

Polyacrylonitrile의 酵素固定化에 관한 研究

韓明振 · 李奎玆 · 金啓用

漢陽大學校 工科大学 工業化學科

(1985년 1월 22일 접수)

Studies on the Immobilization of Enzyme to Polyacrylonitrile

Myung Jin Han, Kyu Hyun Lee, and Kea Yong Kim

*Dept. of Industrial Chemistry, College of Engineering, Hanyang
University, Seoul 133, Korea*

(Received January 22, 1985)

Abstract: The optimum condition, iterative usage and activity change of α -amylase which was immobilized on insoluble carrier polyacrylonitrile (PAN) was estimated. The emulsion polymerized PAN was partially imidoesterified with anhydrous methanol and dry HCl gas, on which α -amylase was immobilized in phosphate buffer solution. The activity and its stability of immobilized α -amylase was investigated at various pH, temperature and time with a batch and a continuous system. From these results, the activity of immobilized α -amylase was slightly decreased than that of free α -amylase. The optimum condition of immobilized α -amylase was obtained at pH 7, 40°C. The stability of immobilized α -amylase decreased until 4~5 times usage, but stabilized thereafter. To estimate the dynamic properties of diffusion resistance of substrate, apparent Michaelis constant ($K'm$) was calculated by using the Bar-Eli & Katchalski equation. The $K'm$ was increased after iterative usage maybe due to the decrease of diffusion velocity. The $K'm$ was also increased on decreasing flow rate and therefore on increasing contact time.

1. 序 論

최근 미생물(효소)이 가지고 있는 특이한 기능을 공학적으로 이용하려는 biotechnology가

크게 각광을 받고 있다. 이 biotechnology는 미생물이 가지고 있는 生合成, 물질대사등의 기능을 효율적으로 이용하여 化學物質의 合成이나 bioreactor, 지구상에 존재하는 生物有機體를

이용한 에너지 생산(biomass), biosensor 및 조미량 성분의 분석등 여러 분야에서 연구검토되고 있다. 그러나 일반적으로 효소는 그 활성이 불안정하고 효소 반응 자체가 수용액 상태에서 진행되기 때문에 반응완료 후 생성물과 효소의 분리가 곤란하여 효소를 재사용할 수 없기 때문에 반응 프로세스가 연속화되지 못하고 있는 실정이다. 이와같은 효소의 활성을 안정화시키고 고가의 효소를 재사용함으로써 연속 프로세스의 설계를 가능하게 하는 방법이 효소 고정화(immobilization of enzyme)이다.

고정화 방법으로는 크게 非水溶性 担体에 공유결합시키거나, 이온결합, 물리적 흡착에 의한 担体結合法^{1,2}, 고분자의 매트릭스 공간에 효소를 포괄시켜 고정하는 包括法³, 저분자량의 다작용기 시약을 이용하여 효소분자간에 공유결합을 도입하거나 효소를 불용화하는 架橋化法 등이 있다. 공유결합법과 가교화법은 비교적 격렬한 조건하에서 반응이 진행되기 때문에 효소 단백질의 활성중심의 파괴나 고차구조의 변화가 일어나기 쉬워 얻어지는 고정화 효소의 활성은 높지 않지만 효소-담체간의 결합력이 커서 안정성은 높은 편이다.

1916년 Nelson과 Griffin⁴은 석탄에 invertase를 흡착시킨 고정화 효소가 효소의 활성을 갖고 있음을 확인한 후, 효소 고정화에 대한 관심이 높아져 많은 연구가 진행되었다. 공업적인 연구로는 Manecke와 Katchalski⁵, 및 Goldstein⁶이 고정화 효소의 담체, 효소, 기질의 확산저항에 따르는 동력학적 상수(Michaelis 상수, Km)와 최적 pH에 대한 연구결과를 발표한 바 있으며 Lilly^{7,8}는 Michaelis형-Menten 반응에 따른 고정화 효소 반응기의 수율에 관한 연구를 발표하였다. 또한 I. Stone⁹, 富永¹⁰은 활성탄에 α -amylase를 흡착 고정화시켜 고농도 전분용액의 연속식 분해반응에 대한 연구결과를 발표하였으며 M. J. Bachler¹¹와 R. J. Wilson¹²은 diethylaminoethyl-셀룰로오스에 α -amylase를 이온결합으로 고정화시켰다.

본 연구에서는 非水溶性 擔體인 polyacrylonitrile의 -CN기를 imidoester化시켜 α -amylase를 coupling 반응에 의해 固定化 시켰다. Free α -amylase와 固定化된 α -amylase의 활성변화를 검토하기 위하여 pH, 시간 및 온도를 변화시켰으며 batch식 및 연속식 반응장치를 사용하여 효소의 활성안정성을 검토하였다. 또한 효소와 기질간의 동력학적 관계도 아울러 검토하였다.

2. 實 驗

2-1. 試 藥

전분은 日本 和光純藥(株) 製品을 그대로 사용하였으며 日本 國產化學工業(株) 製品의 아크릴로니트릴 모노머는 중합금지제를 제거하기 위하여 상압증류하여 사용하였으며 α -amylase(태평양화학 제품)는 역가 30,000u/g인 것을 사용하였다. 메탄올은 日本 純正化學(株) 製品을 마그네슘으로 수일간 환류한 후 상압증류하여 사용하였고 日本 純正化學(株) 製品의 염산은 진한 황산에 주입하여 탈수시켜 가며 가스로 사용하였다.

그외에 개시제, 유화제, 산 및 염기는 日本 和光純藥工業(株) 製品을 그대로 사용하였다.

2-2. Polyacrylonitrile의 合成¹³

아크릴로니트릴 모노머를 pH4의 수용액중에서 sodium lauryl sulfate, potassium persulfate, sodium metabisulfite를 사용하여 질소가스 기류하에서 70℃, 2시간 동안 유화중합시켜 폴리아크릴로니트릴(PAN)을 합성하였다. 합성된 PAN은 물에 주입 침전, 여과시킨 후 건조하였다. DMF를 용매로 25℃에서 점도법¹⁴으로 측정한 분자량은 110,000이었다.

2-3. Polyacrylonitrile의 imidoester化¹⁵ (PANIE)

정제된 PAN을 무수메탄올에 가하고 진한 황산을 통과한 건조 HCl 가스를 주입하며 0℃에서 3시간동안 반응을 시켰다. 반응 후 무수메

탄올로 여러 번 씻은 후 여과, 건조하였다. imidoester化된 수율은 Volhard법으로 정량하였다. 즉 염소함유물 PANIE에 건조한 녹말, Na_2O_2 를 Parr bomb에 가하여 연소분해 시킨 후 생성된 염소화합물을 물로 씻어 내어 Na_2O_2 를 분해시키기 위해서 15분동안 끓인 후 과량의 질산은으로 염화물을 침전시키고 남아있는 질산은을 $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 를 지시약으로 하여 NH_4CNS 로 역적정하여 염소를 정량하였다. 측정 결과 imidoester化는 약 15%이었다.

Fig. 1은 합성된 PAN과 치환된 PANIE를 DMF에 녹여 필름상으로 제작한 후 측정한 IR spectrum이다. $-\dot{\text{C}}=\text{N}$ 를 반영하는 peak인 1690cm^{-1} 에서 PANIE가 PAN의 peak보다 증가한 것으로 보아 부분적으로 imidoester化 반응이 진행되었음을 확인하였다. 측정에 사용한 spectro photometer는 NICOLET 5-MX이다.

2-4. α -amylase의 固定化

pH7 인산염 완충용액중에서 α -amylase와 PANIE를 가하고 일정온도 30°C 에서 α -amylase를 固定化시켰다. 반응 후 충분히 증류수로 씻고 G4 glass filter로 감압여과하고 건조하여 固定化된 α -amylase를 얻었으며 그 반응식은 Fig. 1-a와 같다.

固定化효소의 단백질 함유량 측정을 위하여 固定化효소를 6N 염산으로 110°C 에서 48시간 동안 가수분해를 행한 후 paper chromatography

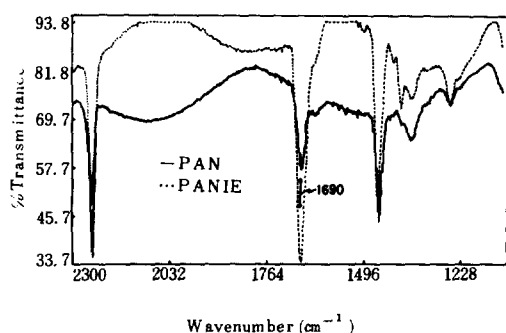
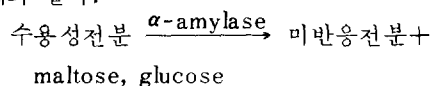


Fig. 1. Infrared spectra of PAN and partially imidoesterified PAN.

(전개용매: n-부탄올; 초산; 물=4;1;2(v/v)에 전개하였다. ninhydrine으로 발색시켜 2개의 분리된 각 spot를 densitometer-ozmer 82를 이용해 570nm에서 흡수면적의 강도로 정량하였다. 固定化효소의 양은 15%이었다.

2-5. α -amylase의 기질분해능 측정^{16,17}

α -amylase의 분해능을 측정하기 위하여 기질인 수용성 전분을 사용하여 光度計法(blue value 측정법)으로 측정하였다. 이때 반응은 아래와 같다.



기질인 수용성 전분의 온도를 변화시키면서 preincubation시킨 후 α -amylase를 첨가하여 온도 및 pH의 변화에 따라 반응을 시킨 후 1N 염산으로 반응을 중지시켰다. 이때 미반응 기질 용액을 0.1N iodine용액으로 발색시켜 Bausch and Lomb spectronic 20(light path; 1 cm)을 사용하여 540nm 파장에서 흡광도(ΔA_{540})의 변화에 따라 미반응 전분량을 계산하였다.

2-6. 효소반응장치

Fig. 2는 효소의 활성을 측정하기 위한 batch식(A) 및 연속식 반응장치(B)의 개요도이다.

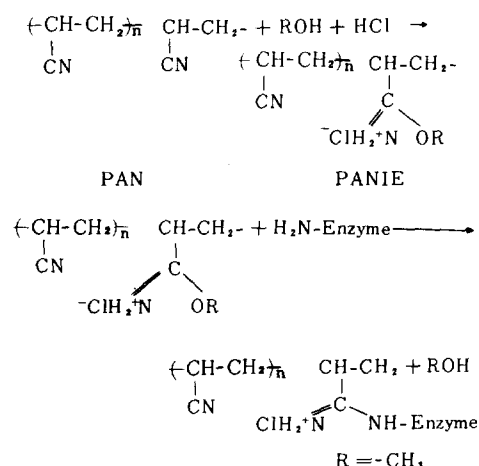


Fig. 1-a. Reaction scheme of the fixation of enzyme to the imidoesterified polyacrylonitrile.

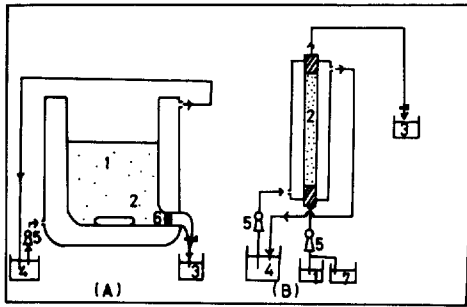


Fig. 2. Apparatus for measurement of enzyme activity, (A) batch system (B) continuous system.

1. starch solution 4. incubator
2. Im-E column 5. pump
3. reservoir 6. 2G-3 glass filter
7. pH solution

(A)는 固定化된 α -amylase를 전분 수용액에 일정량 넣은 후 온도 및 pH를 변화시키면서 시간에 따른 반응정도를 측정하기 위하여 일정량의 용액을 ③에서 채취한다.

(B)는 일정량의 固定化된 α -amylase를 컬럼 내에 충전시킨 후 미량펌프(⑤)에 의해 전분수용액(①)과 pH용액(⑦)을 상향식으로 固定化된 α -amylase와 접촉시킨 후 반응물의 일정량을 ③에서 채취하여 반응정도를 측정한다. 반응 온도를 일정하게 유지하기 위하여 항온수(④)를 순환시켰다.

3. 結果 및 考察

3-1. 효소반응조건

3-1-1. Batch 식에 의한 효소반응

기질로서는 수용성 전분을 사용하였으며 효소 반응은 1% 기질용액에 固定化된 α -amylase를 넣고 pH 및 온도를 변화시키면서 실시한 후 반응시간의 변화에 따라 반응액중 1ml를 채취하여 50배로 희석한 후 이를 blue value 측정법으로 미반응 전분량을 계산하였다.

3-1-2. 연속식 반응장치에 의한 효소반응

연속식 반응장치에 의한 효소반응은 40℃로

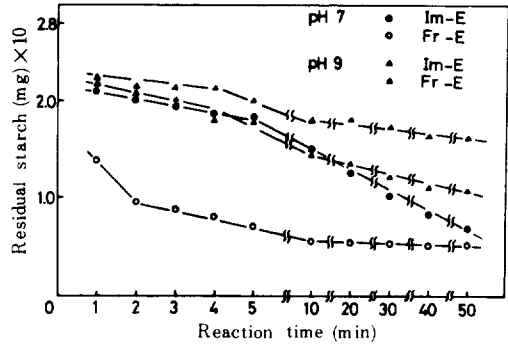


Fig. 3. The effect of reaction time on the degree of hydrolysis of starch in batch system at 40℃.

항온으로 유지시킨 후 길이 10cm, 내경 5mm의 컬럼에 입상 固定化 α -amylase를 충전시키고 미량펌프를 사용하여 유속을 14.1ml/hr, 35.3ml/hr 및 53ml/hr로 변화시키며 기질용액을 상향으로 유입시켜 5분, 10분...60분후의 반응액을 채취하였다. 이를 50배로 희석하여 batch 식과 동일한 방법으로 미반응 전분량을 계산하였다.

3-2. 반응시간에 따른 수용성 전분의 전하율

반응시간의 변화에 따른 효소 活性의 변화를 검토하기 위하여 40℃, batch 식에서 시간의 변화에 따른 효소의 活性을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다.

pH7에서 반응시간에 따른 효소의 活性은 free α -amylase (Fr-E)의 경우 초기에는 크고 점차 감소되나 固定化된 효소(Im-E)의 活性은 초기에 작고 시간에 따라 오히려 증가하며, pH 9의 경우는 free α -amylase 및 固定化된 효소 모두 반응시간에 따라 증가하며, free α -amylase의 활성증가 속도가 보다 큼을 알 수 있다.

3-3. 효소의 最適 pH

固定化된 효소의 특성을 검토하기 위하여 pH 변화에 따른 기질용액의 분해능을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다.

固定化된 α -amylase와 free α -amylase는 모두 기질분해능이 pH7에서 최대치를 보였으며 산성 및 알칼리성이 강할수록 분해능이 감소

하였음을 나타내었다. 最適 pH인 pH 7에서는 固定化된 α -amylase에 의한 기질 전화율이 약 40% 정도였으며 free α -amylase는 약 80%의 기질 전화율을 나타내었다.

3-4. 효소의 最適 溫度

固定化된 효소의 특성을 검토하기 위하여 온도변화에 따른 기질용액의 분해능을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다.

이는 pH 7에서 10분간 반응시킨 후 측정한 결과로 반응온도가 20°C에서 30°C로 증가함에 따라 固定化된 α -amylase와 free α -amylase의 活性이 증가하였으며 40°C에서 가장 높은 活性

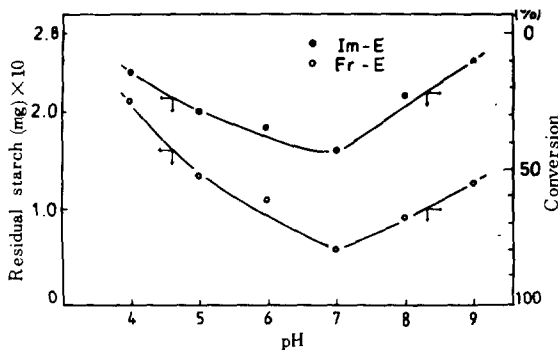


Fig. 4. The effect of pH on the residue starch and degree of hydrolysis of starch in batch system for 10 min. at 40°C.

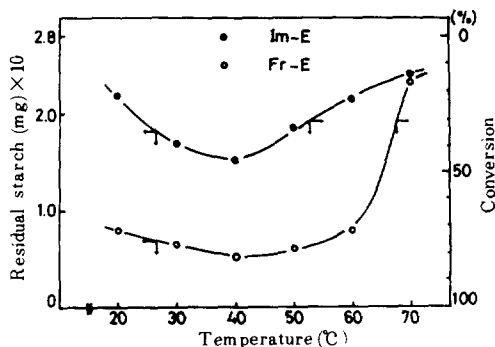


Fig. 5. The effect of reaction temperature on the residue starch and degree of hydrolysis of starch in batch system for 10 min. in pH 7.

을 나타내고 있다. 그러나 40°C 이상의 온도에서는 活性이 감소하여 70°C에는 活性이 없었다. 이는 固定化 및 free α -amylase가 熱安定性이 나쁘기 때문이다².

3-5. 반복사용 가능성

固定化된 효소는 free enzyme과 비교할 때 活性은 다소 떨어지나 다시 반응액으로부터 분리하여 사용할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그러나 固定化된 효소의 사용횟수가 증가함에 따라 재사용시 活性이 급격하게 감소하는 경향을 나타낸다.

이와같은 특성을 검토하기 위하여 固定化된 α

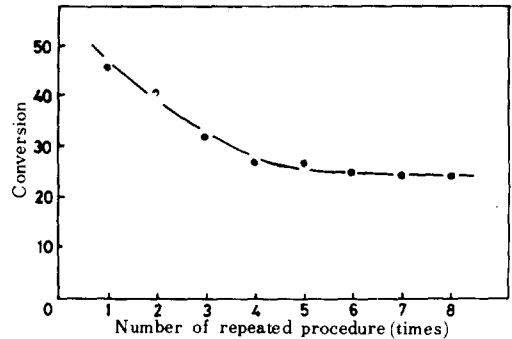


Fig. 6. The effect of No. of repeated procedure on the degree of hydrolysis of starch in batch system for 10 min. at 40°C in pH 7.

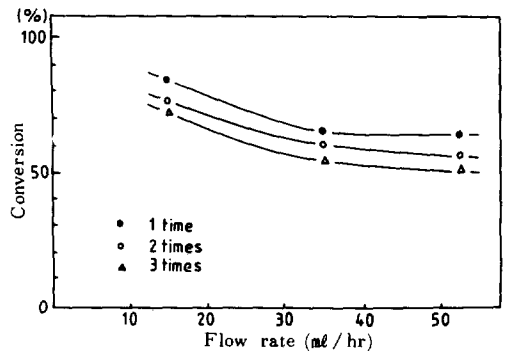


Fig. 7. The effect of No. of repeated procedure on the degree of hydrolysis of starch in continuous system as a function of flow rate at 40°C in pH 7.

-amylase의 最適 조건인 pH7, 40℃에서 반복사용실험(1~8 회)을 행한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 4~5 회까지는 固定化된 α -amylase의 活性이 완만하게 감소하는 경향이 있었으나 그 이후부터는 효소의 活性이 安定化됨을 알 수 있다. 효소의 반복사용에 대한 초기 活性의 감소는 효소의 탈리가 원인¹⁸인 것으로 생각된다.

유속이 증가함에 따라 효소의 活性은 감소하였으며 유속 53 ml/hr에서의 기질의 전화율은 약 70%이었다. 또한 일정한 유속에서 3회 반복실험을 행한 결과 유속 14.1 ml/hr에서 약 85%, 78% 및 72% 정도로 전화율이 감소하였다. 전화율의 감소는 batch식에서와 마찬가지로 효소의 탈리현상이 원인으로 생각된다.

컬럼내에서 효소-기질간의 확산저항에 따르는 동력학적인 특성을 검토하기 위하여 Michaelis-Menten (식-1) 식을 적분형으로 수정하여 컬럼내에서 적용한 Bar-Eli and Katchalski¹⁹ (식-2) 식으로 겔보기 Michaelis 상수($K'm$)를 계산하였다.

$$v = k_s (E) (S) / [K_m + (S)] \dots \dots \text{식 (1)}$$

$$(S_0) - (S_t) = K'm \ln[(S_t) / (S_0)]$$

$$+ C / Q \dots \dots \text{식 (2)}$$

여기서 k_s 는 효소-기질 복합체의 분해속도상수이며 (E)는 효소의 농도, (S)는 기질의 농도, K_m 은 Michaelis 상수이다. 또한 (S_0) 는 컬럼내의 유입시 기질농도, (S_t) 는 유출시 기질농도이며 C는 컬럼의 반응용량이며 Q는 컬럼내를 통과하는 기질의 유속이다. Bar-Eli and

Table 1. Values of Apparent Michaelis Constant as a Function of Flow Rate and Repeated Procedure

Repeated times Michaelis const.	1	2	3
Flow rate(Q)	$K'm$	$K'm$	$K'm$
53 ml/hr	0.62	0.78	0.91
35.3 ml/hr	0.90	1.08	1.19
14.1 ml/hr	1.45	1.62	1.87

pH7, Temp. 40℃

Katchalski식으로 부터 계산한 겔보기 Michaelis 상수, $K'm$ 를 Table 1에 나타내었다.

Table 1에서 보는 바와 같이 일정유속으로 3회 반복실험한 결과 $K'm$ 값은 증가하였다²⁰ 이는 효소에 대한 기질의 확산저항이 증가함에 의해 분해능이 감소하여 $K'm$ 값이 증가하는 원인인 것으로 생각된다. 그리고 동일한 횟수의 반복실험에서 유속이 감소함에 따라 $K'm$ 값이 증가하는 것²¹은 컬럼내에서의 반응시간의 증가때문인 것으로 생각된다.

또한 유속에 따라 기질농도를 0.5%, 1% 및 2%로 변화시켜 가며 전화율을 측정한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 일정 유속에서는 기질농도가 증가할 수록 전화율이 증가하였으며 일정 농도에서는 유속이 증가함에 따라 전화율은 감소하였다. 그러나 0.5% 기질농도에서는 유속에 관계없이 전화율이 67~68%로 거의 일정 하였다.

4. 結 論

固定化시킨 α -amylase의 活性最適 조건은 pH 7, 온도 40℃ 였으며, 70℃ 이상에서는 반응시간이 경과함에 따라 活性이 없었다.

반복사용시의 固定化된 α -amylase의 活性은 반응초기에는 서서히 감소하나 5 회이후 부터는

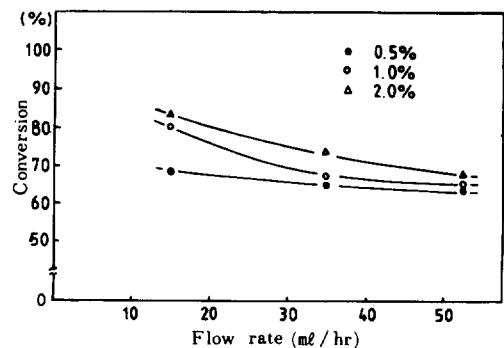


Fig. 8. The effect of concentration of starch on the degree of hydrolysis of starch in the continuous system as a function of flow rate at 40℃ in pH 7.

安定化되어 수 차례 반복사용이 가능하였다.

연속식 반응실험에서 유속이 증가함에 따라 전화율은 약간 감소하였다. 그리고 일정유속에서도 반복사용 횟수가 증가함에 따라 전화율은 감소하였다.

컬럼내의 효소-기질간의 확산저항에 따르는 겔보기 Michaelis 상수, $K'm$ 은 유속이 증가하면 감소하였지만 일정유속에서는 반복사용시에는 증가하였다.

REFERENCE

1. M. H. Green and G. Crutchfield, *Biochem. J.*, **115**, 183 (1969).
2. H. H. Weetall and L. S. Hersh, *Biochem. Biophys. Acta*, **206**, 54 (1970).
3. H. Suzuki, Y. Ozawa, and H. Maeda, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 807 (1966).
4. J. M. Nelson and E. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.*, **38**, 1109 (1916).
5. L. B. Wingare and E. Katchalski-Katizier et al., "Applied biochem. and bioengineering Vol. 1." Academic press (1976).
6. L. Goldstein et al., *Biochemistry*, **3**, 1913 (1964).
7. M. D. Lilly et al., *Biochem. J.*, **100**, 718 (1966).
8. M. D. Lilly et al., *Chemical Engineering*, **CE 12** (1968).
9. I. Stone, U. S. patent, 2717852 (1955).
10. 富永正, 新見匡弘, 梶原久之. 特許公報, 昭 44-1350 (1969).
11. M. J. Bachler, G. W. Strandberg, and K. L. Smiley, *Biotech. and Bioengineering*, **12**, 85 (1970).
12. R. J. H. Welson and M. D. Lilly, *Biotech. and Bioengineering*, **11**, 349 (1969).
13. Wayne R. Sorenson and Tod W. Campbell, "Prep. Method of Polymer Chemistry" 235, Interscience Publisher 2nd ed. (1968).
14. R. L. Clerand and W. H. Stockmayer, *J. Polymer Science*, **17**, 473 (1955).
15. M. J. Hunter and M. L. Ludwig, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3491 (1962).
16. R. M. McCready and W. Z. Hassid, *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1154 (1943).
17. H. Fuwa, *J. Biochem.*, **41**, 5583 (1954).
18. 半田隆, 後藤純雄, 大澤武顔, 點川弥一: 澱粉科學, 第 22 卷, 第 3 號, 72 (1975).
19. Bar-Eli, Katchalski, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1690 (1963).
20. 菅健一, 倉光利江, 田口久活, 前川宣顔, "固定化 酵素の 應用にする 工學的 研究" 要旨集, 25 (1979).
21. 大嶋實, 原納淑郎, 化學工學協會, 第 43 會, B 305, 120 (1978).