

다공성 실리카에 의한 효소고정화에 관한 연구

김 해 성

명지대학교 공과대학 화학공학과

A Study on Enzyme Immobilization on Porous Silica

Hae Sung Kim

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

ABSTRACT

The kinetic characteristics of an invertase immobilized covalently on porous silica have been appraised for the applicability of porous silica to immobilization supports of enzymes. The invertase was covalently bound with glutaraldehyde on 3-aminopropyltriethoxy-silane-activated porous silica to give a maximum loading of 120mg invertase per 1 gram of dry silica and 26.9 to 70.2% retention of original activity. The porous structure of silica seems to be suitable for enzyme immobilization, judging from the observed results of high immobilization capacity and comparably satisfactory retention of enzyme activity.

서 론

효소를 이용하는 생물화학공정의 주요연구분야는 효소의 활용기술에 관한 분야로서 효소의 생물학적 활성을 개량하는 기술분야와 그 활성을 안정화시키고 경제적으로 활용하는 기술분야로 구분할 수 있는데, 전자는 유전 공학적인 방향으로 연구가 진행되는 데 비하여 후자는 고정화법을 중심으로 발전되어 왔다(1, 2).

효소를 고정화시키는 중요한 목적은 효소를 쉽게 회수하여 재이용 할 수 있기 때문에 효소반응공정의 경제성을 높여 줄 수 있으며, 반응양식을 회분식 또는 연속식으로 다양하게 적용할 수 있다는 데 있다. 따라서 자연 효소를 생물화학공정에서 효과적으로 이용하기 위해서는 효소를 고정화 시켜야 하는데, 고정화시키는 방법에는 흡착(adsorption)법, 공유결합(covalent binding)법, 고분자 감금(polymer entrapment)법 등이 있다(3-5). 흡착에 의한 고정화는 담체에 효소를 흡착시키는 것으로서, 담체의 구조적 특성이 효소에 대한 흡착용량이 크면서 세공

확산저항이 작아야 하고 또한 효소에 대한 결합력이 커서 효소가 유리되지 않아야 한다(6, 7). 공유결합에 의한 고정화는 담체의 표면과 효소를 결합제(binding agent) 혹은 교각(spacer arm)으로 공유결합시키는 방법으로 담체를 표면처리하거나 효소에 작용기를 도입하여야 하며, 지지된 효소의 활성도가 차폐되지 않도록 하여야 한다(8, 9). 효소를 미소세공을 가지는 고분자로 고정화시키는 방법은 효소용액의 경계면에 고분자막이 형성되는 microencapsulation법과 고분자 내부의 사슬로 효소를 가두는 fiber entrapment법이 있으며, 이 방법은 고분자의 세공경을 조절하여 효소반응의 선택성을 높일 수 있다는 점에서는 바람직하나 세공확산저항에 유의하여야 한다(10, 11).

효소를 고정화시키는 방법은 고정화시키는 효소의 종류와 효소반응공정의 조업특성을 관련시켜 결정하는데 일반적으로 공유결합법이 많이 시행되고 있다. 고정화담체(12)로는 활성탄, 다공성유리, 산성백토, 알루미늄나, 지르코니아 등의 무기담체와 이온교환수지, 고분자 등의

유기담체가 이용되고 있으며 그 연구 사례와 동향은 Zarborsky(13), Chibata(14), Reilly(15), Woodward(16) 등에 의하여 고찰된 바 있다.

본 연구에서는 고정화담체로 선택된 다공성실리카를 3-aminopropyl-triethoxysilane-acetone 용액으로 표면처리하고 glutaraldehyde로 전화당효소를 공유결합시켜, 자당수용액에서의 자연효소 반응속도와 고정화효소 반응속도를 비교 분석하고, 고정화효소의 활성과 고정화용량 및 속도론적 매개변수를 평가함으로써 다공성실리카의 구조적 특성이 고정화담체로서 유용함을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

효소의 고정화

효소를 고정화하기 위한 담체로는 구조특성이 조절된 다공성실리카를 선택하였다. 이 다공성실리카는 그 구조적 특성이 비표면적 $330\text{ m}^2/\text{g}$, 세공반경 $0.5\mu\text{m}$, 세공율 0.867 , 세공체적 $3.21\text{ cm}^3/\text{g}$, 평균입경 $105\mu\text{m}$ 으로 김(17)에 의하여 효소의 고정화에 적합한 구조적 특성을 가지도록 제조된 담체이다. 다공성실리카(10, 30, 50, 80 및 100 mg)와 2% 3-aminopropyltriethoxysilane-acetone 용액 40 ml 를 각각 5개의 삼각플라스틱에 넣고 45°C 로 24시간 교반하여 aminoalkylsilica를 얻었다. 이 다공성실리카를 아세톤으로 세정한 다음에 5°C 로 유지하면서 1% glutaraldehyde 수용액 5 ml 와 60분동안 반응시킨후 5°C 로 증류수로 여분의 glutaraldehyde를 제거하였다. 이와 같이 표면처리한 다공성실리카와 pH 5인 인산염 완충액에 분말형 전화당효소(Fluka AG, β -D-Fructofuranosidase, $100\text{ IU}/\text{mg}$)를 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0 및 $2.0\text{ mg}/\text{ml}$ 의 농도로 용해시킨 효소수용액을 Fig. 1의 고정화 장치에서 5°C 로 1시간동안 교반, 접촉시켜서 전화당효소가 다공성실리카에 지지되도록 하였다. 이 고정화장치는 외용적 50 ml 의 초자제 플라스틱에 120 rpm 으로 회전하는 저속모터를 연결시킨 것으로, 플라스틱의 회전작용으로 효소수용액과 다공성실리카가 효과적으로 교반되도록 하였다. 이때 고정화 전후에 효소수용액의 흡광도를 280 nm 에서 측정하여 다공성실리카에 지지된 효소의 양을 결정하였다. 고정화온도는 효소의 흡착평형과 활성을 고려하여 상온보다 낮은 5°C 로 유지하였고, 효소수용액의 pH는 5로 유지하여 실리카의 세공과 효소의 활성점이 파괴되지 않도록 하였다. 이와 같은 방법으로 지지된 고정화효소는 최종세정수의 흡광도가 280 nm 에서 0이 될 때까지 증류수와 $0.5\text{ mol}/\text{l}$ 식염수로 반복 세정한 후에 membrane filter(Gelmam, $0.45\mu\text{m}$, 45 mm)로 분리시켜 5°C 로 보관하였다.

- ① Motor
- ② Removable Shaft
- ③ Round Flask
- ④ Cooling Bath
- ⑤ Aminoalkylsilane Silica & Invertase Solution

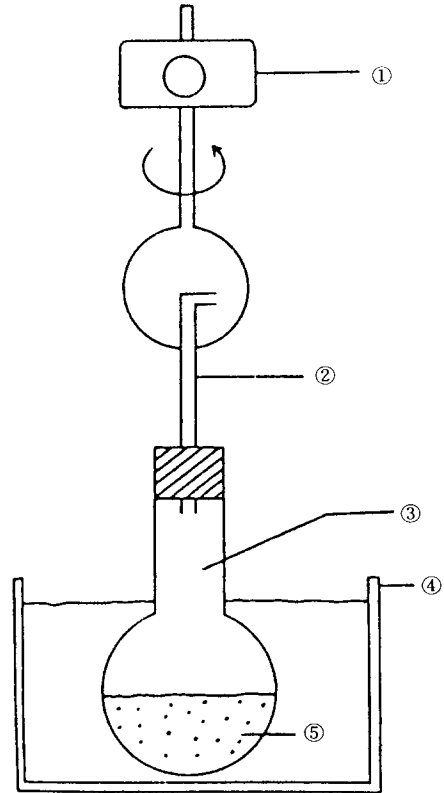


Fig. 1. Rotary immobilization apparatus of native enzyme on porous silica.

효소 촉매 반응

효소촉매반응의 모델반응으로는 전화당효소에 의한 자당의 전화반응을 선택하여, 자연효소(native enzyme) 반응속도와 고정화효소(immobilized enzyme) 반응속도를 각각 내용적 4.0 ml (자당 수용액 1 ml 와 완충액 3 ml)의 시험관반응기와 200 ml (자당수용액 50 ml 와 완충액 150 ml)의 혼합반응기에서 초기속도법으로 측정하고 Lineweaver-Burk 법으로 해석하였다. 자당 수용액($8.00\sim 8.00\text{ mM}$)과 pH 4인 초산염 완충액을 1:3의 체적비로 반응기에 넣고 25°C 로 향온시킨 다음에 적절한 효소농도가 되도록 효소수용액($0.18\text{ mg}/\text{ml}$, $0.50\text{ mg}/\text{ml}$, $0.74\text{ mg}/\text{ml}$)

ml 의 효소수용액 0.1ml) 혹은 고정화효소(고정화 함량 29.2mg / g, 81.3mg / g, 120mg / g인 실리카 30mg)를 첨가하였다. 전화당효소의 농도는 반응물에 균일하게 분산되면 자연효소농도와 고정화효소농도가 다같이 4.38mg / l, 12.2mg / l 및 18.0mg / l이 되도록 하였으며, Fig. 2는 고정화효소반응기를 나타낸 것이다. 이 효소반응기는 외용적 300ml의 초자체 교반 반응기로 그 내외부에 방해판(baffle)과 자켓(jacket)을 부착하고 pH-온도 감지기와 자동피펫을 구비하였으며 자력으로 교반되도록 하였다.

적당한 반응시간이 경과하면 자동피펫으로 시료 1ml를 채취하여 100°C의 불중탕에서 순간적으로 반응을 저지시킨 후에 시료속의 포도당 농도를 Nelson-Somogyi 법(18)으로 측정하였다. 이와같은 반응조건하에서는 자당의 전화율이 5%이내로 유지되므로 초기속도법이 적용되었으며 효소반응속도는 포도당의 농도와 반응시간으로부터 결정하였다.

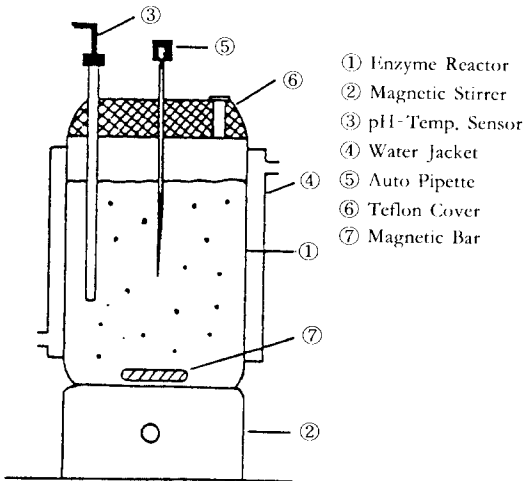


Fig. 2. Experimental reactor for immobilized enzyme reaction kinetics.

실험결과 및 고찰

효소의 고정화

다공성실리카의 고정화함량과 고정화수율을 알아보기 위하여 효소농도와 실리카의 양을 변화시키면서 고정화 함량을 측정된 결과, Fig. 3으로 나타낼 수 있었다. 다공

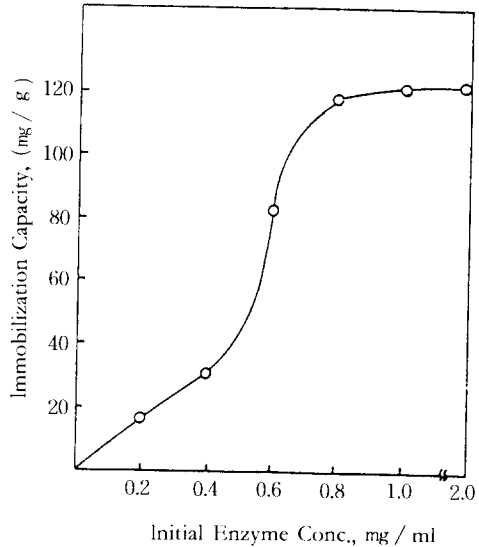


Fig. 3. Immobilization capacity of invertase on porous silica.

성실리카의 고정화함량은 다공성실리카 30mg과 전화당효소 수용액 5ml를 접촉시키면서 효소수용액의 농도변화로부터 실리카 단위 g당 지지된 효소량으로 계산한 것으로, 효소농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0mg / ml에 대하여 14.9, 29.2, 81.3, 116, 119, 120mg / g의 고정화함량을 나타내었다. 다공성실리카에 의한 전화당효소의 고정화함량은 120mg / g에서 최대이므로, 이 최대치가 포화 고정화함량을 알 수 있다. 고정화수율은 효소농도 0.2mg / ml 인 전화당효소 수용액 5ml와 다공성 실리카 10mg, 30mg, 50mg, 80mg, 100mg을 접촉시킨 다음에 효소의 초기 농도와 잔존농도로부터 결정하였으며, Fig. 4에서 알 수 있는 바와 같이 다공성실리카 40mg이상이면 90%이상의 고정화 수율을 얻을 수 있었다. 고정화수율이 90% 일 때의 고정화함량을 계산하면 22.5mg / g으로 포화 고정화함량 120mg / g의 18.8%에 대응하여, 90%의 고정화수율을 얻기 위해서는 포화시키는데 필요한 이론치의 약 5배에 상당하는 다공성실리카가 필요함을 의미한다. 고정화함량과 고정화수율의 관점에서 다공성실리카(120mg / g, 80~95%)와 Bio-Glass 1000(9~10mg / g, 90%이상), Amberlite IRA-94(2.4~3.8mg / g, 61~95%), Amberlite IRC-50(1.04mg / g, 26%), DEAE-Sephadex (80mg / g, 100%), CM-Sephadex (60mg / g, 75%), Microcrystalline Cellulose(12mg / g, 37.5%) 등을 비교할 때에 다공성실리카가 고정화담체로서 유용함을 알 수

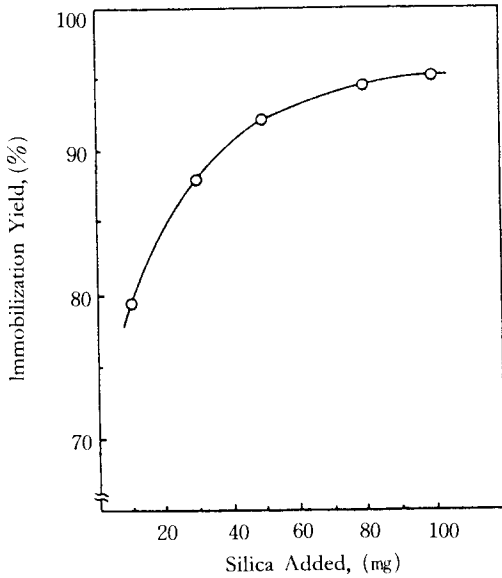


Fig. 4. Immobilization yield of invertase on porous silica.

있으며 지금까지 보고된 담체 중 가장 큰 고정화함량을 가진 것으로 평가되었다(8, 16).

고정화 효소의 활성도

고정화효소의 활성도를 평가하기 위하여 자연효소반응과 고정화효소 반응에 관한 Lineweaver-Burk plot를 Fig. 5, 6에 도시하였다. Fig. 5는 pH 4인 자당수용액(자당농도 2~20mM)중에서 자연효소농도 4.38mg/l, 12.2mg/l, 및 18.0mg/l일때 초기속도법으로 측정한 자연효소 반응속도 v 와 자당농도를 S 를 $1/v$ vs. $1/S$ 로 도시한 그림으로 그 기울기와 절편은 각각 $1/V_m$ 과 k_m/V_m 에 대응한다. 각각의 효소농도에 대응하는 최대속도상수 V_m 과 Michaelis상수 K_m 을 Fig. 5로부터 결정한 결과 V_m 은 $0.265\text{mmol}/1 \cdot \text{min}$, $0.578 \text{mmol}/1 \cdot \text{min}$, $1.150 \text{mmol}/1 \cdot \text{min}$ 이며 K_m 은 평균치로 $23.7\text{mmol}/l$ 이었다. Fig. 6은 다공성실리카 30mg에 담지된 전화당효소 0.876mg(고정화함량 28.9mg/g), 2.44mg(고정화함량 81.3mg/g) 및 3.60mg(고정화함량 120mg/g)을 pH 4인 자당수용액(자당농도 2~20mM) 200ml에 분산시키고 초기속도법으로 측정한 고정화효소 반응속도 v 와 자당농도 S 를 Lineweaver-Burk plot로 도시한 것이다. 고정화효소의 농도는 자연효소반응의 경우와 같이 4.38mg/l, 12.2mg/l, 18.0mg/l이며, 각각의 농도에 대응하는 직선의

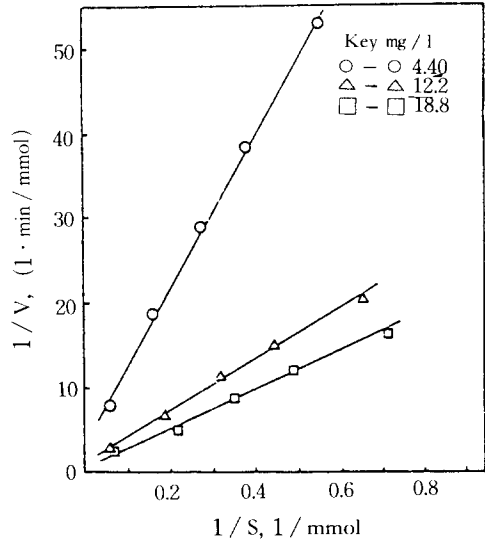


Fig. 5. Lineweaver-Burk plots with native invertase

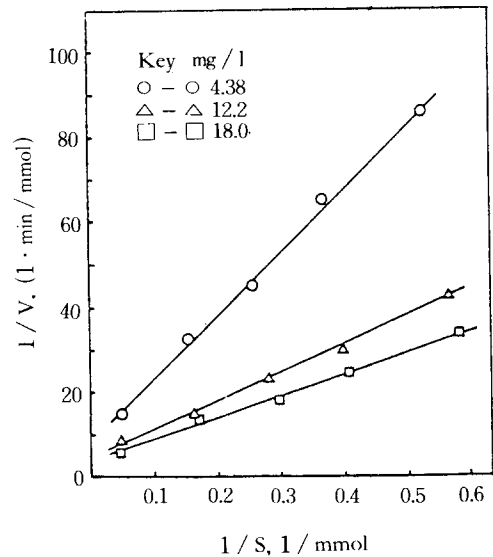


Fig. 6. Lineweaver-Burk plots with immobilized invertase on porous silica.

기울기와 절편은 $1/\eta V_m$ 과 $K_m/\eta V_m$ 이 되는데 η 는 고정화효소의 유효계수(effectiveness factor)이다. Fig. 3으로 부터 결정한 고정화효소반응의 ηV_m 은 0.143

mmol/l·min, 0.199mmol/l·min, 0.215 mmol/l·min 이며 K_m 은 평균치로 21.1mmol/l이었다. 고정화 효소 반응의 최대속도상수 V_m 을 얻기 위해서는 유효계수 η 를 추정하여야 하는데 Thiele modulus ϕ 와 η 의 상관식으로부터 η 를 알고 V_m 을 계산하였다(19).

$$\eta = \frac{1}{\phi} \left(\coth 3\phi - \frac{1}{3\phi} \right) \quad \text{----- (1)}$$

$$\phi = \frac{R}{3} \cdot \left[\frac{V_m}{D_e \cdot K_m} \right]^{1/3} \quad \text{----- (2)}$$

V_m 은 최대속도상수를 실리카 담체의 체적을 기준으로 하여 V_m 로부터 계산하였으며, D_e 는 25°C에서의 차당의 확산계수(20) $3.14 \times 10^{-4} \text{cm}^2/\text{min}$ 와 실리카의 공극율 0.867 및 굴곡도 3으로부터 추산한 $9.07 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{min}$ 로 하였고, 실리카 입자반경 R 은 $5.25 \times 10^{-3} \text{cm}$ 이다. 위와 같은 실험자료에 의하여 고정화함량 28.9mg/g, 81.3mg/g, 120mg/g 일 때 유효계수 η 와 최대속도상수 V_m 을 결정한 결과, 각각 $\eta=0.77$, $V_m=0.186 \text{ mmol}/\text{l} \cdot \text{min}$; $\eta=0.710$, $V_m=0.280 \text{ mmol}/\text{l} \cdot \text{min}$; $\eta=0.695$, $V_m=309 \text{ mmol}/\text{l} \cdot \text{min}$ 이었다. 고정화효소의 활성도를 V_m/V_m 로 정의하여 백분율로 나타내면 각각 70.2%, 48.4%, 26.9%로 Bio-Glass 1000(고정화활성도 30%), Amberlite IRA-94(고정화활성도 75%), Amberlite IRC-50(고정화활성도 8.3%), DEAE-Sephadex(고정화활성도 41%) CM-Sephadex(고정화활성도 70%), Microcrystalline Cellulose(고정화활성도 46%) 등과 비교·평가할 때 다공성실리카가 효소의 고정화 담체로서 유용함을 알 수 있다(8, 16). 다공성실리카를 효소고정화의 담체로서 활용하는 경우에는 고정화함량을 80mg/g 이하로 하여야 고정화효소의 활성이 50%이상으로 유지되므로 바람직한 효소의 고정화 함량은 80mg/g으로 추정된다. 다공성실리카의 고정화담체로서의 특성을 고정화함량과 활성도의 관점에서 종합적으로 검토한 결과 전화당효소 이외의 경우에는 고정화담체로 활용될 수 있는 것으로 판단되었으며, 전화당효소의 고정화에 관하여 보고된 공유결합법 중 가장 우수한 연구결과를 제시한 것으로 평가된다.

요 약

고정화담체로 제조된 다공성실리카를 3-aminopropyl-triethoxysilaneacetone 용액으로 표면처리하고 glutaraldehyde로 전화당효소를 공유결합시켜 전화당효소의 고정화함량과 고정화활성도를 평가한 결과, 고정화함량 120mg/g, 활성도 26.9~70.2%로 우수한 고정화특성을 나타내었으며, 다공성실리카가 고정화담체로 활용되기 위한 구조적 특성을 가진 것으로 평가된다.

감 사

본 연구는 1989년도 문교부 학술연구조성비로 연구되었기로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. H. E. Swaisgood(1985), *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology*, (A. I. Laskin, ed.), p.1, Benjamin/Cummings Publishing, Menlo Park.
2. C. Akin(1987), *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **5**, 319.
3. K. Venkatasubramanian and W. R. Vieth(1983), *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*, (J. J. Mcketta, ed.), Vol. **19**, p. 231, Marcel Dekker, N. Y..
4. W. H. Pitcher(1980), *Immobilized Enzymes for Food Processing*, (W. H. Pitcher, ed.), P.1, CRC Press, Boca Raton.
5. R.A. Messing(1985), *Comprehensive Biotechnology*, (C. L. Cooney and A. E. Humphrey, eds.), Vol. **2**, p.191, Pergamon Press, Oxford.
6. K. Ampon and G. E. Means(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 689.
7. V. D. Sokolovskii and G. A. Kovalenko(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 916.
8. H. Ooshima, M. Sakimoto and Y. Harano(1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 2155.
9. J. Woodward and D. L. Wohlpart(1982), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **32**, 547.
10. K. Imai, T. Shiomi, K. Uchida and M. Miya(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1721.
11. T. Shimoi, M. Tohyama, M. Satoh, M. Miya and K. Imai(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 664.
12. G. Manecke, E. Ehrental and J. Schlunsen(1979), *Characterization of Immobilized Biocatalyst*, (K. Buchholz, ed.), p. 49, Verlag-Chemie, Weinheim.
13. O. Zaborsky(1973), *Immobilized Enzymes*, CRC Press, Boca Raton.
14. I. Chibata(1978), *Immobilized Enzymes*, Halsted Press, N.Y..
15. P. J. Reilly(1980), *Immobilized Enzymes for Food Processing*, (W. H. Pitcher, ed.), p.135, CRC Press, Boca Raton.
16. J. Woodward(1985), *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, Oxford.

17. 김해성(1989), 한국화학공학회지, **27**(3), 299.
18. J. Somogyi(1952), *J. Biol. Chem.*, **19**, 1968.
19. J. J. Bailey and D.F. Ollis(1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., p.208, McGraw-Hill, N.Y..
20. E.L. Cussler(1984), *Diffusion : Mass Transfer in fluid systems*, p. 116, Cambridge University Press, Cambridge.

(Received May 24, 1990, Accepted: July 3, 1990)