

Diazotized Chitin에 고정된 β -glucosidase의 생물반응기에서의 특성, 물질전달계수 및 효율인자에 관한 연구

김종덕[†] · 이경희 · 서석수

부산대학교 약학과

Characteristics, Mass Transfer Coefficient and Effectiveness Factor of β -glucosidase Immobilized on the Diazotized Chitin in Bioreactors

Jong-Deog Kim[†], Kyung-Hee Lee and Suk-Soo Seo

Dept. of Pharmacy, College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735 Korea

Abstract

Diazotized chitin(CHITN) as supports of immobilized enzyme, which was obtained by alkaline hydrolysed chitin with NaN_3 and HCl was employed to produce CHITN-Gase with glutaraldehyde as bifunctional reagent. Activities of CHITN-Gase were determined with reaction of p-nitrophenol- β -D-glucopyranoside(PNG) in plug flow reactor as a reference of CHITA-Gase. Their optimum temperature, pH, K_m' and V_{max}' , mass transfer coefficient(h), effectiveness factor(η) were plotted with variation of flow rate and H/D. Mass transfer coefficient(h) of those enzymes increased because of their flux, as flow rates were increased and controlled by reaction rate. Effectiveness factor(η) of both enzymes were nearly 1.0.

Key words : CHITN, PNG, mass transfer coefficient, effectiveness factor

서 론

분리된 효소를 효율적, 경제적으로 운용하기 위해서는 효소가 열 및 pH에 대하여 안정성을 가지며 재사용할 수 있고 반응조에서 안정하여야 하며, 반응조로부터 분리가 용이하여야 하고, 연속적인 공정이 이루어져야 한다. 천연효소의 반응조로부터의 분리, 정제는 비용이 많이 들고, 효소가 열 및 pH에 의하여 변성되며, 활성이 저하될 우려가 높아 상업적 운용이 용이하지 못하므로, 이는 synzyme이나 고정화 효소로써 극복되어 질 수 있다. synzyme은 재사용

될 수 없기 때문에 고정화 효소가 용이 하다고 할 수 있다. 효소 고정에 사용되는 지지체는 어느 효소와도 결합이 잘 되어야 하며 값이 싸야 할 것이다. Chitin은 새우 및 게 등의 갑각류를 가공하고 난 후의 폐기물로서 2-amino-2-deoxy-D-glucose가 β -1,4 결합으로 연결된 중합체로 산 가수분해 및 알칼리 처리하면 chitin의 -NHAc기는 구조 변경이 용이하여, 알칼리 처리하여 얻어지는 chitosan과 함께 중금속 흡착제¹⁾, 식품 첨가물²⁾, 항 cholesterol 제제³⁾ 및 고정화 효소 지지체⁴⁾ 등의 이용 범위가 넓게 연구되고 있으나, 아직 막대한 양의 chitin이 이용되지 못하고 있다.

고정화 효소의 지지체로써 chitin은 Stanley⁵⁾ 등에 의하여 chitin에 lactase와 α -chymotrysin을 고정하여

[†]To whom all correspondence should be addressed

수용성 효소와의 활성을 비교하였고, Jitendra[®] 등은 chitin의 구조 변형체인 chitosan과 alginate beads에 β -glucosidase를 결합하여 지지체의 효율 및 온도와 pH의 영향에 대하여 보고 한 바 있다. 한편으로 chitin의 효율 증대를 목적으로 Synowiecki[®] 등은 krill chitin을 28%의 KOH 용액으로 90°C에서 2시간 반응시켜 지지체로 만든 후 이 지지체에 invertase, amin-oaclylase, α -amylase, diastase를 결합하여 상호 활성을 비교한 바 있으며, Kurieta[®] 등은 chitin을 20% NaOH 용액에서 반응시켰을 때 30% 정도 탈 아세틸화 된다고 하였고, Hisamatsu[®] 등은 28.6%의 NaOH 용액에 chitin을 반응시켰을 때 35% 정도 탈 아세틸화 된다고 하였다.

본 연구에서는 chitin의 효율을 높이기 위하여 질소 환경에서 부분적으로 탈 아세틸화 시키고 N₂ gas 존재하에 sodium azide (NaN₃)와 HCl로써 diazotization 반응을 시켜 어느 효소와도 결합이 가능하고 성능이 좋은 지지체를 개발하고 β -glucosidase를 결합하여 그의 동태와 활성 정도를 반응기의 크기에 따라 관찰하고 또한 활성에 직접적으로 영향을 미치는 최적 pH, 최적 온도, 반응 속도 상수, 물질 전달 계수와 효율 인자를 검토하여 chitin이 효소의 우수한 고정화 지지체를 검토하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

CHITA의 제조

Chitin을 25, 35 및 50mesh로 분쇄하여 각각 6N-HCl을 CO₂가 완전히 발산할 때까지 처리하여 증류수로 중성이 되도록 세척하여 건조하고 이를 입자 별로 각각 CHITA 25, CHITA 35, CHITA 50으로 표시하였다.

CHITN의 제조

Chitin을 25, 35 및 50mesh로 분쇄하여 이들을 28.6% (w/w) -NaOH로서 120°C에서 질소가스로 포화 시키면서 부분적으로 탈아세틸화시켜 중성이 될 때까지 세척하여 건조하고 이를 입자 별로 각각 CHITN 25, CHITN 35, CHITN 50으로 표시하였다.

효 소

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

기 질

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

완충 용액

0.05M-citrate buffer는 효소 용해용으로, McIlvaine buffer는 반응기의 조건별로 pH를 변화 시켜 사용 하였다.

효소의 활성 측정

PNG를 β -glucosidase와 반응시켜 유리되는 p-nitrophenol을 420nm에서 흡광도를 측정하고¹⁰⁾, 표준 곡선과 비교하여 정량 하였다.

β -glucosidase의 고정

CHITA 지지체에 β -glucosidase의 고정

CHITA 25, 35, 50 각각 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 시키고 pH 5.0 McIlvaine buffer로 세척하여 각각 CHITA 25-Gase, CHITA 35-Gase, CHITA 50-Gase라고 표시하였다.

CHITN 지지체에 β -glucosidase의 고정

CHITN 25, CHITN 35, CHITN 50 각 0.5g을 0.1 M-sodium azide (NaN₃) 28ml와 1N-HCl 2ml를 넣고 질소가스 하에서 1.5시간 반응시킨후 증류수와 pH 5.0의 McIlvaine buffer로 세척하고, 다시 pH 5.0 McIlvaine buffer 26ml 및 25% glutaraldehyde 4ml와 효소 용액 1ml를 넣어 실온에서 2시간 반응시킨 후 여과하고 이것을 pH 5.0 McIlvaine buffer로 세척하여 이를 각각 CHITN 25-Gase, CHITN 35-Gase,

CHITN 50-Gase로 표시하였다.

반응기

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

실험방법

35, 25 및 50mesh의 CHITA-Gase와 CHITN-Gase를 반응기별로 pH의 변화는 pH 1.0 간격으로 pH 3.0~8.0까지 온도의 변화는 10℃간격으로 40~80℃까지 변화 시켰다. 또한 pH, 온도 및 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 50mesh로 변화시키면서 효소 고정화에 따른 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 일반적으로 mesh가 증가함에 따라 표면적이 증가하므로 고정화 정도가 증가 할 것으로 예측되나 실험값은 일정한 순서를 보여 주지 않으므로 표면적의 증가만이 고정화 정도의 척도라고는 말할 수 없으며 특히 효소 또는 지지체가 반응기 내에서 차폐효과 등으로 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 고정화되었으며, 일정시간 지난 후 CHITN 35 Gase가 더 많이 부착되는 것으로

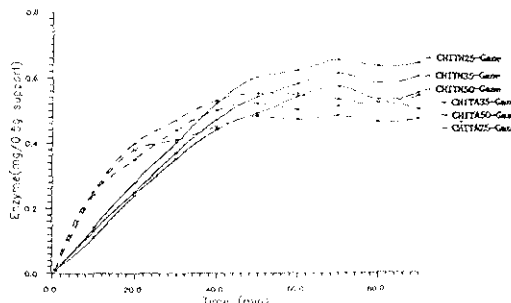


Fig. 1. β -Glucosidase attachment with time on 0.5g support, CHITA and CHITN.

나타났다. 효소 결합 정도는 CHITA 35-Gase가 0.54mg/0.5g support였고, CHITN 35-Gase에서는 0.61mg/0.5g support 이었다. Chitin을 강산으로 처리한 후 효소와 glutaraldehyde를 결합 시킨 CHITA 35-Gase는 CHITN의 azide기와 효소와 결합 시킨 CHITN 35-Gase보다 결합력이 약한 것으로 보이는데 이는 CHITN이 chitin과 chitosan과의 중간 정도의 물질이기 때문에 chitosan의 $-NH_2$ 기와 diazotization 반응이 먼저 일어나 $-NHNH_2$ 로 되고 여기에 N_2 가 이탈되면서 효소의 $-NH_2$ 기가 결합한 후 chitin의 $-NHAc$ 기와 glutaraldehyde가 결합하여 결합력이 CHITA 35-Gase보다 큰 것으로 사료된다.

온도 및 pH의 영향

Fig. 2 및 3에 나타난 바와 같이 CHITA 35-Gase는 50℃에서 최적의 활성을 나타내었고, CHITN 35-Gase는 70℃에서 최적의 활성을 나타내었으며 직경이 8.5 mm인 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/L

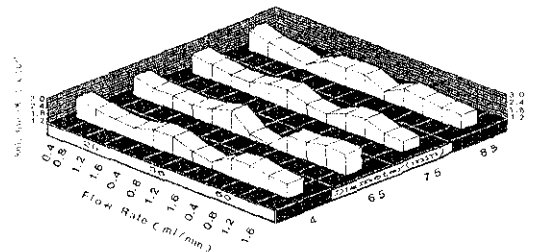


Fig. 2. Comparison of the released glucose according to diameter of the reactors and flow rates in optimum condition, pH 5.0, 50℃ of CHITA-Gase.

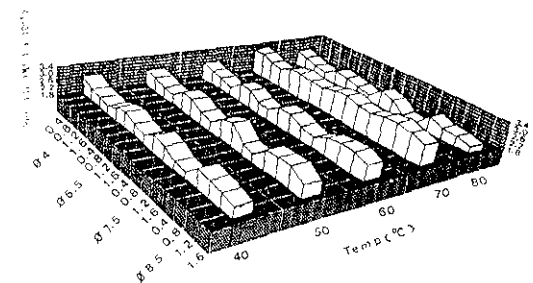


Fig. 3. Comparison of the released glucose according to diameter of reactors and flow rate and temperature, CHITN 35-Gase.

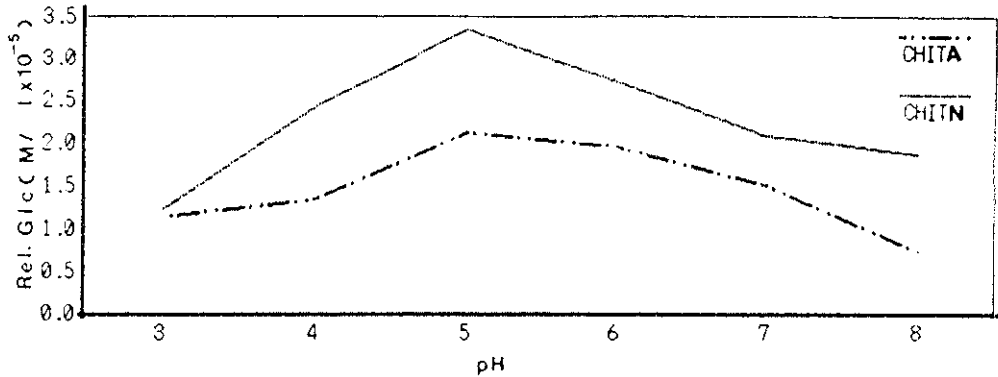


Fig. 4. Comparison of the released glucose according to pH variation of CHITA 35-Gase and CHITN 35-Gase at the optimum temperature, ø 8.5mm reactor, 0.4ml/min.

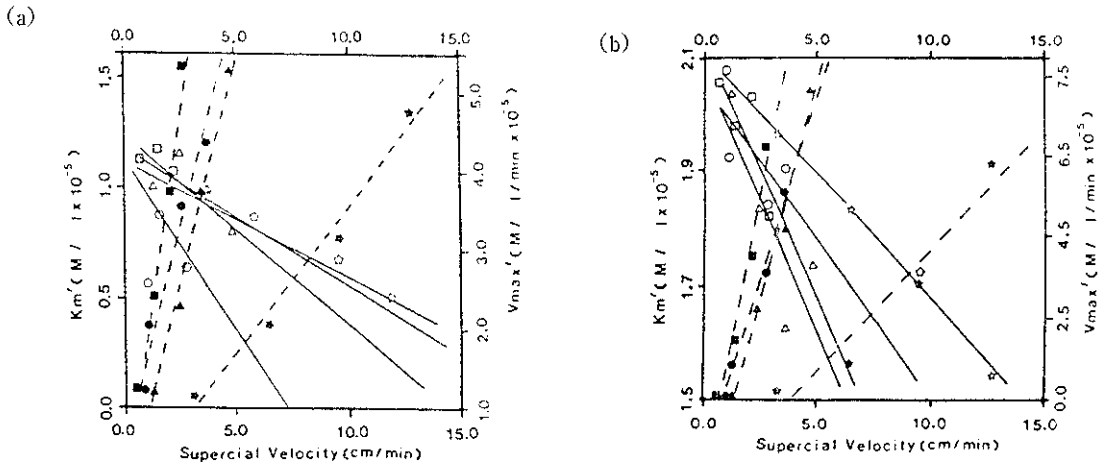


Fig. 5. Tendency of K_m' and V_{max}' CHITA 35-Gase (a) CHITN 35-Gase (b) with the different superficial velocity and reactors.

- ☆-☆ : K_m' values for ø 4.0mm reactor
- △-△ : K_m' values for ø 6.5mm reactor
- : K_m' values for ø 7.5mm reactor
- : K_m' values for ø 8.5mm reactor

- ★-★ : V_{max}' values for ø 4.0mm reactor
- ▲-▲ : V_{max}' values for ø 6.5mm reactor
- : V_{max}' values for ø 7.5mm reactor
- : V_{max}' values for ø 8.5mm reactor

보다 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 있었다.

속도 상수

실험 범위 내에서 최적 상태인 온도 및 pH에서

CHITA 35-Gase와 CHITN 35-Gase를 유속과 반응기 직경을 달리 하여 Michaelis-Menten 식에 따르는 두 속도 상수를 구하여 비교하였다. CHITA 35-Gase 및 CHITN 35-Gase의 K_m' 값은 유속의 증가에 따라 감소하고 V_{max}' 값은 현저히 증가됨을 보였다.

플러그 흐름 반응기의 정상 상태에서 얻은 아래식

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

반응 속도 상수 K_m' 는 유속이 증가할수록 작아지

고 V_{max}' 는 반응기의 길이가 작을수록 커지므로 실험 경향과 같으며 Fig. 5에 실험값을 나타내었다.

반응기의 직경과 superficial velocity에 따른 고정화 효소의 활성과의 관계

효소의 활성 측도를 포도당의 유리량에 비례한다고, 즉 효소의 활성이 크면 포도당이 많이 형성 된다는 가정하에서 포도당의 유리량으로 효소의 활성을 측정하고자 지지체의 입자반경, 반응기의 직경, 반응기 효소의 높이(h), H/D, 유속, 체류 시간, superficial velocity를 변화 시켜 보았다. Table 1에 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 존재하는 것을 알 수 있었다.

물질 전달 계수

고정화 담체 내, 외부에서의 확산 및 물질 전달이 반응기의 효율에 큰 영향을 미치므로 아래와 같이 확산 계수 및 물질 전달 계수를 구하였다.

기질 확산 계수 (Substrate diffusivity, D)

기질 PNG의 확산 계수는 Wilke-Chang 식¹¹⁻¹³을 사용하여 구하였으며 50℃에서의 값은 8.1668×10^{-7} cm²/sec였다.

물질 전달 계수와 유속 및 반응기 직경과의 관계

플러그 흐름 반응기에서의 물질전달 계수는 다음 식으로 구하였다¹⁶.

$$\frac{h}{U} \left[\frac{\mu}{\rho D} \right]^{2/3} = 2.5 \left[\frac{dp \cdot U \cdot \rho}{\mu} \right]^{-0.66} \dots (2)$$

위 식에서 U는 유체 속도이다.

용액으로부터 고정화 효소에 이동 되어지는 기질의 물질 전달 저항 현상을 유속과 반응기 직경을 변수로 고찰하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 유속증가에 따라 물질 전달 계수는 커지며, 반응기의 직경이 증가함에 따라 감소되는 경향을 보였다. CHITA 35-Gase가 CHITN 35-Gase보다 물질 전달 계수가 큰 것으로 나타났으며, 직경 8.5mm 반응기에서 유속이 0.4ml/min의 경우에는 CHITN 35-Gase 및 CHITA 35-Gase의 물질 전달 계수는 각각 3.65×10^{-4} , 3.64×10^{-4} cm/sec이었고 직경 4mm 반응기의 1.6 ml/min에

Table 1. Correlations of reactor size, flow rate, space time and superficial velocity on CHIT 35-Gase

Supports size (mesh)	Reactors diameter (cm)	Reactors height (cm)				H/D (-)	Flow rate (ml/min)	Space time (-)		Superficial velocity (cm/min)	Released glucose ($\times 10^4$ M/L)	
		A		N				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	3.132
							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	10.5	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	
						1.8	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		
					1.8	1.24	2.13	2.82	1.718	2.892		

A : CHITA 35-Gase N : CHITN 35-Gase

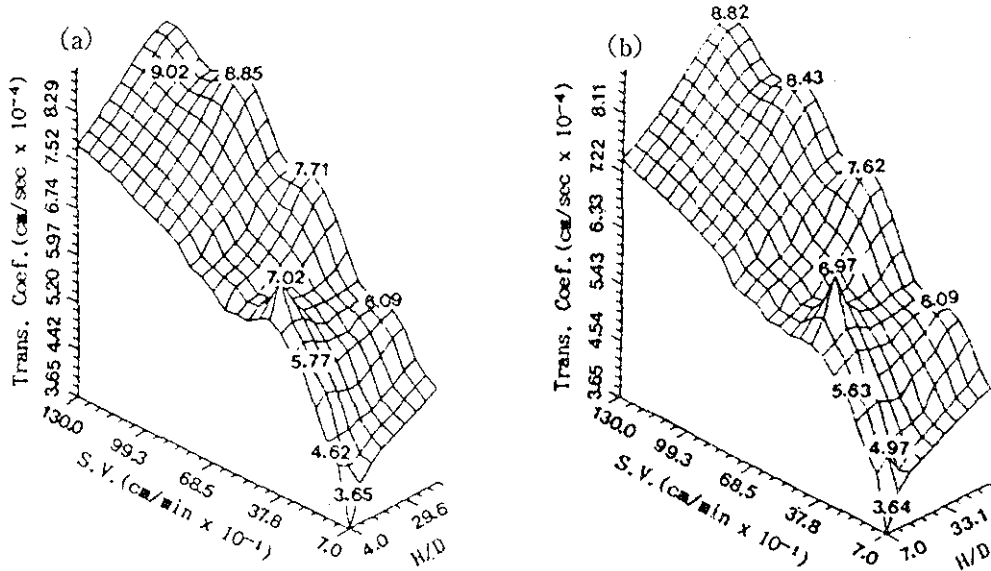


Fig. 6. Correlation of the transport coefficient, superficial velocity and H/D, CHITA 35-Gase (a), CHITN 35-Gase (b)

서는 각각 물질 전달 계수가 9.02×10^{-4} , 8.83499×10^{-4} cm/sec로 증가됨을 보였다.

그리고 (2)식을 변형하면

$$h = 2.5 \cdot U \cdot \left[\frac{dp \cdot U}{D} \right]^{2/3} \quad \dots (3)$$

(3)식으로 쓸 수 있다.

그리고 입자표면적(surface area, Sa)는

$$Sa = \frac{6}{dp} (1-\epsilon) \cdot \text{bed volume} \quad \dots (4)$$

(3)식에 (4)식의 (dp)를 대입시키면

$$2.5 \cdot U \cdot \left[\frac{Sa \cdot D}{6(1-\epsilon) \cdot U \cdot \text{bed volume}} \right]^{2/3} \quad \dots (5)$$

(5)식으로 된다.

따라서, 물질 전달 계수는 입자 표면적과 공극율(ϵ), 반응기의 부피 및 유속에 영향을 받는다고 사려된다. 유속에 따라 물질 전달 계수가 증가되는 것은 고정화 효소 주위의 전달 액막이 유속에 의하여 얇아지므로 flux가 크게 되기 때문으로 생각된다. 또한 입자 표면적(Sa)과 공극율(ϵ)은 커지고 반응기

부피는 작아져야 물질 전달 계수(h)가 커짐을 알 수 있다.

CHITA 35-Gase가 CHITN 35-Gase보다 물질 전달 계수가 크게 나타난 것은 CHITA 35-Gase의 반응기 내에서의 부피가 CHITN 35-Gase보다 작고, CHITA 35-Gase의 공극율(0.875)이 CHITN 35-Gase의 공극율(0.850)보다 큰 것에 기인되는 것으로 판단된다.

효율 인자 (Effectiveness factor, η)

효율 인자는 확산이 반응에 영향을 미치는 수율 factor로써 내부 효율 인자 및 외부 효율 인자로 나누어서 효율을 비교 하였다.

내부 효율 인자 (Internal effectiveness factor, η_i)

정상 상태 하에서 세공 내의 효소 반응 속도는 용액으로부터 고정화 효소 표면에 이동된 기질 물질 전달 속도와 같으므로 다음 식으로 표현된다¹⁰⁾.

위 식에서

$$[S]_s = S - \frac{v}{A \cdot h} \quad \dots (6)$$

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.

내부 효율 인자(η_i)는 최대 농도로 부터 구한 반응 속도에 대한 측정된 값이므로 다음 식으로 부터 구하였다¹⁹⁾.

$$\eta_i = \frac{v}{\frac{V_{max} [S]_s}{K_m + [S]_s}} \quad \dots (7)$$

외부 효율 인자(External effectiveness factor, η_e)

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

$$\eta_e = \frac{v/(\eta_i \cdot V_{max})}{V_{chem}/V_{max}} = \frac{([S]_s/K_m) (1+S/K_m)}{(1 + [S]_s/k_m) (S/K_m)} \quad \dots (8)$$

미소환경에서 기질농도 [S]_s는 실제 효소 접촉 부위의 기질농도이므로 속도 (v)와 입자의 표면적, 그

Table 2. Comparison of the [S]_s, [v] and effectiveness factor of CHITA 35-Gase and CHITN 35-Gase according to the different flow rate and reactor, at optimum condition (A : pH 5.0, 50 °C, N : pH 5.0, 70 °C)

*	Flow rate (ml/min)	.	[S] _s	[v]	η_e	η_i	η	Released glucose ($\times 10^4$ M/L)	
			($\times 10^4$ M/L)	($\times 10^2$ M/min)	(-)	(-)	(-)		
ø 4.0	0.4	A	9.987	1.227	0.998	1	0.998	2.470	
		N	9.989	0.975	0.998	1	0.998	3.132	
	0.8	A	9.946	2.368	0.992	1	0.992	2.426	
		N	9.977	2.032	0.996	1	0.996	3.143	
	1.2	A	9.904	3.637	0.985	1	0.985	1.839	
		N	9.963	3.134	0.990	1	0.990	2.894	
	1.6	A	9.894	4.235	0.978	1	0.978	1.532	
		N	9.926	4.025	0.983	1	0.983	2.765	
	ø 6.5	0.4	A	9.981	1.313	0.998	1	0.998	2.207
			N	9.996	0.626	0.999	1	0.999	3.148
0.8		A	9.956	2.572	0.995	1	0.995	2.094	
		N	9.989	1.538	0.997	1	0.997	3.225	
1.2		A	9.919	4.115	0.991	1	0.991	1.435	
		N	9.980	2.732	0.993	1	0.993	3.048	
1.6		A	9.976	5.735	0.988	1	0.988	1.167	
		N	9.974	3.492	0.989	1	0.989	2.986	
ø 7.5		0.4	A	9.986	1.259	1	1	1	2.391
			N	9.996	0.640	1	1	1	3.236
	0.8	A	9.969	2.264	0.996	1	0.996	2.533	
		N	9.982	1.683	0.998	1	0.998	3.332	
	1.2	A	9.939	3.789	0.996	1	0.996	1.889	
		N	9.963	2.935	0.999	1	0.999	3.107	
	1.6	A	9.916	4.824	0.991	1	0.991	1.718	
		N	9.952	3.923	0.995	1	0.995	2.980	
	ø 8.5	0.4	A	9.983	1.391	0.996	1	0.996	2.418
			N	9.996	0.668	1	1	1	3.247
0.8		A	9.958	2.722	0.994	1	0.994	2.495	
		N	9.983	1.882	0.997	1	0.997	3.342	
1.2		A	9.926	4.166	0.991	1	0.991	2.500	
		N	9.962	2.769	0.994	1	0.994	3.169	
1.6		A	9.884	5.902	0.988	1	0.988	1.718	
		N	9.901	4.534	0.991	1	0.991	2.892	

*Diameter of reactor (mm)

**Enzymes : A ; CHITA 35-Gase, N ; CHITN 35-Gase

리고 물질 전달 계수에 의해서 결정되어 진다.

Table 2에 나타난 바와 같이 CHITN 35-Gase의 (S)s가 CHITA 35-Gase보다 약간 높은 것으로 나타났고, 유속증가에 따라 미소한 감소 현상을 보였다.

반응기의 직경에 따른 (S)s의 농도 변화는 거의 없었으나, 각 효소별 (S)s의 최고 농도는 유속이 작은 0.4ml/min에서 CHITA 35-Gase가 직경 7.5mm반응기에서 9.986×10^{-5} M/L를, CHITN35-Gase가 직경 6.5 mm 반응기에서 9.996×10^{-5} M/L를 보여 주므로 이에 따른 효소의 효율인자는 두 지지체 모두 η_e 는 0.99 이상을, η_i 는 모두 1을 나타내었다.

CHITN 35-Gase가 CHITA 35-Gase보다 (S)s가 큰 것은 CHITA 35-Gase의 입자 표면적보다 CHITN 35-Gase 입자의 표면적이 큰 것에 기인된다고 생각되었다.

요 약

CHITN에 diazotization 반응으로 $-NH_2$ 기를 diazo화한 후 glutaraldehyde와 효소 용액을 가하여 CHITN 35-Gase의 고정화 효소를 만들었다. 이를 CHITA 35-Gase와 함께 반응기의 직경이 $\phi 4$, $\phi 6.5$, 7.5 및 $\phi 8.5$ mm의 반응기에 유속 0.4, 0.8, 1.2 및 1.6 ml/min으로, pH 3.0~8.0까지 pH 1.0 간격으로, 온도는 10°C간격으로 40~80°C까지 각각의 조합으로 반응시켜 최적 온도, 최적 pH, 반응 속도 상수, 물질 전달 계수, 내부(η_i) 및 외부 효율 인자(η_e) 상호관계를 규명하였다. 반응기에 따른 고정화 효소의 활성은 반응기의 직경이나 높이를 변화시켜 활성을 크게 증가시킬 수 없었으나 포도당 생산을 극대화시키는 최적 유속이 존재하였다. 최적 온도는 CHITA 35-Gase의 최적 온도는 50°C였고, CHITN 35-Gase는 70°C이었으며 최적 pH는 모두 pH 5.0이었다. 용액으로부터 고정화 효소에 이동 되어지는 기질의 물질 전달 저항 현상은 유속증가에 따라 물질 전달 계수는 커지는 경향을 나타내었으나, 반응기의 직경이 증가함에 따라 감소되는 경향을 보였다. 물질 전달 계수는 입자 표면적(S_a)과 공극율(ϵ), 반응기의 부피 및 유속에 영향을 받으며 유속이 증가됨에 따라 고정화 효소 주위의 전달 액막이 유속에 의하여 얇아지므로 flux가 크게 되기 때문에 물질 전달 계수가 증가되는 것으로 생각되었다. 또한 입자 표면적(S_a)과 공극

율(ϵ)은 커지고 반응기 부피는 작아져야 물질 전달 계수(h)가 커지며, 이에 따라 공극율이 큰 CHITA 35-Gase($\epsilon:0.875$)의 물질전달 계수가 CHITN 35-Gase($\epsilon:0.850$)의 것보다 큰 것으로 나타났다. K_m' 치는 물질 전달 계수가 작을수록 크고, V_{max}' 치는 물질 전달 계수가 클수록 크게 나타났으며, 입자 반경이 작고 유속이 클수록 크게 나타났었다. 내부 효율 인자(η_i)로써 미소환경에서 기질의 전환 속도, 고정화 효소와 기질 사이의 물질 전달의 정도를 알 수 있었으며, 이는 효소 접촉 부위의 농도 [(S)s, K_m' , V_{max}' , (v), surface area 등에 지배되고, CHITN 35-Gase의 (S)s가 CHITA 35-Gase보다 크게 나타났으며, 두 효소는 모두 1이었다. 외부 효율 인자(η_e)로부터 거시적 환경에서의 물질 전달 상태, 지지체의 입자와 용매 사이의 상대적인 속도를 알 수 있었고, 이는 물질 전달 계수에 의해 지배되며, CHITA 35-Gase, CHITN 35-Gase 모두 0.99 이상으로써 Chitin이 지지체로서의 적합성을 보였다. CHITN 35-Gase 및 CHITA 35-Gase의 반응기별 최고의 활성은 직경 8.5mm 반응기의 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, pH, 온도, 물질 전달 계수, 유속, 효율인자 등의 인자에 의하여 활성의 차이를 보였고, 식품 가공 후의 폐기물인 chitin은 화학적 처리에 따라 고정화 효소의 좋은 지지체가 될 수 있음을 보였다.

문 헌

1. Sakaguchi, T., Horikochi, T. and Nakajima, A. : Adsorption of heavy metal ions by chitin and chitosan phosphate. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **53**, 149(1979)
2. Knorr, D. : Use of chitinous polymer in food. *Food Tech.*, **38**, 85(1984)
3. 平野茂博 : キチン, キトサン の 科 學. 高 分 子 加 工, **35**, 28(1986)
4. Levin, Y., Pechet, M., Goldstein, L. and Katchalski, E. : A water-insoluble polyanionic derivative of Trypsin. I. preparation and properties. *Biochemistry*, **3**, 1905(1964)
5. Stanley, W. L., Watters, G. G., Chan, B. and Mercer, J. M. : Lactose and other enzyme bound to chitin with glutaraldehyde. *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 315(1975)

6. Jitendra, D. D., Ray, R. and Desai, A. : Immobilization of β -glucosidase from *Scytalidium lignicola* on chitosan. *J. Ferment. Technol.*, **64**, 255 (1986)
7. Synowieck, J., Sikorski, Z. E. and Naczka, M. : The activity of immobilized enzymes on different Krill chitin preparations. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2211 (1981)
8. Kurita, K., Sannan, T. and Iwakura, Y. : Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamin by hetero and homogeneous hydrolysis. *Makromol. Chem.*, **178**, 3197 (1977)
9. Hisamatsu, M. and Yamada, T. : Partially deacetylated chitin as an acid-stable support for enzyme immobilization. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 219 (1989)
10. Goldstein, L. : Methods in Enzymology (Mosbach, K. ed.). Academic Press, Vol. 44 (1976)
11. Bailey, J. E. and Ollis, D. F. : *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill, p. 452 (1977)
12. Culsser, E. L. : *Mass transfer in fluid system*. Cambridge Univ. Press, p. 185 (1984)
13. Welty, J. R. and Wicks, C. E. and Wilson, E. R. : *Fundamentals of momentum, heat and mass transfer*. John Wiley & Sons, p. 492 (1984)
14. Engasser, J. M. : A fast evaluation of diffusion effects on bound enzyme activity. *Bioph. Acta.*, **526** (1978)
15. Goldstein, L., Levin, Y. and Katchalski, E. : A water-insoluble polycationic derivative of trypsin. II. Effect of the polyelectrolyte carrier on the kinetic behavior of the bound trypsin. *Biochemistry*, **3**, 1913 (1964)
16. Lee, S. B., Kim, S. M. and Dewey, D. Y. : Effect of external diffusion and design geometry on the performance of immobilized glucose isomerase reactor system. *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2023 (1979)
17. 이경희, 김종덕, 김병우, 송승구 : 修飾 Chitin에 固定 β -glucosidase의 動特性. 한국생물공학회지, **5**(3), 279 (1990)
18. Rehm, H-J. and Reed, G. : Biotechnology (volume editor : Kennedy, J. F.), VCH, Vol. 7a, p. 349 (1987)
19. Goldstein, L. and Katchalski, E. : Immobilized Enzyme. -A Survey In "*Applied Biochemistry and Bioengineering*", Wingard, L. B., Katchalski, E. and Goldstein, L. (eds.), Academic Press, Vol. 1, p. 1 (1976)
20. Lee, S. B. and Dewey, D. Y. : New method of determining kinetic constants for immobilized enzymes in a packed-bed reactor system. *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1499 (1979)
21. Engasser, J. M. and Horvath, C. : Inhibition of bound enzyme. III. Diffusion enhanced regulatory effect with substrate inhibition. *Biochemistry*, **13**, 3855 (1974)
22. Goldstein, L. : Microenvironmental effect on enzymatic catalysis. A kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin. *Biochemistry*, **2**, 4072 (1972)
23. Stephanopoulos, G. and Fredrickson, A. G. : New method of determining kinetic constants for immobilized enzymes in a packed-bed reactor system. *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1499 (1976)
24. Bahi, O. P. and Agrawal, K. M. L. : Glycosidase of *Phaseolus vulgaris*. I. Isolation and characterization of β -N-acetylglucosaminidase. *J. Biol. Chem.*, **243**, 98 (1968)

(1991년 5월 13일 접수)