

고정화 효소

고정화 효소의 필요성

:대부분의 효소들은 구형단백질이기 때문에 물에 용해된다. 그러므로, 비싼 효소를 회분식 공정에서 재사용하기 위한 분리를 쉽게 하기 위해서 효소를 화학적 또는 물리적 방법에 의해 불용성 담체의 표면 또는 내부에 고정화 시킬수 있다.

고정화 효소의 장점

1. 반응용액으로부터 쉽게분리 → 재사용 가능
2. 연속식 반응기에 쉽게 유지가능
3. 선택적으로 변형된 화학적,물리적 성질을 보여줌
4. 효소가 나온 세포의 실제 환경을 모사

고정화 효소의 단점

:고정화효소의 입자가 매우 크고, 중합담체에 효소가 포함되어 있기 때문에 용해성 유리효소에서는 없던 물질전달저항이 생긴다.

고정화 기술

고정화 기술--- 화학적 방법: 공유결합의 형성
--- 물리적 방법: 비공유결합의 형성

1. 화학적 방법

(1) 공유부착법

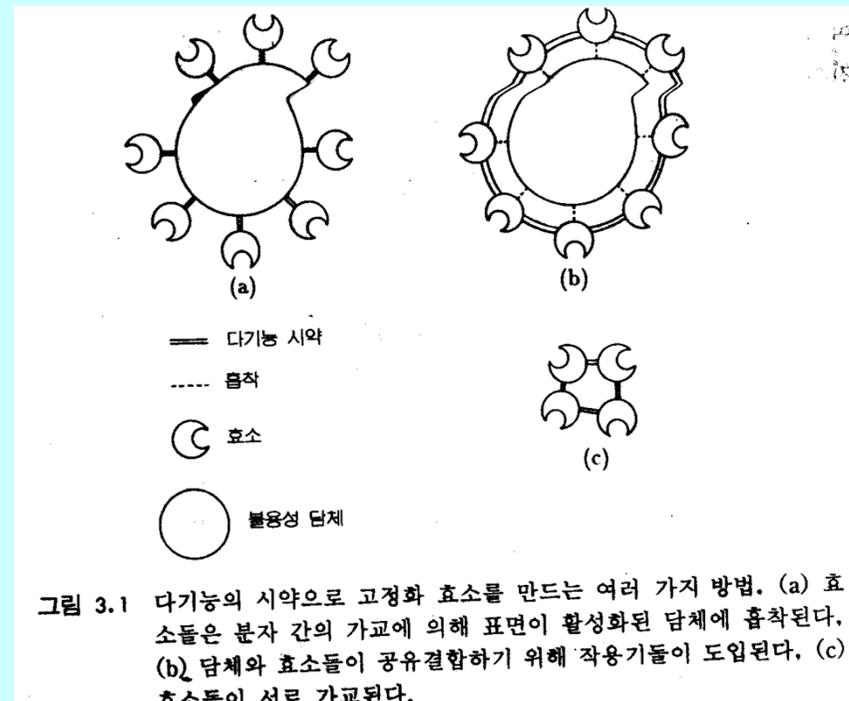
- 효소분자의 중요하지 않은 아미노산 잔기를 물에 불용성이며 작용기를 갖는 담체에 공유부착하는 방법
- 효소 고정화에 가장 널리 쓰이며, 원리는



- 여기서 E는 효소,

(2) 다가능 시약을 이용한 가교

:물에 불용성인 효소들은 글루타르알데히드와 같이 천연적으로 양쪽에 모두 작용기를 갖고 낮은 분자량을 갖는 다가능 시약으로 마련한다.



2. 물리적 방법

(1) 흡착법(absorption): 흡착제와 효소용액을 접촉시킴으로써 효소가 물리적으로 활성흡착제 표면에 흡착

◆흡착기술의 장점

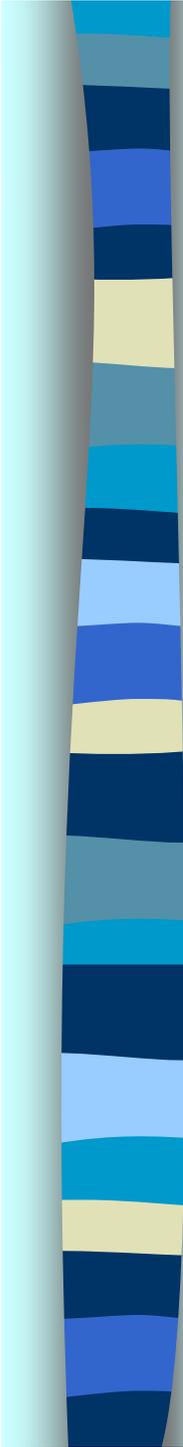
- ①고정화 과정이 간단
- ②고정화되는 동안 효소를 분리,정제 가능
- ③효소들은 흡착에 의해 비활성화 되지 않음
- ④흡착은 가역과정이다.

◆흡착기술의 단점

- ①결합의 세기가 약하다.
- ②용액의 **ph**, 이온세기, 및 온도에 매우 민감
- ③일정량의 담체에 흡착되는 효소의 양이 적다.

◆일반적으로 이용되는 흡착제로는

알루미나, 음이온 양이온 교환수지, 칼슘카보네이트, 탄소, 셀룰로오스, 점토등



(2)포괄방법(**cross linking**): 중합체가 망상구조를 형성함으로써
효소를 가교된 중합체 안에 가둘 수 있다.

◆포괄방법의 장점

- 효소의 화학적 변형이 없으므로 효소의 본질적인 성질이 변하지 않음

◆포괄방법의 단점

- 효소는 겔이 형성되는 동안 비활성화 될 수 있음
- 효소의 누출 문제

◆ 일반적으로 사용되는 가교중합체로는 폴리아크릴아미드겔

(3)미세 캡슐화 방법(**encapsulation**)

:반투막의 미세캡슐 안에 효소를 고정화 시키는 방법으로서 접촉중합기술에 의해 수행된다

물질전달저항의 영향

◆ 고정화 효소의 입자는 크기가 크고 중합담체에 포함되어있기 때문에 용해성 유리효소에는 없는 물질전달 저항을 야기한다.

◆ 액체로부터 고정화 효소의 반응 부위까지의 기질의 이동 (3단계)

(1) 벌크액체로부터 고정화 효소 주위에 상대적으로 잘 혼합되지 않은 액층으로의 이동

(2) 상대적으로 잘 혼합되지 않은 액층을 통한 확산

(3) 고정화 입자표면으로부터 불활성 담체 안의 효소의 활성부위로의 확산

◆ 여기서 1,2단계는 외부 물질전달저항이고, 3단계는 내부물질전달 저항이다.

외부물질전달저항

◆효소가 불용성입자의 표면에 고정화될 경우, 경로는 단지 1,2단계
들, 즉 외부물질전달저항으로 구성

◆물질전달 속도

$$N_s = k_s A (C_{s_b} - C_s)$$

여기서 C_{s_b} 는 벌크용액 안에서의 농도

C_b 는 고정화 효소표면에서의 기질농도

K_s 항은 물질전달계수(길이/시간)

A 는 1개의 고정화된 효소입자의 표면적

◆고정화 효소의 효소반응 동안에 기질전달속도는 기질소비속도와
같다. → Michaelis-Menten식으로 표현하면

$$r_p = k_s a (C_{s_b} - C_s) = \frac{r_{\max} C_s}{K_M + C_s}$$

여기서 a 는 반응용액의 단위부피당 전체 표면적이고,

위 식은 벌크용액 안의 기질농도와 고정화 효소표면에서의 기질농도 사이의 관계를 보여주며 무차원 형태로

$$\frac{1 - C'_s}{N_{Da}} = \frac{C'_s}{1 + C'_s}$$

여기서,

$$C'_s = \frac{C_s}{C_{sb}}$$

$$N_{Da} = \frac{r_{\max}}{k_s a C_{sb}}$$

$$\beta = \frac{C_{sb}}{K_M}$$

Na 는 **Damköhler**수(최대 물질전달속도와 최대 반응속도의 비율)로 알려져 있으며, N_{da} 의 크기에 의존하여

1. $N_{Da} \ll 1$ 이면, 물질전달속도는 반응속도보다 훨씬 크고, 전체 반응은 효소반응에 의해 조절된다.

$$r_p = \frac{r_{\max}}{K_M + C_S}$$

2. $N_{Da} \gg 1$,

$$r_p = k_s a C_{sb}$$

물질전달에 대한 저항 때문에 반응속도가 낮아지는 정도를 측정하기 위하여 고정화 효소의 유효인자(effectiveness factor) η 를 정의

$$= \frac{\text{actual rate}}{\text{rate at surface}}$$

내부물질전달저항

◆효소가 공중합 또는 미세캡슐화에 의해 고정화된다면 내부입자 물질전달저항은 효소반응속도에 영향을 미칠수 있는데, 식을 유도하기 위해서 다음의 가정이 필요하다.

1. 반응은 고정화 효소 안의 모든 위치에서 일어나며, 반응속도식은 유리효소에 대해 관찰된 것과 똑같은 형태이다.
2. 고정화 효소를 통한 물질전달은 분자확산을 통해 일어난다.
3. 고정화 효소의 바깥쪽 표면에서의 물질전달제한은 없다.
4. 고정화 효소는 구형이다.

그림에 나타낸것 처럼 두께 dr 의 구형셀에 대한 물질수지는

$$- \quad + \quad =$$

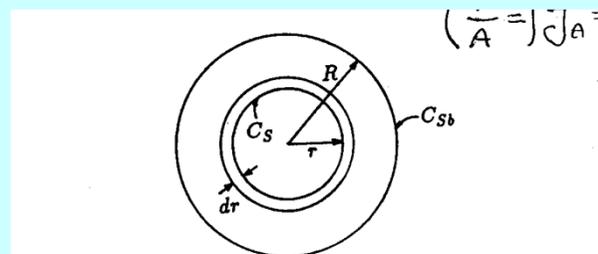


그림 3.3 고정화 효소에서 기질에 대한 셀(shell)수지

$$4\pi(r + dr)^2 D_s \left[\frac{d C_s}{dr} + \frac{d}{dr} \left(\frac{dC_s}{dr} \right) dr \right] - 4\pi r^2 D_s \frac{dC_s}{dr} + (4\pi r^2 dr) r_s = 4\pi r^2 dr \frac{dC_s}{dt}$$

--여기서 D_s 는 고정화 담체에서 기질의 확산계수

◆정상상태에서 기질농도의 변화, dC_s/dt 는 0

괄호를 열고 $(dr)^2$ 또는 $(dr)^3$ 이 있는 모든 항을 없애고 정리

$$D_s \left(\frac{d^2 C_s}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_s}{dr} \right) + r_s = 0$$

◆ 위의 식은 r_s 에 적당한 표현을 대체하여 0차, 1차반, Michaelis Menten 식의 경우에 대해 나타낼 수 있다.

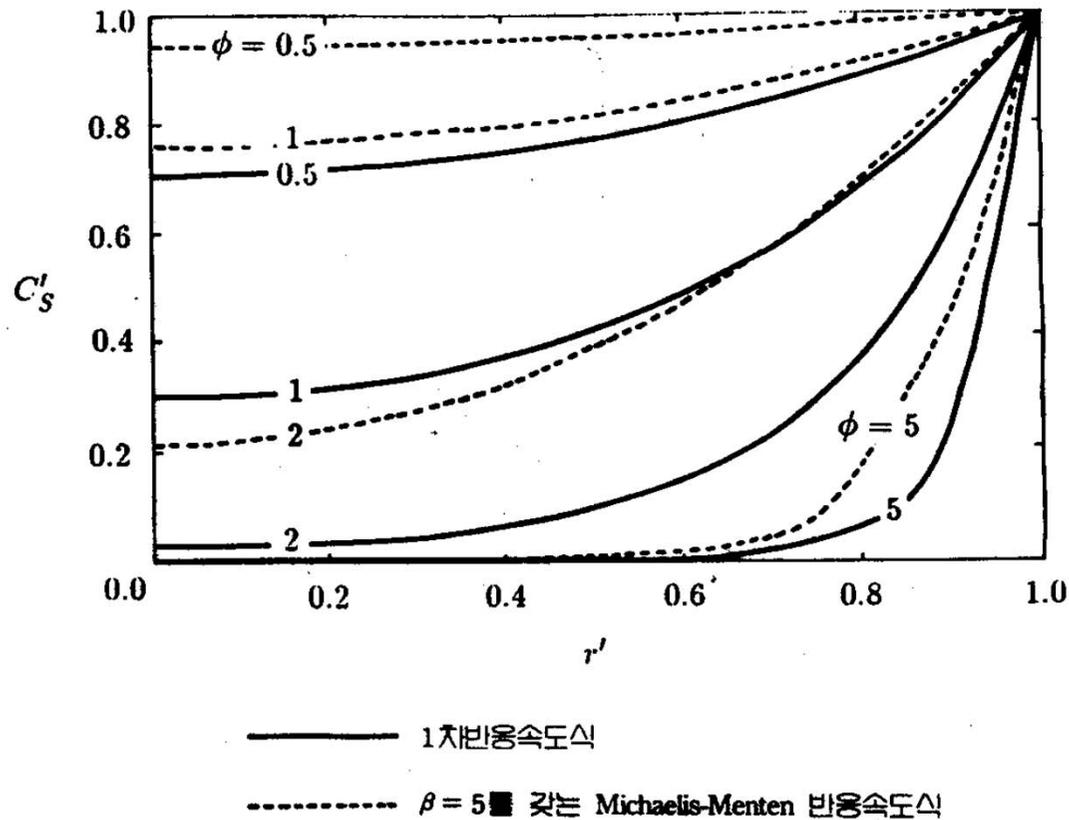


그림 3.4 반지름방향거리에 대한 기질농도 구배는 Thiele계수의 다른 값들에 대해 1차반응속도식(실선)과 $\beta=5$ 를 갖는 Michaelis-Menten 반응속도식에 의해 예측할 수 있다.