Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 6, No. 1, 33~40(1978).

固定化 Alkaline Protease에 關한 硏究

全 文 鎭·沈 相 國*·鄭 東 孝**

高麗大學校 農科大學 農化學科
**中央大學校 農科大學 食品加工學科

(1978년 3월 10일 수리)

Studies on Immobilized Alkaline Protease

Jun, M.J. · Shim, S.K.* · Chung, D.H.**

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Korea University
**College of Agriculture, Chung Ang University

(Received March 10, 1978)

Abstract

Immobilization of alkaline protease was investigated by absorbing the enzyme on adsorbents. Alkaline protease was adsorbed on silica gel selected as a carrier to immobilize the enzyme.

In this study, properties of the immobilized enzyme were compared with those of the soluble enzyme.

1) The optimum pH(10.0) of the enzyme was not changed, but the activity was increased at alkaline pH by immobilization.

2) The optimum temperature of the immobilized enzyme was shifted from 50° to 45°C, while the tem perature-activity profile became broader than those of the soluble enzyme.

3) The pH stability of the immobilized enzyme was significantely increased at pH 4.0, althouth it did not change in the neutral and alkaline pH region.

4) The heat stability of the enzyme was enhanced in the temperature range of 55°~65°C by the immobilization.

5) The immobilized enzyme retained 40% of its original activity after repetitive use for 6 times.

6) The enzyme stability was greately improved for a prolonged storage at 4°C.

序 論

酵素는 熱, 强酸, 强 알칼리 또는 有機溶媒등에 對해서 不安定하여 酵素反應을 하는데 適當한 環境에 있어서도 比較的 쉽게 失活한다. 또한 酵素는 生體觸媒(biocatalyst)로서 그 酵素反應은 一般의 化學觸媒의 경우와 顯著히 다르며 酵素를 물에 溶解한 狀態에서 基質에 作用시키는 batch process로 行하고 있다. 그러므로 反應마다 反應終了液中에서 酵素를 回收하는 것은 技術的으로 어렵고 反應生成物을 分離할 때에 變性, 失活시켜서 除去하고 있다. 이러한 觀點에서 酵素性質의 改善이 試圖되어 그 하나의 手段으로서 酵素를 觸媒活性을 가진 채로 물에 不溶性으로 하는 固定化가 檢討되어지게 되었다. 固定化酵素는 酵素反應後에 容易하게 除去할 수 있고 再使用을 可能하게 하는 有利한

*現, 韓國技術檢定公團(서울中區陽洞, 대우빌딩 24층)

性質을 가지고 있다[1~13].

固定化酵素 製造에 있어서는 物理的 方法과 化學的 方法이 있는데 物理的 吸着法에 있어서는 擔體로서 活性炭[14~21], 多孔性 glass,[22~24] 酸性白土[25~27], 活性白土[15,18,20,26], 漂白土[16], alumina,[14,29,30] kaolin,[28] silica gel,[31] gluten[32]등이 調査되었다.

Protease의 固定化에 關한 硏究는 Mitz와 Schlueter[33]가 cellulosic ion exchange의 유도체에 proteolytic enzyme 結合시켰고 Cressuell과 Sunderson[34]등이 *p*-amino phenylalanine-L-leucine에 pronase를 固定化하였다. 또 Kasuga[35]등은 Koniak에 acid protease를 包合시켰고, Gabel과 Hofsten[36]등은 agarose에 proteinase를 結合시켰고, Shaltiel[37]등은 CM-Sephadex에 pronase를 結合시켰다.

Brümmer[38]등과 Patel[39]등은 CM-Cellulose의 azide 誘導體에 pronase를 固定化하였으며, Sekine[40]은 Sepharose의 CNBr 活性化에 의해 neutral protease를 固定化하였으고, 邊[41]등은 ω-aminoalkyl에 sepharose를 固定化하였다.

本 實驗에서는 物理的 吸着法에 依해서 pronase alkaline protease를 silica gel에 吸着시켜서 固定化하여 soluble alkaline protease와 酵素的 性質을 比較 實驗한 結果의 一部를 보고한다.

實 驗 方 法

1. 實驗材料

(1) 酵素液 : 酵素는 標品 bacterial alkaline protease(日本長瀨産業(株))를 使用하였다. 이 酵素劑 0.05 g을 蒸溜水 100 ml에 加하여 가끔 振盪하면서 30°C에서 20分間 放置한 후 濾過하여 그 濾液을 使用하였다. 酵素液의 pH 調節에는 N NaOH와 N HCl을 使用하였다.

(2) 擔體 : Activated clay, kaolin, silica gel, activated alumina, activated carbon, charcoal bone Amberlite CG-50, acid clay, Wako gel를 105~110°C에서 30分間 乾燥한 후 desiccator에 保管하여 使用하였다.

2. 酵素活性 測定方法

Hammarsten casein을 基質로 하여 酵素를 作用시킨 후 Anson-Ogihara 變法에 의해 그 活性을 測定하였다[42,43].

(1) 基質의 調製 : pH 6.0~7.0의 基質은 Hammarsten casein 1.2 g을 0.05 M Na_2HPO_4 160 ml에 加하여 20°C 以內에서 加溫하면서 溶解하여 pH 調節한 후 200 ml로 하였으며 pH 8.0 以上에서 0.05 M는 boric acid로 溶解하여 pH를 調節한 後 200 ml로 하여 使用하였다.

(2) 活性測定

1) **可溶性酵素의 경우** : 두個의 試驗管에 各各 酵素液 1 ml와 0.1 M glycine NaCl-NaOH burffe (pH 10.0) 2 ml를 取하고, 反應試驗管을 40°C water bath에 넣어 5분 후 미리 40°C로 加溫한 0.6% casein 基質 5 ml를 加하여 10分間 反應시킨 후 0.44 M trichloroacetic acid 5 ml를 加하여 反應을 中止시키고 30分間 放置한 後 沈澱의 形成이 完了된 後에 濾過하였다.

對照試驗管은 water bath에서 먼저 0.44 M trichloroacetic acid를 加하고 계속해서 0.6% casein 5 ml를 加하여 30分間 放置 후 濾過하였다.

各各의 濾液을 試驗管에 2 ml씩 取한 후 0.55M Na_2CO_3 5 ml 및 3倍로 稀釋한 Folin 試藥 1 ml를 加하여 30°C에서 30分間 發色시켜 Spectrophotometer(Unicum SP 600 UV)를 使用하여 660 nm에서 吸光度(optical density)를 測定하여 그 差로서 酵素의 活性을 算出하였다.

2) 固定化酵素의 경우 : 0.8 g의 固定化酵素를 試驗管(직경 3.5 cm)에 取하여 0.1M glycine NaCl-NaOH buffer (pH 10.0) 2 ml를 加하여 40°C water bath에서 진탕시키면서 가용성酵素와 같은 操作을 하였다.

對照試驗管에는 固定化酵素대신 擔體 0.8 g을 取하고 0.1M glycine NaCl-NaOH buffer(pH 10.0) 2 ml를 加하여 가용성酵素와 같은 操作을 하였다.

各各의 濾液을 가용성酵素의 경우와 같은 方法으로 發色시켜 그 差로서 酵素의 活性을 測定하였다.

本 實驗에서는 最大活性을 100으로 하여 相對活性으로 表示하였다.

3. 固定化酵素의 製造方法

(1) 擔體의 選擇 : 擔體를 選擇하는데 있어서 吸着條件은 다음과 같이 하였다. 擔體 1 g에 對해 pH 10.0으로 調節된 酵素液 5 ml를 加하여 가끔 振盪混合하면서 30°C에서 30分 放置한 후 10分間 원심분리(3000 rpm) 시킨 후 濾液에 殘存하는 酵素의 活性을 測定하여 吸着反應 前의 酵素의 活性과 比較하여 吸着率을 求하였다.[26]

또한 60 ppm의 tyrosine에 對하여서도 같은 方法에 의해 吸着反應 前後의 tyrosine 濃度를 測定하

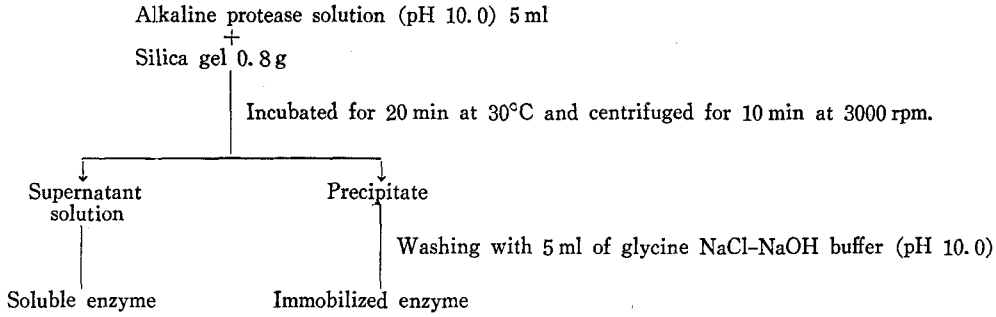

Fig. 1. Preparation of Immobilized Alkaline Protease.

여 吸着率을 求하였다.

그리고 固定化酵素의 活性을 測定하였다.

(2) 吸着時間 및 擔體量에 따른 酵素의 吸着率의 測定 : 吸着時間을 求하기 위하여 擔體 1g에 對해 酵素 5 ml 加하여 30°C에서 一定時間 放置後 10分間 원심분리(3000 rpm) 시키고 吸着殘存液의 酵素活性을 測定한 후 吸着反應前의 酵素의 活性과 比較하여 吸着率을 求하였다.[18]

또한 擔體量을 求하기 위하여 酵素 5 ml를 加하고 30°C에서 20分間 放置한 후 10分間 원심분리시키고 吸着殘存液의 酵素活性을 測定하여 吸着反應前의 酵素의 活性과 比較하여 吸着率을 求하였다.

本 實驗에서는 다음과 같은 方法(Fig. 1)에 의하여 固定化酵素를 製造 使用하였다.

4. 固定化酵素의 性質

(1) 最適 pH : 固定化酵素의 最適 pH를 調査하기 위하여 pH 6.0~8.0은 M/15 phosphate buffer를 pH 9.0~13.0은 0.1M glycine NaCl-NaOH buffer를 使用하여 pH 1.0의 間隔으로 pH 6.0~13.0까지 各各 그 酵素活性을 調査하였다. 常法에 따라 酵素의 活性을 測定하여 그 活性度를 blank와의 差로서 나타내었다. 또 比較 對照하기 위하여 가용성酵素에 對해서도 같은 實驗을 行하였다.

(2) 最適溫度 : 固定化酵素의 最適溫度를 調査하기 위하여 0.1M glycine NaCl-NaOH buffer를 使用하여 pH 10.0으로 調節한 후 5°C 간격으로 30°C~70°C까지 調査하였다. 常法에 따라 酵素의 活性을 測定하여 그 活性度를 blank와의 差로서 나타내었다. 또 比較對照하기 위하여 가용성酵素에 對해서도 같은 實驗을 하였다.

(3) pH에 對한 安定性 : 固定化酵素의 pH安定性에 對하여 調査하기 위해서 pH 3.0~8.0까지는 0.1M McIlvaine buffer를, pH 9.0~12.0까지는 0.1M glycine NaCl-NaOH buffer를 使用하여 pH 1.0 간격으로 pH 3.0~12.0으로 各各 pH를 調節한 후 30°C에서 120分間 前處理한 후 最適條件으로 調節하여 그 殘存力價를 調査하였다.

常法에 따라 酵素의 活性을 測定하여 그 活性度를 blank와의 差로서 나타냈다. 또 比較對照하기 위하여 가용성酵素에 對해서도 같은 實驗을 하였다.

(4) 熱에 對한 安定性 : 0.1M glycine NaCl-NaOH buffer로 pH 10.0으로 調節한 酵素를 30°C~70°C의 各 溫度에서 30分間 維持시킨 후 그 殘存力價를 調査하였다. 常法에 따라 酵素의 活性을 測定하여 그 活性度를 blank와의 差로서 나타냈다. 또 比較對照하기 위해 가용성酵素에 對하여서도 같은 實驗을 하였다.

5. 固定化酵素의 再使用時의 活性變化

이와 같은 固定化酵素에 對하여 連續的으로 再使用할 수 있을 것인가에 대하여 檢討를 하였다. 製造한 固定化酵素를 batch process로 다음과 같은 方法(Fig. 2)으로 再使用하여 酵素活性의 減少度를 調査하였다. 즉 固定化酵素 0.8g에 0.1M glycine NaCl-NaOH buffer(pH10.0) 2 ml를 加한 후에 酵素의 活性測定方法에 依하여 酵素反應시킨 後 0.44M trichloroacetic acid를 加하지 않고 反應液과 固定化酵素를 10分間 원심분리 (3000 rpm)하여 濾液에 對해서 casein 分解程度를 Folin으로 測定하고, 한편 固定化酵素는 0.1M glyceine NaCl-NaOH buffer(pH 10.0) 2 ml를 添加하여 最初의 操作方法으로 酵素反應을 하였다.[35]

6. 固定化酵素의 保存中의 活性變化

固定化酵素를 製造하여 냉장고(4°C)內에 保存하면서 1日間隔으로 活性의 變化를 보았다. 또 比較對照하기 위하여 가용성酵素에 對하여서도 같은 實驗을 하였다.

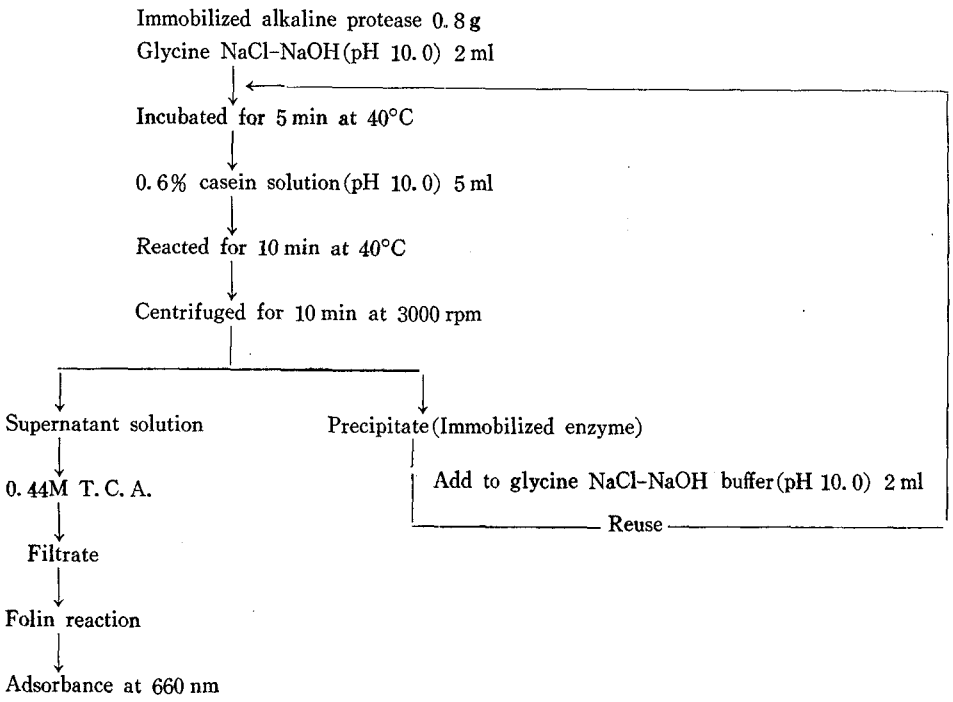

Fig. 2. Reuse of Immobilized Alkaline Protease.

結果 및 考察

1. 擔體의 選擇

擔體를 選擇하는데 있어서 酵素의 높은 吸着率과 높은 酵素活性을 維持하면서 酵素反應에 의하여 生成된 tyrosine을 吸着하지 않는 것으로 擇하였다. Table 1에서와 같이 kaolin과 silica gel은 酵素를 잘 吸着하나 tyrosine은 거의 吸着하지 않았다.

Table 1. Properties of Carriers.

Carrier	Enzyme adsorbed(%)	Tyrosine adsorbed(%)
Activated clay	88.2	40.2
Kaolin	100	0
Kaolin*	97.3	3.2
Silica gel	100	0
Activated alumina	63.3	12.9
Activated carbon	97.1	91.8
Charcoal bone	97.4	62.1
Amberlite CG 50.	93.8	10.5
Acid clay	84.8	9.5
Wako gel	100	43.9

*Maker is different.

Kaolin과 silica gel에 吸着된 酵素(固定化酵素)의 活性을 測定한 結果 silica gel에 吸着된 酵素는 높은 活性率을 나타냈으나 kaolin에 吸着된 酵素는 活性을 거의 나타내지 않았다.

本 實驗에서는 固定化酵素의 擔體로서 silica gel을 選擇하였다.

2. 吸着時間 및 擔體量에 따른 酵素吸着率의 測定

Fig. 3에서와 같이 短時間에 吸着平衡에 達하였으며 20分 以後에는 吸着率이 100%에 到達하였다.

이는 glucoamylase를 酸性白土에 吸着시켰을 때[18] 15分 吸着된 것과 거의 같은 時間이며 glucose oxidase를 活性炭, activated alumina에 吸着시켰을 때[15] 2時間 吸着시킨 것 보다 짧은 時間이다.

本 實驗에서는 固定化酵素 製造時 吸着時間을 20分으로 하였다.

한편 擔體의 量에 따른 酵素의 吸着率의 測定은 Fig. 4에서와 같이 擔體의 量과 吸着率과는 直線的 關係를 나타내지 않았으며 擔體單位當 吸着酵素量이 一定하지 않았다. 이는 glucoamylase를 activated clay에 吸着시켰을 때[18]의 結果와 같았다.

Fig. 4에 있어서 (A)는 擔體의 吸着能이 100%인 飽和 吸着狀態이고 (B) 部分은 酵素의 全部를 吸着하지 않은 狀態인 不飽和 吸着狀態이다.

本 實驗에서는 固定化酵素의 製造時 擔體의 量

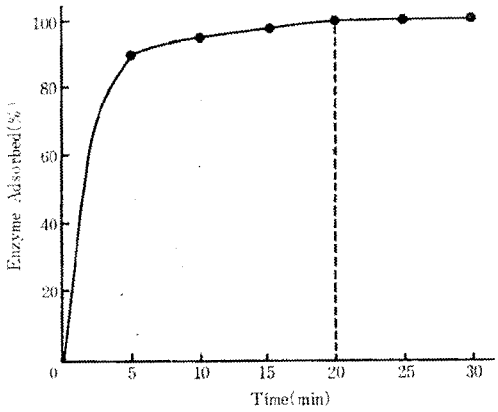

Fig. 3. Adsorption of Enzyme by Time Course.

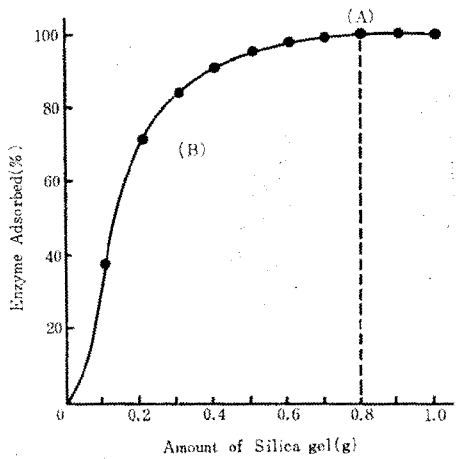

Fig. 4. Adsorption of Enzyme by Silica gel.

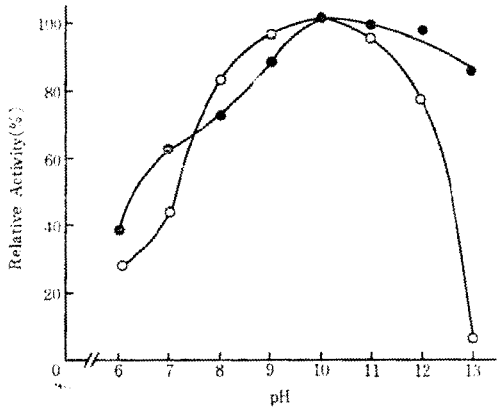

Fig. 5. Effect of pH on Enzyme Activity.
—○— : Soluble enzyme
—●— : Immobilized enzyme

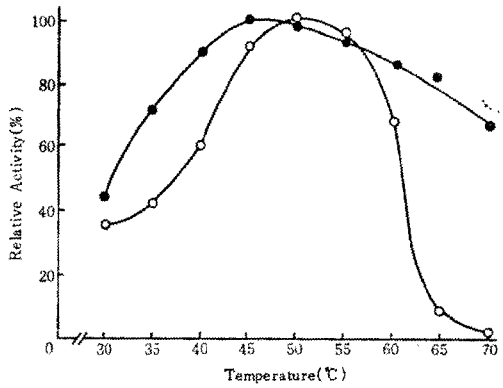

Fig. 6. Effect of Temperature on Enzyme Activity.
—○— : Soluble enzyme
—●— : Immobilized enzyme

을 0.8g으로 하였다.

3. 固定化酵素의 性質

(1) 最適 pH : Fig. 5에서와 같이 固定化酵素의 最適 pH는 가용성酵素의 最適 pH와 같이 pH 10.0으로 나타났다. 酵素를 固定化하는 경우 最適 pH가 移動하는 경우와 移動하지 않는 경우가 있는데 本 實驗의 경우는 最適 pH가 變하지 않았다.

그러나 가용성酵素의 相對活性이 pH 12.0에서 76%, pH 13.0에서는 6%로서 活性이 떨어진 것에 대하여 固定化酵素는 pH 12.0에서 96%, pH 13.0에서 84%로 나타났다. 즉 固定化酵素는 強알칼리側에서 可溶性酵素보다 높은 活性을 나타냈다.

(2) 最適 溫度 : Fig. 6에서와 같이 固定化酵素의 最適溫度는 45°C로서 可溶性酵素의 最適溫度 50°C보다 5°C의 差異를 보였다.

酵素를 固定化하는 경우 最適溫度가 變하지 않는 경우와 變하는 경우가 있다. 本 實驗에서는 最適溫度가 變하였으나 可溶性酵素의 相對活性은 60°C~65°C~70°C에서 70%~8%~2%로 낮아진 反面, 固定化酵素는 85%~82%~8%로 나타났다. 즉 固定化酵素는 高溫에서 可溶性酵素보다 높은 活性을 나타냈다.

(3) pH에 對한 安定性 : Fig. 7에서와 같이 固定化酵素는 可溶性酵素와 같이 pH 6.0~12.0의 넓은 範圍에서 安定하였다. pH 4.0에서 固定化酵素는 可溶性酵素보다도 높은 相對活性을 나타냈고, 酸性쪽에서 可溶性酵素보다도 높은 安定性을 나타냈다.

(4) 熱에 對한 安定性: Fig. 8에서와 같이 可溶性

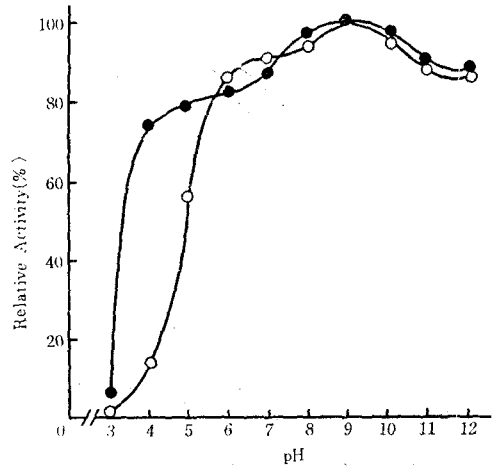

Fig. 7. pH Stability of Enzyme Activity,
—○— : Soluble enzyme
—●— : Immobilized enzyme

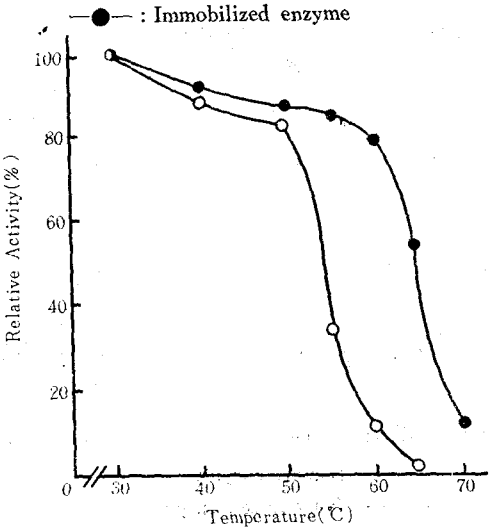

Fig. 8. Heat Stability of Enzyme Activity.
—○— : Soluble enzyme
—●— : Immobilized enzyme

酵素는 50°C 까지 安定하나 65°C 以上에서는 거의 失活되었다. 固定化酵素는 60°C 까지 安定하고 65°C에서도 相對活性이 58%를 나타내었고 70°C에서 16%로 낮아졌다.

本 實驗에서 固定化酵素가 可溶性酵素보다 高溫에서 安定함을 나타냈다.

4. 固定化酵素의 再使用時의 活性變化

Fig. 9에서 나타난 바와 같이 1회때보다 2~3회 使用時의 活性이 높게 나타났다. 그것은 1~2회 使用하므로서 酵素가 보다 더 溶出되기 쉽게 되는 것이 하나의 原因이라고 생각된다. 이와같은 結果

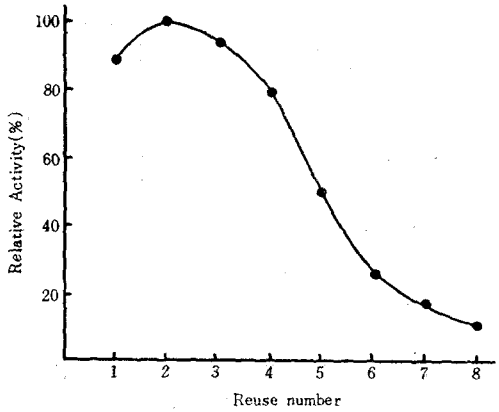

Fig. 9. Variation of Enzyme Activity by Reuse.

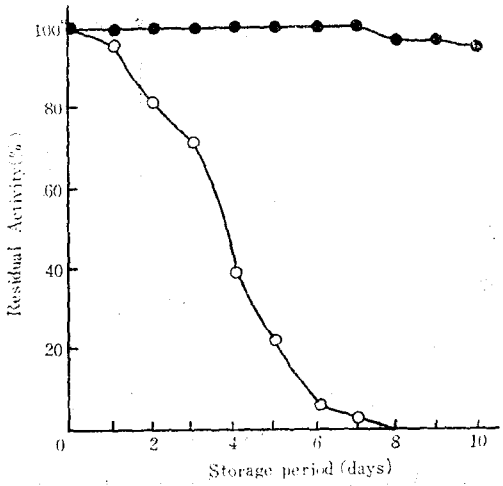

Fig. 10. Time Course of Decrease of Enzyme Activity at Refrigerator (4°C).
—○— : Soluble enzyme
—●— : Immobilized enzyme

는 koniak에 glyoxal을 處理하여 acid protease를 不溶化한 경우[35]와 같은 現象이라고 생각된다. 6回 使用하였을 때에 1回 使用時의 約 40%의 殘存活性을 나타내었다. 이 固定化酵素는 column 充塡에 依해서 連續的 使用의 可能性이 檢討될수 있다고 생각된다.

5. 固定化酵素의 保存中의 活性變化

Fig. 10에서와 같이 可溶性酵素는 냉장고(4°C)에서 3일째부터 活性이 低下하여 6일 後에는 거의 活性을 나타내지 않았다. 여기에 對하여 固定化酵素는 냉장고(4°C)에서 10日後까지 活性을 維持하였다. 可溶性酵素를 固定化할 경우 保存性이 增加한다는 事實을 나타낸다.

總 括

吸着劑에 酵素를 吸着시키는 方法에 의하여 酵素의 固定化를 試圖하였다. 擔體로서 選擇된 silica gel에 alkaline protease를 吸着시켜서 固定化 alkaline protease를 製造하였다.

本 論文에서 固定化 alkaline protease의 酵素化學的 性質을 soluble alkaline protease와 比較하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 固定化 alkaline protease의 最適 pH (10.0)는 soluble alkaline protease와 같았으나 알칼리 pH에서는 活性이 增加하였다.
2) 固定化 alkaline protease의 最適溫度는 50°C에서 45°C로 낮아졌다. 그러나 活性은 可溶性酵素보다 幅이 넓게 나타났다.
3) 固定化 alkaline protease의 pH 安定性은 soluble alkaline protease와 비슷하나 pH 4.0에서는 活性이 增加하였다.
4) 固定化 alkaline protease의 熱 安定性은 特히 55°C~65°C에서 增加되었다.
5) 固定化 alkaline protease를 batch 方法에 의하여 6回 再使用하였을 때 1回 酵素反應時의 40%의 相對殘存活性을 나타내었다.
6) 固定化 alkaline protease의 保存性이 크게 增加되었다.

參 考 文 獻

1) 千畑一郎, 土佐哲也：蛋白質・核酸・酵素, **11**, 23 (1966).
2) Silman, I.H. and Katchalski, E.: *Ann. Rev. of Biochem.*, **35**, 873 (1966).
3) 植村定治郎・相田浩 編： 醱酵と微生物, Ⅱ, 109, 朝倉書店 (1970).
4) Lemuel, B., Wingard, Jr.: *Enzyme Engineering*, 177, Interscience publisher. John Wiley & Sons (1972).
5) Deriman, D.: *Advances in Applied Microbiology* **15**, 13, Academic Press (1972).
6) Shuichi Aiba, Arthur E. Humperey, Nancy F. Millis: *Biochemical Engineering* 2nd ed. 393, University of Tokyo Press (1973).
7) Richardson, T. et al.: *J. of Food Science*, **39**, 645 (1974).
8) 한문희：産業微生物學會誌, **3**, 165 (1975).
9) 千畑一郎：固定化酵素, 講談社 (1975).
11) 日本生化學會編：生化學實談講座 5, 酵素研究法(下), 641 (1975).
11) 千畑一郎：日本醸造協會雜誌, **71**, 2 (1976).
12) 三浦喜溫：化學工學, **40**, 118 (1976).
13) 千畑一郎：*New Food Industry*, **18**, 66 (1976).
14) Nelson, J.M. and Griffin, E.G.: *J. Am. Chem. Soc.*, **38**, 1109 (1916).
15) Miyamoto, K, T. Fugii and Y. Miura: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 565 (1971).
16) Stone, I.: U.S. Pat., 2717852 (1955).
17) 富永正, 新見國弘, 椙原久之：日本特許. 昭 43-23560 (1968).
18) 宇佐美昭次, 山田徹, 木村昭子：醱酵協會誌, **25**, 513 (1967).
19) 富永正・新見國弘, 椙原久之：日本特許, 昭40-27319 (1965).
20) 木村昭子, 白崎春海, 宇佐美昭次：工業化學雜誌, **72**, 489 (1969).
21) 宇佐美昭子, 松原路子, 野田治郎：醱酵協會誌. **29**, 195 (1971).
22) Weetall, H.H.: *Science*, **166**, 615 (1969).
23) Weetall, H.H. and L.S. Hersh: *Biochim. Biophys. Acta*, **185**, 464 (1969).
24) Marsh, D.R., et al.: *Biotech. & Bioeng.*, **15**, 483 (1973).
25) 富金原孝, 渡邊一穗：日本特許, 昭 40-27319 (1965).
26) 宇佐美昭次, 武富昇醱：酵協會誌, **23**, 267 (1965).
27) 宇佐美昭次, 白崎春海：醱酵工學雜誌, **48**, 506 (1970).
28) Mclaren, A.D.: *Science*, **125**, 697(1957).
29) Herring, W.M., et al.: *Biotech. & Bioeng.*, **15**, 69 (1973).
30) Charles, M. et al.: *Biotech. & Bioeng.*, **17**, 203 (1975).
31) Tosa, T., T. Sato, T. Mori, Y. Matuo and I. Chibata: *Biotech. & Bioeng.*, **15**, 69 (1973).
32) Rothfus, J.A. and S.T. Kennel: *Cereal Chem.*, **47**, 140 (1970).
33) Mitz, M.A. and Schlueter, R.J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4024 (1959).
34) Cresswell, D. and A.R. Sanderson: *Biochem.*

J., **119**, 447 (1970).
35) 春日茂, 大池國威, 小林時夫, 鈴木周 : 醱酵協會誌, **28**, 299 (1970).
36) Gabel, D. and B.V. Hofsten: *Bur. J. of Biochem.*, **15**, 410 (1970).
37) Shaltiel, S., R. Mizrahi, Y. Stupp and M. Sela: *Eur. J. of Biochem.*, **14**, 509 (1970).
38) Brümmer, W., N. Hennrich, M. Klocknow, H. Lang and H.D. Orth: *Eur. J. of Biochem.*, **25**, 129 (1872).
39) Patel, A.B., R.O. Stasiw, H.D. Brown and C.A. Ghiron: *Biotech. & Bioeng.*, **14**, 1031 (1972).
40) Hiroshi Sekine: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 437 (1973).
41) 변시명, 배은옥 : 한국식품과학회지, **8**, 125 (1976).
42) 赤堀四郎 : 酵素研究法 Ⅱ, 朝倉書店, 240(1967).
43) 東京大學 農學部 農藝化學教室編 : 實驗農藝化學 上卷, 朝倉書店, 281 (1960).