

☒ 응용 논문

**Methyl- β -D-Fructofuranoside 합성을
위한 고정화 전화당 효소의 미소환경 최적화**
-Microenvironmental Optimizat on of Immobilized
Invertase for Methyl- β -D-Fructofuranoside Synthesis-

허주형* · 안형환**

Heo, Joo Hyung · An, Hyung Hwan

Abstract

In order to enhance the selectivity, productivity and yield of methyl fructoside, which was synthesized by enzymatic glycosylation of sucrose and methanol solution, controlling of surface property of solid support using different immobilization procedures optimized microenvironment of immobilized invertase. Silanization and polyethylene imine coating methods were adopted to give a hydrophobic and hydrophilic environment of immobilized invertase. As a result, polyethyleneimine coating method gave higher loading of enzyme, effective activity, and relative activity than silanization method, because it brought on increasing the functional density of amino group and enhancing the conservation of activity by regulating of hydrophilicity. And then, hydrophilic environment was possible to restraint the assessing of methyl fructoside molecule, which was more hydrophobic than sucrose, fructose, and glucose molecule in the reaction mixture, into the active site of immobilizedinvertase. Consequently, hydrophilic microenvironment of immobilized invertase by polyethyleneimine coating obtained higher yield and productivity with increasing conversion than silanized and native invertase. Thus, this procedure optimized the microenvironment of immobilized invertase suitable for the enzymatic synthesis of methyl fructoside.

1. 서 론

당 화합물의 기능성과 생리활성은 당과 결합하는 다른 단위체와의 입체적 배향과 치환도에 따라서 다양하게 조절된다.[17, 22]. 당분자는 아노머 탄소의 수산기와 이웃수산기들에 의하여

*서강대학교 화학공학과

**충주대학교 안전공학과

나타나는 입체적 특이성에 의하여 혼성 생화합물 설계의 효과적인 기본 골격체로서 이용되고 있다. 이에 따라 당 고분자(sugar polymer), 당 지방산 에스테르(sugar fatty acid ester), 및 당 폴리에스테르(sugar polyester)등 당을 모체로 다양한 기능성을 부여하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[4, 6, 15].

당 화합물의 합성은 관능기의 보호, 활성화 및 탈보호 과정을 필요로하는 화학적 합성법보다는 입체 및 위치 선택성을 이용한 효소적 합성법이 반응단계를 단순화할 수 있고 분리정제 비용을 줄일수 있으므로 바람직한 합성법으로 평가되고 있다. 특히, 미수계에서 효소의 촉매활성이 유지됨을 보고한 이래[14], 유기상 반응매질, 무용매상 반응매질 및 초임계상 반응매질에서 기능성 당 화합물의 합성에 관한 연구가 활발히 진행되어지고 있다[5,10,11].

당은 친수성이 높아 유기반응매질에 대한 용해도가 낮으므로 알킬글리코시드[7], 유기붕산 복합체[18] 및 당 아세탈[13] 등의 당 유도체를 이용하고 있는데, 최근 [2, 4]의 연구결과로부터 메틸 프럭토시드(methyl- β -D-fructofuranoside)의 물리화학적 특성이 기존의 당 혹은 당 유도체보다 당 화합물 합성에 효과적이고, 메틸 프럭토시드는 과당이나 자당 혹은 레반이나 이눌린으로부터 메탄올과의 산촉매 배당화 반응에 의하여 얻을 수 있는데, 자유과당은 자당, 레반 및 이눌린에서의 경우와 달리 수용액상에서 주로 베타, 피란형으로 존재하며, 화학적 호변 이성화에 의하여 배당화시 각각의 이성질체가 모두 생산되는 어려움을 갖고 있다[16]. 그러므로, 순수한 퓨란형의 베타-메틸 프럭토시드를 얻기 위해서는 효소적 합성법에 근거하여 자당, 레반 혹은 이눌린과 같이 결합형태의 과당(베타, 퓨란형)으로부터 합성하는 것이 보다 효과적이다.

메틸 프럭토시드를 합성하기 위한 효소로는 가수분해효소인 전화당 효소와 전이효소인 이눌리나아제와 레반수크라아제 등을 이용할 수 있으나 전화당 효소를 제외한 대부분의 경우 효소 비용의 비중이 높고, 수율이 낮아 실험실 규모의 연구수준에 머물러 있다.

따라서 메틸 프럭토시드의 효소적 생산이 실용화 되기 위해서는 수율과 생산성을 획기적으로 높일 수 있는 방안이 제시되어야 하는데, 여러 매개변수의 최적화 뿐 만아니라, 대량생산이 가능한 고정화 효소의 반응 기술에 관한 체계적인 연구가 필수적이다.

고정화 효소에 의한 메틸 프럭토시드 합성은 고정화 담체의 표면특성과 고정화된 효소의 미소환경이 갖는 친수-소수 분위기 및 반응물과 생성물의 친수성과 소수성의 특성에 따라 반응평형과 수율 및 생산성이 좌우되므로, 고정화 담체의 표면특성 조절이 배당체 합성의 유효 매개변수로 작용하기 때문에 메틸 프럭토시드의 수율과 생산성을 높일 수 있는 근본적인 방안은 고정화 효소촉매의 미소환경을 조절할 수 있는 신촉매 기술의 개발이 유일한 방법이라 할 수 있다.

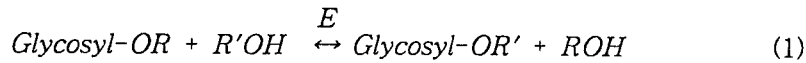
본 연구에서는 고정화 기법에 따른 담체의 표면화학적 특성변화에 따라서 메틸 프럭토시드 합성에 효과적인 전화당 효소의 미소환경 조절하고자 하였다.

2. 이론적 배경

2.1 메틸 프럭토시드의 합성반응

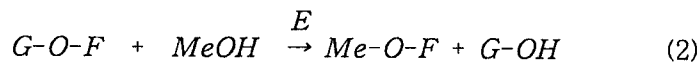
일반적으로 배당체의 합성반응은 당 공여체인 glycosyl-OR이 당 수용체인 ROH와

글리코시드 결합을 이루는 반응으로 다음과 같이 표시되며,

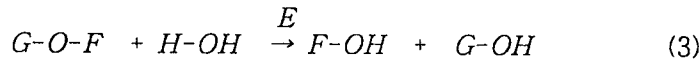


글리코시다아제를 이용하면 입체특이성과 위치특이성에 의하여 정해진 글리코시드 결합만이 이루어진다. 당 공여체와 반응하는 당 수용체가 물이면 가수분해(hydrolysis), 알코올이면 알코올(alcoholysis)분해라고 하며, 알코올 분해반응에 의한 배당화로 배당체가 생성된다.

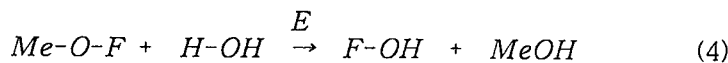
메틸 프럭토시드의 합성반응은 다음과 같이 진행된다. 자당($G-O-F$)과 메탄올($MeOH$) 수용액을 전화당 효소(E)로 반응시키면 알코올 분해반응에 의하여 메틸 프럭토시드($Me-O-F$)와 포도당($G-OH$)이 생성되면서



동시에 자당의 가수분해반응에 의하여 과당($F-OH$)과 포도당이 생성된다.



또한, 알코올 분해반응에 의하여 생성된 메틸 프럭토시드는 다시 전화당 효소의 기질로 작용하여 다음과 같이 가수분해될 수 있다.



메틸 프럭토시드의 생산성과 수율을 극대화하려면 위의 (4)식과 같은 생성물의 분해 반응을 억제하여야 한다. 반응 생성물인 메틸 프럭토시드가 다시 효소와 기질 착화합물을 형성하지 못하도록 조절하면 메틸 프럭토시드의 분해반응이 억제될 수 있으며, 이와같은 가수분해반응 억제 조절은 효소의 미소환경을 메틸 프럭토시드 합성반응에 유리하도록 조절함으로써 가능하다고 판단된다. 즉, Fig. 1에 나타낸 바와 같이, 전화당 효소를 강력한 친수성 표면위에 고정화한다면, 반응 생성물인 메틸 프럭토시드보다 친수성이 큰 자당, 포도당, 과당 및 물분자의 접근은 자유로우나 메틸 프럭토시드 분자의 접근은 억제될 것으로 판단된다.

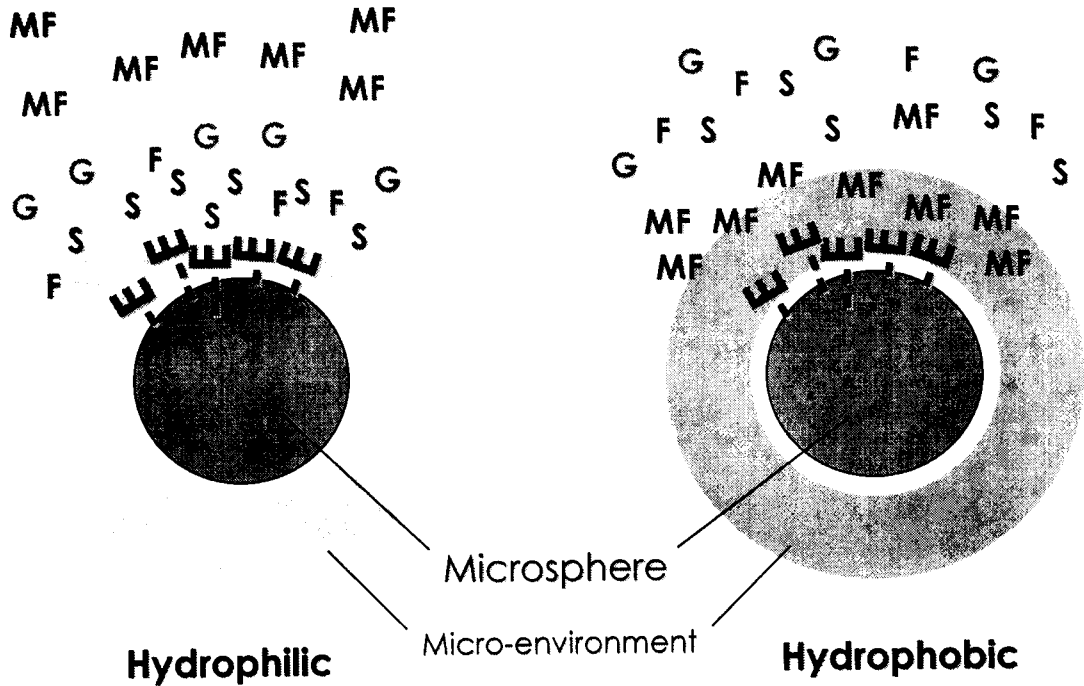


Fig. 1. Schematic diagram of micro-environment control of enzyme-bound microsphere.

(E: enzyme, F: fructose, G: glucose, MF: methyl fructoside, MF: methyl fructoside, and S: sucrose)

3. 재료 및 방법

3.1 전화당 효소의 고정화

고정화 전화당 효소(β -D-fructofuranosidase, EC 3.2.1.26, 140.7 U/mg, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)의 미소환경을 조절하기 위한 담체로는 무기계열의 실리카와 유기계열의 스티렌을 선택하였다. 고정화 기법으로는 수용상 및 유기상 실란화[23]와 폴리에틸렌이민 도포법[8, 19]을 선택하여 담체표면의 친수 및 소수성을 조절하였다.

실리카 계열의 담체로는 김해성[1]에 의하여 제조된 다공성 실리카(평균입경 40~50 μ m, 비표면적 330 m^2/g , 세공반경 0.5 μ m, 세공율 0.869, 세공체적 3.21 cm^3/g)와 실리카 젤60(평균입경 63~200 μ m, 70~230 mesh ASTM, Merck, Germany)을 사용하였고, 스티렌 계열의 담체로는 아크릴 공중합체 라텍스 폴리머[입경 0.3 μ m, 고형분 45%(w/w), pH 4~5, styrene/acryl ratio 55/45, acrylamide함량 0.3%(w/w), 대원 폴리머(주)]를

이용하였다.

다공성 실리카와 실리카젤 60의 수용상 실란화는 pH 3~4로 조절된 10 %(v/v)의 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane, Fluka, Chemie AG, Buchs, Switzerland) 수용액 54 mL와 담체 2 g을 75 °C에서 2시간동안 접촉시켜 실란화시킨 후 여과 세정하고 115 °C의 건조기에서 10시간동안 건조시켜 사용하였다.

유기상 실란화는 2%(v/v)의 3-아미노프로필트리에톡시실란-아세톤 수용액 167 mL와 담체 3 g을 45 °C에서 24시간동안 접촉시켜 실란화 한 후, 여과 세정 및 건조시켜 사용하였고, 폴리에틸렌이민(PEI, M.W. 40,000~50,000, TCI, Japan) 도포는 0.1~1%의 PEI-붕산염 완충액(pH 8.5) 10mL와 담체 100 mg을 25 °C에서 1시간동안 접촉시켜 표면처리한 후, 붕산염 완충액으로 미반응 PEI를 여과하여 제거하였다. 라텍스 폴리머를 폴리에틸렌이민으로 도포하기 위하여 0.1%의 PEI-붕산염 완충액(pH 8.5) 9 mL에 라텍스 폴리머 현탁액 1 mL를 가하고, 25°C에서 1시간 동안 표면처리하여 아미노기를 도입시킨 다음, 0.2 μ m의 여과막으로 여과·세정한 후, pH 8.5의 붕산염 완충액에 정치하고 4 °C 냉장보관하여 사용하여 이용하였다.

실란화 및 PEI 도포법으로 아미노기가 도입된 각각의 담체에 가교결합제인 글루타르알데히드로 효소를 공유결합하여 각각의 고정화 효소축매를 제조하였다. 아미노기가 도입된 각각의 담체 100 mg을 2.5%의 글루타르알데히드(25% 수용액, Merck, Germany)-인산염완충액(pH 7) 10 mL와 25 °C에서 2시간동안 접촉하여 알데히드기를 도입시킨 후, 여과, 세정하여 미반응한 글루타르알데히드를 완전히 제거하였다. 위의 방법에 의하여 제조된 각각의 담체와 pH 4.8의 초산염 완충액에 4 mg/mL의 농도로 조제한 전화당 효소 수용액 15 mL를 4 °C에서 3시간 동안 접촉시켜 효소를 고정화하였다. 반응이 끝난 후, 고정화 효소는 0.2 μ m의 여과막으로 여과·세정한 다음, 초산염 완충액(pH 4.8)에 정치하고 4 °C로 냉장보관하여 사용하였다.

고정화 함량은 고정화 전후의 효소모액과 여과액의 흡광도를 자외선 흡수분광기(UVIKON 820, Kontron, Germany)로 280 nm에서 측정하여 산출하였다. 고정화 효소의 활성도는 pH 4.8, 고정화 효소농도 $1\sim 4 \times 10^{-3}$ mg/mL, 그리고, 농도 0.291 mol/L의 자당수용액을 25 °C로 유지된 회분식 반응기에서 전화율이 1~2%가 되도록 자력교반기로 교반하여 반응시키고 0.2 mol/L의 탄산나트륨수용액으로 반응을 정지시킨 후, DNS(3,5-dinitro salicylic acid, Sigma, St. Louis, MO, USA)법으로 측정한 총환원당의 농도로부터 초기속도를 결정하고 효소의 단위질량을 기준으로 한 U/mg(μ mole/min-mg)으로 나타내었다. 또한 상대 활성도는 자연효소의 활성도에 대한 고정화효소의 활성도 백분율로 나타내었고, 유효활성도는 고정화 효소의 활성도와 고정화 함량의 곱으로 나타내었다.

3.2 메틸 프럭토시드 생산성에 대한 담체 표면특성의 영향

수용상 실란화, 유기상 실란화 및 폴리에틸렌이민 도포법으로 담체표면의 미소환경을 조절한 각각의 고정화 효소축매를 이용하여 메틸 프럭토시드 생산성을 최대한으로 얻을 수 있는 최적 고정화 담체를 선정하였다. 미소환경이 조절된 각각의 고정화 효소축

매를 이용하여 허주형과 김해성[3]에 의하여 검토된 메틸 프럭토시드 합성의 최적 반응조건[효소활성도 2 U/mL, 메탄올 함량 30%(v/v), 자당의 초기농도 0.291 mol/L, pH 4.8(초산염 완충액), 온도 25 °C]에서 자당과 메탄올의 배당화 반응을 수행하였다. 반응물과 생성물의 농도는 굴절률 검출기(R401 RI detector, Waters, USA)와 탄수화물 칼럼{High performance carbohydrate column[®], 4.6×250 mm, Waters, USA; 이동상: 아세토니트릴/물[75:25%(v/v)], 유속: 1.4 mL/min}을 사용하는 HPLC법으로 분석하였다.

3.3 최적 고정화 담체의 선정

PEI에 의하여 친수성 미소환경이 조절된 실리카와 스티렌 담체중에서 메틸 프럭토시드 합성 반응에 효과적인 담체를 선정하였다. 순수한 자당 수용액에서 자당의 전화 반응과 자당-메탄올(30%, v/v) 수용액에서의 메틸 프럭토시드 합성반응에 대하여 PEI-실리카와 PEI-스티렌 담체에 고정화된 전화당 효소의 최대 반응속도(V_m)과 미카엘리스 상수(K_m)을 검토하였다. 반응온도 25 °C, pH 4.8, 효소농도 $1\sim 4 \times 10^3$ mg/mL의 반응조건에서 자당농도를 0.05~0.291 mol/L로 변화시키면서 전화율이 1~2%에 도달하면 시료 1 mL를 채취하고 탄산나트륨 수용액(0.2 mol/L) 1 mL로 반응을 정지시켰다.

각각의 반응물의 농도는 HPLC법으로 측정하여 초기 가수분해속도와 초기 알코올 분해속도를 계산하였다. 이와같은 방법으로 얻은 자당농도 변화에 대한 각각의 초기속도를 Lineweaver-Burk plot와 Hanes-Woolf plot를 이용한 절편과 기울기로부터 순수한 자당 수용액과 자당-메탄올(30%, v/v) 수용액에서 각각의 V_m 과 K_m 을 결정하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1 고정화 효소의 유효 활성도와 상대 활성도에 대한 담체 표면특성의 영향

자당과 메탄올 수용액으로부터 메틸 프럭토시드를 합성하기 위해서는 기질인 메탄올에 의하여 효소가 불활성화 혹은 변성되지 않으면서 메틸 프럭토시드의 수율과 생산성을 높일 수 있도록 효과적으로 표면처리된 고정화 담체를 필요로 한다. 이와같은 관점에서 그 구조적 특성이 효소 고정화에 적합하도록 김해성[1]에 의하여 조절된 실리카계열의 다공성 실리카와 상업적으로 시판되고 있는 실리카젤 60, 그리고 스티렌계열의 라텍스 폴리머를 선정하였다.

담체의 표면특성은 수용상 실란화와 폴리에틸렌이민 도포법에 의해서 친수성으로, 유기상 실란화에 의해서 소수성으로 조절하였다. 이로부터 담체 표면에 고정화된 고정화 효소의 유효활성도와 상대활성도를 비교하여 Table 1에 나타내었다.

유효활성도는 1%의 PEI-다공성 실리카가 16,200U/g로 가장 높았고, 상대 활성도는 PEI-라텍스 폴리머가 75.3%로 가장 높게 나타났다. 다공성 실리카는 비표면적과 세공경이 크기 때문에 유효 활성도가 높게 나타난 반면, 고정화 함량이 높기 때문에 고정화 효소들간의 상호 활성점 차폐현상에 의한 입체장애를 유발하므로 상대 활성도가

감소한 것으로 판단된다. PEI-다공성 실리카의 경우, 1%의 PEI로 표면처리한 경우가 0.1%로 표면처리한 경우보다 고정화 효소의 표면밀도가 높아서 유효 활성도는 높지만 이 역시 입체장애에 의하여 상대 활성도는 감소하는 것으로 나타났다.

다공성 실리카의 결과로부터 실란화와 PEI 도포법에 의한 담체의 표면화학적 특성 변화와 그에 따른 영향을 비교하였다.

Table 1. Immobilization characteristics of bound invertase on different carriers.

Carrier type	Carrier	Method of binding	Activity of free enzyme	Relative activity (%)	Effective activity (U/g-carrier)
Silica base	porous silica	0.1% PEI-coating	140.7 U/mg	71.1	12000
	"	1% PEI-coating	"	64	16200
	"	Organic silanization	"	14.2	2400
	"	Aqueous silanization	"	14.2	2000
	silicagel 60	0.1% PEI-coating	"	13.2	164.6
	"	Organic silanization	"	4.3	34.5
Styrene base	Styrene/acryl latex micro-spheres	0.1% PEI-coating	"	75.3	6357

실란화법의 경우, 유기상과 수용상 실란화법을 이용하여 담체의 표면화학적 특성을 소수성 친수성으로 조절하고자 하였다. 그러나, 실란기 자체의 소수성이 강하기 때문에 수용상 실란화법으로는 친수성 조절이 용이하지 못한 것으로 나타났다. 그 결과, 유기상 및 수용상 실란화 모두 고정화 효소의 상대 활성도가 매우 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다. 그러나, PEI 도포법의 경우에는 PEI가 다량의 아미노기를 함유하고 있어서 교각을 형성하는 글루타르알데히드기의 표면밀도를 증가시킬 수 있으므로 효소의 고정화 함량을 높일 수 있었다. 그리고, PEI로 이루어진 친수성 피막은 효소의 미소 환경을 친수성 분위기로 유지하여 효소의 활성보존능을 향상시킬 수 있기 때문에 유효 활성도와 상대 활성도 모두 높게 나타났다.

4.2 메틸 프럭토시드 생산성에 대한 담체 표면특성의 영향

전화당 효소에 의하여 자당과 메탄올 수용액으로부터 메틸 프럭토시드를 합성할 때에, 메틸 프럭토시드의 생산성과 수율을 향상시키기 위해서는 물보다 친핵성이 큰 메탄올의 함량을 높이거나, 당 공여체인 자당의 농도를 높게 유지하여 물의 활동도를 상대적으로 낮추는 것이 바람직하다. 그러나, 메탄올의 함량이 최대 50%이상이면 효소가 쉽게 불활성화되며[21], 자당의 농도가 너무 높으면 메틸 프럭토시드보다는 자당과 과

당이 결합하는 1-케스토오스(1-kestose) 및 6-케스토오스(6-kestose)가 생성되는 것으로 보고되고 있다[20]. 따라서, 단순한 기질의 농도상승에 의한 물의 활동도 감소만으로는 반응선택도를 향상시키기가 매우 어려운 것을 알 수 있다. 또한, 물과 메탄올의 상용성이 높기 때문에 분자트랩이나 제 2상을 형성하기 곤란하므로 기질이나 반응매질의 조절보다는 효소촉매의 반응성을 능동적으로 조절하는 것이 바람직한 것으로 평가된다.

이와같은 관점에서, 일부 연구자들은 전이효소를 사용하거나 고정화효소를 사용하여 배당체의 전화율과 수율을 향상시키는 연구결과를 제시하였다[17]. 그러나, 전이효소의 경우, 비용이 매우 높고, 특정기질을 제공하거나, 새로운 부산물이 생성되므로 경제적인 면에서 제한이 따른다. 또한, 고정화 효소를 사용하는 경우, 아실화 혹은 (트랜스)에스테르화[9]의 경우와는 달리, 배당화에 대하여 효소 미소환경 조절에 관한 논의는 보고되어 있지 않다.

Fig. 2, 3, 그리고 4는 실란화 및 PEI 도포법으로 각각의 표면화학적 특성이 조절된 고정화 전화당 효소를 이용하여 허주형과 김해성[3]의 연구결과로부터 얻은 최적반응 조건에서 메틸 프럭토시드 합성반응을 수행하고 자연효소의 경우와 함께 비교한 결과이다. 그림에서 알 수 있는 바와같이 PEI 도포법의 경우가 수용상 실란화법과 자연효소의 경우보다 전화율이 계속적으로 증가하는 것을 알 수 있다. 이로부터 PEI법으로 고정화된 전화당효소는 생성물인 메틸 프럭토시드의 가수분해를 억제할 수 있도록 고정화 담체의 표면특성이 메틸 프럭토시드의 합성반응에 유리하도록 조절되었음을 알 수 있었다. 이에 반하여 수용상 실란화법의 경우는 표면특성이 소수성을 나타내므로 생성물인 메틸 프럭토시드를 효과적으로 배척해내지 못하여 반응시간 9시간 이후부터 평형전화율에 도달하는 것을 볼 수 있다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이, 실란화의 경우에는 전화율에 대한 수율의 감소가 급격하게 진행되었고, Fig. 4에 나타난 바와 같이 가수분해반응에 의한 생성물의 농도감소가 심각하게 일어나는 것을 알 수 있었다. 그 결과, 실란화의 경우는 고정화하지 않은 자연효소의 경우보다도 오히려 전화율과 생성물의 농도가 매우 낮게 나타나게 되므로, 담체의 표면화학적 특성의 영향이 효소촉매 반응의 반응환경을 지배하는 매우 중요한 인자임을 알 수 있다.

따라서, 다공성 실리카와 라텍스 폴리머 표면에 도포된 PEI는 풍부한 아미노기를 도입하고, 전화당 효소의 활성에 유리한 친수성 피막을 형성하였기 때문에 고정화 함량과 활성도를 증대시켰다. 그리고, 이에따른 담체의 표면화학적 특성은 효소의 활성점 부근의 미소환경을 조절하여 효소의 활성점에는 메틸 프럭토시드보다 상대적으로 친수성이 강한 분자들이 모여들고 메틸 프럭토시드 분자의 접근이 어렵기 때문에 전화율과 수율 및 농도가 높게 얻어진 것으로 판단된다.

결과적으로, 고정화 효소의 미소 환경을 폴리에틸렌이민 도포법으로 친수화시킨 PEI-실리카와 PEI-라텍스 폴리머 고정화 효소는 전화율이 증가함에 따라 수율은 안정적으로 일정하게 유지되었고, 전화율에 대한 메틸 프럭토시드의 생성농도가 계속적으로 증가하고 있으므로 고정화 담체의 표면특성이 메틸 프럭토시드 합성반응에 적합하도록 고정화되었음을 알 수 있었다.

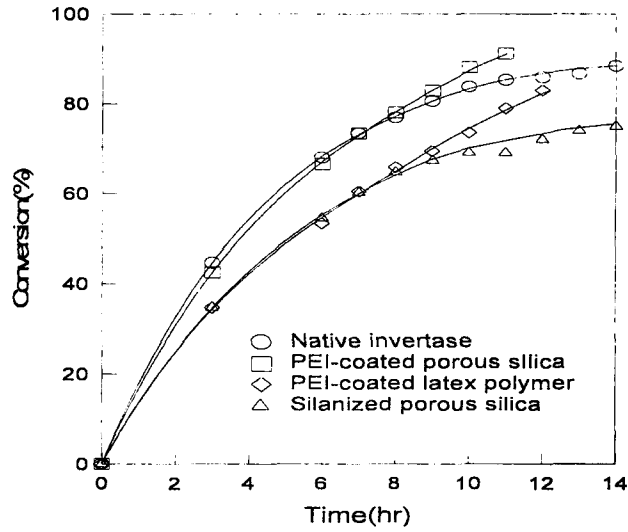


Fig. 2. Time courses of methyl fructoside synthesis by different invertases.

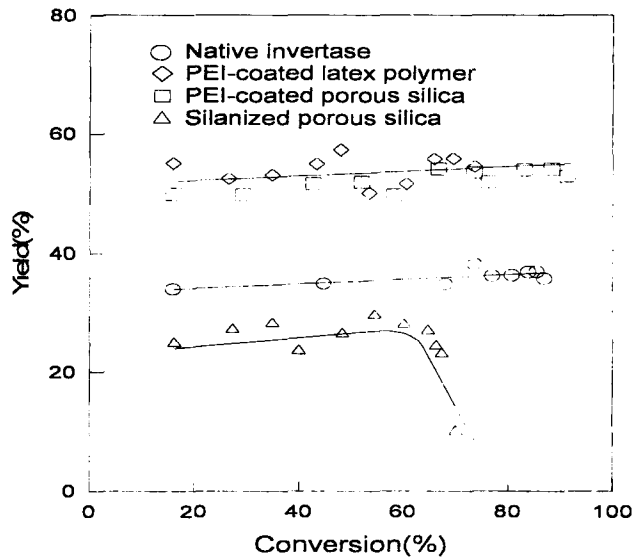


Fig. 3. Effect of conversion on yield of methyl fructoside by different invertases.

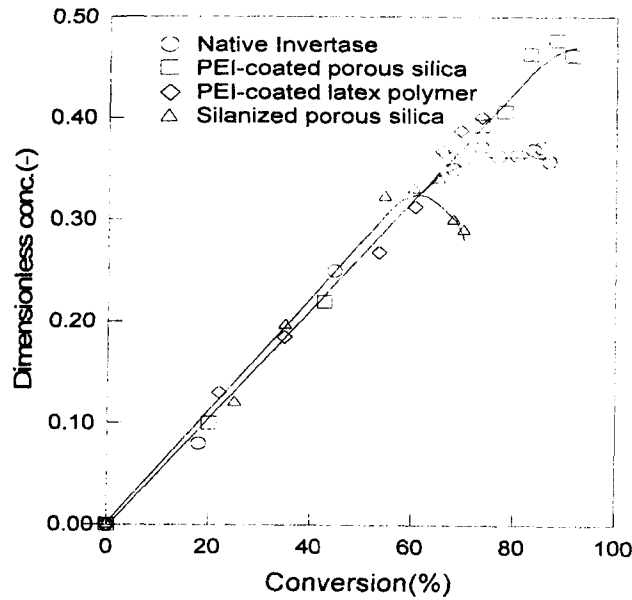


Fig. 4. Effect of conversion on dimensionless concentration of methyl fructoside by different invertases.

4.3 담체표면 특성에 따른 고정화 전화당 효소의 V_m 과 K_m 비교

전화당 효소에 의한 자당과 메탄올의 배당화 반응에서 당 분해 반응(sucrolysis)속도 r_H 와 알코올 분해반응(alcoholysis)속도 r_A 는 각각 Michaelis-Menten에 의하여 제안된 효소-기질반응 속도식에

$$r_H = \frac{dC_F}{dt} = \frac{V_{m_H} \cdot C_S}{K_{m_H} + C_S} \quad (5)$$

$$r_A = \frac{dC_{MF}}{dt} = \frac{V_{m_A} \cdot C_S}{K_{m_A} + C_S} \quad (6)$$

의하여 식(5)과 식(6)로 나타낼 수 있다. V_{m_H} , V_{m_A} 는 각각 당 분해반응과 알코올 분해반응의 최대 반응속도이며, K_{m_H} , K_{m_A} 는 각각의 미카엘리스상수이고, C_S , C_F 및 C_{MF} 는 각각 자당, 과당 그리고 메틸 프럭토시드의 몰농도이다. 따라서, 초기속도법에 의하여 실험자료를 얻고 Lineweaver-Burk plot과 Hanes-Woolf plot를 이용하면 매개변수 V_{m_H} , V_{m_A} , K_{m_H} 및 K_{m_A} 를 결정할 수 있다.

고정화 전화당효소를 이용하여 자당과 메탄올 수용액에서 메틸 프럭토시드를 합성할 때, Michaelis-Menten 속도식으로 표시되는 메틸 프럭토시드 합성반응속도는 자당

이 가수분해하여 포도당과 과당을 생성하는 당 분해반응에 대한 속도식 (5)와 자당과 메탄올이 반응하여 메틸 프럭토시드를 생성하는 알코올 분해반응에 대한 속도식 (6)의 합으로 나타낼 수 있다.

Table 2에 나타낸 바와 같이, Km은 PEI-실리카의 경우가 PEI-라텍스 폴리머의 경우보다 약 2~3배정도 낮게 나타났으며, Vm 역시 PEI-실리카가 PEI-라텍스 폴리머보다 약 2배정도 높게 나타났다. Km은 기질 친화도를 나타내는데, PEI-라텍스 폴리머의 기질 친화도가 높게 나타난 것은 실리카의 표면특성이 라텍스 폴리머보다 친수성이 강하여 고정화 효소주변에 자당의 농도가 상대적으로 높았기 때문으로 생각된다. 그리고, PEI-라텍스 폴리머보다 PEI-실리카의 Vm이 높게 나타난 것은 PEI-실리카의 고정화 함량이 높고, 기질 친화도가 PEI-라텍스 폴리머보다 높기때문으로 평가된다. 따라서, 메틸 프럭토시드를 합성하기 위한 최적 고정화 효소축매로는 PEI-실리카가 우수한 것으로 나타났다.

Table 2. Apparent kinetic parameters of immobilized invertase for sucrose hydrolysis, sucrolysis and methanolysis.

	Carrier type	Km(mmol/L)	Vm (U/mg)
Sucrose hydrolysis in aqueous medium	PEI-coated silica	36.5	71.3
	PEI-coated latex polymer	47.6	37.5
Sucrolysis in aqueous methanol medium	PEI-coated silica	43.4	20
	PEI-coated latex polymer	97.0	10.4
Methanolysis in aqueous methanol medium	PEI-coated silica	24.0	8.68
	PEI-coated latex polymer	79.1	4.84

5. 결 론

고정화 기법에 따른 담체의 표면화학적 특성변화로부터 메틸 프럭토시드 합성에 효과적인 전화당 효소의 미소환경 조절하였다. 고정화 전화당 효소의 미소환경을 조절하기 위한 담체로는 무기계열의 실리카와 유기계열의 스티렌을 선택하였고, 고정화 기법으로는 수용상 및 유기상 실란화와 폴리에틸렌 이민 도포법을 선택하여 담체표면의 소수 및 친수성을 조절하였다.

그 결과, PEI 도포법의 경우가 실란화의 경우보다 다량의 아미노기를 함유하고 있어서 교각을 형성하는 글루타르알데히드의 표면밀도를 증가시키기 때문에 효소의 고

정화 함량을 높일 수 있었다. 또한, PEI 처리에 의한 담체의 표면화학적 특성은 효소 활성점부근의 미소환경을 친수 분위기로 조절하여 효소의 활성보존능을 향상시킬수 있기 때문에 유효 활성도와 상대 활성도 모두 높게 나타났다. 이와 같은 전화당 효소의 친수성 미소환경은 자당과 메탄올로부터 메틸 프럭토시드를 합성할때에 상대적으로 친수성이 강한 분자들은 활성점에 쉽게 접근하지만 생성물인 메틸 프럭토시드의 접근은 제어되므로 높은 전화율과 수율을 얻었다.

고정화 효소의 미소분위기를 폴리에틸렌이민 도포법으로 친수화시킨 PEI-실리카와 PEI-라텍스 폴리머 고정화 효소는 전화율이 증가함에 따라 수율은 안정적으로 일정하게 유지되었고, 전화율에 대한 메틸 프럭토시드의 생성농도가 계속적으로 증가하여 고정화 담체의 표면특성이 메틸 프럭토시드 합성반응에 적합하게 최적화 되었다.

참고문헌

- [1] 김해성. "다공성 실리카에 의한 효소고정화에 관한 연구", 한국생물공학회지, 5(2) : pp.107-112, 1990.
- [2] 선우환, 김종태, 김해성, "메틸글리코시드에 의한 지방산의 효소적배당화" 한국유화학회지, 16(1) : pp.83-94, 1999.
- [3] 허주형, 김해성, "Alginate-enclosed microspheres를 이용한 메틸 프럭토시드의 연속생산공정", 한국생물공학회지, 10(2) : pp.159-165, 1995.
- [4] 허주형, 김해성, "메틸 프럭토시드를 이용한 과당계열 당 지방산에 스테르의 효소적 합성", 한국생물공학회지, 13(6) : pp.706-717, 1998.
- [5] 허주형, 김종태, 김해성, 무용매, "무유화제공정에 의한 메틸 프럭토시드 지방산 폴리에스테르의 합성", 한국유화학회지, pp.15(4) : 45-56, 1998.
- [6] Akoh, C. C, "*Carbohydrate polyesters as fat substitutes*", Marcel Dekker, Inc., N. Y. USA, 1994.
- [7] Akoh, C. C. and Mutua, L, N, " Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters : Effect of reaction parameters and the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids", Enzyme Microb. Technol., 16(2) : pp.115-119, 1994.
- [8] Bahulekar, R., Ayyangar, N. R., and Ponrathnam, S, "Polyethylene imine in immobilization of biocatalysts", Enzyme Microb. Technol., 13 (11) : pp.858-868, 1991.
- [9] Brandy, C., Metcalfe, L., Slaboszewski, D., and Frank, D, " Lipase immobilized on a hydrophobic, microporous support for the hydro-lysis of fats", IAOCS, 65(6) : pp.917-921, 1988.
- [10] Bjorkling, F., Godtfredsen, S. E., and Kirk, O, "A highly selective enzyme-catalysed esterification of simple glucosides", J. Chem. Soc. Chem. Commun., pp.934-935, 1989.
- [11] Castillo, E., Marty, A., Combes, D., and Condoret, J. S, "Polar substrates for

- enzymatic reactions in supercritical CO₂ : How to overcome the solubility limitation", *Biotechnol. Lett.*, **16**(2) : pp.169-174, 1994.
- [12] Ducret, A., Giroux, A., Trani, M. and Lorite, R, "Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acid in organic media under reduced pressure", *Biotechnol. Bioeng.*, **48**(3) : pp.214-221, 1995.
- [13] Fregapane G., Sarney, D. B., and Vulfson, E. N, " Enzymic solvent free synthesis of sugar acetal fatty acid esters", *Enzyme Microb. Technol.*, **13**(10) : pp.796-800, 1991.
- [14] Klivanov, A. M, " Enzymes that work in organic solvents", *CHEMTECH.*, **16**(6) : pp.354-359, 1986.
- [15] Liu, X. C. and Dordick, J. S, "Sugar acylate-based polymers as chiral molecularly imprintable hydrogels", *J. Polymer Sci. Part A : Polymer Chem.*, **37**(11) : pp.1665-1671, 1999.
- [16] Macrae, R., Robinsom, R. K., and Sadler, M. J, " Encyclopedia of food science, food technology and nutrition(Vol. 3)", *Academic Press Inc.*, N. Y. pp.2080-2083, 1993.
- [17] Nilsson, K. G. I, "Enzymatic synthesis of oligosaccharides", *TIBTECH.* **6**(10) : pp.256-264, 1988.
- [18] Oguntimein, G. B., Erdmann, H. and Schmid, R. D, " Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvents", *Biotechnol. Lett.*, **15**(2) : pp.175-180, 1993.
- [19] Pieters, B. and Bardeletti, G, "Enzyme immobilization on a low-cost magnetic support: Kinetic studied on immobilized and coimmobilized glucose oxidase and glucoamylase", *Enzyme Microb. Technol.*, **14**(5) : pp.361-370, 1992.
- [20] Selisko, B., Ulbrich, R., and Schellenberger, A, " Invertase-catalyzed reactions in alcoholic solutions", *Biotechnol. Bioeng.*, **35**(4) : pp.1006-1010, 1990.
- [21] Straathof, A. J. J., Vrijenhoef, J. P., Sprangers, E. P. A. T., Bekkum, H. V. and Kieboom, A. P. G, " Enzymic formation of β -D-fructo-furanosides from sucrose : Activity and selectivity of invertase in mixtures of water and alcohol", *J.Carbohydr. Chem.*, **7**(1) : pp.223-238, 1988.
- [22] Sturgeon, R. J, " *Carbohydrate Chemistry*. J. F. Kennedy(ed)", *Oxford Univ. Press*, N. Y., USA, pp.263, 1988.
- [23] Weetall, H. H, " Covalent Coupling methods for inorganic support materials.: *In Method in Enzymology*(vol. 44), K. Mosbach(ed)", *Academic Press Inc.*, N. Y, 1976.

- ◆ 허주형 : 명지대학교 화학공학과를 졸업했으며, 동대학원 화학공학과 석사 및 박사 학위를 취득하였다. 관심분야는 환경 친화성, 생체 친화성을 갖는 알킬글리코시르류 biosurfactant의 효소재 및 화학적 합성과 분리 정제등이다.
- ◆ 안형환 : 명지대학교 화학공학과를 졸업했으며, 동대학원 화학공학과에서 석사 및 박사학위를 취득하였다. 관심분야는 플라즈마를 이용한 자동차 배기가스 및 폐기물 처리 분야, 각종 건축물 내장재 및 생활용품의 연소시 발생하는 Toxic Gas 분석 평가분야등이다.