

β -glucosidase의 고정화와 효소 반응특성

정의준·이상호·이용현
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Immobilization of β -glucosidase and properties of Immobilized Enzyme

Eui-Jun Jeong, Sang-Ho Lee, and Yong-Hyun Lee
Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT

β -glucosidase derived from *Aspergillus niger* was immobilized by (1) covalent linkage on chitin and chitosan with glutaraldehyde, (2) adsorption on DEAE-cellulose and Amberlite IRA93 after succinylation, and (3) entrapment on alginate and polyacrylamide gels with various cross linking agents. The retention yield of β -glucosidase immobilized on chitosan was 31.5% and operational stability was 69% after continuous operation at column reactor(50°C at pH 4.8) for 15 days. The retention yield and operational stability were 24.7% and 60% respectively, in adsorption on Amberlite IRA 93. On the other hand, the entrapment method by alginate and polyacrylamide gel was identified to be not appropriate due to the continuous elution of immobilized β -glucosidase. Optimum conditions for the immobilization on chitosan were also studied with optimum pH of 4.8 and glutaraldehyde concentration of 0.4%(w/v). The properties and stability of immobilized β -glucosidase are also investigated. The conversion yield of cellobiose to glucose was also analyzed using the column type enzyme reactor to evaluate the effectiveness of immobilized enzyme.

서 론

섬유소의 효소당화는 다음과 같은 효소 복합체; endo- β -1, 4- glucanase (E.C.3.2.1.4), exo- β -1, 4- glucanase (E.C.3.2.1.91) 및 β -glucosidase(E.C.3.2.1.21)의 synergistic action에 의해 진행된다(1-4). 그러나 현재 알려져 있는 대부분의 섬유소 분해 효소 복합체의 경우 β -glucosidase의 활성이 약하여 생성 환원당의 40~60%가 cellobiose로 생성된다. 특히 cellobiose는 cellulase의 효소 작용을 강력하게 저해하는 것으로 알려져 있다.

β -glucosidase는 cellobiose나 다른 짧은 사슬형의 β -

1, 4-oligoglucosides를 glucose로 전환시키는 효소로서, product inhibition을 경감시키고 당전환율을 최대화시키기 위해서 β -glucosidase의 첨가가 필요하다(5-7). 그러나 효소를 batch식으로 직접 주입하는 것보다는 특정 담체에 고정화시켜 사용하는 것이 효소활성을 장기적으로 지속시키고, 또한 고가의 효소를 재사용한다는 측면에서 바람직하다.

β -glucosidase의 고정화에 대한 최초의 연구(8)는 *Candida wickerhamii*에서 유래된 β glucosidase를 ceramic에 흡착시킨 것으로, 효소활성 회수율은 24%였으며, column reactor system에서 실험한 결과 operational stability가 우수하여 산업적으로 응용될 가능성이 있음을

시사한 바 있다. 또한 Desai 등은(9) *Scytalidium lignicola*에서 생산된 β -glucosidase를 glutaraldehyde를 가교물질로 chitosan 담체에 고정화하였고, Fujishima 등(10)은 cellulase 계통 효소가 기질인 섬유소에 강하게 흡착하는 원리를 이용하여, cellulase에 의해 가수분해되지 않고 남은 wood residue를 고정화 담체로 이용해 β -glucosidase를 흡착시킨 결과 88%의 높은 효소활성 회수율을 얻었다고 보고하였다. Fujikawa 등(11)은 고정화 담체로써 calcium alginate gel의 적합성을 검토한 바 있는데 이 방법의 단점인 효소의 지속적인 용출을 방지하고자 여러가지 가교 물질을 첨가하여 고정화를 시도하였다. 또한 최근에는 Roy 등(12)이 *Myceliophthora thermophila* D14 유래의 β glucosidase를 CNBr-activated Sepharose와 polyacrylamide gel 담체에 고정화시켜 그 효소 특성을 조사한 바 있다.

본 연구는 섬유소 당화공정에 활용할 수 있는 적합한 β -glucosidase의 고정화 방법을 개발하고자, 일반적으로 널리 이용되고 있는 효소 고정화법; chitin 또는 chitosan을 이용한 covalent linkage, ion exchange resin에의 adsorption, 각종 gel을 이용한 entrapment+로 효소를 고정화하였고, 고정화된 효소의 특성을 조사 검토하였다. 또한 고정화된 효소를 column형 반응기를 활용하여 그 효용성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용효소 및 기질

본 실험에서 사용된 β -glucosidase는 *Aspergillus niger*에서 유래된 산업용 농축 효소인 Novozym(Novo Co., Denmark)였고, 사용 기질은 cellobiose(Sigma Co.)이었다.

당 및 soluble protein 분석

Glucose는 효소적 방법인 PGO(peroxidase-glucose oxidase o-parainisidine)법(13)으로 정량하였으며, soluble protein은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Bradford법(14)으로 정량하였다.

효소 활성 및 특성

효소 활성은 2% cellobiose 0.5ml과 pH 4.8 acetate buffer용액 0.4ml에 효소액 0.1ml을 첨가하여 50℃에서 30분간 반응시켜 생성된 glucose를 측정하여 결정하였다.

효소 활성은 1ml의 효소가 분당 1 μ mole의 glucose를 생성한 것을 1 unit(IU)로 하였다. 또한 최적 pH, 및 pH 안정성은 20mM acetate buffer(pH 3.0~5.5), potas-

sium phosphate buffer(pH 5.5~7.0), Tris-HCl buffer(pH 7.0~9.0)를 사용하여 조사하였고, 최적 온도 및 온도 안정성은 30℃에서 70℃로 온도를 변화시키면서 검토하였고, 고정화 효소와 soluble enzyme을 비교 조사하였다.

Chitin 및 chitosan을 담체로한 covalent linkage에 의한 고정화

사용 담체는 개껍질 유래의 crude chitin을 정제한 chitin(15)과 Rigby 등(16)의 방법에 의해 chitin으로 부터 조제한 chitosan이었다. 상기 담체를 50mM acetate buffer (pH 4.8)로 상온에서 30분간 팽윤시키고 가교제인 glutaraldehyde를 첨가하여 담체를 활성화시킨 후 β -glucosidase를 첨가하여 일정시간 반응시키고, 비 흡착 효소는 buffer용액으로 세척하여 고정화 수율을 얻었다.

고정화 수율(%)=B/A \times 100

A: 고정화전 효소의 활성

B: 고정화후 효소의 활성

고정화 최적조건을 결정코저, 담체와 glutaraldehyde와의 반응성에 영향을 주는 적정 pH, glutaraldehyde농도, coupling time, 단위담체당 효소의 첨가량을 검토하였다.

Amberlite 및 DEAE-cellulose를 담체로한 흡착에 의한 고정화

사용 담체는 anionic exchange resin인 DEAE-cellulose와 Amberlite IRA 93(Sigma Co. USA)으로서 0.5N NaOH와 0.5N HCl로 반복 세척하여 resin을 활성화시키고 10mM acetate buffer(pH 4.8)로 평형화시켰다. Klotz 등(17)의 방법에 따라 반응 pH를 7로 유지하면서, 효소액의 protein mg당 14ml의 0.2% succinic anhydride를 첨가하여 0℃하에서 30분간 교반시켜, (-)charge를 강화시켜 흡착성을 증대시킨 효소를 담체에 흡착시켰다.

Alginate 및 acrylamide gel을 담체로한 entrapment에 의한 고정화

사용 담체는 alginate 및 acrylamide gel이며, alginate gel 고정화 효소는 sodium alginate 800mg을 증류수 40 ml에 팽윤 용해시킨 후, 효소 55.2 unit를 첨가한 후 가교제로써 각각 25% glutaraldehyde 0.1ml, carbodiimide HCl 280mg 또는 N-hydroxysuccinimide 320mg이 녹은 용액과 상온에서 1시간 반응시키고, 이 반응액을 주사기

에 옮겨 200ml의 1% CaCl₂ 용액에 떨어뜨리면서 bead (3~5mm: direct measurement method)를 형성하게 하여 제조하였다. 또한 polyacrylamide gel 고정화 효소는 Makkar 등(18)과 Sen 등(19)의 방법을 따랐는데 acrylamide 3g 과 bisacrylamide 0.3g 을 증류수 7.5ml에 녹인 후 효소 55.2 unit를 첨가하고 가교물질로 25% glutaraldehyde 0.2ml. 또는 N hydroxysuccinimide 30mg을 첨가하고 전체부피를 100ml로 조절한 후 TEMED(tetramethyl ethylenediamine)를 1~2방울 첨가하여 gel을 형성시켰다. 한편 gel의 형성시 생성되는 열은 4℃의 냉각수로 처리하여 효소의 실활을 방지하였다. 형성된 gel은 균일한 작은 입자로 분쇄한 후 고정화 실험에 사용하였다.

Column형 고정화 효소 반응기의 조작

Chitosan 담체에 고정화된 β -glucosidase에 대해 column형 반응기에서 cellobiose 농도를 1~10%, flowrate를 20~180ml./hr(working vol: 130ml.)로 변화시키면서 glucose 전환율을 조사하였다. 사용 column형 반응기는 water jacket이 부착된 column reactor, water bath, peristaltic pump, 그리고 flow rate controller(Spectra/Chrom Flow Rate Controller, 1~300ml./hr)로 이루어져 있고, 사용된 column의 크기는 2.1×38cm(working volume 130ml.)였다. 또한 chitosan 담체의 void volume은 10ml./g였다. 고정화 효소의 활성 반감기는 1% cellobiose를 10ml./hr의 flow rate으로 주입하여 50℃에서 반응시켜 glucose 전환율이 절반으로 될때까지의 일수로 하였다.

결과 및 고찰

Chitin 및 chitosan을 담체로한 covalent linkage에 의한 고정화

Table 1은 chitin과 chitosan을 담체로하여 가교제인 glutaraldehyde로 활성화 시킨 후 β -glucosidase를 고정화시킨 결과이다. 최대의 활성 회수율은 glutaraldehyde로 활성화시킨 chitosan 담체인 경우로 31.5%였고, glutaraldehyde로 처리하지 않은 비교군의 경우도 28%로서 비교적 높은 효소 활성 회수율을 보였다. 반면 chitin의 경우에는 효소활성 회수율이 22~26%로서 chitosan에 비해 다소 낮은 편이었다. 또한 고정화 효소의 15일 경과 후 활성 유지도는 glutaraldehyde로 처리한 chitosan의 경우 초기 활성의 69%가 유지된 반면 glutaraldehyde로 처리하지 않은 경우는 그 보다 낮은 63.3%의 활성 유지도를 보였다. 위의 결과는 담체를 glutaraldehyde로 활성화시키는 것이 효소활성 회수율에 큰 영향이 없으나 효소활성 유지에는 상당한 효과가 있음을 의미한다.

Amberite 및 DEAE-cellulose를 담체로한 흡착에 의한 고정화

Soloman 등(20)의 succinylation method를 도입하여 Amberite IRA93, DEAE-cellulose와 같은 담체에 대한 효소의 결합력을 강화시켰다. 따라서 succinic anhydride의 최적 처리농도를 결정하고자, 0.5~5%(w/v)까지 변화시키면서 효소를 처리하여 잔존활성도를 측정할 결과는 Fig. 1과 같다. Succinic anhydride의 사용량이 2%(w/v)이내의 경우에는 잔존활성도가 80% 수준으로 유지되었으나 그 이상의 농도에서는 효소활성이 급격히 감소되었으므로 2%를 적정 처리농도로 결정하였다.

Table 2는 succinylation시킨 효소를 대표적인 anionic exchange resin인 Amberite IRA93과 DEAE cellulose에 흡착시킨 결과이다. Succinylation시킨 효소를 Amberite IRA93에 흡착시킬 경우 최대의 활성 회수율인 24.7%

Table 1. Immobilization of β -glucosidase on chitosan and chitin with or without glutaraldehyde.

Matrice	Treatment	Immobilized	Activity	Retention
		enzyme activity (units)	yield (%)	of activity (%)
Chitosan	Glutaraldehyde	17.4	31.5	69.0
Chitosan	None	15.5	28.0	63.3
Chitin	Glutaraldehyde	14.5	26.2	60.0
Chitin	None	12.4	22.4	54.1

Activity yield (after immobilized reaction) and retention of activity (after 15 days operation) were investigated in the column type enzyme reactor using β -glucosidase immobilized on each matrix with or without 0.4% glutaraldehyde at 50℃. The amount of immobilized enzyme is 55.2 IU and column working volume is 130ml.

Table 2. Immobilization of β -glucosidase on DEAE-cellulose and Amberite IRA93 with or succinylation

Matrice	Treatment	Immobilized enzyme activity (units)	Activity yield (%)	Retention of activity (%)
DEAE-cellulose	Succinylation	3.2	5.8	25.0
DEAE-cellulose	None	1.5	2.7	10.0
Amberite IRA93	Succinylation	13.7	24.7	62.0
Amberite IRA93	None	13.2	23.9	53.0

β glucosidase(55.2 IU) with or without succinylation was added to each matrices(130mL of working volume) previously equilibrated with 10mM of buffer(pH 4.8) and standed overnight at 4°C. The unabsorbed enzyme was washed with the same buffer. Activity yield and retention of activity were calculated by the same method in Table 1.

가 얻어졌다. 반면 DEAE-cellulose의 경우 효소 활성 회수율은 5.8%에 불과하였으며, Amberite IRA93에 비해 매우 낮아 β -glucosidase 고정화에는 부적합한 담체로 판별되었다. 15일 경과 후 고정화 효소의 활성 유지도는 succinylation시킨 효소를 사용한 Amberite IRA93의 경우 초기 활성의 62%를 유지한 반면 succinylation시키지 않은 비교군의 경우는 53%로서 다소 낮은 활성 유지도

를 나타내었다. 이로 미루어 Amberite IRA93이 보다 적절한 담체임을 알 수 있었고 β -glucosidase를 succinylation 시킨 후 담체에 흡착시킬 경우 효소 활성회수율에는 큰 증가가 없었으나 효소활성을 유지함에는 상당한 효과가 있음을 알 수 있었다.

Alginate 및 acrylamide gel을 담체로한 entrainment에 의한 고정화

Table 3은 sodium alginate gel과 polyacrylamide gel을 담체로 glutaraldehyde, succinimide 및 carbodiimide를 가교제로 하여 효소를 포접하여 고정화시킨 결과이다. 가장 높은 효소활성 회수율은 18.7%로서 glutaraldehyde를 가교제로 하여 alginate gel에 포접시킨 경우였다. 한편 acrylamide gel 고정화에 있어서는 glutaraldehyde로 처리할 경우는 11.1%, succinimide로 처리할 경우는 10.3%로서 alginate gel 고정화법에 비해 전반적으로 효소활성 회수율이 낮았다. 고정화 β -glucosidase의 column 반응기에서의 활성유지도를 측정된 결과 15일 경과후 glutaraldehyde를 가교제로 한 acrylamide담체 고정화의 경우 43%인 것을 제외하고는 모두 10~20% 사이의 낮은 활성 유지도를 나타내었으며 효소의 용출을 방지하기엔 비흡함이 있었다.

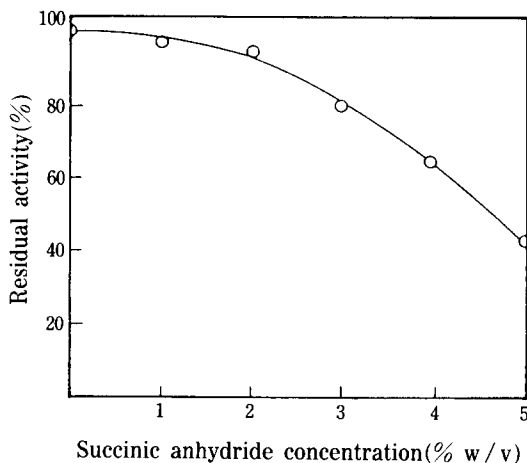


Fig. 1. Effect of succinic anhydride concentration on the activity of β -glucosidase.

Chitosan을 담체로한 최적 고정화 조건의 확립

위의 각종 효소 고정화법을 종합 비교한 결과, chitosan이 β -glucosidase고정화에 가장 적합한 담체로 판단되

Table 3. Immobilization of β -glucosidase on alginate gel and acrylamide gel with or without cross-linking agents.

Matrice	Treatment	Immobilized enzyme activity (units)	Activity yield (%)	Retention of activity (%)
Alginate	None	5.5	10.0	8.0
Alginate	Succinimide	8.8	16.1	20.1
Alginate	Carbodiimide	6.0	10.8	18.5
Alginate	Glutaraldehyde	10.3	18.7	21.2
Acrylamide	None	3.9	7.0	13.0
Acrylamide	Succinimide	5.7	10.3	15.0
Acrylamide	Glutaraldehyde	6.1	11.1	43.0

어 그 최적 고정화 조건을 검토하였다. 담체를 glutaraldehyde로 활성화시키는데 있어서의 적정 pH를 조사하기 위해, pH를 3.0~9.0으로 변화시켜 효소를 고정화한 결과는 Fig. 2와 같다. pH 4.8에서 고정화 β -glucosidase의 활성 회수율이 36%로 가장 높았다. Glutaraldehyde는 bifunctional reagent로서 효소와 담체를 연결시키는 가교역할을 함으로써, 이는 효소의 활성 회수율뿐만 아니라 효소의 안정성에도 많은 영향을 주게된다. 효소 활성회수율을 최대화 할 수 있는 glutaraldehyde의 적정

농도를 검토한 결과는 Fig. 3과 같으며, glutaraldehyde 농도가 0.4%일 때 가장 높은 회수율을 얻을 수 있었다. 또한 glutaraldehyde로 활성화시킨 담체와 효소사이의 흡착반응 시간의 영향을 검토한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와같이 최적 반응시간이 50분이었다.

또한 단위담체당 적정 첨가효소량을 조사하기 위해 chitosan 1g에 대해서 β -glucosidase의 첨가량을 10~35unit로 변화시킨 결과 Table 4와 같으며 효소를 20unit로 첨가할 때 효소 활성 회수율이 28.5%로서 가장 높았

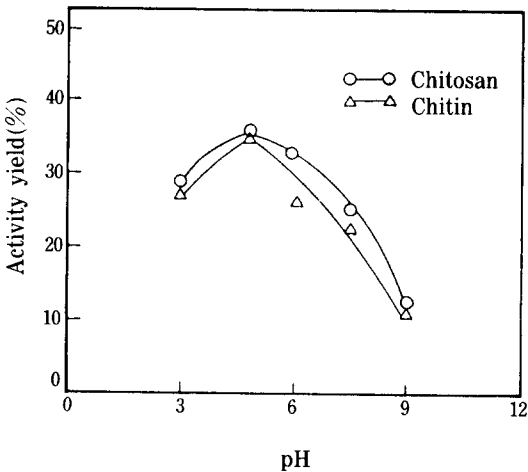


Fig. 2. Effect of glutaraldehyde activation pH on the immobilization of β -glucosidase on chitosan and chitin: 0.4% glutaraldehyde.

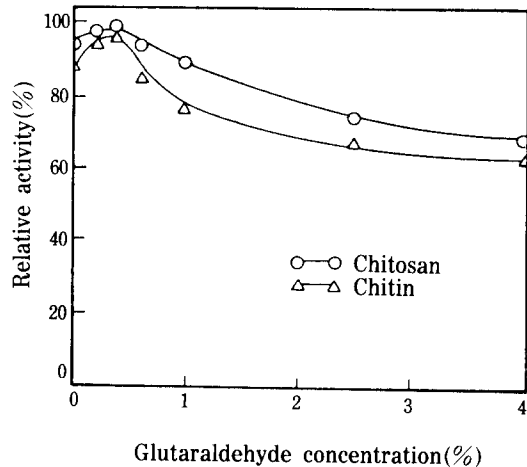


Fig. 3. Effect of glutaraldehyde concentration on the immobilization of β -glucosidase on chitosan and chitin.

Table 4. Effect of the amount of enzyme on immobilization of β -glucosidase on chitosan.

Soluble enzyme (units)	Immobilized enzyme	
	Total activity (units)	Activity yield(%)
9.25	1.70	18.4
13.88	3.51	25.3
20.00	5.27	28.5
23.15	5.09	22.0
27.75	6.11	22.0
32.38	6.54	20.2

β -glucosidase(9.25~32.18 unit) was added to the chitosan which was previously activated by 0.4% glutaraldehyde at pH 4.8 and 50°C.

다. 일반적으로 효소 고정화에 있어서 효소의 첨가량을 증가시킴에 따라 효소의 total activity는 증가하나, 효소 활성 회수율, 고정화 효소 및 colum 사용경비등의 경제성을 고려하여 고정화시 적당한 효소 첨가량이 선택되어야 할 것으로 사료된다. Chitin을 Rigby 등(16)의 방법에 따라 NaOH 등으로 처리하였을 경우에 Fig. 5에서와 같이 효소가 고정화되기에 더욱 적합한 다공성 구조의 chitosan으로 변환됨을 볼 수 있다.

고정화 β -glucosidase의 특성비교

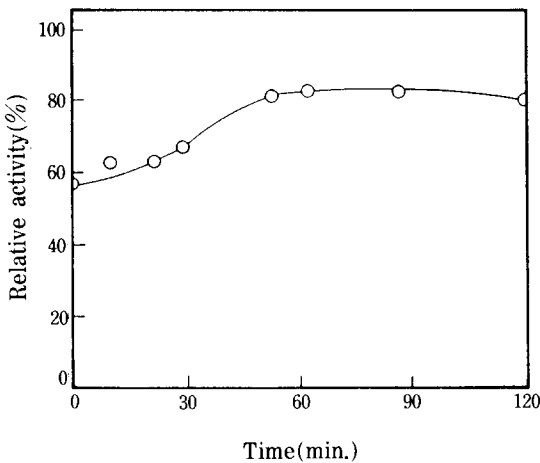


Fig. 4. Effect of coupling time on immobilization of β -glucosidase on chitosan.

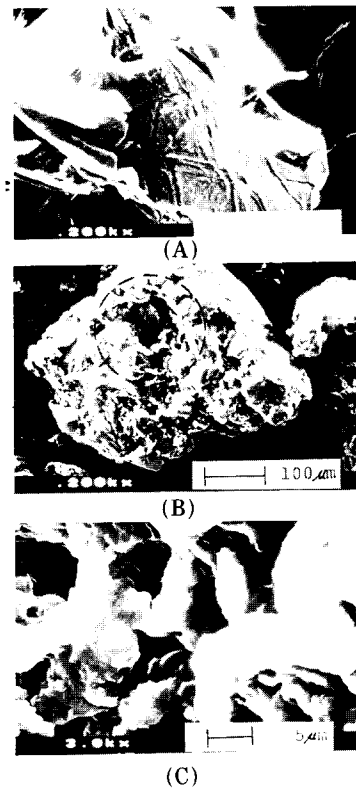


Fig. 5. Scanning electron micrograph of chitosan and chitin: (A) chitin particle($\times 200$), (B) chitosan particle($\times 200$), (C) enlarged portion of the circle in (B) ($\times 300$).

고정화 β -glucosidase의 특성 변화를 조사하기 위하여 chitosan과 Amberite IRA93 담체에 고정화된 효소의 pH와 온도의 최적조건 및 안정성을 soluble 효소와 비교하였다. 그 결과 soluble 상태의 효소에 비해 chitosan 담체에 고정화된 효소의 경우에는 최적온도가 50°C에서 60°C로 10°C의 증가를 보였고, 최적 pH는 별다른 차이를 보이지 않았으며, 온도 안정성도 5°C정도 증가를 보였다.

Column형 고정화 효소 반응기의 조작

Flow rate의 영향: Glutaraldehyde를 가교제로 chitosan 담체에 고정화시킨 β -glucosidase에 있어 column형 효소 반응기(2.1×38cm, working volume 130ml.)에서의 glucose 생성조건을 검토하였다. 이때 반응기내에 고정화된 β -glucosidase의 양은 180unit(12ml. of 15IU/ml.)였다. 5% cellobiose를 기질로 flow rate를 20, 60, 100, 140 그리고 180ml./hr[dilution rate(D)=0.154, 0.462, 0.769, 1.080 그리고 1.385 hr⁻¹]로 변화시키면서 conversion yield 조사한 결과는 Table 5와 같다. 생성 glucose 농도는 각각 46.5, 43, 37.5, 31.5 그리고 24.5mg/ml.였고, conversion yield는 각각 0.93, 0.86, 0.75, 0.63 그리고 0.49였다. 이로 볼때 dilution rate가 증가할수록 기질의 retention time 감소로 인한 반응시간의 단축으로 인해 conversion yield는 점점 감소함을 알 수 있었다. 또한 Table 5는 반응기에서의 dilution rate에 따른 productivity의 변화를 나타내며, productivity는 생성 glucose 농도와

dilution rate(D)를 곱하여 얻었다. Productivity는 flow rate가 140ml./hr에 이를때까지 계속 증가하다가 그 이상의 flow rate에서는 더 이상의 증가를 보이지 않았는데, 이는 glucose로의 전환율이 감소됨에 기인된다. 또한 flow rate 100 140ml./hr에서 productivity는 28.8~34.0 g/L·hr로 가장 높았다. 고정화된 β -glucosidase를 이용한 효소반응기에서의 최적 조작조건을 결정하기 위해서는 productivity는 물론, reactor operational cost, 그리고 conversion yield에 따른 기질의 경제적이용도 등을 고려함이 필요할 것이다.

기질 농도의 영향: 사용가능한 최대의 기질 농도를 조사하기 위해 cellobiose 농도를 1~10%로 변화시키면서 최대의 glucose 전환율을 지니는 flow rate인 20ml./hr와 최대의 glucose를 생성하는 flow rate 범위인 90 ml./hr의 두가지의 flow rate로 첨가하여 얻어진 glucose 전환율의 변화를 Table 6에 나타내었다. 20ml./hr의 낮은 flow rate에서는 cellobiose 농도를 5%까지 높였을 때 conversion yield는 0.85로 높았고 productivity는 6.55 g/L·hr였으며, 90ml./hr의 높은 flow rate에서는 cellobiose 농도가 5%일 때 conversion yield는 0.46으로 낮았지만 productivity는 15.92 g/L·hr로 비교적 높았다. 이를 종합컨데 productivity와 cellobiose로부터 glucose로의 conversion yield를 모두 고려해 최적 기질농도를 결정하여야 할 것으로 사료된다.

고정화 효소의 활성만감기: 여러 방법으로 고정화시킨 β -glucosidase의 활성유지도와 활성만감기를 column

Table 5. Effect of dilution rate on conversion yield and productivity of β -glucosidase immobilized on chitosan with glutaraldehyde.

Flow rate (ml./hr)	Dilution rate* (hr ⁻¹)	Glucose conc. (g/L)	Conversion** yield	Productivity*** (g/L·hr)
20	0.154	46.5	0.93	7.16
60	0.462	43.0	0.86	19.87
100	0.769	37.5	0.75	28.84
140	1.080	31.5	0.63	34.02
180	1.385	24.5	0.49	33.93

Conversion yield was investigated in the colum type enzyme reactor using β -glucosidase(55.2IU) immobilized on chitosan with 0.4% glutaraldehyde.

* Dilution rate=flow rate / working volumn(130ml.)

** Conversion yield is ratio of cellobiose to glucose

*** Productivity=Glucose concentration X Dilution rate

Table 6. Effect of cellobiose concentration on conversion yield and productivity of β -glucosidase immobilized on chitosan with glutaraldehyde in different dilution rate($D=0.154$ and 0.692hr^{-1}).

Cellobiose concentration(%)	1	2	3	5
(D = 0.154)				
Glucose conc.(g / L.)	6.50	15.20	24.60	42.50
Conversion yield	0.65	0.76	0.82	0.85
Productivity(g / L · hr)	1.00	2.34	3.79	6.55
(D = 0.692)				
Glucose conc.(g / L.)	5.70	11.20	16.20	23.00
Conversion yield	0.57	0.56	0.54	0.46
Productivity(g / L · hr)	3.94	7.75	11.21	15.92

형 반응기에서 연속 반응을 시켜 검토한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 효소활성 유지도 및 반감기는 glutaraldehyde 로 처리한 chitosan 담체에 고정화시켰을 경우에 효소 활성반감기가 20일로서 가장 길었고, 효소를 succinylation시킨 후 Amberite IRA93 담체에 고정화시켰을 경우에는 효소활성 반감기가 18일로서 비교적 좋은 결과를 얻었다.

요 약

Aspergillus niger 유래의 β -glucosidase를 (1)glutaraldehyde 를 가교제로 한 chitin과 chitosan 담체에 covalent linkage, (2)Amberite IRA93과 DEAE-cellulose담체에 succinylation시킨 후 흡착, 그리고 (3)alginate, polyacrylamide에 각종 가교제를 이용 entrapment 등의 방법으로 고정화하였다. Glutaraldehyde를 가교제로써 chitosan을 활성화시킨 후 β -glucosidase를 고정화시켰을 때 효소활성 회수율이 31.5%로 가장 높았고, 또한 column형 반응기에서의 15일 경과 후 효소활성 유지도도 69%로서 가장 우수하였다. 또한 succinylation시킨 효소를 Amberite IRA93 담체에 흡착시켰을 때 효소활성 회수율은 24.7%였고 효소 활성유지도는 62%였다. 반면에 entrapment 방법에 의한 β -glucosidase의 고정화는 효소의 지속적인 용출로 β -glucosidase의 고정화에는 적합하지 않았다. Chitosan 담체에서의 고정화 최적조건을 조사한 결과 가교제인 glutaraldehyde의 최적농도는 0.4%였고, glutaraldehyde의 최적 반응 pH는 4.8이었다. 또한 column형 반응기를 이용하여 cellobiose로부터 glucose로의 전환율을 조사하여 고정화 효소의 효용성을 검토하였다.

감 사

본 연구는 동력자원부 90년도 대체에너지 기술개발사업비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. K. E. Eriksson (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 317.
2. E. T. Reese (1977), *Recent Adv. phytochem.*, **11**, 311.
3. G. Halliwell and M. Riaz (1970), *Biochem. J.*, **116**, 35.
4. Y. H. Lee and L. T. Fan (1980), *Adv. in Biochem. Eng.*, **17**, p. 101, Springer-Verlag, Berlin.
5. M. Mandels and D. Sternberg (1976), *J. Ferment. Technol.*, **54**, 267.
6. J. A. Howell and J. D. Stuck (1975), *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 873.
7. D. Sternberg (1970), *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 648.
8. R. P. Rohrbach, D. S. Scherl, and R. W. Detroy(1985), *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 15, 363.
9. J. D. Desai, R. Ray, and A. Desai (1986), *J. Ferment. Technol.*, **64**, 225.
10. S. Fujishima, F. Yaku, and T. Koshijiam (1987), *Mokuzai Gakkaishi*, **33**, 992.
11. S. Fujikawa, T. Yokota, and K. Koga (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 440.

12. S. K. Roy, S. K. Raha, S. K. Dey, and S. L. Chakrabarty (1989), *Enzyme Microbiol. Technol.*, **11**, 431.
13. Sigma Corporation (1989), *Sigma Diagnostic Glucose Procedure*, No. 510, Sigma Catalogue.
14. M. M. Bradford (1976), *Anal. Biochem.*, **72**, 248.
15. W. L. Stanley, L. G. Watters, B. Chan, and J. M. Mercer (1975), *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 315.
16. G. W. Rigby (1936), U. S. Patent 2,040,979.
17. I. M. Klotz (1967), *Method in Enzymology*, **11**, 577.
18. H. P. S. Makkar, O. P. Sharma, and S. S. Negi (1981), *J. Biosci.*, **3**, 7.
19. S. Sen and S. L. Chakrabarty (1987), *Enzyme Microbiol. Technol.*, **9**, 112.
20. B. Soloman and Y. Levin (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1161.

(Received: July 10, 1990, Accepted: August 21, 1990)