

修飾 Chitin에 固定된 β -Glucosidase의 動特性

李京熙·金鍾德·金昞祐·*宋勝久
釜山大學校 藥學大學 藥學科, *工科大學·化學工學科

Characteristics of β -Glucosidase Immobilized on the Modified Chitin in Bioreactors

Kyung Hee Lee, Jong Deog Kim, Byung Woo Kim and Seung Koo Song*

Department of Pharmacy, College of Pharmacy and

**Department of Chemical Engineering, College of Engineering,*

Pusan National University, Pusan, Korea

ABSTRACT

Partial hydrolysed and deacetylated chitin, CHITA and CHITB as supports of immobilized enzyme were obtained by treatment of acid and base respectively. Glutaraldehyde, bifunctional reagent, was employed for crosslinking between β -glucosidase and support. Immobilized enzyme activities of CHITA-Gase and CHITB-Gase were determined with the reaction of p-nitrophenol- β -D-glucopyranoside(PNG) in batch reactor, CSTR and PFR.

Their optimum temperature, pH and enzymatic characteristics including K_m and V_{max} values were observed with variation of the flow rates.

Mass transfer coefficient(h), effectiveness factor(η), deactivation rate(kd) of two immobilized enzymes were also examined to compare efficiency of reactors.

서론

천연 효소는 물리적 및 화학적 변화에 대하여 매우 약하며, 재 사용 되어질 수 없는 등의 많은 단점을 갖고 있다.

이러한 결점을 보완하는 방법으로 고정화 효소가 이용되고 있다. Chitin은 자연계에 널리 분포되어 있는 갑각류의 주성분으로써, 구조의 변형이 용이하고 흡착력이 강하여 Sakaguchi 등(3)은 중금속 흡착제로 사용한바 있으며, 또한 쉽게 구할 수 있어 고정화 효소의 지지체로서 많은 잇점이 있는 것으로 생각된다.

Nelson등(1)에 의하여 alumina에 효소를 흡착법으로 고정시키고 Bernfeld 등 (2)이 α -amylase를 polymeric

gel에 포괄법으로 고정화한 이래로 acrylamide, sephadex, silicagel, nylon등의 많은 종류의 지지체를 사용하여 효소를 고정하여 왔다(2).

Stanley등(4)은 lactase를 chitin에 고정하여 그 활성을 수용성 lactase와 비교 하였고, Jitendra등(5)은 chitin의 구조 변형체인 chitosan에 β -glucosidase를 결합하여 온도와 pH의 영향에 대하여 보고한 바가 있다. 또, Sundstrom 등(6)은 무기질(alumina, silian, tinia등)의 지지체에 β -glucosidase를 고정하여 충전한 재 순환 되는 플러그 흐름 반응기에서 cellulose를 포도당으로 가수분해 과정에서 반응 시간과 지지체의 량에 따른 β -glucosidase의 활성을 고찰한 바 있다.

또한, 고정화에 따른 효소의 활성을 규명하기 위하여

Lee(7)은 포도당의 이성화효소를 고정화하여 외부 확산 효과를 설명하였고, Douglase등(8)은 고정화 glucoamylase의 세공 확산(pore diffusion) 효과에 대하여 보고한 바 있다.

Boersma등(9)은 생균체에 고정된 포도당 이성화 효소의 물질 전달 효과에 대하여 보고한 바 있고, Gene등(10)은 고정화 효소의 내재성 환경(intrinsic environment)에서 기질의 분산도와 반응 속도상수를 구하였다.

또한, Toda등(11)은 고정화된 세균으로 충전된 반응기에서 물질 전달 효과를 연구하였고, Mensfeld등(12)은 고정화 invertase가 충전 반응기에 유입되는 유속과 반응기의 크기에 따른 효소의 활성 차이를 polystyrene 지지체를 사용하여 연구 보고한 바가 있다. 그리고 Engasser등(13, 15)은 고정화 효소의 내재성 및 외부 확산 저항과 기질 및 산물 저해에 대하여 보고하였다. Otto(16), Gene(17), Engasser(18)등은 거시적 환경과 미소 환경에서의 기질과 고정화 효소간의 반응 척도를 효율 인자로 나타내었으며, Gene등(17)과 Ooshima등(19)은 고정화 효소의 안정성과 불활성화를 동력학적으로 고찰하였다.

본 연구에서는 β -1,4 결합을 분해 하는 β -glucosidase를 강 산으로 전처리한 chitin(CHITA)와 강 염기로 부분적으로 탈 아세틸화 시킨 chitin(CHITB)에 고정화시켜 회분식 반응기, 연속흐름 반응기 및 플러그 흐름 반응기등의 반응기에서 최적 pH, 최적 온도, 반응 속도 상수, 물질 전달 계수, 외부 확산 계수, 효율 인자 및 효소 불활성화 속도등을 비교, 고찰 하였다.

재료 및 방법

재 료

Chitin (Sigma)을 분쇄하여 35 mesh로 걸러 강산과 강알칼리로 처리하여 사용하였다.

1) 강산의 처리

30g의 chitin과 500ml의 6N-HCl을 실온에서 반응시켜 CO₂가 완전히 발산한 후, 중류수로 중성이 되도록 세척하고, 건조하여 이를 CHITA 표시하였다.

2) 강 알칼리 처리

30g의 chitin과 500ml의 28.6%(w/w)-KOH로 120℃에서 3시간 환류 시키면서 부분적으로 탈 아세틸화시키고 난 후, 중성으로 될때까지 세척하고, 건조하여 이를 CHITB로 표시하였다.

효 소

β -Glucosidase(Fulka:Switzerland)를 pH가 5.0인 0.05 M-citrate buffer에 녹여 1mg/ml가 되도록 하여 사용하였다.

기 질

p-Nitrophenol- β -D-glucopyranoside(Fulka:Switzerland, 이하 PNG로 약칭)를 반응기의 pH에 조건에 따라 조절된 McIlvaine buffer에 녹여 농도가 10⁻⁴ M/l 되도록 하여 사용하였다.

완충용액

0.05M-citrate buffer는 효소 용해용으로, McIlvaine buffer는 반응기의 조건별로 pH를 변화시켜 사용하였다.

효소의 활성 측정

PNG를 β -glucosidase와 반응 시켜 유리되는 p-nitrophenol을 420nm에서 흡광도를 측정하고(2), 표준 곡선과 비교하여 정량하였다.

β -glucosidase의 고정

CHITA 지지체에 β -glucosidase의 고정

CHITA 0.5g을 pH 5.0인 McIlvaine buffer 26.1ml에 넣고 HAc 0.5ml와 β -glucosidase 용액 1ml를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 25% glutaraldehyde를 2.4ml 넣어 2% glutaraldehyde가 되도록 하여 실온에서 2시간 동안 고정화 시켜 CHITA-Gase로 표시하였다. 또한 CHITB에 같은 방법으로 β -glucosidase를 고정화 시켜 CHITB-Gase로 표시하였다.

실험방법

Native- β -glucosidase(Nat-Gase), CHITA-Gase 및 CHITB-Gase를 회분식 반응기, 연속 흐름 반응기 및 플러그 흐름 반응기에서의 활성을 상호비교 하였다. 회분식 반응기에서는 140분간 반응시켜 5분 간격으로 시료를 채취하였으며, 연속 흐름 반응기와 플러그 흐름 반응기에서는 유속을 변화시키면서 정상 상태에 도달했을 때 시료를 채취하였다.

pH는 4.0에서 8.0까지 1.0 간격으로, 온도는 10℃ 간격으로 40℃에서 80℃까지 변화시켰다. 또한, 연속 흐름 반응기와 플러그 흐름 반응기에서는 유속을 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 ml/min으로 변화시켜 유속에 따른 효소의 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

효소의 고정

β -glucosidase는 CHITA에 초기에는 부착이 빠르게 잘 일어 났으나, 일정시간이 지난 후에는 CHITB보다 부착량이 적은 것으로 나타났다. CHITA-Gase 및 CHITB-Gase의 부착 정도는 각각 0.54mg / 0.5 g, 0.58 mg / 0.5 g support로 나타났고, 그 결과를 Fig. 1에 나타 내었다.

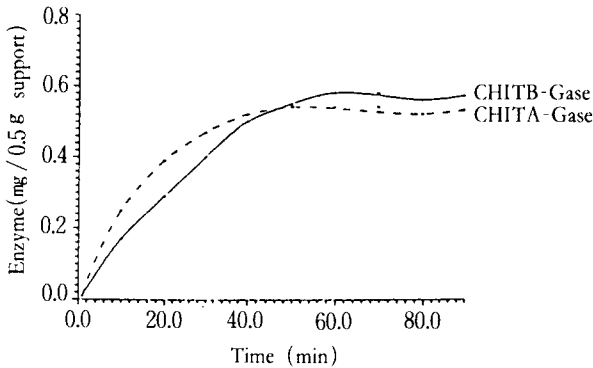


Fig. 1. β -Glucosidase attachment with time on 0.5 g support, CHITA and CHITB.

최적 온도 및 pH

Nat-Gase, CHITA-Gase 및 CHITB-Gase를 이용한 회분 식 반응기, 연속 흐름 반응기 및 플러그 흐름 반응기에서 각 효소의 반응 최적 온도는 50℃ 부근이었다. 회분 식 반응기에서의 최적 pH는 Nat-Gase가 pH 5.0이었으며, CHITA-Gase 및 CHITB-Gase는 pH 6.0이었다. 연속 흐름 반응기에서의 각 효소의 최적 pH는 pH 6.0이었으며 플러그 흐름 반응기에서는 pH 5.0이었다.

반응기별 CHITA-Gase 및 CHITB-Gase의 pH 변화 및 온도 변화에 관한 결과를 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다.

pH의 변화는 다음과 같이 나타내어진다.

$$\Delta pH = pH_i - pH_o = 0.43 e \Phi / KT$$

pHo : pH value next to immobilized enzyme

pHi : pH in bulk phase

K : Boltzman constant($1.38066 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)

T : Absolute temperature

CHITA-Gase의 경우를 고찰해보면 고정화 효소 근방의 pH(pHo)는 6.0이고 용액상의 pH(pHi)는 5.0이므로

윗 식에 값을 대입하면 정전력 Φ 의 값이 -648.1 ev로 나타나므로 고정화 효소의 최적 pH인 pHo는 Nat-Gase의 최적 pH인 pHi 보다 큼을 알 수 있고, CHITA-Gase의 최적 pH 이동은 Nat-Gase 보다 알칼리쪽으로 일어난 것으로 판단된다. CHITA-Gase는 최적 pH 6.0을 중심으로 염기성 쪽으로 활성이 CHITB-Gase 보다 높게 나타났고, CHITB는 부분적으로 가수분해 되어(-) charge가 (+)charge 보다 많은 것으로 보여지며, 이 (+) charge에 의하여 CHITB-Gase는 최적 pH 6.0으로부터 산성쪽에서의 활성이 CHITA-Gase보다 높게 나타나는 것으로 보아진다.

또, CHITA-Gase는 회분식 반응기 및 연속 흐름 반응기에서 최적 pH를 전후로 활성이 감소하나, CHITB-Gase는 pH 4.0-pH 6.0까지의 범위에서 활성을 나타내었으므로, CHITA-Gase보다 pH의 선택성이 넓은 것으로 보여지며 효소의 선택에 따라 활용 범위가 많을 것으로 보여진다. 플러그 흐름 반응기에서는 최적 pH의 이동이 일어나지 않았는데, 이것은 CHITA-Gase 및 CHITB-Gase의 입자 상호간에 정전력이 없기 때문으로 생각된다. 즉, 회분식 반응기 및 연속 흐름 반응기에서는 효소와 효소와의 거리가 멀어서 기질과의 반응에서 정전력이 작용하나, 플러그 흐름 반응기에서는 효소가 상호 접촉하고 있으므로 이로 인한 정전력이 생기지 않아 앞의 식에 의하여 pH 이동이 일어나지 않은 것으로 생각된다.

외부 및 내부 확산 한계

1) 기질 확산 계수 (substrate diffusivity, D)

고정화 담체 내외부에서의 확산 및 물질 전달이 반응기의 효율에 큰 영향을 미치므로 효율 인자를 얻고자 아래와 같이 확산 계수 및 물질 전달 계수를 구하였다. 기질 PNG의 확산 계수는 Wilke-Chang 식(20, 22)을 사용하여 구하였으며, 50℃에서의 값은 $8.1668 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{sec}$ 였다.

2) 유효 확산 계수(effective diffusivity, Deff)

유효 확산 계수는 공극율과 굴곡 인자를 이용한 다음 식으로 표현된다(18, 21).

$$Deff = \frac{D\epsilon}{\tau} \quad \text{----- (1)}$$

위 식에서

ϵ : porosity

τ : turtuosity

이다.

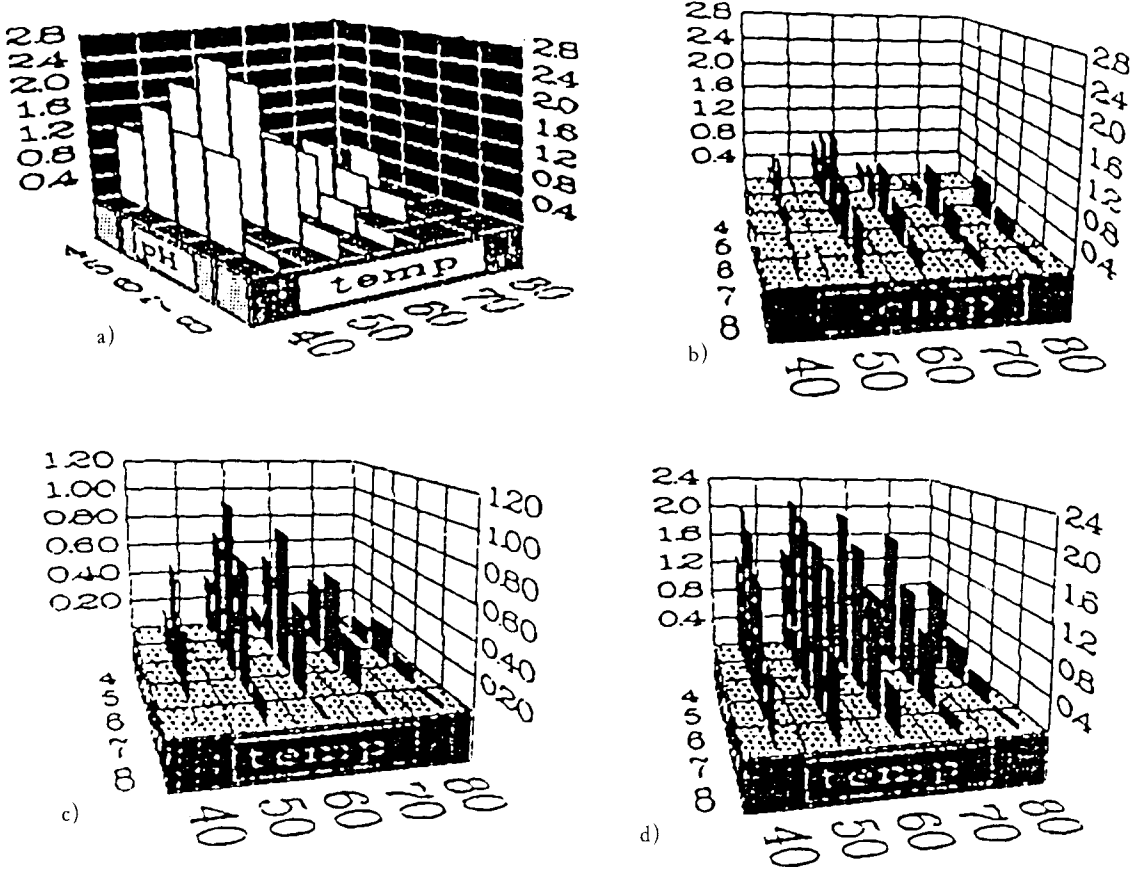


Fig. 2. Correlations of the released glucose with pH and temperature change in different reactors using CHITA-Gase as enzyme.

- a) Nat-Gase in Batch reactor
- b) CHITA-Gase in Batch reactor
- c) CHITA-Gase in CSTR
- d) CHITA-Gase in PFR

위 식(1)에 실험적으로 구한 공극율(CHITA-Gase: 0.225, CHITB-Gase:0.329) 및 굴곡 인자($\tau=2$)를 대입하면, CHITA-Gase의 De_{eff} 는 $9.187 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 / \text{sec}$ 이고, CHITB-Gase의 De_{eff} 는 $1.343 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{sec}$ 였다.

3) 물질 전달 계수(external mass transfer coefficient, h)

a. 회분식 반응기에서의 물질 전달 계수

회분식 반응기에서의 물질 전달 계수는 다음 식으로 구하였다(18).

$$\left[\frac{h d_p}{D} \right]^2 = 4 + 1.21 \left[\frac{d_p U}{D} \right]^{2/3} \quad \text{---- (2)}$$

$$U = \frac{g d_p^2 \Delta \rho}{18 \mu} \quad \text{---- (3)}$$

위 식에서

d_p : particle diameter (0.05cm)

U : relative velocity between particle and liquid

$\Delta \rho$: density difference between particle and fluid (CHITA: 0.327, CHITB: 0.350)

g : gravitational acceleration (981cm/sec²)

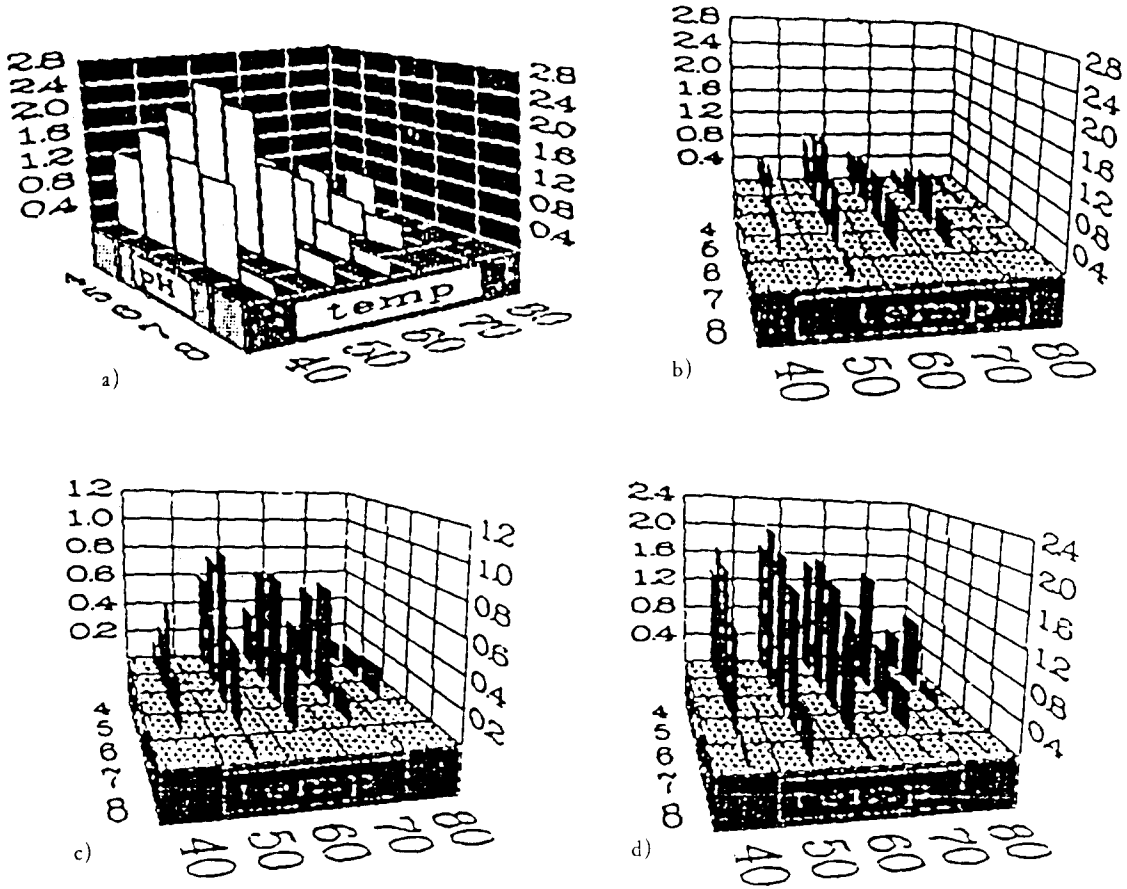


Fig. 3. Correlations of the released glucose with pH and temperature change in different reactors using CHITB-Gase as enzyme.

- a) Nat-Gase in Batch reactor
- b) CHITB-Gase in Batch reactor
- c) CHITB-Gase in CSTR
- d) CHITB-Gase in PFR

μ : fluid viscosity (0.6567×10^{-3} at 50°C)
 이다.

(2), (3)식을 이용한 CHITA-Gase 및 CHITB-Gase의 물질 전달 계수는 각각 $2.884 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{sec}$, $3.083 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{sec}$ 이었다.

b. 플러그 흐름 반응기에서의 물질 전달 계수
 플러그 흐름 반응기에서의 물질 전달 계수는 다음 식으로 구하였다(18).

$$\frac{h}{U} \left[\frac{\mu}{\rho D} \right]^{2/3} = 2.5 \left[\frac{d_p U \rho}{\mu} \right]^{-0.66} \quad \text{---- (4)}$$

위 식에서

U : fluid velocity

이다.

최적 조건 pH 5.0, 온도 50°C 에서 유속에 따른 CHITA-Gase 및 CHITB-Gase의 물질 전달 계수를 Table 1. 에 나타내었다.

Table 1. Comparison of mass transfer coefficient of CHITA-Gase and CHITB-Gase according to different reactors

Flow rate (ml / min)	Batch R (10 ⁻³ cm / sec)		PFR (10 ⁻⁴ cm / sec)	
	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase
0.0	2.884	3.083		
0.4			3.952	3.957
0.8			5.002	5.005
1.2			5.729	5.736
1.6			6.322	6.466

회분식 반응기에서의 물질 전달 계수는 CHITA-Gase 보다 CHITB-Gase 쪽이 나은 것으로 나타났으며 이것은 CHITB-Gase가 CHITA-Gase보다 확산 방해 작용을 적게 받는 것으로 생각되며, 지지체의 입자를 조절함으로써 좋은 지지체가 될 수 있을 것으로 보여진다. 플러그 흐름 반응기에서는 유속이 증가함에 따라 물질 전달 계수도 증가함을 보였으며, CHITA-Gase와 CHITB-Gase의 물질 전달 계수가 비슷한 것으로 나타났다.

겉보기 속도 상수, Km' 및 Vmax'의 측정

1) 회분식 반응기

Nat-Gase, CHITA-Gase 및 CHITB-Gase를 이용한 회분식 반응기에서의 Km' 및 Vmax'를 구하기 위하여 Michaelis-Menten 식을 적용 하였으며, 이 식을 이용한 반응 속도, r은 다음과 같이 쓸 수 있다(23).

$$-\frac{ds}{dt} = r = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{----- (5)}$$

위 식(5)을 초기 기질 농도, So로 부터 시간 t에서의 기질 농도, S까지를 적분하고, 전환율, X=(So-S)/S를 대입하면 정리하면,

$$\frac{t}{X} = \frac{K_m}{V_{max}} \left[\frac{1}{X} \ln \frac{1}{1-X} - 1 \right] + \frac{So + K_m}{V_{max}} \quad \text{---- (6)}$$

위 식(6) 식에서 기울기와 절편에서 km'와 Vmax'를 구하는 방법을 Fig. 4.에 나타내었다.

2) 연속 흐름 반응기

체류 시간 τ와 반응 속도 r, 전환율 X는 다음과 같이 쓸 수 있고(1),

$$\tau = \frac{So \cdot X}{r} \quad r = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}, \quad S = So(1-X)$$

대입하여 정리하면

$$\frac{So \cdot X}{\tau} = \frac{K_m \cdot X}{\tau \cdot (X-1)} + V_{max}' \quad \text{----- (7)}$$

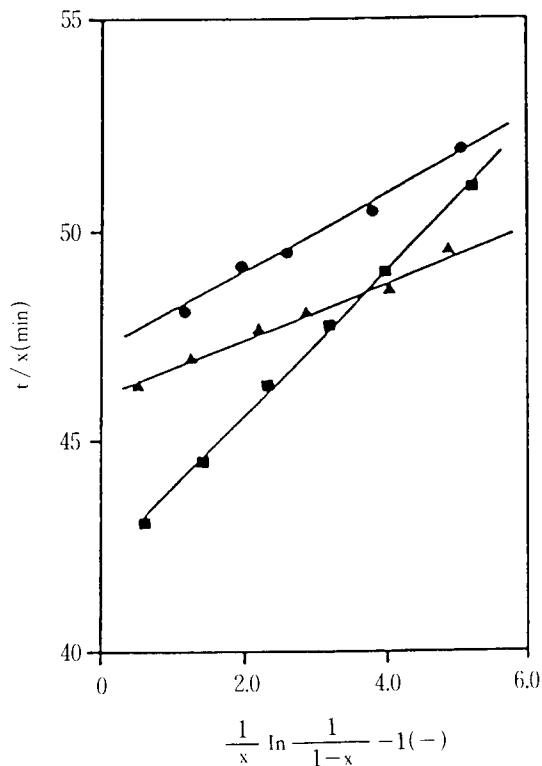


Fig. 4. Linear regression of integrated Michaelis-Menten equation for Km' and Vmax'. t/X as a function of 1/X · ln(1/(1-X)-1 with reaction time t, in batch reactor.

- : Nat-Gase
- : CHITA-Gase
- ▲-▲ : CHITB-Gase

으로 된다.

위 식(7)에서 기울기와 절편에서 K_m' 및 V_{max}' 를 구하면 그림을 Fig. 5에 나타내었다.

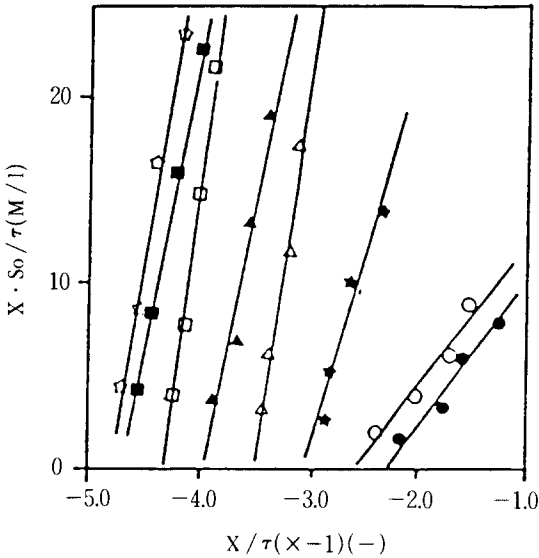


Fig. 5. Linear regression of equation (7) for K_m' and V_{max}' of CHITA-Gase and CHITB-Gase according to different flow rate and initial concentration S_0 , [(1, 2, 4, 6) × 10⁻⁴M/l] in CSTR.

- : CHITA-Gase, ●-● : CHITB-Gase at flow rate 0.4ml/min
- : CHITA-Gase, ■-■ : CHITB-Gase at flow rate 0.8ml/min
- △-△ : CHITA-Gase, ▲-▲ : CHITB-Gase at flow rate 1.2ml/min
- ☆-☆ : CHITA-Gase, ★-★ : CHITB-Gase at flow rate 1.6ml/min

3) 플러그 흐름 반응기

충전탑에서 물질 수지식이 다음과 같이 표현되므로

(24)

$$\frac{\partial S}{\partial t} = D_z \frac{\partial^2 S}{\partial Z^2} + D_r \frac{1}{\gamma} \frac{\partial}{\partial \gamma} \left[\gamma \frac{\partial S}{\partial \gamma} \right] - U_s \frac{\partial S}{\partial Z}$$

- R

축 방향과 반경 방향의 무시한 플러그 흐름이 정상 상태에서는 아래와 같이 표현된다.

$$U_s \frac{dS}{dZ} = -R = \frac{V_{max}' S}{K_m' + S} \quad \text{----- (8)}$$

위 식(8)를 적분하여, 전환율 X를 대입하면 아래의 (9)식을 얻으며,

$$\frac{X \cdot S}{\tau} = \frac{K_m' \ln(1-X)}{\tau} + V_{max}' \quad \text{----- (9)}$$

기울기와 절편에서 K_m' 및 V_{max}' 를 구하였다.

CHITA-Gase 및 CHITB-Gase에 대한 동력학 변수를 유속에 따라 구한 결과는 Fig. 6에 나타내었다.

또한, 회분식 반응기, 연속 흐름 반응기, 플러그 흐름 반응기의 반응 최적조건, 반응 속도 상수 및 유리된

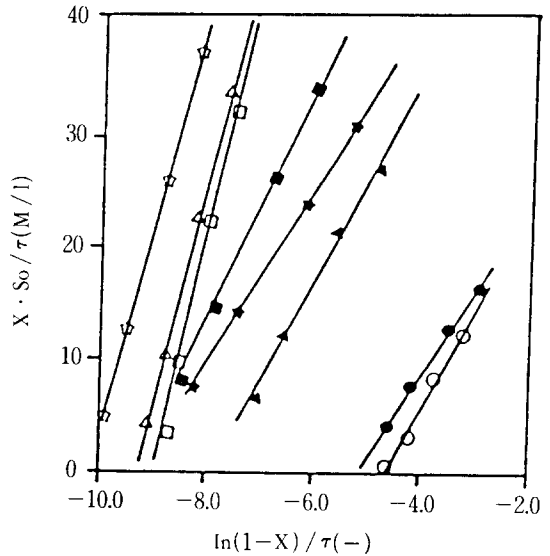


Fig. 6. Plots of equation (9) for kinetic parameters K_m' and V_{max}' of CHITA-Gase and CHITB-Gase according to different flow rate and initial concentration S_0 , [(1, 2, 4, 6) × 10⁻⁴M/l] in PFR.

- : CHITA-Gase, ●-● : CHITB-Gase at flow rate 0.4ml/min
- : CHITA-Gase, ■-■ : CHITB-Gase at flow rate 0.8ml/min
- △-△ : CHITA-Gase, ▲-▲ : CHITB-Gase at flow rate 1.2ml/min
- ☆-☆ : CHITA-Gase, ★-★ : CHITB-Gase at flow rate 1.6ml/min

포도당량을 Table 2에 나타내었으며, 반응 최적 조건에서 연속 흐름 반응기 및 플러그 흐름 반응기의 유속에 따른 반응 속도 상수를 각각 Table 3.과 Table 4.에 수록하였다.

연속 흐름 반응기에서 CHITA-Gase의 Km'값은 유속에 따라 감소되는 경향을 보였고, Vmax'값은 유속 증가에 따라 증가하였다.

CHITB-Gase의 Km'값은 유속 증가에 따라 CHITA-Gase 보다 감소 하는 폭이 컸으며, Vmax'값은 CHITA-Gase가 CHITB-Gase보다 증가 되었다. 이들의 결과를 Fig.

7(a)에 나타내었다.

플러그 흐름 반응기에서 CHITA-Gase 및 CHITB-Gase 모두 유속 증가에 따라 Km'치가 감소되는 경향을 볼 수 있었고, CHITB-Gase가 CHITA-Gase보다 더 감소됨을 보였다.

Vmax'값은 CHITA-Gase 및 CHITB-Gase 모두 유속 증가에 따라 증가되었고, CHITA-Gase의 값이 CHITB-Gase의 값 보다 증가 되었다. 이들의 결과를 Fig. 7 (b)에 나타내었다.

고정화효소의 반응기별 Km'값은 회분식 반응기에서는

Table 2. Comparison of optimum condition, kinetic constants and amounts of the released glucose of each immobilized enzymes according to different reactors

I II III	Batch reactor			CSTR		PFR	
	Nat-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase
Optimum pH	5.0	6.0	6.0	6.0	6.0	5.0	5.0
Optimum temperature (°C)	50	50	50	50	50	50	50
Released glucose (10 ⁻⁵ M/l)	2.440	2.318	1.249	1.309	0.929	2.210	2.090
Km (10 ⁻⁵ M/l)	2.404	6.894	1.725	7.824	8.212	10.650	7.391
Vmax (10 ⁻⁷ M/l/min)	26.259	40.011	25.472	2.018	1.982	52.418	37.584

- I. Reactors
- II. Enzymes
- III. Determinants

Table 3. Comparison of kinetic constants and amounts of the released glucose of CHITA-Gase and CHITB-Gase according to different volumetric flow rate in CSTR

Volumetric flow rate (ml,min)	τ	Km' (10 ⁻⁵ M/l)		Vmax' (10 ⁻⁷ M/l/min)		Released glucose (10 ⁻⁵ M/l)	
		CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase
0.4	625	7.820	8.211	2.018	1.983	1.309	0.929
0.8	313	52.021	31.906	14.931	6.411	0.810	0.670
1.2	208	42.750	31.594	22.341	12.540	0.972	0.829
1.6	156	38.011	20.752	18.182	15.093	0.681	0.670

Table 4. Comparison of kinetic constants and amounts of the released glucose of CHITA-Gase and CHITB-Gase according to different volumetric flow rate in PFR

Volumetric flow rate (ml/min)	Superficial velocity (cm/min)	Residence time (τ)	K_m' ($10^{-5}M/l$)		V_{max}' ($10^{-7}Ml/min$)		Released glucose ($10^{-5}M/l$)	
			CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase
0.4	1.21	5.97	10.651	7.392	52.413	37.584	2.027	2.094
0.8	2.41	2.99	25.532	10.271	222.201	71.887	2.094	1.650
1.2	3.62	1.99	23.910	9.152	272.670	95.418	1.436	1.340
1.6	4.83	1.49	21.521	7.670	261.883	81.384	1.167	0.843

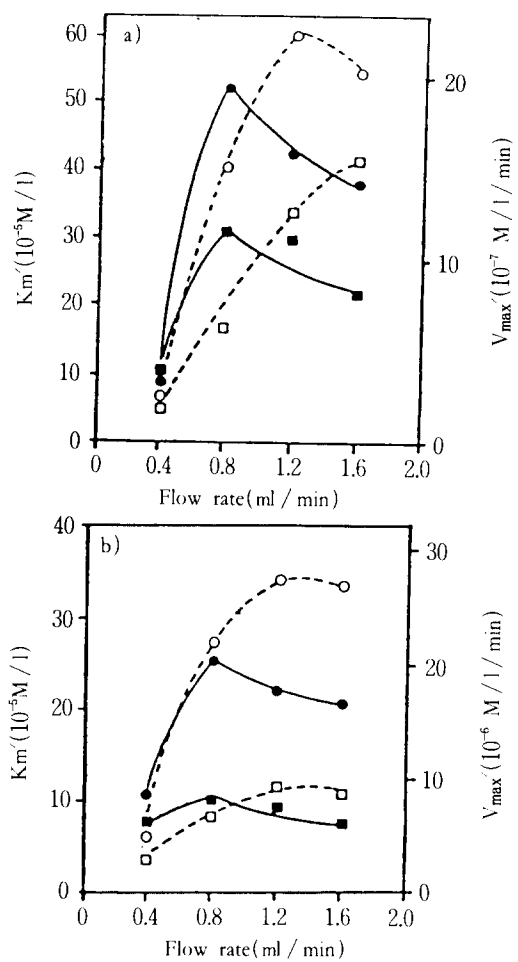


Fig. 7. Tendency of K_m' and V_{max}' of CHITA -Gase and CHITB-Gase with different flow rate in CSTR(a) and PFR(b).

●—● : values of K_m' for CHITA-Gase. ○—○ : values of V_{max}' for CHITA-Gase.
 ■—■ : values of K_m' for CHITB-Gase. □—□ : values of V_{max}' for CHITB-Gase.

CHITA-Gase가 CHITB-Gase보다 크므로 기질에 대한 친화력은 CHITB-Gase쪽이 좋으며, 물질 전달 계수도 CHITA-Gase($2.884 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{sec}$)보다 CHITB-Gase ($3.083 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{sec}$)가 좋은 것으로 나타났다.

그러나, 포도당 유리량은 CHITA-Gase 쪽이 CHITB-Gase 보다 많은 것으로 나타났다. 연속 흐름 반응기에서의 K_m' 값은 유속이 증가함에 따라 CHITA-Gase보다 CHITB-Gase가 작으므로써 기질에 대한 친화력은 CHITB-Gase가 좋은 것으로 나타났다. 플러그 흐름 반응기에서의 K_m' 값은 유속 증가에 따라 CHITA Gase 및 CHITB-Gase 모두 감소 경향을 보였고, V_{max}' 값은 모두 증가 경향을 보였다.

유속 증가에 따라 CHITB-Gase의 K_m' 치가 CHITA-Gase 보다 작은 경향을 보였고, V_{max}' 값은 CHITA Gase가 CHITB-Gase보다 크게 나타났다.

효율 인자(effectiveness factor, η)

효율 인자는 확산이 반응에 영향을 미치는 수율 factor 로써 내부 효율인자, 외부 효율 인자로 나누어서 효율을 비교 하였다.

a. 내부 효율 인자(internal effectiveness factor, η_i)

정상 상태 하에서 세공 내의 효소 반응 속도는 용액 으로부터 고정화 효소 표면에 이동된 기질 물질 속도

와 같으므로 다음 식으로 표현된다.

$$[S]_s = S - \frac{v}{A \cdot h} \quad \text{----- (10)}$$

위 식에서

[S] s : substrate concentration at the external surface

S : bulk phase substrate concentration

v : observed rate of enzyme reaction

A : surface area of particles

이다.

내재성 효율 인자(η_i)는 최대 농도로 부터 구한 반응 속도에 대한 측정된 값이므로 다음 식으로 부터 구한다.

$$\eta_i = \frac{v}{V_{max}' \cdot [S]_s / (K_m' + [S]_s)} \quad \text{----- (11)}$$

b. 외부 효율 인자(external effectiveness factor, η_e)

효율은 확산 효과를 무시하였을 경우의 반응 속도에 대한 반응 속도로 정의되며, 또한 외부 효율 인자와 내부 효율 인자의 곱이므로 다음 식으로 표현된다.

$$\eta_e = \frac{v / (\eta_i \cdot V_{max}')}{V_{chem} / V_{max}'} = \frac{([S]_s / K_m') (1 + S / K_m')}{(1 + [S]_s / K_m') (S / K_m')} \quad \text{----- (12)}$$

이상의 식을 이용하여 회분식 반응기, 플러그 흐름 반응기에서 구한 각각의 효율 인자(η)를 Table 5, 6에 수록하였다.

Table 5. Comparison of kinetic constants and effectiveness factors of CHITA-Gase and CHITB-Gase in Batch reactor

Enzymes	[S] _s (10 ⁻⁴ M/l)	K _m ' (10 ⁻⁵ M/l)	V _{max} ' (10 ⁻⁷ M/l/sec)	V (10 ⁻⁷ M/l/sec)	η_i (-)	η_e (-)	η (-)
CHITA-Gase	0.996	6.894	0.667	0.395	1	0.998	0.998
CHITB-Gase	0.997	1.725	0.425	0.362	1	0.999	0.999

Table 6. Comparison of kinetic constants and effectiveness factors of CHITA-Gase and CHITB-Gase according to different superficial velocity in PFR

Superficial velocity (cm/min)	[S] _s (10 ⁻⁴ M/l)		K _m ' (10 ⁻⁵ M/l)		V _{max} ' (10 ⁻⁷ M/l/sec)		V (10 ⁻⁷ M/l/sec)		η_i (-)		η_e (-)		η (-)	
	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase
1.21	0.997	0.999	10.651	7.393	0.873	0.875	0.423	0.104	1	1	0.987	0.994	0.987	0.994
2.41	0.995	0.997	25.531	10.212	3.703	1.198	1.042	5.911	1	1	0.966	0.985	0.966	0.985
3.62	0.994	0.966	23.912	4.150	4.544	1.590	1.340	8.304	1	1	0.963	0.983	0.963	0.983
4.83	0.995	0.997	21.520	7.673	4.363	1.351	1.384	7.642	1	1	0.966	0.988	0.966	0.988

효율인자(η)는 고정화 효소에 있어서 실제의 반응과 확산 한계가 없을 때의 반응의 비율로써 나타낼 수 있다. 즉,

$$v = \eta \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

이 때의 효율인자(η)으로 부터 기질과 고정화 효소 간의 전환 속도 및 기질의 물질 전달의 정도를 알 수 있고, 효율인자(η)는 내부 효율 인자(η_i)와 외부 효율 인자(η_e)로 나누어 생각 할 수 있으며, $\eta = \eta_i \cdot \eta_e$ 로 나타낸다. (η_i)로써 미소환경에서 기질의 전환 속도, 고정화 효소와 기질 사이의 물질 전달의 정도를 알 수 있었고, (η_e)로써 거시적 환경에서의 물질 전달 상태, 지지체의 입자와 용매 사이의 상대적인 속도를 알 수 있었다. 회분식 반응기에서는 CHITA-Gase의 미소 환경에서 반응 속도가 CHITB-Gase보다 나은 것으로 나타났으며 효율도 나은 것으로 나타났다. 이는 유속 또는 교반 속도를 증가시켜 물질 저항을 감소 시킴으로써 수율을 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다.

플러그 흐름 반응기에서는 CHITA-Gase의 표면 농도가 CHITB-Gase보다 높은 것으로 나타났고, 이는 CHITA 과 CHITB의 밀도와 공극률 차이에서 오는 것으로 보이며, 이것은 전반적으로 (η_i)가 (η_e)보다 큰 것에서도 알 수 있다. 플러그 흐름 반응기에서도 유속 증가에 따라 효율인자(η)가 감소 됨을 보이고 있으나, 전체적인 효율은 0.96 이상으로 chitin이 지지체로써 좋은 것을 의미하며 어느 반응기에서도 이용할 수 있다고 사려된다.

효소 불활성화 속도(enzyme deactivation rate, k_d)

각 반응기에서의 효소 불활성화 속도(k_d)를 구하기 위하여

$$-\left[\frac{dE_0}{dt}\right] = k_d \cdot E_0 \quad \text{----- (13)}$$

위(13)식을 적분하여 $\ln(E/E_0) = -k_d \cdot t$ 를 구하고 Michaelis-Menten 식을 대입시켜 정리하여 회분식 반응기, 연속 흐름 반응기, 플러그 흐름 반응기의 불활성화 속도를 기질 전환률(X)과 실험 시간(t)을 도해하여 k_d 를 구하였고(1), 그 결과를 Table 7.에 나타내었다.

최적 온도 50℃에서 고정화된 효소의 불활성화 속도는 회분식 반응기에서는 적었으며, 연속 흐름 반응기 및 플러그 흐름 반응기에서는 불활성화 속도가 현저하게 증가됨을 나타내었다. 회분식 반응기에서는 고정화 효소가 Nat-Gase보다 불활성화 속도가 작았고, CHITA-Gase 보다 CHITB-Gase가 더 적음을 보였다. 연속 흐름 반응기 및 플러그 흐름 반응기에서는 유속 증가에 따라 불활성화 정도가 현저하게 나타났으며, CHITA-Gase가 CHITB-Gase보다 불활성화 정도가 큼을 보였다. 그러나 연속 흐름 반응기의 아주 낮은 유속에서 이례적으로 불활성화 속도가 낮게 나타남을 보여주고 있다. 이러한 현상은 앞으로 더 많은 실험 고찰을 하여야 할 것으로 사려된다.

효소의 효율을 높이기 위해서는 반응기의 선택과 지지체의 입자크기, 유속의 조절이 중요한 것으로 판단되어진다.

이상의 사실에서 chitin은 β -glucosidase의 지지체로서의 적합성을 보였으며, 여러 반응기에는 CHITA-Gase가 CHITB-Gase보다 수율이 높게 나타났으나, pH 변화에 따른 활성의 안정성은 CHITB-Gase가 좋은 것으로 사려된다. 플러그 흐름 반응기는 연속적으로 산물을 얻을 수 있을 뿐 만 아니라 회분식 반응기에 준하는 효율을 나타내어, β -glucosidase의 반응기로서 적합함을 보였다. 또한, 반응기의 선택, 유속 및 지지체 입자 표면에 따라서 효율이 좌우 될 것으로 판단된다.

이상의 사항들을 고려하면 chitin은 β -glucosidase의 좋은 지지체가 될 수 있을 것으로 보며 공업적 응용에도 기대되어진다.

Table 7. Comparison of enzyme deactivation rate of CHITA-Gase and CHITB-Gase according to different volumetric flow rate and reactors

Volumetric flow rate (ml / min)	Batch reactor (10 ⁻⁴ / min)			CSTR (10 ⁻⁴ / min)		PFR (10 ⁻⁴ / min)	
	Nat-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase	CHITA-Gase	CHITB-Gase
0.0	2.162	0.017	0.001				
0.4				0.228	1.043	30.619	25.408
0.8				7.643	5.330	19.194	15.539
1.2				1.682	2.841	11.556	15.767
1.4				0.538	4.230	8.496	4.989

요 약

Chitin을 35 mesh로 분쇄하여 강산과 강알칼리로 처리하여 CHITA와 CHITB를 만들고 여기에 glutaraldehyde를 작용시켜 β -glucosidase를 고정하여 CHITA-Gase 및 CHITB-Gase를 제조하였다. 이 두 종류의 고정화 효소를 기질 p-nitrophenol- β -D-glucopyranoside(PNG)과 회분식 반응기, 연속 흐름 반응기 및 플러그 흐름 반응기에서 반응시켜 최적 온도, 최적 pH, 반응 속도 상수, 물질 전달 계수, 효율 인자 및 효소 불활성화 속도 등을 구하여 반응기별 효율을 검토하였다.

반응 최적 온도는 세가지의 반응기 모두 50°C였으며, 최적 pH는 플러그 흐름 반응기에서는 Nat-Gase와 같이 pH 5.0이었고, 회분식 반응기 및 연속 흐름 반응기에서는 최적 pH의 이동이 일어나 pH 6.0으로 이었다. 반응기의 최적 조건에서 km값은 회분식 반응기에서 CHITB-Gase($1.725 \times 10^{-5} M/l$)가 CHITA-Gase($6.894 \times 10^{-5} M/l$)보다 작았으며, 연속 흐름 반응기 및 플러그 흐름 반응기에서는 유속 증가에 따라 Km'치가 감소하는 경향을 보였고, CHITB-Gase가 CHITA-Gase보다 더 작았다. V_{max} '값은 회분식 반응기, 연속 흐름 반응기, 플러그 흐름 반응기에서 모두 CHITA-Gase가 CHITB-Gase 보다 높은 것으로 나타났다. 그리고, 물질전달계수 및 효율인자, 효소 불활성화 속도등의 값은 환경은 CHITB-Gase의 것이 나은 것으로 나타났다.

이들의 결과에서 CHITA-Gase 및 CHITB-Gase는 기질과의 반응 환경이 좋으므로 chitin은 β -glucosidase의 좋은 지지체라고 판단되어 공업적 응용이 기대된다.

감 사

본 연구는 1989년도 문교부 학술 연구 조성비로 수행된 것으로써 지면을 빌어 감사의 뜻을 표합니다.

참 고 문 헌

1. Goldstein, L., and E. Katchalski : Immobilized Enzyme—A Survey, in "Applied Biochemistry and Biotechnology", L. B. Wingard, E. Katchalski, and L. Goldstein, Edited, 1976, Academic Press.
2. L. Goldstein(1976), *Methods in Enzymology* (Mosbach, K., ed), Vol. **44**. Academic Press.
3. T. Sakaguchi, T. Horikochi and A. Nakajima (1979), *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **53**, 149.
4. W. L. Stanley, G. G. Watters, B. Chan and J. M.

- Mercer (1975), *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 315.
5. D. D. Jitendra, R. Ray and A. Desai(1986), *J. Ferment. Technol.*, **64**, 255.
6. D. W. Sundstrom, H. E. Klei, R. W. Coughlin, G. J. Blederman and C. A. Brouwer(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 473.
7. S. B. Lee, S. M. Kim and D. Y. Dewey(1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2023.
8. D. L. Dougl, K. L. Gene, P. J. Reilly and Y. L. Yoon (1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1 (1980).
9. J. G. Boersma, K. Veuenga, H. G. J. De Wilt and G. E. H. Joosten (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1711.
10. K. L. Gene and P. J. Reilly(1981), *Chemical Engineering Science.*, **36**, 1967.
11. K. Toda(1975), *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1729.
12. J. Mansfeld and A. Schillenbuger(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 72.
13. J. M. Engasser and C. Horvath(1974), *Biochemistry*, **13**, 3845.
14. J. M. Engasser and C. Horvath(1974), *Biochemistry*, **13**, 3849.
15. J. M. Engasser and C. Horvath(1974), *Biochemistry*, **13**, 3855.
16. H. F. Otto, T. C. Moon and M. Sernetz(1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 157.
17. K. L. Gene, R. A. Lesch and P. J. Reilly(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 487.
18. J. M. Engasser(1978), *Bioph. Acta.*, 526.
19. H. Ooshima and Y. Harano (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, : 1991.
20. J. E. Bailey and D. F. Ollis(1977), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 452, McGraw-Hill.
21. E. L. Culsser(1984), *Mass Transfer in Fluid System*, 185, Cambridge Univ. Press.
22. J. R. Welty, C. E. Wicks and E. R. Wilson(1984), *Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer*, **492**, John Wiley & Sons.
23. W. Halwachs(1978), *Biotechnol. Bioeng*, **20**, 281.
24. S. B. Lee and D. D. Y. Ryu(1979), *Biotechnol. Bioeng*, **21**, 1499.
25. L. Goldstein(1972), *Biochemistry*, **2**, 4072.
26. T. Tosa, T. Mori and I. Cibata(1969), *Arg. Biol. Chem.*, **33**, 1503.
27. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse and I. Cibata(1969), *Arg.*

- Biol. Chem.*, **33**, 1047.
28. H. Rehm and G. Reed : Enzyme Immobilization in "Biotechnology", J. F. Kennedy and J. M. S. Cabral, Edited, 1987, 7a, 349, Verlag. Chemie.
29. H. Ishikawa, T. Tanaka, K. Kurose and H. Hikida (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**: 924.
30. G. K. Lee, R. A. Lesch and P. J. Reilly(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 487(1981).
31. O. Hannibal — Friedrich, M.Chun and Sernetz(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 157.
32. S. Hashimoto and K. Furukawa(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**: 52.
33. L. Makaskie, E., J. M. Wates and A. C. R. Dean(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 66.
34. K. M. Downing, C. S. Ho and D. W. Zabriskie(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1097.
35. M. R. A. Barros, J. M. S. Cabral and J. M. Novais (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1097.
36. J. C. Davis(1974), *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1113.
37. I. A. Webster and M. L. Shuler(1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1725.
38. L. Shemer, R. Granot, A. Freeman, M. Sokolovsky and L. Goldstein (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1067.
39. J. M. Coulson and T. F. Richardson(1978), *Chemical Engineering*, **376**, Pergamon Press.

(Received; November 2, 1990, Accepted; November 30, 1990)