

Analysis of an Immobilized β -Galactosidase Reactor with Competitive Product Inhibition Kinetics

Byung Chul Kang*

Department of Chemical Engineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received September 9, 2013 / Revised December 12, 2013 / Accepted December 16, 2013

The present study deals with the immobilization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase on a weak ionic exchange resin (Duolite A568) as polymer support. β -Galactosidase was immobilized using the adsorption method. A kinetic study of the immobilized enzyme was performed in a packed-bed reactor. The adsorption of the enzyme followed a typical Freundlich adsorption isotherm. The adsorption parameters of k and n were 14.6 and 1.74, respectively. The initial rates method was used to characterize the kinetic parameters of the free and immobilized enzymes. The Michaelis-Menten constant (K_m) for the immobilized enzyme (120 mM) was higher than it was for the free enzyme (79 mM). The effect of competitive inhibition kinetics was studied by changing the concentration of galactose in a recycling packed-bed reactor. The kinetic model with competitive inhibition by galactose was best fitted to the experimental results with V_m , K_m , and K_i values of 46.3 mmolmin⁻¹mg⁻¹, 120 mM, and 24.4 mM, respectively. In a continuous packed-bed reactor, increasing the flow rate of the lactose solution decreased the conversion efficiency of lactose at different input lactose concentrations. Continuous operation of 11 days was conducted to investigate the stability of a long-term operation. The retained activity of the immobilized enzymes was 63% and the half-life of the immobilized enzyme was found to be 15 days.

Key words : Continuous operation, inhibition kinetics, lactose hydrolysis, packed-bed reactor

서 론

락토스(lactose) 가수분해 효소인 β -galactosidase는 생성물인 갈락토스(galactose)에 의해 다음과 같이 경쟁적 저해를 갖는 속도식을 따른다고 알려져 있다[12, 15, 16].

$$V = \frac{V_m[S]}{K_m \left(1 + \frac{P}{K_i} \right) + [S]}$$

여기서 V_m 은 최대 반응속도이고 K_m 은 효소와 기질 사이 해리도를 나타내는 Michaelis-Menten 상수이고 그리고 K_i 는 저해 상수를 나타낸다. 속도 상수를 결정하는 세 가지 방법이 있는데 첫째는 속도식을 적분하여 비선형 회귀로 속도상수를 구하는 방법이 있고[6, 8, 17, 29] 둘째로는 Ozdural 등이 제안한 실험 조건을 변경하면서 속도상수를 결정하는 방법이 있고 [23] 마지막으로 초기 속도를 측정하여 선형 회귀에 의한 속도 상수의 결정하는 방법이 있다[25].

이 중에서 속도식을 적분하여 비선형 회귀에 의한 속도상수를 결정하는 방법이 가장 널리 사용되었다. 이 방법은 효소반응을 진행하면서 반응물인 락토스나 생성물인 포도당을 시간에 따라 측정하고 이 결과로 얻어진 자료를 비선형회귀에 의해 상수를 결정하는 것이다. 한 번의 반응 실험으로 상수를 결정할 수 있지만 반응을 진행하는 전 과정에 걸쳐 기질 혹은 생산물의 농도가 정확하게 측정되어야 한다. Ozdural 등이 제안한 방법은 반응조건을 변경하면서 각각 다른 실험조건에서 속도상수를 독립적으로 구하는 것이다. 기질인 락토스의 농도를 높게 유지한 조건에서 속도식을 기질의 농도에 영향을 받지 않는 영차식으로 가정하고 V_m 를 구한다. 그런 다음 기질의 농도를 낮게 유지하여 일차속도식으로 가정하고 갈락토스 농도를 변화시키면서 겉보기 K_m 을 구한 다음 이것으로부터 K_i 를 구한다. 마지막으로 갈락토스가 없는 상태에서 낮은 기질 농도에서 K_m 을 구한다. 초기속도법은 기질의 농도에 따른 초기의 속도를 측정하여 기질 농도와 반응 속도의 관계에서 속도 상수 K_m 과 V_m 을 결정한다. 경쟁적 저해를 갖는 속도식에서 저해 물질을 첨가하여 이것으로부터 K_i 를 구한다. 이 방법은 여러 번의 실험을 통해 속도 상수를 구하지만 Lineweaver-Burk 플롯을 통해서 선형 회귀에 의해 구할 수 있는 장점이 있다.

고정화 효소는 제품의 분리 정제가 용이하고 연속 운전이 가능하기 때문에 효소에 의한 전환 공정에 널리 연구되었다[7, 21, 22, 24]. 고정화 방법으로는 효소와 담체 사이에 공유결합

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1702, Fax : +82-51-890-1694

E-mail : bckang@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

방법[3, 4], 담체에 효소를 물리적 흡착 방법[28], 그리고 효소를 알지네이트와 같은 고분자 매트릭스에 캡슐화하는 방법 등이 있다[9, 10]. 고정화 효소에 대한 반응기로는 충전층(packed bed) 반응기, 유동층 반응기 그리고 막(membrane) 반응기 등이 있다[11, 26, 27]. 이 중에서 충전층 반응기가 널리 사용되는데 고정화 효소에 대한 높은 전환율을 이룰 수 있으며, 반응기의 운전 비용이 저렴하고 그리고 연속 운전이 가능한 장점이 있다[13, 14]. 단점으로는 온도 조절이 어렵고 유체의 흐름의 불균형으로 인한 채널링 현상이 발생할 수 있다[5].

고정화 효소 반응의 속도상수를 결정하기 위하여 재순환 충전층 반응기 조업을 실시하는데 이것은 기질을 반응기로 공급하고 다시 회수하여 계속적으로 반응시키는 방법이다. 이 조업은 회분식과 같이 시간에 따라서 기질의 전환을 측정한다[20]. 재순환 충전층 반응기를 이용한 고정화 효소의 반응속도식의 매개변수를 측정하는데 이용되었다. 속도식의 측정에서 물질 전달 저항의 영향을 제거하기 위해 기질의 공급 및 재순환 유량을 높게 유지하여 반응기 내부에서 높은 선 속도(superficial velocity)를 유지한다[1, 18].

본 연구는 경쟁적 저해 속도식을 갖는 락토스 분해 효소를 Kang [13]에 의해 효소의 고정화에 우수한 능력을 보여 준 Duolite 담체에 효소를 고정화하고 그 특성을 평가하였다. 그리고 충전층 반응기에서 재순환 반응을 통해 초기 속도법에 의해 경쟁적 저해의 속도 상수를 결정하고자 하였다. 충전층 반응기 연속 운전을 통한 공급유량에 따른 정상 상태의 전환율과 장기조업에 의한 연속 운전을 실시하여 효소와 반응기의 안정성을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

효소 및 시약

효소 β -galactosidase를 물리적 흡착으로 고정화시키고 그 흡착 특성 고정화 담체로는 약 염기성 음이온 교환수지인 Duolite A568 (Rohm and Hass, Frankfurt, Germany)를 사용하였다. 이 담체는 비교적 균일한 미세기공을 가지며 평균 입자크기는 $375 \mu\text{m}$ 이고 매트릭스는 phenol formaldehyde 이다. 효소인 β -galactosidase (Sigma, St. Louis, U.S.A.)는 효모 *Kluyveromyces lactis*에서 유래된 것으로 사용하였다. 다른 모든 시약들도 1급 이상을 사용하였다

효소 고정화

효소 고정화는 담체 Duolite A568를 사용하여 충전층 반응기에서 넣고 흡착에 의한 방법으로 다음과 같이 실시하였다. 충전층 반응기는 원통형 유리관을 사용하였고 지름은 8 mm 그리고 높이는 75 mm로서 부피는 4.0 ml였다. 담체 0.5 g을 충전층 반응기에 넣고 증류수 500 ml를 연동펌프(peristaltic pump)로 1시간 동안 10 ml min^{-1} 의 유량으로 재순환

(recirculation)시키면서 담체를 세척하였다. 그 다음에 증류수 대신 인산 완충용액(50 mM, pH 7.0)을 사용하여 마찬가지로 방법으로 1시간 동안 세척을 실시하였다. 인산 완충용액에 적절히 희석된 0.2에서 $2.0 \text{ mg protein ml}^{-1}$ 의 효소 용액 20 ml를 연동펌프로 10 ml min^{-1} 의 유량으로 12시간 동안 재순환시키면서 효소 고정화를 실시하였다.

담체에 흡착되지 않은 효소를 제거하기 위해 인산완충용액 20 ml로 2회에 걸쳐 연동펌프로 1시간 동안 재순환으로 세척을 실시하였다. 담체에 흡착된 효소의 양은 초기에 투입된 효소의 양과 세척에 의해 상등액(supernatant)으로 빠진 효소의 양의 차이에 의해 결정하였다. 효소의 양은 단백질 측정에 의해 결정되었고 Lowry 방법을 사용하였다[19].

담체에 대한 효소 흡착 특성

담체에 고정화되는 효소의 흡착 특성을 관찰하기 위해 효소의 농도를 변화시키면서 Duolite A568에 고정화되는 효소의 양을 측정하였다. 대표적인 흡착 등온식은 Langmuir와 Freundlich 이 있는데 식은 각각 다음과 같이 표시된다.

$$\text{Langmuir isotherm: } Y = \frac{Y_{\max} C}{\theta + C}$$

$$\text{Freundlich isotherm: } Y = kC^{1/n}$$

여기서 Y는 담체에 고정화된 효소의 농도이고 C는 용액에 있는 효소의 농도이고 Y_{\max} , θ , k 그리고 n은 흡착 등온선의 특성을 나타내는 상수이다. 고정화 담체에 효소의 농도를 달리하면서 효소용액 20 ml를 투입하였고 고정화 효소의 양과 용액 속에 남아있는 효소의 양을 측정하여 흡착 등온선의 비교는 Excel의 Solver 기능을 사용하여 비선형회귀 방법으로 결정하였다.

효소의 활성 측정

효소의 활성은 기질로 ONPG를 사용하여 효소반응에 의해 발생된 o-nitrophenol의 발색에 의한 흡광법으로 결정하였다. 인산완충용액에 14 mM ONPG가 포함된 20 ml의 용액을 기질로 사용하여 고정화 효소의 경우 충전층 반응기에서 10 ml min^{-1} 으로 재순환하면서 5분 동안의 효소 반응을 통해 생성된 o-nitrophenol을 spectrophotometer로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 이것으로부터 활성을 측정하였다. 효소 활성 1 U는 $1 \text{ mmol o-nitrophenol ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 생성되는 것으로 정의된다. 마찬가지로 자유(free) 효소의 활성은 회분식 반응기에서 효소를 첨가하고 ONPG 20 ml 용액에서 반응시켜 흡광도를 측정하여 활성을 측정하였다.

초기 속도법에 의한 반응속도 상수의 결정

생성물에 의한 경쟁적 저해를 갖는 반응 속도식을 Lineweaver-Burk plot의 형태로 바꾸면 다음과 같다.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K'_m}{V_m} \frac{1}{S}$$

여기서 속도상수인 V_m , K'_m , K_I 는 초기 속도법에 의해 결정된다. K'_m 은 겔보기 Michaelis-Menten 상수인데 실험에서는 겔보기 상수를 먼저 구하고 기질의 농도(S)와 생성물인 갈락토스(P)의 농도를 변화시키면서 $K'_m = K_m \left(1 + \frac{P}{K_I}\right)$ 의 관계를 이용하여 선형 회귀법에 의한 반응속도 상수를 결정하게 된다.

충진층 반응기 운전

연속 조업에서는 기질의 농도와 유량을 달리하면서 정상상태에 도달한 후 락토스의 전환율을 측정하였다. 기질인 락토스의 농도는 10 mM에서 100 mM까지 변화시켰고 각 기질 농도에 대해서 공급되는 유량은 0.5 ml min⁻¹에서 12 ml min⁻¹으로 변화시켰다. 또한 장기 조업에 의한 안정성을 평가하기 위해 기질농도를 10 mM로 하고 유량을 1.0 ml min⁻¹으로 11일 동안 연속운전을 실시하였고 이것에 대한 안정성을 평가하였다.

결과 및 고찰

효소의 흡착 특성

Duolite 담체 0.5 g을 충진층 반응기에 넣고 효소의 농도를 0.2 mg ml⁻¹에서 2.0 mg ml⁻¹의 범위에서 20 ml 효소 용액을 제조하여 연동펌프로 1시간 재순환시키면서 흡착을 실시하였다. 담체에 흡착된 효소의 양은 초기 효소농도에서 상등액 (supernatant)에 남아있는 효소의 양 사이의 차에 의해 결정되었다. Fig. 1에서 효소의 농도가 증가할수록 흡착되는 효소의

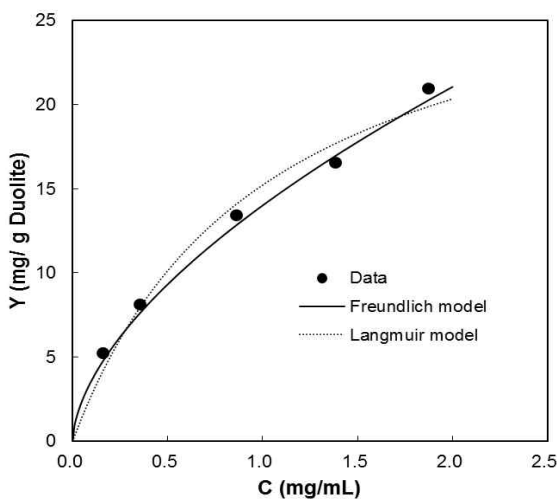


Fig. 1. Comparison of adsorption isotherm of β -galactosidase on Duolite A568. Experimental data were compared with the simulated results using Freundlich and Langmuir adsorption mechanism.

양이 완만한 포화 곡선을 보이면서 증가함을 알 수 있다. 포화 곡선의 물리적 특성을 보여주는 Langmuir 등온식과 semi-empirical 식에 해당하는 Freundlich 흡착 등온선을 엑셀의 해 찾기 기능을 이용하여 최소 제곱법으로 예측 결과를 비교하였다. Freundlich 흡착 등온식 $Y = kC^{1/n}$ 를 이용하여 상수 k와 n을 결정하였다. 속도상수는 k는 14.62이고 n은 1.744로 완만하게 포화하는 일반적인 특성을 보여주고 있다. Langmuir 흡착등온식을 이용하여 비선형회귀에 의한 최적 값을 결정하였는데 Y_{max} 와 θ 는 각각 30.6과 1.01이었다. 그 동안 효소 galactosidase의 담체에 대한 흡착 특성을 흡착 등온식을 사용하여 조사한 연구는 없고 일반적으로 효소의 농도의 변화시키면서 효소의 loading되는 양을 측정하였고 포화곡선을 보인다는 것을 보여주었다. 효소 amylase의 담체에 흡착특성을 연구한 결과에 의하면 Freundlich 흡착 등온식이 Langmuir 흡착 등온식 보다 흡착 특성을 잘 나타냄을 보여주었다[2].

자유효소와 고정화 효소의 속도상수 비교

Fig. 2에서 락토스의 농도를 5에서 100 mM로 변화시키면서 자유 효소의 경우에는 삼각플라스크에서 반응을 진행하였다. 또한 고정화 효소는 충진층 반응기에서 재순환 유량을 15 ml min⁻¹으로 하여 반응을 진행하였다. 두 경우 모두 초기 속도법에 의해 K_m 과 V_m 을 결정하였다. 자유 효소와 고정화 효소의 속도 상수 값은 K_m 은 각각 79와 120 mM 이었고 V_m 은 각각 68과 46 mmolmin⁻¹mg⁻¹이었다. 일반적으로 고정화 효소의 경우 K_m 값이 물질전달 저항의 영향이나 혹은 고정화에 의한 활성부위의 변화 등으로 인해 자유 효소에 비해 증가한다고 알려져 있다. 본 실험에서는 물질전달 저항을 제거하기 위해 재순환 유속을 빠르게 해주었다. 따라서 이 경우에는 효소와

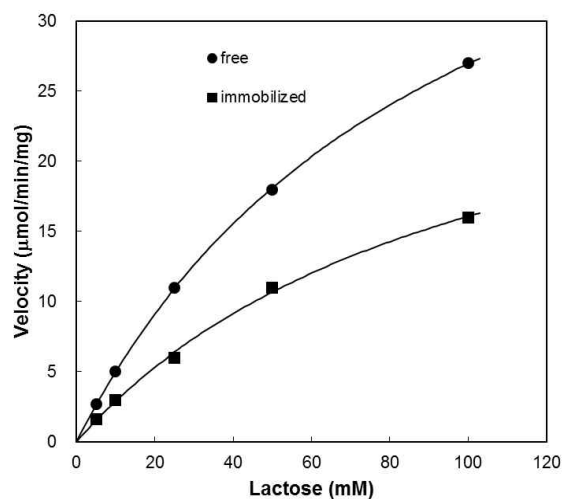


Fig. 2. Comparison of free and immobilized β -galactosidase kinetics using initial rate method to evaluate Michaelis-Menten constants. Reaction velocity was evaluated using different feeding lactose concentration by initial rate method.

기질 사이의 친화도 감소는 고정화 의해 효소 단백질의 활성 부위가 영향을 받는 것으로 추정된다.

Freitas 등에 의하면 알지네이트(alginate) 담체에 포괄시킨 *A. oryzae* 기원의 효소에 대한 비교 연구에 의하면 자유효소와 고정화 효소의 K_m 값은 각각 52 mM와 60 mM 이었다[6]. 고정화 효소의 K_m 값이 높은 것을 알 수 있고 대부분의 연구들이 고정화 효소의 K_m 값이 높게 나타난다. K_m 값의 범위는 사용하는 효소의 특징에 따라 변화가 생긴다.

경쟁적 저해에 의한 속도 상수의 결정

고정화 효소에 의한 락토스의 분해에서 생성물 갈락토스에 의한 저해 상수 K_i 를 구하기 위한 재순환 유량을 15 ml min^{-1} 으로 충전층 반응기에서 초기 속도법을 실시하였다. 기질 락토스의 농도는 50 mM와 100 mM로 변화시켰으며 갈락토스를 넣지 않은 경우를 비교하였다(Fig. 3). 저해물인 갈락토스 농도를 증가시킬수록 효소 반응의 속도는 감소함을 알 수 있다. 겉보기 K_m 값은 갈락토스를 넣은 경우가 증가하였고 이것은 경쟁적 저해 속도식의 전형적인 특성을 보여준다. 저해상수 K_i 는 24.4 mM로 결정되었고 따라서 고정화 효소에 대한 고유한 속도상수는 V_m 은 $46.3 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 이고 K_m 은 120 mM 그리고 K_i 는 24.4 mM이었다. 많은 연구들이 락토스 분해에 대한 고정화 효소에 대한 상수 값을 제시하였다. 대부분의 경우 사용한 담체와 고정화 방법에 따라 값의 범위가 다르게 나타난다.

경쟁적 저해 속도식을 결정하기 위한 방법은 초기속도법, 비선형회귀법, 그리고 실험조건 변화에 따른 상수 결정법이 있다. 문헌에 제시된 것은 사용하는 효소의 기원도 다르고 사용하는 담체도 다르지만 본 실험에서 얻어진 값과 비교해 보

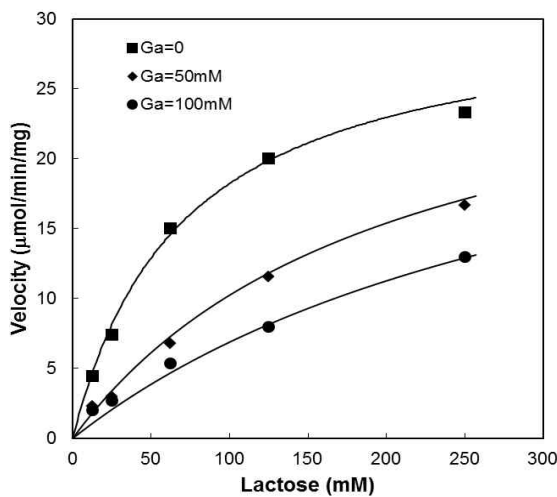


Fig. 3. Effect of galactose on the initial reaction rate of β -galactosidase. Inhibition of immobilized enzyme reaction rate was investigated using different galactose concentration at the start of reaction.

면 K_m 값은 0.3 mM에서 200 mM까지 다양하게 제시되었다 [15, 17, 23]. 저해 상수인 K_i 값도 1.5 mM에서 199 mM까지 다양하게 나타났다[23, 25, 29]. 본 연구의 초기 속도법에 의한 경쟁적 저해 속도 상수에 대한 결과는 문헌에 제시된 범위 내에 있으며 속도식 결정 방법 중에서 Ozudural 등이 제시한 실험조건 변화에 따른 상수 결정법은 간편한 방법임에도 불구하고 속도상수의 값이 너무 낮게 제시되었다.

충진층 반응기의 연속 조업

기질의 농도와 투입되는 유량에 따른 정상 상태에서 락토스 전환율의 변화를 관찰하기 위해 충전층 반응기의 연속 조업을 실시하였다(Fig. 4). 투입되는 락토스의 농도를 10에서 100 mM로 변화시켰고 투입 유량에 대한 락토스 전환율을 조사하였다. 투입유량을 증가시킬수록 기질의 전환율은 감소하였고 같은 투입유량에서 락토스의 농도가 가장 낮은 10 mM에서 높은 전환율을 보였다. 투입유량이 증가할수록 물질전달 저항을 줄이는 효과는 있지만 기질과 효소의 접촉시간이 단축되기 때문에 락토스의 전환율은 낮아지게 된다. 락토스 전환의 생산성은 투입 유량을 높일수록 증가하게 된다. Kang [14]과 Mmmarella 등[20]은 담체에 고정화한 효소의 유당 분해에 대한 운전 결과를 수학적 모델링에 의해 충전층 반응기에서 투입되는 유량이 증가할수록 기질의 전환율은 감소함을 하였고 이것은 실험 결과와 잘 일치함을 알 수 있다.

장기 연속조업에 대한 안정성 평가

투입유량을 2 ml min^{-1} 으로 하고 락토스 농도를 100 mM로 하여 연속 충전층 운전을 장기 조업을 실시하였다. 시간이 경

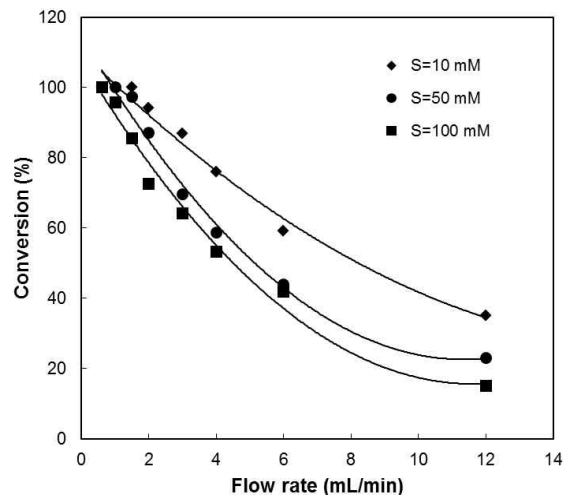


Fig. 4. Conversion of lactose by immobilized β -galactosidase in a continuous packed bed reactor. The measured values of conversion was obtained at the steady state operation. Feeding concentrations of lactose at 10, 50 and 100 mM were used to evaluate the effect of steady state conversion.

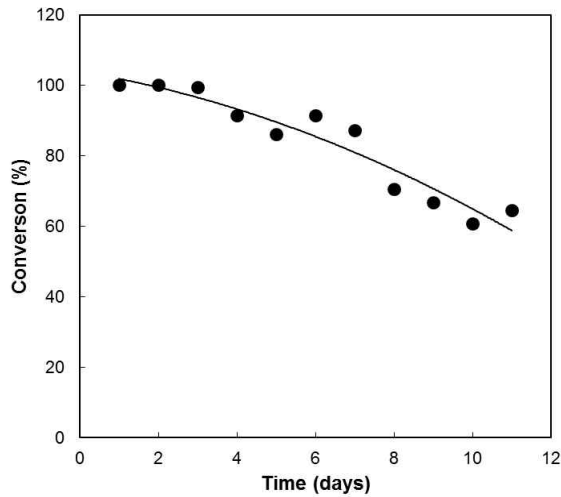


Fig. 5. Steady state conversion of lactose during the long term continuous operation in a packed bed reactor. Feeding concentration of lactose was 100 mM and fixed flow rate of 2 ml min⁻¹ was used during 11 days of operation.

과할수록 전환율은 감소하였으며 효소의 활성에 대한 반감기는 15일이었다. 일반적으로 흡착에 의한 고정화 방법은 장기 연속 조업에서 효소와 담체 사이의 약한 결합력으로 인해 반감기가 짧아진다고 보고되었다. 하지만 본 연구의 경우에 Duolite A568 담체와 효소 사이의 흡착 고정화에서는 다른 연구에 비해 반감기가 긴 것을 알 수 있고 안정적인 조업 결과를 보여주고 있다.

Roy 등에 의한 장기 조업의 안정성 평가는 일반적으로 반복적인 회분식(repeated batch)에 의해 몇 번까지 재 사용이 가능한 지를 판단하였다[27]. 고정화 효소를 이용한 반응기의 산업화에 가장 중요한 문제는 효소의 활성이 얼마나 연속적으로 오래 유지하는 것이다. 반응기 형태는 유동층, 막 반응기, 그리고 충전층이 있지만 지금까지의 연구는 대부분 재순환에 의한 회분식 운전이었다. 충전층 반응기에서는 본 실험과 같이 연속적 운전을 통해 고정화 효소의 활성 변화를 통해 반감기를 예측하는 것이 바람직하다. 따라서 본 공정이 상업적으로 활용되기 위해서는 여러 충전층 반응기를 사용하여 효소활성 변화에 따라 투입되는 유량을 감소시켜 최대한의 전환율을 유지하고 반감기를 지나면 반응기 내부의 고정화 효소를 교체하는 것이 바람직하다고 판단된다.

References

- Al-Muftah, A. E. and Abu-Reesh, I. M. 2005. Effects of internal mass transfer and product inhibition on a simulated immobilized enzyme-catalyzed reactor for lactose hydrolysis. *Biochem Eng J* **23**, 139-153.
- Bautista, L. F., Martinez, M. and Aracil, J. 1999. Adsorption equilibrium of α -amylase in aqueous solutions. *AIChE J* **45**, 761-768.
- Dwevedia, A. and Kayastha, A. M. 2009. Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. *Bioresour Technol* **100**, 2667-2675.
- Elnashar, M. M. M. and Yassin, M. A. 2009. Lactose hydrolysis by β -galactosidase covalently immobilized to thermally stable biopolymers. *Appl Biochem Biotechnol* **159**, 426-437.
- Fogler, H. S. 2006. *Elements of chemical reaction engineering* pp. 784-785, 4th eds., Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Freitas, F. F., Marquez, L. D. S., Ribeiro, G. P., Brandao, G. C., Cardoso, V. L. and Ribeiro, E. J. 2011. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Biochem Eng J* **58**, 33-38.
- Gekas, V. and Lopez-Leiva, M. 1985. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem* **20**, 2-12.
- Guidini, C. Z., Fischer, J., de Resende, M. M., Cardoso, V. L. and Ribeiro, E. J. 2011. β -Galactosidase of *Aspergillus oryzae* immobilized in an ion exchange resin combining the ionic-binding and crosslinking methods: Kinetics and stability during the hydrolysis of lactose. *J Mol Catal B Enzym* **71**, 139-145.
- Haider, T. and Hussain, Q. 2007. Calcium alginate entrapped preparation of *A. oryzae* β -galactosidase: its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *Int J Biol Macromol* **41**, 72-80.
- Haider, T. and Husain, Q. 2008. Concanavalin A layered calcium alginate - starch beads immobilized β -galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients. *Int J Pharm* **359**, 1-6.
- Haider, T. and Hussain, Q. 2009. Hydrolysis of milk/whey lactose by β -galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. *Chem Eng Process* **48**, 576-580.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzon, G. and Vicaria, J. M. 2002. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb Technol* **31**, 300-309.
- Kang, B. C. 2010. Hydrolysis of egg yolk protein in a packed bed reactor by immobilized enzyme. *J Life Sci* **20**, 1656-1661.
- Kang, B. C. 2011. Characteristics of lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase on chitosan bead. *J Life Sci* **21**, 127-133.
- Ladero, M., Santos, A. and García-Ocha, F. 1998. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb Technol* **22**, 558-567.
- Ladero, M., Santos, A. and García-Ocha, F. 2000. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb Technol* **27**, 583-592.
- Li, X., Zhou, Q. and Chen, X. D. 2007. Pilot-scale lactose hydrolysis using β -galactosidase immobilized on cotton fabric. *Chem Eng Process* **46**, 497-500.
- Lortie, R. 1994. Evaluation of the performance of immobilized enzyme reactors with Michaelis-Menten kinetics. *J*

- Chem Tech Biotechnol* **60**, 189-193.
19. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
 20. Mammarella, E. J. and Rubiolo, A. C. 2006. Predicting the packed bed reactor performance with immobilized microbial lactase *Process Biochem* **41**, 1627-1636.
 21. Mateo, C., Monti, R., Pessela, B. C. C., Fuentes, M., Torres, R. Guisan, J. M. and Fernandez-Lafuente, R. 2004. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose: full hydrolysis of lactose in milk. *Biotechnol Prog* **20**, 1259-1262.
 22. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. and Fernandez-Lafuente, V. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* **40**, 1451-1463.
 23. Özdural, A. R., Tanyolac, D., Boyaci, I. H., Mutlu, M. and Webb, C. 2003. Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. *Biochem Eng J* **14**, 27-36.
 24. Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F. and Kumar, H. 2006. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase - review. *J Chem Technol Biotechnol* **81**, 530-543.
 25. Portaccio, M., Stellato, S., Rossi, S., Bencivenga, U., Mohy Eldin, M. S., Gaeta, F. S. and Mita, D. G. 1998. Galactose competitive inhibition of β -galactosidase (*A. oryzae*) immobilized on chitosan and nylon supports. *Enzyme Microb Technol* **23**, 102-106.
 26. Rejikumar, S. and Devi, S. 2001. Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing β -galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly (vinyl alcohol). *Int J Food Sci Technol* **36**, 91-98.
 27. Roy, I. and Gupta, M. N. 2003. Lactose hydrolysis by LactozymTM immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochem* **39**, 325-332.
 28. Szczodrak, J. 2000. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J Mol Catal B Enzym* **10**, 631-637.
 29. Zhou, Q. Z., Chen, X. D. and Li, X. 2003. Kinetics of lactose hydrolysis by β -galactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on cotton. *Biotechnol Bioeng* **81**, 127-133.

초록 : 경쟁적 저해를 갖는 고정화 β -galactosidase 반응기의 해석

강병철*

(동의대학교 화학공학과)

Duolite A568 담체에 흡착으로 β -galactosidase를 고정화시켰다. 효소의 흡착되는 현상은 Freundlich 흡착 등온식을 잘 따랐다. 흡착에 관련된 파라미터인 k 와 n 은 각각 14.62와 1.744를 얻었다. 자유 효소와 고정화 효소의 속도식에 관련된 매개변수를 구하기 위해 초기 속도법을 실시하였다. Michaelis-Menten 상수(K_m)는 고정화 효소가 120 mM이고 자유 효소가 79 mM 이었다. 재순환 충전층 반응기에서 갈락토스의 농도를 변화시키면서 경쟁적 저해식에 대한 영향을 조사하였다. 갈락토스에 의한 경쟁적 저해식에 대한 모델이 실험 결과와 잘 일치하였으며 V_m , K_m 그리고 K_i 값은 각각 $46.3 \text{ mmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$, 120 mM and 24.4 mM 이었다. 연속 충전층 반응기에서 락토스 용액의 유량을 증가시킬 때 서로 다른 락토스 농도에서 락토스의 전환율이 감소하였다. 장기 연속 조업을 통해 고정화 효소의 안정성을 평가하기 위해 11일 동안 연속적으로 반응기 운전을 실시하였다. 고정화 효소의 잔류하는 활성은 63%로 유지되었고 효소의 반감기는 15일로 밝혀졌다.