

## 고정화 전화당 효소에 의한 메틸 프룩토시드의 합성

허 주 형 · 김 해 성  
명지대학교 공과대학 화학공학과

### Enzymatic Synthesis of Methyl Fructoside by Immobilized Invertase

Joo Hyung Heo and Hae Sung Kim

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Myoung Ji University,  
Seoul 120-178, Korea

#### ABSTRACT

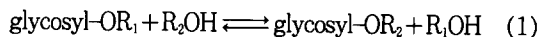
Methyl fructoside was synthesized from sucrose and methanol using an immobilized invertase. The enzyme was covalently bound by glutaraldehyde on porous silica coated with polyethyleneimine to give loading capacity of 120mg of invertase per one gram of dry porous silica and effective activity of 100 U per one milligram of bound invertase. Polyethyleneimine coating imparted a hydrophilic character, good activity retention and high loading capacity to the surface of porous silica as well as hydrophilic microenvironment in the vicinity of bound invertase. The immobilized enzyme was formed into an alginate-enclosed silica bead to have enough activity for methyl fructoside synthesis from aqueous methanol-sucrose solution. Using the alginate-enclosed biocatalyst the yield of methyl fructoside was obtained as high as 55.9% from aqueous 30%(v/v) methanol and 0.291mol/l sucrose with 2U/ml activity at 25°C, pH 4.8.

#### 서 론

메틸 프룩토시드를 포함한 배당체(glycoside)는 당단백질과 당지질을 합성하기 위한 당공여체(glycosyl donor)로서, 진단시약, 면역물질, 친화성 흡착질, 생체계면 활성제 등의 합성연구와 함께 의학, 약리학, 면역학 및 생리활성 물질과 신물질 개발분야에서 그 중요성이 날로 증대되고 있다(1). 배당체의 합성법은 화학적 합성법과 효소적 합성법으로 구분되는데, 화학적 합성법은 관능기의 보호(protection), 활성화(activation), 탈보호(deprotection)단계를 거치며 각 단계마다 분리·정제가 필요하지만, 효소적 합성법은 효소가 가지는 입체특이성(stereospecificity), 위치특이성(regiospecificity) 및 기질특이성(substrate specificity)을 활용하여 반응단계를

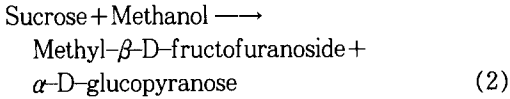
단순화할 수 있고 분리와 정제시의 비용을 줄일 수 있으므로 바람직한 합성법으로 평가되고 있다(2). 그러나, 효소적 합성법은 반응계에 존재하는 소수성 기질(hydrophobic substrate) 혹은 유기매체(organic media)로 인하여 효소가 쉽게 불활성화(deactivation)되거나 변성(denaturation)되므로 효소의 활성을 높게 유지하면서 재활용 할 수 있는 고정화 기술에 관한 연구를 필요로 하고 있다(3, 4).

일반적인 배당체의 합성반응은 당공여체인 glycosyl-OR<sub>1</sub>이 당수용체(glycosyl acceptor)인 R<sub>2</sub>OH와 글리코시드결합(glycosidic linkage)을 이루는 반응으로 다음과 같이 표시되며,

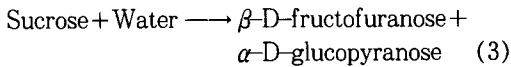


글리코시다제(glycosidase)계열의 효소를 이용하

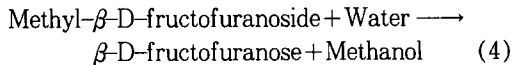
면 입체특이성과 위치특이성에 의하여 정해진 글리코시드 결합만이 이루어진다. glycosyl-OR, 이 당 혹은 배당체일 때 특별히 R<sub>2</sub>OH가 물이면 가수분해(hydrolysis), R<sub>2</sub>OH가 알코올이면 알코올분해(alcoholysis)라고 하는데, 자당수용액과 메탄올 수용액을 전화당효소와 함께 반응시키면 알코올분해반응



에 의하여 메틸 프루토시드(methyl fructoside)가 생성되면서 동시에 자당의 가수분해반응



이 일어난다(5). 또한, 메틸 프루토시드는 전화당효소의 기질로 작용하여 다음과 같이



가수분해되는데 메틸 프루토시드 분자가 효소의 활성점 부근에 접근하는 것을 방해한다면 이 반응은 억제시킬 수 있다. 즉, 전화당 효소를 강력한 친수성 표면 위에 고정화하면 자당, 물, 메탄올 분자들의 접근은 자유로우나 상대적으로 친수성이 약한 메틸 프루토시드의 가수분해반응은 억제될 것이다.

메틸 프루토시드를 합성하기 위한 바람직한 고정화 담체라면 강력한 친수성 표면특성을 가져야 하고 고정화 함량(loading capacity)과 활성 보존능(activity retention)은 크면서 반응물과 생성물의 세공 확산저항이 작도록 그 입경과 구조 특이성 속도론적 관점에서 조달되어야 한다. 이와 같이 요구되는 특성은 서로 상관성이 크면서 종종 상반되므로 활용성이 크고 실용적인 담체를 개발하는 데는 복잡한 장애요인이 되고 있으나, 김(6)에 의하여 개발된 다공성 실리카는 비표면적 330m<sup>2</sup>/g, 세공반경 0.5 $\mu$ m, 세공률 0.867, 세공체적 3.21cm<sup>3</sup>/g 및 평균입경 40~50 $\mu$ m로서 효소의 고정화에 적합한 구조적 특성을 가지고 있으므로 그 표면화학적 특성이 조절된다면 메틸 프루토시드의 합성반응에 유용한 고정화 담체가 될 것으로 판단되었다.

따라서, 본 연구에서는 메틸 프루토시드를 합성하기 위한 전화당 효소의 고정화 담체로서 다공성 실리카를 선택하고 표면처리제와 글루타르알데히드(glutaraldehyde)로 전화당 효소를 고정화시켜서 이

고정화 효소 촉매가 고정화 함량과 활성도 및 친수성의 관점에서 메틸 프루토시드의 합성에 유용한 효소 촉매임을 밝히고 효소법에 의한 배당체의 합성이 경제적이고 효율적인 연속생산공정으로 발전될 수 있도록 하였다.

## 재료 및 방법

### 전화당 효소의 고정화

전화당 효소를 고정화하기 위해서는 다공성 실리카 표면에 수용상 실란화(aqueous silanization), 유기상 실란화(organic silanization)(7) 및 폴리에틸렌이민 도포법(polyethyleneimine coating)(8)으로 아미노기를 도입하고 글루타르알데히드를 결합시켰다. 수용상 실란화에서는 pH 3~4로 조절된 10% 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane, Fluka)수용액 20ml와 다공성 실리카 100mg을 접촉시켜 75 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시킨 후 미반응 실란용액을 여과막(Whatman, 0.5 $\mu$ m, 47mm)으로 여과한 뒤, 증류수로 세정하여 잔류 실란용액을 제거하고 115 $^{\circ}$ C로 유지된 건조기에서 10시간 동안 건조하였다. 유기상 실란화에 의한 표면처리 방법은 다공성 실리카 100mg을 2% 3-아미노프로필트리에톡시실란-아세톤용액 20ml와 접촉시켜 45 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 반응시킨 후 여과막(Whatman, 0.5 $\mu$ m, 47mm)으로 여과하고 미반응 실란용액은 아세톤으로 세정 후 115 $^{\circ}$ C에서 건조하였다. 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, M. W. 40000~50000, 30% 수용액, Tokyo Kasei Kogyo)을 도포하기 위해서는 다공성 실리카 100mg를 0.1% 혹은 1% PEI-붕산염 완충액(borate buffer, pH 8.5) 10ml와 접촉시켜 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 표면처리한 후 여과막(Gelman, 0.2 $\mu$ m, 7mm)으로 여과한 뒤 붕산염 완충액(pH 8.5)으로 세정하였다.

표면처리한 실리카 100mg과 인산염 완충액(phosphate buffer, pH 7.0)으로 제조한 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde, 25% 수용액, Merck)수용액 10ml를 상온에서 2시간 동안 반응시켜 알데히드기가 결합되도록 하였다. 반응 후 여분의 글루타르알데히드 용액을 제거하기 위해 여과막(Gelman, 0.2 $\mu$ m, 47mm)으로 여과한 뒤 인산염 완충액(pH 7.0)으로 세정하였다. 이 다공성 실리카와 초산염 완충액(pH 4.8)에 농도가 4mg/ml가 되도록 용해된 전화당 효소( $\beta$ -D-fructofuranosidase, EC. 3.2.1.26, Fluka, 140.7U/mg)수용액 15ml를 4 $^{\circ}$ C로 3시

간 동안 접촉시킨 후, 고정화 전후의 효소수용액의 흡광도를 280nm에서 측정하여 고정화 함량을 산출하고, 여과막(Gelman, 0.2 $\mu$ m, 47mm)으로 세정하여 pH 4.8, 4 $^{\circ}$ C로 보관하였다.

고정화 촉매의 활성도는 pH 4.8, 농도 0.291mol/l의 자당수용액을 25 $^{\circ}$ C로 유지된 회분식 반응기에서 전화율이 1~2%가 되도록 반응시키고, DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)법(9)으로 측정된 총환원당(total reducing sugar) 농도로부터 초기속도를 결정하여 효소의 단위질량을 기준으로 한 U/mg( $\mu$ mol/min · mg)으로 나타내었다.

#### Alginate-enclosed biocatalyst 성형

pH 4.8, 1.2%(w/v) 알지네이트(sodium alginate, Junsei Chemical)-초산염 완충액 100ml에 고정화 효소촉매 200mg(건조한 실리카 기준)을 5 $^{\circ}$ C로 유지된 초음파 분산기에서 고르게 분산시키고 기포를 제거한 후 알지네이트-실리카 현탁액으로 일정한 크기의 액적을 성형하였다. 이 크기가 일정한 액적을 pH 4.8 초산염 완충액으로 조제한 0.1mol/l의 염화칼슘 수용액에서 2시간 동안 겔화하여 alginate-enclosed biocatalyst를 얻었다. 이와 같이 성형된 액적과 alginate-enclosed biocatalyst는 현미경으로 관측한 결과 완전한 구형으로 그 평균 입경은 각각 1.97mm, 1.49mm이었다.

#### Alginate-enclosed biocatalyst의 반응 특성 실험

alginate-enclosed biocatalyst의  $V_m$ ,  $K_m$ 값은 자당의 전화반응과 메틸 프룩토시드의 합성반응에 대하여 반응온도 25 $^{\circ}$ C, pH 4.8, 자당농도 범위 0.05mol/l ~ 0.291mol/l에서 평가하였으며, 전화반응은 수용상이지만, 메틸 프룩토시드의 합성반응은 30%(v/v) 메탄올 수용액에서 진행되었다. 회분식 반응기에서 전화율이 1~2%에 도달하면 시료 2ml를 채취하여 0.2mol/l의  $Na_2CO_3$  수용액 1ml로 반응을 정지시키고, DNS법으로 측정된 총환원당농도와 염료산화(dye oxidation)법(10)으로 측정된 포도당 농도로부터 초기 가수분해 속도와 초기 알코올 분해속도를 측정하였다. 이와 같은 방법으로 자당의 초기농도를 0.05mol/l에서 0.291mol/l 범위로 변화시키면서 초기속도를 측정하고 Lineweaver-Burk Plot한 다음에 그 절편과 기울기로부터 자당 수용액과 30% 메탄올 수용액에서의 최대속도상수와 Michaelis 상수를 결정하였다.

#### 메틸 프룩토시드의 합성

고정화 전화당 효소를 사용하여 자당(Sucrose, Ju-nsei Chemical)과 메탄올(Methanol, Carloerba)로부터 메틸 프룩토시드를 합성하고 반응계의 총환원당과 포도당 농도를 DNS(Sigma) 시약과 과산화효

소(Peroxidase, EC.1.11.1.7., Sigma, 10,000U/mg), 포도당 산화효소(Glucose Oxidase, EC.1.1.3.4, Sigma, 10,000U/mg) 및 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Sigma)로 발색시킨 후에 UV분광기(Uvikon 820)로 정량하였다.

반응조건은 자연효소(native enzyme)를 사용한 Selisko 등(11)의 연구결과를 검토하여 효소활성도 2U/ml, 메탄올 함량 30%(v/v), 자당의 초기농도 0.291mol/l, pH 4.8(acetate buffer), 온도 25 $^{\circ}$ C로 하였다. 시험관 반응기에서 앞서 나타낸 반응조건이 되도록 반응물 4ml와 alginate-enclosed biocatalyst 100~150개를 넣고 반응시키면서 1시간마다 순서대로 시험관 반응기에 0.2mol/l의  $Na_2CO_3$  수용액 2ml씩을 첨가하여 반응을 정지시켰다.  $Na_2CO_3$  수용액이 첨가되면 반응이 순간적으로 정지되고 서서히 알지네이트 겔층도 완전히 용해하므로 원심분리 후에 시료 채취가 용이하도록 하였다. 환원당의 총량은 시료 중 환원당의 농도가 0.2~2g/l 이 되도록 희석시킨 후 575nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선에 의하여 환원당의 총량을 구하였다. 포도당 농도는 포도당 산화효소와 과산화효소를 사용하는 염료 산화법(dye oxidation method)으로 정량하였다. 먼저 시료 중 포도당의 농도가 1~10nmol/l 이 되도록 희석시켜 0.2ml를 취한 후 2.1ml의 ABTS 용액을 첨가하고 0.1ml의 과산화효소 수용액을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 정지시킨 후 0.1ml의 포도당 산화효소수용액을 첨가하여 10분간 발색시키고 420nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선에 의하여 포도당의 농도를 정량하였다. 이와 같은 방법으로 1시간마다 11시간 동안 총환원당농도와 포도당 농도를 측정하고 메틸 프룩토시드, 과당 및 자당의 농도를 결정하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 고정화 효소의 함량과 활성도

자당과 메탄올 수용액으로부터 메틸 프룩토시드를 합성하기 위해서는 효소의 활성이 높게 유지되어야 하고 소수성 기질인 메탄올에 대하여 효소가 불활성

화 혹은 변성되지 않도록 표면처리된 고정화 담체를 필요로 한다. 이와 같은 관점에서 그 구조적 특성이 효소의 고정화에 적합한 다공성 실리카에 폴리에틸렌이민과 아미노프로필트리에톡시실란으로 표면처리하여 표면화학적 특성을 조절하고 전화당 효소의 고정화 함량(loading capacity)과 유효 활성도(effective activity)를 측정하여 Fig. 1에 나타내었는데, 고정화 함량은 1% PEI-실리카가 184mg/g으로 가장 크지만 유효 활성도는 0.1% PEI-실리카가 100U/mg으로 가장 높았다. 1% PEI-실리카의 고정화 함량은 가장 크지만 고정화 효소분자들이 서로 서로를 차폐하여 입체적 장애(steric hindrance)가 일어나서 유효 활성도가 감소하는 것으로 판단됨으로써 폴리에틸렌이민 수용액의 처리농도는 0.1%가 적당하였다.

Fig. 1은 고정화 담체에 글루타르알데히드로 전화당 효소를 가교시키고 그 고정화 함량과 유효 활성도를 고정화 담체와 표면처리제에 따라서 비교한 것으로 PEI-실리카 담체가 가장 바람직한 고정화 담체임을 알 수 있었다. 실란화 실리카는 PEI-실리카와 비교할 때에 고정화 함량은 비슷하지만, 효소의 활성은 실란화 표면보다는 폴리에틸렌이민 피막에서 훨씬 더 안정하였다. 폴리에틸렌이민은 다가 양이온성 아민류로서 음이온성 히드록시기를 함유한 실리카의 표면에 정전기적으로 결합을 하여 견고한 친수성 피막을 형성하는데(12), 이 친수성 피막은 실리카 표면이 전화당 효소와 직접적으로 접촉할 때에 문제가 되는 변성(denaturation)을 피하면서 전화

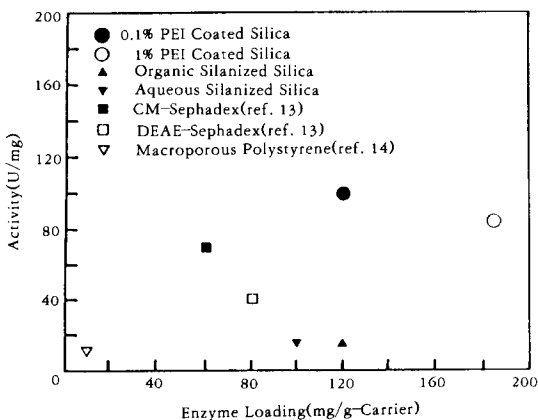


Fig. 1. Effective activity and loading capacity of immobilized invertase on different carriers.

당 효소의 활성점을 안정화시킴으로써 높은 유효 활성도를 나타낸 것으로 판단되었다. 그러나, 실란화 표면에서는 그 표면이 소수성이므로 폴리에틸렌이민과 같은 표면 화학적 처리효과를 기대할 수 없으므로 0.1% 폴리에틸렌이민 도포법에서의 유효 활성도가 100U/mg인 것에 비하여 현저히 낮은 15U/mg의 유효 활성도를 나타내었다. 대표적인 유기담체로서 천연고분자 담체인 DEAE-Sephadex, CM-Sephadex(13)와 합성고분자 담체인 macroporous polystyrene(14)과 비교해 본 결과, PEI-실리카의 고정화 함량 120mg/g과 유효 활성도 100U/mg으로 판단할 때에 PEI-실리카담체가 구조적 특성과 표면 화학적 관점에서 전화당 효소를 고정화하기 위한 가장 우수한 담체임을 알 수 있었다.

### Alginate-enclosed biocatalyst의 반응 특성

메틸 프룩토시드의 연속생산공정에서 사용될 고정화 효소층대는 고정상(fixed bed), 유동상(fluidized bed), 혼합상(mixed bed) 등의 입의 반응양식을 수용하면서 거품 혹은 부유물질이 존재하는 반응계에서도 특별한 여과장치 없이 반응계와 분리될 수 있으며, 고정화 효소가 세균과 곰팡이로부터 차폐되어 멸균시키지 않고도 무균조업이 가능하여야 한다. 위와 같은 기능을 구비하기 위해서는 gel-enclosed biocatalyst의 이점을 활용하는 것이 적절한 방안이라고 생각되었으므로 알지네이트층으로 둘러싼 고정화 전화당 효소를 제조하였다. 이 고정화 촉매가 메틸 프룩토시드의 합성반응에서 효소촉매로서 활용되기 위해서는 자당 수용액에서의 전화반응속도와 30% 메탄올 수용액에서의 가수분해 반응속도 및 알코올분해 반응속도에 관한 정량적인 지식을 필요로 하므로, 최대반응속도상수와 Michaelis상수로 표시되는 M-M(Michaelis-Menten) 속도식의 타당성을 검토하였다. 25°C, pH 4.8에서 자당수용액의 전화반응속도를 Lineweaver-Burk Plot하여 M-M속도식으로 나타낼 수 있으며  $V_m$ 과  $K_m$ 은 각각 71.3U/mg과 47.6mmol/l이었다. 자연효소의 Michaelis상수 30.5mmol/l와 PEI-실리카 촉매의 유효 활성도 100U/mg로 판단할 때 alginate-enclosed biocatalyst는 충분한 만큼의 효소활성을 유지한 것으로 나타났다. 자연효소의 Michaelis상수보다는 고정화 촉매의  $K_m$ 값이 다소 증가하여 자당에 대한 전화당 효소의 친화력이 감소하였지만 고정화 전화당 효소의 활성도가 71.3%나 유지되고 있으므로 메틸 프룩토시드의 합성에 필요로 하는 2U/ml의 효소활성을

연기 위한 비드의 체적 백분율(비드체적/반응물체적 × 100)은 약 5%로 낮은 수준이었다.

고정화 전화당 효소와 함께 자당과 메탄올 수용액이 반응하면 가수분해 반응속도  $r_H$ 와 알코올분해 반응속도는  $r_A$ 는 M-M식으로부터 다음과 같이

$$\frac{dF}{dt} = r_H = \frac{V_{m1} \cdot S}{K_{m1} + S} \quad (5)$$

$$\frac{dM}{dt} = r_A = \frac{V_{m2} \cdot S}{K_{m2} + S} \quad (6)$$

나타낼 수 있으며  $V_{m1}$ ,  $V_{m2}$ 는 최대반응속도,  $K_{m1}$ ,  $K_{m2}$ 는 Michaelis상수, S, F, M은 각각 자당, 과당, 메틸 프룩토시드의 몰농도이다. 따라서 초기속도법에 의하여 실험자료를 얻고 Lineweaver-Burk Plot 하여 매개변수  $V_{m1}$ ,  $V_{m2}$ ,  $K_{m1}$ ,  $K_{m2}$ 를 결정하였다.

Fig. 2는 30% 메탄올 수용액에서 전화당 효소에 의한 가수분해 반응속도와 알코올분해 반응속도를 Lineweaver-Burk plot한 것으로 각각의 매개변수  $V_{m1}$ ,  $K_{m1}$ 은 20.0U/mg, 97.8mmol/ℓ 이었다. 가수분해반응과 알코올분해반응은 서로 병렬반응으로 메틸 프룩토시드의 선택도를 높이기 위해서는  $r_H/r_A$ 을 감소시켜야 하며,  $r_H/r_A$ 을 감소시키기 위해서는 메탄올의 함량을 높이고 물의 활동도를 낮추어야 하는데 메탄올 함량이 40% 이상이 되면 효소가 쉽게 불활성화되어 최대반응속도상수가 현저히 감소하므로 현재의 메탄올 함량 30%가 적절한 것으로 생각된다(11). 30% 메탄올수용액으로부터 진행되는 가수분

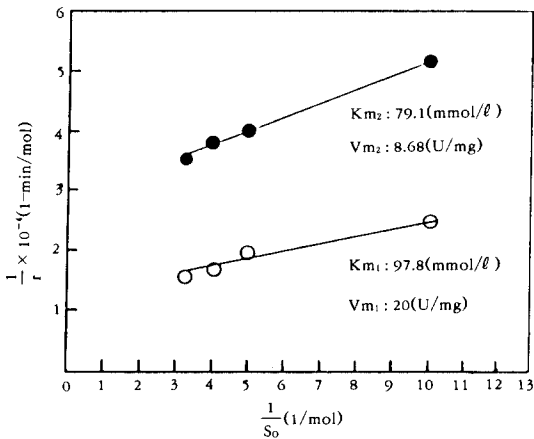


Fig. 2. Lineweaver-burk plot for sucrose hydrolysis(○) and alcoholysis(●) with 30%(v/v) MeOH at 25°C, pH 4.8.

해반응과 알코올분해반응은 M-M 속도식으로 표시될 수 있음을 입증하였고, 메틸 프룩토시드의 합성 반응계에서 시간의 변화에 따라서 각 성분의 농도를 예측할 수 있도록 반응속도식을 제시하였다.

### 메틸 프룩토시드의 합성

Fig. 3은 자당과 메탄올 수용액으로부터 고정화 전화당 효소를 이용하여 메틸 프룩토시드를 합성하면서 1시간마다 그 농도를 측정하고 폴리에틸렌이민 도포법과 수용상 실란화법에 의한 표면 화학적 효과를 비교한 것이다. PEI-실리카에 고정화된 전화당 효소를 이용한 메틸 프룩토시드의 합성반응은 효소활성도 2U/ml, 자당 초기농도 0.291mol/ℓ, 메탄올 함량 30%에서 시작되어 11시간 후에 전화율 91.2%에 도달하였으며, 그 최고수율과 농도는 각각 55.9%, 27.0g/ℓ 이었다. 수용상 실란화법으로 고정화된 전화당 효소를 이용한 경우에는 자당농도 0.291mol/ℓ, 메탄올 함량 30%일 때 그 전화율 64.7%, 수율 29.8%, 농도 21.9g/ℓ를 얻었으며, 고정화하지 않은 전화당효소(native enzyme)를 이용한 Selisko(11)의 경우에는 자당농도 0.438mol/ℓ, 메탄올 함량 30%일 때 그 전화율 62.2%, 수율 18.2%이었다. 이와 같은 연구결과로 판단할 때에 PEI-실리카에 고정화한 전화당 효소촉매는 메틸 프룩토시드의 합성반응에 효과적인 효소촉매임을 알 수 있으며, 본 연구에서 얻은 연구 결과를 scale-up하면 경제적이고 효율적인 생산방식으로 발전될 수 있을 것이다. 배당체를 효소법으로 합성하는 경우에는 높

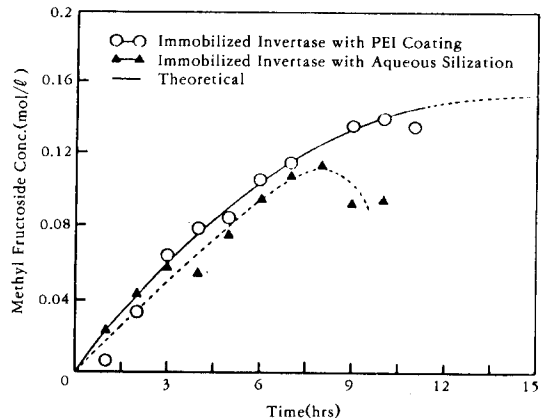


Fig. 3. The kinetics of methyl fructoside synthesis with 30%(v/v) MeOH, 2U/ml of activity at 25°C, pH 4.8.

은 효소의 활성이 요구되는데도 불구하고 소수성 기질에 의하여 효소의 활성이 저하되고 배당체의 수율을 높이기 위하여 고농도의 기질용액을 사용하여야 하였으나 고정화 함량과 활성도 및 친수성이 월등한 PEI-silica biocatalyst를 사용함으로써 위와 같은 문제점을 극복하였다. 다공성 실리카 표면에 도포된 폴리에틸렌이민은 교각을 이루면서 수많은 아미노기를 도입하였고, 안정성과 내구성이 우수하고 강력한 친수성 피막을 형성하였으므로, 고정화 함량과 활성도를 크게 증대시켰으며, 상대적으로 친수성이 약한 메틸 프룩토시드가 전화당 효소의 활성점에 접근하는 것을 억제하였다. 일반적으로 메틸 프룩토시드가 전화당효소의 활성점에 접근하는 것을 억제하기 위해서는 기질의 농도를 높게 유지하여 항상 기질과 효소가 활성 착화물을 이루게 하거나, molecular trap 혹은 제2상을 사용하여 메틸 프룩토시드를 반응계에서 분리시켰다(2). 그러나, 본 연구에서는 친수성이 강한 폴리에틸렌이민으로 표면처리하여 전화당 효소를 고정화시켜서 효소의 활성점 부근에는 메틸 프룩토시드보다 상대적으로 친수성이 강한 분자들이 모여들고 메틸 프룩토시드 분자들은 배척되기 때문에 Fig. 3에 나타난 바와 같이 메틸 프룩토시드가 효소의 기질로 작용하여 다시 가수분해되지 않으므로, 메틸 프룩토시드의 수율과 농도가 높게 얻어진 것으로 판단되며, 소수성 표면인 실란화 실리카의 경우에는 반응이 진행되면서 메틸 프룩토시드의 농도가 증가하였으나 그 최고농도 21.9g/l 에 도달한 후에는 다시 전화당 효소의 기질로 작용하여 메틸 프룩토시드 농도가 급격히 감소함을 보여주고 있으므로 실란화 실리카와 같은 소수성으로 표면처리된 담체에 고정화된 전화당 효소로는 효과적으로 메틸 프룩토시드를 합성할 수 없었다.

메틸 프룩토시드의 합성반응이 회분식 효소반응기에서 진행될 때 자당(S), 포도당(G), 과당(F) 및 메틸 프룩토시드(M)의 농도는 각각 다음과 같이 표시되므로

$$-\frac{dS}{dt} = r_H + r_A \quad (7)$$

$$\frac{dG}{dt} = -\frac{dS}{dt} \quad (8)$$

$$\frac{dF}{dt} = r_H \quad (9)$$

$$\frac{dM}{dt} = r_A \quad (10)$$

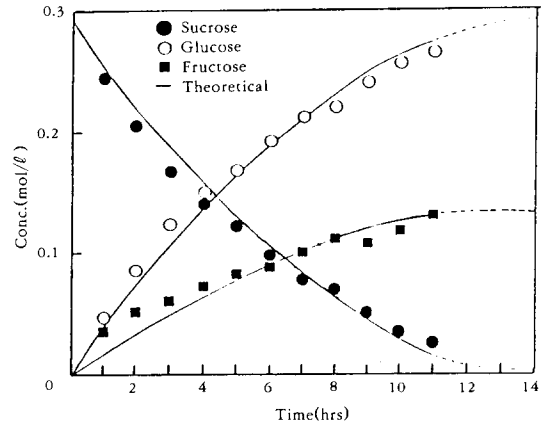


Fig. 4. The kinetics of sucrose conversion with 30%(v/v) MeOH 2U/ml of activity at 25°C, 4.8.

주어진 초기조건으로부터 수치적분하여 메틸 프룩토시드의 합성 반응계를 해석하였다. Fig. 4는 메틸 프룩토시드의 합성반응계에 대하여 각 성분의 농도를 시간별로 측정하고 평가된 매개변수 값을 갖는 M-M 속도식으로부터 이론치를 계산하여 서로 비교한 그림이다. 이 반응은 11시간이 지나자 91.2%의 전화율에 도달한 후에 서서히 진행되다가 약 14시간 이후에 완결되었지만 90%의 전화율을 기준으로 하면 10시간이 적절한 반응시간이라고 볼 수 있다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이 각 성분의 전 농도 범위에서 이론치와 실험치는 잘 일치하고 있으므로, 제시된 반응속도식은 메틸 프룩토시드의 연속 생산 공정에서도 고정화 효소반응기를 설계하는데 유용하게 활용될 것이다.

## 요 약

다공성 실리카표면에 폴리에틸렌이민과 글루타르알데히드로 전화당 효소를 고정화시키고 자당과 메탄올로부터 메틸 프룩토시드를 합성한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 다공성 실리카를 폴리에틸렌이민으로 표면처리하여 얻어진 고정화 담체는 그 다공성 구조와 표면화학적 특성이 효소의 고정화에 적합하여 전화당 효소에 대한 고정화 함량 120mg/g, 활성도 100U/mg을 얻어 배당체의 합성반응에서 필요로 하는 고정화 촉매를 제조할 수 있었으며 고정화 담체 표면에 형성된 폴리에틸렌이민 피막은 효소 부

근에 친수성 분위기를 유지하여 높은 효소활성을 나타내었고 메틸 프룩토시드가 효소에 접근하여 가수분해되는 반응을 억제하여 메틸 프룩토시드의 수율과 농도를 크게 증가시켰다. 자당과 메탄올 수용액으로부터 메틸 프룩토시드를 합성한 결과, 자당 농도 0.291mol/ℓ, 메탄올 농도 30%(v/v), 반응온도 25℃, pH 4.8, 효소활성도 2U/ml일 때 자당의 전화율 91.2%, 메틸 프룩토시드 농도 27.0g/ℓ, 그 평균수율 55.9%을 얻었으며, 위의 연구결과로부터 고정화 효소에 의한 배당체의 합성반응이 연속생산공정으로 연구개발 될 수 있을 것으로 기대된다.

### 감 사

본 연구는 1991년 특정기초연구과제의 연구비로 이루어졌으며 연구비를 제공해 주신 한국과학재단에 심심한 감사의 말씀을 드립니다.

### 참고문헌

1. K. G. I. Nilsson(1991), *Applied Biocatalysis*. (H. W. Blanch and D. S. Clark, eds), Vol. 1, P. 117, Marcel Dekker, N. Y.
2. K. G. I. Nilsson(1988), *TIBTECH*, **6**, 256.
3. J. S. Dordick(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 194.
4. V. Laroute and R. Willemot(1992), *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 528.
5. A. J. J. Straathof, J. P. Vrijenhoef, E. P. A. T. Sprangers, H. V. Bekkum and A. P. G. Kieboom(1988), *J. Carbohydr. Chem.*, **7**, 223.
6. 김해성(1989), *한국화학공학회지*, **27**(3), 299.
7. H. M. Weetall(1976), *Method in Enzymology*, **44**, 134.
8. R. Bahulekar, N. R. Ayyangar and S. Ponrathnam(1991), *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 858.
9. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
10. D. A. Harris(1987), *Spectrophotometry & Spectrofluometry* (D. A. Harris and C. L. Bashfold, eds), P. 69, IRL Press, Oxford.
11. B. Selisko, R. Ulibrich, A. Schellenberger and U. Müller(1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1006.
12. R. K. Iler(1979), *The Chemistry of Silica*, **394**, John Wiley & Sons. N. Y.
13. J. Woodward(1985), *Immobilised Cells and Enzymes*, (J. Woodward, ed) P. 5, IRL Press, Oxford.
14. J. Mansfeld and A. Schellenberger(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1006.