

Chitin의 효소적 가수분해 특성에 대한 속도론적 연구

이 은 영 · † 김 광

동아대학교 화학공학과

(접수 : 1997. 8. 29., 게재승인 : 1997. 10. 1.)

Kinetics on the Specificity of Enzymatic Hydrolysis of Chitin

Eun-Young Lee and Kwang Kim†

Dept. of Chemical Engineering, Dong-A Univ., Pusan 604-714, Korea

(Received : 1997. 8. 29., Accepted : 1997. 10. 1.)

Hydrolysis and adsorption reversibility experiments were run for initial enzyme activity of 4.48, 9.65, 11.19 and 17.14U/mL at a temperature 30°C. The chitin particle size corresponded to a mean particle diameter of 0.127mm, and the initial concentration of chitin was 10mg/mL. After approximately 2hrs, the enzyme activity remained constant in a pseudo-steady state. The amounts in the bulk $[E]$ and the amounts of enzyme adsorbed on the chitin surface $[E']$ are plotted on Lineweaver-Burk plot to yield a linear relationship with a correlation coefficient of 0.99, a slope of 2.79cm^{-1} and an intercept of $0.08\text{cm}^2/\text{U}$. From this parameters, the values of $[E']$ and K_E were calculated to be $12.5\text{U}/\text{cm}^2$ and $34.88\text{U}/\text{mL}$, respectively. Adsorption isotherm of the enzyme on the particles showed a well developed plateau of 1.35×10^{-3} , 4.72×10^{-3} , 4.42×10^{-3} , $8.58 \times 10^{-3}\text{U}/\text{cm}^2$ at 30°C. To determine the specificity of chitinase for crystalline chitin, the free energy of adsorption was measured, and it was determined as about $-14.62 \sim -18.87\text{kJ}/\text{mol}$.

Key Words : crystalline chitin, chitinase, hydrolysis, Lineweaver-Burk plot, adsorption free energy

서 론

Chitin은 N-acetyl- β -D-glucosamine(NAG)이 β -1,4 결합한 직쇄상의 천연 고분자 중합체로서, cellulose와 같이 특이한 공간적 배열로 결정화된 다당류이다(1). 즉, 피라노오스환의 2위의 탄소에 cellulose에서는 OH기, chitin에서는 N-acetyl기, chitosan에서는 NH₂기가 각각 결합하여 있고, 그 외의 부분은 같은 구조이다. 그러나, 이들 기능기의 차이에 따라 분자용집 구조 혹은 결정구조가 각각 다르고, 또한 각각의 용해도 다르다. N-acetyl기에서 쉽게 NH₂기로 변환될 수 있으므로, chitin을 탈아세틸화 처리하면 chitosan을 얻을 수 있으며, chitin, chitosan은 피라노오스환의 C-2위에 N-acetyl기 및 NH₂기가 100% 결합되어 있는 것은 아니고 일반적으로는 혼재되어 있다. N-acetyl기 및 NH₂기가 100% 결합된 것은 각각 poly-1,4- β -N-acetylglucosamine과 poly-1,4- β -glucosamine이라는 화학명으로 불린다. 이에 따라, 보통 탈아세틸화도가 50% 이하인 것을 chitin이라 부르고, 50% 이상인 것을 chitosan이라고 한다. 따라서, chitin, chitosan은 N-acetyl기(또는 NH₂기)의 존재 비율

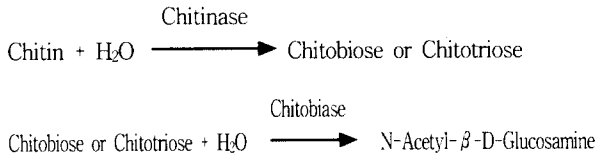
만 다른 동일한 다당이라고 말해도 좋은 천연 고분자이며, cellulose 결정이 화학처리에 의해 결정다형을 나타냄과 같이 chitosan의 결정도 시료 제조 방법에 따라 다양한 결정 형태를 나타낸다. 또한, 게, 새우, 원양 보리새우, 곤충 등의 절지 동물과 오징어의 뼈 등에서 추출한 chitin의 결정 구조에도 두, 세 가지 형태가 알려져 있다(2).

Chitin은 재생이 가능한 생물분해성의 중요한 천연 자원이며, 자연계에서 cellulose 다음으로 풍부하게 존재한다. 해양 무척추 동물, 곤충, 곰팡이, 조류 등에 다량 함유되어 있으며, 수산폐기물의 13-27%를 차지한다. 이전에는 고품수산폐기물을 해양투기, 소각, 땅에 묻는 등의 방법으로 처리하여 연간 $1.5 \times 10^8\text{kg}$ 에 달하는 chitin 또한 폐기처리 되었는데, chitin 분자내의 강한 결정구조로 인한 낮은 반응성 때문에 용도 개발이 활발히 진행되지 못한 때문이다(2-4).

최근 chitin이 포함된 고품의 수산폐기물을 건조시키고, 분쇄한 뒤, chitin 분해성 효소를 이용하여, chitin으로부터 yeast single-cell protein(SCP)을 생산하는 생물학적 변환 공정이 발표되었다. Chitin의 가수분해물인 NAG는 수용성으로서 SCP를 생산하기 위한 기질로서 사용된다(5-6). 뿐만 아니라, 케양성 대장염과 위염 질환의 치료제로서 높은 효능을 나타내며(7), 사료첨가제로서도 사용이 가능하다(8). Chitin을 완전히 가수분해하여 단당류인 NAG를 생성하기 위해서는, chitin 가수분해 효소들의 상호작용과 연속작용이 요구된다(9).

† Corresponding Author : 840 Hadan-dong, Saha-gu, Dept. of Chemical Engineering, Dong-A Univ., Pusan 604-714, Korea
Tel : (051) 200-6738, Fax : (051) 200-7728
E-mail : kkim@seunghak.donga.ac.kr

Endochitinase(poly- β -1 \rightarrow 4-(2-acetamido-2-deoxy)-D-glucoside glycanohydrolase; EC 3.2.1.14)는 삼당류 및 사당류를 포함하는 NAG의 중합체를 가수분해하며, chitobiase(β -D-N-acetylglucosaminidase; EC 3.2.1.30)는 이당류와 삼당류를 가수분해하여 NAG를 생성한다.



Chitinase는 달팽이, 콩씨, 곤충, 미생물 등의 다양한 유기체에서 발견된다(9-12). 이 효소의 가장 유용한 자원은 미생물로서(13-18), 미생물을 이용한 chitinase의 생성은 수산 폐기물 chitin을 처리하는 생물학적 전환 공정의 한 단계로서 주목을 받아왔다(5-6, 19-20). Chitin은 화학적으로 cellulose와 유사하기 때문에, chitinase system은 2단계의 가수분해 fraction, cellulase system은 3단계의 fraction으로 이루어져 있지만, 이 고분자들을 가수분해하는 효소 system은 활성면에서 비슷하다. 400가지의 chitin 가수분해 효소를 생성해내는 곰팡이와 미생물을 조사한 결과 *Serratia marcescens* QMB 1466은 가장 활성적인 chitinase를 생성했으며(10, 21), 다른 chitinase가 생산된 chitin만을 가수분해하는데 반해, *S. marcescens*의 chitinase는 "결정성" chitin을 가수분해 한다는 보고가 있다(22-23). 따라서, chitin의 물리·화학적 전 처리에 필요한 비용을 절감하는 것이 가능하다.

효소에 의한 가수분해의 경우에, 가용성 기질에 대한 가수분해 기구는 잘 알려져 있는 반면(24), 결정성 구조를 가진 기질의 가수분해에 대한 자료는 적은 편으로서, 불용성 기질에 대한 효소 반응은 고체 표면으로의 확산, 흡착, 가수분해, 탈착, 분리의 단계로 구성된다(25). 물질 전달 확산이 중요한 역할을 하는 생화학 공정을 이해하고 설계할 때, 율속단계에서의 분자 확산 계수는 생화학 현상을 특징짓는 무차원 변수이다. 불용성 기질의 효소적 가수분해, 혹은 단백질 기질을 포함하는 고정화된 효소 반응의 경우와 같은 단백질 물질 전달이 율속단계인 불균일 반응 공정에서 단백질 확산 계수의 측정이 필요하다(26). 또한, chitin 표면의 활성 부위에 대한 chitinase 흡착은 그 뒤에 일어나는 촉매반응에 있어서 필수적인 단계이다. 일반적으로 이러한 반응기구를 설명할 때는, 결정성 혹은 형태에 따른 기질의 특성과 효소의 특성, 그리고 촉매반응으로부터 흡착과정을 따로 구별해내는데 있어서의 어려움이 따른다. 따라서 본 논문에서는 *S. marcescens* QMB 1466 균주의 cell density의 변화에 의해 각기 다른 정도의 활성을 가진 chitinase를 이용하여 불용성 chitin과 수용성의 가수분해 염과 효소로 이루어진 불균일 계로 모델링하고, chitinase에 의한 chitin 가수분해에 대한 중요한 변수들을 계산함으로써 그 특성을 속도론적으로 고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

Canada British Columbia University의 Biotechnology Laboratory에서 분양 받은 *Serratia marcescens* QMB 1466을 30°C,

500mL 삼각 flask에서 배지량을 100mL로 하여 210rpm으로 희분 진탕 배양하였다. 배양 배지는 YEPD배지(Difco Co. Ltd)를 사용하였으며, 본 배양에서는 pH 8, 30°C에서 0.05% yeast extract, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.03% MgSO₄, 0.136% KH₂PO₄와 chitinase 생산을 위한 탄소원으로써 1.5% chitin을 첨가한 최소 무기물 배지를 사용하였다.

효소 생성

배양 배지에서 16시간 배양한 균주 배양액을 동일한 조성의 배지에 1% 접종하고, 균주의 재배양 시간에 따라 세포 밀도를 변화시켜 효소의 활성을 조절하기 위하여 배양시간을 각각 다르게 한 다음, 희분 발효를 위한 최소 무기물 배지에 1%를 접종하였다(27). 250rpm, 30°C에서 8일간 희분 발효 후, 원심 분리(8000rpm, 20분)하여 각각 활성이 다른 조효소를 얻었다.

기질제조

가수분해 실험에 사용한 결정성 chitin은 반정제한 chitin(Sigma Co., U.S.A.)을 ball-mill한 다음, 100mesh와 140mesh 사이로 체에 걸러서 평균 입자 직경이 0.127mm가 되게 하였다. Chitinase의 활성을 측정하기 위한 기질로서는, chitin에 아세톤을 가하고, 저어주면서 5~10배의 진한 염산을 천천히 가한 다음, 혼합물을 glass wool로 여과하여 에탄올에 부어서 침전시켜, 흰색 시럽형태의 colloidal chitin을 제조하였다(28).

가수분해 반응

미생물로부터 분리한 각각 다른 활성을 가진 조효소를 사용하여, 결정성 chitin 분말 1g을 삼각 flask내에서 효소량을 100mL로 한 다음 pH 6.6, 30°C에서 계속 교반시키면서 가수분해 반응을 진행하였다. Flask 부피는 시료 채취의 빈도와 크기에 기초하여 250mL로 하였으며, 1회 시료 채취량은 효소 분석을 반복하여 실행할 수 있도록 3mL로 하였다. 시료는 채취한 후, 즉시 원심 분리(7500rpm, 5분)하여 미 반응한 chitin 입자와 용액을 분리한 뒤 상층액을 분석하였다.

흡착가역성

가수분해 반응 완료 후 원심분리한 chitin 분말을 25°C에서 72시간동안 건조시킨 다음 정량하고, κ -phosphate 완충용액(pH 6.0) 1mL를 가하여 교반시키면서 2시간동안 효소를 탈착시켰다. 혼합물을 다시 원심분리한 다음, 탈착된 효소량 E_{ad} 를 측정하여 chitin 표면에 계속 흡착되어 있는 효소량 E_{ad} 를 구하고 흡착 가역성 $R_{\text{cv}}(\%)$ 를 계산하였으며, chitin에 비가역적으로 흡착된 효소량 E_{ir} 은 R_{cv} 로부터 구할 수 있었다.

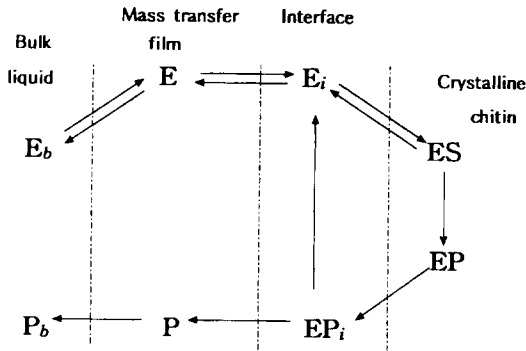
분석

Chitinase 활성은 Reissig등의 비색법에 따라 Micro Elisa Plate Reader(Bio Rad Co., U.S.A.)를 사용하여 측정하였다(29-30). 샘플링한 뒤 8000rpm에서 20분간 원심분리하여 chitin 분말과 미생물로부터 분리한 효소를 κ -phosphate 완충용액(pH 6.0)으로 희석한 용액과 colloidal chitin, κ -phosphate 완충용액을 effendorf tube에 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 원심분리(7500rpm, 5분)한 상층액을 분석하였다. 발색 시약으로는 K₂B₄O₇·4H₂O와 DMAB(p-dimethyl aminobenzaldehyde)를 사용하였으며,

540nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1단위는 37°C에서 1시간동안 NAG 1mg을 유리시킬수 있는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

Figure 1에 chitinase에 의한 chitin의 가수분해 반응 기구를 나타내었다. 그림에 나타난 것과 같이 이 반응은 chitin 표면으로 효소의 확산, 흡착-가수분해 반응, bulk 상으로 생성물이 이동하는 세 단계로 이루어지며, 각 단계에 대한 속도론적 분석을 하였다.



- $E_b \rightleftharpoons E$ Transport of the enzyme through a mass transfer film from the bulk fluid to the solid-liquid interface
- $E \rightleftharpoons E_i$ Adsorption of the chitinase at the interface
- $E_i \rightleftharpoons ES$ Formation of an enzyme-substrate complex [ES]
- $ES \rightarrow EP$ Formation of an enzyme-product complex [EP]
- $EP \rightleftharpoons EP_i$ Desorption of [EP]
- $EP_i \rightleftharpoons E_i$ Dissociation in the interface of [EP_i] into the enzyme [E]
- $P \rightleftharpoons P_b$ Transport of the product from the interface to the bulk phase

Figure 1. Enzyme transport-reaction schema.

효소의 확산- Interface mass transfer rate

고체 기질의 가수분해는 고체-액체 계면으로 효소가 확산되면서 시작된다. 가수분해 실험의 결과에 따르면, Figure 2에 나타난 바와 같이, 효소 확산에 관련되어 뚜렷이 구별되는 두가지 시간 간격이 존재한다. 첫번째는 효소가 chitin 표면에 흡착되고 가수분해 반응이 개시되는 비정상 상태 간격이며, 두번째는 bulk 내에서 효소 농도가 정상상태로 나타나는 간격이다. 흡착의 초기 단계인 비정상상태 간격에 대하여 chitin 표면으로의 효소 확산은 단일 물질 전달 계수 k_L 을 가지는 막이론으로 모델화 할 수 있으며, chitin 표면상에는 비가역적인 효소흡착이 빠르게 일어난다는 가정을 한다.

효소의 확산에 대한 연속방정식은 다음과 같다.

$$\frac{\partial E_b}{\partial t} = -\nabla \cdot N_E \tag{1}$$

여기서 N_E 는 효소의 molar flux이다.

Bulk 상은 잘 섞였다고 가정하고 액상의 부피에 대하여 적분하면,

$$\frac{dE_b}{dt} = -N_E|_s \cdot n \cdot a_s \tag{2}$$

여기서 n 은 molecular number density이며, $N_E|_s \cdot n$ 은 액의 단위 부피당 chitin 입자 표면에서의 평균 flux이고, a_s 는 단위부피당 chitin의 계면 면적으로서 다성분계에 대한 물질전달계수의 일반적인 정의를 이용하여 다음과 같이 나타낼 수 있다(31).

$$-N_E|_s \cdot n = k_L(E_b - E_i) \tag{3}$$

여기서 k_L 은 물질전달계수이다.

식(3)을 식(2)로 치환하면

$$\frac{dE_b}{dt} = -k_L \cdot a_s \cdot (E_b - E_i) \tag{4}$$

식(2)와 (3)에 대하여 $E_b \gg E_i$ 라 가정하면, 식(4)는 다음과 같이 된다.

$$\frac{dE_b}{dt} = -k_L \cdot a_s \cdot E_b \tag{5}$$

식(5)를 적분하면 다음과 같이 된다.

$$\ln \frac{E_b}{E_{b0}} = -k_L \cdot a_s \cdot t \tag{6}$$

여기서 E_{b0} 는 bulk에서의 초기 효소 농도이고, E_b 는 시간 t 에서의 효소 농도이다.

Table 1은 각각 다른 활성을 가진 chitinase에 의한 chitin의 가수분해 실험 결과를 나타낸 것으로서, 가수분해 반응 시간 경과에 따른 효소 활성의 변화를 기록한 것이다. 초기 활성이 17.14U/mL인 효소에 대한 자료를 Figure 2에 나타내었다.

Figure 2에서 반응시작 후에서부터 60분까지를 선형화하여 $k_L \cdot a_s$ 에 대한 값을 계산하면 $3.06 \times 10^{-4} s^{-1}$ 이다. 초기 활성이 4.48, 9.65, 11.19U/mL인 효소 용액에 대하여 이와 같이 계산하면 $k_L \cdot a_s$ 의

Table 1. Results of diffusion and hydrolysis of chitinase with various initial activities.

반응시간(분)	Enzyme activity (U/mL)			
0	4.48	9.65	11.19	17.14
5	3.37	4.35	9.47	9.92
10	3.42	2.04	7.82	7.94
15	3.26	2.00	6.99	7.90
30	3.26	0.59	6.54	6.29
60	3.76	2.00	5.50	5.69
90	3.39	0.12	5.34	4.12
120	3.05	3.37	4.98	4.55
180	2.05	4.00	4.99	4.55
240	1.99	3.43	4.93	4.78
300	1.92	3.60	4.74	4.64
360		2.78	4.75	4.65

(E_0 : initial enzyme activity, Initial chitin concentration : 10mg/mL
Mean diameter of chitin particle : 0.127mm, Hydrolysis temp. : 30°C)

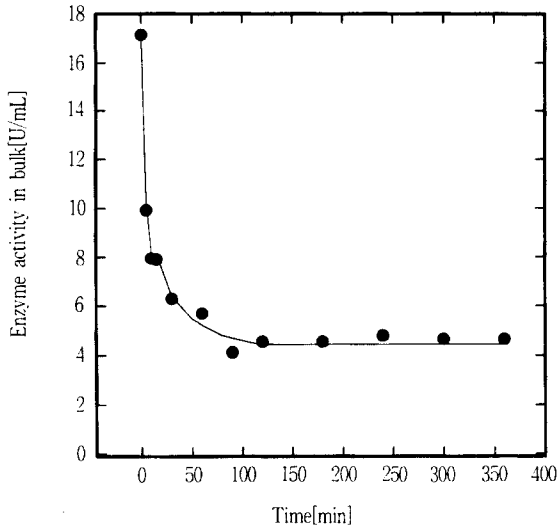


Figure 2. Variation of chitinase activity with time during diffusion and hydrolysis onto crystalline chitin. (Initial activity of chitinase : 17.14U/mL, Temp. : 30°C)

값은 각각 4.87×10^{-5} , 4.37×10^{-4} , $1.97 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이다. Chitin 입자가 구형이라고 가정하여, α_s 는 3.41 cm^{-1} 이라 하면 각각의 가수분해 실험에 대한 k_1 의 평균값은 $7.25 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 가 된다.

효소의 흡착

Chitinase system과 cellulase system이 그 활성 면에서 유사하다는 점을 이용하여, 결정성 chitin에 대한 chitinase의 흡착-가수분해 반응을 설명 할 수 있다. Lee와 Ooshima등(32-33)에 의하면, 고체 cellulose 기질에 대한 cellulase 흡착이 cellulose의 효소 가수분해에 있어서 주된 변수가 된다. 또한, Leloup등(25)은 효소의 흡착과 가수분해는 동시에 일어나며, 흡착은 가수분해 반응에 있어서 필수적인 단계라고 보고하였다. Converse등(34-35)은 cellulose 섬유상에 cellulase의 흡착이 감소하면, cellulose의 가수분해 속도가 느려지는 것을 발견하였다. 흡착시, 효소와 기질 결합부위 사이의 특정한 힘에 의해 효소-기질 복합체가 형성된다. Figure 3에 반응온도 30°C에서 결정성 chitin에 대한 chitinase의 흡착능을 나타내었다. 가수분해 실험 후, 원심분리한 효소 상층액의 활성 E_b 와 초기활성 E_{i0} 사이의 차이로부터, 단위 면적당 효소의 흡착능 $\Psi (\text{U/cm}^2)$ 를 다음과 같이 계산할 수 있다.

$$\Psi (\text{U/cm}^2) = \frac{(E_{i0} - E_b)}{(mA_s)} V \tag{7}$$

여기서, m 은 chitin 분말의 양(mg), A_s 는 chitin의 비표면적(cm^2/mg), V 는 상층액의 부피를 나타낸다. Chitinase 흡착은 2시간 후에, 정상상태에 도달하고, 10-15분 사이에 최대 흡착능의 50%에 도달하였다. 흡착의 이후 단계에서는, 표면에서 효소가 좀더 밀접하게 채워지면서 흡착된 층내에 구조적인 재배열이 일어난다는 보고가 있다(25). 2시간내에 chitin 상에 대한 효소의 흡착능은 최대가 되고, 이후 4시간동안 계속해서 정상상태가 유지되었다. 이 결과는 흡착된 효소와 흡착되지 않은 효소 간에 평형 상태가 유지되고 있음을 나타내는 것으로서, 6시간후의 총 흡착 능

은 효소의 초기 활성이 4.48, 9.65, 11.19, 17.14U/mL일 때, 각각 1.35×10^{-3} , 4.72×10^{-3} , 4.42×10^{-3} , $8.58 \times 10^{-3} \text{ U/cm}^2$ 로 계산되었다.

흡착 가역성 $R_{ev}(\%)$ 를 계산하였으며, chitin에 비가역적으로 흡착된 효소량 E_{ir} 은 R_{ev} 로부터 구할 수 있었다.

$$R_{ev}(\%) = \frac{E_{de} \cdot V}{(E_0 - E_{de}) \cdot V} \times 100 \tag{8}$$

여기서, V 는 완충용액의 부피(mL)이다.

$$E_{ir} = \frac{100 - R_{ev}}{100} E_{aa} \tag{9}$$

흡착가역성을 chitinase와 결정성 chitin이 반응한 초기 표면적의 함수, Ω 로서 나타내었다. Ω 는 다음과 같이 흡착 평형값 Ψ_{max} 에 의해 나타낼 수 있다.

$$\Omega(\%) = \frac{\Psi}{\Psi_{max}} \times 100 \tag{10}$$

여기서, Ψ 는 chitin의 단위 표면적당 흡착된 효소량이다.

흡착가역성 $R_{ev}(\%)$ 과 비가역적으로 흡착된 효소의 양 E_{irrev} 를 Ω 값의 범위가 37~100%일 때에 대하여 Figure 4에 나타내었다. R_{ev} 값이 44~80%로 계산되었는데 이는 효소와 기질 표면과의 반응이 일어나는 초기 표면적이 증가함에 따라 효소의 흡착 가역성이 증가함을 나타내는 것이다. 비가역적으로 흡착된 효소 활성 E_{irrev} 에 대한 값의 범위는 $16 \sim 199 \mu\text{g/cm}^2$ 으로 계산되었으며, chitin 표면에 균일하게 chitinase가 흡착되어 반응이 진행됨을 보여주는 것이다.

효소-생성물 이동

효소-생성물 복합체 EP의 이동을 설명하기 위해, shell mass-balance method와 Fick의 법칙(31)을 적용하였다. Chitin 입자는 반경 R 인 구형이라 가정한다. Figure 2에 나타낸 바와 같이 거의 2시간 후에 효소 활성은 일정하게 되었다. 이것은 흡

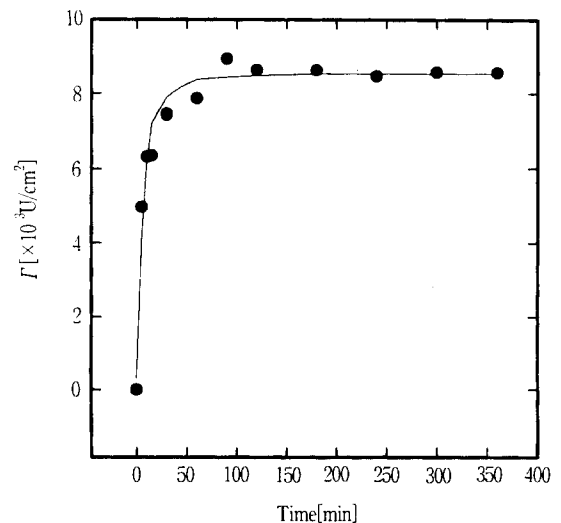


Figure 3. Kinetics of chitinase adsorption onto crystalline chitin.

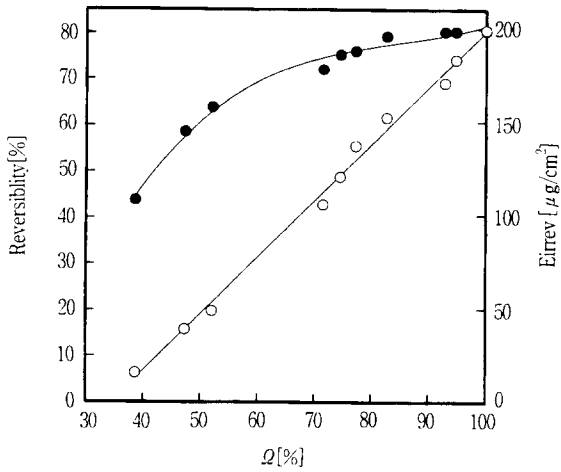


Figure 4. Adsorption reversibility of chitinase from crystalline chitin as a function of initial surface coverage(closed circle), amounts of irreversibly adsorbed enzyme(open circle).

착 표면 반응-탈착 주기내에서 정상 상태에 도달했다는 것을 나타내는 것으로서, 이 시간대에 초점을 맞추고 막 내에서 효소-생성물 복합체 EP의 농도 구배는 정상상태이며, 분리 반응은 일차 반응이고, 비가역적이라는 가정을 한다.

한 chitin 입자 내부에 두께 Δr인 구형 shell에 대한 물질 수지식을 세우면 다음과 같다.

$$N_{EP,r} |_{r+4\pi r^2} - N_{EP,r} |_{r-4\pi r^2} + R \cdot 4\pi r^2 \Delta r = 0 \tag{11}$$

여기서 $N_{EP,r} |_{r}$: Chitin의 중심으로부터 r방향으로 거리 r만큼 떨어진 chitin 표면을 통과하는 효소-생성물 복합체 EP의 몰수 $R \cdot 4\pi r^2 \Delta r$: 두께 Δr인 표면에서 가수분해 반응에 의하여 생성되는 EP의 몰 수이다.

식(11)을 $4\pi \Delta r$ 로 나누고 Δr의 극한을 취하면 다음과 같이 된다.

$$-D \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} (r^2 \frac{d[EP]}{dr}) = R \tag{12}$$

여기서 D는 확산도이다. a를 단위부피당 반응한 표면 면적이라 하면, $R = -k_r[EP]a$ 가 되어 다음과 같이 된다.

$$\therefore D \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} (r^2 \frac{d[EP]}{dr}) = k_r [EP] a \tag{13}$$

식 (13)은 다음과 같이 된다.

$$\frac{[EP]}{[EP]_i} = \frac{C_1}{r} \cosh \sqrt{\frac{k_r a}{D}} r + \frac{C_2}{r} \sinh \sqrt{\frac{k_r a}{D}} r \tag{14}$$

여기서, C₁, C₂는 적분상수이다.

식(14)를 다음과 같은 경계 조건에 의해 풀면,

chitin 표면, r=0 에서는 $[EP]=[EP]_i$ 이고

r=δ 에서 $[EP]=0$

$$[EP] = \frac{[EP]_i \sinh[\gamma(1-r/\delta)]}{\sinh \gamma} \tag{15}$$

여기서 $\gamma^2 = \frac{k_r \delta^2}{D}$, δ=막두께이다.

Chitinase의 분자량은 13,000~56,000의 범위에 있고(9) NAG의 분자량은 221.2이기 때문에 효소와 효소 생성물-복합체의 확산도는 같을 것으로 가정할 수 있다. 막두께 δ는 초기 속도 자료로부터 얻어진 k_L의 값으로부터 계산할 수 있다. 막 이론 질량 계수는 다음과 같이 주어진다.

$$k_L = \frac{D}{\delta} \tag{16}$$

δ에 대하여 풀기 위해 식(15)로 치환하면, 다음과 같다.

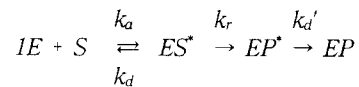
$$\gamma^2 = \frac{k_r D}{(k_L)^2} \tag{17}$$

Young과 공동 연구자들이 제안한 상관관계(26)를 이용하면 효소 복합체의 확산도는 $8.76 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ 로 계산된다.

Chitinase-NAG 복합체 EP의 분리에 대한 속도 상수를 계산하기 위해, 문헌으로부터 표본값(representative value)을 사용했다. Young등(26)에 의하면 몇가지의 효소 복합체에 대한 속도 상수값이 $1.4 \times 10^6 - 4.5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 의 범위내에 있다고 하였다(26). k_r에 대한 차수 10s⁻¹과 가수분해 실험에 의한 k_L에 대한 값 $7.25 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 를 이용하면, γ에 대한 최소값이 식(17)로부터 40.82로 계산된다. γ에 대한 값을 사용하여 식(15)를 풀면, EP의 농도는 막 두께의 11%되는 곳에서 초기 농도의 1.2%로 떨어진다. γ 값이 30이면, 막 두께의 15%인 곳에서 1.1%로 떨어진다. 따라서, 분리 반응은 기질-bulk상 사이의 계면에서만 일어난다고 할 수 있다.

효소반응 속도론

계면에서 일어나는 효소의 흡착(탈착)-가수분해-생성물 탈착은 다음과 같은 속도론 모델로 나타낼 수 있다(37).



여기서, k_a, k_a, k_r, k_d'는 각각 효소 흡착, 효소 탈착, 분리반응, 생성물 탈착에 대한 속도상수이다.

각 반응 단계에 대한 반응 속도식은 다음과 같다:

$$\text{효소의 흡착: } R_A = k_d[E]([E^*] - [ES^*] - [EP^*]) - k_a[ES^*] \tag{18}$$

여기서 $[E^*]$ 는 chitin 입자 상에 흡착될 수 있는 효소 분자의 최대 표면 농도를 나타낸다. 따라서, 괄호 안의 항은 반응하는 동안 활성화되는 표면 농도를 나타내는 것이다.

$$\text{표면에서 가수분해 반응의 속도: } R_{II} = k_r[ES^*] \tag{19}$$

여기서, k_r'' 는 가수분해 반응에 대한 속도상수이다.

$$\text{효소-생성물 복합체의 탈착 속도} : R_D = -k_d[EP^*] \quad (20)$$

준정상상태 가정하면, ES^* 복합체는 반응개시 후 즉시 E, S와 동적인 평형 관계에 도달한다. 즉 효소 흡착 속도, 반응 속도, 생성물의 탈착 속도는 같다. 이러한 가정하에, 생성물의 생성 속도는 식(19)와 (20)으로부터 다음과 같이 된다.

$$[EP^*] = \frac{k_r}{k_d'} [ES^*] \quad (21)$$

그리고, 효소의 총 농도는 효소-생성물 복합체 EP^* 와 효소-기질 복합체 ES^* 의 합이다.

$$[ES^*] + [EP^*] = k_r \left(\frac{1}{k_r''} + \frac{1}{k_d'} \right) [ES^*] \quad (22)$$

$[ES^*]$ 에 대하여 풀고, 식(22)로 치환하여 풀면

$$R_H = \frac{1}{k_r''} + \frac{1}{k_d'} \{ [ES^*] + [EP^*] \} \quad (23)$$

식(23)은 준정상 상태 동안에 흡착된 효소량의 향으로 chitin 가수분해 속도를 나타낸 것으로서, 가수분해 속도와 흡착된 효소 농도와의 관계를 선형화하는 것을 가능하게 한다.

준정상 상태일 때, bulk내 효소의 양과 흡착된 효소의 양과의 관계를 다음과 같이 식(22)와 (23)을 이용하여 나타낼 수 있다.

$$k_d[E]([E_T^*] - [ES^*] - [EP^*]) - k_d[ES^*] = k_d'[EP^*] \quad (24)$$

식(24)에서, 효소-이동론 부분에서 얻어진 결과들을 이용하여, 계면내의 효소의 농도 $[E]$ 를 bulk내에 효소의 농도 $[E]$ 로 치환한다.

식(22)~(24)를 이용하여 다음과 같은 결과를 이끌어낸다.

$$[ES^*] + [EP^*] = \frac{[E_T^*][E]}{\left(\frac{k_d'}{k_d} \right) \left[\frac{(k_r'' + k_d)}{(k_r'' + k_d')} \right] + [E]} \quad (25)$$

식(25)는 chitin 표면에 흡착된 효소의 농도와 bulk 상에 존재하는 효소의 농도와의 관계를 나타내는 Michaelis-Menten식의 형태이다. 식(24), (25)를 이용하여, chitin 가수분해 속도는 용액의 bulk 내에 존재하는 효소의 농도의 향으로 나타낼 수 있다.

$[E^*] = [ES^*] + [EP^*]$, $K_E = \frac{k_d'}{k_d} \frac{k_r'' + k_d}{k_r'' + k_d'}$ 라 하면, chitin 가수분해 속도와 bulk 내의 chitinase 향으로 흡착된 chitinase와의 관계를 Lineweaver-Burk plot에 의하여 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{1}{[E^*]} = \frac{K_E}{[E_T^*][E]} + \frac{1}{[E_T^*]} \quad (26)$$

초기 효소활성이 17.14U/mL일 때의 실험결과를 Fig. 2에 나타내었는데, 거의 2시간후에 효소 활성은 정상상태에 도달했으며, 이러한 결과는 다른 활성값을 가진 효소에 대한 가수분해 실험

에도 나타났다. 가수분해 실험을 한 flask 전체에 걸쳐서 효소 활성은 거의 일정하기 때문에, 초기 활성과 정상상태 시간대에 나타난 활성의 차이는 chitin 표면에 흡착된 효소의 양을 나타낸다. 이 차이를 입자표면 $\alpha_0 = 3.41 \text{cm}^{-1}$ 로 나누면 흡착된 효소 활성 $[E^*]$ 를 얻을 수 있다.

식(37)에 따르면, $[E]$ 와 $[E^*]$ 의 값은 Fig. 5에 이중 역비례로 도식화하였는데, 이 때, 상관계수는 0.99, 기울기는 2.79cm^{-1} 이며, 절편은 $0.08 \text{cm}^2/\text{U}$ 이다. 이 변수들로부터 $[E_T^*]$ 와 K_E 의 값은 각각 $12.5 \text{U}/\text{cm}^2$ 과 $34.88 \text{U}/\text{mL}$ 로 계산되었다.

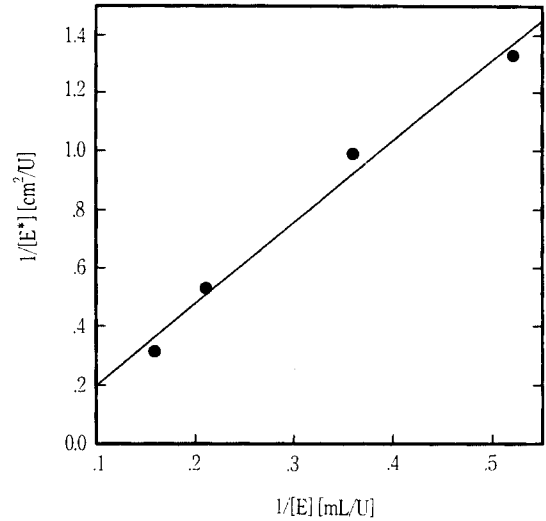


Figure 5. Lineweaver-Burk plot of concentration of adsorbed chitinase and concentration of chitinase in the bulk. (Slope : 2.79cm^{-1} , Intercept : $0.08 \text{cm}^2/\text{U}$, Correlation coefficient : 0.99)

흡착자유에너지

고체 기질에 대한 chitinase의 특성을 측정하려면 흡착 자유에너지를 구할 필요가 있다. 흡착 자유 에너지 변화는 단백질 흡착시의 에너지 변화인 $\Delta\mu$ 항과 사슬 형성시의 엔트로피 변화인 ΔS 의 두 가지 향으로 나눌 수 있으며, 이들은 흡착 과정을 제어한다. 효소는 격렬한 형태적 변화를 일으키지 않기 때문에 엔트로피 항은 무시할 수 있으며(25), 따라서 흡착 자유 에너지는 $\Delta\mu$ 항으로 압축된다. 고체-액체 계면에서의 단백질 흡착에 대한 많은 실험 결과에 따르면, 액상은 bulk 상, 두께가 1인 얇은 액층으로서 계면 표면에 존재하는 표면 상의 두 가지 분리된 상으로 고찰할 수 있다.

효소의 활성은 표면으로부터 거리의 함수로서 측정할 수 있으며, 표면에서와 bulk 상에서 활성은 bulk와 표면에 존재하는 분자들 간의 모든 인력으로부터 계산할 수 있다. 두 상간에 분자들의 화학 퍼텐셜이 평형이 되었을 때 평형 상태에 도달했다고 할 수 있으며, 화학 퍼텐셜은 bulk상에서 효소의 활성(E_b), 효소의 흡착능(Ψ)과 같은 측정 가능한 변수와 함수 관계를 이루고 있다. 흡착의 표준 자유 에너지 변화(ΔG)는 흡착 등온선으로부터 구할 수 있으며, 표준 자유 에너지는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (27)$$

여기서 K 는 평형 상수로서, 평형 상수는 Fig. 2, 3과 Table 1의

결과를 이용하여 다음 식으로부터 구할 수 있다.

$$K = \Psi / lE_b \tag{28}$$

여기서 Ψ 는 앞에서 설명한 바와 같이 단위면적당 효소의 흡착 농도(U/cm^2)이며, E_b 는 bulk 상의 효소 활성(U/cm^3)이고, l 은 고체 기질의 표면에 존재하는 얇은 액상의 두께(nm/U)로서 상 불연속성의 거리로 나타낼 수도 있다. Bulk 상의 효소 활성은 Figure 3에서 흡착 등온선이 평형에 도달했을 때의 활성으로부터 구할 수 있었으며, 거리 l 은 다음식으로부터 계산할 수 있었다.

$$l^{1/3} = Mw_{enzyme} / E_b N \tag{29}$$

여기서 Mw_{enzyme} 는 chitinase의 분자량으로서 13,000~56,000의 값을 가지며(9), N 은 아보가드로 수이다.

거리 l 은 초기 활성이 4.48, 9.65, 11.19, 17.14인 효소에 대하여 각각 1.79~2.91, 1.75~2.85, 1.57~2.56, 1.55~2.53nm/U로 계산되었다. 이에 대한 K 값은 각각 $1.23 \sim 2.00 \times 10^3$, $4.14 \sim 6.74 \times 10^3$, $3.14 \sim 5.12 \times 10^3$, $5.96 \sim 9.73 \times 10^3$ 으로 계산되며, 30°C에서 흡착 자유 에너지는 -14.62~-15.62, -17.11~-18.12, -16.54~-17.55, -17.86~-18.87kJ/mol로 계산된다. 이는 α -amylase가 수용성 전분을 가수분해 할 때의 흡착 자유 에너지 -30kJ/mol보다 훨씬 작고, 결정성 전분을 가수분해할 때의 흡착 자유 에너지 -20.7kJ/mol와 거의 비슷한 값으로서, α -amylase가 수용성 기질에서보다 고체 기질에 대하여 친화력이 작다는 것을 나타내는 것이다(25). 결정성 chitin 외에 colloidal chitin, 혹은 carboxymethyl chitin과 같은 수용성 chitin 을 기질로 사용하여 가수분해시의 흡착 자유 에너지를 구한다면 보다 큰 수치를 얻을 수 있을 것으로 고찰된다.

요 약

반응온도 30°C에서 초기 효소활성이 4.48, 9.65, 11.19, 17.14U/mL일 때 가수분해 반응과 흡착가역성에 대한 실험을 행하였다. Chitin 입자 크기는 평균 직경이 0.127mm가 되게 하였으며 초기 chitin 농도는 10mg/mL로 하였다. 약 2시간 후에, 효소 활성은 준-정상상태하에서 일정하게 유지되었으며, bulk상의 효소량 $[E]$ 와 흡착된 효소량 $[E^*]$ 를 Lineweaver-Burk plot으로 나타낸 결과, 상관계수 0.99, 기울기 $2.79cm^{-1}$, 절편은 $0.08cm^2/U$ 였으며, 이들 변수로부터 $[E^*]$ 와 K_E 의 값이 각각 $12.5U/cm^2$ 과 $34.88U/mL$ 로 계산되었다. 입자에 대한 효소의 흡착 등온선은 30°C에서 1.35×10^{-3} , 4.72×10^{-3} , 4.42×10^{-3} , $8.58 \times 10^{-3}U/cm^2$ 로 나타났다. 결정성 chitin에 대한 chitinase의 특성을 측정하기 위해, 흡착자유에너지를 측정하였는데, -14.62~-18.77KJ/mol로 계산되었다.

인 용 부 호

- a_s interface area of chitin per volume (cm^{-1})
- A_s specific surface area of chitin spherulites (cm^2/mg)
- D diffusivity
- E enzyme concentration (U/mL)
- EP enzyme-product complex

- ES enzyme-substrate complex
- G free energy of adsorption (kJ/mol)
- K equilibrium constant
- k_a rate constant for adsorption of enzyme
- k_d rate constant for desorption of enzyme
- k_d' rate constant for desorption of product
- k_L mass transfer coefficient
- k_r rate constant for dissociation reaction
- k_r'' rate constant for hydrolysis
- l thickness of the surface phase associated to the chitin spherulite (nm/U)
- m amount of chitin spherulites (mg)
- M_w the enzyme molecular weight
- N Avogadro's number
- n unit normal vector
- N_F molar flux of enzyme
- R_{ev} adsorption reversibility (%)
- R_A rate of adsorption
- R_H rate of hydrolysis
- t hydrolysis reaction time
- V volume of the supernatant (mL)
- Ψ amount of adsorbed enzyme per area (U/cm^2)
- Ω initial surface coverage (%)
- δ thickness of film

첨 자

- b in bulk phase
- i in interface
- 0 initial condition
- ev reversibility
- ir irreversibility
- ad adsorption
- de desorption
- $*$ adsorbed on chitin

참 고 문 헌

1. Muzzarelli, R. A. A. (1978), Chitin, 1st ed., p. 45, Pergamon Press, Oxford.
2. Sakurai, K. (1990), Chemical Reactivity of Chitin and Chitosan, *SEN-I GAKKAISHI*, 46(12), 553.
3. Tokura, S., N. Nishi, and J. Noguchi (1979), Studies on Chitin. III. Preparation of Chitin Fibers, *Polym J.*, 11(10), 781.
4. Kaifu, K., N. Nishi, T. Komai, S. Tokura, and O. Somorin (1981), Studies on Chitin. V. Formylation, Propionylation, and Butylation of Chitin, *Polym J.*, 13(3), 241.
5. Cosio, I. G., R. A. Fisher, and P. A. Carroad (1982), Bioconversion of Shellfish Chitin Waste Pretreatment, Enzyme Production, Process Design, and Economic Analysis, *J. Food Sci.*, 47, 901.
6. Carroad, P. A. and R. A. Tom (1978), Bioconversion of

- Shellfish Chitin Wastes: Process Conception and Selection of Microorganism, *J. Food Sci.* 43, 1158.
7. Satnley, J. F. (1977), "Method and Agent dor Treating Inflammatory Disorders of the Gastrointestinal Tract", United States Patent, 4,006,224.
 8. Asano, S. (1985), 海の幸のポリマー, ポリマーダイジェスト, 2, 10.
 9. Sakai, K., T. Uchiyama, Y. Matahira, and F. Nanjo (1991), Immobilization of Chitinolytic Enzymes and Continuous Production of N-Acetylglucosamine with the Immobilized Enzymes, *J. Ferment. Bioeng.*, 72(3), 168.
 10. Koga, D. (1990), Chitinolytic Enzymes, *SEN-I GAKAISHI*, 46(12), 581.
 11. Fuchs, R. L., S. A. Mcpherson, and D. J. Drahos (1986), Cloning of a *Serratia marcescens* Gene Encoding Chitinase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(3), 504.
 12. Joshi, S., M. Kozlowski, S. Richens, and D. M. Comberbach (1989), Chitinase and Chitobiase Production during Fermentation of Genetically Improved *Serratia liquefaciens*, *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 289.
 13. Vasseur, V., F. Arigoni, H. Andersen, G. Defago, G. Bornpeix, and J. M. Seng (1990), Isolation and Characterization of Aphanocladium album Chitinase-Overproducing Mutants, *J. Gen. Microbiol.*, 136, 2561.
 14. Sabby, S. A. (1992), Microbial Degradation of Shrimp-Shell Waste, *J. basic Microbiol.*, 12, 107.
 15. Ulhoa, C. J., and J. F. Peberdy (1992), Purification and Some Properties of the Extracellular Chitinase Produced by *Trichoderma harzianum*, *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 236.
 16. Despande, M. V. (1986), Enzymatic Degradation of Chitin Its Biological Applications, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 45, 277.
 17. Terayama, H., S. Takahashi, and H. Kuzuhara (1993), Large-Scale Preparation of N,N'-Diacetylchitobiose by Enzymatic Degradation of Chitin and Its Chemical Modifications, *J. Carbohydrate Chemistry*, 12(1), 82-83.
 18. Takiguchi, Y., and K. Shimahara (1989), N-アセチルキトオリゴ糖およびキトオリゴ糖の微生物による生産とその利用, *BIOINDUSTRY*, 6(8), 616.
 19. Tom, R. A. and P. A. Carroad (1981), Effect of Reaction Conditions on Hydrolysis of Chitin by *Serratia marcescens* QMB 1466 chitinase, *J. Food Science*, 46, 646.
 20. Moiseev, S. R. and P. A. Carroad (1981), Conversion of the Enzymatic Hydrolysis of Shellfish Waste Chitin to Single-Cell Protein, *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1067.
 21. Monreal, J. and E. T. Reese (1969), The chitinase of *Serratia marcescens*, *Can. J. Microbiol.*, 15, 689.
 22. Vyas, P., and M. V. Deshpande (1989), Chitinase Production by *Myrothecium verrucaria* and its Significance for Fungal Mycelia Degradation, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 35, 343.
 23. Reid, J. D. and D. M. Ogrzydziak (1981), Chitinase-Overproducing Mutant of *Serratia marcescens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(3), 664.
 24. Banks, W., and C. T. Greenwood (1977), Mathematics Models for the Action of Alpha-Amylase on Amylose, *Carbohydr. Res.* 57, 301.
 25. Leloup, V. M., P. Colonna, and S. G. Ring (1991), α -Amylase Adsorption on Starch Crystallites, *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 127.
 26. Young, M. E., P. A. Carroad, and R. L. Bell (1980), Estimation of Diffusion Coefficients of Proteins, *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 953.
 27. 이천우, 이은영, 장상목, 김광 (1996), Chitinolytic Enzyme을 이용한 N-acetyl- β -D-glucosamine의 최적생산, *한국생물공학회지*, 11(6), 696.
 28. Berger, L. R., and D. M. Reynolds (1958), The Chitinase System of a Strain of *Streptomyces griseus*. *Biochem et Biophys. Acta*, 29, 522.
 29. Reissig, J. L., J. L. Strominger, and L. F. Leloir (1955), A Modified Colorimetric Method for the Estimation of N-Acetylamine Sugars, *J. Biol. Chem.* 217, 959.
 30. Bradford, M. M. (1976), A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
 31. Bird, R. B., W. E. Stewart, and E. N. Lightfoot (1960), *Transport Phenomena*, 4th ed, p. 639, John Wiley & Sons Inc., New York.
 32. Lee, S. B., H. S. Shin, D. D. Y. Ryu, and M. Mandels (1982), Adsorption of Cellulase on Cellulose-Effect of Physicochemical Properties of Cellulase on Adsorption and Rate of Hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2137.
 33. Ooshima, H., D. S. Burns, and A. O. Converse (1990), Adsorption of Cellulase from *Trichoderma reesei* on Cellulose and Lignocellulosic Residue in Wood Pretreatment by Dilute Sulfuric with Explosive Decompression, *Biotechnol. Bioeng.* 36, 446.
 34. Converse, A. O., R. Matsuno, M. Tanaka, and M. Taniguchi (1988), A Model of Enzyme Adsorption and Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose with Slow Deacetylation of the Adsorbed Enzyme, *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 38.
 35. David, C., and R. Fornasier (1986), Utilization of Waste Cellulose. 7. Kinetic Study of the Enzymatic Hydrolysis of Spruce Wood Pretreated by Sodium Hypochlorite, *Macromolecules*. 19, 552.
 36. M. E. Young, and R. L. Bell (1985), Kinetics of Chitinase Production I. Chitin Hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 771.
 37. 김 광, 장상목, 윤태경, 이동환, 문병현, 선우양일, 박인호, 이상록 (1994), 생물반응공학, p. 143, 형설출판사, 서울