

微生物處理에 의한 벚짚으로부터 Furfural 製造에 관한 研究(I)

——酵素固定化—加水分解法을 利用한 Xylose 生成——

金 雨 植·劉 仁 相
延世大學校 工科大學 化學工學科

(1983 년 6 월 23 일 접수)

Production of Furfural from Rice Straw by Microbial Treatment(I)

——Production of xylose using immobilized enzymatic hydrolysis——

Woo-Sik Kim and In-Sang Yoo
Department of Chemical Engineering, College of Engineering,
Yonsei University, Seoul 120, Korea

(Received; June, 23, 1983)

要 約

微生物을 利用하여 벚짚으로부터 Furfural 을 製造하는데 있어서 제 I 段階로 Xylanase 의 固定化와 그 酵素의 反應諸特性 및 固定層反應器에서 벚짚으로부터 추출된 Xylan 의 連續的인 加水分解反應에 關하여 研究하였다.

Xylanase 를 固定化시킬 때의 最適 pH 와 溫度는 pH5 및 20°C 였으며, 固定化된 酵素의 反應最適 pH 와 溫度는 各各 pH5 및 40°C 였다. 또한 pH 安定性 및 熱安定性도 水溶性酵素에 比하여 높게 나타났다.

活性炭에 固定化시킨 Xylanase 를 使用하여 固定層反應器에서 連續的인 加水分解反應을 進行할 때, 벚짚으로부터 추출된 0.25~1.25% Xylan 溶液의 8.2~8.7%가 Xylose 로 轉換되었으며, 기질의 流速이 增加하면 物質傳達係數 $k_L a$ 값의 增加로 겉보기 K_m 값이 감소하였으며, 이 계에서의 K_m 값은 $0.82 \times 10^{-3} M$ 이었다.

ABSTRACT

The study on immobilization of xylanase extracted from the culture of *Aspergillus niger* KG 79 was performed by attaching it covalently on activated carbon with glutaraldehyde as a bifunctional reagent. And the characteristics of reaction of immobilized enzyme and continuous hydrolytic reaction of xylan extracted from rice straw were studied.

Optimal values of pH and temperature for immobilization of xylanase were pH 5 and 20°C. In the hydrolytic reaction, the optimal pH and temperature were pH 5 and 40°C respectively. Xylanase in the immobilized state were more stable than those in the free state.

During the continuous hydrolytic reaction of xylan, 8.2~8.7% of xylan solution that has 0.25~1.25% concentration range, was converted to xylose and Km value of xylanase was $0.82 \times 10^{-3} \text{M}$. As the flow rate of substrate solution was increased, apparent Km was reduced, because of the increasing mass transfer coefficient.

1. 序 論

오늘날 生物學의 方法을 利用한 資源의 再生이나 回收에 關하여 關心이 높아지고 있으며 多様な Bio-Mass로부터 高價의 物質을 추출하는 技術들이 活發히 研究되고 있다.^{1,2)} 特히 우리 주위에서 多量으로 用易하게 얻을 수 있는 저급 農產資源이나 山林資源으로부터 유효섬유소자원을 추출하고 이를 이용하여 高級의 化學物質을 生成하는 저급섬유소 資源의 再活用이 크게 기대되고 있다.³⁾

섬유소 資源으로는 주로 cellulose, hemicellulose, lignin 등을 들 수 있으며⁴⁾ cellulose의 再活用に 關해서는 이미 오래전부터 많은 研究가 進行되었다.^{5,28)} Hemicellulose에 關해서는 主成分이 D-xylan으로서 複合糖類로 構成되어 있으며 一般的으로 酵素에 依해 分解가 부적당하여 주로 酸에 依한 加水分解法이 利用되어 왔다. 그러나 近來에 와서는 D-xylan을 분해시킬 수 있는 *Aspergillus niger*^{6,25)}, *Ceratostitis paradoxa*⁷⁾, *Trichoderma Viride*^{8,28)} 등에서 추출한 역가 높은 효소들을 이용함으로써 효소가수분해에 대한 研究가 활발히 進行되기 시작하였다.

효소가수분해법은 산가수분해법에 비하여 反應時 操作이 용이하고 不必要한 副產物이 生成되지 않으므로 효소의 정제, 반응조건 및 속도적인 면에서 주로 연구가 진행 중이다.^{9,27)} 더우기 最近 들어 효소를 적절한 지지체에 고정시켜 反應에 使用하는 효소고정화법이 많이 利用되고 있

는바^{15,16)} 효소의 고정화는 一般的으로 효소반응에서의 취약점인 회수가 곤란하며 연속반응이 어려워 반응계의 제어가 어려운 점, 그리고 온도 및 pH에 대한 안정성이 약한 점 등을 보완, 개선할 수 있는 장점을 가지고 있다.^{10,24,29)}

본 研究에서는 우리 나라에서 多量 產出되고 있는 農產廢資源인 벚짚의 效率的인 活용을 위한 方法으로 固定層反應器를 使用하여 연속적인 효소가수분해 반응으로서 *Aspergillus niger* KG 79로부터 추출한 xylanase를 효소로 사용하여 약 19%의 hemicellulose를 지닌 벚짚으로부터 xylose를 生成한 後 酸處理에 作하여 이 용액으로부터 고급용매 및 의약품제조에 쓰이는 furfural의 製造에 關하여 研究하였다.

1 단계로 벚짚으로부터 hemicellulose를 추출하여 효소를 고정화시킨 고정층 반응기에서 연속 반응으로 xylose를 生成하는 實驗을 行하였다.

2. 理論的 背景

活性炭에 固定화시킨 xylanase를 고정층 반응기에 넣고 기질을 연속적으로 보내 反應시킬 때 활성탄 내부에서의 物質傳達을 무시하면 이 반응계의 물질수지식은 다음과 같다.¹²⁾

$$D\left(\frac{d^2S}{dl^2}\right) - v\left(\frac{dS}{dl}\right) - \left(\frac{k_1a}{\epsilon}\right)(S - S^*) = 0 \dots\dots\dots (1)$$

(1) 식의 경계조건은 $l = 0$ 일 때

$$S = \left(\frac{D}{v}\right)\left(\frac{dS}{dl}\right) = S_0$$

$l = L$ 일 때

$$\frac{dS}{dt} = 0$$

한편 이 반응이 Michaelis-Menten 의 速度式으로 表現된다면 정상상태일 때 고정화된 효소 表面의 물질전달속도와 反應速度가 같으므로

$$k_L a (S - S^*) = \left[\frac{k_2 E S^*}{K_m + S^*} \right] (1 - \epsilon) \dots (2)$$

(2) 식을 무차원항 Y^* 로 表示하면

$$Y^* = \frac{1}{2} \left\{ Y - \alpha - \beta + \sqrt{(Y - \alpha - \beta)^2 + 4\beta Y} \right\} \dots (3)$$

이 된다. 그러므로 (1) 식은

$$\left(\frac{1}{B_0} \right) \left(\frac{d^2 Y}{dz^2} \right) - \frac{dY}{dz} - \left(\frac{w}{z} \right) \left\{ Y + \alpha + \beta - \sqrt{(Y - \alpha - \beta)^2 + 4\beta Y} \right\} = 0 \dots (4)$$

(4) 식의 경계조건은 $z = 0$ 일 때

$$Y - \left(\frac{1}{B_0} \right) \left(\frac{dY}{dz} \right) = 1$$

$z = 1$ 일 때

$$\frac{dY}{dz} = 0$$

이다.

반응기에서 기질의 유속이 분산계수보다 매우 클 경우, 즉 B_0 가 무한대가 되어 plug flow 일 때 (4) 식은

$$-\frac{dY}{dz} = \left(\frac{w}{z} \right) \left\{ Y + \alpha + \beta - \sqrt{(Y - \alpha - \beta)^2 + 4\beta Y} \right\} \dots (5)$$

이 式을 積分하면 액막내에서 물질전달을 고려한 식이 되나 매우 복잡해지므로 액막내에서의 물질전달을 무시한 식으로 유도하여 그 식으로부터 물질전달을 고려한 보정값을 계산한다.

액막내에서의 물질전달을 무시한 식은 다음과 같다.

$$\frac{dY}{dz} = -[\lambda Y / (Y + \beta)] \dots (6)$$

이 式을 積分하면

$$S_0(1 - Y_e) = \beta' \ln Y_e + \lambda' \dots (7)$$

이 되며 (7) 식은 Lilly 가^{18, 19)} 액막내에서의 물질전달을 고려하지 않고 유도한 $PS_0 = K_m' \ln$

$(1 - \beta) + k_2 E \beta / Q$ 와 같은 식이 된다.

이 식에 Kobayashi¹²⁾에 의해 유도된 물질전달을 고려한 보정값 $K_m' = K_m + 3/4[k_2 E(1 - \epsilon)/k_L a]$ 식을 대입하면 다음과 같은 식이 된다.

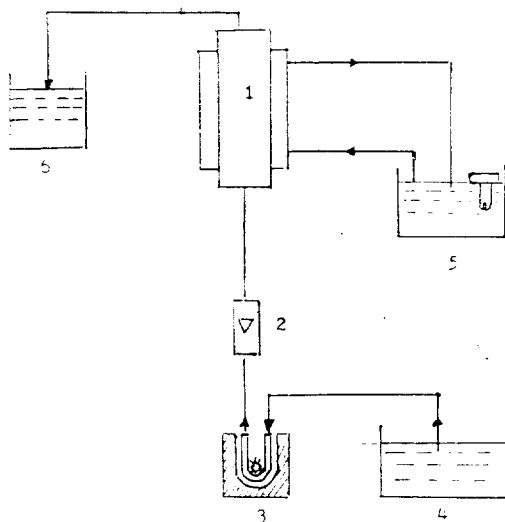
$$S_0(1 - Y_e) = \left(\beta' + \frac{3}{4} \lambda' \right) \ln Y_e + \lambda' \dots (8)$$

(8) 식과 실험치를 이용하여 겉보기 $K_m (K_m')$ 값을 구하고 Kunii 와 Suzuki²⁰⁾의 物質傳達效果에 관한 實驗結果를 利用하여 본래의 K_m 값과 물질 전달계수값인 $k_L a$ 를 구한다.

3. 實驗裝置 · 材料 및 方法

(1) 實驗裝置 및 材料

本 實驗에 使用된 裝置는 Fig. 1과 같다.



1. Fixed bed reactor
2. Flow meter (LAB-CREST DIV. F & P. Co. cat. No. 448-225)
3. Peristaltic pump (Rikakikai Co. Mp-3)
4. Substrate tank
5. Waterbath
6. Product reservoir

Fig. 1. Schematic diagram of experimental apparatus

本 實驗에 使用된 균주는 *Aspergillus niger* KG 79이며 기질로는 D-xyylan (Sigma from larchwood) 및 벚짚 (경기도산)을 使用하였고 xylose (Sigma No. x-2000)를 환원당의 표준시료로 使用하였으며 Bovine albumin (Sigma)을

단백질 정량의 표준시료로 사용하였다. 또한 효소의 고정화를 위해 담체로는 활성탄(Philippine-Japan activated carbon Co.)을 사용하였다.

(2) 實驗方法

(2)-1. 벚짚으로부터 hemicellulose 추출

우리나라의 벚짚은 cellulose, hemicellulose, lignin 이 각 32%, 19.7%, 45.3%으로 構成되어 있으며, hemicellulose 성분은 선택적으로 벚짚과 NaOH 용액과의 反應으로 추출된다. 추출되어 나오는 hemicellulose의 양을 알기 위하여 NaOH 용액의 농도 및 온도, 시간을 變化시켜 가면서 實驗하였다. cellulose, lignin, hemicellulose와 hemicellulose 속에 포함된 xylan의 定量分析은 Koo²⁵⁾와 AOAC²¹⁾法으로 行하였다.

(2)-2. 조효소의 製造 및 活性測定

酵素製造方法은 大量生産을 目的으로 밀기를 25 g에 물 25 ml를 가하여 autoclave에서 가압살균후 接種하여 26°C에서 3일간 배양하였다. 이와같이 만든 Koji에 5배의 물을 첨가하여 25°C에서 2시간 동안 추출하여 여과한 후 10,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 나온 상등액을 황산암모늄 50%(w/v)로 가한후 하루동안 4°C에서 방치하고 이때 침전된 효소를 투석시켜 vacuum freeze dryer로 냉동건조시킨 것을 조효소로 사용하였다.^{26, 27)}

조효소의 역가측정은 xylan 0.625g을 0.5N-NaOH 20 ml에 녹이고 1N-HCl 10 ml와 0.05 M acetate buffer(pH 4.5) 90 ml를 가하여 진탕기에서 40°C, 30분간 반응시키고 이때 생성된 환원당을 Somogi-Nelson法²¹⁾으로 測定하였다.

이 분말효소의 xylan 분해활성은 1g당 575 unit였으며, batch 실험시 0.2%(w/v) (pH 4.5 acetate buffer) 효소액을 사용하였다.

* 1 unit: 주어진 條件下에서 1분동안 1μmde의 xylose를 生成하는 효소의 活性

(2)-3. 固定化酵素의 製造 및 活性測定

고정화 효소의 제조를 위해 담체는 활성탄을 사용하였으며 활성화시킨 담체 1g을 2.5% (w/v)의 효소용액 3ml에 bifunctional reagent인 glutaraldehyde를 첨가하여 교반하면서 공유결합시켜 충분히 吸着시킨 후 상등액을 버리고 상등여액에 효소가 없을 때까지, 즉 분광계의 280 nm의 파장에서 흡광도가 나타나지 않을 때까지, 증류수로 세척하여 고정화 효소로 사용하였다. 고정화시킨 효소의 역가측정은 조효소의 역가측정법과 마찬가지로 0.625% (w/v)의 xylan 용액 5 ml에 효소를 흡착 고정화시킨 활성탄 1g을 가하여 40°C에서 30분간 반응시키고 Somogi-Nelson法으로 환원당을 측정하였다. 활성탄 1g에 50 mg의 효소가 흡착된 고정화 효소의 xylan 분해활성은 활성탄 1g당 26.7 unit였다. 이 값을 relative activity 100%로 기준하고 측정하였다. 또한 이렇게 제조한 고정화 효소는 연속반응에서 약 2개월간 역가에 변화없이 사용할 수 있었다. 여액의 효소단백질 측정은 Robinson-Hodgen Biuret²²⁾법을 이용하였다.

(2)-4. 固定化酵素를 이용한 連續反應實驗

고정화 효소의 연속적인 반응을 위하여 Fig. 1과 같은 고정층 반응장치를 이용하였으며 활성탄에 고정화시킨 효소를 반응기에 채워 넣고 여러 종류의 초기농도값을 지닌 xylan 용액을 각기 다른 유속으로 反應시켰으며 xylan 용액의 유속과 초기농도가 바뀔 때마다 정상상태를 유지하기 위해 60분 이상 충분히 반응시킨 후의 반응값을 사용하였다. 반응기를 通過하여 나온 生成物質은 Somogi-Nelson法으로 환원당을 정량분석하고, liquid chromatograph법으로 생성물을 정성 및 정량분석하여 Fig. 2와 같이 나타냈으며, 반응기는 내경 1.8 cm, 높이가 26.5 cm인 아크릴 수지관을 使用하였고, 반응기 내부온도는 water jacket의 이중관을 사용하여 일정하게 유지하였다.

본 실험의 조작조건은 Table 1과 같다.

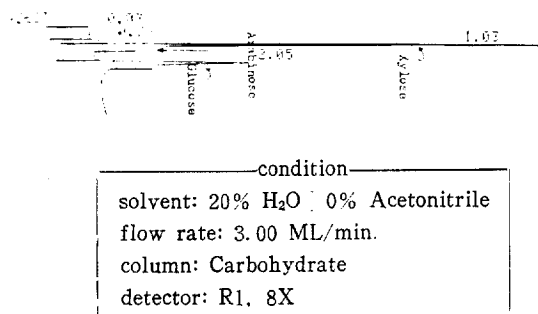


Fig. 2. HPLC (Waters Co. M 45) Patterns of sugar analyses

Table 1. Operating condition of reactor

Reactor diameter, cm	1.80
Reactor height, cm	26.5
Substrate flow rate, ml/hr	30-210
Reactor voidge	0.50
Initial substrate concentration(%)	0.25-1.25
Viscosity*, (cP)	1-1.12
Density, (g/cm ³)	1-1.05
Reactor temperature, °C	40-0.5

* Properties for substrate solution at 40°C

4. 實驗結果 및 考察

(1) 볏짚으로부터 hemicellulose 추출

Fig. 3, 4, 5는 볏짚에서 추출되는 hemicellulose의 양을 알기 위하여 NaOH의 농도, 추출시의 온도, 시간을 변화시켜 가면서 실험한 결과이다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 볏짚과 NaOH 용액을 1:20(w/v)으로 혼합할 때 NaOH 농도가 증가함에 따라 추출량도 증가하며, NaOH의 농도가 15% 이상부터는 추출량이 일정하게 나타남을 알 수 있었다. 이때 hemicellulose의 값은 주입볶짚에 대한 추출된 hemicellulose 양의 백분율이다. 온도에 따라서는 90°C에서 최대 추출량을 나타내었으며, 시간에 따라서는 6시간 이상에서는 거의 변화가 없음을 알 수 있다.

(2) 효소의 고정화

(2)-1. 효소의 고정화시 pH 및 온도의 영향

0.05 M buffer solution (HCl-KCl buffer, ace-

tate buffer, citric phosphate buffer, borax-NaOH buffer)을 사용하여 만든 2.5% 효소액에 활성탄을 흡착시켜 pH 변화에 따른 흡착고정화되는 효소의 활성을 측정해 본 결과 Fig. 6과 같으며 흡착시의 최적 pH는 5.0으로 나타났다. 즉 *Aspergillus niger*로부터 생성된 xylanase가 酵素反應最適 pH 범위에서 가장 잘 흡착고정화됨을 나타낸다. 온도에 따른 영향으로는 2.5% (w/v) 효소용액 (0.05 M pH5 acetate buffer) 3 ml에 활성탄 1g을 가한 후 0°C부터 50°C 조건에서 각각 100 분간씩 흡착시킨 후, 고정화된 효소의 활성을 측정한 결과, 효소흡착

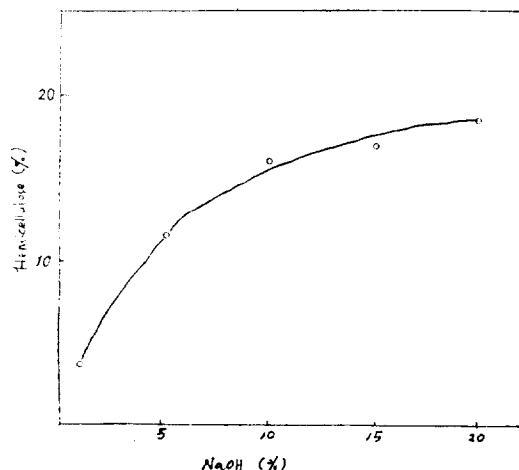


Fig. 3. Effect of NaOH concentration on the extraction of hemicellulose from rice straw. (One part of rice straw was extracted with 20 parts of NaOH solution at 90°C for 3hr.)

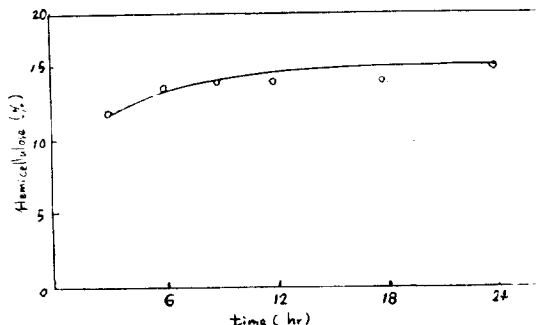


Fig. 4. Time course of hemicellulose extraction from rice straw (One part of rice straw was extracted with 20 parts of 15% NaOH solution at 90°C)

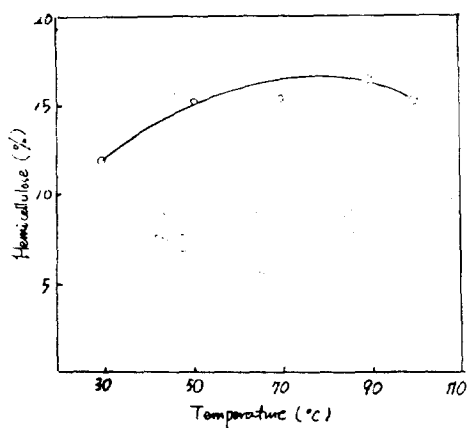


Fig. 5. Effect of temperature on the extraction of hemicellulose from rice straw (One part of rice straw was extracted with 20 parts of 15% NaOH at different temperatures for 6 hrs.)

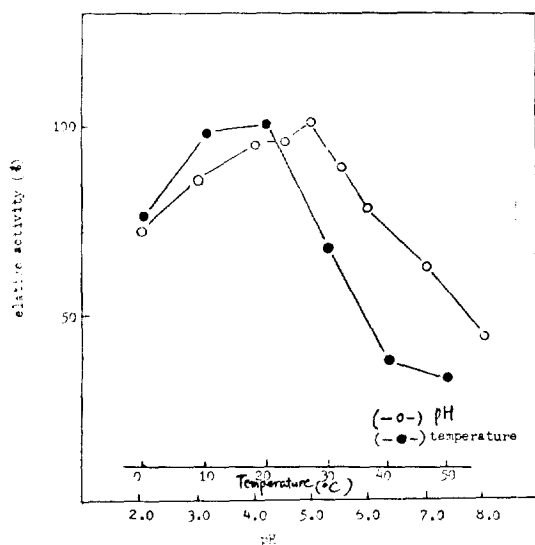


Fig. 6. Effect of pH and temperature for the preparation of immobilized enzyme for 100 min. adsorption.

의 최적온도는 20°C 였다.

(2)-2. 담체량과 효소량과의 흡착관계

0.05 M pH 5 의 acetate buffer 용액 3 ml 에 효소 100 mg 을 가하고 활성탄을 0.5 g 에서 2.5 g 까지 변화시켜 가면서 100 분간 흡착시키고 그때의 복합체의 효소활성을測定한 결과는 Fig.

7 과 같다. Fig. 7 에서 보는 바와 같이 활성탄이 2g 될 때까지는 계속적으로 활성이 증가하나 그 이상에서는 변화가 없었다.

또한 0.05 M pH 5 acetate buffer 용액 3 ml 에 효소 100 mg 을 가하고 활성탄 2g 을 넣고 20 분에서 100 분간의 교반 후 시간에 따른 흡착량을調査해 본 결과 100 분以後에는 변화가 없으므로 完全吸着時間이 100 분이라는 것을 알 수 있었다.

(2)-3. glutaraldehyde가 효소의 흡착 및 결합에 미치는影響

3.75% (w/v) 효소용액 (pH 5, 0.05 M acetate buffer) 2 ml 에 5~25%의 glutaraldehyde 용액을 1 ml 씩 가하고, 활성탄 1g 을 넣은 뒤 20°C 에서 100 분간 교반하여 결합시킨 후의 활성을測定한 결과는 Fig. 8 과 같으며 glutaraldehyde 를 첨가하여 흡착결합시킨 효소의 경우가 첨가하지 않은 경우보다 약 30% 이상의 효과를 보였으며 glutaraldehyde 량이 증가할수록 共有結合량이 많아짐을 알 수 있었다.

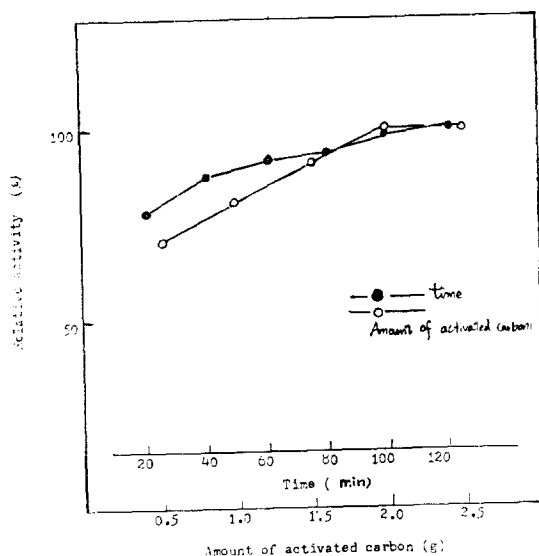


Fig. 7. Amount of the dried activated carbon used for the immobilization of 100mg enzyme and the effect of adsorption time for the preparation of immobilized enzyme at 20°C, PH 5.

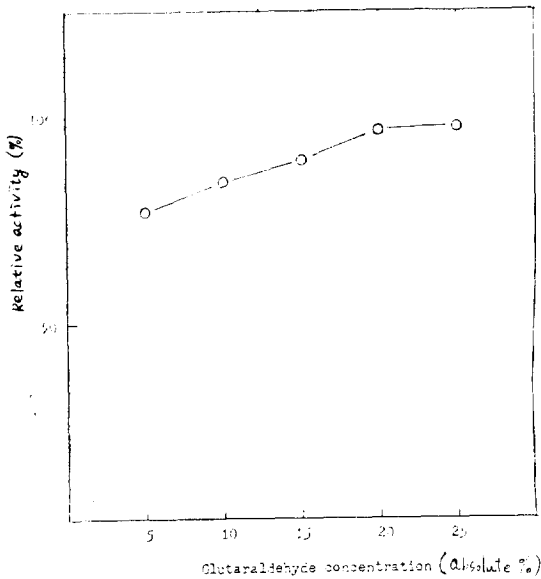


Fig. 8. Effect of glutaraldehyde concentration for the preparation of immobilized enzyme at 20°C, pH 5.

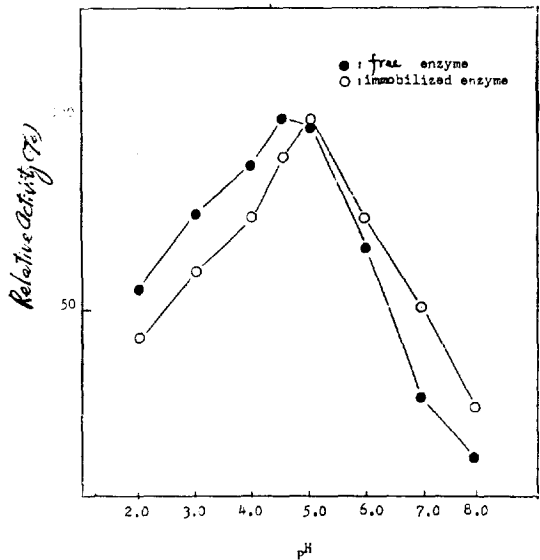


Fig. 9. Effect of pH on the hydrolytic reaction with immobilized enzyme. Activity was determined with 1% xylan solution in varying pH for 30 min. at 40°C.

(3) 固定化酵素의 反應諸特性

(3)-1. 反應時 pH 및 溫도의 影響

고정화 효소를 사용하여 반응시킬 때의 pH 영향을 검토하기 위하여 pH 2~pH 10의 buffer 용액을 사용하여 만든 1%의 xylan 용액에 1g의 고정화 효소를 혼합하여 반응시킨 후 효소활성을 측정해 본 결과 Fig. 9와 같다. 그림과 같이 pH 5에서 최대활성을 나타냈고 수용성 효소 때보다 전체적으로 pH가 높은쪽으로 약간씩 이동하는 것을 알 수 있었다. 이는 효소가 고정화될 때 glutaraldehyde의 작용으로 효소의 작용기의 성질에 변화가 있음을 나타내는 것이다.

한편 온도의 영향에 대해서는 1%의 xylan 용액(0.01 M acetate buffer pH 5)에 1g의 고정화 효소를 혼합하여 10°C에서 70°C까지 변화시켜 가면서 30분간 반응시켜 측정한 결과 Fig. 10과 같이 최적온도는 40°C로서 액상 효소와 같은 결과를 보였으며 60°C, 70°C에서는 glutaraldehyde와의 공유결합으로 작용기의 안정화에 따라 액상효소 때보다 반응이 잘 되는 것을 알 수 있었다.

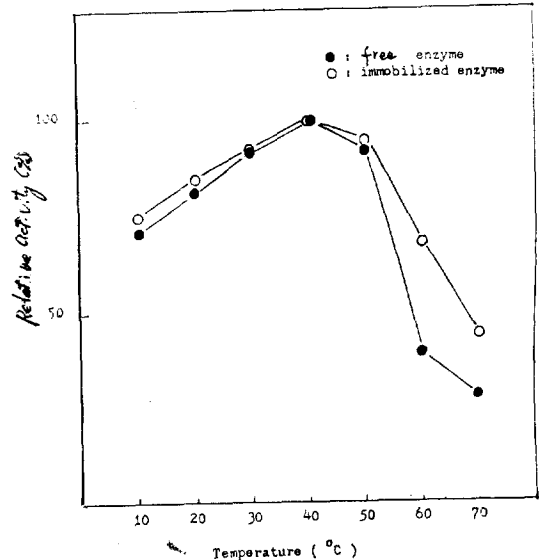


Fig. 10. Effect of temperature on the hydrolytic reaction with immobilized enzyme. Activity was determined with 1% xylan solution at varying temperature.

(3)-2. 안정성에 미치는 pH 및 온도의 영향

고정화 효소의 안정성에 미치는 pH 영향을 규

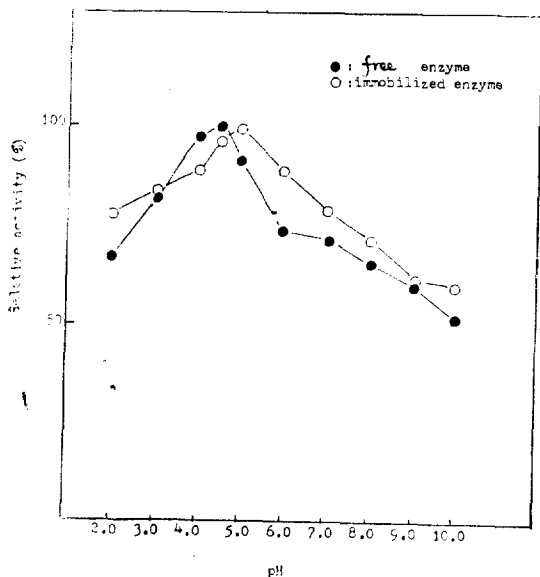


Fig. 11. Effect of pH on the stability of immobilized enzyme.

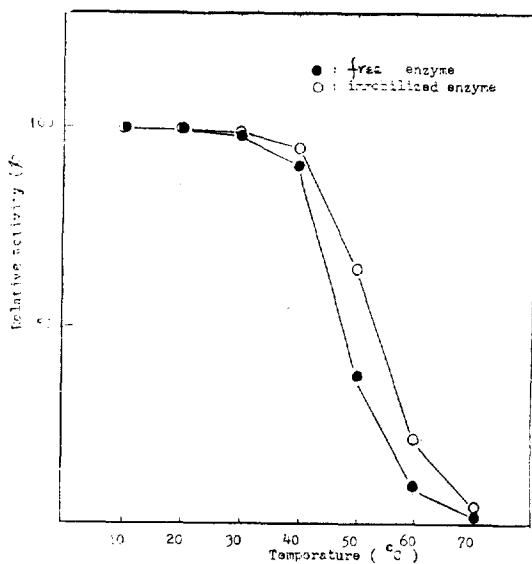


Fig. 12. Effect of temperature on the stability of immobilized enzyme.

명하기 위해 pH 2에서 pH 10까지의 buffer 용액에 고정화효소 1g 씩을 가하여 4°C에서 2시간 정치시킨 후 증류수로 세척하고 다시 pH 5, 1% (w/v) xylan을 3ml 가하고 30분간 반응시킨 후 잔존효소의 활성을 측정 비교하였다. Fig. 11과 같이 고정화효소는 액상효소에 비해 약간

높은 pH 5에서 가장 안정하였으며 상대적으로 pH가 높은 값을 가질수록 액상효소에서 보다 안정된 값을 가짐을 알 수 있었다. 이 결과는 효소반응 때와 같이 glutaraldehyde의 작용으로 인하여 효소의 작용기가 안정해짐에 기인된 것으로 사료된다.

온도의 영향으로는 고정화효소 1g에 acetate buffer (pH 5) 3ml를 가하고 20°C에서 70°C까지 각각 2시간 방치후 상등액을 버리고 증류수로 세척한 후 1%의 xylan 용액을 가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 것으로 잔존효소활성을 측정한 결과 Fig. 12와 같다. 고정화효소와 액상효소가 40°C가 지나면 활성이 급격히 저하되나 고정화 효소는 액상효소보다 구조적으로 안정되어 비교적 열안정성이 큼을 알 수 있었다.

(4) 고정화 xylanase를 이용한 固定層反應器에서의 연속가수분해반응

활성탄에 고정화시킨 xylanase를 column 내에 완전충전시켜 공극도(ϵ)가 0.5가 되게 하고 初期濃度가 다른 xylan 용액을 연속적으로 column 내로 유입시켜 반응시켜 나온 生成物中の xylose 량은 Fig. 13과 같으며 Fig. 14에

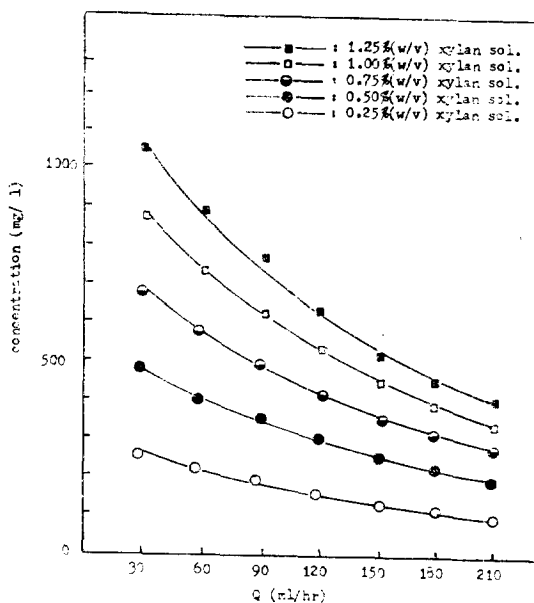


Fig. 13. Relation between product concentration of xylose and substrate flow rate Q

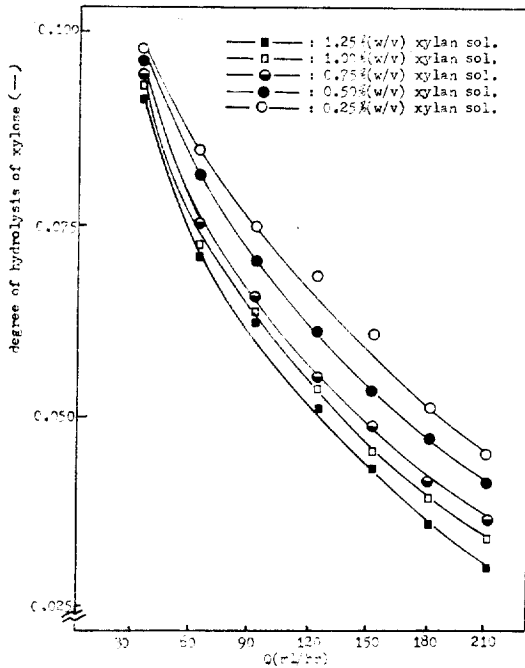


Fig. 14. Relation between degree of hydrolysis of xylose and substrate flow rate Q

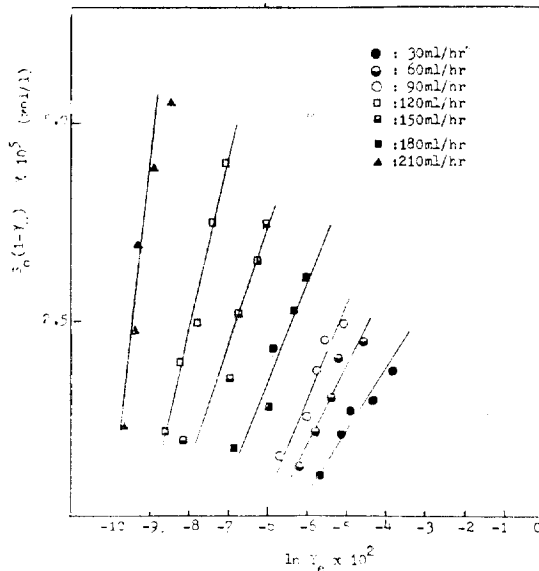


Fig. 15. Relation between $S_0(1-Y_e)$ and $\ln Y_e$ for the hydrolysis of xylan by least square method

서 보듯이 유속에 따른 기질의 전환율은 유속이 작을수록 초기농도가 작을수록 커짐을 알 수 있

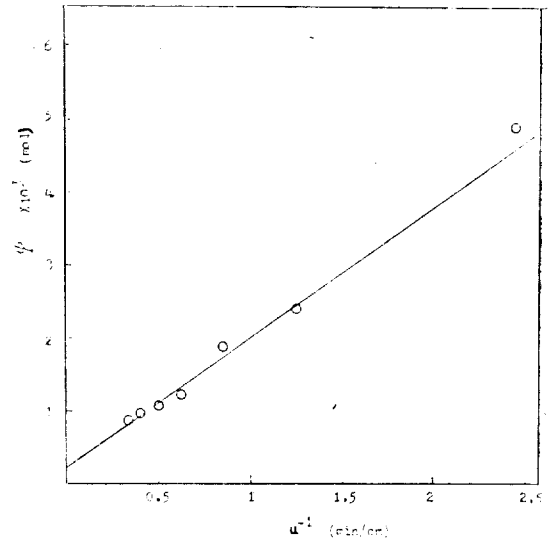


Fig. 16. Relation between Ψ and u^{-1} for the hydrolysis of xylan.

다.

고정층 반응기에서 매우 낮은 유속의 범위에서는 實驗的 情報가 거의 없으나 plug flow reactor 에서의 反應으로 담체의 表面에 액막이 형성되는 모델로 생각하여 이에 따른 걸보기 K_m 과 본래의 K_m 값 및 k_{La} 값을 구하였다.

Fig. 15 에서와 같이 식(7)의 $\ln Y_e$ 와 $S_0(1 - Y_e)$ 의 상관관계가 直線을 나타내므로 여기에서 $\beta' + \frac{3}{4}\alpha'$ 값과 λ' 값을 구하고 $\beta' + \frac{3}{4}\lambda'$ 값으로부터 k_{La} 값을 구하기 위해 Fig. 16 에서 보는 바와 같이 $\beta' + \frac{3}{4}\alpha'$ 즉 직선의 기울기값 Ψ 와 유속과의 상관관계를 유도하여 Kunii 의 $k_{La} = k_c \cdot N_{Re}$ 식을 연관시켰다. 즉

$$\beta' + \frac{3}{4}\alpha' = K_m + \frac{3}{4}$$

$$\left[\frac{k_2 E (1 - \epsilon)}{k_c \cdot \frac{\rho u d}{\mu}} \right] = \Psi$$

가 되므로

여기에서 u^{-1} 와 Ψ 의 함수관계로부터 K_m 값과 k_{La} 값을 알아내었다. 따라서 이계에서의 k_{La} 값과 유속간의 상관관계는 $k_{La} = 9.2 N_{Re}$ 로 나타낼 수 있었고 K_m 값은 $0.82 \times 10^{-3} M$ 이었다. 반응기내에서의 기질유속이 증가함에 따라 걸보기 K_m 값은 감소하였으며 K_m' 값의 감소는 Kobay-

Table 2. Values of apparent K_m (K_m')

Substrate flow rate(mi/hr)	Apparent K_m (M)
30	5.15×10^{-3}
60	2.42×10^{-3}
90	1.90×10^{-3}
120	1.17×10^{-3}
150	1.11×10^{-3}
180	0.96×10^{-3}
210	0.94×10^{-3}

ashi¹²⁾에 의한 $K_m' = K_m + 3/4[k_2E(1 - \epsilon)/k_{LA}]$ 로서 알 수 있었으며, 이것은 유속이 증가함에 따라 체류시간의 감소와 경막의 물질이동에 대한 저항값의 감소에 기인하는 것으로 설명할 수 있다.

Table 2에서는 각각의 유량에 따른 겉보기 K_m (K_m')값을 나타내었다.

5. 結 論

本實驗의 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 固定化酵素의 製造時 活性炭에 吸着되는 酵素의 最適 pH 및 溫度는 pH 5.0 및 20°C였으며 glutaraldehyde 溶液이 bifunctional reagent로 作用하여 酵素의 結合을 安定시켜 주었다.
2. 固定化된 xylanase의 反應最適 pH는 5.0으로 水溶性 酵素보다 약간 높은 값을 나타내었으며 反應最適溫度는 40°C였고 熱安定性 및 pH 安定性이 水溶性 酵素에 비해 약간 큰 값을 나타내었다.
3. 固定化시킨 xylanase를 충전시킨 固定層反應器에서 加水分解連續反應時 0.25~1.25% (w/v) xylan 溶液의 8.2~8.7%가 xylose로 轉換되었고, K_m 값은 $0.82 \times 10^{-3}M$ 이었으며 流速이 增加하면 k_{LA} 값이 增加하여 겉보기 K_m (K_m')값은 감소하였다.

後 記

本 研究는 1982年度 產學協同財團지원 研究費

로 수행되었으며, 產學協同財團當局과 本 實驗을 爲해 均주를 제공하여 주신 KAIST 한 문회 박사님께 感謝의 뜻을 올립니다.

Nomenclature

- a External surface area of support per unit volume of reactor, cm^{-1}
- B_0 Bodenstein number, $uL/D(-)$
- d Particle diameter, cm
- D_L Molecular diffusivity of substrate, cm^2/sec
- D Dispersion coefficient, cm^2/sec
- E Enzyme concentration in support, g/cm^3
- k_L Mass transfer coefficient in the liquid film, cm/sec
- K_m Michaelis constant, g/cm^3
- K_m' Apparent Michaelis constant, g/cm^3
- k_c Constant in correlation $N_{sh} = k_c \cdot N_{Re}$, $(-)$
- k_2 Rate constant, sec^{-1}
- l Longitudinal distance of reactor, cm
- N_{Re} Reynold number, $\rho u d / \mu (-)$
- N_{sh} Sherwood number $k_L d / D_L$
- P Product concentration, g/l
- Q Substrate flow rate, l/sec
- S Substrate concentration, g/cm^3
- S^* Substrate concentration the surface of support, g/cm^3
- S_0 Substrate concentration in feed, g/cm^3
- u Substrate velocity, cm/sec .
- v Volume
- w Weight
- Y Dimensionless concentration, S/S_0
- Y_c Outlet dimensionless concentration of substrate, $(-)$
- Y Dimensionless concentration of substrate at the surface of support
- z Dimensionless longitudinal distance, l/L
- α Dimensionless parameter, $k_2E(1 - \epsilon)/k_{LA} S_0$

α'	αS_0 , g/cm ³
β	Dimensionless parameter, K_m/S_0
β'	βS_0 , g/cm ³
ϵ	Voidage volume per unit volume of reactor, (-)
ρ	Substrate density, g/cm ³
τ	Retention time L/u , sec
λ	Dimensionless parameter, $\alpha\omega$
λ'	λS_0 , g/cm ³
μ	Substrate viscosity, g/cm·sec
\mathcal{W}	Slope of linear relationship between S_0 ($1 - Y_e$) and $\ln Y_e$
ω	Dimensionless parameter $(k_L a / \epsilon) \cdot \tau$

參考文獻

- George T. Tsao, "Annual report of fermentation processes," 2, Academic Press, 1978. p. 1.
- Michael E. Flickinger, "Annual report of fermentation processes," 2, Academic Press, 1978. p. 23.
- T.A. Hsu, and M.R. Ladisch, *Chemtech. May* (1980), 315.
- Irving S. Coldstein, *Biotech. & Bioeng. Sym.* 6(1976), 293.
- Bisaria V.S. and T.K. Ghose, *Enzyme Microb. Technol.*, 3(1981), 90.
- Michael J. and Bernd, S., *Can. J. Biochem.*, 57(1979), 125.
- Robert F.H. and Geoffery N.R., *Carbonhydrate Research*, 42(1975)
- Chales R. Wilke. and Ren der Yang., *AIChE Symposium series*, 72 158, (1976), 104.
- Gorbacheva I.V. and N.A. Rodionova., *Biochem. Biophys. Acta*, 79(1977), 484.
- Oskar, Zabosky, "Immobilized Enzymes," CRC Press, 1974, p. 61.
- Kunion Ohmiya. and Shuya Tanimura., *Biotech. & Bioeng.*, 20(1978), 1.
- Takeshi Kobayashi. and M. Moo Young., *Biotech. & Bioeng.*, 13(1971), 893.
- J.A. Howell, and J.D. Stuck., *Biotech. and Bioeng.*, 17(1975), 878.
- Baily and Ollis, "Biochemical Engineering Fundamentals," McGraw-Hill, 1977.
- R. Haynes. and K.A. Walh., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 36(1969), 234.
- Y.K. Cho. and J.E. *Biotech. & Bioeng.*, 20(1978), 1651.
- Y.K. Cho. and J.E. Bailey., *Biotech. & Bioeng.*, 21(1979), 461.
- N.D. Lilly. and W.E. Hornby., *Biochem. J.*, 100(1966), 718.
- S.P.O Nill. and P. Dunhill., *Biotech. and Bioeng.*, 13(1971), 337.
- D. Kunii and M. Suzuki, *Internal. J. Heat and Mass Transfer*, 10(1967), 845.
- Somogi. M., *J. Biol. Chem.*, 19(1952), 195.
- H.W. Robinson. and C.G. Hogden., *J. Biol. Chem.*, 135(1940), 707.
- Ghose, T.K., A. Fiechter and N. Blake brough., "Advances in Biochemical Engineering," 2, 1-48 Springer-Verlag, Berlin, 1972.
- Wingard. G.B. Jr., "Enzyme Engineering," John Wiley & S Sons, 1972.
- Koo, Y.C., "The Chemical Composition and Cellulosic Structures of Major Bamboo Products in Taiwan," Taiwan Forestry Research Institute, Feb, 1972.
- Association of Official Agricultural Chemists in Official Methods of Analysis. 11th, ed. (AOAC, Washington, D.C. 1970), p. 336.
- 한문희, 최양도, *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.*, 9(1981), 241.
- 우창명, 이서래, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 4(1972)
- 정동효, 이계호, *J. Kor. Agricultural Chemical Society*, 12(1972), 207.
- 김병홍, 배무, *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.*, 7(1979), 91.
- 송정승, "Naringinase 의 고정화," 연세대학교(1977).

