

NADH 동시재생을 이용한 실관효소반응기에서의 L-leucine 생산

이윤영 · 장호남

한국과학기술원 화학공학과/생물공정연구센터
(1991년 12월 30일 접수, 1992년 3월 30일 채택)

L-leucine Production with Simultaneous NADH Regeneration in a Hollow Fiber Enzyme Reactor

Yun-Young Lee and Ho-Nam Chang

Department of Chemical Engineering and Bioprocess Engineering Research Center,
KAIST, Deaduk Science Town, Taejeon 305-701, Korea
(Received 30 December 1991; accepted 30 March 1992)

요 약

실관반응기에 주반응효소(leucine dehydrogenase), 재생반응효소(formate dehydrogenase), 그리고 고분자 조효소 유도체(dextran-NAD⁺)를 고정화시켜 연속적으로 루이신을 생산하였다. 실관반응기의 루이신 생산은 34시간 유지되었고 최고 전화율이 83%, 평균전화율이 76%였다. Space time yield는 78.2 g/L/d(또는 596 mmol/L/d)의 높은 값을 얻었는데 이러한 높은 space time yield 값은 발효공정으로는 얻기 힘든 효소반응기의 장점이라 하겠다. 효소반응시 조효소 유도체의 retention coefficient는 평균적으로 87%, 최고 91%이었고, residence time은 평균적으로 1시간 정도를 유지하였다. 조효소유도체의 turn over number는 8500을 넘어서었다. 결과적으로 조효소재생방법을 사용하지 않는 경우의 루이신 kg생산당 NAD⁺비용을 재생방법에 의하여 약 10,000 배로 줄여, 산화환원효소의 산업적 응용의 가장 큰 문제점이었던 조효소 비용문제를 해결하였다.

Abstract—L-leucine was produced from α -ketoisocaproate in a hollow fiber enzyme reactor, where leucine dehydrogenase(L-leucine: NADH oxidoreductase, EC1.4.1.9), formate dehydrogenase(formate: NAD⁺ oxidoreductase, EC1.2.1.2), and NAD⁺ covalently bound to water-soluble dextran(dextran-NAD⁺) were used as the catalytic enzyme, coenzyme regeneration enzyme, and enlarged coenzyme, respectively. The continuous-production of L-leucine in a hollow fiber enzyme reactor for 34 hrs resulted in a space-time yield of 78.2 g/L/d (or 596 mmol/L/d) with a mean substrate conversion of 76%. After 34 hrs, the reaction did not continue due to loss of enzyme activity. The turnover number of cofactor-ratio of moles of product to moles of NAD(H)-exceeded 8,500. The cofactor regeneration scheme for NADH had been successful to the extent that cofactor cost was no longer dominant in the L-leucine production.

1. 서 론

산화환원 반응은 생명현상에 있어서 기본적인 반응이다. 그런 맥락에서 IUPAC위원회가 편집한 Enzyme

nomenclature란 책에서 산화환원효소가 다른 종류의 효소들보다 종류수가 많은 것도 이해할 수 있다[1]. 그러나 십여가지의 가수분해효소가 다양한 공정에서 산업화되어 응용되고 있는 것에 반하여 산화환원효소의

산업적 응용은 지금까지 단 두 가지 효소(glucose oxidase, catalase)로 제한되어 왔다. 그 가장 큰 이유는 대부분의 산화환원효소가 필요로 하는 조효소-특히 광범위하게 사용되는 조효소 NAD(H)-의 가격이 매우 비싸기 때문이다. 즉, 대부분의 산화환원효소에 사용되는 순도 90%의 β -NAD⁺의 '91년 현재 가격은 1 kg당 \$6140로서 소량생산이 아닌 경우 조효소를 양론비로 사용하기에는 값이 너무 비싸다[2]. 그러므로 이러한 조효소를 필요로 하는 효소를 사용하는 공정에 있어서는 효과적인 *in situ* 조효소 재순환방법이 있어야 한다. 발효공정에 있어서는 세포자신이 기질전환과 조효소재생에 필요한 효소를 가지고 있기 때문에 대사과정의 일부로서 조효소가 생성, 재생되어진다. 그러나 *in vitro*한 효소를 사용하는 공정에서는 조효소를 외부에서 인위적으로 재생되도록 디자인하여야 한다. 즉, 주합성을 위한 효소반응 이외에 조효소 재생을 위한 재순환 시스템을 사용해야 한다. 조효소를 계속해서 재순환시키기 위해서는 다음 두 가지 별개의 공정이 필요하다. 첫째가 산화된 조효소를 환원시켜주는 regeneration 공정이고 두번째는 조효소를 반응기 내에 계속 남아있게 하는 retention 공정이다.

이 때 사용되는 regeneration 방법은 실용적이고 가격이 저렴하고 간편해야 하며 동시에 turn over number (TON: mol product formed/mol cofactor present in reaction)가 높아야 한다. NADH의 regeneration방법은 크게 효소를 사용하는 방법 (3), 전기화학적 방법 (4), (광)화학적 방법 (5), 그리고 생물학적인 방법 (6)으로 분류할 수 있다. 특히 NAD⁺을 NADH로 재생시킬 때 NAD⁺ 중 pyridinium 고리의 환원(수소가 붙는 과정)이 매우 높은 위치 선택성(regioselectivity)을 요구하기 때문에 활성이 있는 조효소(active NAD⁺)의 생성을 위해서는 높은 위치 선택성을 가진 방법을 사용해야 하고 위의 네 가지 방법 중에서 이렇게 높은 선택성을 얻을 수 있는 방법은 아직까지는 효소를 이용하는 방법밖에는 없다. 효소법은 높은 위치 선택성이 외에도 다른 효소 주반응과 양립할 수 있고 반응정도를 쉽게 측정할 수 있다는 장점이 있다. 효소를 사용하는 regeneration방법은 효소와 그 효소가 사용하는 기질에 따라 여러 가지 종류가 있는데 그 중에서 산화제로서 formate, glucose, glucose-6-phosphate 그리고 alcohol들을 사용하는 방법이 우수한 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 formate dehydrogenase(FDH)/formate방법이 기질(formate)의 가격이 저렴하고, 부산물(CO₂)의 제거가 용이하며, 효소(FDH)가 매우 높은 환원력을 가지고 있는 등 현재까지는 가장 유리한 방법으로 알려져 있다.

또한 조효소 NAD(H)는 분자량이 600 정도이기 때문에 통상 사용되는 기질 및 생성물과 크기가 별로 차이가 나지 않는다. 그러므로 조효소를 생성물로부터 분리해 내면서 반응기 내에 retention하기 위해서는 특수한 방법이 필요하다. 일반적으로 조효소 NAD⁺를 retention하는 방법으로 가장 많이 이용되는 것이 수용성 고분자(water-soluble polymer)에 고정화시키는 것으로서 고분자 담체로는 dextran[7], polyethyleneimine(PEI)[8], polylysine[9], polyethyleneglycol(PEG)[10] 등이 많이 사용되고 고정화 위치로는 NAD⁺의 adenine 핵의 C8 site와 N6 site가 가장 일반적으로 선택되고 있다. 그 이유는 많은 산화환원효소들이 NAD⁺ 분자와 결합할 때 NAD⁺ adenine 핵의 N6와 N8 site들이 효소의 활성화 부위의 반대쪽으로 뺄어나가기 때문에 활성화 부위를 보호할 수 있기 때문이다.

Formate/FDH regeneration방법을 이용할 주반응으로는 L-leucine dehydrogenase(L-LeuDH)를 이용하여 L-leucine을 생산하는 반응으로 정했다. L-LeuDH와 FDH의 두 가지 효소를 이용한 루이신 생산은 평판형 막[11]을 이용하거나 gel column을 이용[12]하는 시도가 있었다. 전자는 단백질에 의한 membrane clogging이 일어나는 단점이 있었고 후자는 효소를 gel에 고정화할 때 효소활성이 크게 저하되고 기질이 gel pore를 통과할 때 확산 저항을 받는다는 문제가 발생했다. 그러므로 본 연구에서는 membrane의 fouling현상을 최대한 줄일 수 있는 실관모듈을 도입하여 실험을 하였다. 실관모듈은 십자형흐름(cross-flow) 여과방식을 이용하여 실관내부로 유체를 계속해서 재순환시킴으로써 농도분극과 막이 오염되는 현상을 최소화할 수 있기 때문에 막 모듈에 있어서 가장 진보한 형태이다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험개요

전체적인 실험개요는 Fig.1과 같이 나타낼 수 있다. 주반응은 효소 L-LeuDH가 NADH를 소비하면서 α -ketoisocaproate에서 L-leucine을 생성하는 것이고 이 때 동시에 (*in situ*) regeneration 반응으로써 효소 FDH가 NAD⁺를 다시 NADH로 환원시키는 것이다. 이 때 효소들과 수용성 고분자가 붙은 조효소는 분자량이 크기 때문에 membrane을 빠져 나가지 못하게 하면서 생성물인 루이신을 연속적으로 분리해 내는 것이다.

2-2. 실험장치

실험장치는 Fig.2와 같다. 기질은 peristaltic pump (Masterflex: Cole-Parmer, I11, USA)를 이용하여 반

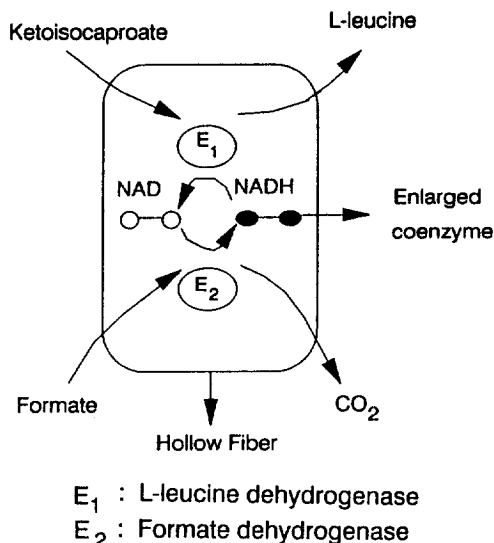


Fig. 1. Schematic representation of the continuous reaction system of leucine and formate dehydrogenase with recycling of dextran-NAD⁺.

응기 내에 연속적으로 공급하여 반응기 내의 효소, 조효소 유도체와 반응시켰다. 이 때 반응기는 water bath를 이용하여 25°C로 유지하였고 working volume은 level controller를 사용하여 20 mL로 일정하게 유지하였다. 반응기는 또한 효소와 조효소유도체가 균일하게 분배되어 반응이 촉진되게 하기 위하여 magnetic stirrer를 사용하여 교반해 주었다. Peristaltic pump를 사용하여 반응기에서 연속적으로 용액을 30 mL/min의 재순환속도로 뽑아서 실험모듈로 보내어 한외여과를 시켰다. 실험모듈에서는 suction pump를 사용하여 생성물을 뽑아 내었고 pump와 실험모듈 사이에 감압압력계를 설치하여 압력을 측정하였다. 실험모듈의 세척은 실험전에 0.1 N NaOH로 역세척(backflushing)한 후 증류수로 남아 있는 NaOH를 제거하였다. 세척은 막의 초기 투과도가 얻어질 때까지 계속하였다. 실험모듈은 반응부피가 매우 적고 여과액의 부피도 매우 적은 관계로 기존에 시판되는 실험모듈은 적합하지 않았다. 그러므로 Amicon사의 실험관을 사용하여 소형의 모듈을 직접 제작하였다. 실험모듈의 유효막면적이 20 cm² 정도되게 T자형 유리관에 길이 11.5 cm의 실험관 10개를 넣어 실리콘 접착제로 실링하여 사용하였다.

2-3. 실험재료

실험관은 Amicon(MA., USA)사에서 구입, 사용하였고 분획분자량은 10,000이고 구성성분은 polysulfone이

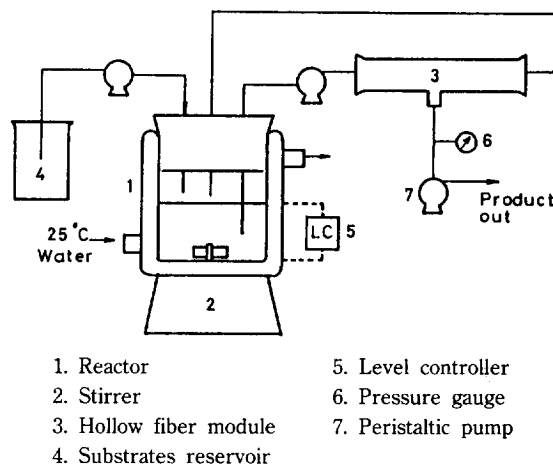


Fig. 2. Schematic diagram of hollow fiber enzyme reactor experiment.

었다. Formate dehydrogenase는 *Pseudomonas oxalaticus*에서, leucine dehydrogenase는 *Bacillus* species에서 추출한 것을 Sigma Chemical Company(MO., USA)에서 구입하여 사용하였다. 조효소유도체인 dextran-NAD⁺도 Sigma사에서 구입, 사용하였고 분자량이 40,000이므로 분획 분자량이 10,000인 실험관에 고정화되었다.

2-4. 분석방법

NAD⁺는 spectrophotometer(Beckman, CA, USA)에 의해 상온에서 260 nm의 흡광도로 분석하였고 dextran-NAD⁺는 spectrophotometer에 의해 상온에서 274 nm의 흡광도로 분석하였다. Chiral 화합물이 생성되므로, 반응생성물의 전화율을 측정하기 위하여 편광측정법(polarimetry)을 사용하였다. 즉, 기질과 생성물 중에서 광학 이성질체를 가지고 있는 유일한 화합물이 L-leucine이므로 광학특성을 이용하여 농도를 측정하는 편광계(Bellingham + Stanley Limited, Kent, England)를 이용하여 상온에서 농도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 실험관의 성능에 미치는 재순환속도의 영향

실험관의 투과성능과 배제성능에 가장 큰 영향을 미치는 변수는 재순환속도와 처리용액의 농도로 알려져 있다. 그러므로 실제 조업시 실험관의 좋은 성능을 얻기 위하여 재순환 속도와 처리용액의 농도를 어느정도로 유지해야 되는지가 중요한 문제이다.

먼저, 실험관의 성능에 미치는 재순환속도의 영향을

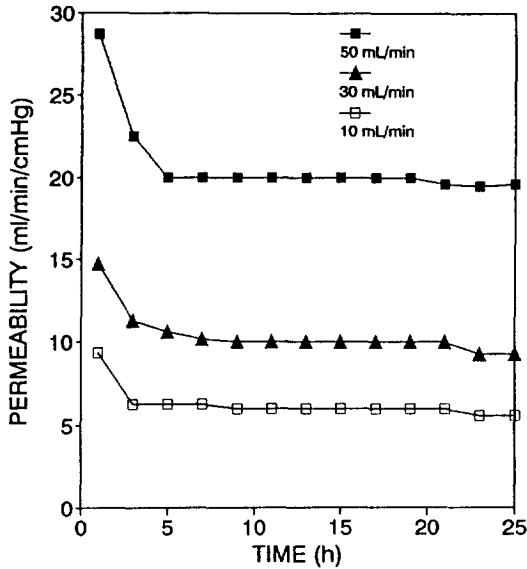


Fig. 3. Effect of recirculation rate on membrane permeability(no enzymes, 100 mmol/L sodium α -ketoisocaproate, 1 mol/L ammonium formate, and 100 μ mol/L dextran-NAD⁺).

알아보기 위하여 효소를 제외하고 100 mmol/L sodium α -ketoisocaproate, 1 mol/L ammonium formate 그리고 100 μ mol/L dextran-NAD⁺를 넣어준 후 여러 가지 재순환속도에서 실관의 투과성과 배제성을 알아보았다. Fig. 3은 여러 가지 재순환속도에서의 시간에 따른 apparent permeability의 변화를 관찰한 것으로, 시간이 경과함에 따라 permeability가 급격히 감소하여 거의 일정한 값에 도달함을 알 수 있다. 이는 투과가 진행함에 따라 막 표면에 gel층이 형성되어 곧 정상상태에 도달하는 것을 의미한다. 또한 재순환속도가 증가할수록 permeability가 증가하는 것을 알 수 있다. 이것은 재순환속도가 증가할수록 실관 내에서의 선속도(linear velocity)가 증가하므로 막 근처에서의 shear rate가 커져서 농도분극이나 gel층을 파괴시키기 때문에 막의 투과성능, 즉 permeability가 향상되는 것으로 해석된다. 이러한 결과는 정상상태에서의 물질전달 계수는 관 내에서의 선속도에 비례한다는 gel분극이론의 결과와 일치하였다 [13]. 그러므로 선속도가 증가할수록 막 근처에서의 물질전달이 촉진되어 투과성능이 향상되므로 실관의 투과성능만 보았을 때는 되도록 높은 재순환속도를 유지하는 것이 유리하였다. 그러나 효소와 같은 단백질은 입체구조가 중요하므로, 너무 높은 선속도를 유지하면 전단응력이 효소의 입체구조를 파괴하여 효소가 활성을 잃을 염려가 있으므로 효소가 활성을 잃지 않는 범위

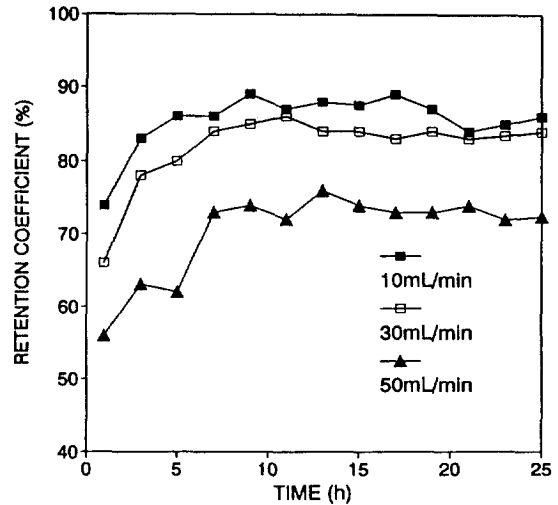


Fig. 4. Effect of recirculation rate on membrane retention coefficient of dextran-NAD⁺(no enzymes, 100 mmol/L sodium α -ketoisocaproate, 1 mol/L ammonium formate, and 100 μ mol/L dextran-NAD⁺).

내에서 재순환속도를 유지해야 했다.

Fig. 4는 여러 가지 재순환속도에서의 시간에 따른 dextran-NAD⁺의 retention coefficient의 변화를 관찰한 것으로, 시간이 경과함에 따라 조효소유도체의 retention coefficient가 급격히 증가하여 거의 일정한 값에 도달함을 알 수 있다. 이것은 permeability와 마찬가지로 투과가 진행함에 따라 막 표면에 gel층이 형성되어 곧 정상상태에 도달하는 것을 의미한다. 또한 재순환속도가 증가할수록 조효소유도체의 retention coefficient가 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 관 내에서의 선속도가 증가할수록 막 근처에서의 물질전달이 촉진되어 조효소유도체(dextran-NAD⁺)가 더 쉽게 막을 새어나가는 때문인 것으로 생각된다. 그러므로 dextran-NAD⁺을 반응기 내에 더 효과적으로 유지(retention)한다는 면에서는 되도록이면 재순환속도를 작게 하는 것이 유리하였다.

결론적으로, 재순환속도에 따른 투과성능(apparent permeability)과 배제성능(retention coefficient)은 서로 상충되는 양상을 보였다. 그러므로 만족할 만한 투과, 배제성능을 얻기 위하여 재순환속도를 얼마로 유지하는가를 결정하는 것이 중요하였다. 재순환속도를 30 mL/min으로 하면 retention coefficient가 평균 80% 이상, permeability도 평균 10 mL/min/cmHg를 유지하여 조업에 적당한 것으로 나타났다.

3-2. 실관의 성능에 미치는 조효소 농도의 영향

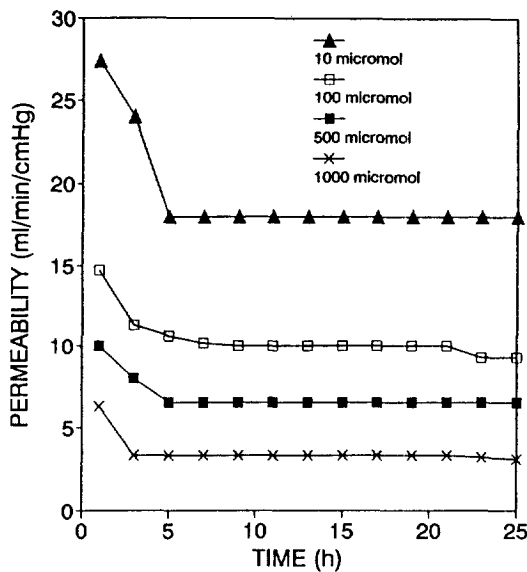


Fig. 5. Effect of coenzyme concentration on membrane permeability(no enzymes, 100 mmol/L, sodium α -ketoisocaproate, 1 mol/L ammonium formate, and recirculation rate 30 mL/min).

재순환속도와 더불어 실관의 성능에 큰 영향을 미치는 조효소의 농도에 따른 실관성능을 조사하였다. 효소를 제외하고 100 mmol/L sodium α -ketoisocaproate, 1 mol/L ammonium formate를 넣어준 후 30 mL/min의 일정한 재순환속도에서 dextran-NAD⁺의 농도를 여러 가지로 하여 투과성능과 배제성능을 조사하였다.

Fig. 5는 dextran-NAD⁺의 각 농도에서의 시간에 따른 apparent permeability의 변화를 관찰한 것으로, 시간이 경과함에 따라 permeability가 급격히 감소하여 거의 일정한 값의 정상상태에 도달함을 알 수 있다. 또한 농도가 증가할수록 permeability가 현저히 감소하는 것을 알 수 있다. 이는 농도가 증가할수록 막 부근에서의 점도나 gel층의 두께가 증가하여 물질전달저항을 증가시키기 때문이다. 이러한 결과는 정상상태의 permeability는 농도의 log값에 대하여 거의 직선적으로 감소한다는 기존의 보고[14]와 일치했다. 이러한 농도에 따른 permeability의 감소, 즉 투과성능의 저하는 product 회수가 저하된다는 것을 의미하므로 투과성능만 보았을 때 되도록이면 낮은 dextran-NAD⁺ 농도에서 조업하는 것이 유리한 것으로 나타났다.

Fig. 6은 dextran-NAD⁺의 각 농도에서의 시간에 따른 dextran-NAD⁺의 retention coefficient의 변화를 관찰한 것으로 시간이 경과함에 따라 조효소유도체의 retention coefficient가 급격히 증가하여 거의 일정한 값의

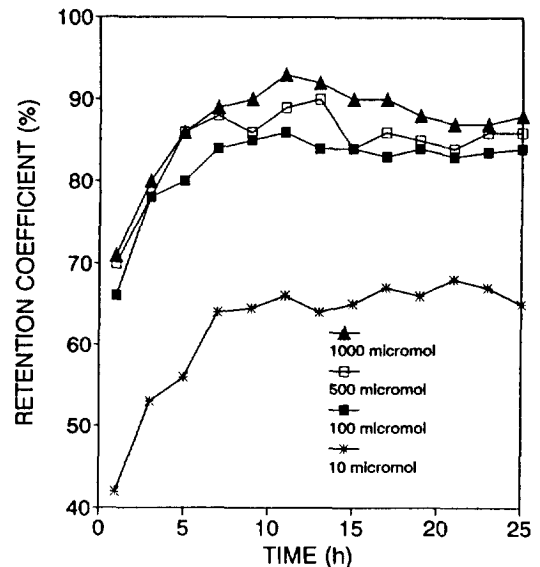


Fig. 6. Effect of coenzyme concentration on membrane retention coefficient of dextran-NAD⁺(no enzymes, 100 mmol/L sodium α -ketoisocaproate, 1 mol/L ammonium formate, and 30 mL/min recirculation rate).

정상상태에 도달함을 알 수 있다. 또한 농도가 증가할수록 조효소유도체의 retention coefficient가 감소하였는데 이는 농도가 증가할수록 막 부근에서의 점도나 gel층의 두께가 증가하여 투과저항이 커져서 실질적인 pore의 크기가 감소되기 때문이다. 그러므로 dextran-NAD⁺의 retention을 높게 유지한다는 면에서는 되도록이면 조효소유도체의 농도를 높게 하는 것이 유리하였다.

결론적으로, dextran-NAD⁺의 농도에 따른 투과성능과 배제성능도 서로 상충되는 양상을 나타내었다. 그러므로 만족할 만한 투과, 배제성능을 얻기 위하여 적당한 dextran-NAD⁺ 농도를 결정하는 것이 중요하였다. Dextran-NAD⁺의 농도가 10 μ mol에서 100 μ mol로 증가하였을 때 배제성능은 크게 향상되나 100 μ mol 이상에서의 배제성능의 향상은 매우 미미하였다. 높은 TON을 얻기 위해서는 되도록이면 조효소유도체의 농도를 적게 유지해야 하므로 100 μ mol이 적당한 농도로 판단되었으며 이 농도에서 apparent permeability의 값도 10 mL/min/cmHg를 유지하여 조업에 적당한 것으로 나타났다.

3-3. Dextran-NAD⁺의 Elution loss.

연속반응시 반응기 내에 조효소를 성공적으로 유지하

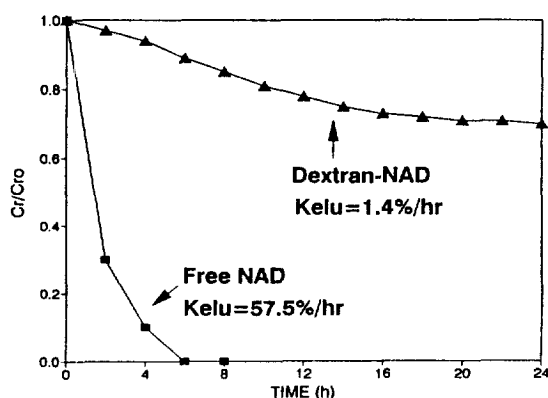


Fig. 7. Elution of NAD^+ and dextran- NAD^+ across membrane in a continuously operated hollow fiber reactor (residence time: 1.6 hr, no enzymes, 100 mmol/L sodium α -ketoisocaproate, 1 mol/L ammonium formate, 100 $\mu\text{mol/L}$ dextran- NAD^+ or 100 $\mu\text{mol/L}$ NAD^+ , 30 mL/min recirculation rate).

는 것이 매우 중요하다. 그래서 실관의 배제성능을 검사하기 위하여 조효소유도체가 반응기 내에 얼마나 잘 유지되는가를 실험하였다. 다음 Fig. 7은 불완전한 retention에 의해 생기는 조효소 손실을 시간의 함수로 나타내었다. 이러한 조효소 retention은 고분자화한 조효소의 평균분자량과 membrane의 분획분자량에 의존한다. Retention coefficient R 은 다음과 같다.

$$R = (C_r - C_f) / C_r$$

단, 여기서 C_r 과 C_f 은 각각 retentate와 filtrate에서의 조효소(유도체)의 농도이다.

연속반응시 washout에 대한 식은 다음과 같다.

$$C_r / C_m = \exp[(1 - R) / \tau] t$$

여기서 C_m 는 초기의 retentate에서의 조효소(유도체)의 농도이고 t 는 조업시간, τ 는 mean residence time이다. 위 식으로부터 $\ln(C_r / C_m)$ 와 조업시간을 plot하면 다음과 같은 elution loss K_{elu} 를 얻을 수 있다.

$$K_{elu} = (1 - R) / \tau$$

그러므로 K_{elu} 는 retention coefficient R 뿐만 아니라 mean residence time τ 에도 의존하고 있다. τ 가 작아질수록 K_{elu} 가 커지므로 가급적 τ 를 높이 유지하는 것이 K_{elu} 를 줄이는데 있어 중요하였다. Fig. 7은 τ 가 1.6 hr에서 dextran- NAD^+ 와 free NAD^+ 의 elution loss를 계산한 것이다. 효소는 제외하였고 기질과 조효소 농도는 다음과 같다; 100 mmol/L sodium α -ketoisocap-

Table 1. Continuous enzymatic reaction conditions

Components	Conditions
Initial conditions	
Substrate mixture	
Sodium α -ketoisocaproate	100 mmol/L
Ammonium formate	1 mol/L
Dextran- NAD^+	100 $\mu\text{mol/L}$
Enzymes	
FDH	5 unit/mL
LeuDH	5 unit/mL
Feed substrate solution	
Sodium α -ketoisocaproate	30 mmol/L
Ammonium formate	0.3 mol/L
Other conditions	
pH	8
Temperature	25°C
Working volume	25 mL
Residence time	about 1 hr

roate, 1 mol/L ammonium formate, 100 $\mu\text{mol/L}$ dextran- NAD^+ (or 100 μmol NAD^+). 먼저 분자량이 약 600 정도인 free NAD^+ 를 분획분자량 10,000의 실관으로 retention하였을 때 free NAD^+ 의 K_{elu} 값은 57.5%/hr로써 6시간 후에는 막을 새어나가 반응기 내에 조효소는 거의 존재하지 않았다. 반면에 분자량 40,000인 dextran- NAD^+ 을 분획분자량 10,000인 실관으로 retention하였을 때는 K_{elu} 값이 1.4%/hr로써 2시간 후에도 반응기 내에 60% 이상 dextran- NAD^+ 가 유지됨으로써 NAD^+ 를 고분자에 고정화함으로써 조효소가 성공적으로 반응기 내에 유지됨을 알 수 있었다.

3-4. L-leucine 생산

두 효소 FDH, LeuDH와 조효소유도체 dextran- NAD^+ 가 같은 균일액상에 존재함으로 물질전달 저항이 거의 없이 조효소를 연속적으로 사용하고, 재생하면서 반응이 빠른 속도로 진행되었다. 실험조건은 Table 1에 나타나 있다. Fig. 8은 시간에 따른 전화율을 나타내었다. 효소반응은 대략 34시간 유지되었고, 최고 전화율이 83%, 평균 전화율이 76%였다. 34시간 이후에는 반응이 급격히 감소하다 중지되었다. 반응이 중지된 이유를 알아보기 위하여 반응이 중지된 이후에 반응기에 free NAD^+ 을 넣어 주어 보았다. 조효소를 넣어준 후에도 여전히 반응이 일어나지 않는 것으로 미루어 반응이 중지된 것은 조효소유도체의 retention이 불완전하거나 조효소유도체의 활성이 떨어져서가 아니라 FDH와 LeuDH의 두 가지 효소들 중 하나 또는 둘 모두의 활성이 떨어졌거나 효소들이 막에 흡착되어서 반응이 중

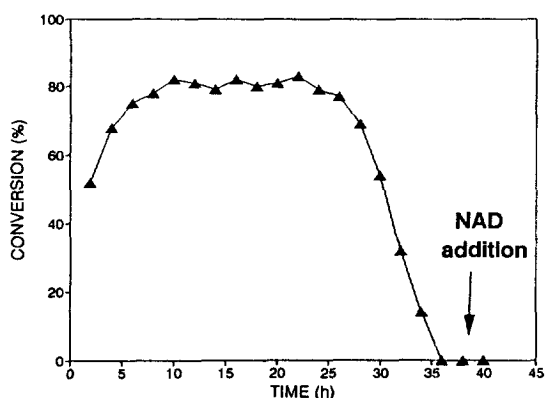


Fig. 8. Time dependence of L-leucine production in a hollow fiber enzyme reactor(conditions shown in Table 1).

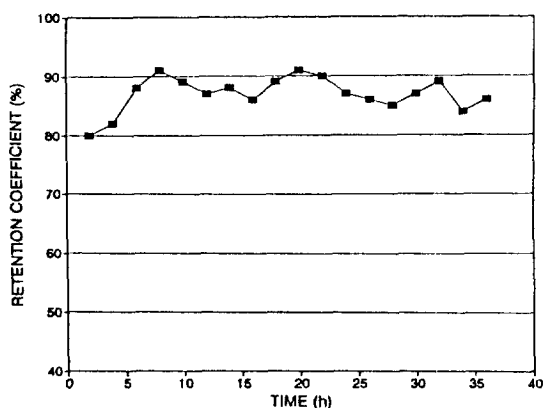


Fig. 9. Time dependence of retention coefficient of dextran-NAD⁺ in a hollow fiber enzyme reactor(conditions shown in Table 1).

지된 것으로 보인다. 효소의 활성이 중지된 이유는 Charm과 Wong[15]의 보고처럼 교반시 발생한 전단 응력이 효소의 삼차원구조를 파괴하여 효소가 활성을 잃어버린 것으로 보인다. Space time yield는 78.2 g/L/d, 즉 596 mmol/L/d의 높은 값을 얻었다. 이러한 높은 space time yield 값은 발효공정으로는 얻기 힘든 효소반응기의 장점이라 하겠다.

Fig. 9는 반응시 시간에 따른 retention coefficient를 나타내었다. 효소를 넣었을 때의 retention coefficient는 효소를 넣어주지 않았을 때 보다 향상된 모습을 보였다. 평균적으로 87%, 최고 91%의 retention coefficient를 보였다. 효소를 넣었을 때의 retention coefficient가 넣지 않았을 때보다 향상된 이유는 다음 두 가지 요인 때문인

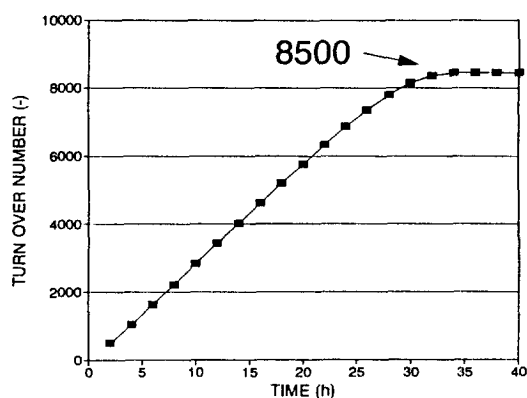


Fig. 10. Development of dextran-NAD⁺ turnover number (conditions shown in Table 1).

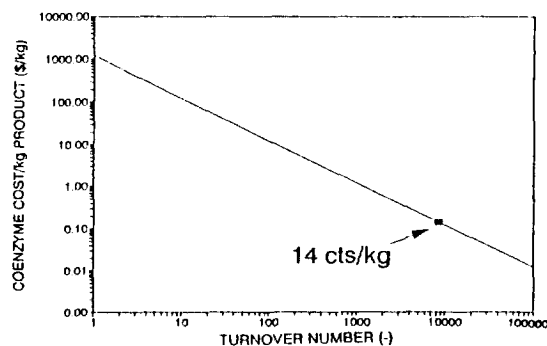


Fig. 11. Logarithmic plot of NAD⁺ cost per kilogram of L-leucine with the NAD⁺ turnover number.

것으로 해석된다. 첫째, 반응 용액의 실질적인 농도가 증가하여 막 부근에서의 점도와 gel층의 두께가 증가하고 물질전달 저항이 커져서 결과적으로 retention coefficient가 증가하는 것이고, 둘째는 효소와 조효소 간의 친화력 때문에 조효소가 반응기 내에 더 오랫동안 유지되는 것으로 보인다. Fig. 10은 시간에 따른 TON의 증가를 보여주는 것으로 최고 8500까지 증가하였다. 대부분의 산화환원효소에 사용되는 순도 90% β -NAD⁺의 '91년도 가격은 1 kg생산당 \$ 6140이다. 조효소 regeneration방법을 사용하지 않았을 때 루이신 1 kg생산당 들어가는 조효소 NAD⁺의 비용은 \$ 6140 \times (루이신 분자량/NAD⁺ 분자량) = \$ 6140 \times (131.17/663) = \$ 1215이다. 이 때 regeneration 방법을 도입하면 루이신 kg 생산당 필요한 NAD⁺비용은 \$ 1215/TON로 나타낼 수 있다. 즉, TON=1215일 때 kg 루이신 생산당 NAD⁺비용은 1\$이고 TON=10,000일 때 12 cent로 감소하게 된다. Fig. 11은 TON가 증가할수록 루이신 kg생산당

필요한 NAD⁺의 비용이 감소하는 것을 나타낸 것으로 8500의 TON에서는 그 값이 14 cent까지 감소하였다. L-leucine의 1991년 현재 가격이 kg당 \$ 140이므로 십여 cents의 조효소비용은 더 이상 산화환원효소의 산업적 응용에 크게 문제가 되지 않는다. 결과적으로 조효소를 이용한 공정에 있어 조효소 재생방법을 사용함으로써 전체공정에서 차지하는 조효소 비용의 비중이 현저하게 줄어들어 효소나 기질의 비용보다도 적어지는 결과를 얻었다.

REFERENCES

1. Enzyme Nomenclature: Recommendations of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry, Academic Press, New York(1979).
2. Sigma price list, 1991.
3. Chenault, H. W. and Whitesides, G. M.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **14**, 147(1987).
4. Laval, J.-M., Bourdillon, C. and Moiroux, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 157(1987).
5. Willner, I. and Mandler, D.: *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 467(1989).
6. Nath, P. K., Izumi, Y. and Yamada, H.: *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 28(1990).
7. Gu, K. F. and Chang, T. M. S.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **12**, 227(1990).
8. Campbell, J. and Chang, T. M. S.: *Biochemical. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 562(1976).
9. Yamazaki, Y., Maeda, H. and Suzuki, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1761(1976).
10. Guagliard, A., Raia, C. A., Rella, R., Buckmann, A. F., Dauria, S., Rossi, M. and Bartolucci, S.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **13**, 25(1991).
11. Kula, M.-R. and Wandrey, C.: *Methods Enzymol.*, **136**, 9(1987); Ohshima, T., Wandrey, C., Kula, M.-R. and Soda, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1616(1985); Leuchtenberger, W., Karrenbauer, M. and Plocker, U.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **434**, 78(1983).
12. Kajiwar, S. and Maeda, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2873(1987).
13. Blatt, W. F. In: Membrane Separation Technology, Flin, J. E.(ed.), Plenum Press, New York, p. 47, (1970).
14. Kim, B. S. and Chang, H. N.: *Bioseparation*, **2**, 23 (1991).
15. Charm, S. E. and Wong, B. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 1103(1970).