

Silica Gel을 담체로한 효소의 고정화 및 충전층 반응기에서의 반응속도론적 해석

한상섭 · 조찬휘 · 이한주

연세대학교 공과대학 화학공학과
(1990년 9월 5일 접수, 1991년 2월 2일 채택)

Hydrolytic Enzyme Immobilization by Cross-linked Silica Gel and Their Kinetic Behaviors in Packed Bed Reactor

Sang Sub Han, Chan Hwi Cho and Hanju Lee

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Yonsei University
(Received 5 September 1990; accepted 2 February 1991)

요 약

본 연구에서는 가수분해효소인 trypsin을 가교결합 고분자인 실리카 겔을 담체로 하여 포괄법으로 고정시키고 고정화된 담체를 일정한 크기로 만든 후 충전층반응기에 넣어 DL-BAPNA 기질을 사용해 trypsin에 대한 반응성을 평가하였다. 25-200 cm/hr의 유속범위에서 Michaelis 상수와 최대반응속도 V_m' 은 고정화시키지 않았을 경우에 비해 Michaelis 상수는 작게 그리고 최대반응속도는 더 크게 나타났으며 Michaelis 상수는 유속에 따라 감소한 반면 최대반응속도는 증가하였다. 실리카 겔의 담체직경이 0.6 mm인 고정화효소에 대한 효율인자는 0.9~1로서 내부저항을 무시할 수 있었으며 외부물질전달계수 K_s 는 $8.82 \times 10^{-4} \sim 1.75 \times 10^{-3}$ cm/hr이었다. 또한, Michaelis 상수는 trypsin의 고정화밀도에 의해 영향을 받았으며 고정화된 효소의 양이 10 mg trypsin/g silica gel일 때 최적전환율을 나타내었다.

Abstract—This study is for the immobilization of a hydrolytic enzyme, trypsin, within cross-linked silica gels and their kinetic behaviors in a packed bed reactor using a sensible amide substrate, DL-BAPNA. In the range of linear velocity of 25 to 200 cm/hr, Michaelis constants(K_m') and maximum reaction rates(V_m') for immobilized trypsin were less and greater than those for a soluble trypsin, respectively. In comparison with free enzyme, Michaelis constants decreased but maximum reaction rates increased as linear velocity increased. In the case of supported silica-gel with the spherical diameter of 0.6 mm, the internal diffusion resistance was negligible because the effectiveness factor was found to be in the range of 0.9~1 and the mass transfer coefficient(K_s) was in the range of 8.82×10^{-4} to 1.75×10^{-3} cm/sec. In addition, Michaelis constant was the function of the amount of immobilized trypsin(immobilization density) and the conversion was found to be maximized at the immobilization density of 10 mg trypsin/g silica gel.

1. 서 론

효율적인 효소이용이라는 측면에서 효소고정화는 관

심이 집중되어 온 한 분야가 되어 왔으며 효소와 관계되는 고정화라는 의미는 효소분자에 대한 물리화학적인 제한이나 한정을 일컫는다. 오래전부터 이용되어 온

물리적 혹은 화학적인 효소고정화법에는 불용성 모체에 부착하는 흡착법, 이온결합법, 그리고 공유결합법이 있으며 불용성 겔모체 혹은 불용성 Microcapsule 내에 포괄하는 포괄법이 있다[1]. 고정화 대상의 효소에 따라 담체의 선정이 중요하며 이 때 고려할 사항은 효소의 성질, 입자의 크기, 표면적, 친수성과 소수성의 몰비, 담체의 화학조성 등이다. 고정 담체에 고정화된 효소를 충전층효소반응기에 사용하면 겔보기 속도상수들은 활성기의 물리화학적 변형, 하전상태에 있는 담체와 기질특성, 고정화효소 입자의 내부환경(microenvironment)과 외부환경(macroevironment)에서의 물질전달 저항 등의 인자들에 의해 영향을 받게 되는데 특히 물질전달 저항은 겔보기 속도상수와 같은 속도상수에 지대한 영향을 미치게 된다. 그러므로 물질전달 저항이 전체 반응속도에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 정량적인 해석이 고정화효소반응기 설계를 위하여 필요하게 된다. 따라서 고정화효소의 촉매작용에서 입자내부확산[7, 12, 13, 15, 18, 23] 및 입자간의 확산에 대한 연구가 폭넓게 진행되고 있다[4, 9-11, 14, 16, 18, 22].

국내에서는 silica gel을 이용하여 포괄법으로 효소를 고정화시킨 연구가 없었다. 그리고 포괄법으로 고정화된 효소는 겔의 기공크기가 상대적으로 적어 담체밖으로 유출될 수 없고, 겔이 하전형태를 띄고 있기 때문에 특정 기질에 대해서는 반응조건을 호전시킬 수 있다는 점에 착안하여 본 연구를 시작하였다.

본 연구에서는 가격이 저렴하고 구입이 용이한 가교 결합 고분자인 실리카겔을 담체로 하여 trypsin을 포괄법으로 고정화시키고, 고정화된 담체를 일정한 크기로 만든 후 충전층반응기에 넣어 DL-BAPNA 기질을 사용해 trypsin에 대한 반응성을 평가하여 물질수지식과 Lineweaver-Burk plot에 의해 고정화효소에 대한 겔보기 속도상수(V_m' , K_m')를 결정하고, 조작조건에 따른 속도상수의 영향 그리고 입자내 확산과 입자간 확산에 대해 연구하였다.

2. 실험

2-1. 실험장치

기질용액을 미량펌프로 유입하여 유량계를 거쳐 충전층반응기의 하단부에 일정한 유속으로 주입한다. 전반적인 실험반응장치는 Fig. 1과 같다.

2-2. 시료 및 효소고정화법

2-2-1. 효소 및 기질

본 실험에서는 가격이 저렴하기에 널리 사용되는 trypsin을 고정화효소로 선택하였으며 기질로는 효소활성을

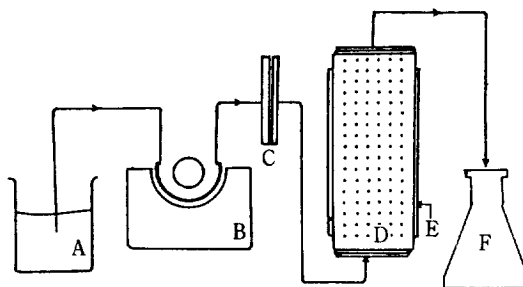


Fig. 1. Schematic diagram of the apparatus. A: Substrate solution reservoir, B: Peristaltic pump, C: Flow meter, D: Packed bed reactor, E: Water jacket, F: Product solution.

민감하고 간단하게 평가할 수 있는 DL-BAPNA를 사용하였다.

효소 : Trypsin in bovine pancreas (Cat. # : T 8253, type III, dialyzed and lyophilized, essentially salt-free) from Sigma Chem Co.

기질 : Na-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (DL-BAPNA, Cat. # : B 4875, hydrochloride crystalline) from Sigma Chem Co.

2-2-2. 실리카겔에 의한 효소고정화법

2-2-2-1. 하이드로 졸의 제조

먼저 효소를 고정화시키기 위해 규산소오다(sodium silicate)와 산용액으로 하이드로졸을 제조하였다. 하이드로졸은 여러 가지 SiO_2 함량이 맞추어 규산소오다와 산용액(HCl 용액)을 일정한 양론비로 혼합한 후 교반조에서 균일하게 교반하였다. 그리고 이 하이드로졸에 가성소오다용액을 가하여 효소에 큰 영향을 미치지 않는 pH 2 정도로 유지시켰다. 하이드로졸에 가할 효소는 현탁시켜 3-4 ml의 현탁용액(증류수)에 일정한량의 효소를 넣은 다음 충분히 분산시켜 사용하였다. 이 때 trypsin은 실라놀기(-Si-O-)를 가지고 있는 유리용기에 잘 흡착되기 때문에 플라스틱용기를 이용하였다.

2-2-2-2. 겔화에 의한 효소의 고정화

pH 2로 고정된 하이드로졸에 3-5 N 가성소오다용액을 가하고 pH 3-4로 재조절한 다음 효소현탁액을 가하면서 계속하여 교반시켰다. 그 후 혼합된 sol 용액은 축중합반응을 일으켜 서서히 하이드로겔이 된다. 이 겔은 교호적인 실리콘과 산소원자의 특성을 나타내는 3차원적으로 가교결합된 복합구조를 갖게 된다[8].

반응초기에 이같은 구조는 수화도도가 크고 입자간의 결합이 거의 없는 작은 입자로 되어 있지만 반응시간이 경과함에 따라 입자간의 결합이 더욱 중요하게 작용하여 겔화가 일어나게 된다. 하이드로겔이 형성된 후에도

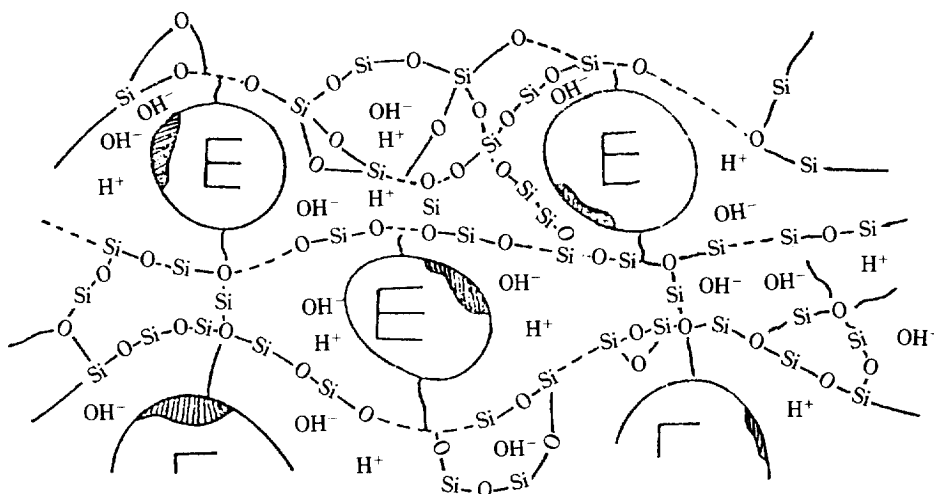


Fig. 2. Cross-sectional view of lattice-entrapped enzyme conjugate showing polymerchains and occluded enzyme molecules.

계속 물분자가 빠져 나오면서 축합반응이 일어난다. 이때문에 담체의 성질(담체의 전하)과 효소자체의 변형에 의해 국지적인 미세환경의 변화가 유도된다. 규산소다를 겔화시켜 trypsin을 포괄법으로 고정화시킨 2차원적 구조는 Fig. 2와 같이 추정된다. 이 때 효소를 포함하는 실리카겔은 수분함량(SiO_2 기준)이 500-1000% 정도(본 실험에서는 약 600%)이다.

2-2-2-3. 후처리(숙성, 세척 및 건조)

제조된 고정화 겔은 먼저 잘게 쪼개어 숙성하는데, 이 때 숙성용액은 효소활성에 거의 영향을 미치지 않는 45°C , pH 9-10인 암모니아수를 사용하였으며 65 cm/hr 유속으로 24시간 숙성하였다. 그 후 겔내부에 남아 있는 다량의 NaCl에 의해 효소주변환경을 악화시킬 수 있기 때문에 증류수로 24시간 동안 세척하였다. 숙성 및 세척과정을 거친 하이드로겔은 적당한 강도를 갖도록 진공증발기에서 수시간 동안 균일하게 건조시켜 겔의 수분함량이 200%가 되도록 하였다. 고정화된 효소가 담체 밖으로 떨어져 나오거나 담체외부 표면에 흡착되어 노출되는 경우가 있으므로 이 고정화 겔을 다시 세척한 후 재건조시켜 사용했다. 본 실험에서는 최종 SiO_2 함량을 7%, 최종수분함량을 200%로 유지하였다. 처리과정을 모두 마친 일정한 크기의 고정화 겔은 밀봉하여 건조를 막고 $0-4^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다.

2-3. 실험방법

2-3-1. 생성물 분석법

DL-BAPNA가 trypsin에 의해 가수분해되어 생성되는 p-nitroaniline은 노란 발색을 하므로 410 nm의 고유파

Table 1. Experimental conditions and ranges of reaction variables used for the operation of packed bed enzyme reactor

Reaction temperature	25°C
pH	8
Immobilized enzyme amounts	0.5-15 mg/g
Substrate concentration	0.5-4 mM
Superficial velocity	25-200 cm/hr

장에서 UV-spectrophotometer(UV-120-01, Shimadzu)를 이용하여 측정하였다[4, 13]. p-nitroaniline에 대한 표정곡선은 0.02 M CaCl_2 를 포함한 0.05 M Tris buffer에 일정량의 p-nitroaniline(M.W=138.1)을 녹인 용액을 이용하여 구했으며 채취한 시료에는 반응정지제(0.2 N HCl)를 가한 후 측정하였다.

2-3-2. 충전층반응기에서의 실험방법

DL-BAPNA 결정분말을 2 ml dimethyl sulfoxide에 완전용해시키고 0.02 M Tris buffer(pH 7.6)로 농도를 조절하였다. 이렇게 제조된 모액은 25°C 이상 유지하였다. 충전층반응기의 제원은 직경은 1.15 cm, 길이 11.7 cm 그리고 부피는 12.15 cm^3 이며 반응기에 충전되는 구형으로 가정한 실리카겔의 SiO_2 함량은 7%, 수분함량은 200%(SiO_2) 그리고 겔의 직경은 0.6 mm로 하였다. 본 실험의 반응조건은 Table 1에 나타내었다.

3. 결과 및 검토

3-1. 전하율에 대한 주입속도의 영향

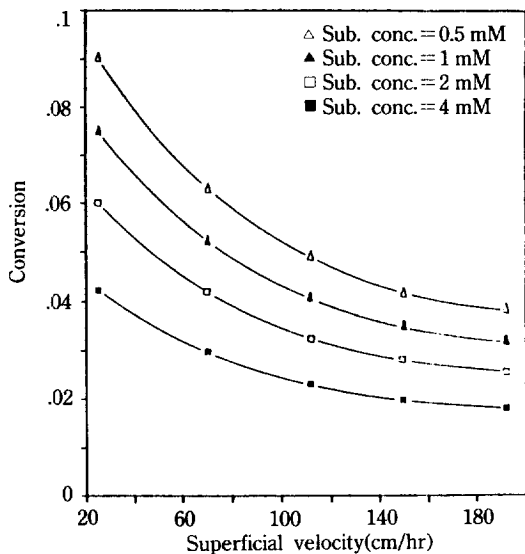


Fig. 3. The degree of hydrolysis of DL-BAPNA as a function of superficial velocity in PBR. Immobilized enzyme amounts=0.5 mg/g carrier, Reactor length=11.7 cm, $d=1.15$ cm.

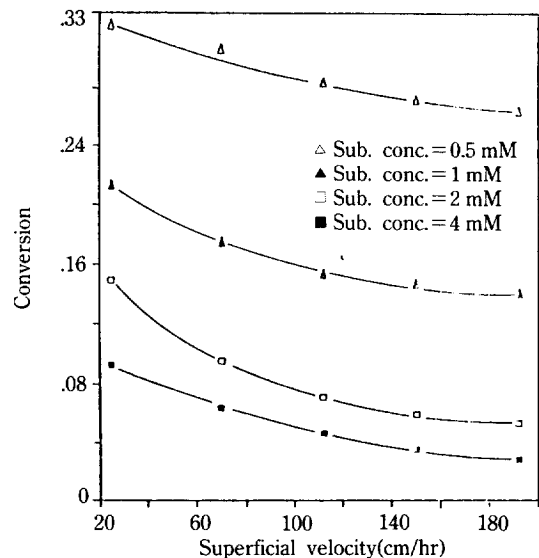


Fig. 5. The degree of hydrolysis of DL-BAPNA as a function of superficial velocity in PBR. Immobilized enzyme amounts=10 mg/g carrier, Reactor length=11.7 cm, $d=1.15$ cm.

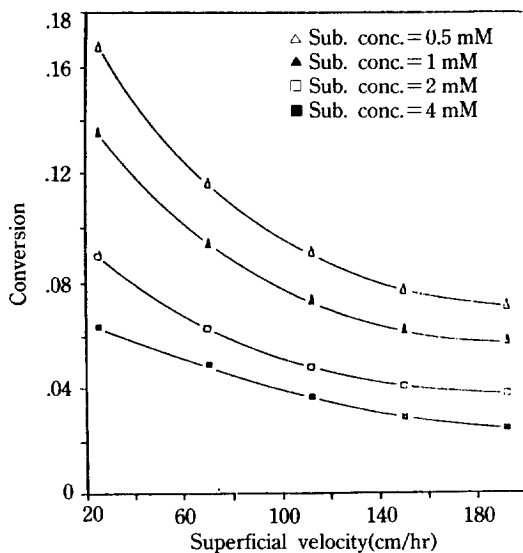


Fig. 4. The degree of hydrolysis of DL-BAPNA as a function of superficial velocity in PBR. Immobilized enzyme amounts=1 mg/g carrier, Reactor length=11.7 cm, $d=1.15$ cm.

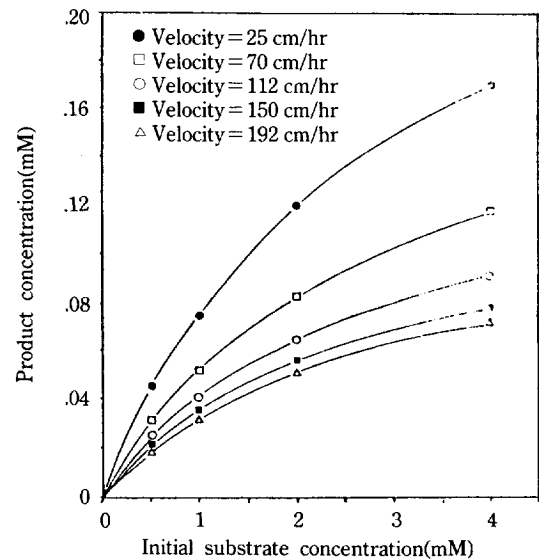


Fig. 6. The outlet product concentration as a function of initial substrate concentration in PBR. Immobilized enzyme amounts=0.5 mg/g carrier, Reactor length=11.7 cm, $d=1.15$ cm.

초기 기질농도를 일정하게 유지시키면서 용액의 주입속도에 따른 반응물의 전환율을 고정화된 효소의 양을 달리하면서 얻은 결과가 Fig. 3-5와 같다. Fig. 3-5를 살

펴볼 때 가장 낮은 기질농도인 0.5 mM일 때 용액주입 속도에 더 민감하게 작용하며 기질농도가 증가할수록 주입속도에 따른 영향이 상대적으로 감소함을 나타내고

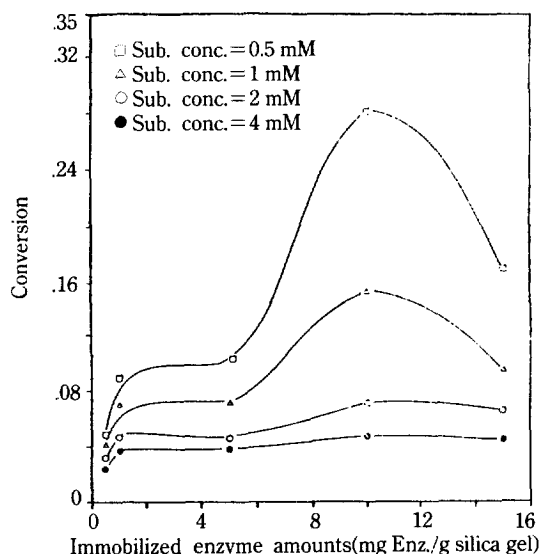


Fig. 7. The degree of hydrolytic reaction depending on immobilized enzyme amounts. Superficial velocity = 112 cm/hr, Reactor length = 11.7 cm, $d = 1.15$ cm.

있다. 이와 같은 결과는 다른 문헌에 나타난 결과와 같다 [9]. 그러나 주입속도가 아주 느린 범위에서 주입속도에 대한 전화율의 변화율은 기질농도가 커짐에 따라 증가될 것으로 기대된다. 이와 같은 실험조건하에서 Fig. 7에 나타난 바와 같이 도입유속이 112 cm/hr일 경우 고정화량이 10 mg/g silica gel일 때 최적전화율을 나타내었다.

3-2. 생성물 농도에 대한 초기기질농도의 영향

Fig. 6은 각각의 주입속도에 대해 초기기질농도에 따른 기질의 전화율을 나타내고 있다. 초기기질농도가 증가함에 따라 생성물의 양은 증가하였으나 전화율은 감소하였다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 기질농도가 증가할수록 생성물의 농도는 더 빨리 포화치에 이르고 기질의 농도가 낮을수록 기질농도의 변화율이 증가하는데 이러한 현상은 효소반응이 0차반응에서 1차반응으로 전이하기 때문에 일어나는 것으로 설명할 수 있다. 또한 Fig. 3-5와 Fig. 6을 비교해 보면 전화율 면에서 초기농도를 높이는 효과는 도입 유속을 증가시키는 결과로 됨을 알 수 있다.

3-3. 전화율에 대한 고정화된 효소량의 영향

고정화 효소량에 따른 가수분해정도를 Fig. 7에 나타내었다. 초기기질농도가 2 mM, 4 mM일 경우 고정화 효소의 양이 증가함에 따라 반응물의 전화율이 일정한 포화치에 도달하였고, 0.5 mM, 1 mM일 때는 고정화

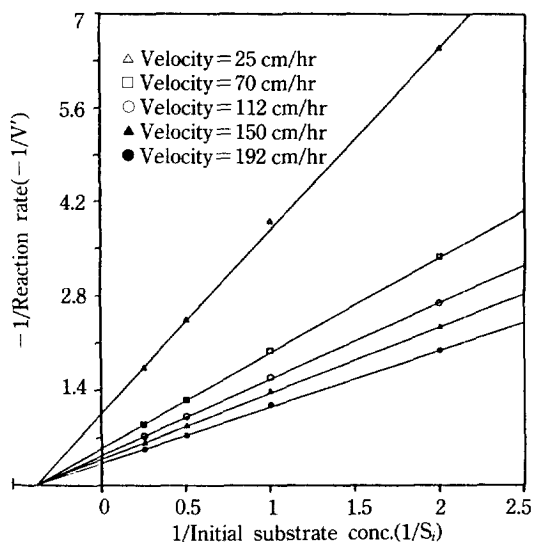


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot for immobilized trypsin immobilized enzyme amounts = 0.5 mg/g carrier.

효소의 양이 10 mg trypsin/g silica gel일 때까지 전화율이 점증하다가 그 이상의 고정화된 양에서는 역으로 감소하였다. 이러한 현상은 실리카겔과 DL-BAPNA의 구조특성, 하전형태, 그리고 생성물과의 상호작용에 의한 결과로 사료된다. Fig. 7에 의하면 고정화된 효소의 양에 대해 기질농도가 적어질수록 더욱 더 민감한 반응을 보이고 있음을 나타내며 이와 유속을 달리했을 경우에도 비슷한 경향을 나타내었다.

3-4. 고정화효소에 대한 Lineweaver-Burk plot 및 물질수지에 의한 속도상수의 결정

고정화효소에 대한 속도상수는 고정화되지 않은 효소의 속도상수와 다르게 된다. 여러 형태로 고정화된 효소에 대한 겔보기 Michaelis상수(K_m')와 겔보기 최대반응속도(V_m')에 대한 많은 실험적인 보고가 있었다 [4, 6, 13, 19]. 한편 본 실험에 의하면 고정화된 효소의 양에 따라서는 K_m' 이 상당히 변화하였다. 이와 같은 결과는 담체특성(입체구조적인 형태, 담체의 하전특성, 다공성, 굴곡도), 고정화되는 효소의 밀도 및 활성점의 열화(deactivation), 용액특성(기질, 생성물 그리고 용액의 하전형태), 그리고 담체 외부의 물질전달 저항과 같은 조작특성 등에 의해 반응 주변환경의 변화정도가 달라지는 것으로 사료된다. 본 실험과 같이 겔과 기질의 하전부호가 다르면 효소-기질 반응조건을 향상시켜 고정화되지 않은 trypsin보다 더 낮은 외부 기질용액에서 한계속도 V_m' 에 도달하게 되고 Michaelis 상수는 수용

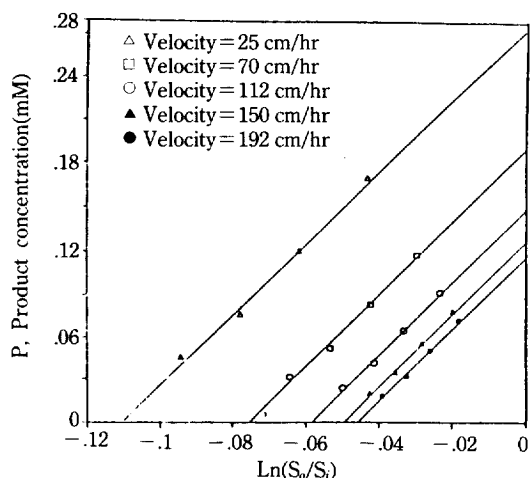


Fig. 9. The dependence of kinetic parameters on inlet velocity. Immobilized enzyme amounts=0.5 mg/g carrier, $2R=0.6$ mm, $T=298$ K.

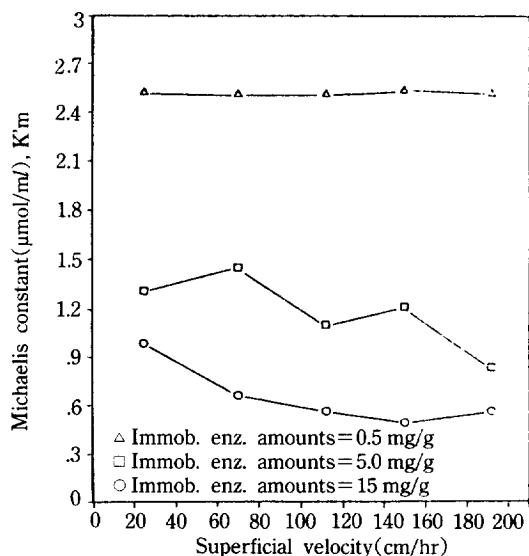


Fig. 10. The variation of the apparent Michaelis constants with superficial velocity estimated by Lineweaver-Burk plot in PBR(Toda Method). $2R=0.6$ mm, $T=298$ K.

성 trypsin보다 더 적게 된다.

Toda는 고정상 미분 반응기에 대한 실제 평균 반응 속도(effective rate of enzyme reaction), $-Ve'$ 를 구한 후 Lineweaver-Burk plot를 통해 겉보기 속도상수를 평가하였다[22].

$$-Ve' = \{F/C(1-\alpha)\} (S_i - S_o) \quad (1)$$

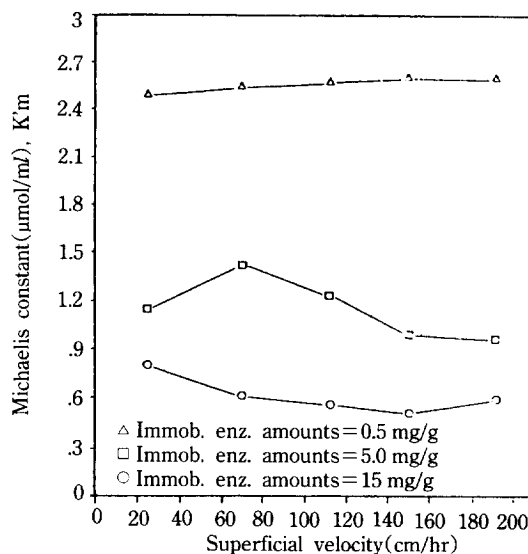


Fig. 11. The variation of the apparent Michaelis constants with superficial velocity estimated by material balance in PBR(Gelf Method). $2R=0.6$ mm, $T=298$ K.

Fig. 8은 식 (1)을 이용해 반응속도를 구한 다음 Lineweaver-Burk plot한 것이며 이 때 평가한 겉보기 Michaelis 상수 $K'm'$ 과 최대반응속도 Vm' 은 Fig. 10과 12에 나타내었다. Lilly 등[13]은 column 내의 효소활성은 일정하고 균일하며 bulk 용액에서 기질에 대한 촉방향 확산은 무시할 수 있다고 가정하여 정상상태에서 식 (2)와 같은 수지식을 유도하였다.

$$S_i - S_o = Km' \ln(S_o/S_i) + Vm' L/F \quad (2)$$

식 (2)를 이용해 속도상수를 결정할 수 있는데 $\ln(S_o/S_i)$ 와 $(S_i - S_o)$ 에 대한 그래프는 Fig. 9와 같으며 이와 같은 방법으로 평가된 속도상수 $K'm'$ 과 Vm' 은 Fig. 11과 13에 나타내었다.

Lineweaver-Burk plot에 의한 Toda법과 물질수지에 의한 Gelf법으로 평가한 겉보기 Michaelis 상수는 거의 차이가 없으나 겉보기 최대반응속도는 약 40%의 차가 발생하였다. Fig. 10과 11에 의하면 고정화된 양이 많을수록 $K'm'$ 은 작아졌으며 효소의 고정화된 양이 0.5 mg/g silica gel일 때는 유속에 의해 거의 영향받지 않았으나 더 많은 양이 고정화되었을 경우에는 유속이 증가함에 따라 일관성있게 감소함을 보여 주었다. 따라서 고정화된 효소의 밀도가 Michaelis 상수에 상당한 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 또한 고정화된 효소의 양이 증가할수록 Michaelis 상수가 감소하여 반응조건이 호전되었다. 그리고 Fig. 12-13에 나타난 바

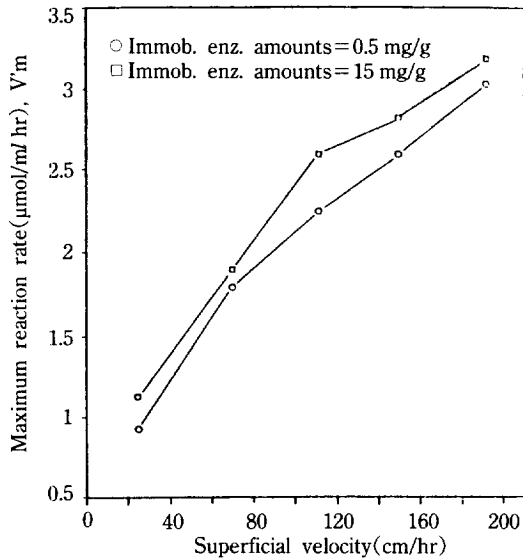


Fig. 12. The effect of superficial velocity on the apparent maximum reaction rate estimated by Lineweaver-Burk plot in PBR(Toda Method). $2R=0.6$ mm, $T=298$ K.

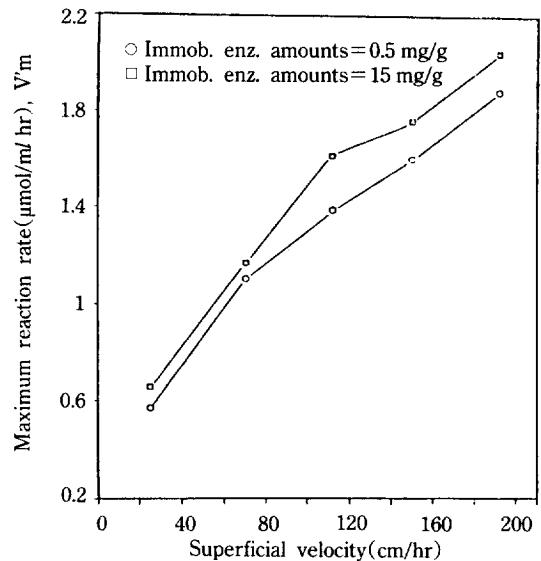


Fig. 13. The effect of superficial velocity on the apparent maximum reaction rate estimated by material balance in PBR(Gelff Method). $2R=0.6$ mm, $T=298$ K.

와 같이 겉보기 최대반응속도 V_m' 은 유속이 증가함에 따라 민감하게 증가했으며 Hirano 등[6]이 aminoacrylase pellet에 대해 실험한 결과와 유사하였다.

한편 수용상 trypsin에 대한 속도상수 K_m' 과 V_m' 은 각각 $2.562 \mu\text{mol/ml}$, $0.572 \mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$ 이었으며 실리카겔에 고정화된 trypsin의 K_m' 은 고정화 양이 0.5 mg/g silica gel일 때 거의 변화가 없었으나 더 많은 양이 고정화되었을 때는 감소하였다. 또한 V_m' 은 고정화되지 않은 trypsin보다 훨씬 큰 값을 나타냈다.

이러한 결과를 종합해 보면 실리카겔을 담체로 사용하였을 경우 확산저항에 의한 전체 반응속도의 감소보다는 담체의 고유특성에 의해 반응속도가 더욱 증가함을 알 수 있었다. 물론 이러한 결론은 담체가 상당히 크게 되어 확산저항이 상대적으로 크게 작용하게 되면 다르게 나타날 것으로 사료된다.

3-5. 유효확산계수 D_e 및 물질전달계수 K_c 의 결정

3-5-1. 유효확산계수

외부확산계수 D_b 를 알아보기 위해 회석용액에서 확산용질(diffusing solute)에 대한 D_b 를 구하는 여러 가지 실험식중 가장 널리 사용되는 Wilke & Chang 실험식을 사용하였다.

$$D_b = 7.4 \times 10^{-8} \frac{T(X M_a)^{1/2}}{\mu V_b^{0.6}} \quad (3)$$

이 식으로부터 DL-BAPNA 용액에 대한 외부확산계수는 $4.313 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$ 이었다.

한편 유효확산계수 D_e 는 (4) 식과 같이 표현된다.

$$D_e = \frac{D_b \beta}{\tau} \quad (4)$$

여기서 β 는 실리카겔의 다공성을 나타내며 τ 는 굴곡도를 나타내는데 Schneider & Smith[20]에 의하면 $\beta=0.486$ 이고 $\tau=3.35$ 로써 본 연구에서는 이 값들을 이용하였다. 이와 같은 수치는 실리카겔의 제조방법에 따라 상당히 달라질 수 있으나 D_e 의 차수에는 큰 영향이 없을 것으로 사료된다.

이 값과 식 (4)를 이용해 구한 유효확산계수는 $D_e = 6.257 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ 이었다.

3-5-2. 물질전달계수 K_c

Wilson & Geankoplis[3]는 충전층반응기의 물질전달 현상을 연구하여 반응조작조건이 $0.0016 < Re < 55$, $165 < Sc < 70$, 600 범위에서는 식 (5)와 같은 관계식을 제시하였다.

$$\alpha_{jd} = \frac{1.09}{Re^{2/3}} \quad (5)$$

Chilton & Colburn은 이러한 계의 물질전달에 대해 식 (6)과 같은 상관관계식을 제안하였다.

Table 2. Dimensionless numbers and mass transfer coefficient K_s depending on superficial velocity

Flow rate(cm/hr)	Re	j_D	Sc	K_s (cm/sec)
25	0.04	21.86	2130	8.82×10^{-4}
70	0.112	11.08	2130	1.25×10^{-3}
112	0.195	8.104	2130	1.46×10^{-3}
150	0.262	6.655	2130	1.61×10^{-3}
192	0.335	5.649	2130	1.75×10^{-3}

$$\frac{K_s \rho}{G} Sc^{2/3} = f(Re) \quad (6)$$

본 실험은 이와 같은 조작범위를 만족하였으며 식 (6)의 좌변항이 j_D 로 정의되므로 식 (5)와 (6)에서 j_D 를 소거하여 물질전달계수 K_s 를 구하였다. 도입유속에 따른 물질전달계수의 값은 Table 2에 수록하였다.

3-6. 고정화효소에 대한 효율인자

미분식인 식 (7)을 규격화하여 평가된 효율인자는 Thiele Modulus ϕ_R 와 무차원 Michaelis상수 Ω 상수에 의존함을 알 수 있다.

$$D_e \left(\frac{d^2 S_p}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS_p}{dr} \right) - Vm' \left(\frac{S_p}{K_m' + S_p} \right) = 0 \quad (7)$$

경계조건

$$S_p = S_R \quad \text{at} \quad r = R \quad (8)$$

$$\frac{dS_p}{dr} = 0 \quad \text{at} \quad r = 0 \quad (9)$$

$$\phi = R[Vm'/(D_e \times K_m')]^{1/2}$$

$$\Omega = K_m'/S_R$$

M-M 반응속도식은 두 가지의 점근적인 축소형태로 나타나게 되는데 만일 Ω 가 무한대로 접근할 경우 일차반응속도식으로 되며 Ω 가 0으로 접근하게 되면 0차 반응속도식으로 된다. 일찍이 Smith & Weekman[21]이 각각의 점근해를 구한 바 있지만 점근적인 경우가 아닐 때는 식 (7)과 경계조건인 식 (8), (9)를 이용하여 수치해석법으로 구한다. Lee 등[12]이 구한 해를 이용해 본 실험에 대한 효율인자를 계산한 결과 여러 유속에 대해 모두 0.9 이상으로 실리카겔($d_p = 0.6$ mm)의 내부 확산저항을 무시할 수 있었다. 따라서 내부확산저항이 거의 없는 경우의 경마인자들을 구하였고 본 실험의 Thiele Modulus와 효율인자는 Table 3에 수록하였다.

4. 결 론

Table 3. Effective diffusion coefficient, Thiele modulus and effectiveness factor depending on superficial velocity

F(cm/hr)	D_e (cm ² /hr)	ϕ_R	η
25	2.25×10^{-3}	0.603	0.97-1
70	2.25×10^{-3}	0.835	0.94-1
112	2.25×10^{-3}	0.929	0.92-1
150	2.25×10^{-3}	0.993	0.91-1
192	2.25×10^{-3}	1.076	0.90-1

가수분해효소인 trypsin을 포괄법으로 실리카겔에 고정화시키고 DL-BAPNA를 기질로 하여 반응조건을 변화시켜 실험한 결과는 다음과 같다.

(1) Michaelis상수와 최대반응속도는 고정화시키지 않았을 경우에 비해 Michaelis상수는 작게, 최대반응속도는 크게 나타났다. 그리고 25 cm/hr-200 cm/hr의 범위에서 Michaelis상수는 유속에 따라 감소한 반면, 최대반응속도는 증가하였다.

(2) Michaelis상수는 trypsin의 고정화 밀도에 의해 영향을 받았으며 고정화된 효소의 양이 10 mg trypsin/g silica gel일 때 최적전환율을 나타내었다.

(3) 담체직경이 0.6 mm인 고정화효소에 대한 효율인자는 0.9-1로 내부저항을 무시할 수 있었으며, 외부 물질전달계수 K_s 는 8.820×10^{-4} - 1.750×10^{-3} cm/sec이었다.

NOMENCLATURE

C	: reactor volume [m ³]
D_e	: effective internal diffusion coefficient [cm ² /sec]
D_b	: bulk diffusion coefficient [cm ² /sec]
F	: volumetric flow rate of substrate solution [ml/hr]
G	: mass flow rate [g/cm ² sec]
j_D	: Colburn j factor for mass transfer [-]
K_m'	: apparent Michaelis constant [mol/ml]
K_s	: mass transfer coefficient [cm/sec]
L	: column length [cm]
M_s	: molecular weight of the solvent [g]
R	: particle radius [cm]
Re	: Reynolds number = $d_p G/\mu$
r	: radial coordinate with respect to particle [cm]
Sc	: Schmidt number = $\mu/\rho D_b$ [-]
S_i	: initial substrate concentration [mol/ml]
S_o	: outlet substrate concentration [mol/ml]
S_p	: substrate concentration within pores of particles [mol/ml]

- S_R : substrate concentration at the liquid-carrier interface [mol/ml]
 V_b : molar volume of the diffusing solute obtained from Kopp's law [mol/ml]
 $-Ve'$: effective rate of enzyme reaction [mol/ml·sec]
 Vm' : apparent maximum reaction rate [mol/ml·sec]
 X : experimental combination parameter of solvent [-]

Greek Letters

- α : void fraction of column [-]
 β : internal porosity of particle [-]
 η : effectiveness factor [-]
 ρ : fluid density [g/ml]
 τ : intraparticle tortuosity [-]
 μ : fluid viscosity [g/cm·sec]
 Ω : dimensionless Michaelis constant [Km'/S_R]
 ϕ_R : Thiele modulus

REFERENCES

- Chibata, I.: "Immobilized Enzymes", Halsted Press, John Wiley, New York, London(1978).
- Erlanger, B., Kokowsky, N. and Cohen, W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271(1961).
- Geankoplis, J.: "Mass Transfer Phenomena", Holt Reinhart Winston(1974).
- Gellf, G., Thomas, D. and Broun, G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 315(1974).
- Gondo, S., Isayama, S. and Kusunoki, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 423(1975).
- Hirano, K., Karube, I., Matsunaga, T. and Suzuki, S.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 401(1977).
- Hornby, W. E., Lilly, M. D. and Crook, E.M.: *Biochem. J.*, **107**, 669(1968).
- Iler, R. K.: "The Colloid Chemistry of Silica and Silicates", Cornell University, New York(1955).
- Kobayashi, T. and MooYoung, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **125**, 47(1973).
- Lee, S. B., Kim, S. B. and Ryu, D. D.Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2023(1979).
- Lee, S. B. and Ryu, D. D.Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1499(1979).
- Lee, Y. Y. and Tsao, T. George: *J. Food Science*, **39**, 667(1974).
- Lilly, M. D., Hornby, W. E. and Crook, E. H.: *Biochem. J.*, **100**, 718(1966).
- Marrazzo, W. N. and Merson, R. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1515(1975).
- Ollis, D. F.: *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 871(1972).
- O'Neil, S. P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 201(1972).
- Preiser, H., Schmitz, J., Maestracci, D. and Crane, R. K.: *Clin. Chim. Acta.*, **59**, 105(1975).
- Rovito, B. J. and Kittrell, J. R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 143(1973).
- Ryu, D. D. Y., Chung, S. H. and Katoh, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 159(1977).
- Schneider, P. and Smith, J. M.: *AIChE J.*, **14**, 886(1968).
- Smith, J. M.: "The Chemical Engineering Kinetics", 2nd ed., McGraw Hill, New York(1970).
- Toda, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1729(1975).
- Zaborsky: "Immobilized Enzymes", CRC Press (1974).