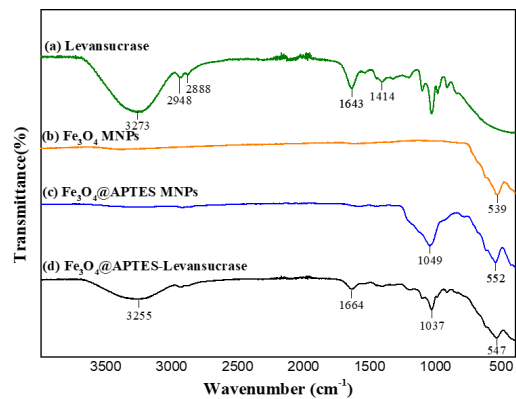


Fig. 5. FT-IR spectrum. (a) free levansucrase, (b) Fe₃O₄ MNPs, (c) surface-modified Fe₃O₄ MNPs with APTES, and (d) MNPs immobilized with levansucrase.

3.4.2 Fe₃O₄-levansucrase의 형태 특성화

Fe₃O₄ MNP와 levansucrase가 결합된 Fe₃O₄ MNP의 형태를 SEM을 이용하여 조사하였다. Fig. 6은 SEM 측정 결과로 Fe₃O₄ MNP의 표면은 효소 고정 전후에 매끄러운 구형을 가지며 자기 쌍극자 모멘트로 인해 응집된 것처럼 보였다[32].

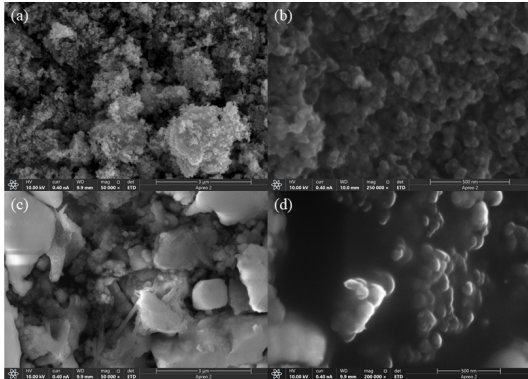


Fig. 6. SEM images of synthesized MNPs. (a), (b) Fe₃O₄ nanoparticles, (c), (d) Fe₃O₄ magnetic nanoparticles fixed with levansucrase, magnified 50,000 times (scale bar: 3 μm) and 250,000 times (scale bar: 500 nm), respectively.

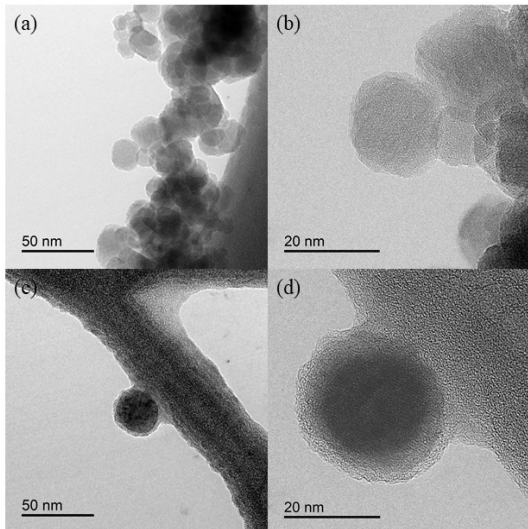


Fig. 7. TEM images of the synthesized magnetic nanoparticles. (a), (b) Fe₃O₄ magnetic nanoparticle, (c), (d) Fe₃O₄ magnetic nanoparticles fixed with levansucrase, magnified 250,000 times (scale bar: 50 nm) and 500,000 times (scale bar: 20 nm), respectively.

합성된 MNP와 효소가 결합된 MNP의 내부 구조를 분석하기 위해 TEM 분석을 수행하였다. Fig. 7의 TEM 이미지에서 확인된 MNP의 평균 크기는 약 20 nm로, 효소를 고정한 후 약 30 nm의 입자 크기로 나타났다. 입자 크기는 작을수록 비표면적이 커져서 지지체의 표면에 더 많은 효소가 고정될 수 있으며, 기질 및 물질 확산 제한을 최소화하기 때문에 지지체의 핵심 요소 중 하나이다[33].

3.4.3 Fe₃O₄-levansucrase의 결정학적 및 자기적 특성화

합성된 MNP의 결정 구조를 XRD로 조사하였으며 Fe₃O₄ MNP와 효소가 고정된 Fe₃O₄ MNP의 회절 패턴을 Fig. 8에 나타내었다. 합성된 Fe₃O₄ MNP는 데이터베이스 파일 (JCPDS database file No. 85-1436)에 해당하는 peak 이외의 다른 특징적인 peak는 검출되지 않았으며, 이는 Iron(II) oxide 또는 수산화물과 같은 불순물이 포함되지 않은 순수한 Fe₃O₄ MNP의 합성을 나

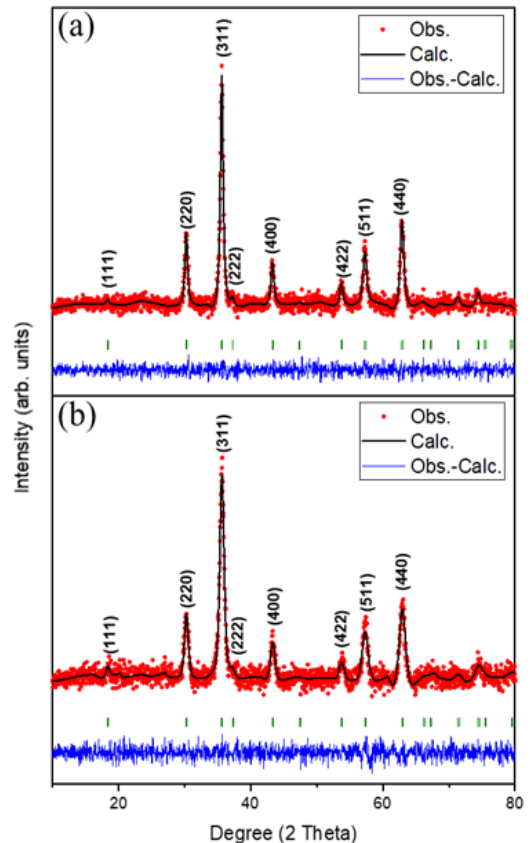


Fig. 8. XRD pattern of (a) synthesized Fe₃O₄ MNPs and (b) enzyme-immobilized Fe₃O₄ MNPs.

타낸다. Levansucrase를 Fe₃O₄ MNP의 표면에 고정화 후의 XRD 패턴은 Bragg 회절 강도의 작은 차이를 제외하고는 Fe₃O₄의 패턴과 유사하였으며, levansucrase가 Fe₃O₄ MNP에 고정된 후에도 Fe₃O₄의 결정상의 성질이 변하지 않았음이 확인되었다[34,35].

합성된 MNP의 자기적 특성은 VSM을 사용하여 분석하였으며, 고정화 전후의 변화를 Fig. 9의 hysteresis curve로 나타내었다. Fe₃O₄ MNP 및 효소 고정 Fe₃O₄ MNP의 포화 자화는 각각 68.1 및 49.1 emu/g로, 고정화 후 Fe₃O₄ MNP의 포화 지수가 약간 감소하는 것은 단백질 침착으로 인한 shell 층의 두께 증가 때문일 수 있다. 효소 고정 후 포화 자화의 감소에도 불구하고 MNP는 자기장에 충분히 반응하였고 고체상과 액체상이 잘 분리되었다.

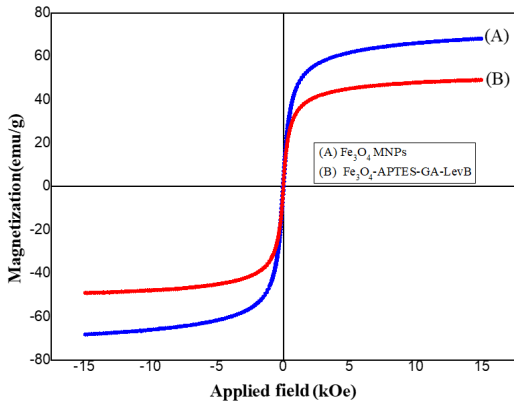


Fig. 9. Magnetic hysteresis curves of (a) Fe₃O₄ nanoparticles and (b) enzyme-immobilized Fe₃O₄ nanoparticles.

3.5 자유 및 고정화된 levansucrase의 효소적 특성화

3.5.1 효소 활성 및 안정성에 대한 pH의 영향

자유 및 고정된 levansucrase의 활성에 대한 pH의 영향은 pH 4.0-8.0 범위로 조절된 완충용액에서 수행하였다. Fig. 10a에서 보는 바와 같이 자유 및 고정화 효소 모두 pH 6.0에서 최대 활성을 나타내었으며, 이는 Fe₃O₄ MNP에 대한 고정화가 효소 활성 부위의 이온화 그룹에 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 기존 연구 중 효소의 최적 pH가 효소와 지지체의 전하에 의해 영향을 받는 결과를 가져오는 경우도 있으나[36,37], 본 연구에서는 pH의 영향은 없는 것으로 확인되었다. Fig. 10b는 다양한 pH 범위에서 효소의 안정성을 비교한 것으로 고정화 효소는 유리 효소보다 전체 pH 범위에서 약간 더 높

은 활성을 가지며, 이는 고정화 후 지지체와 효소 사이의 결합으로 인해 발생하는 입체 효과 (steric effect)에 기인한 결과로 볼 수 있다[38].

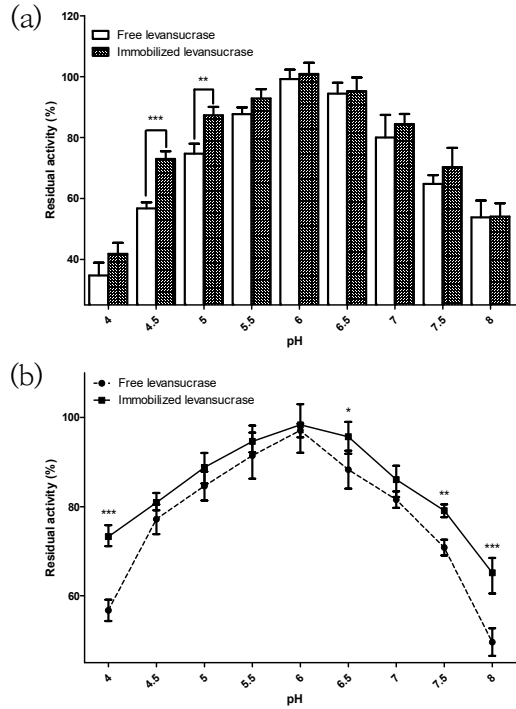


Fig. 10. Optimal pH (a) and pH stability (b) of immobilized levansucrase.

3.5.2 효소의 활성과 안정성에 대한 온도의 영향

온도는 효소 활성에 영향을 미치는 중요한 요소 중 하나로, 다양한 온도 범위에서의 고정화 효소 활성을 검토하였다. Fig. 11a에 도시된 것과 같이 levansucrase의 최적 온도는 25°C에서 30°C로 이동하였다. 이러한 효소의 최적 온도의 차이는 고정화 후 발생하는 3차원 구조의 변화로 기인한 것일 수 있으며, 기존 연구발표들과 유사하였다 [39,40] Fig. 11b에 나타난 바와 같이 고정화 효소는 40~50°C에서 1시간 배양 후 초기 활성의 45.2~75.1%를 유지했지만, 자유 효소는 12.2~50.4%의 활성만 유지했다. 이러한 고정화 후 효소의 열안정성 증가는 지지체와 효소 사이의 공유 결합 형성이 고정화 효소의 구조적 유연성과 열 진동을 감소시키며, 단백질의 변성을 방지할 수 있다는 다른 연구의 결과들과 일치한다[41-43].

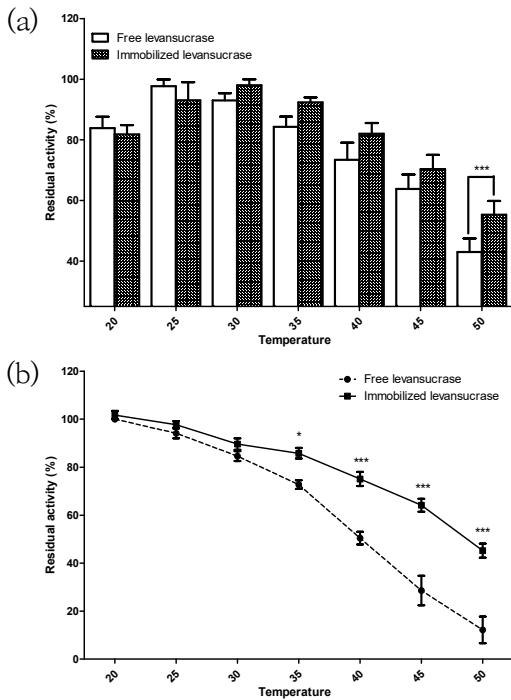


Fig. 11. Optimal temperature (a) and thermal stability (b) of immobilized levansucrase

3.6 고정화된 levansucrase의 재사용성

효소 고정의 궁극적인 목적으로 볼 수 있는 효소 재사용 가능성을 7회 연속 사용 후 잔류 활성을 분석하여 Fig. 12에 나타내었다. MNP-levansucrase는 5회 재사용 후 초기 활성의 $60.6 \pm 3.5\%$ 를 보였고, 6회와 7회 재

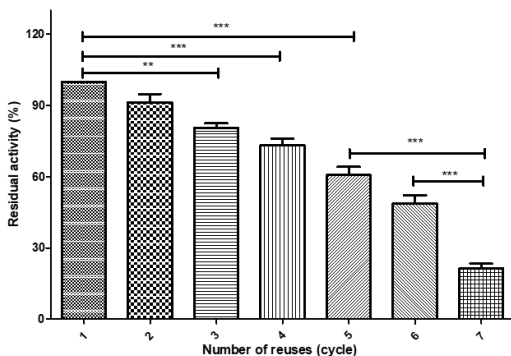


Fig. 12. Reusability of the immobilized levansucrase as measured by relative enzyme activity after seven consecutive cycles of reuse. The reaction in each cycle was carried out using a new substrate solution.

사용 후에도 각각 $48.6 \pm 3.4\%$ 와 $21.3 \pm 2.7\%$ 의 잔류 활성을 보였다. 재사용 횟수가 증가함에 따라 고정화된 levansucrase의 활성이 점차 감소한 것은 반복 사용으로 인한 기계적 손상 및 반응 후 세척 단계에서의 효소 손실로 인한 것으로 사료된다.

4. 결론

본 연구는 기능성 바이오소재인 levan의 합성 공정의 효율성을 높이기 위해 signal peptide가 포함된 *B. subtilis* 유래의 재조합 levansucrase를 무기 지지체인 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@APTES MNP}$ 에 고정함으로써 효소 안정성의 향상과 용이한 회수 및 재사용 특성을 부여하고자 하였다. 재조합 levansucrase의 발현은 signal peptide의 존재로 인해 *E. coli*에서 세포 외 발현으로 나타났으며, C-terminal에 첨가한 6X His-tag에 의해 금속 친화성 chromatography를 사용하여 간단히 정제하였다. 합성된 MNP는 APTES로 표면을 개질한 후에도 매끄러운 표면을 가진 약 20 nm의 작은 입자 반경을 가지는 것으로 분석되었다. 효소 고정을 위한 최적 조건은 (1) 20 mM의 GA농도, (2) 3시간의 가교 시간, (3) 2:1의 MNP와 단백질의 비율로 나타났으며, 이 때의 최대 활성은 각각 $86.9 \pm 2.8\%$, $90.2 \pm 2.3\%$, $84.8 \pm 1.6\%$ 로 나타났다. 고정화 전후의 결정 구조는 유의한 차이점을 보이지 않았으며, 고정화 후 MNP의 포화도가 소폭 감소하였으나 외부 자기장에 충분히 반응하여 효소의 용이한 분리가 가능하였다. 고정화된 levansucrase는 다양한 pH 범위에서 자유 효소보다 약간 더 안정적인 거동을 보였으며, 고정화 효소의 열안정성은 자유 효소에 비해 전체적인 범위에서 증가하였다. 또한, 고정화된 levansucrase는 5회 및 7회 재사용 후에도 각각 $60.6 \pm 3.5\%$ 와 $21.3 \pm 2.7\%$ 의 우수한 잔류 활성을 보였다. 따라서 본 연구의 Fe_3O_4 MNP에 재조합 levansucrase를 고정화하고 이를 이용한 levan의 합성 방법은 용이한 효소 회수 및 재사용의 장점이 있는 또 다른 효율적인 levan의 합성 방법을 제공하고 있다.

References

[1] E. T. Öner, L. Hernández, J. Combie, "Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences

- to future prospects”, *Biotechnology Advances*, Vol.34, No.5, pp.827-844, Sep-Oct. 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.002>
- [2] C. S. Hundscheil, F. Jakob, A. M. Wagemans, “Molecular weight dependent structure of the exopolysaccharide levan”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol.161, pp.398-405, Oct. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.019>
- [3] S. A. Arvidson, B. T. Rinehart, F. Gadala-Maria, “Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp.”, *Carbohydrate Polymers*, Vol.65, No.2, pp.144-149, Jul. 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.039>
- [4] Y. W. Han, “Microbial Levan”, *Advances in Applied Microbiology*, Vol.35, pp.171-194, 1990.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70244-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70244-2)
- [5] J. Seibel, R. Moraru, S. Götze, K. Buchholza, S. Na’amnieh, et al., “Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase)”, *Carbohydrate Research*, Vol.341, No.14, pp.2335-2349, Oct. 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.07.001>
- [6] S. A. F. T. van Hijum, E. Szalowska, M. J. E. C. van der Maarel, L. Dijkhuizen, “Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*”, *Microbiology*, Vol.150, No.3, pp.621-630, Mar. 2004.
DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.26671-0>
- [7] E. W. Lyness, H. W. Doellen, “Levansucrase from *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnology Letters*, Vol.5, pp.345-350, May. 1983.
DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01141136>
- [8] M. Steinmetz, D. L. Coq, S. Aymerich, G. Gonzy-Tréboul, P. Gay, “The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites”, *Molecular and General Genetics MGG*, Vol.200, pp.220-228, Jul. 1985.
DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00425427>
- [9] R. Chambert, G. Tréboul, R. Dedonder, “Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*”, *European Journal of Biochemistry*, Vol.41, No.2, pp.285-300, Jan. 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03269.x>
- [10] N. V. Bhagavan, Medical biochemistry, Academic Press, 2002, pp.153-175, Oct. 2010.
- [11] R. A. Sheldon, “Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance”, *Advanced Synthesis & Catalysis*, Vol.349, No.8-9, pp.1289-1307, Jun. 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>
- [12] A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, “Enzyme immobilization: an update”, *Journal of Chemical Biology*, Vol.6, pp.185-205, Aug. 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>
- [13] S. Sharma, S. Gupta, Princy, S. K. Arya, A. Kaur, “Enzyme immobilization: Implementation of nanoparticles and an insight into polystyrene as the contemporary immobilization matrix”, *Process Biochemistry*, Vol.120, pp.22-34, Sep. 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.05.022>
- [14] H. H. Nguyen, M. Kim, “An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization”, *The Korean Vacuum Society*, Vol.26, No.6, pp.157-163, Nov. 2017.
DOI: <https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157>
- [15] A. Hill, S. Karboune, C. Mateo, “Investigating and optimizing the immobilization of levansucrase for increased transfructosylation activity and thermal stability”, *Process Biochemistry*, Vol.61, pp.63-72, Oct. 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.011>
- [16] S. Sangmanee, S. Nakapong, R. Pichyangkura, K. Kuttiyawong, “Levan-type fructooligosaccharide production using *Bacillus licheniformis* RN-01 levansucrase Y246S immobilized on chitosan beads”, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, Vol.38, No.3, pp.295-303, May-Jun. 2016.
- [17] M. A. Esawy, D. A. R. Mahmoud, A. F. A. Fattah, “Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties”, *Bioprocess Engineering*, Vol.25, No.2, pp.237-246, Apr-Jun. 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-66322008000200003>
- [18] K. H. Jang, K. B. Song, B. S. Park, C. H. Kim, B. H. Chung, et al., “Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite”, *Process Biochemistry*, Vol.37, No.4, pp.339-343, Dec. 2001.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00215-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00215-1)
- [19] K. H. Jang, K. B. Song, J. S. Kim, C. H. Kim, B. H. Chung, et al., “Production of levan using recombinant levansucrase immobilized on hydroxyapatite”, *Bioprocess Engineering*, Vol.23, pp.89-93, Jul. 2000.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s004499900153>
- [20] C. G. C. M. Netto, H. E. Toma, L. H. Andrade, “Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol.85-86, pp.71-92, Jan. 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.08.010>
- [21] Y. Sun, F. Shi, Y. Niu, Y. Zhang, F. Xiong, “Fe₃O₄@OA@ Poloxamer nanoparticles lower triglyceride in hepatocytes through liposuction effect and nano-enzyme effect”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol.184, Dec. 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110528>
- [22] F. Ghanbari, P. Hashemi, “Removal of histamine from biological samples by functionalized Fe₃O₄@Agarose @Silica nanoparticles and its fast determination by ion mobility spectrometry”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol.203, Jul. 2021
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111717>
- [23] M. R. Ghazanfari, M. Kashefi, S. F. Shams, M. R. Jaafari, “Perspective of Fe₃O₄ Nanoparticles Role in

- Biomedical Applications”, *Biochemistry Research International*, Vol.2016, pp.32, May. 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/7840161>
- [24] S. Rajput, C. U. Pittman Jr., D. Mohan, “Magnetic magnetite (Fe₃O₄) nanoparticle synthesis and applications for lead (Pb²⁺) and chromium (Cr⁶⁺) removal from water”, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol.468, pp.334-346, Apr. 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.12.008>
- [25] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, “Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range”, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol.26, No.1, pp.62-69, Jan. 1968.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5)
- [26] E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher, “New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues”, *Journal of Chromatography A*, Vol.411, pp.177-184, 1987.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)93969-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)93969-4)
- [27] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, et al., “Measurement of protein using bicinchoninic acid”, *Analytical Biochemistry*, Vol.150, No.1, pp.76-85, Oct. 1985.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- [28] J. B. Summer, V. A. Graham, “Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine”, *Journal of Biological Chemistry*, Vol.47, No.1, pp.5-9, Jun. 1921.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86093-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86093-8)
- [29] C. Garcia-Galan, J. C. S. Santos, O. Barbosa, R. Torres, E. B. Pereira, et al., “Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol”, *Process Biochemistry*, Vol.49, No.4, pp.604-616, Apr. 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.028>
- [30] Y. Lu, H. Dai, H. Shi, L. Tang, X. Sun, et al., “Synthesis of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutyrate by immobilized cells using amino acid-modified magnetic nanoparticles”, *Process Biochemistry*, Vol.99, pp.9-20, Dec. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.027>
- [31] L. Fernandez-Lopez, S. G. Pedrero, N. Lopez-Carrobles, B. C. Gorines, J. J. Virgen-Ortiz, et al., “Effect of protein load on stability of immobilized enzymes”, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol.98, pp.18-25, Mar. 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.002>
- [32] J. Alzaidi, M. Alzahrani, N. R. A. El-Mouty, “Chemical studies on the preparation of magnetic nanoparticles coated with glycine and its application for removal of heavy metals”, *Oriental Journal of Chemistry*, Vol.32, No.3, pp.1503-1513, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.13005/ojc/320324>
- [33] J. C. S. Santos, O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murica, R. C. Rodrigues, et al., “Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes”, *ChemCatChem*, Vol.7, No.16, pp.2413-2432, Jul. 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1002/cctc.201500310>
- [34] W. Xie, J. Wang, “Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil”, *Biomass and Bioenergy*, Vol.36, pp.373-380, Jan. 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.11.006>
- [35] J. Xu, C. Ju, J. Sheng, F. Wang, Q. Zhang, et al., “Synthesis and Characterization of Magnetic Nanoparticles and Its Application in Lipase Immobilization”, *Korean Chemical Society*, Vol.34, No.8, pp.2408-2412, Aug. 2013.
DOI: <https://doi.org/10.5012/bkcs.2013.34.8.2408>
- [36] M. Taheran, M. Naghdi, S. K. Brar, E. J. Knystautas, M. Verma, et al., “Degradation of chlortetracycline using immobilized laccase on Polyacrylonitrile-biochar composite nanofibrous membrane”, *Science of The Total Environment*, Vol.605-606, pp.315-321, Dec. 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.185>
- [37] X. Qiu, X. Xiang, T. Liu, H. Huang, Y. Hu, “Fabrication of an organic-inorganic nanocomposite carrier for enzyme immobilization based on metal-organic coordination”, *Process Biochemistry*, Vol.95, pp.47-54, Aug. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.007>
- [38] R. Morellon-Sterling, O. Tavano, J. M. Bolivar, Á. Berenguer-Murcia, G. Vela-Gutiérrez, et al., “A review on the immobilization of pepsin: A Lys-poor enzyme that is unstable at alkaline pH values”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol.210, pp.682-702, Jun. 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.224>
- [39] H. T. Deng, Z. K. Xu, X. J. Huang, J. Wu, P. Seta, “Adsorption and Activity of Candida rugosa Lipase on Polypropylene Hollow Fiber Membrane Modified with Phospholipid Analogous Polymers”, *Langmuir*, Vol.20, pp.10168-10173, Oct. 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1021/la0484624>
- [40] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, “Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques”, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol.40, No.6, pp.1451-1463, May. 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- [41] X. Liu, Y. Hu, B. Wei, F. Liu, H. Xu, et al., “Immobilized glucosyltransferase and sucrose synthase on Fe₃O₄@Uio-66 in cascade catalysis for the one-pot conversion of rebaudioside D from rebaudioside A”, *Process Biochemistry*, Vol.118, pp.323-334, Jul. 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.05.004>
- [42] L. Cheng, H. Zhang, H. Liang, X. Sun, X. Shen, et al., “Enzymatic Bioconversion of Cycloastragenol-6-O-β-D-glucoside into Cycloastragenol by a Novel Recombinant β-Glucosidase from *Phycococcus sp. Soil748*”, *Process Biochemistry*, Vol.90, pp.81-88, Mar. 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1016/i.procbio.2019.11.006>

- [43] B. Wei, F. Liu, X. Liu, L. Cheng, Q. Yuan, et al., "Enhancing stability and by-product tolerance of β -glucuronidase based on magnetic cross-linked enzyme aggregates", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol.210, Feb. 2022.

DOI: <https://doi.org/10.1016/i.colsurfb.2021.112241>

노 현 정(Hyeon-Jeong Noh)

[준회원]



- 2011년 8월 : 건양대학교 나노바이오화학학과 (이학학사)
- 2021년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 일반대학원 의료공학과 공학석사

<관심분야>

생명과학, 분자생물학

이 우 일(Woo-Yiel Lee)

[정회원]



- 1988년 8월 : 경희대학교 문리과 대학 화학과 (이학석사)
- 1996년 8월 : (미국)에리조나주립 대학교 생화학과 (이학박사)
- 1997년 1월 ~ 1998년 8월 : 한국 생명공학연구원 postdoctorate
- 2006년 3월 ~ 2019년 2월 : 건양대학교 제약생명공학과 교수
- 2019년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 의료신소재학과 교수

<관심분야>

생명과학, 단백질화학