

Diazotized Chitin에 고정된 β -glucosidase의 생물 반응기에서의 동특성

김 종 덕 · 이 경 희 · *송 승 구
부산대학교 약학대학 약학과 *공과대학 화학공학과

Characteristics of β -glucosidase Immobilized on the Diazotized Chitin in Bioreactors

Jong Deog Kim, Kyung Hee Lee, Seung Koo Song*
Department of Pharmacy, College of Pharmacy and
*Department of Chemical Engineering, College of Engineering,
Pusan National University, Pusan, Korea

ABSTRACT

Diazotized chitin (CHITN) was synthesized reacting with NaN_3 and HCl to alkaline hydrolyzed chitin for the support of immobilized enzyme. Immobilized β -glucosidase on diazotized chitin(CHITN-Gase) was produced reacting with glutaraldehyds as bifunctional reagent. CHITN-Gase activities were determined reacting with p-nitrophenol- β -D-glucopyranoside in plug flow reactor as a reference. Optimum temperature, optimum pH, reaction constant and deactivation rate were determined with variation of flow rate and H/D. The particle size of immobilized enzyme in the best was 35 mesh(CHITN35-Gase). The optimum conditions of immobilized enzyme were 70°C in temperature and 5.0 in pH. Diameter and flow rate of plug flow reactor in the best were 8.5mm in diameter and 0.8ml/min in flow rate. Reaction constant was mainly influenced by electrostatic force. The best glucose hydrolyzing activities of CHITN35-Gase was 3.34×10^{-5} M/l, while that of native- β -glucosidase was 2.44×10^{-5} M/l.

서 론

효소를 산업적으로 운용하기 위해서는 반응조에서 안정하여야 하며, 반응조로 부터 분리가 용이하고, 연속적인 공정이 이루어져야 한다.

천연효소의 반응조로부터의 분리, 정제는 비용이 많이 들고, 열 및 pH에 의하여 변성되며, 활성이 저하될 우려가 높아 산업적 운용이 용이하지 못하므로, 이는 synzyme이나 고정화 효소로써 극복되어 질 수 있다.

고정화 효소는 Sumner(1)에 의하여 urease가 정제되어 물리, 화학적 성질이 알려졌으며, 효소의 고정은 Nelson

등(2)이 alumina에 효소를 흡착법으로 고정시킨 이래 발전되어 왔다. 지지체도 흡착제로써 쉽게 얻을 수 있는 alumina, bentonite, Cellulose등으로 부터 polyacrylamide, nylon, polysaccharides등의 합성 유기물 지지체와 titanium, glass등의 무기물 지지체등으로 꾸준히 연구되어 왔다. 고정화 효소와 반응기에 대한 특성과 반응 환경등의 운용에 필요한 여러가지 인자들은 Goldstein(3, 4)등이 water-insoluble copoly-(maleic acid-ethylene)-trypsin (IMET)에 효소를 고정하여 최적 pH 이동, 내열성등의 성질과 특징, 고정화 trypsin의 동력학 동태, km 치에 대한 정전력의 영향, 효소 접촉 부위의 기질량과 전하량에

대하여, 또 polyanionic 및 polycationic 유도체에 chymotrysin 을 고정하여 pH 이동 및 km' 치의 변화, 반응속도에 관하여 보고한 바 있다. Greenfield(5)등은 silica-alumina 지지체에 glucose oxidase를 결합하여 packed-bed reactor 에서 film diffusion과 동력학적 동태에 관하여 보고한 바 있고, Mensfeld(6)등은 macroporous polystyrene에 invertase 를 결합하여 column 충전 반응기에서 시간당 유입량과 반응기 크기에 따른 활성의 차이와 유속에 따라 전환률이 낮아지고, km' 치는 감소하며, V_{max} '치는 증가하는 현상을 보고한 바 있다. 또, Lee(7)등은 고정화 glucose isomerase의 reactor system에서 H/D의 비율이 클수록 활성이 높아지는 것과 superficial velocity에 따라 km' 및 V_{max} '치가 지수 함수로 감소하는 현상 대하여 보고하였다. 그리고 Howell(8)등은 cellulose를 가수 분해 동안 효소가 불활성화 되는 것에 대하여 보고 하였고, Tosa(9, 10)등은 aminoacylase를 DEAE-cellulose 및 DEAE-sephadex 에 고정하여 충전 반응기에서 연속적인 반응으로 산업적 응용에 관하여 보고한 바 있다.

Chitin은 자연계에 널리 분포되어 있는 갑각류의 주성 분으로써 N-acetyl-2-deoxy-D-glucosamine이 β -1,4 결합으로 연결된 중합체이다. Chitin을 산 및 알칼리 가수분해 처리하면 chitin의 -NHAc기는 구조 변경이 용이하고 흡착력이 강하여 Sakaguchi(11)등은 증류수 흡착제로 사용한 바 있다. 그리고 값이 싸고 쉽게 구할 수 있어 고정화 효소의 지지체로써의 사용 가치가 많아, Stanley(12)등은 lactase와 α -chymotrysin을 glutaraldehyde로써 chitin에 고정하여 수용성 효소와의 활성을 비교하였다. 또한 Jitendra(13)등은 chitin의 구조 변형체인 chitosan 과 alginate beads에 β -glucosidase를 결합하여 지지체의 효율 및 온도와 pH의 영향에 대하여 보고한 바 있다. 한편으로 chitin의 효율증대를 목적으로 Synowiecki(14)등은 krill chitin을 22%의 HCl 용액으로 mineral을 제거한 후, 28%의 KOH 용액으로 온도 90°C에서 2시간 반응시켜 지지체로 만든 후 이 지지체에 invertase, aminoacylase, α -amylase, diastase 등을 각각 고정하여 상호 활성을 비교한 바 있다. 그리고 Kurieta(15)등은 chitin을 20% NaOH 용액에서 반응시켰을 때 30% 정도 탈 아세틸화 되는 것에 대하여, Hisamatsu(16)등은 28.6%의 NaOH 용액에 chitin을 반응시켰을 때 35%정도 탈 아세틸화 되고, 그 이상으로 탈 아세틸화 시켜도 단백질의 흡착 능력은 증가하지 않으며, chitosan과 대등하다고 하였다. 또한 chitosan은 pH 4.0이하에서는 용해 되기 때문에 내산성 지지체로 적합하지 못하나, chitin은 산, 알칼리에 강하므로 이를 부분적으로 탈 아세틸화 시키면 내산성 지지체가 될 수 있을 것으로 기대된다.

한편 본 실험에 사용된 β -glucosidase는 녹색 식물에 의해 합성되는 biomass인 cellulose의 분해 효소로서 cellulose 는 발효에 의하여 연료가 될 수 있으므로 본 연구에서는 값이 싸고 고정화 능력이 우수한 chitin에 고정하여 앞전(17)의 연구보다 활성을 높이기 위하여 chitin을 강 산(6 N-HCl)으로 처리하여 고정화한 CHIT-A-Gase 와, 강 알칼리(28.6%-NaOH)로 질소 환경에서 부분적으로 탈아세틸화 시키고 N_2 gas 존재하에 Sodium azide(NaN_3)와 HCl로써 diazotization반응을 시킨 후 β -glucosidase 를 고정시켜 CHITN-Gase를 제조하였다. 이 효소들의 입자의 크기를 25, 35 및 50 mesh로 하여 H/D 가 다른 4가지의 반응기에서 유속을 0.4, 0.8, 1.2 및 1.6ml/min으로 주입시키고, 기질의 pH와 반응기의 온도를 변화시켜 각 조건에서 최적 pH, 최적온도, 반응 속도 상수, 효소의 불활성화 속도등에 따른 고정화 효소의 따른 활성을 비교, 검토하였다. 또한 고정화 효소와 지지체 간의 상호 관계를 규명하여 상호간의 활성 및 천연 β -glucosidase와의 활성을 비교하여 고정화 효소의 잇점과 chitin이 β -glucosidase의 좋은 지지체임을 입증하여 공업적으로 응용하는데 기여 하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

1) CHITA의 제조

Chitin을 25, 35 및 50 mesh로 분쇄하여 각각 6 N-HCl 을 CO_2 가 완전히 발산할 때까지 처리하여 증류수로 중성이 되도록 세척하여 건조하고 이를 입자 별로 각각 CHITA 25, CHITA 35, CHITA 50으로 표시하였다.

2) CHITN의 제조

Chitin을 25, 35 및 50 mesh로 분쇄하여 이들은 28.6%(w/w)-NaOH로서 120°C에서 질소 가스로 포화시키면서 부분적으로 탈 아세틸화시켜 중성이 될 때까지 세척하여 건조하고 이를 입자 별로 각각 CHITN 25, CHITN 35, CHITN 50으로 표시하였다.

효소

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

기질

p-nitrophenol- β -D-glucopyranoside(Fluka: Switzerland, 이하 PNG로 약칭)를 반응기의 반응 조건에 따라 pH 를 조절한 McIlvaine buffer에 녹여 농도가 10^{-4} M/1

되도록 하여 사용하였다.

완충용액

효소를 용해하기 위하여 0.05M-citrate buffer를 사용하였고, 기질은 McIlvaine buffer에 녹여 반응기의 조건별로 pH를 변화시켜 사용하였다.

효소의 활성 측정

PNG를 β -glucosidase와 반응시켜 유리되는 p-nitro-phenol을 420nm에서 흡광도를 측정하고(2), 표준 곡선과 비교하여 정량하였다.

β -glucosidase의 고정

1) CHITA 지지체에 β -glucosidase의 고정

CHITA 25, 35 및 50을 각각 0.5g을 취하여 100ml의 flask에 넣고 여기에 pH 5.0인 McIlvaine buffer 26.1ml, HAc 0.5ml 및 β -glucosidase 용액 1ml를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 25% glutaraldehyde를 2.4ml 넣어 2%의 glutaraldehyde가 되도록 하여 실온에서 2시간 동안 고정화 시켰다. 이 고정화 효소를 pH 5.0 McIlvaine buffer로 세척하여 각각 CHITA25-Gase, CHITA35-Gase, CHITA 50-Gase라고 표시하였다.

2) CHITN 지지체에 β -glucosidase의 고정

CHITN 25, CHITN 35, CHITN 50을 각각 0.5g을 취하여 100ml의 flask에 넣고 0.1 M-sodium azide(NaN_3) 28ml와 1 N-HCl 2ml를 넣고 질소 가스하에서 1.5시간 반응시킨후 증류수와 pH 5.0의 McIlvaine buffer로 각각 세척하였다. 이것을 pH 5.0 McIlvaine buffer 26ml, 25% glutaraldehyde 4ml 및 효소용액 1ml가 담긴 반응조에 넣어 실온에서 2시간 반응시켰다. 이를 여과하고 pH 5.0 McIlvaine buffer로 세척하여 이를 각각 CHITN25-Gase, CHITN35-Gase, CHITN50-Gase로 표시하였다.

반응기

직경이 4.0, 6.5, 7.5 및 8.5mm의 플러그 흐름반응기를 사용하였다.

실험방법

25, 35 및 50 mesh의 CHITA-Gase와 CHITN-Gase를 반응기별로 pH의 변화는 pH 1.0 간격으로 pH 3.0-8.0까지, 온도의 변화는 10 $^{\circ}$ C 간격으로 40-80 $^{\circ}$ C 까지 변화시켰다. 또한 유속을 반응기별로 각각 0.4, 0.8, 1.2 및 1.6ml/min으로 변화시켜 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 고정

입자 크기에 따른 효소 고정화 정도를 고찰하기 위하여 입자를 25, 35 및 50 mesh로 변화시키면서 효소고정에 따른 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 일반적으로 mesh가 증가함에 따라 표면적이 증가하므로 고정화 정도가 증가할 것으로 예측되나 실험값은 일정한 순서를 보여주지 않으므로 표면적의 증가만이 고정화 정도의 척도라고는 말할 수 없으며 특히 효소 또는 지지체가 반응기 내에서 차폐효과등으로 표면에 계속적으로 고정화가 될 수 없는 것으로 사료된다. 따라서 어느정도 우수한 고정화 정도를 나타낸 35 mesh를 중심으로 다른 변수에 따른 영향을 고찰하였다. Fig. 1에 따르면 효소는 CHITA 35-Gase가 CHITN 35-Gase보다 초기에 빨리 고정화 되었으며, 일정시간 지난 후 CHITN 35-Gase가 더 많이 부착되는 것으로 나타났다. 효소 결합 정도는 CHITA 35-Gase가 0.54mg / 0.5g support였고, CHITN 35-Gase에서는 0.61mg / 0.5g support이었다. chitin을 강산으로 처리한 후 효소와 glutaraldehyde를 결합시킨 CHITA 35-Gase는 CHITN의 azide기와 효소와 결합 시킨 CHITN35-Gase보다 결합력이 약한 것으로 보이는데 이는 CHITA이 chitin과 chitosan과의 중간 정도의 물질이기 때문에 chitosan의 -NH₂기와 diazotization 반응이 먼저 일어나 -NHNH₂로 되고 여기에 N₂가 이탈되면서 효소의 -NH₂기가 결합 한 후 chitin의 -NHAc기와 glutaraldehyde가 결합하여 결합력이 CHITA 35-Gase보다 큰 것으로 사려된다.

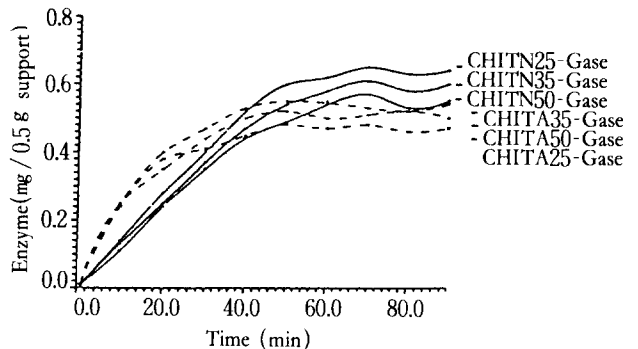


Fig. 1. β -Glucosidase attachment with time on 0.5 g support, CHITA and CHITN.

온도 및 pH의 영향

Fig. 2 및 Fig. 3에 나타난 바와 같이 CHITA 35-Gase는 50 $^{\circ}$ C에서 최적의 활성을 나타내었고, CHITN 35-

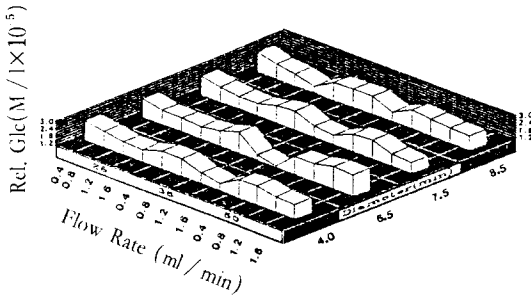


Fig. 2. Comparison of the released glucose according to diameter of the reactors and flow rates in optimum condition, pH 5.0, 50°C of CHITA 35-Gase.

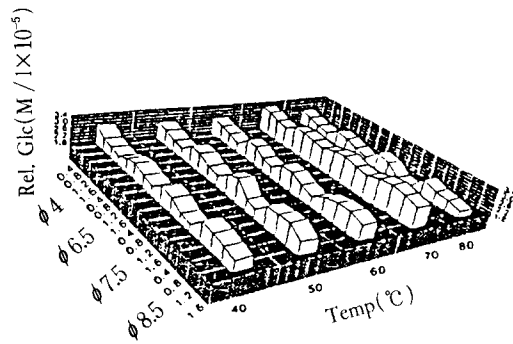


Fig. 3. Comparison of the released glucose according to diameter of reactors and flow rate and temperature, CHITN 35-Gase.

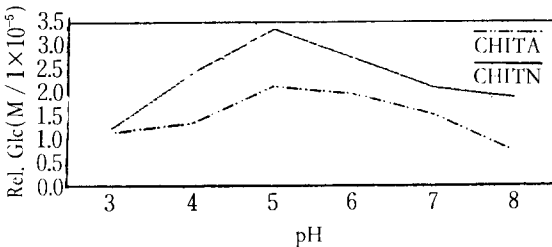


Fig. 4. Comparison of the released glucose according to pH variation of CHITA 35-Gase and CHITN 35-Gase at the optimum temperature, 8.5mm reactor. 0.4mm / min

Gase 는 70°C에서 최적의 활성을 나타내었으며 직경이 8.5mm인 반응기에서 유속 0.8ml / min에서 3.342×10^{-5} M / l의 유리된 포도당을 나타내었다. 이는 CHITA-Gase의 최대 활성시의 값, 2.588×10^{-5} M / l보다 1.3배가 큰 것이다. 전반적으로 CHITN 35-Gase에 의한 유리 포도당이 CHITA 35-Gase의 값보다 높은 것으로 나타났다.

또한 CHITA 35-Gase는 pH 4-7의 넓은 pH범위에서 활성의 안정성을 보였으며, CHITN 35-Gase의 일반적인 활성은 넓은 범위에서 CHITA 35-Gase의 활성보다 높았으며 pH 5.0에서 최적 활성을 나타내었고 최적 pH를 벗어나면 활성이 감소됨을 보여 pH의 선택성이 좁음을 Fig. 4에서 볼 수 있다.

Km' 및 Vmax'의 비교

실험 범위 내에서 최적의 상태인 온도 50°C, pH가 5.0(CHITA 35-Gase) 및 70°C(CHITN 35-Gase)에서 유속과 반응기 반경을 달리하여 CHITN 35-Gase 및 CHITN 35-Gase의 Michaelis-Menten 식에 따르는 두 속도 상수를 구하여 비교 하였다. CHITN 35-Gase 및 CHITN 35-Gase의 Km'치 및 Vmax'치는 반응기의 크기와 유속에 따라 다른 경향을 나타내었다. CHITA 35-Gase 는 ϕ 4.0, ϕ 6.5, ϕ 7.5 및 ϕ 8.5mm의 반응기에서는 유속 증가에 따라 Km'치의 감소 현상을 보였다. Vmax'치는 모두 현저히 증가됨을 보였다.

CHITN 35-Gase는 반경을 달리한 반응기에서 유속 증가에 따라 Km'치는 모두 감소하였고 Vmax'는 모두 증가함을 보였다.

그리고 플러그 흐름 반응기의 정상 상태의 식은 아래와 같다.

$$K_m' \ln \frac{S}{S_0} + (S - S_0) = -\frac{H}{U_s} V_{max}' \quad (1)$$

위 식을 다시 쓰면

$$\frac{K_m'}{V_{max}'} \ln \frac{S}{S_0} + \frac{(S - S_0)}{V_{max}'} = -\frac{H}{U_s} \quad (2)$$

(2)식을 얻을 수 있다. 이 식에서 반응 속도 상수 km'는 유속이 증가할수록 superficial velocity (Us)가 클수록 작아지는 경향을 볼 수 있고, 또한 Vmax'치는 반응기의 길이가 작을수록 커지는 것을 알 수가 있으므로 식에 의해서도 유속의 증가에 따라 km'는 감소되고, Vmax'는 증가됨을 증명할 수 있었다.

이상의 결과들을 Fig. 5에 나타내었다.

CHITA 35-Gase 및 CHITN 35-Gase등은 이온 부하를 가지고 있어 정전력에 의한 기질을 당기는 힘이 있으므로 km 및 km'는 다음의 관계가 알려져 있다.

$$k_m' = k_m \cdot \exp(z\phi / kT) \quad (3)$$

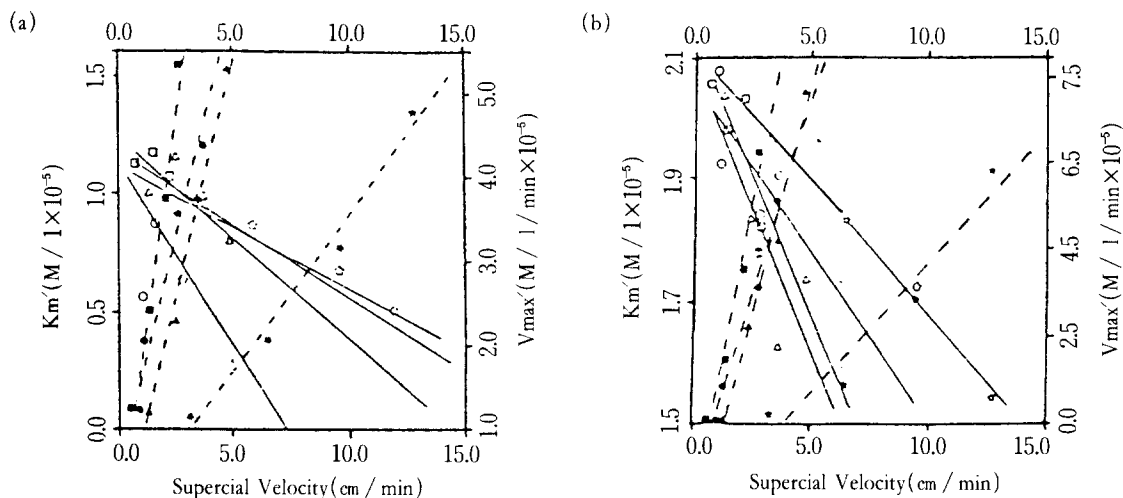


Fig. 5. Tendency of K_m' and V_{max}' CHITA35– Gase(a) CHITN35– Gase(b) with the different superficial velocity and reactors.

- ☆-☆: K_m' values for ϕ 4.0 mm reactor
- △-△: K_m' values for ϕ 6.5 mm reactor
- : K_m' values for ϕ 7.5 mm reactor
- : K_m' values for ϕ 8.5 mm reactor
- ★-★: V_{max}' values for ϕ 4.0 mm reactor
- ▲-▲: V_{max}' values for ϕ 4.0 mm reactor
- : V_{max}' values for ϕ 4.0 mm reactor
- : V_{max}' values for ϕ 4.0 mm reactor

Table 1. Correlation of the diameter of reactors, superficial velocity and electrostatic force at optimum condition of support size 35 mesh

Support size, mesh (cm)	Reactors diameter (mm)	Surface area (cm ²)		Superficial velocity (cm/min)	Electrostatic force (ev)		Mean electrostatic force (ev)	
		CHITA-Gase	CHITN-Gase		CHITA-Gase	CHITN-Gase	CHITA-Gase	CHITN-Gase
35 (0.05)	4.0	33.39	47.5	3.18	4.751	5.556	3.81	4.2
				6.37	4.323	4.723		
				9.54	3.824	3.122		
				12.74	2.342	3.234		
	6.5	35.35	65.70	1.21	6.810	7.432	3.70	4.0
				2.41	3.773	4.072		
				3.62	1.802	2.224		
				4.82	2.486	2.452		
	7.5	33.45	63.62	0.95	9.213	9.342	6.93	7.0
				1.18	7.215	7.242		
				2.76	6.332	5.832		
				3.62	4.974	5.534		
	8.5	29.79	61.28	0.71	7.542	8.569	6.42	7.7
				1.41	7.066	7.625		
				2.11	6.835	9.732		
				2.82	4.231	4.863		

여기서

ze: Substrate charge

ϕ : Electrostatic potential 이다.

확산을 무시할 수 있는 Na⁺-Gase의 km치는 4.461×10^{-5} M/l이므로, 여기서 고정화 효소에 의한 km'값을 대입하면 지지체의 정전력(ϕ)를 구할 수 있다.

CHITA 35-Gase는 유속이 증가할수록 4가지의 반응기에서는 km'치가 감소함을 보였는데 이는 지지체 CHITA의 하전량에 관계되어진다고 사려되므로 Table 1에서 보여주는 바와 같이 반응기에서 superficial velocity가 3.2, 6.4, 9.5 및 12.7cm/min으로 증가함에 따른 ϕ 6.5mm의 반응기는 하전량은 6.81, 3.77, 1.80 및 2.48 cv로 감소하므로 Km'치의 감소가 일어나는 것으로 생각된다.

CHITN 35-Gase의 Km'치의 감소가 CHITA 35-Gase보다 큰 것으로 나타났는데, 이것은 평균 하전량 및 반응기의 입자 표면적이 CHITN 35-Gase가 큰 것에 기인된다고 사려된다.

활성 상호 관계

1) 반응기의 직경과 superficial velocity에 따른 고정

화 효소의 활성과의 관계

효소의 활성 측도를 포도당의 유리량에 비례한다고, 즉 효소의 활성이 크면 포도당이 많이 형성된다는 가정 하에서 포도당의 유리량으로 효소의 활성을 측정하고자 지지체의 입자반경, 반응기의 직경, 반응기 효소의 높이 (H), H/D, 유속, 체류 시간, superficial velocity를 변화시켜 보았다. Table 2에 수록된 바와 같이 반응기의 직경과 H/D변화에 따른 유리된 포도당량의 변화가 미소하므로 반응기의 직경이나 높이를 변화시켜 고정화 효소의 활성을 크게 증가시킬 수 없었다. 그러나 유속의 증가에 따른 유리된 포도당량이 감소하므로 포도당의 생산을 극대화 시키는 최적 유속이 존재하는것을 알 수 있었다. 이상의 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

2) 반응기 직경 및 온도와 고정화효소의 활성과의 관계

반응 최적 유속 0.8ml/min에서 CHITA 35-Gase는 50℃에서 최적의 활성을 나타내었고 반응기의 직경이 작고 최적 온도에 가까울수록 활성이 높았으며, 반응기의 직경이 크고 온도가 높을수록 활성의 저하를 보였다. CHITN 35-Gase는 40℃에서 최적 온도인 70℃까지의

Table 2. Correlations of reactor size, flow rate, space time and superficial velocity on CHIT 35-Gase

Support size, (mesh) (cm)	Reactors diameter (cm)	Reactors height (cm)		H/D (-)		Flow rate (ml/min)	Space time (-)		Sperficial velocity (cm/min)	Released glucose (x10 ⁻⁵ M/l)	
		A	N	A	N		A	N		A	N
35 0.05	0.40	18.0	21	45.0	52.5	0.4	5.66	6.60	3.18	2.470	3.312
						0.8	2.83	3.30	6.37	2.462	3.143
		1.2	1.88	2.20	9.55	1.839	2.894				
		1.6	1.42	1.65	12.73	1.532	2.765				
	0.65	6.5	11	10.0	16.9	0.4	5.39	9.13	1.21	2.207	3.148
						0.8	2.70	4.56	2.41	2.094	3.225
		1.2	1.80	3.04	3.62	1.435	3.048				
		1.6	1.35	2.28	4.82	1.167	2.986				
	0.75	5.5	8	7.3	10.7	0.4	6.07	8.84	0.95	2.391	3.236
						0.8	3.04	4.42	1.81	2.533	3.332
		1.2	2.03	2.95	2.72	1.889	3.107				
		1.6	1.52	2.21	3.62	1.718	2.980				
	0.85	3.5	6	4.1	7.1	0.4	4.97	8.51	0.70	2.418	3.247
						0.8	2.48	4.26	1.41	2.495	3.342
		1.2	1.66	2.84	2.14	2.500	3.169				
		1.6	1.24	2.13	2.82	1.718	2.892				

A: CHITA 35-Gase

N: CHITA 35-Gase

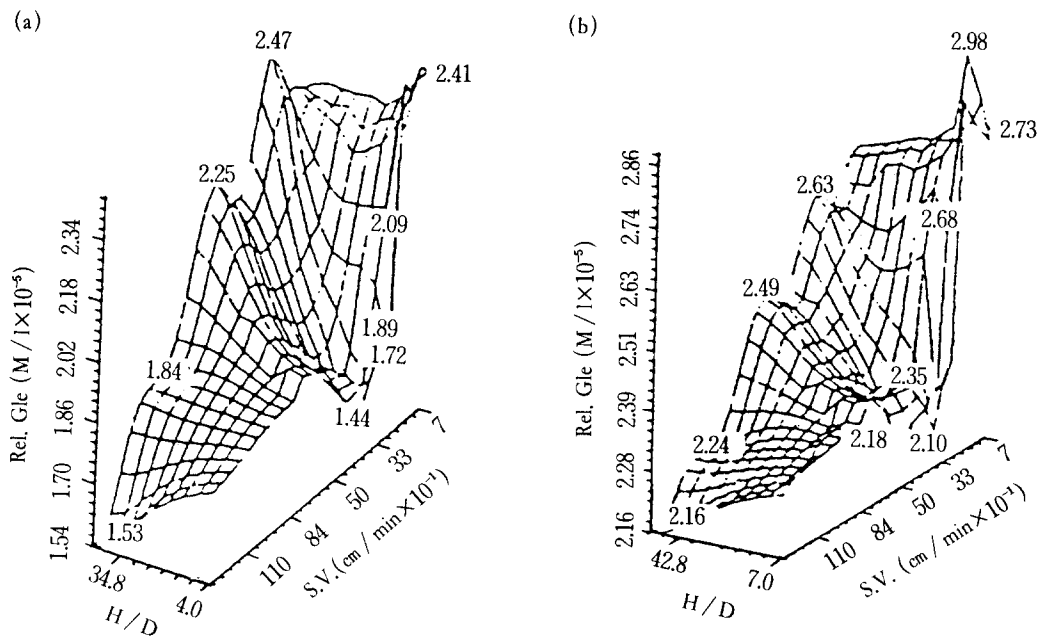


Fig. 6. Correlation of the released glucose, superficial velocity and H/D, CHITA 35-Gase(a), CHITN35-Gase(b).

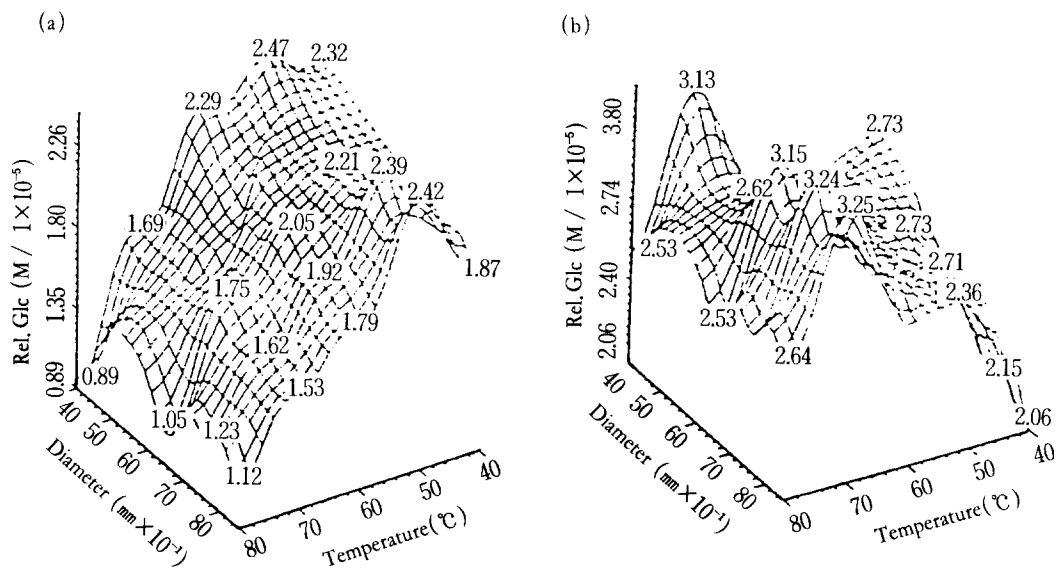


Fig. 7. Correlation of the released glucose, diameter and temperature on CHITA 35-Gase(a), CHITN35-Gase(b).

높은 활성을 유지하므로 CHITA 35-Gase보다 높은 온도에서 활성을 유지할 수 있는 것을 알았으며 심지어 80℃에서도 CHITN 35-Gase보다 2배 이상의 유리 포도당을 얻었다. 이러한 점을 고려하면 CHITN-Gase는 CHITA-Gase보다 높은 온도에서 안정함을 알 수 있었고 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

효소 불활성화 속도

1) 불활성화 속도와 유속과의 관계

CHITA 35-Gase는 유속증가에 따라 4가지의 반응기 모두 감소현상을 나타내었다. 4가지의 반응기 모두 유속 0.8ml/min에서 불활성화 속도가 크게 나타났고 $\phi 6.5 < \phi 8.5 < \phi 4.0 < \phi 7.5$ mm의 순서로 불활성화 속도가 크게 나타났다.

CHITN 35-Gase는 유속증가에 따라 감소 경향을 보였고 4가지의 반응기는 유속이 느린 0.4ml/min에서 불활성화 속도가 크게 나타났고 반응기별로는 $\phi 8.5 < \phi 7.5 < \phi 6.5 < \phi 4.0$ mm의 순서로 나타났다. CHITA 35-Gase의 불활성화 속도가 CHITN 35-Gase보다 큰 것은 지지체와 효소간의 결합력에 관계되는 것으로 사려된다. CHITN 35-Gase가 CHITA 35-Gase보다 지지체에 효소가 가깝게 부착되어 있다고 판단되어지며 이는 diazotization 결합에 기인되는 것으로 생각된다. 반응기의 반경이 작을수록 불활성화 속도가 적고, 유속이 낮을수록 효소가 빨리 포화되어 활성이 낮아지는 것으로 사려된다. 이상의 결과

를 Fig. 8에 나타내었다.

2) pH와 불활성화 속도의 관계

50℃, 직경 8.5mm 반응기에서 유속이 0.4ml/min 일때 pH 변화에 따른 효소 불활성화 속도를 Fig. 9에 나타내었다. pH가 증가됨에 따라 불활성화 속도가 증가되는 것을 알 수 있었다. CHITA 35-Gase의 경우가 CHITN 35-Gase의 경우보다 불활성화 속도가 크게 나타났으며 이들 효소는 모두 최적 pH 5.0 이하에서는 불활성화 속도가 낮았으나 pH 6.0 이상에서는 커짐을 보였다. pH가 높을수록 불활성화 속도가 증가되었는데 이는 pH가 높을수록 지지체와 효소간의 결합력이 약해지는 것으로 판단된다. 또한 지지체의 입자크기에 따라 입체 장애로 인한 결합력 및 기질의 포화 속도가 달라지나 pH 변화에 따른 불활성화 속도 변화는 입자 크기에는 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

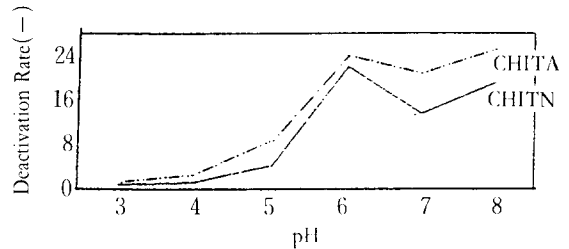


Fig. 9. Relationship between the deactivation rate and pH, CHIT35-Gase.

요 약

35 mesh의 CHITN에 diazotization 반응으로 $-NH_2$ 기를 diaz화 한 후 glutaraldehyde와 β -glucosidase를 가하여 CHITN 35-Gase의 고정화 효소를 만들었다. 이를 CHITA 35-Gase와 함께 반응기의 직경이 4.0, 6.5, 7.5mm 및 8.5mm의 반응기에 유속 0.4, 0.8, 1.2ml/min 및 1.6ml/min으로, pH 4.0-8.0까지 pH 1.0, 온도는 10℃ 간격으로 40-80℃까지 각각의 조합으로 반응시켜, 반응 속도 상수, 효소의 불활성 속도, H/D와 유속, pH, 온도, 정전기력 등의 상호 관계를 규명하였다. 효소의 고정화는 차폐 효과등에 의하여 표면적의 증가에 따른 고정화 정도는 될 수 없었다. 고정화 효소의 활성은 CHITN 35-Gase가 CHITA 35-Gase의 최적 온도는 50℃였고, CHITN 35-Gase는 70℃였으며 80℃ 이상에서도 CHITA 35-Gase 보다 높게 나타났다. km³/치는 지지체 정전기력의 크기에 따라 감소하는 현상을 나타내었고, 유속에

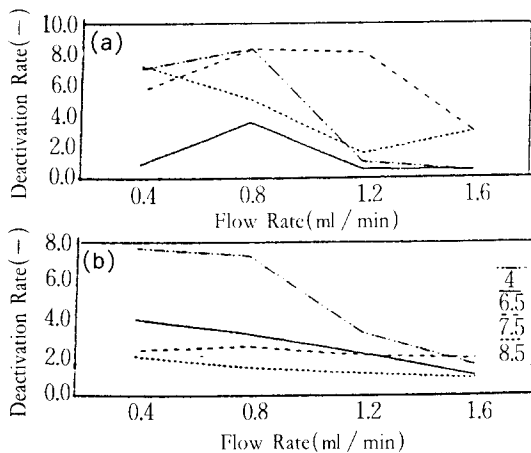


Fig. 8. Comparison of the deactivation rate between CHITA35-Gase(a) and CHITN 35-Gase(b), according to the different flow rates and reactors, 50℃, pH 5.0.

다른 km³치의 증가 및 감소율은 입자의 표면적 및 하전량에 관계되는 것으로 나타났으며, V_{max}는 증가하는 현상을 나타내었다. 반응기에 따른 고정화 효소의 활성은 반응기의 직경이나 높이를 변화시켜 활성을 크게 증가시킬 수 없었으나 포도당 생산을 극대화 시키는 최적유속이 존재하였다. 최적 온도는 지지체와 효소의 결합력에 따라 다르게 나타나 CHITA 35-Gase 보다 2배 이상의 유리 포도당을 얻었고, 최적 pH는 모두 pH 5.0이었다. 효소의 불활성화 속도는 지지체와 효소가 가깝게 부착되어 있다고 생각되는 CHITN 35-Gase가 CHITA 35-Gase 보다 작았으며, 유속 및 반응기 속도에 따라 다르게 나타났다. CHITN 35-Gase 및 CHITA 35-Gase의 반응기별 최고의 활성은 직경 8.5mm반응기의 0.8ml/min에서 각각 3.342×10^{-5} 및 2.50×10^{-5} M/l이었다. 이것은 Nat Gase의 최적 온도 50°C, 최적 pH 5.0에서의 2.440×10^{-5} M/l보다 높은 활성을 보였다. 이상에서 지지체의 입자, 유속, pH, 온도 등의 인자에 의하여 활성의 차이를 보였고, Chitin은 화학적 처리에 따라 효소의 좋은 지지체가 될 수 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. L. Goldstein and E. Katchalski(1976), Immobilized Enzyme—A Survey (*in Applied Biochemistry and Bioengineering*, L. B. Wingard, E. Katchalski, and L. Goldstein, ed), Academic Press, Vol. 1.
2. L. Goldstein (1976), *Methods in enzymology* (Mosbach K., ed), Vol. 44. Academic Press.
3. Y. Levin, M. Pechet, L. Goldstein and E. Katchalski (1964), *Biochemistry*, **3**, 1905.
4. L. Goldstein, L., Y. Levin and E. Katchalski (1964), *Biochemistry*, **3**, 1913.
5. P. F. Greenfield, D. D. Kinzler and R. L. Laurance (1975), *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1555.
6. J. Mansfeld and A. Schllenbuger (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 72.
7. Lee, S. B., S. M Kim and D. Y. Dewey (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2023.
8. J. A. Howell (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 847.
9. T. Tosa, T. Mori and I. Chibata (1969), *Arg. Biol. Chem.*, **33**, 1503.
10. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse and I. Chibata (1969), *Arg. Biol. Chem.*, **33**, 1047.
11. T. Horikochi and A. Nakajima (1979), *Nippon Noeikagaku Kaishi*, 53, 149.
12. W. L. Stanley, G. G. Watters, B. Chan and J. M. Mercer (1975), *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 315.
13. D. D. Jitendra, R. Ray and A. Desai (1986), *J. Ferment. Technol.*, **64**, 255.
14. J. Synowieck, Z. E. Sikorski, and M. Nacz (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2211.
15. K. Kurita, T. Sannan, and Y. Iwakura (1977), *Makromol. Chem.*, **178**, 3197.
16. M. Hisamatsu and T. Yamada (1989), *J. Ferment. and Bioeng.*, **67**, 219.
17. 이경희, 김종덕, 김병우, 송승구(1990), 한국생물공학 회지, **5**(3), 279.
18. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse and I. Chibata (1967), *Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 603.
19. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.*, **28**, 265.
20. Halwachs, W. (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 281.
21. Lee, S. B. and Dewey D. Y. Ryu(1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1499.
22. J. E. Balley and D. F. Ollis (1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed, McGraw-Hill, 498.
23. E. L. Culsser (1984), *Mass Transfer in Fluid System*, Cambridge Univ. Press, 185(1984).
24. J. R. Welty and C. E. Wicks and E. R. Wilson (1984), *Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer*, John Wiley & Sons, 492.
25. J. M. Engasser (1978), *Bioph. Acta.*, **526**, 301.
26. J. M. Engasser and C. Horvath (1974), *Biochemistry*, **13**, 3845.
27. J. M. Engasser and C. Horvath (1974), *Biochemistry*, **13**, 3849.
28. J. M. Engasser and C. Horvath (1974), *Biochemistry*, **13**, 3855.
29. O. Hannibal-Friedrich M. Chun and M. Sernetz (1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 157.
30. L. Goldsein (1972), *Biochemistry*, **2**, 4072.
31. H. Ishikawa, T. Tanaka, K. Kurose and H. Hikida (1987) *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 924.
32. J. C. Davis (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1113.
33. L. Shemer, R. Granot, A. Freeman, M. Sokolovsky and L. Goldstein(1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1067.
34. G. Stephanopoulos and A. G. Fredrickson (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1499.

35. D. Thomas, C. Bourdillon, G. Broun, and J. P. Kernevez (1974), *Biochemistry*, **13**, 2995.
36. A. J. Sophianopoulos and B. J. Weiss (1964), *Biochemistry*, **3**, 1920.
37. R. Puvannakrishnan and S. M. Bose (1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 919.
- (Received; May 11, 1991, Accepted; July 30, 1991)**