

## Chitosan Microbeads에 의한 효소고정화

손흥식\* · 박성민 · 손병일 · 최현미 · 이근태  
대선주조(주) 증양연구소\*, 부경대학교 식품공학과

### Immobilization of an Enzyme with Chitosan Microbeads

Heung-Sik SOHN\*, Seong-Min PARK, Byung-Yil SON, Hyeon-Mee CHOI, and Keun-Tai LEE

DaeSun Distilling Co., Ltd., Lab.\*, Department of Food Science and Technology,  
Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Immobilization of amyloglucosidase (AMG) with chitosan microbead and its possible applications were evaluated. The diameter of chitosan microbead was about 1.2 mm and the optimum enzyme concentration for immobilization was 6 mg/ml. The relative activity of the immobilized enzyme was 97.8% at pH 4.2 and 55°C and the optimum condition for the immobilized enzyme was the same to that of free enzyme. In case of temperature above 30°C, the activity of the immobilized enzyme was a little higher than that of free enzyme. The enzyme activities of both free and immobilized were stable for 6 months when stored at 35°C. The optimum temperatures of both enzymes for saccharification of the dextrinized starch were 55°C while the relative activity of the immobilized enzyme was 62.6%.

**Key words:** amyloglucosidase (AMG), chitosan microbead, immobilization enzyme activity

#### 서 론

Chitin을 고농도의 알카리용액으로 탈아세틸화하여 만든 chitosan은 초산이나 젖산같은 유기산의 묽은 수용액이나 무기산인 염산의 묽은 산 용액에도 매우 잘 용해되는 특징이 있어서 이것의 산업적 응용에 관하여는 매우 광범위한 분야에서 그 가능성이 검토되어 왔는데 그 중에서도 고정화를 위한 담체성분으로서의 이용 가능성에 대해서는 이미  $\alpha$ -chymotrypsin과 phosphatase, *Aspergillus*  $\beta$ -glucosidase 그리고 alkaline phosphatase와 pepsin, urease, penicillin acylase 등의 (Bisset:1978, Muzzarelli:1976) 효소를 대상으로 하여 확인해 두고 있는 실정이다.

1990년대 들어 chitosan을 이용한 담체로서의 적용을 위한 활발한 연구가 진행되어져 알코올 발효공업에 사용되어지는 효모의 담체로서 chitosan을 이용할 경우, 반복되는 batch column을 사용하여 최종적으로  $1.2 \times 10^{10}$  cells/ml-beads에 도달하였으며 알코올 생산에 있어서도 calcium alginate를 담체로 한 것보다 1.5배 더 높은 생산수율을 나타냈다고 보고하였고 (Shinonaga,1992),  $\beta$ -galactosidase를 chitosan에 결합시켰을 경우, free enzyme에 비하여 상대적으로 넓은 범위의 pH와 높은 온도에서 활성이 나타났지만 고정화된 효소활성이 free enzyme 보다 월등히 낮은 10.7%의 저조한 활성을 나타낸다고 보고하였다 (Carrara, 1994). 또한, 지방산 가수분해효소의 일종인 lipoprotein lipase의 chitosan 담체 고정화 시에 free enzyme에 비하여 약 40%의 활성을 나타내며 pH 및 온도 안정성, 보존성 등에서 매우 우수한 결과가 나타났다고 Itoyama 등 (1994)이 발표하였다.

Chitosan을 고정화효소용 담체로서의 가능성을 위해 알코올 발효 공업에 있어서 전분질의 당화에 대량 사용되는 amyloglucosidase 효소를 공유결합에 의한 고정화를 시도하여, free enzyme에 대한 고정화 가능여부와 고정화효소의 상대활성 및 각종 반응조건에서의 활성변화 등을 비교하고, 아울러, 실제의 생산공정에서 사용

되어지고 있는 주정발효원료인 액화전분질용액에 대한 효소반응을 실시하여, 이들 각종 효소를 이용한 고정화효소의 담체로서의 이용가능성에 대하여 검토하여 보았다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 실험재료

실험에 사용한 붉은 대게 (*Chinonectes japonicus*)는 경북 영덕군 해안지역의 수산가공공장에서 폐기되는 대게의 몸통부분 갑각을 수집하여 선별한 후 부착된 육 및 이물질을 제거하고 수세하여 50°C에서 열풍건조한 다음 20 mesh 정도의 크기로 분쇄하였고 효소고정화에 사용된 효소는 당화효소의 일종인 amyloglucosidase (상품명 AMG, NOVO社)를 사용하였으며 효소의 활성측정 실험에 사용되어진 기질은  $\beta$ -nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (NPG, SIGMA chemical co.,USA)이며 또 당화액 제조원료로는 쌀, 쌀보리, 옥수수 등의 각종 전분질원료를 발효시킨 다음, 연속식증류에 의한 주정 (알코올농도 95% v/v)을 생산하는 공정중, 당화공정 투입직전의 액화전분용액을 사용하였다[일산실업(주)].

##### 2. Chitosan microbead (Ch.B)의 제조와 효소의 고정화

20 mesh 정도의 분말 chitin (Park, 1995; Baik, 1995)을 사용하여 제조되어진 chitosan (탈아세틸화도 80%)을 4% (v/v) 초산용액에 녹여, 4% 농도의 chitosan용액이 되도록 한 다음, 여과 및 탈기과정을 거쳤다. 이 용액을 약 0.5 mm의 직경을 가진 노즐을 통하여 10% NaOH용액 (용매로 50% ethyl alcohol을 사용)에 침지시킨 다음 즉시, 냉수로서 연속적으로 세척시킨 다음 탈이온수에 담겨 보관하였으며 (Seo 등, 1988). Ch.B에 효소를 고정화시키기 위하여 먼저, 효소와 microbead간의 공유결합에 의한 접합을 유도할 수 있는 spacer 결합 (Fig. 1)을 실시한 뒤, 이들 spacer결합

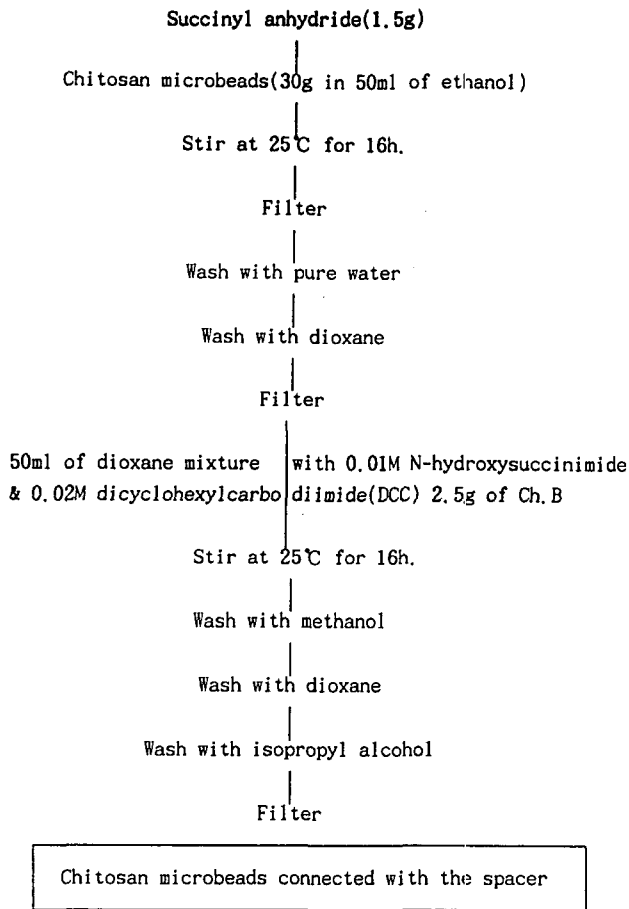


Fig. 1. Flow chart for the preparation of chitosan microbeads-connected with the spacer.

Ch.B에 대한 효소의 고정화를 Itoyama 등 (1994)의 방법에 따라 0.01M sodium acetate buffer (pH 4.2)용액, 25°C에서 16시간 (50 rpm) 실시하였다. 또한 효소의 고정화 정도는 고정화 전후의 효소 용액에 대한 단백질 농도의 차에 의해서 결정되며 효소단백질의 농도는 Lowry (1951)의 비색법에 의해 구하였다.

### 3. 고정화효소의 특성 측정

AMG 활성측정을 위한 기질로서 0.01M sodium acetate buffer (pH 4.2) 완충액에 0.1% NPG (p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranosidase)와 고정화효소를 0.01 M sodium acetate buffer (pH 4.2), total volume 1 ml에 55°C에서 15분간 반응시킨 후, Tyagi (1993)의 방법으로 측정하였으며 Ch.B에 고정화 되어진 효소와 free enzyme (20.9  $\mu$ g AMG/0.01M sodium acetate buffer, pH 4.2)의 각기 온도별 활성비교는 10°C에서 70°C까지의 범위내에서 10°C 간격으로 반응을 검토하였으며 pH별 완충액에 있어서의 활성비교는 pH 3.2~8.2까지의 범위내에서 1의 간격으로 반응을 진행시킨 후, pH 변화에 따른 고정화효소의 활성변화를 관찰하였다. 가열에 의한 활성변화 측정은 0.01M sodium acetate 완충액 (pH 4.2)중에서 각기 20°C에서 80°C까지 10°C 간격으로 1시간 가열시킨 다음 잔존 활성을 측정하여 효소의 고정화에 따른 내열성 변화를 관찰하였다. 고정화효소를 25°C, 0.01M sodium acetate 완충액 (pH 4.2)에

저장하였을 때, 저장기간에 따른 잔존 효소활성의 변화를 측정하여 장기저장에 따른 효소활성의 실행정도를 관찰하였다. 전당 측정은 시료용액 50  $\mu$ l (0~1 mg/1 ml)를 test tube에 취하고 Dubois (1956)의 전당분석법에 따라 485 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선으로 부터 구하였다 환원당 측정은 0.45  $\mu$ l membrane filter로 여과한 시료를 미리 처리해 놓은 SEP-PAK C<sub>18</sub> (Waters Inc. USA)에 통과시켜 그 통과액을 시료로 하여 분석하였으며 각각의 반응조건에 따른 전분용액은 아래식에 나타난 바와같이 원료의 전당에 대해 당화되어 생산되는 환원당의 비로서 나타내었다.

$$\text{당화율 (\%)} = \frac{\text{환원당} - \text{초기 환원당}}{\text{전당} - \text{초기 환원당}} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### 1. Chitosan microbeads에 의한 효소의 고정화

Chitosan을 이용하여 제조된 평균 크기가 1.2 mm인 microbead에 효소의 고정화를 위해 AMG용액을 1 mg~10 mg/ml 사이의 범위에서 1 mg/ml의 간격으로 제조하여 100 mg의 chitosan bead에 반응시킨 뒤, chitosan bead에 의하여 고정화 되어진 효소의 농도를 Fig. 2에 나타냈다. 15시간 동안의 반응과정중 6 mg/ml 농도의 효소용액까지 비교적 급속한 효소고정화율의 증가를 가져왔지만 이후, 반응효소농도의 증가에도 불구하고 거의 일정한 수준의 고정화율을 나타내고 있어 본 실험에서는 효소고정화를 위한 초기 AMG용액의 농도를 6 mg/ml로 결정하였다.

### 2. 고정화효소의 특성

#### (1) Free enzyme에 대한 고정화효소의 상대활성도

고정화효소의 상대효소 활성도는 Fig. 3에 나타난 바와같이 반응온도 (55°C), 반응시간 (15 min.)에서 free enzyme 활성의 97.8%

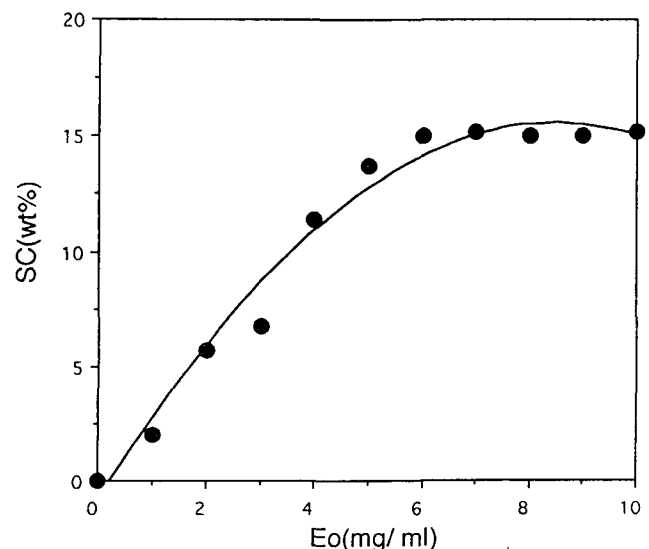


Fig. 2. Effect of the initial concentration (Eo) of AMG on the surface concentration (SC) of AMG immobilized into the chitosan beads.

에 달하고 있는 것으로 나타났다. 효소를 고정화함으로써 고정화된 AMG의 활성부위의 자유로운 활동이 억제됨과 아울러, 변화된 국소환경으로 인한 효소 및 기질, 그리고 반응물간의 원활한 이동이 억제되어 free enzyme에 대한 활성이 상대적으로 낮아질 수 있다는 것이 당연한 결과지만 본 실험에 사용되어진 AMG의 경우, 거의 free enzyme에 버금가는 효소활성을 나타내고 있는 것을 알 수 있다.

(2) 활성에 대한 온도 및 pH의 영향

Free enzyme 및 고정화효소의 기질 NPG에 대한 활성의 반응 온도에 의한 영향 (Fig. 2)을 나타냈는데 고정화효소의 효소활성의 최적온도조건은 55°C로서 free enzyme과 동일한 것으로 나타났으며, free enzyme 및 고정화효소의 기질 NPG에 대한 pH의 영향 (Fig. 4)은 AMG의 경우 비교적 산성영역에서 최대의 활성을

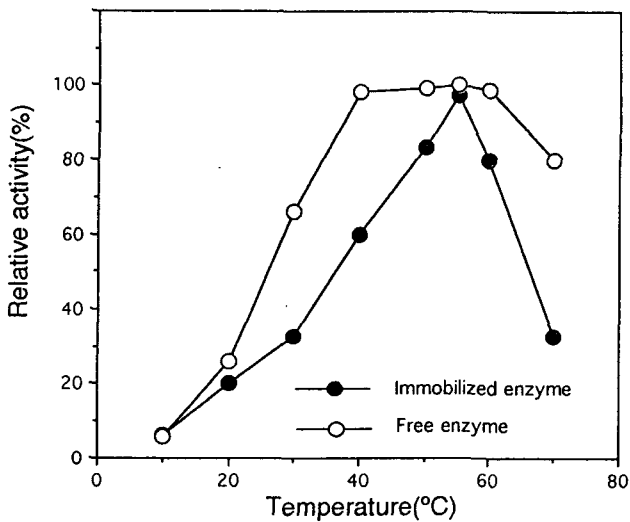


Fig. 3. Effect of the temperature on the relative activity of NPG hydrolysis (pH 4.2).

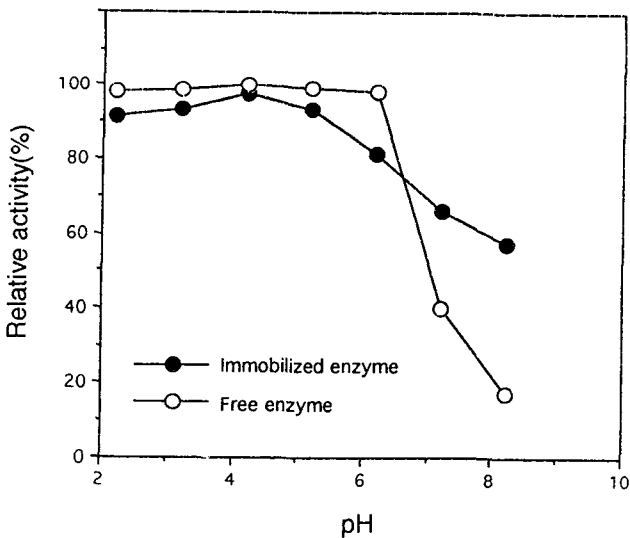


Fig. 4. Effect of pH on the relative activity of NPG hydrolysis at 55°C.

나타내고 있으며 중성으로 갈수록 활성이 급격하게 저하되었다. pH 최적활성조건은 pH 4.2로서 free enzyme과 동일하였으나 중성 이후의 영역에 있어서는 free enzyme에 비하여 상대적으로 높은 효소활성을 나타내었다. Roig 등 (1995)은 epoxy-activated plastic support를 이용한 고정화효소의 경우 효소의 고정화에 의한 최적 반응 pH영역의 이동에 대해 보고한 바있다.

(3) 활성에 대한 열처리의 영향

Free enzyme 및 고정화효소의 기질 NPG의 열처리에 의한 (Fig. 5) 내열성의 변화는 유리효소와 유사한 것으로 나타났다. 효소고정화에 의한 내열성 증대는 효소를 고정화시킴으로 말미암아 얻을 수 있는 보편적인 효과 중의 하나인데 특히, 공유결합에 의한 고정화효소인 경우에는 열이나 혹은 활성을 저해할 수 있는 약제에 대해 보다 강한 내성을 가지고 있는 것으로 Ulbrich 등 (1986)은 보고하였다. 가열에 의한 효소활성 실험의 kinetic curve 및 kinetic constant는 Fig. 6와 Table 1에 요약하였다. 본 연구결과, 가열온도 30°C를 기점으로 free enzyme에 비하여 상대적으로 소폭 증대되어진 활성을 나타냈다. Tyagi 등 (1994)도 DEAE-cellulose를 이용한 AMG의 고정화 실험에서 30°C 이상에서의 고정화에 의한 내열성 증대를 보고하였다. 또한 고정화된 효소를 0.01M sodium acetate 완충액 (pH 4.2) 중에 넣고 35°C의 온도에서 저장할 경우 free enzyme 및 고정화효소 모두 6개월 이상의 저장기간임에도 불구하고 활성변화가 나타나지 않아 저장 안정성이 높은 효소임을 알 수가 있었다.

3. 전분용액에 대한 고정화효소의 활성특성

반응온도 25°C에서 55°C까지의 범위에서 10°C 간격으로 구분하여 반응시켰을 때의 활성을 Table 2에 나타냈다. Free enzyme의 경우 55°C에서 약 91% 정도의 최대활성을 나타냈으며 각 반응온도의 분포에 따른 활성의 차이도 비교적 소폭이며 고정화효소의 경우도 55°C에서 57%로 최대의 효소활성을 나타내고 있으나 각 반응

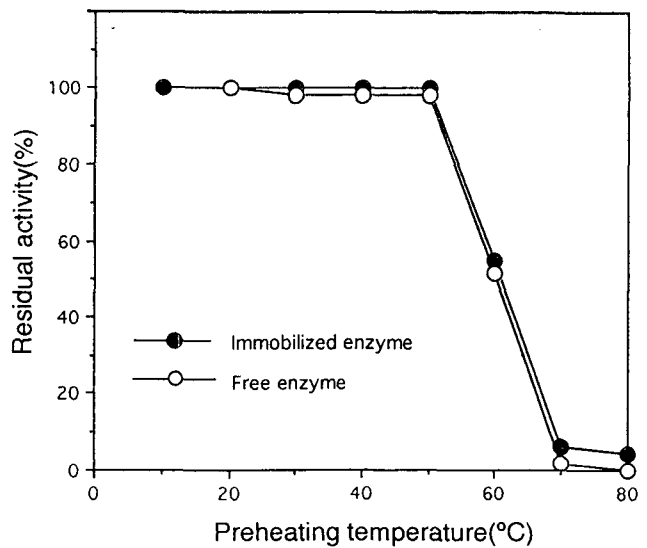


Fig. 5. Effect of heat treatment on the residual activity of the free and immobilized AMG.

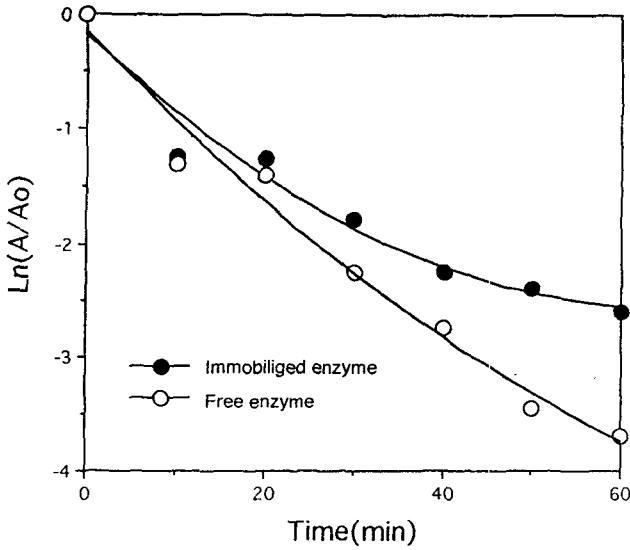


Fig. 6. Kinetics of thermal inactivation at 70 C for the free and immobilized AMG (hydrolysis of NPG, pH4.2, 55 C).

Table 1. Thermal inactivation rate constant,  $k_i$ , for the free and immobilized AMG at 70°C

Code	$K_i$ (min <sup>-1</sup> )
Free AMG	$6.36 \times 10^{-1}$
Immobilized	$4.54 \times 10^{-1}$

Table 2. Degree of saccharification of dextrinized starch solution (pH 5.4) by the free and the immobilized enzyme for 1 hr

Temperature (°C)	Free enzyme (=F.E) (%)	Immobilized enzyme (=I.E) (%)	RA* (%)
25	88.2	37.2	42.2
35	88.9	46.9	52.8
45	89.5	52.4	58.5
55	90.2	56.5	62.6

\*RA : Relative Activity =  $\frac{FE}{IE} \times 100$

온도별 활성치의 폭이 free enzyme에 비하여 상대적으로 큰 것으로 나타났다. Free enzyme에 대한 고정화효소의 상대활성에 있어서 또 다른 기질 즉, NPG의 경우, 반응온도 55°C에서 약 98%의 상대활성에 비하여 현저하게 낮은 62.63%의 상대활성을 나타낸 것은 Roig등 (1995)이 기질로서 비교적 긴 사슬의 감자전분용액을 사용한 경우, 약 50% 정도의 상대효소활성을 나타낸 것으로 보고한 바, free 및 immobilized enzyme의 활성을 비교해 볼 때 사용 기질 적용의 변화에 따라 발생할 수 있는 차이라고 판단된다. 즉, 비교적 작은 분자량 및 간단한 구조의 기질일 경우, 이들 기질과 효소와의 접촉에 의한 반응효율에 비하여 매우 큰 분자량 및 구조, 높은 점질성에 의하여 이들 기질과 효소와의, 특히 기질의 반응부위와의 접촉이 상대적으로 매우 어려웠던 것으로 판단되며 이러한 높은 점도의 기질들은 반응온도의 변화에 따른 점도변화가 민감한데 free enzyme의 경우 그 활동의 자유로움으로 말미암아 큰 영향을 받지않았던 반면 고정화AMG의 경우에는 상대적으로

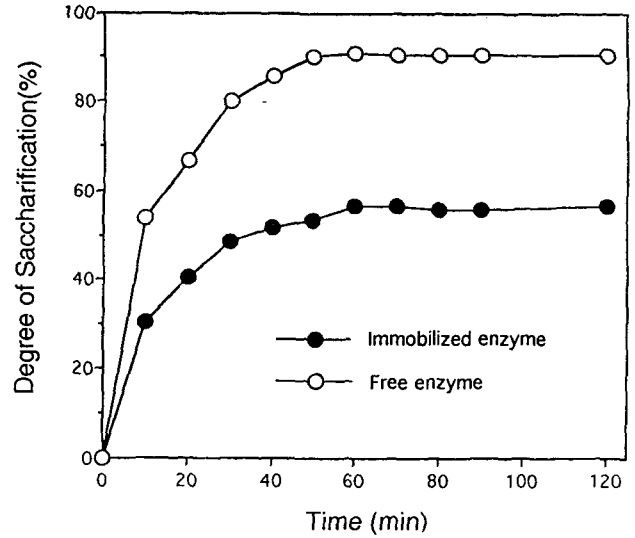


Fig. 7. Degree of saccharification of dextrinized starch by the free and immobilized AMG at pH4.5 and 55°C.

낮은 반응온도일수록 이에 따른 점성의 증가로 인한 효소와의 접촉에 더욱 큰 영향을 끼친 결과로 판단된다. 전분용액에 대한 반응시간의 경과에 따른 당화율의 변화를 Fig. 7에 나타냈다. 55°C의 반응조건에서 약 60분이 경과한 뒤에는 지속적으로 동일한 수준의 당화율을 나타내어 더 이상의 당화는 진행되지 않는 것으로 판단되며 전체 당화공정 중, 초기 반응시간 10분 동안에 약 50% 이상의 당화가 진행된 것으로 free 및 immobilized enzyme 모두 공통적으로 나타났다.

### 요 약

Chitosan의 산업적 응용분야 중 효소의 고정화담체로서의 이용 가능성을 확인하기 위한 방법으로 알코올 발효공업에서 다량으로 사용되어지고 있는 당화효소인 amyloglucosidase를 공유결합에 의한 고정화를 시도, 여러가지 반응조건에서의 활성변화를 free enzyme과 비교해 보았으며, 생산공정에서 사용되어지고 있는 액화전분용액에 대한 반응을 실시하여 효소고정화를 위한 담체로서의 chitosan 적용가능성을 검토한 결과, 제조되어진 chitosan bead의 직경은 약 1.2 mm 정도였으며 고정화시에 AMG의 농도 6 mg/ml가 최적의 반응액농도로서 더 이상의 농도 증가에도 불구하고 거의 일정한 수준의 고정화율을 나타내었으며 pH 4.2인 0.01 M sodium acetate완충액, 반응온도 55°C, 15 min의 조건에서 free enzyme에 대한 상대효소활성도는 97.8%에 달하였고, 고정화효소의 효소활성의 최적온도조건은 55°C로서 free enzyme의 그것과 동일한 것으로 나타났다. 고정화효소의 최적 활성조건은 pH 4.2로서 free enzyme과 동일하였으며 중성 이후의 영역에서는 free enzyme에 비하여 상대적으로 높은 효소활성을 나타내었고, 열에 대한 내성에 있어서, 가열온도 30°C를 기점으로 free enzyme에 비하여 상대적으로 소폭 증대되어진 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 알코올발효용 액화전분용액에 대한 free enzyme 및 고정화효소의 반응시, 두 시료 모두 55°C에서 최대의 활성을 나타

내었으나 고정화효소의 free enzyme에 대한 상대활성도는 62.6%였다.

### 참 고 문 헌

- Arasaratnam, V., T. Murugapoothy and K. Balasubramaniam. 1994. Effect of pH on preparation and Performance of Physically Immobilized Amyloglucosidase on DEAE-Cellulose. *Starch/starke*, 46, 146~149.
- Bisset, F., D. Sternberg. 1978. Immobilization of *Aspergillus* Beta-Glucosidase on chitosan. *Appl. Env. Microbiol.*, 35, 750.
- Carrara, C. and A. Rubido. 1994 Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase on Chitosan. *Biotech. Prog.*, 10, 220~224.
- Cherkasova, T.A., V.E. Vonskii and Y.A. Leikin. 1992. Covalent Immobilization of Proteinases on Polymeric Carriers with Epoxy groups. *Plenum Publishing*, 612~615.
- Freeman, A and Y. Dror. 1994. Immobilization of "Disguised" Yeast in Chemically Crosslinked Chitosan Beads. *Biotech. and Bioeng.*, 44, 1083~1088.
- Groboillot, A.F., C.P. Champagne, G.D. Darling, D. Poncelet and R. J. Neufeld. 1993. Membrane Formation by Interfacial Cross-Linked of Chitosan for Microencapsulation of *Lactococcus Lactis*. *Biotech. & Bioeng.*, 42, 1157~1163.
- Hadwiger, L.A. 1984. Chitin, Chitosan and Related Enzymes. *Academic Press, J. P. Zikakised., San Diago*, 291~302.
- Hirano, S., O. Miura. 1979. Alkaline phosphatase and pepsin immobilized in gels. *Biotech. Bioeng.*, 21, 711.
- Itoyama, K., S. Tokura and T. Hayashi. 1994. Lipoprotein Lipase Immobilization onto Porous Chitosan Beads. *Biotech. Prog.*, 10, 225~229.
- Kise, H. and A. Hayakawa. 1991. Immobilization of protease to porous chitosan beads and their catalysis for ester and peptide synthesis in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 584~588.
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, N.J., A.L. Farr and R.J. Randall, (1951), Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
- Muzzarelli, R., G. Barontini, R. Rocchetti. 1976. Immobilized enzymes on chitosan columns  $\alpha$ -Chymotrypsin and Acid Phosphatase. *Biotech. Bioeng.*, 18, 1445.
- Roig, M.G., A. Slade, J.F. Kennedy, D.W. Taylor and M.G. Garaita. 1995. Investigation of Stabilities, pH, and Temperature Profiles and Kinetic Parameters of Glucoamylase Immobilized on Plastic Supports.
- Seo, H. and Y. Kinemura. 1988. Preparation and some properties of chitosan porous beads. *Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan*, 22~24.
- Shinonaga M.A., Y. Kawamura and T. Yamane. 1992. Immobilization of Yeast Cell with Cross-Linked Chitosan Beads. *J. Ferment. Bioeng.*, 74, 90~94.
- Spagna, G., P.G. Pifferi and A. Martino. 1993. Pectinlyase Immobilization on Epoxy Supports for Application in the Food Processing Industry. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 57, 379~385.
- Tyagi, R. and M.N. Gupta. 1994. Noncovalent and Reversible Immobilization of Chemically Modified Amyloglucosidase and beta-Glucosidase on DEAE-Cellulose. *Process biochemistry*, 29, 443~448.

1998년 8월 25일 접수

1998년 10월 30일 수리