

Alginate-enclosed Microspheres를 이용한 배당체 합성에 관한 연구

김해성·김우식*

명지대학교 공과대학 화학공학과, *연세대학교 공과대학 화학공학과

A Study on Glycoside Synthesis Using Alginate-enclosed Microspheres

Hae Sung Kim and Woo Shik Kim*

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Myoung Ji University, Seoul 120-728, Korea

*Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

ABSTRACT

Latex microspheres of styrene/acryl copolymer with acrylamide functional group were used for the stable covalent immobilization of an enzyme applicable for enzymatic synthesis of glycoside. The latex microspheres were coated with polyethyleneimine to establish structural and functional properties relevant to the covalent immobilization with a high retention of activity. Polyethyleneimine-coated microspheres satisfactorily immobilized the invertase for methyl fructoside synthesis, and model reaction were formed into alginate-enclosed microspheres biocatalyst. Using the alginate-enclosed microspheres biocatalyst, the yield of model glycoside was obtained as high as 52.2% at concentration of aqueous 30 % (v/v) methanol and 0.291mol/l sucrose solution with 2U/ml of activity. The present study showed that the latex microspheres were successfully applied to enzymatic synthesis of glycoside.

서 론

당단백질(glycoprotein)과 당지질(glycolipid)로 이루어진 생리활성물질의 기능성은 당분자들이 결합된 올리고당(oligosaccharide)에 의하여 결정된다고 알려져 있으며, 항원-항체반응, 세포인식능력, 조직내에서의 투과속도, 세포분화 등의 생리작용 또한 glycosylation에 의하여 조절된다고 한다(1, 2). 따라서 생리활성이 있는 신물질들을 개발하거나 생리활성물질의 기능성을 조절하기 위해서는 배당체를 이용하여 올리고당을 결합시키거나 그 결합방식을 원하는 대로 조절하여야 한다. 이와 같이 올리고당을 합성하거나 당의 결합방식을 조절하기 위해서는 배당체를 필요로 하는데, 화학적인 합성법보다는 효소적인 합성법이 반응단계를 단순화할 수 있고, 분리

와 정제시의 비용을 줄일 수 있으므로 바람직한 합성법으로 평가되어 왔다(3).

배당체의 일반적인 효소적 합성법은 효소비용의 비중이 크고 배당체의 수율과 농도가 낮아서 연속생산공정으로 발전되지 못하고 연구수준에 머물러있다. 따라서 경제적이고 효율적인 연속생산 공정으로 발전하기 위해서는 효소의 고정화 기술을 확립하고 배당체의 수율과 농도를 높이는 방안이 제시되어야 한다. 배당체의 수율과 농도가 낮은 것은 배당체 합성반응의 근본적인 문제점으로서 기질의 농도를 높게 유지하거나, molecular trap 혹은 제2상(4)을 이용하여 배당체를 반응계와 분리시켜서 해결하고 있지만 효과적인 방안이 되지 못하고 있다. 따라서 배당체의 효소합성에 관한 문제점을 해결하기 위해서는 바람직한 표면화학적 특성을 구비한 고정화 담

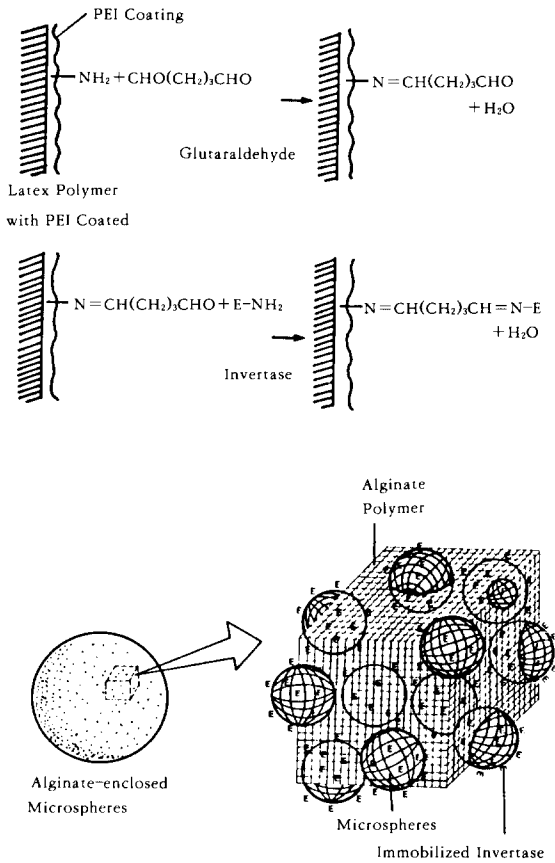


Fig.1. Schematic representation of covalent immobilization sequence(a) and conceptual diagram of alginate-enclosed microspheres(b).

체를 제조하고 그 표면에 활성점을 도입함으로써 반응특성이 우수한 고정화 촉매를 개발하고 배당체의 수율과 농도를 높이는 방안을 제시하여야 한다. 바람직한 고정화 담체라면 물리화학적 내구성과 안정성 및 변형에 대한 기계적 강도가 우수하여야 하며, 촉매활성의 고정화 함량(loading capacity)과 활성 보존능(activity retention)은 크면서 반응물과 생성물의 세공 확산저항이 작도록 그 입경과 구조 특성이 속도론적 관점에서 조절되어야 한다. 이와 같이 요구되는 특성은 서로 상관성이 크면서 종종 상반되므로 활용성이 크고 실용적인 담체를 개발하는데는 복합적인 장애요인이 되고 있으나, polystyrene

based microspheres(5)는 앞서 논의한 특성을 구비하고 있으므로 그 표면에 강력한 친수성 피막을 형성시켜서 표면화학적 특성을 조절한다면 배당체의 수율과 농도를 높일 수 있으므로 효소의 고정화 담체로서 이상적이라고 판단된다. 이와 같은 관점에서 입경 0.3 μm , 고형분 45wt%, pH 4~5, styrene/acryl ratio 55/45, acrylamide 함량 0.3wt%인 스티렌/아크릴 공중합체 라텍스(styrene/acryl copolymer latex)를 고정화 담체로서 선택하고 폴리에틸렌이민(poly-ethyleneimine)으로 표면 화학적 특성을 조절하고자 한다. 폴리에틸렌이민은 다가 양이온성 아민류이므로 음이온성 아크릴아마이드를 함유한 라텍스 입자의 표면과 정전기적으로 결합하여 견고한 친수성 피막을 형성한다. 이 친수성 피막은 효소의 활성을 안정화시키면서 친수성 기질이 효소에 접근하는 것을 쉽게 하지만 소수성 기질이 접근하는 것은 억제시킨다. 또한, 라텍스 입자에 도포된 폴리에틸렌이민은 교각(spacer arm)을 이루면서 수많은 아미노기를 도입하고, 화학적 안정성과 열안정성 및 내구성이 큰 피막이 되므로, 효소의 고정화에 합당한 표면화학적 특성을 준다(6). 스티렌/아크릴 라텍스 입자를 폴리에틸렌이민으로 표면처리하고 가교제인 글루타르알데히드로 원하는 효소와 가교시켜서 고정화 함량과 활성보존능은 크지만 세공 확산저항이 없으며, 배당체의 유기합성반응에 유리한 고정화 효소촉매가 되도록 한다. 이 라텍스 폴리머 입자에 고정화된 효소촉매는 입경이 마이크론 이하이므로 반응물과의 분리가 쉽지않고, 반응매질에 따라서 응집하며 고정상(fixed bed) 혹은 유동상(fluidized bed) 등의 반응양식을 수용할 수 없다는 문제점이 있다. 따라서 본 연구의 목적은 이와 같은 문제점을 해결하고 거품 혹은 부유물질이 존재하는 반응계에서도 특별한 여과장치 없이 반응계와 분리될 수 있으며, 고정화 효소촉매가 세균과 곰팡이로부터 차폐되어 멸균시키지 않고도 무균조업이 가능하도록 alginate-enclosed microspheres biocatalyst를 제조하고 이를 이용하여 가장 기본이 되는 배당체인 메틸 프룩토시드(methyl fructoside)를 합성함으로써 경제적이고 효과적인 효소법에 의한 연속 생산공정으로 개발함에 있다.

1. Sonic processor
2. Cooling coil
3. Test tube reactor
4. Microspheres suspension
5. Mesh tray

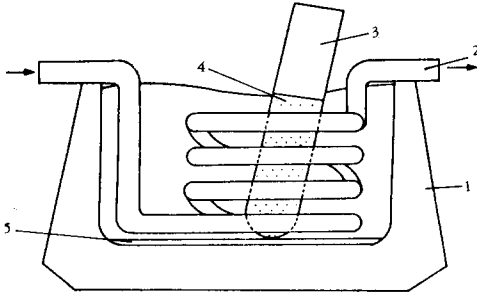


Fig. 2. Experimental apparatus of surface treatment for enzyme immobilization.

재료 및 방법

Microspheres에 의한 고정화

메틸 프루토시드를 합성하기 위해서는 전화당 효소를 고정화해야 하므로 스티렌/아크릴 공중합체 라텍스 폴리머(입경 $0.3\mu\text{m}$, 고형분 45wt%, pH 4~5, styrene/acryl ratio 55/45, acrylamide 함량 0.3wt%) 표면에 폴리에틸렌이민 도포법(polyethyleneimine coating) (7)으로 아미노기를 도입하고 글루타르알데히드를 결합시켰다. 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, M. W. 40000~50000, 30% 수용액, Tokyo Kasei Kogyo)을 도포하기 위해서는 라텍스 폴리머 현탁액 1ml(solid content : 45%)를 0.1% PEI-붕산염 완충액(borate buffer, pH 8.5) 9ml와 접촉시켜 25°C 에서 1시간 동안 Fig. 2의 장치에서 표면처리한 후 여과막(Gelman, $0.2\mu\text{m}$, 47mm)으로 여과한 뒤 붕산염 완충액(pH 8.5)으로 세정하였다.

표면처리한 라텍스 폴리머(PEI-microspheres) 450mg과 인산염 완충액(phosphate buffer, pH 7.0)으로 제조한 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde, 25% 수용액, Merck)수용액 10ml를 25°C 로 유지된 Fig. 2의 고정화 장치에서 2시간 동안 반응시켜 알데히드가 결합되도록 하였다. 반응 후 여분의 글루타르알데히드 용액을 제거하기 위해 여과막(Gelman, $0.2\mu\text{m}$, 47mm)으로 여과한 뒤 인산염 완충액(pH 7.0)으로 세정하였다. PEI-microspheres와 전화당 효소(β -D-fructofuranosidase, EC. 3.2.1.26, Fluka, 140.7U/mg)의 초산염 완충액(4mg/ml,

1. Thermometer
2. Tap
3. Water jacket
4. Magnetic stirrer
5. Magnetic bar
6. Baffle
7. Sampling needle

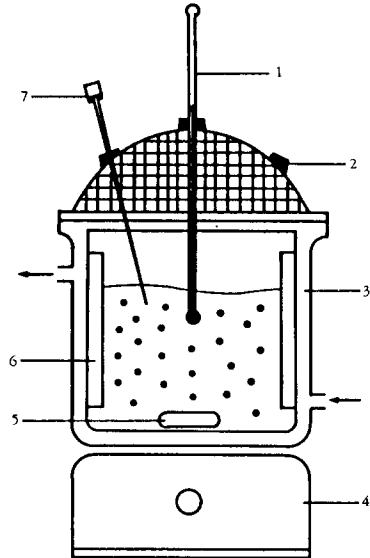


Fig. 3. Batch reactor for immobilized enzyme reaction.

pH 4.8) 15ml를 4°C 로 유지된 고정화 장치에서 3시간 동안 접촉시킨 후, 고정화 전후의 효소 수용액의 흡광도를 280nm에서 측정하여 고정화 함량을 산출하고, 여과막(Gelman, $0.2\mu\text{m}$, 47mm)으로 세정하여 pH 4.8, 4°C 로 보관하였다.

PEI-microspheres에 고정화된 전화당 효소의 유효활성도(effective activity)는 pH 4.8, 농도 $0.291\text{mol}/\ell$ 의 자당수용액을 25°C 로 유지된 Fig. 3의 회분식 반응기에서 전화율이 1~2%가 되도록 반응시키고, DNS(3, 5-dinitrosalicylic acid, Sigma)법(8)으로 측정된 총환원당(total reducing sugar) 농도로부터 초기 속도를 결정하여 microspheres의 단위질량을 기준으로 한 U/g($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$)으로 나타내었다. 상대 활성도(relative activity)는 25°C , pH 4.8, 자당농도 $0.291\text{mol}/\ell$ 일 때 자연효소(native enzyme)의 활성도에 대한 백분율로 나타내었다.

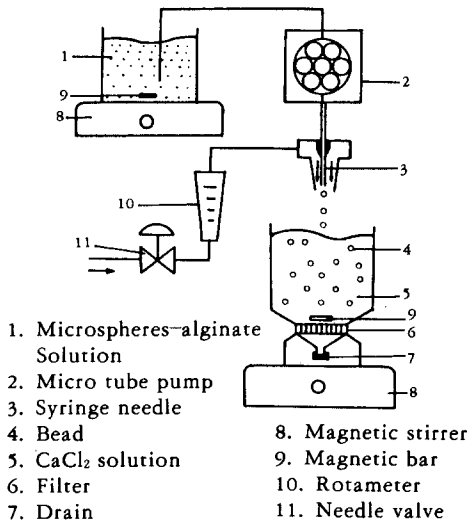


Fig. 4. Experimental apparatus for bead formation.

Alginate-enclosed microspheres성형

pH 4.8, 1.2% (w/v) 알지네이트(sodium alginate, Junsei Chemical)-초산염 완충액 100ml에 전화당 효소가 고정화된 라텍스 폴리머 450mg을 5°C로 유지한 초음파 분산기에서 고루게 분산시키고 기포를 제거한 후 알지네이트-라텍스 폴리머 현탁액을 얻고, Fig. 4의 장치에서 마이크로튜브 펌프를 이용하여 주사바늘로 급송시키면서, 공기의 유량을 조절하여 일정한 크기의 액적을 성형하였다. 크기가 일정한 액적을 pH 4.8의 초산염 완충액으로 조제한 0.1mol/l의 염화칼슘 수용액 속에서 2시간 동안 젤화하여 alginate-enclosed microspheres biocatalyst를 얻었다. 성형된 액적과 alginate-enclosed microspheres는 현미경으로 관측한 결과 완전한 구형으로 그 평균 입경은 각각 1.97mm, 1.49mm이었다.

Alginate-enclosed microspheres의 반응 특성

alginate-enclosed microspheres biocatalyst의 Vm, Km값은 자당의 전화반응과 메틸 프룩토시드의 합성반응을 반응온도 25°C, pH 4.8, 자당농도 범위 0.05mol/l ~ 0.291mol/l에서 평가하였으며, 전화반응은 수용상이지만, 메틸 프룩토시드의 합성반응은 30% (v/v) 메탄올 수용액에서 수행하였다. Fig. 3

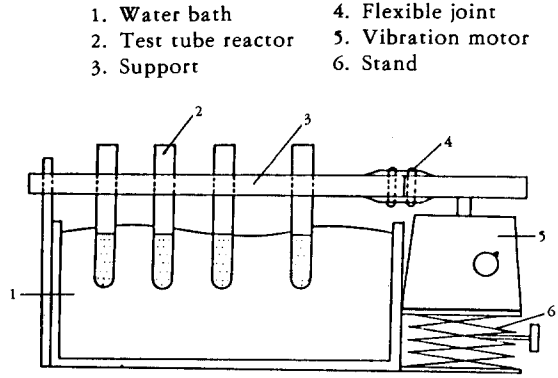


Fig. 5. Experimental reactor for methyl fructoside synthesis.

의 회분식 반응기에서 전화율이 1~2%에 도달하면 시료 2ml를 채취하여 0.2mol/l의 Na₂CO₃ 수용액 1ml로 반응을 정지시키고, DNS법으로 측정된 총환원당 농도와 염료산화(dye oxidation)법(9)으로 측정된 포도당 농도로부터 초기 가수분해속도와 초기 알코올 분해속도를 측정하였다. 이와 같은 방법으로 자당의 초기농도를 0.05mol/l에서 0.291mol/l 범위로 변화시키면서 초기속도를 측정하고 Line-weaver-Burk Plot과 Hanes-Woolf Plot를 이용하여 그 절편과 기울기로부터 자당수용액과 30% 메탄올 수용액에서의 Vm과 Km을 결정하였다.

메틸 프룩토시드의 합성

alginate-enclosed microspheres를 이용하여 자당(sucrose, Junsei Chemical)과 메탄올(methanol, Carloerba)로부터 메틸 프룩토시드를 합성하고 반응계의 총환원당과 포도당 농도를 DNS시약과 과산화효소(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 흡광도 575nm와 420nm에서 UV분광기(Uvikon 820)로 정량하였다.

반응조건은 자연효소를 사용한 Selisko 등 (10)의 연구결과를 검토하여 효소활성도 2U/ml, 메탄올 함량 30% (v/v), 자당의 초기농도 0.291mol/l, pH4.8(acetate buffer), 온도 25°C로 하였다. Fig. 5

에 도시한 시험관 반응기에서 앞서 나타난 반응조건이 되도록 반응물 4ml와 alginate-enclosed microsphere 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 시료채취가 용이하도록 하였다. 환원당의 총량은 시료중 환원당의 농도가 0.2~2g/l이 되도록 희석시킨 후 1ml를 취하고 DNS시약 3ml를 가하여, 5분간 100°C에서 중탕한 다음 수돗물로 냉각시킨 후 575nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선으로 환원당의 총량을 구하였다. 포도당 농도는 시료 중 포도당 농도가 1~10nmol/l이 되도록 희석시켜 0.2ml를 취한 후 2.1ml의 ABTS용액을 첨가하고 0.1ml의 과산화효소 수용액을 가하여 37°C에서 5분간 정치시킨 후 0.1ml의 포도당 산화효소수용액을 첨가하여 10분간 발색시키고 420nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선으로 그 농도를 정량하였다. 이와 같은 방법으로 매시간마다 14시간 동안 총환원당 농도와 포도당 농도를 측정하여 메틸 프루토시드, 과당 및 자당의 농도를 각각 결정하였다.

결과 및 고찰

PEI-microspheres에 의한 고정화

자당과 메탄올 수용액으로부터 메틸 프루토시드를 합성하기 위해서는 효소의 활성이 높게 유지되어야 하고 소수성기질인 메탄올에 대하여 효소가 불활성화 혹은 변성되지 않도록 표면처리된 고정화 담체를 필요로 한다. 이와 같은 관점에서 그 구조적 특성이 조절된 라텍스 폴리머에 폴리에틸렌이민으로 표면처리하여 표면 화학적 특성을 조절하고 전화당 효소의 유효활성도(effective activity)와 상대활성도(relative activity)를 측정한 결과 각각 6357 U/g-microspheres, 75.3%이었다. 스티렌/아크릴 라텍스 폴리머에 고정화된 전화당 효소의 고정화 특성을 대표적인 합성고분자 담체와 천연고분자 담체 및 무기담체 등의 경우와 비교해 보면 Table 1에 나타난 바와 같으며 PEI-microspheres가 가장 우수한 고정화 담체임을 알 수 있다. PEI-microspheres에 고정화된 전화당 효소의 고정화 특성이 우수한 것은 폴리에틸렌이민이 아미노기를 많이 가지고 있어서 글루타르알데히드의 표면밀도가 증가하므로 효소의 고정

Table 1. Immobilized characteristics of bound invertase on different carriers.

Carriers	Method of Binding	Activity of Native Enzyme	Effective Activity ^a (U/g carrier)	Relative Activity ^b (%)
Styrene/Acryl Latex Microspheres	Covalent Binding	140.7U/mg	6357	75.3
Porous Glass(11)	"	289U/mg	780~867	30
Macroporous Polystyrene(12)	"	300U/mg	505~1321	37.4~63.9
Microcrystalline Cellulose(13)	"	4000U/ml	550	46
Anion-Exchanger IRA-94(11)	Ionic Binding	289U/mg	520~825	75
Cation-Exchanger IRC-50(11)	"	289U/mg	249	83
DEAE-Sephadex(13)	"	4000U/ml	3280	41
CM-Sephadex(13)	"	4000U/ml	4200	70

^a Effective Activity = Activity of Immobilized Invertase × Loading

^b Relative Activity = (Activity of Immobilized Invertase / Activity of Native Invertase) × 100

화 함량을 높일 수 있고, 폴리에틸렌이민으로 이루어진 친수성 피막이 표면작용(surface interaction)에 의한 효소의 변성을 방지하면서 효소의 활성점 부근에 친수성 분위기를 유지하여 효소의 활성 보존능을 향상시켰기 때문으로 생각된다. 또한, 폴리에틸렌이민 피막은 300°C에서도 분해하지 않을 만큼 열안정성(6)이 좋으므로 스티렌/아크릴 폴리머의 내구성을 크게 향상시킨 것으로 판단된다. 따라서 스티렌/아크릴 라텍스 폴리머를 폴리에틸렌이민으로 표면처리하고 효소를 고정화하면 배당체의 합성반응에 가장 효용성이 큰 고정화 효소촉매를 얻을 수 있을 것으로 기대되었다.

Alginate-enclosed microspheres의 반응 특성

alginate-enclosed microspheres가 효소촉매로서 활용되기 위해서는 자당 수용액에서의 전화반응속도와 30% 메탄올 수용액에서의 가수분해 반응속도 및 알코올분해 반응속도에 관한 정량적인 지식을 필요로 하므로, 최대반응속도상수와 Michaelis상수로 표시되는 Michaelis-menten 속도식의 타당성을 검토하였다. Fig. 6은 25°C, pH 4.8에서 자당 수용액의

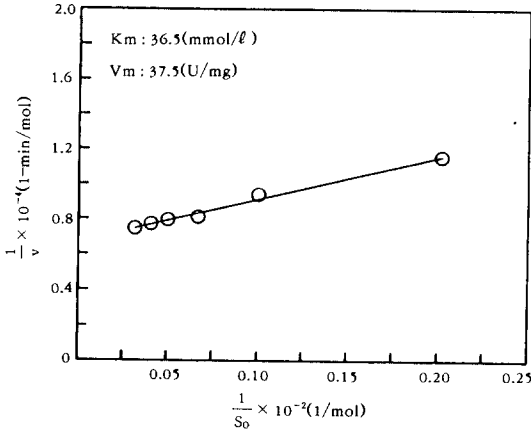


Fig. 6. Lineweaver-burk plot for sucrose hydrolysis at 25°C & pH 4.8.

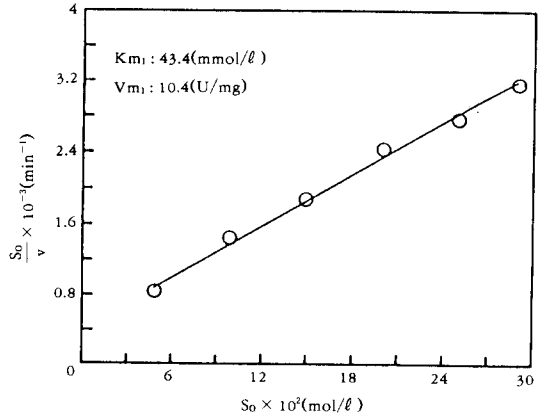


Fig. 7. Hanes-woolf plot for sucrose hydrolysis with 30% (v/v)MeOH at 25°C & pH 4.8.

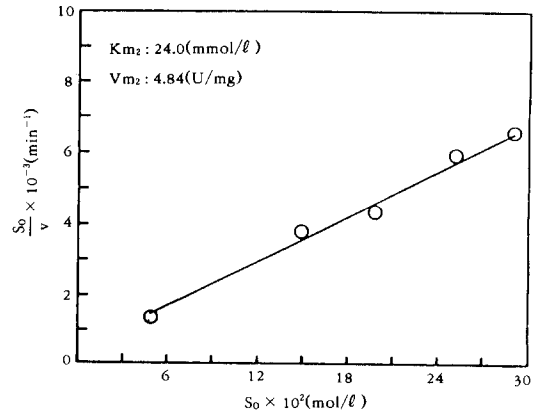


Fig. 8. Hanes-woolf plot for sucrose alcoholysis with 30% (v/v)MeOH at 25°C & pH 4.8.

전화반응속도를 Lineweaver-Burk plot로 구한 최대속도상수와 Michaelis상수는 각각 37.5U/mg과 36.5mmol/l이었다. 라텍스 폴리머 촉매의 유효활성도 106U/mg과 자연효소의 Michaelis상수 29.5mmol/l로 비교할 때 alginate-enclosed microsphere biocatalyst는 충분할 만큼의 효소활성을 유지한 것으로 나타났다. 자연효소의 Michaelis상수보다도 고정화촉매의 Km값이 다소 증가하여 자당에 대한 전화당 효소의 친화력이 감소하였지만 고정화 전화당 효소의 활성도가 35.4%나 유지되고 있으므로 메틸 프룩토시드의 합성시에 필요로 하는 2U/ml의 효소활성을 얻기 위한 bead의 체적 백분율 (bead 체적/반응물 체적×100)은 약 5%로 낮은 수준이었다.

기질인 자당이 물과 반응하면 가수분해(hydrolysis), 알코올과 반응하면 알코올분해(alcoholysis)라고 하는데, 자당 수용액과 메탄올수용액을 고정화 전화당 효소와 함께 반응시키면 알코올분해반응에 의하여 메틸 프룩토시드(methyl fructoside)가 생성되면서 동시에 자당의 가수분해반응이 일어난다(14, 15). 또한, 메틸 프룩토시드는 전화당 효소의 기질로 작용하여 다시 가수분해 되는데 메틸 프룩토시드 분자가 효소의 활성점 부근에 접근하는 것을 방해한다면 이 반응은 억제시킬 수 있다. 즉 전화당 효소를 강력한 친수성 표면 위에 고정화하면 자당, 물, 메탄

올 분자들의 접근은 자유로우나 상대적으로 친수성이 약한 메틸 프룩토시드 분자의 접근은 어렵게 되므로 메틸 프룩토시드의 가수분해반응은 억제될 것이다. 위의 반응 생성물인 메틸 프룩토시드의 가수분해반응이 억제되어 알코올분해반응만이 진행된다면 가수분해(1) 반응속도 r_H 와 알코올분해(2) 반응속도 r_A 는 M-M식으로 나타내면 다음과 같다.

$$\frac{dF}{dt} = r_H = \frac{V_{m1} \cdot S}{K_{m1} + S} \quad (1)$$

$$\frac{dM}{dt} = r_A = \frac{V_{m2} \cdot S}{K_{m2} + S} \quad (2)$$

V_{m1} , V_{m2} 는 최대반응속도, K_{m1} , K_{m2} 는 Michaelis 상수, S, F, M은 각각 자당, 과당, 메틸 프

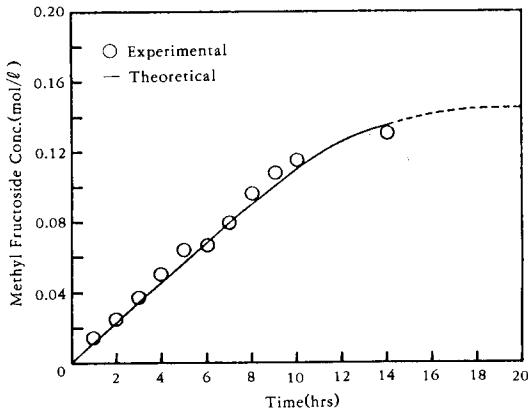


Fig. 9. The kinetics of methyl fructoside synthesis with 30%(v/v) MeOH, 2U/ml activity at 25°C & pH 4.8.

룩토시드의 몰농도이다. 따라서 초기속도법에 의하여 실험자료를 얻고 Hanes-Woolf Plot하여 매개변수 V_{m1} , V_{m2} , K_{m1} , K_{m2} 를 결정하였다.

Fig. 7, 8은 30% 메탄올 수용액에서 전화당 효소에 의한 가수분해 반응속도와 알코올분해 반응속도를 Hanes-Woolf Plot한 것으로 각각의 매개변수 V_{m1} , K_{m1} 은 10.4U/mg, 43.4mmol/l 이고 V_{m2} , K_{m2} 는 4.84U/mg, 24.0mmol/l 이었다. 가수분해 반응과 알코올분해반응은 서로 병렬반응으로 메틸 프룩토시드의 선택도를 높이기 위해서는 r_H/r_A 를 감소시켜야 하며, r_H/r_A 을 감소시키기 위해서는 메탄올의 함량을 높이고 물의 활동도를 낮추어야 하는데 메탄올 함량이 40% 이상이 되면 효소가 쉽게 불활성화되어 최대반응속도 상수가 현저히 감소하므로 현재의 메탄올 함량 30%가 적절한 것으로 생각된다. 30% 메탄올 수용액으로부터 진행되는 가수분해반응과 알코올분해반응은 M-M속도식으로 표시될 수 있음을 입증하였고, 메틸 프룩토시드의 합성반응계에서 시간의 변화에 따라서 각 성분의 농도를 예측할 수 있도록 반응속도식을 제시하였다.

메틸 프룩토시드의 합성

Fig. 9는 자당과 메탄올 수용액으로부터 메틸 프룩토시드를 합성하면서 매시간마다 그 농도를 측정하고 이론치와 비교한 것이다. 메틸 프룩토시드의 합성반응은 효소활성도 2U/ml, 자당 초기농도 0.291 mol/l, 메탄올 함량 30%에서 시작되어 14시간후에 전화율 93.1%에 도달하였으며, 그 최고수율과

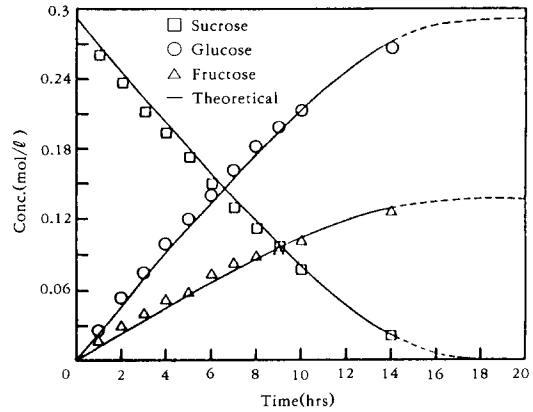


Fig. 10. The kinetics of various compounds with 30%(v/v) MeOH, 2U/ml activity at 25°C & pH 4.8.

(□: Sucrose, ○: Glucose, △: Fructose, —: Theoretical)

농도는 각각 52.2%, 25.2g/l 이었다. Selisko(10) 등은 고정화하지 않은 전화당 효소를 이용하여 자당 농도 0.438mol/l, 메탄올 함량 30%일 때 전화율 62.2%, 수율 18.2%의 연구결과를 얻었다. 배당체를 효소법으로 합성하는 경우에는 높은 효소의 활성이 요구되는데도 불구하고 소수성 기질에 의하여 효소의 활성이 저하되고 배당체의 수율을 높이기 위하여 고농도의 기질용액을 사용하여야 하였으나 고정화 함량과 활성도 및 친수성이 월등한 alginate-enclosed microspheres를 사용함으로써 위와 같은 문제점을 극복하였다. 라텍스 폴리머 표면에 도포된 폴리에틸렌이민은 교각을 이루면서 수많은 아미노기를 도입하였고, 안정성과 내구성이 우수하고 강력한 친수성피막을 형성하였으므로, 유효활성도와 상대활성도를 크게 증대시켰으며, 상대적으로 친수성이 약한 메틸 프룩토시드가 전화당 효소의 활성점에 접근하는 것을 억제하였다. 일반적으로 메틸 프룩토시드가 전화당 효소의 활성점에 접근하는 것을 억제하기 위해서는 기질의 농도를 높게 유지하여 항상 기질과 효소가 활성 착화물을 이루게 하거나, molecular trap 혹은 제2상(2)을 사용하여 메틸 프룩토시드를 반응계에서 분리시켜야만 하였다. 본 연구에서는 강력한 친수성 표면에 전화당 효소가 고정되어 있어서 효소의 활성점 부근에는 메틸 프룩토시드보다 상대적으로 친수성이 강한 분자들이 모여들고 메틸 프룩토시드 분자들은 배척되기 때문에 메틸 프룩토시

드가 효소의 기질로 작용하여 다시 가수분해 되지는 않으므로, 메틸 프룩토시드의 수율과 농도가 높게 얻어진 것으로 판단된다.

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

$$-\frac{dS}{dt} = r_H + r_A \quad (3)$$

$$\frac{dG}{dt} = -\frac{dS}{dt} \quad (4)$$

$$\frac{dF}{dt} = r_H \quad (5)$$

$$\frac{dM}{dt} = r_A \quad (6)$$

주어진 초기조건으로부터 수치적분하여 메틸 프룩토시드의 합성 반응계를 해석하였다. Fig. 10은 메틸 프룩토시드의 합성반응계에 대하여 각 성분의 농도를 시간별로 측정하고 평가된 매개변수값을 갖는 M-M속도식으로부터 이론치를 계산하여 서로 비교한 그림이다. 이 반응은 14시간이 지나자 93.1%의 전환율에 도달한 후에 서서히 진행되다가 약 18시간 이후에 완결되는데 13~14시간이 적절한 반응시간이라고 볼 수 있다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이 각 성분의 전 농도범위에서 이론치와 실험치는 잘 일치하고 있으므로, 제시된 반응속도식은 메틸 프룩토시드의 연속생산공정에서도 고정화 효소반응기를 설계하는데 유용하게 활용될 것이다.

요 약

스티렌/아크릴 라텍스 폴리머를 폴리에틸렌이민으로 표면처리하여 얻은 PEI-microspheres는 그 표면 화학적 특성이 효소의 고정화에 적합하여 배당체의 합성반응에서 필요로 하는 alginate-enclosed microspheres biocatalyst를 제조할 수 있었고 라텍스 폴리머 표면에 형성된 폴리에틸렌이민 피막은 효소 부근에 친수성 분위기를 유지하여 높은 효소활성을 나타내었을 뿐만 아니라, 생성된 배당체가 효소에 접근하여 가수분해되는 반응을 억제하여 배당체의 수율과 농도를 크게 증가시켰으므로 alginate-enclosed microspheres에 의한 배당체의 합성반응이 연속생산공정으로 연구개발 될 수 있다.

감 사

본 연구는 1992년 특정기초연구과제의 연구비로 이루어졌으며 연구비를 제공해 주신 한국과학재단에 심심한 감사의 말씀을 드립니다.

참고 문헌

1. R. J. Sturgeon(1988), *Carbohydrate Chemistry*, (J. F. Kennedy, ed), 263, Oxford Univ. Press, N. Y.
2. C. F. Goochee and T. Monica(1990), *Bio/Technol.*, **8**, 421.
3. K. G. I. Nilsson(1991), *Applied Biocatalysis*, (H. W. Blanch and D. S. Clark, eds), Vol, 1, 117. Marcel Dekker, N. Y.
4. K. G. I. Nilsson(1988), *TIBTECH*, **6**, 256.
5. A. Kondo, S. Oku and K. Higashitani(1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 537.
6. D. A. Tomalia and G. R. Killat(1985), *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, (H. F. Mark, N. M. Bikales, C. G. Overberger, G. Menges and J. I. Kroschwitz, eds), Vol. 1, 680, John Wiley & Sons, N. Y.
7. R. Bahulekar, N. R. Ayyangar and S. Ponrathnam(1991), *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 858.
8. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
9. D. A. Harris(1987), *Spectrophotometry & Spectrofluometry*, (D. A. Harris and C. L. Bashfold, eds), 69, IRL Press, Oxford.
10. B. Selisko, R. Ulibrich, A. Schellenberger and U. Müller(1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1006.
11. H. Uoshima, M. Sakimoto and Y. Harano (1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 2155.
12. J. Mansfeld and A. Schellenberger(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 72.
13. J. Woodward(1985), *Immobilised Cells and Enzymes*, (J. Woodward, ed) 5, IRL Press, Oxford.
14. 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.
15. E. V. Vulfson, R. Patel, J. E. Beecher, A. T. Andrews and B. A. Law(1990), *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 950.