

Calcium Alginate에 의한 Fungal- α -Amylase의 고정화

송 일 천 · 서 한 수 · 김 계 용

한양대학교 공과대학 공업화학과

(1986년 1월 9일 접수)

Immobilization of Fungal- α -Amylase in Calcium Alginate

Il Cheon Song, Han Soo Suh, and Kea Yong Kim

Department of Industrial Chemistry, College of Engineering, Hanyang University, Seoul, Korea

(Received January 9, 1986)

Abstract: Fungal- α -amylase which is a starch-hydrolysis enzyme was immobilized in the calcium alginate gel at room temperature. The activities of native and immobilized enzyme were measured with spectrometer by means of blue value method determining residual starch. The optimum pH and temperature of fixed enzyme were 4 and 45°C, respectively. The best permeability of substrate was shown at 3% (w/v) of the gel concentration. From the Lineweaver-Burk plot, Michaelis constants of native and immobilized enzyme were estimated by measuring the initial velocity. Reaction with immobilized enzyme gels were performed in batch, plug flow, and stirred flow reactor. The conversion of the substrate was higher in the stirred reactor than in plug flow reactor at the same reaction conditions. This result was attributable to the fact that the stagnant layer on the gel surface inhibited the diffusion of substrate.

서 론

최근 효소가 지니는 특이한 기능을 공학적으로 이용하려는 연구가 많이 이루어지고 있다¹. 효소는 종래의 화학촉매에 비해 높은 기질특이성을 지니고 있어 부생성물을 크게 줄일 수 있으며 효소의 반응특이성을 이용하여 특정한 입체반응을 수행할 수도 있다. 또한 효소를 촉매로 사용할 때 에너지절감효과 및 환경공해 문제에도 큰 잇점을 가지고 있다.

그런데 효소반응은 수용액에서 진행되므로 효소의 활성이 불안정하고 생성물로 부터 효소의 분리와 정제가 어렵다. 이러한 결점을 개선하기 위한 방법으로 효소의 반복사용 또는 연속사용과 활성 안정성 및 생성물의 순도를 향상시키기 위한 수단으로 효소고정화에 대한 연구가 많이 수행되고 있다^{2,3}.

본 실험에서는 글루코오스, 시럽, 양조, 과일 주스, 제지, 섬유가공 및 캔디공업 등에 사용되는 녹말가수분해 효소인 Fungal- α -amylase를 알긴산칼슘에 포괄법으로 고정화시킨 다음 이 고정화효소 반응의 최적조건, 역학적 거동변화 및 반응기 내에서의 겔과 기질의 정체층간의 기질확산저항이 전화율에 미치는 영향 등에 대하여 살펴보았다.

실 험

시 약

녹말은 日本 和光純藥工業(株) 제품을 그대로 사용하였다. 알긴산나트륨은 원희무역(주)의 제품을 그대로 사용하였다. α -amylase는 NOVO 사 제품인 반응최적 pH가 4.7, 반응최적 온도가 37°C인 액상 Fungal- α -amylase 800L을 아세트

산 나트륨 완충용액으로 100배 희석하여 사용하였다. 염화칼슘, 염화나트륨, 염산, 요오드 및 요오드칼륨은 日本 和光純藥工業(株) 제품을 그대로 사용하였다.

Fungal- α -Amylase의 고정화^{4,5}

알긴산은 brown algae로 부터 추출된 glycuronan으로 D-mannuronic acid와 L-guluronic acid로 구성되어 있는 천연다당류이다. 효소의 고정화는 다음과 같이 하였다. 소정량의 알긴산나트륨을 70°C 정도의 물에 녹인 다음 상온에서 효소와 잘 섞어서 균일한 수용액을 만들었다. 이 수용액을 1% (w/v) 염화칼슘용액에 미량주입기를 통해 적하시켰다. 이때 가용성 알긴산나트륨은 Na^+ 이 Ca^{+2} 으로 치환되면서 등방성 겔을 형성, 불용성이 된다. 이후 2시간가량 경화시킨 후 형성된 겔을 1% 염화나트륨용액으로 충분히 세척하여 포괄되지 않은 효소를 제거하였다. 제조된 효소겔은 4°C에서 보관하여 사용하였다.

α -Amylase의 활성측정⁶

α -amylase의 활성은 기질분해능을 광도계법(blue value method)으로 측정하여 구하였다. 기질인 수용성 녹말을 0.07N 요오드용액으로 발색시켜 Bausch & Lomb社의 Spectronic 20를 사용하여 파장 540nm에서의 흡광도 변화로 부터 미반응 기질량을 계산하였다.

반응최적조건 측정^{7,8}

일반적으로 효소를 고분자담체에 고정화 시켰을 때 그 최적조건 및 반응특이성은 다음의 몇가지 요인에 의해 변화하게 된다. 첫째는 담체자체의 물리적, 화학적 성질이 고정된 효소의 미시환경(microenvironment)을 변화하게 하는 것과, 둘째는 고정화에 따른 효소의 3차 구조의 변화, 셋째는 고정화된 효소가 불균일제 반응에 의해 영향받기 때문이다.

알긴산칼슘겔내에 효소를 고정시킬 경우 담체의 음이온전하와 효소의 성질에 기인되는 pH와 온도의 변화 및 겔농도를 각각 독립변수로 하여 batch reactor에서 효소의 반응최적조건을 측정하였다.

반응초기속도 측정^{7,9}

효소반응은 일정 효소량 사용시 기질 농도를 증가시키에 따라 반응속도는 급격히 증가하다가 일정농도 이상에서는 기질저해작용으로 인해 한계속도에 도달하게 되는데 이때의 반응속도를 최대속도라 한다. 순수 및 고정화된 효소의 Michaelis constant인 K_m 값과 최대속도 V_m 값을 측정하기 위해 각 기질농도에 대한 초기속도를 구하였다. 초기속도는 반응속도가 기질농도 함수라고 가정했을 때의 식(1)에서 구하였다.

$$v = d[S]/dt = k[S]^n \quad (1)$$

v : 반응속도, $[S]$: 기질농도

t : 반응시간, k : 반응속도상수

n : 반응차수,

식(1)의 양변에 $\log$ 를 취하면 식(2)를 얻을 수 있다.

$$\log v = n \log [S] + \log k \quad (2)$$

식(2)에서 $\log [S] : \log v$ 의 그래프로 부터 각 기질농도에 해당하는 초기속도를 다음과 같이 구하였다. 반응최적조건에서 기질 50ml에 순수 혹은 고정화효소 일정량을 투입하고 일정 반응 시간마다 반응물 0.5ml씩을 채취하고 여기에 0.1N 염산 2ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 물로 40배 희석시킨 다음 요오드용액으로 미반응전분을 발색시켜 흡광도변화를 측정하여 기질전하량을 계산하였다.

효소반응장치 및 조건

고정화효소의 반응기 형태에 따른 반응성의 변화를 검토하기 위하여 Fig. 1과 같은 장치를 사용하였다.

반응기(A)는 plug flow reactor(이하 PFR라고 함)인데, column(2)에 효소겔을 1.3g 충전시키고 기질용액(1)과 pH 4의 완충용액(6)을 미량펌프(5)로 유입속도를 14.1ml/hr, 35.3ml/hr 및 53ml/hr로 변화시키면서 반응기에 주입한다. 반응한 물질을 (3)에서 일정량 채취하여 전하율을 측정하였다. 반응온도를 일정하게 유지시키기 위하여 항온수(4)를 순환시켰다. 이때 사용한 반응기의 column은 내경 5mm, 높이 100mm였다.

한편, 반응기(B)는 stirred flow reactor(이하 SFR라고 함)이다. 반응기(2)에서 고정화 효소 젤이 부유상태에서 반응하는 점이 PFR 경우와 다르며 그 외의 조건은 반응기(A)와 동일하다. 반응기(B)는 내경 50mm, 높이 100mm인 원통형을 사용하였다.

결과 및 고찰

고정화효소의 반응최적조건

최적 pH 고정화효소의 pH변화에 따른 기질 분해능을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

이때 반응은 batch reactor를 사용하여 순수효

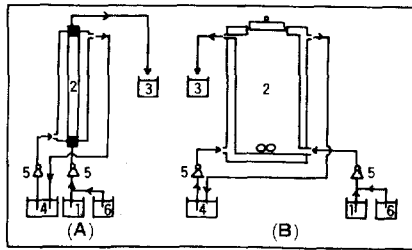


Fig. 1. Apparatus for measurement of enzyme activity.

(A) Plug flow reactor

(B) Stirred flow reactor

- | | |
|--------------------|----------------|
| 1. Starch solution | 2. Enzyme gel |
| 3. Reservoir | 4. Incubator |
| 5. Pump | 6. pH solution |

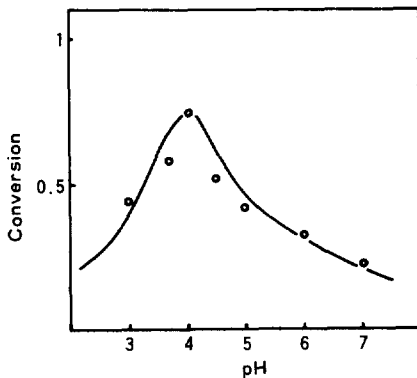


Fig. 2. The effect of pH on the conversion of substrate in batch system for 20 min, at 37°C, by 2% gel.

소의 최적온도인 37°C에서 20분간 반응시켜 전화율을 측정하였다. 순수효소의 최적pH는 4.7인데 비하여 고정화효소의 최적pH는 4로 산성쪽으로 약간 이동되었다. 이것은 알긴산칼슘의 음이온 때문에 젤내의 효소의 미시환경이 변하였기 때문이라고 생각된다¹⁰.

최적젤농도 알긴산나트륨에 효소를 고정시킬 경우 알긴산나트륨의 농도변화에 따른 기질전화율을 검토하기 위하여 batch reactor에서 pH4, 37°C로 20분간 반응시켜 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다.

그런데 일반적으로 젤농도가 증가하면 기질화산속도는 감소하게 되며 반대로 젤농도가 감소하게 되면 효소를 고정시킬 수 있는 담체로서의 성능은 떨어지게 된다¹¹. 따라서 위의 두 상반되는 요인에 대하여 실험을 한 결과 가장 높은 전화율을 나타내는 최적젤농도는 알긴산나트륨의 경우 3% (w/v) 였다.

최적온도 효소고정화시 담체의 영향에 따른 반응최적 온도의 변화를 살펴보기 위해 앞에서 구한 최적pH 4와 젤농도 3% (w/v)에서 온도를 변화시키면서 전화율의 변화를 batch reactor에서 측정한 결과는 Fig. 4와 같다.

최적온도는 45°C로 순수효소의 경우보다 7~8°C 높았다.

고정화 효소량에 따른 전화율변화 고정화 효

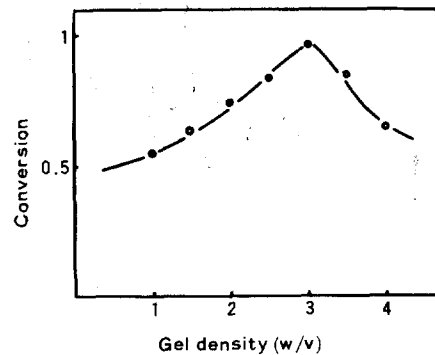


Fig. 3. The effect of gel density on the conversion of substrate in batch system for 20 min, at 37°C, in pH 4.

소량에 대한 기질전환율변화를 검토하기 위하여 겔제조시 알긴산나트륨 10ml에 효소첨가량을 변화시키면서 batch reactor를 사용하여 전환율을 측정한 결과는 Fig. 5와 같았다.

효소량의 증가와 함께 전환율이 급격히 증가하다가 1.5ml 이상에서는 전환율이 완만하게 증가함을 알 수 있었다. 본 실험에서는 효소량을 2.5ml 사용해서 겔을 제조하였다.

효소의 반응속도

본 실험에 사용된 효소반응이 Michaelis-Menten 이론에 따른다면 반응메카니즘은 식(3)으로 나타내어진다^{14,15}.

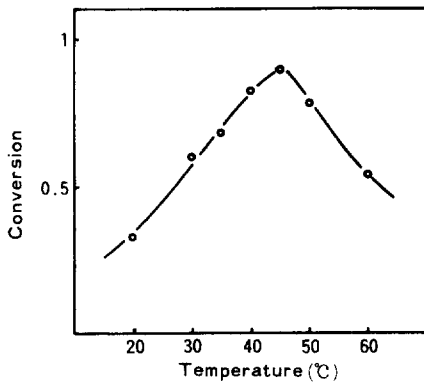


Fig. 4. The effect of reaction temperature on the conversion of substrate in batch system for 20min, in pH 4, by 3% gel.

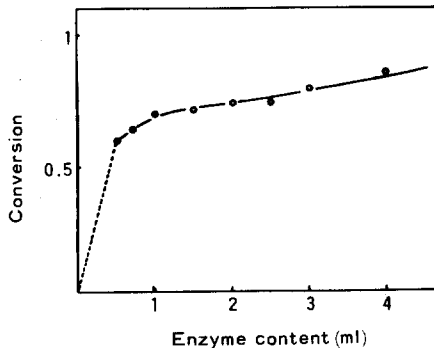
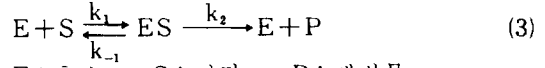


Fig. 5. The effect of the used enzyme content on the conversion of substrate in batch system for 10min, at 45°C, in pH 4, by 3% gel.



E: 효소 S: 기질 P: 생성물

이때의 반응속도식은 식(4)로 나타낼 수 있다.

$$v = V_m \cdot [S] / (K_m + [S]) \cdot V \quad (4)$$

v: 반응속도 V_m : 최대속도

K_m : Michaelis constant V: 반응부피

식(3)에서 복합체 ES의 분해속도상수비인 Michaelis constant $K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$ 과 V_m 을 측정하기 위해 식(4)를 역수로 취해 식(5)를 얻을 수 있다.

$$v^{-1} = (K_m \cdot V / V_m) [S]^{-1} + V / V_m \quad (5)$$

식(5)에서 $[S]^{-1}$: v^{-1} 의 선형그래프인 Lineweaver-Burk plot를 Fig. 6에 나타내었다.

순수 및 고정화효소의 경우 모두 직선성을 잘 나타내므로 Michaelis-Menten이론에 따른다는 것을 알 수 있었다. 순수효소의 경우 K_m 은 0.73이고 고정화효소의 K_m' 은 0.9였다. 두 경우 K_m 값의 차가 크지 않은 것으로 보아 고정화시킨 경우 효소의 기질분해능이 순수효소에 비해 크게 떨어지지 않음을 알 수 있었다.

PFR에서의 효소반응

고정화된 α -amylase의 PFR에서의 반응성을 검토해 보기위해 효소고정된 겔 1.3g을 컬럼에 충전시켜 기질농도 및 유속변화에 따른 전환율을 측정한 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

모든 유속에서 기질농도가 증가함에 따라 겔표

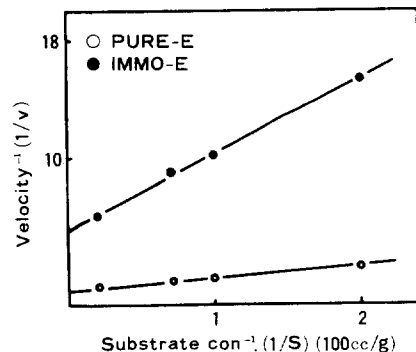


Fig. 6. Reciprocal plot of the equation 5, according to Lineweaver-Burk.

면에 기질의 정체층 두께가 증가하므로 겔표면으로의 기질이동계수 $h_s = D_s / \delta$ (D_s : 확산계수, δ : 정체층 두께)가 감소하기 때문에 전화율이 저하됨을 알 수 있었다¹⁶.

SFR에서의 효소반응

고정화된 α -amylase의 SFR에서의 기질농도 변화에 따른 반응성을 검토하기 위하여 유속을 변화시키면서 전화율을 측정한 결과를 Fig. 8에 나타내었다.

기질농도가 증가함에 따라 모든 유속에서 전화율은 감소하였으며 농도변화에 따른 전화율 차가

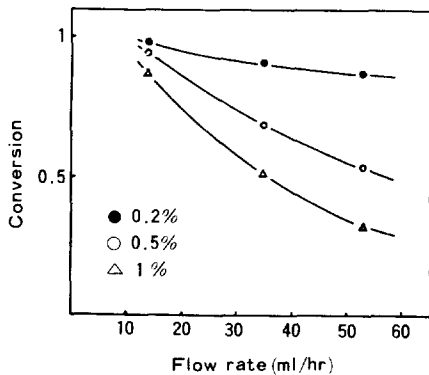


Fig. 7. The effect of concentration of substrate on the conversion of starch in plug flow system as a function of flow rate at 45°C in pH 4.

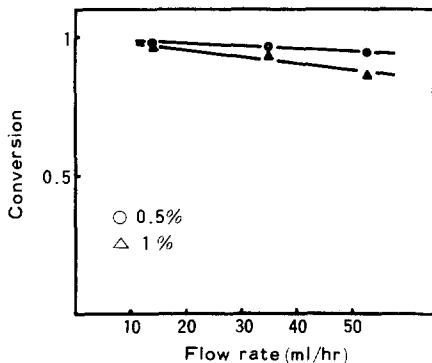


Fig. 8. The effect of concentration of substrate on the conversion of starch in stirred flow system as a function of flow rate at 45°C, in pH 4.

PFR보다 상당히 줄어들었음을 알 수 있었다. 이는 교반에 의하여 겔표면에서의 정체기질층이 감소하므로 기질이동계수 h_s 가 증가되었기 때문이라고 사료된다.

반응기형태에 따른 반응성 비교

식(4)에서 반응속도는 기질농도에 비례하게 된다. 한편 이론상으로는 PFR이 SFR보다 효소단위무게당 기질전화율이 많아지지만¹⁷ 본 실험에서는 효소반응시 기질이 겔에 의한 확산저항 때문에 동일조건하에서는 SFR이 PFR보다 전화율이 더 많은 결과를 얻었다.

일반적으로 겔내에 효소를 고정시킨 경우 기질이 겔표면으로 이동해서 겔표면에서부터 반응이 시작된다고 가정한다. 이때 기질이 겔표면으로 이동하는 flux를 식(6)으로 나타낼 수 있다.

$$J_s = h_s (S_b - S_s) \quad (6)$$

J_s : 기질 flux h_s : 기질이동계수 (D_s / δ)

Table 1. Values of Apparent Michaelis Constant and Maximum Velocity as a Function of Flow Rate

Flow type	PFR		SFR	
Kinetic constant	K'_m	V'_m	K'_m	V'_m
Flow rate (ml/hr)				
53	0.26	22.27	0.03	55.3
35	0.32	25.48	0.027	48.1
14	0.52	27.23	0.02	19.9

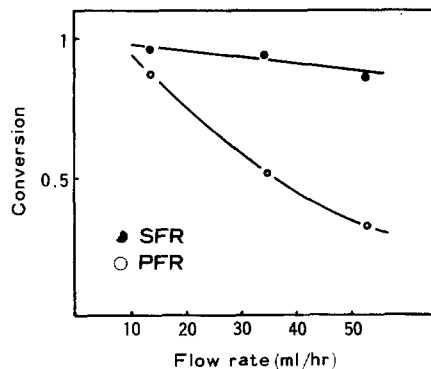


Fig. 9. The effect of flow type on the conversion of starch as a function of flow rate at 45°C, in pH 4.

S_B : bulk solution의 기질농도

S_s : 젤표면의 기질농도

식(6)에서 J_s 가 커지기 위해서는 h_s 가 커져야 하는데 특정기질에 대한 확산계수는 일정하므로 δ 가 작아져야 한다. 이것은 실험결과와 잘 일치한다.

또한 두 반응기에서의 동역학적 상수를 유속변화에 따라 측정해서 반응기성질을 살펴 보았다. Table 1에 두 반응기의 역학적 상수값들을 나타내었다. 두 반응기의 상수값을 구하는 방법은 PFR인 경우 식(4)에 $v = -d[S]/dt$ 항을 대입하여 적분해서 얻은 식(7)로부터 K_m' 와 V_m' 을 구한다.

$$[S_0] \cdot X - K_m' \cdot \ln(1-X) = V_m' / q \quad (7)$$

$[S_0]$: 기질초기농도 q : 유속

X : 전화율(= $([S_0] - [S]) / [S_0]$)

SFR의 경우는 식(4)에 반응기 고유의 속도식인 $v = q([S_0] - [S]) / V$ 를 치환해서 정리한 식(8)로부터 구할 수 있다.

$$[S_0] \cdot X + K_m' \cdot X / (1-X) = V_m' / q \quad (8)$$

Table 1에서 SFR의 K_m' 값이 PFR에서 보다 모든 유속에서 상당히 낮은 값을 나타내었다. 이것은 SFR이 PFR보다 기질분해능이 우수함을 나타내는 것이므로 앞의 실험결과와 잘 일치함을 알 수 있었다. 또한 PFR인 경우에는 유속이 증가함에 따라 V_m' 값이 저하되는 반면 SFR인 경우에는 반대로 증가되었다. 이는 젤로 기질이 확산되는 과정이 기질의 분해과정보다 느림을 나타내는 것이므로 알긴산칼슘에 효소를 고정시킨 것은 확산과정이 분해과정보다 반응에 큰 영향을 미친다는 사실을 알 수 있었다.

결 론

Fungal- α -amylase를 알긴산칼슘에 고정화시킨 효소반응의 최적pH와 온도는 각각 4, 45°C이고 최적젤농도는 3% (w/v)임을 알 수 있었다.

순수 및 고정화효소의 Michaelis-Menten constant K_m 값이 각각 0.73과 0.9이며 고정화효소의 기질분해능이 순수효소에 비해 크게 떨어지지 않음을 알 수 있었다. 알긴산칼슘젤에 고정화시킨 효소를 반응기에 사용할 때 젤주위의 정체 기질층을 제거시킴으로서 기질확산저항을 줄일 수 있었다. 그리고 stirred flow reactor(SFR)가 plug flow reactor(PFR)보다 반응성이 좋았다. 고정화시킨 효소반응에서 확산과정이 분해과정보다 반응에 큰 영향을 미친다는 것을 알았다.

참 고 문 헌

1. W. R. Vieth, *CHEM TECH NOV.*, 677 (1973).
2. *ibid*, JAN., 47 (1974).
3. Klaus Mosbach, *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, **44**, 3 (1976).
4. Rober E. Kesting, *Synthetic Polymeric Membranes*, Mc-Graw-Hill, New York, 104 (1971).
5. H. Eikmeier and F. Westmeier, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 53 (1984).
6. H. Fuwa, *J. Biochem.*, **41**, 5583 (1954).
7. W. Ferdinand, *The Enzyme Molecule*, John Wiley & Sons, London, 159 (1976).
8. W. R. Vieth, *CHEM TECH MAY*, 309 (1974).
9. K. J. Laidler, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2699 (1949).
10. R. Goldman, *Biochemistry*, **7**, 486 (1968).
11. S. J. Peter, *Biotech. Bioeng.*, **XXI**, 2155 (1979).
12. G. G. Guibault, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2533 (1970).
13. F.R. Shu, *Anal. Chem.*, **44**, 2161 (1972).
14. W. Ferdinand, *The Enzyme Molecule*, John Wiley & Sons, London, 26 (1976).
15. *ibid.*, 34 (1976).
16. Klaus Mosbach, *Method in Enzymology*, Academic Press, New York, **44**, 415 (1976).
17. S. P. O'Neill, *Chem. Eng. Sci.*, **26**, 173 (1971).