creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

BY: **저작자표시**. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

= **변경금지**. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000235959

2007 년 2 월

석사학위논문

고정화 효소를 이용한 PFR 과 CSTR 에서의 hexylglucoside 의 합성에 관한 연구

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

김 효 정

고정화 효소를 이용한 CSTR 과 PFR 에서의 hexylglucoside 의 합성에 관한 연구

Use of enzyme coated nanofiber for the synthesis of hexylglucoside using CSTR and PFR

2008 년 2 월 25 일

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

김 효 정

고정화 효소를 사용한 CSTR 과 PFR 에서의 hexylglucoside 의 합성에 관한 연구

지도교수 이 중 헌

이 논문을 공학석사학위신청 논문으로 제출함.

2007 년 10 월

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

김 효 정

김효정의 석사학위논문을 인준함

위원장　조선대학교　교수　조 병 욱 (인)
위　원　조선대학교　교수　김 정 규 (인)
위　원　조선대학교　교수　이 중 헌 (인)

2007 年　11 月　日

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT

제1장 서론 1

제2장 실험재료 및 방법 5

제1절 실험재료 5

제2절 BG 특성분석 5

2-1 BG 고정화 5

2-1-1 PANI 제조 5

2-1-2 PAMP 제조 5

2-1-3 PANI와 PAMP지지체에 beta-glucosidase의 고정 6

2-2 효소 고정화 특성 6

2-2-1 효소 고정화 6

2-2-2 효소 정량 6

2-2-3 효소 활성도 측정 6

2-3 최적 pH 7

2-4 최적 온도 7

2-5 고정화 효소의 온도에 대한 안정성 조사 7

2-6 효소반응 특성 7

2-7 효소 안정성 측정 8

제3절 Hexylglucoside 합성 8
3-1 시약 및 기기 8
3-2 자연효소에 의한 hexylglucoside합성 9
3-3 회분식 반응기에서 고정화 효소에 의한 hexylglucoside 합성 9
3-4 PFR에서 고정화 효소에 의한 hexylglucoside 합성 9
3-5 CSTR에서 고정화 효소에 의한 hexylglucoside 합성 10
3-6 효소 재사용 10

제3장 결과 및 고찰 13

제1절 BG 특성조사 13
1-1 효소 고정화 능력 13
1-2 최적 pH 15
1-3 최적 온도 17
1-4 고정화 효소의 온도에 대한 안정성(stability) 19
1-5 효소 반응 특성조사 (Km, Vm, Kcat) 21
1-6 효소 안정성 조사 26

제2절 Hexylglucoside 합성 28
2-1 회분식 반응기에서의 자연 효소와 고정화 효소에 의한 hexylglucoside 합성 28

2-2 PFR에서의 고정화 효소에 의한 hexylglucoside 합성 30
2-3 CSTR에서 고정화 효소에 의한 hexylglucoside 합성 32
2-4 고정화 효소의 재사용 35

제4장 결론 39

참 고 문 헌 41

List of Table

Table 1. List of kinetic parameters for the free and immobilized beta−glucosidase. 25

Table 2. Effect of reactors on glucose conversion and produced hexylglucoside concentration..... 34

List of figure

Figure 1. Hexylglucoside synthesis from glucose and hexanol 4

Figure 2. Calibration curve for protein concentration 11

Figure 3. Calibration curve for hexylglucoside concentration 12

Figure 4. Loading capacity of immobilizition media 14

Figure 5. Effect of pH on the activity of free and immobilized beta-glucosidase at 37℃ 16

Figure 6. Effect of temperature on the activity of free and immobilized beta-glucosidase 18

Figure 7. Storage stability of free and immobilized beta-glucosidase at 40℃, 60℃ and pH 5.0 20

Figure 8. Lineweaver-Burk plots to determine the Michaelis-Menten constant (Km) and maximum velocity (Vmax) of free beta-glucosidase pH 5.0 and 37℃ 22

Figure 9. Lineweaver-Burk plots to determine the Michaelis-Menten constant (Km) and maximum velocity (Vmax) of PANI-BG pH 5.0 and 37℃ 23

Figure 10. Lineweaver-Burk plots to determine the Michaelis-Menten constant (Km) and maximum velocity (Vmax) of PAMP-BG pH 5.0 and 37℃ 24

Figure 11. Storage stability of free and immobilized beta-glucosidase at 25℃, 200rpm and pH 5.0 27

Figure 12. Synthesis of hexylglucoside with free and two types of immobilized beta-glucosidase free-BG (●), PANI-BG (▲), PAMP-BG (■) The reactions were carried out using 25g/L glucose at 37℃ 29

Figure 13. Synthesis of hexylglucoside by cotton-PANI-BG at PFR 4hr RT (●), 2hr RT (▲), and 1hr RT (■). 31

Figure 14. Synthesis of hexylglucoside by cotton-PANI-BG (flow rate 0.3ml/hr, RT 33hr). 33

Figure 15. Effect of enzyme recycle on synthesis of hexylglucoside 36

Figure 16. Effect of recycle on enzyme activity 37

Figure 17. The immobilized enzymes (A : cotton-PANI-BG, B : PAMP-BG) and recovered with magnets (C) 38

ABSTRACT

Use of enzyme coated nanofiber for the synthesis of hexylglucoside using CSTR and PFR

Hyo-joung Kim
Advisor: Prof. Lee, Jung-Heon, PhD.
Department of Chemical Engineering.
Graduate School of Chosun University.

Beta-glucosidase(BG) from almond (EC 3.2.1.21) shows wide substrate specificity and is used to break beta-glucosidic linkages of conjugated glucosides of disaccharides. Alkylglucosides are surfactants with good biodegradability and low toxicity produced by an enzymatic method.

In this paper, highly stable and easily separable immobilized enzyme were developed using nanofibers as enzyme supporting materials. Beta-glucosidase(BG) was immobilized on the surface of the supporting materials with cross-linked enzyme aggregation. The properties of the immobilized enzymes on polyaniline nanofiber (PANI) and magnetically separable polyaniline nanofiber(PAMP) were compared. The storage stabilities of immobilized enzyme were higher than that of free enzyme. After 16days, free-BG,

PANI-BG and PAMP-BG showed 32%, 37%, 77% of residual activity at 25℃. The optimal pH and temperature of free and immobilized enzymes were determined for the different reaction conditions. The optimal pH and temperature were 5.0 and 55℃, respectively.

Hexylglucoside was synthesized using free-BG and immobilized BG under batch reactor, continuous stirred tank reactor(CSTR) and plug flow reactor(PFR). The conversions of hexylglucoside with free and immobilized enzymes were 6.76% and 4.19% under batch condition and those of free and immobilized enzymes were 6.58% and 14.68 For the different residence times(1, 2 and 4hr), the hexylglucoside conversions were 7.09%, 22.22% and 57.83% respectively. The maximum conversion 57.8% of hexylglucoside was obtained by cotton-PANI-BG at PFR (0.15ml/hr and 4hrs residence time)

Keywords: beta-glucosidase, immobilized enzyme, hexylglucoside, CSTR, PFR.

제 1 장 서론

일반적으로 효소는 그 활성이 불안정하고 효소 반응은 반응 후 생성물과 효소의 분리가 매우 어려우며 많은 시간과 노력을 통하여 얻은 값비싼 효소의 재사용이 불가능하여 이 결과 연속반응공정을 어렵게 한다. 이와 같은 문제점을 해결하는 방법 중 효소의 고정화가 매우 유용한 방법으로 인정되어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [1-5]. 고정화 효소(immobilized enzyme)는 효소단백질을 물에 녹지 않는 담체에 물리적 또는 화학적 방법으로 부착시켜서 만든 물리적 촉매(heterogeneous catalyst)의 하나이다. 이러한 효소 유도체는 안정성과 특이성이 높기 때문에 실질적으로 의학, 식품 또는 공업공정이나 폐기물 처리 등에 이용되고 있다. 고정화 효소에 대하여 연구 하는 목적으로 다음 세가지를 들 수 있다. 1)고정화 효소는 가용성 효소보다 공정과정에 있어서 경제적이며 이용하기가 편리하다. 2) 효소의 물리 화학적 성질을 선택적으로 변화시킬 수 있다. 3) 세포막에 부착된 생체 효소 연구를 위한 모형으로 사용할 수 있다. 현재 생산되고 있는 고정화 효소가 모두 이와 같은 목적으로 쓰이고 있지는 않으나 실질적으로 효소의 공업적 이용에 있어서 여러 가지 장점을 보여주고 있다. 이러한 공정은 효소를 반응용액에서 쉽게 회수할 수 있기 때문에 최종산물에 효소가 불순물로 남아있지 않고, 공정과정을 정확하게 조정할 수 있는 것이 특징이다. 효소를 회수하여 재이용할 수 있기 때문에 효소 이용 공정의 공업화에 있어서 단식(batch) 또는 연속적 효소반응법 등을 쓸 수 있을 뿐 아니라 연쇄적 단계 반응 과정을 효율적으로 처리할 수 있는 장점이 있다. 이러한 고정화 효소의 공업적 이용도가 높은 것은 효소정제에 의하여 생산가가 높아진다 하더라도 효소제품을 재이용 할 수 있고 또 효소 처리를 연속화 함으로서 경제성 및 효율성을 높일 수 있다는 점에서 각광을 받고 있다. 분리된 효소를 효율적, 경제적으로 운용하기 위해서는 효소가 열 및 pH에 대하여

안정성을 가지며 재사용 할 수 있어야 한다. 효소의 고정화 방법으로는 흡착법, 가둠법, 공유결합법 등이 있다. 흡착법은 담체 표면에 부착시키는 방법으로 정전기력, 이온결합력, 소수성 결합과 같은 물리적 힘을 이용한다. 공유결합법은 activated esters, bialdehydes, epoxides, amimes와 thiol등의 시약을 사용하여 담체에 효소를 화학적으로 공유 결합시키는 방법이다[6].

본 연구에서는 고분자 기본구조가 비극성인 방향족 화합물로서 극성이 큰 용매에는 거의 용해되지 않는 폴리아닐린을 지지체로 하여 공유결합에 의해 고정화 시킨 효소를 효과적으로 이용하기 위한 기초자료로 활용하기 위해 효소의 고정화 조건 및 고정화 효소의 특성에 관하여 연구하고 이를 활용하여 hexylglucoside를 합성하고자 하였다. 기능성 당 화합물을 합성하기 위해서는 단순 한 결합구조를 가진 알킬글루코사이드(alkylglucoside)로부터 출발하여 필요로 하는 결합구조를 형성시키거나 그 배열구조를 조절하는 것이 경제적이므로 기능성 당 화합물을 생산하고자 하는 정밀 화학공업, 식품 과 화장품 공업 및 약리학과 의학 등의 연구 분야에서는 최근 많은 관심과 함께 알킬글루코사이드에 관한 연구[7-9]가 계속되고 있다. 알킬글루코사이드의 효소적 합성법은 Michael Trani 등[10], gudrun Liunger 등[11], Gabin Vic등[12], Paul Christakopoulos 등[13], Terez Balong등[14], mats Andersson 등[15] 의 많은 연구자에 의하여 연구되어 왔으나, 높은 효소농도를 사용함에도 불구하고 반응속도와 수율이 낮고 여전히 상용화 수준과는 거리가 멀 뿐만 아니라 체계적인 연구결과도 제시되어 있지는 못한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 강력한 자석에 의해 반응조로부터 분리가 용이한 고정화 효소를 사용하여 batch, PFR, CSTR 에서 hexylglucoside를 합성하고 농도 관점에서 가장 바람직한 효소반응 공정을 제시하였다. 알킬글루코사이드를 크로마토그래피법으로 분리.정제할 수 있으므로 반응공정과 분리공정을 통합 생산

공정으로 통합하면 기능성 알킬글루코사이드의 혁신적인 생산공정이 될 것으로 전망된다.

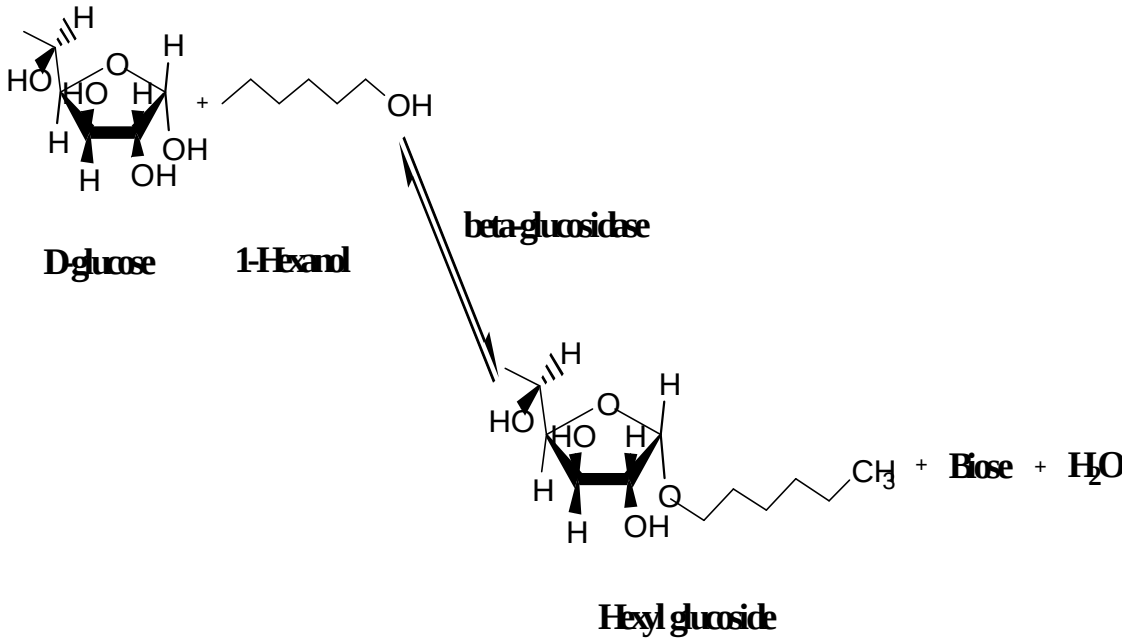

Figure 1. Hexylglucoside synthesis from glucose and hexanol

제2장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험재료

본 연구에서는 beta-glucosidase(Fluka, EC.3.2.1.21 from almonds) 를 고정화 할 효소로 사용하였고, 고정화 할 지지체로 polyaniline 을 사용하였으며, 효소 활성측정을 위한 기질로서는 p-nitrophenyl beta-D-glucopyranoside(sigma)를 사용하였다. 또한 본 연구에서는 Fe_2O_3, N,N-Dimethylformamide(sigma), sodium acetate buffer, sodium carbonate, sodium phosphate buffer(pH4~8), Tris buffer, protein assay kit, Ammonium peroxo disulfate 등 시약을 사용하였다. 위의 시약들은 모두 Sigma 제품으로 사용하였다. 사용한 기기로는 반응온도 유지를 위해 Thermo mixer(Fine mould precision znd.co), p-nitrophenol 농도를 측정하기 위해 UV-visible spectrophotometer(Amersham)을 사용하였다.

제 2 절 BG 특성분석

2-1 BG 고정화

2-1-1 PANI 제조

Polyaniline nanofiber 를 제조하기 위해서 ammonium peroxo disulfate 0.1% (w/w)와 aniline 용액(1M HCl 용액)을 격렬하게 섞는다. 고분자 중합 반응에 의해 nanofiber 가 만들어지면 nanofiber 내에 있는 HCl 용액을 제거하기 위해 4 번 이상 증류수로 씻어낸다. 제조된 시료는 사용을 위해 냉장 보관하였다.

2-1-2 PAMP 제조

자석으로 분리가 가능한 polyaniline nanofiber 의 제조를 위해서 시약상에서 구입한 iron oxide 나노입자를 고분자 중합 시 첨가하여 반응을 시켜 polyaniline 중합 시 nanoparticle 등이 끼워 들어가는 형태 또는 nanoparticle 표면에 polyaniline 이 coating 되는 형태의 자석에 의해 분리가 가능한 나노입자 또는 nanofiber 의 제조가

가능하였다. 이렇게 제조된 nanofiber 는 증류수로 4 번 이상 씻은 다음 효소의 고정화를 위해 냉장고에 보관하였다.

2-1-3 PANI 와 PAMP 지지체에 beta-glucosidase 의 고정

각각의 5ml vial 에 PANI 2mg, PAMP 2mg 을 넣는다. beta-glucosidase 를 10mg/ml 되게 pH 5.0 인 20mM sodium phosphate buffer 에 용해한 다음 이 효소용액 1ml 을 취하여 각각의 PANI 2mg, PAMP 2mg 이 들어있는 5ml vial 에 첨가하여 실온에서 200rpm 으로 30 분간 반응시킨다. 2 시간 후 상등액을 버리고 20mM sodium phosphate buffer 로 200rpm 에서 5 분 동안 세척한 후 더 이상의 효소가 떨어져 나오지 않을 때까지 세척과정을 5~10 회 반복한다.

2-2 효소 고정화 특성

2-2-1 효소 고정화

beta-glucosidase(Fluka)를 pH 5.0 인 20mM sodium phosphate buffer 에 용해시켜 0.1, 0.5, 1, 5, 10mg/ml 가 되도록 효소용액을 만들어서 PANI 와 PAMP 지지체에 각각 고정화 하여 효소활성을 측정한다.

2-2-2 효소 정량

효소 고정화 반응 후 잔존 효소 정량은 800ul의 희석한 sample과 200ul의 Brad ford reagent를 혼합하여 595nm에서 흡광도를 측정한 후 검량곡선을 이용하여 정량 하는 Bradford method를 사용하였다 [16]. 검량곡선은 Bovine serum albumin(BSA)로 작성하였다.

2-2-3 효소 활성도 측정

효소의 활성도 측정을 위한 p-nitrophenol 검량곡선은 pH 5.0인 20mM sodium phosphate buffer 에 1mM p-nitrophenol을 녹인 후 일정농도 간격

으로 희석하여 p-nitrophenol 검량곡선을 얻었다. 효소 활성도 측정은 pNPG(p-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside)를 beta-glucosidase와 반응시켜 유리되는 p-nitrophenol을 420nm에서 흡광도를 측정하고[17] 검량곡선과 비교하여 정량하였다.

2-3 최적 pH

beta-glucosidase 와 PANI-BG, PAMP-BG 의 pH 에 따른 영향을 조사하기 위해서 기질로써 1mM pNPG 가 이용되었고, pH 의 조절은 20mM sodium phosphate buffer 를 이용하여 pH 4~8 까지 바꿔가면서 유리되는 p-nitrophenol 을 420nm 에서 흡광도를 측정하였다.

2-4 최적 온도

beta-glucosidase 와 PANI-BG, PAMP-BG 의 온도의 영향 조사를 위해 pH 를 beta-glucosidase 의 최적 pH 5.0 으로 고정하고, Thermo mixer(THERMO FINEMIXER 2000-DX, SHFINEMOULD PRECISION IND., CO.)를 이용하여 온도를 25℃~62℃로 바꿔가면서 측정하였다.

2-5 고정화 효소의 온도에 대한 안정성 조사

pH 를 beta-glucosidase 의 최적 pH 5.0 으로 고정하고, storage temperature 를 40℃, 60℃로 하여 7 일 동안 보관 하면서 자연 효소와 PANI-BG, PAMP-BG 의 활성을 측정하는 방법으로 안정성을 조사하였다.

2-6 효소반응 특성

beta-glucosidase, PANI-BG, PAMP-BG 의 기질로써 1mM pNPG 를 사용하였고, 농도의 범위는 0.06~1mM 로 하여 Kinetic constants 를 결정하였다. 사용된 효소는 beta-glucosidase 0.005mg/ml, PANI-BG 0.1mg/ml, PAMP 0.1mg/ml 이고 pH 와

온도 조건은 각각 5.0, 37℃이다. Km 과 Vm 은 Lineweaver-Burk method 에 의해 Enzyme Kinetics pro software 를 사용하여 구하였다.

2-7 효소 안정성 측정

pH 5.0 인 20mM sodium phosphate buffer 를 용매로 한 beta-glucosidase, PANI-BG, PAMP-BG 용액을 25℃에서 200rpm 으로 shaking 상태에서 보관하면서 각각 효소의 활성을 측정하여 안정성을 조사하였다.

제 3 절 Hexylglucoside 합성

3-1 시약 및 기기

Alkylglucoside 를 합성하기 위한 효소로는 beta-glucosidase(EC.3.2.1.21 from almond, Fluka)를 글루코시드 공여체로는 포도당(Glucose, Junsei)을 각각 사용하였고 글루코시드 수용체로는 헥산올(Hexanol, Aldrich)을 사용하였다. 양친매상을 구성하기 위한 상용용매로는 GC 급의 2-메톡시에탄올(2-methoxyethanol, Fluka)을 사용하였다. 포도당과 헥실글루코사이드의 농도를 측정하기 위해 HPLC system 을 사용하였다. 기울기 용리 장치로 SCL-10Avp(system controller, Shimadzu)를 사용하였고, 펌프는 LC-10ADvp (Shimadzu)를 사용하였다. ELSD-LT(low temperature-evaporative light scattering detector, Shimadzu)를 사용하여 glucose 와 hexylglucoside 의 농도를 측정하였고, column 은 carbohydrate column ES 5u(4.6*250mm, Alltech)을 사용하였다. 이동상의 조제를 위하여 HPLC 급 Acetonitrile (Duksan), Water(Duksan)을 사용하였고, hexylglucoside 농도를 측정하기 위한 standard 시약으로는 hexyl-beta-D-glucoside 200mM solution (Biochemika, 4℃ 냉장보관)를 사용하였다.

플러그 흐름 반응기(plug flow reactor, PFR)는 stainless steel 로 자체 제작한 column 으로 용적이 4mm*47mm 이다. 제작한 column 안에 고정화 효소(cotton 에 PANI-BG 100mg(enzyme 80mg/PA 10mg)를 붙인 것)를 넣었다. 유량조절을 위해 syringe pump(perfusor)를 그리고 생성물 채집을 위해 fraction collector

(Retriever)를 사용하였으며, 반응온도를 37℃로 유지하기 위해 heating coil(Young ji precision & Industry co.)을 사용하였다. 연속혼합흐름 반응기 (continuoust stirred tank reactor, CSTR)장치로는 40ml vial 을 반응기로 사용하였다.

3-2 자연효소에 의한 Hexylglucoside 합성

반응온도가 37℃로 유지된 8ml vial 반응기에서 GC 급의 2-methoxyethanol 을 상용용매로 하는 양친매상 효소반응계를 구성하고 효소농도를 1mg/ml 로 하여 hexylglucoside 를 합성하였다. 3, 6, 9, 12, 32, 48 시간에 시료 0.2ml 을 채취하여 -70℃ 냉동 보관 후 HPLC system[18]으로 glucose 와 hexylglucoside 농도를 분석하였다.

3-3 회분식 반응기에서 고정화 효소에 의한 Hexylglucoside 합성

beta-glucosidase 가 polyaniline 에 coating 된 PANI(40mg/5mg PANI)와 PAMP(40mg/5mg PAMP)를 각각 넣은 8ml vial 반응기에 2-methoxyethanol 을 상용용매로 하는 양친매상 효소반응계를 구성(2-methoxyethanol/water/ hexanol (60:40:40))하고 반응온도를 37℃로 유지하면서 hexylglucoside 를 합성하였으며 최종 생성물 농도관점에서 자연효소와 비교하였다.

3-4 PFR 에서 고정화 효소에 의한 Hexylglucoside 합성

용적이 4mm*47mm 인 stainless steal column 에 고정화 효소인 Cotton-PANI-BG 100mg(enzyme 80mg loading)을 넣고 heating coil 을 이용하여 PFR 의 반응온도를 37℃로 유지하였다. 2-methoxyethanol 을 상용용매로 하는 양친매상(amphiphilic phase)을 syringe 에 넣고 syringe pump 를 이용하여 유량을 각각 0.6ml/hr, 0.3ml/hr, 0.15ml/hr(체류 시간 각각 1, 2, 4 시간)로 변화시키면서 hexylglucoside 를 합성 하였으며, fraction collector 에 채집된 생성물을 HPLC system 을 사용하여 glucose, hexylglucose 농도를 분석하였다.

3-5 CSTR 에서 고정화 효소에 의한 hexylglucoside 합성

40ml vial 에 고정화 효소 Cotton-PANI 100mg(enzyme 80mg loading)을 넣고 양친매상(amphiphilic phase)10ml 에 glucose 25g/L 를 넣고 heating coil 을 이용 하여 CSTR 의 반응온도를 37℃로 유지하였다. Amphiphilic phase 를 syringe 에 넣고 syringe pump 를 이용하여 유량을 0.3ml/hr(체류시간 33 시간)로 하여 hexylglucoside 를 합성하였으며, 채집된 생성물은 HPLC system 을 사용하여 농도를 분석하였다.

3-6 효소 재사용

고정화 효소인 PAMP-BG 는 자석에 의해 회수가 용이하다.

3-3 절에 언급된 고정화 효소에 의한 hexylglucoside 합성에 사용된 PAMP-BG 를 강력한 자석을 사용하여 반응용액으로부터 회수한 후, 재사용 하였다. 회수된 PAMP-BG 를 이용하여 37℃로 유지된 반응기(batch)에서 hexylglucoside 합성실험을 수행하였다. 1 회 반응시간은 24 시간이었으며, 재회수해서 사용한 횟수는 총 8 회이다.

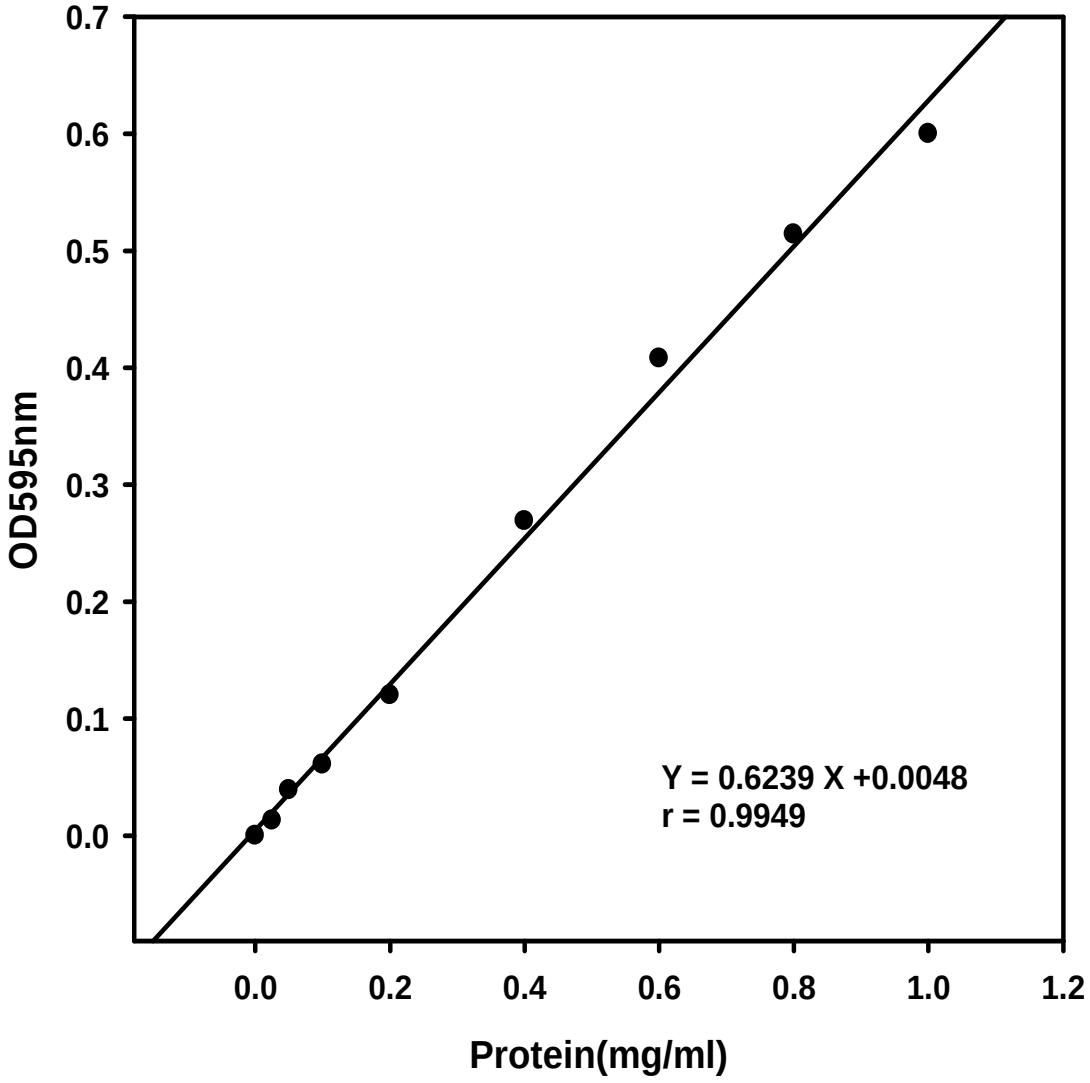

Figure 2. Calibration curve for protein concentration

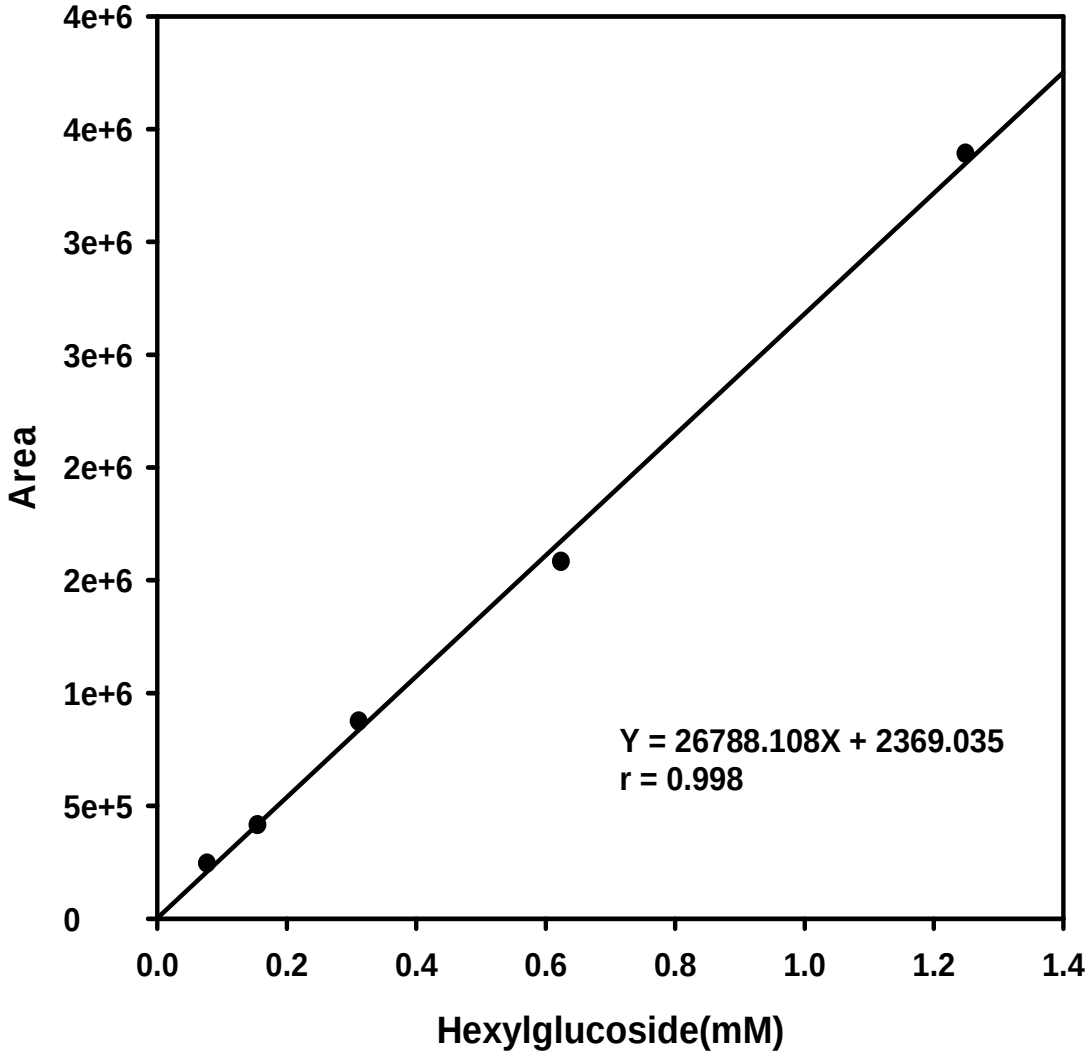

Figure 3. Calibration curve for hexylglucoside concentration

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 BG 특성 조사

1-1 효소 고정화 능력

Figure 4. 에서 보는 바와 같이 polyaniline 에 고정화된 각각 다른 농도의 beta-glucosidase 는 PANI-BG 의 경우 5mg/ml, PAMP-BG 의 경우 10mg/ml 일 때 상대적으로 높은 활성을 나타냈다. 그러므로 최대 고정화를 위한 효소의 농도는 각각 5mg/mL, 10mg/mL 이라고 할 수 있다. 하지만, 이 경우에는 PANI-BG 와 PAMP-BG 에 고정화할 때 고정화 되지 못하고 버려지는 효소가 많다. 따라서 경제적인 면을 고려할 때, 2mg PANI 와 2mg PAMP 에 고정화 하는 beta-glucosidase 의 최적 고정화 량은 비교적 활성이 높은 지점인 1mg/ml 로 정하였다.

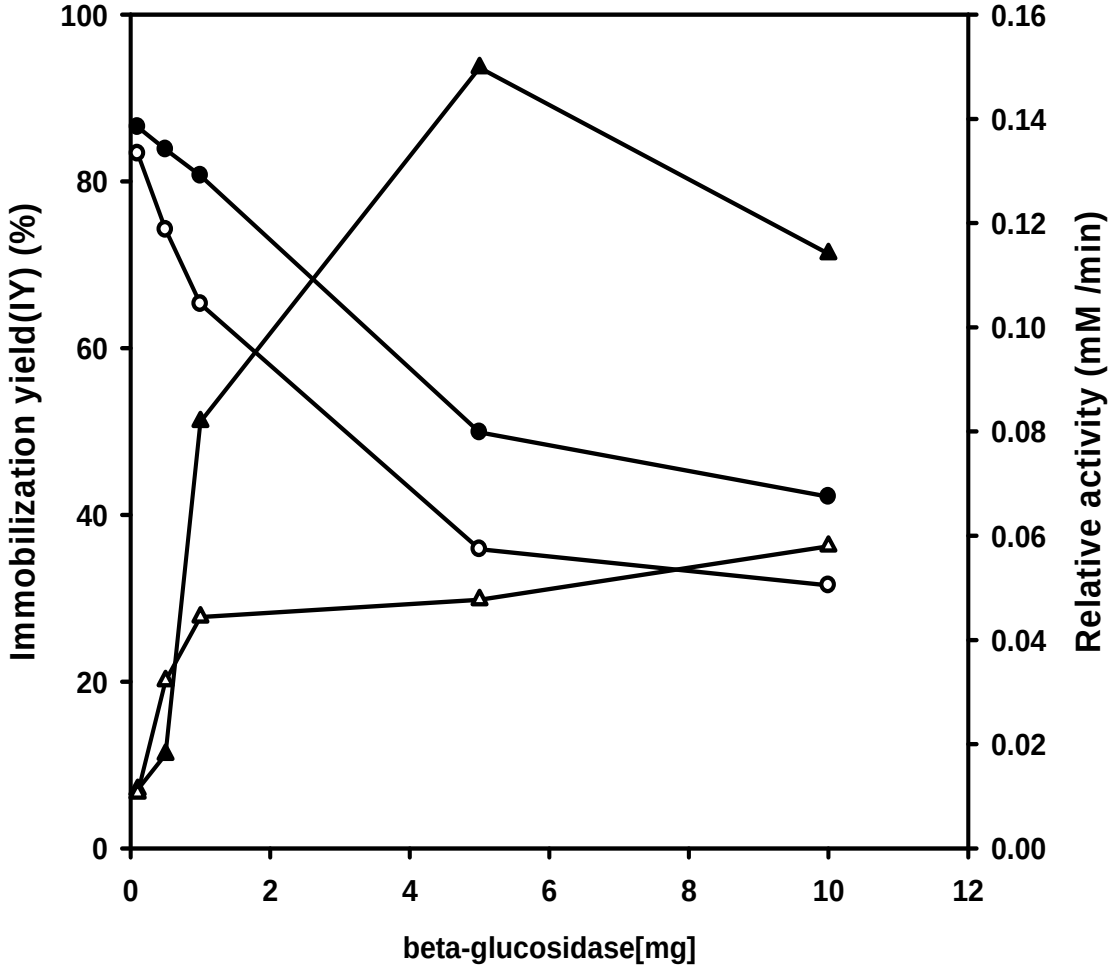

Figure 4. Loading capacity of immobilizition media

1-2 최적 pH

beta-glucosidase 및 고정화 효소 PANI-BG, PAMP-BG 의 기질 pNPG 에 대한 pH 영향을 Figure 5. 에 나타내었다. pH 별 완충액에 있어서의 활성비교를 pH4~8 까지의 범위 내에서 pH1 의 간격으로 반응을 진행시킨 후, pH 변화에 따른 활성 변화를 관찰하였다. PANI-BG, PAMP-BG 의 경우 비교적 산성영역에서 최대의 활성을 나타내고 있으며 중성으로 갈수록 활성이 저하되었다. pH 최적 활성 조건은 pH5.0 으로서 자연 효소와 동일하였으나 중성 영역에 있어서는 자연 효소에 비하여 상대적으로 높은 효소활성을 나타내어 효소의 고정화로 인해 pH 에 대한 안정성이 높아졌음을 확인하였다. 고정화 효소의 활성은 pH 에 따라 자연효소와 차이가 나는 경우가 많다고 알려져 있다[19]. 이것은 대부분의 담체가 어느 정도 전하를 띠고 있으므로 그로 인하여 반응용액(macroenvironment)의 pH 와 고정화 효소가 있는 미세환경의 pH 가 서로 다르기 때문이다[20].

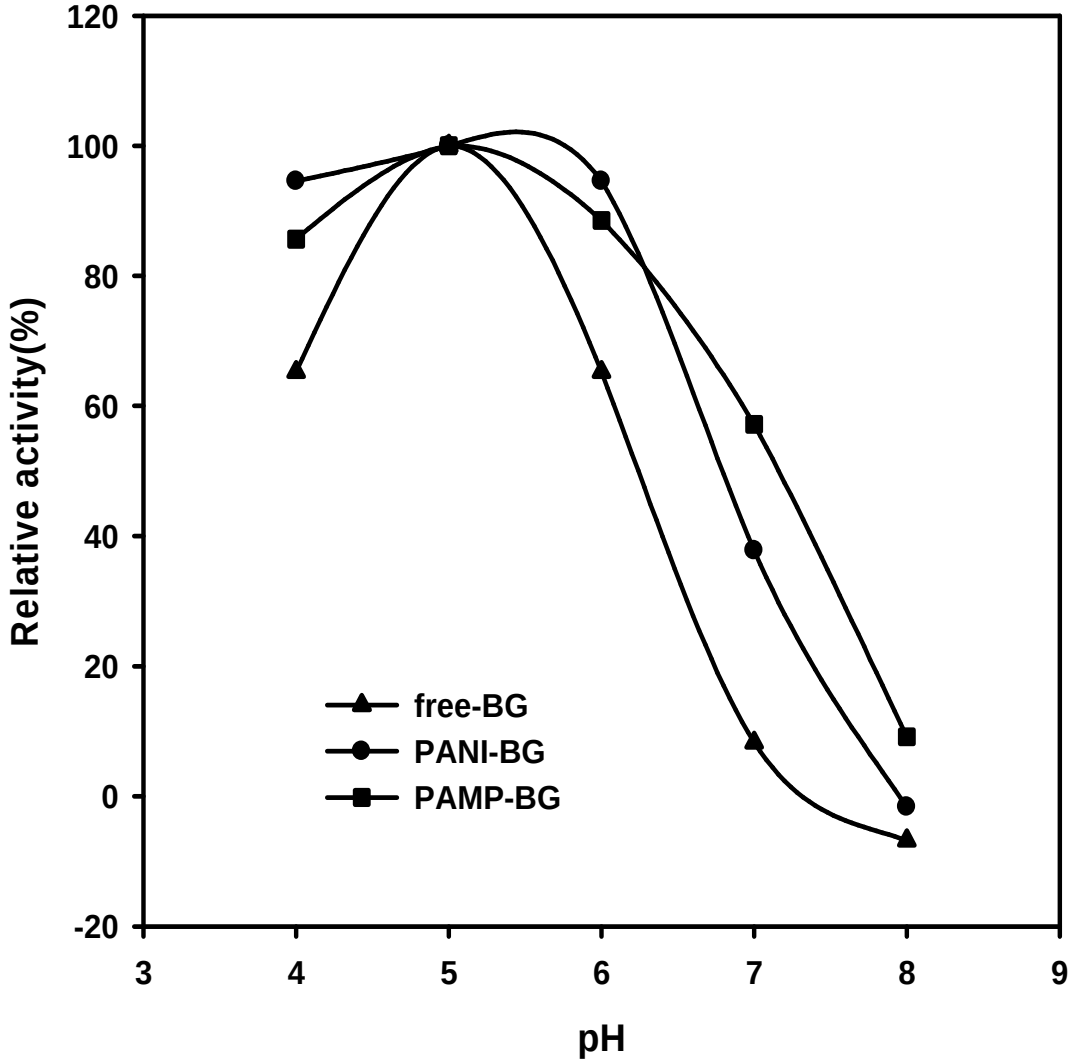

Figure 5. Effect of pH on the activity of free and immobilized beta-glucosidase at 37℃

1-3 최적 온도

자연 효소 및 고정화 효소의 기질 pNPG 에 대한 활성의 반응온도에 대한 영향을 Figure 6. 에 나타냈는데 고정화 효소의 효소 활성의 최적 온도 조건은 55℃로써 자연 효소와 동일한 것으로 나타났다. 온도에 대한 안정성은 자연 효소의 경우 25℃에서 43%, 55℃에서 100%, 65℃에서 61%의 활성을 보여 온도에 영향을 많이 받는 것으로 보여지며, PANI-BG 와 PAMP-BG 의 경우 45℃~65℃ 영역에서 94%이상의 활성을 보여 효소의 고정화로 인해 온도에 대한 안정성이 높아졌음을 확인하였다. 또한, 고정화 효소는 자석에 의해 반응조로부터 쉽게 회수될 뿐 아니라 연속적으로 사용할 수 있기 때문에 공정의 경제성을 높일 수 있으며 생성물과 효소가 분리되어 사용할 수 있어 생성물의 정제가 간편해지고 반응 정도를 우리가 원하는 만큼 제어할 수 있다.

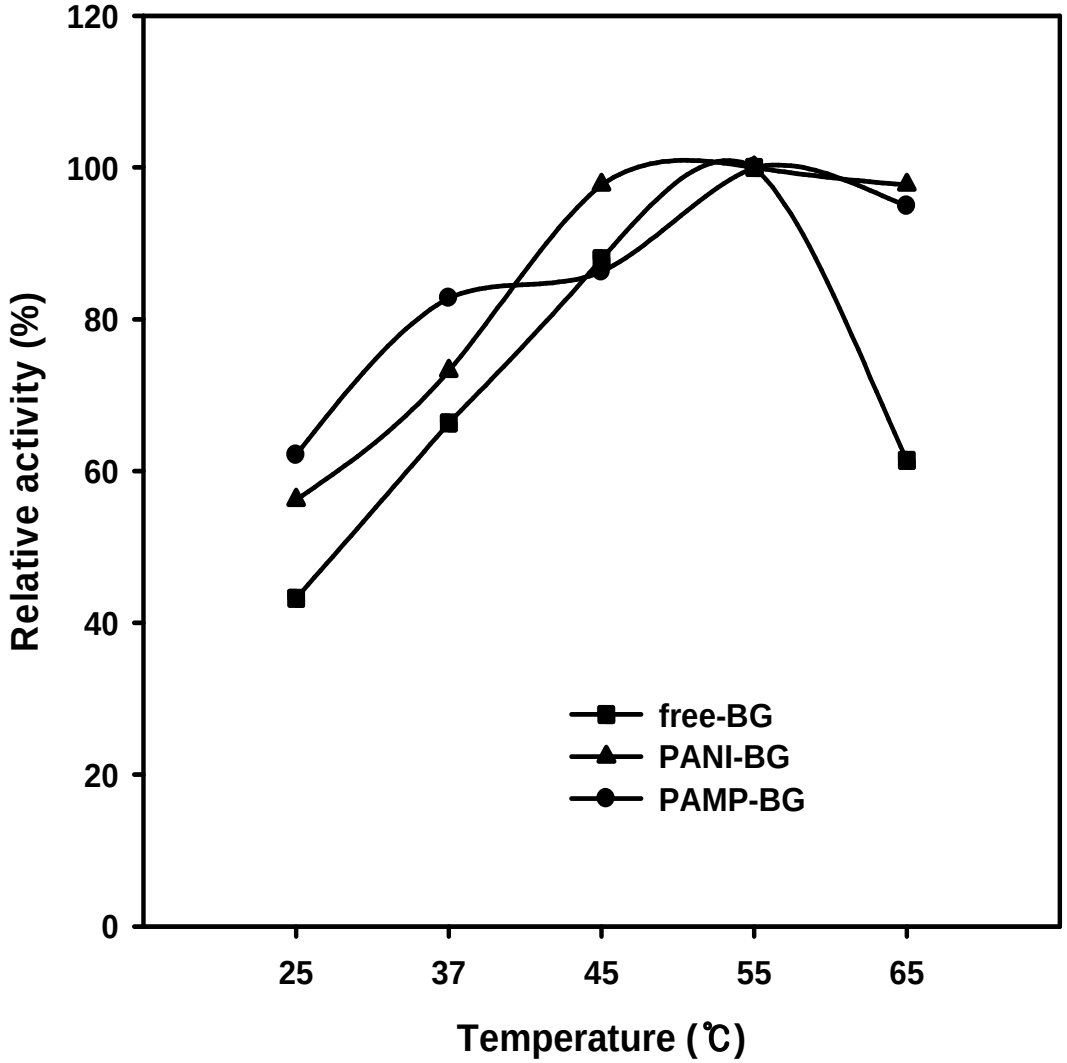

Figure 6. Effect of temperature on the activity of free and immobilized beta-glucosidase

1-4 고정화 효소의 온도에 대한 안정성(stability)

beta-glucosidase 및 고정화 효소 PANI-BG, PAMP-BG 의 기질 pNPG 에 대한 온도 영향을 Figure 7. 에 나타내었다. 온도에 의한 활성변화 측정은 20mM sodium phosphate buffer(5.0)중에서 각각 40℃, 60℃ 에서 7 일 동안 저장하였을 때, 저장기간에 따른 잔존 효소활성의 변화를 측정하여 장기저장에 따른 효소활성을 관찰하였다. 60℃ 에서 1 일 동안 저장한 자연 효소 및 고정화 효소의 잔존 효소활성은 없는 것으로 나타났다. 40℃ 에서 3 일 동안 저장한 자연 효소의 경우 잔존 효소활성은 38.8%였고, 7 일 동안 저장한 경우 잔존 효소활성은 1.0%였다. 고정화 효소 PANI-BG 는 3 일 동안 저장한 경우 잔존 효소활성은 27.9%, 7 일 동안 저장한 경우 3.0%였다. PAMP-BG 의 3 일 동안 저장한 경우 잔존 효소활성은 80.4%로 높은 활성을 유지하였고, 7 일 동안 저장한 경우 40.2%로 비교적 높은 활성을 유지하였다. 이것은 고정화에 의해서 열 안정성이 증가되었음을 말해 주고 있다. 고정화로 인해 최적온도가 향상된다는 보고는 여러 논문에서도 보고된 바가 있다[21-23]. 본 연구에서도 고정화 효소의 장점 중의 하나인 여러 특성 중 특히 열에 대한 안정성이 높아졌음을 확인하였다.

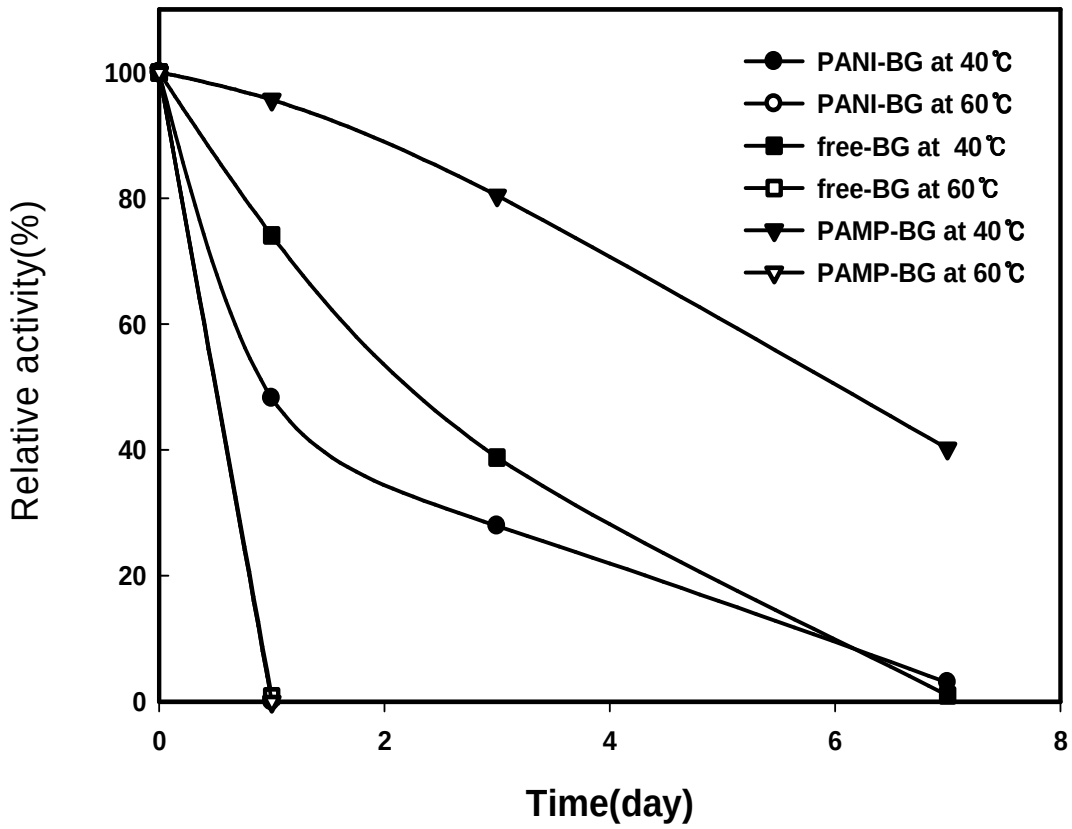

Figure 7. Storage stability of free and immobilized beta-glucosidase at 40℃, 60℃ and pH 5.0

1-5 효소 반응 특성조사(Km, Vm, Kcat)

Michaelis-Menten constants Km 과 Vmax 는 효소와 기질의 상호작용의 특성을 나타내며, 초기 효소 농도에 비례하여 증가되는 값으로 효소의 최대 반응속도를 나타내는 중요한 매개 변수들이다. 본 실험에서는 자연 효소와 고정화 효소의 초기 효소 농도가 다르기 때문에 이를 보정하기 위해 Vm 을 초기 효소 농도로 나눠주는 Kcat 을 도입하였다. Table 1. 에서 보는 바와 같이 자연 효소의 초기 효소 농도를 0.005mg/ml 로 하였을 때 Vmax 0.27, Km 1.13, Kcat 54 이다. PANI-BG 의 초기 효소 농도를 0.1mg/ml 로 하였을 때, Vmax 0.4, Km 4.91, Kcat 4 로 자연효소에 비해 13.5 배 정도 반응속도가 감소하는 것을 볼 수 있고, PAMP-BG 의 초기 효소 농도를 0.1mg/ml 로 하였을 때, Vmax 0.49, Km 4.07, Kcat 4.9 로 자연효소에 비해 11 배 정도 반응속도 감소 하는 것을 볼 수 있다(Figure 8~10). 이것은 효소의 지지체에 공유결합으로 기질 확산 저항[24, 25], 기질분배의 문제점, 단백질의 구조적인 변화[26], 단백질의 유동성의 감소 등으로 인해서 활성도의 감소가 일어난 것으로 생각된다[27].

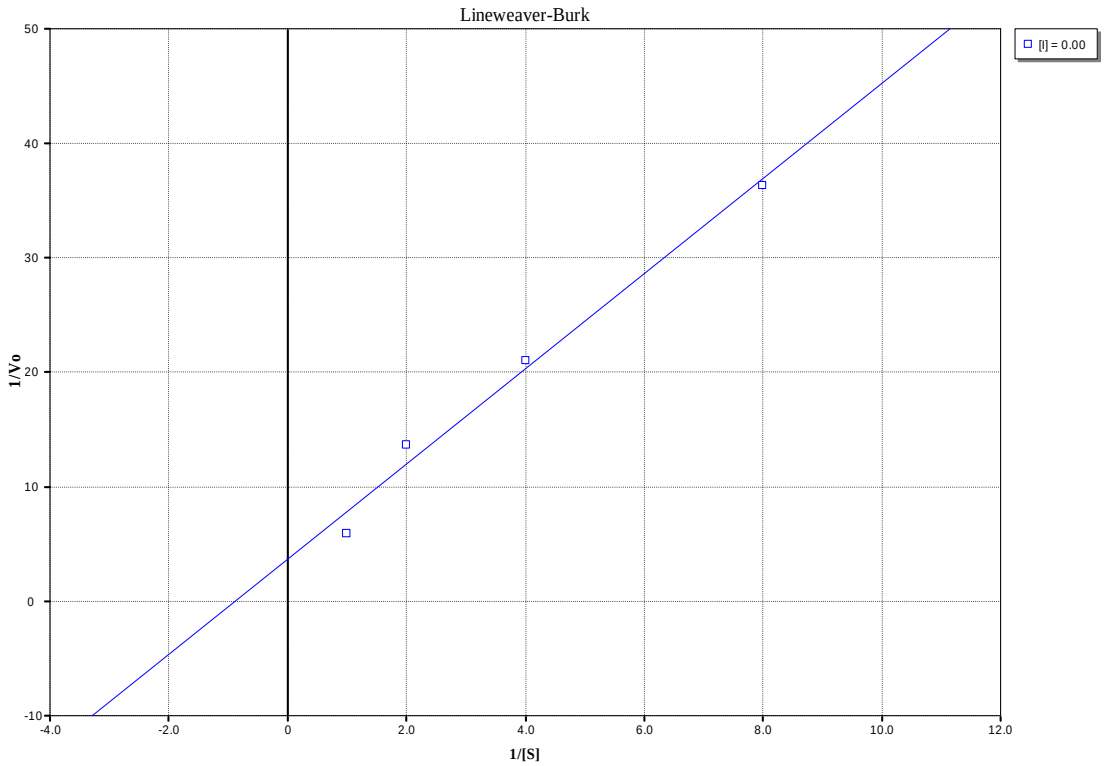

Figure 8. Lineweaver−Burk plots to determine the Michaelis−Menten constant (Km) and maximum velocity(Vmax) of free beta−glucosidase pH 5.0 and 37℃

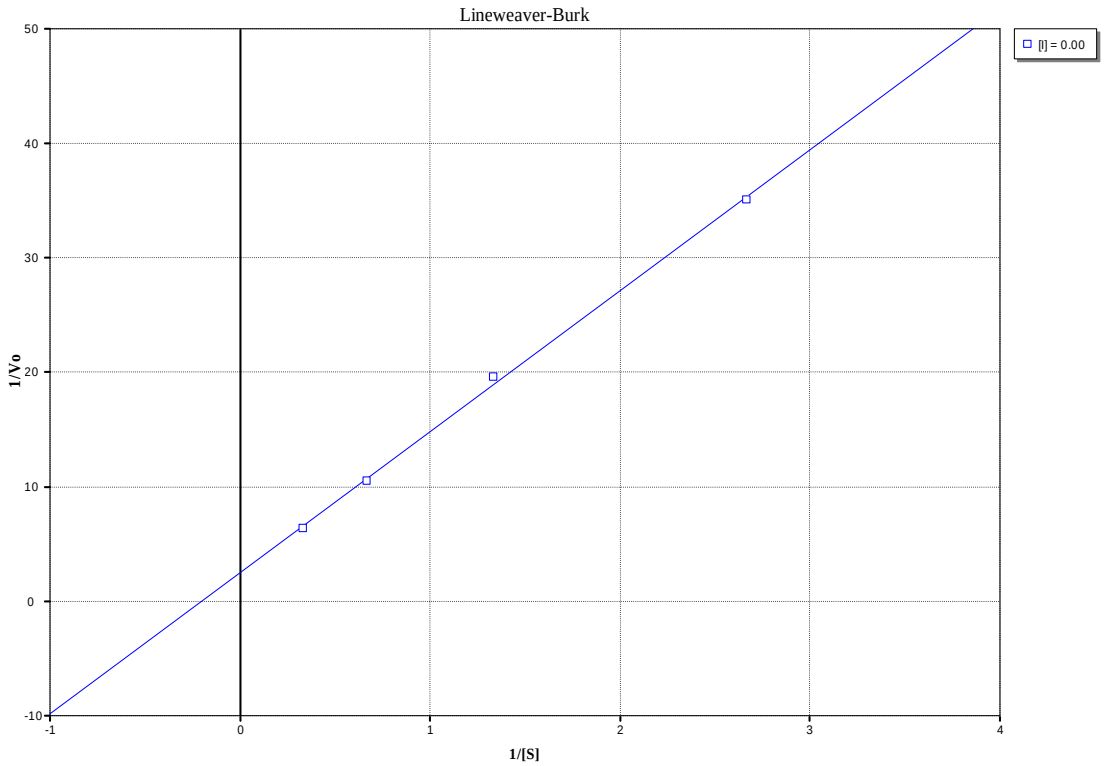

Figure 9. Lineweaver−Burk plots to determine the Michaelis−Menten constant (Km) and maximum velocity (Vmax) of PANI−BG pH 5.0 and 37℃

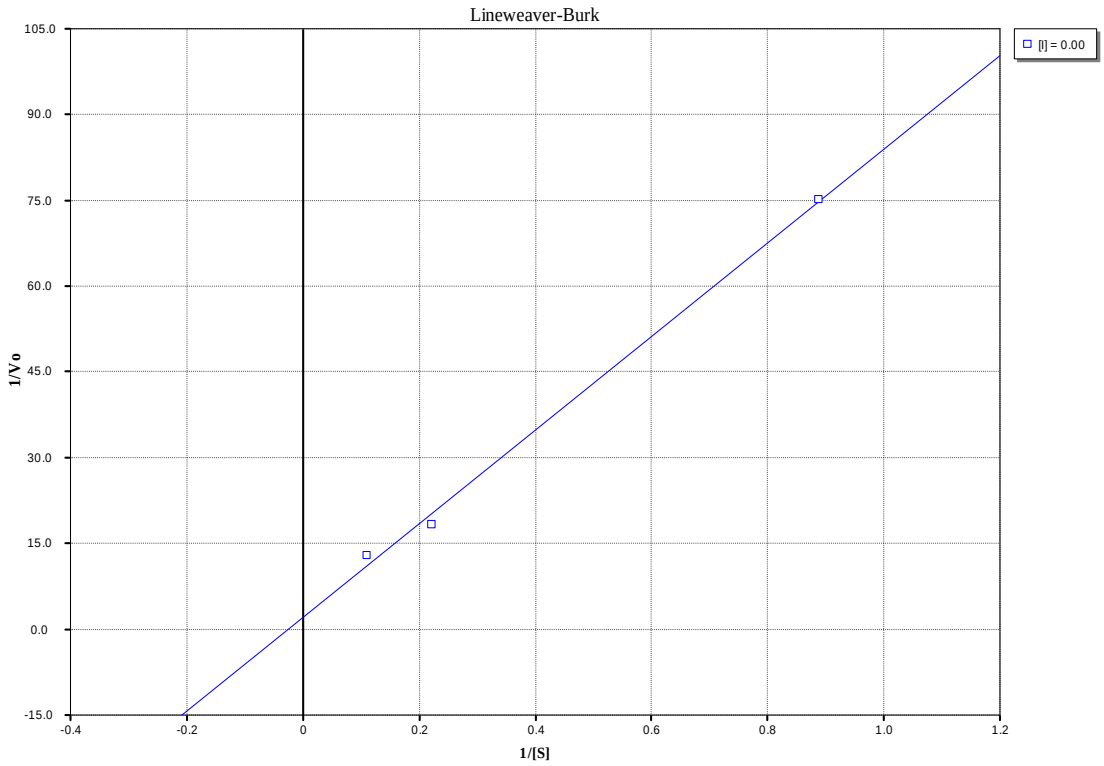

Figure 10. Lineweaver−Burk plots to determine the Michaelis−Menten constant (Km) and maximum velocity (Vmax) of PAMP−BG pH 5.0 and 37℃

Table 1. List of kinetic parameters for the free and immobilized beta-glucosidase.

Enzyme	Enzyme loading amount (mg/mL)	Km (mM)	Vm (mmol/min)	Kcat (mmol/min·mg protein)
Free-BG	0.005	1.13	0.27	54
PANI-BG	0.1	4.91	0.4	4
PAMP-BG	0.1	4.07	0.49	4.9

1-6 효소 안정성 조사

자연 효소와 고정화 효소를 20mM sodium phosphate buffer(pH5.0)중에서 장기 저장하였을 때, 저장 기간에 따른 잔존 효소 활성의 변화를 측정하여 안정성을 조사한 결과를 Figure 11. 에 나타내었다. 각각 25℃에서 200rpm 으로 흔들어주는 조건하에 16 일간 보관하면서 활성을 측정하였다. 그 결과, 자연 효소를 7 일 동안 보관한 경우에는 잔존 효소 활성이 63%로 떨어졌으며, 16 일째는 32% 정도의 활성을 유지하였다. 고정화 효소 PANI-BG 를 7 일 동안 보관한 경우에는 76%, 16 일 동안 보관한 경우에는 36%로 자연 효소 보다 4~13%정도 활성이 높았고, PAMP-BG 를 7 일 동안 보관한 경우에는 100% 이상의 높은 활성을 유지하였고 16 일 동안 보관한 경우에는 76% 이상이었다. 이것은 자연 효소에 비해 37~44% 정도의 활성이 더 유지된다는 것을 보여주는 결과였다. 효소 고정화는 효소의 안정성을 향상시키는 매우 효과적인 방법으로 알려져 있으며[28] 이것은 효소단백질이 담체에 결합되어 있는 상태에서는 변성 조건하에서도 변성이 쉽게 일어나지 않기 때문이다.

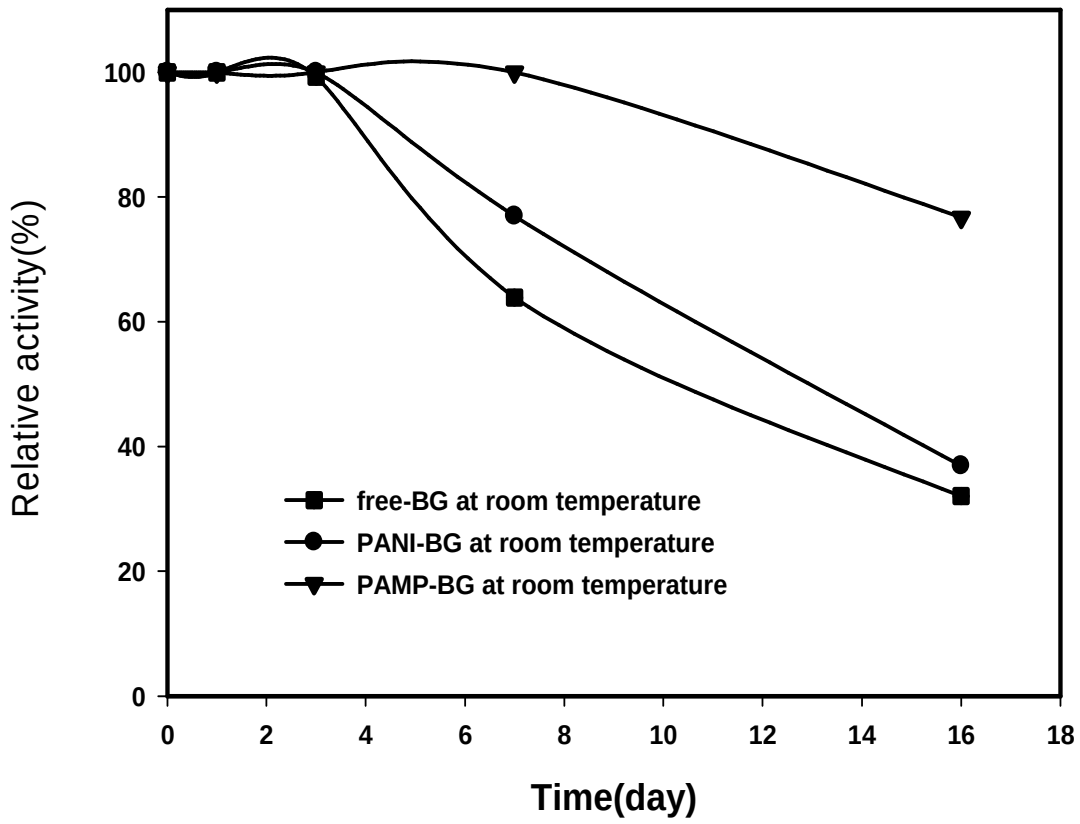

Figure 11. Storage stability of free and immobilized beta-glucosidase at 25℃, 200rpm and pH 5.0

제 2 절 Hexylglucoside 합성

2-1 회분식 반응기에서의 자연 효소와 고정화 효소에 의한 hexylglu-coside 합성

2-methoxyethan/water/hexanol (60/20/20, %, v/v)의 반응매질에서 포도당의 농도를 25g/L, 자연 효소의 농도를 1mg/mL, 고정화 효소(PANI-BG, PAMP-BG)의 농도를 8mg/mL 로 하여 회분식 반응기에서 hexylglucoside 를 합성하였고 시간에 따른 생성물 농도를 Figure 12. 에 나타내었다. 그림에서는 고정화된 효소의 농도가 8 배 많음에도 불구하고 자연 효소에 의해 합성된 생성물 농도가 훨씬 많음을 볼 수 있다. 이는 글루타알데하이드에 의해 효소를 고정화 할 경우 효소들이 글루타알데하이드에 의해 가교결합이 되면 불용성 집합체를 형성하거나, 흡착된 효소끼리 서로 연결되기도 한다. 때문에 PANI-BG, PAMP-BG 에 의한 생성물의 농도가 자연효소에 비해 낮은 이유는 가교 연결로 인한 효소의 활성부위 변화와 확산저항에 의한 것으로 판단된다. 하지만 자연 효소는 공정이 끝난 후 회수가 어렵지만 고정화 효소는 자석에 의해 회수가 용이하므로 고정화 효소를 재회수하여 사용한다면 이는 자연 효소를 사용한 공정보다 더 경제적이라고 생각된다.

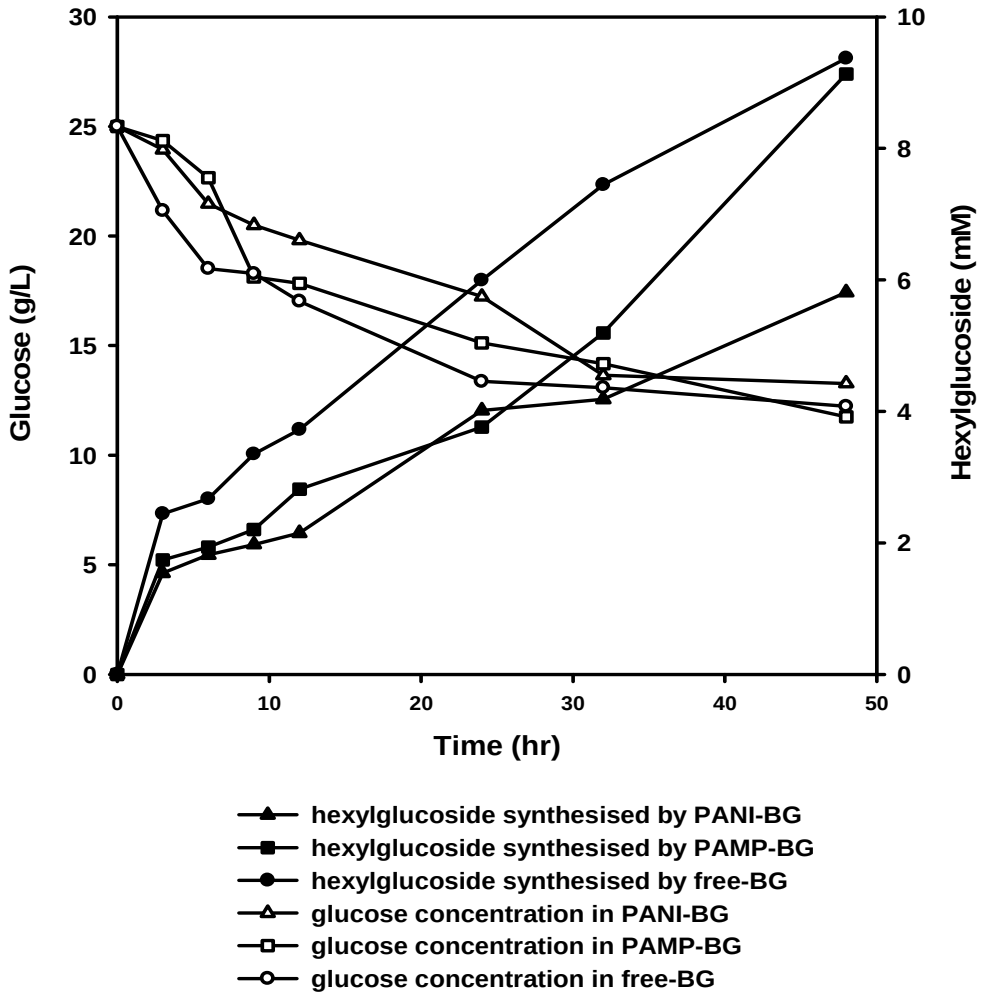

Figure 12. Synthesis of hexylglucoside with free and two types of immobilized beta-glucosidase (●) free-BG, (▲)PANI-BG, (■)PAMP-BG The reactions were carried out using 25g/L glucose at 37℃

2-2 PFR에서의 고정화 효소에 의한 hexylglucoside 합성

Figure 13. 은 PFR 용적이 4mm*47mm 인 관을 사용하여 머무름 시간에 따른 생성물 농도의 변화를 나타낸 것이다. 그림에서와 같이 생성물의 농도가 머무름 시간에 따라 증가 하였으며, 머무름 시간이 4 시간이었을 때는 생성물의 농도가 최고 6.06mM 을 나타내었고 이내 2 시간 마다 5mM 이상의 생성물 농도를 나타내었다. 이는 Table 2. 에서 보는 바와 같이 자연 효소에 의해 batch 에서 합성된 hexylglucoside 농도가 반응시간 48 시간에 conversion 이 6.58% 인 것을 생각할 때 머무름 시간이 4 시간인 경우의 PFR 에 의해 합성된 생성물은 28 시간의 반응시간을 기준으로 볼 때 conversion 이 57.83%로 매우 높은 전화율을 보였다. 따라서 PFR 에 의한 hexylglucoside 합성이 매우 바람직한 반응공정이라 판단된다.

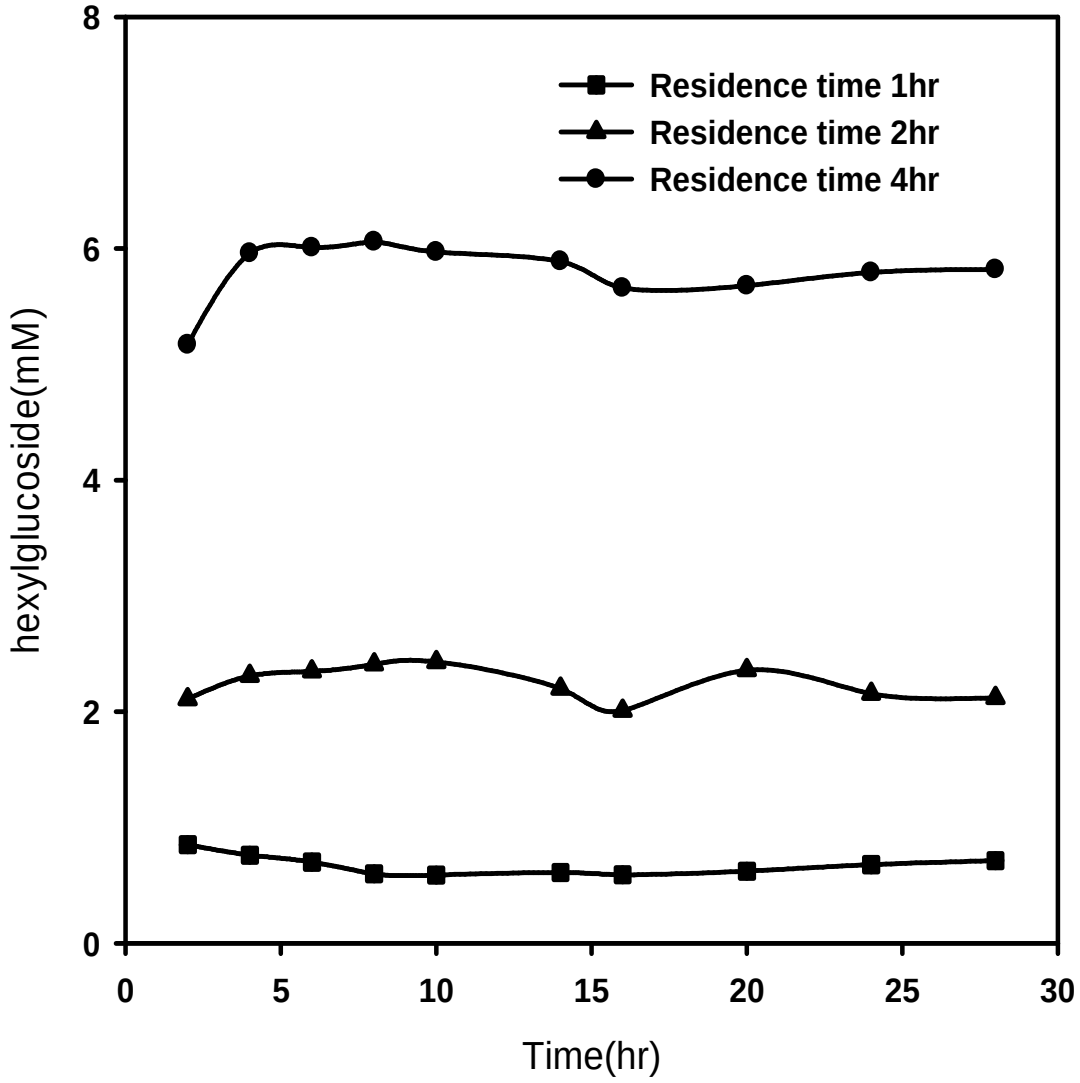

Figure 13. Synthesis of hexylglucoside by cotton-PANI-BG at PFR 4hr RT (●), 2hr RT (▲), and 1hr RT (■)

2-3 CSTR에서 고정화 효소에 의한 hexylglucoside 합성

Figure 14. 는 CSTR 에서 고정화 효소 PANI-BG, PAMP-BG 를 사용하여 유량 0.3mL/hr, 반응부피 10mL, 머무름 시간 33 시간으로 하였을 때 합성된 hexylglucoside 의 농도를 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 반응시간 80 시간 이후에 반응이 정상상태로 가는 것을 보여 주었으나, 최종 생성물 농도 관점에서 볼 때 PFR 에 비해 conversion 이 14.68%로 매우 낮음을 볼 수 있다. CSTR 은 반응기 부피당 반응물의 conversion 이 흐름 반응기들 중 가장 작기 때문에 높은 conversion 을 얻기 위해서는 대단히 큰 반응기를 사용해야 할 것으로 생각된다.

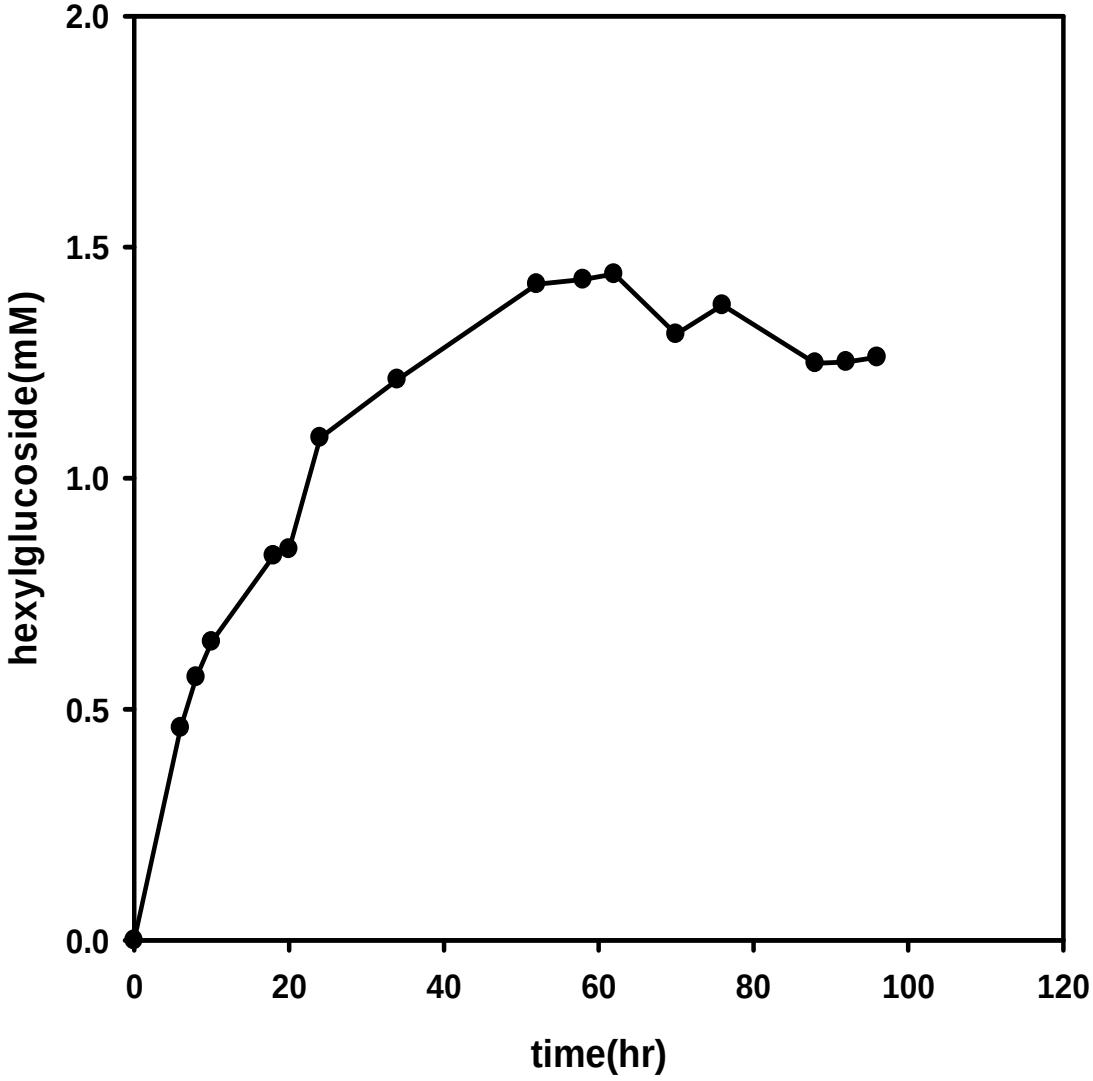

Figure 14. Synthesis of hexylglucoside by cotton-PANI-BG (flow rate 0.3ml/hr, RT 33hr)

Table 2. Effect of reactors on glucose conversion and produced hexylglucoside concentration.

Reactor	Enzyme concentration (mg/mL)	Glucose concentration (mmol)	Reaction time (hr)	Conversion (%)	Product concentration (mM)
Batch	1 (Native)	138.70	48	6.76	9.37
	8 (PANI-BG)	138.70	48	4.19	5.81
	8 (PAMP-BG)	138.70	48	6.58	9.13
PFR	8 (PAMP-BG)	138.70	28 (0.6mL/hr, RT : 1hr)	7.09	9.83
		138.70	28 (0.3mL/hr, RT : 2hr)	22.22	30.69
		138.70	28 (0.15mL/hr, RT : 4hr)	57.83	80.28
CSTR	8 (PAMP-BG)	138.70	28 (0.3ml/hr, RT : 33hr)	14.68	10.19

2-4 고정화 효소의 재사용

자석으로 분리가 가능한 고정화 지지체인 PAMP 에 효소를 고정화 시킨 후에 이를 사용하여 hexylglucoside 를 합성하는 실험을 반복하여 고정화 효소의 재사용 가능성을 실험하였다. 이러한 일련의 실험은 효소의 재활용을 통하여 효소의 사용량을 감소 시키고 효소의 재사용을 통하여 경제적인 효과를 얻기 위한 과정이었다. Figure 16. 에서 보는 바와 같이 본 연구를 통하여 고정화 효소를 사용하고 이를 자석으로 회수한 후에 다시 사용하는 반복되는 과정을 통하여 사용한 결과 한번 회수 할 때마다 회수되는 효소의 양이 95% 이상으로 8 번 반복해서 사용한 경우 회수되는 효소의 양이 PANI-BG 는 초기 효소활성도의 66%, PAMP-BG 는 초기 효소 활성도 의 71%의 회수율을 보여주었다. 회수율의 감소는 고정화 효소가 탈착되어 총괄적인 효소의 활성도 감소로 나타난 것으로 판단된다. Figure 17. 은 효소의 회수과정을 사진으로 보여준 것이다. 본 연구에서 개발한 고정화 효소는 자석에 빠른 속도로 붙기 때문에 분리가 용이 하면서 반응액으로부터 깨끗하게 분리되는 모습을 보여주고 있다.

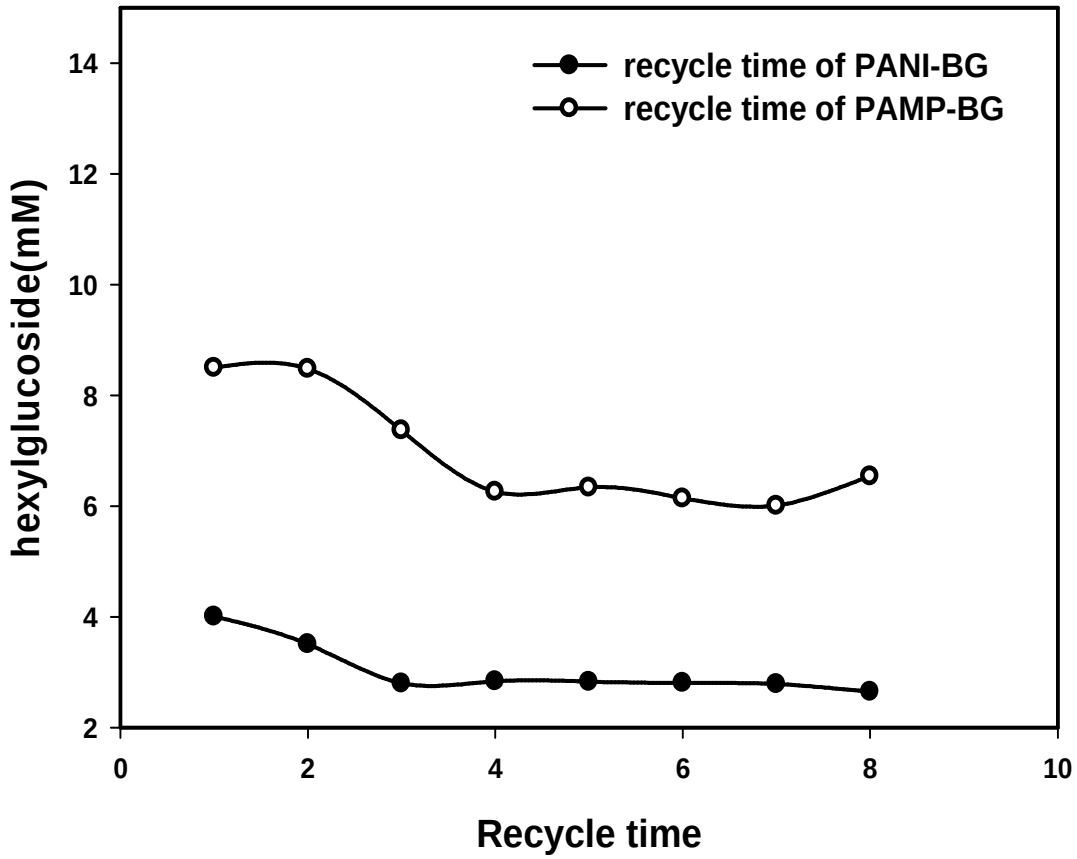

Figure 15. Effect of enzyme recycle on synthesis of hexylglucoside

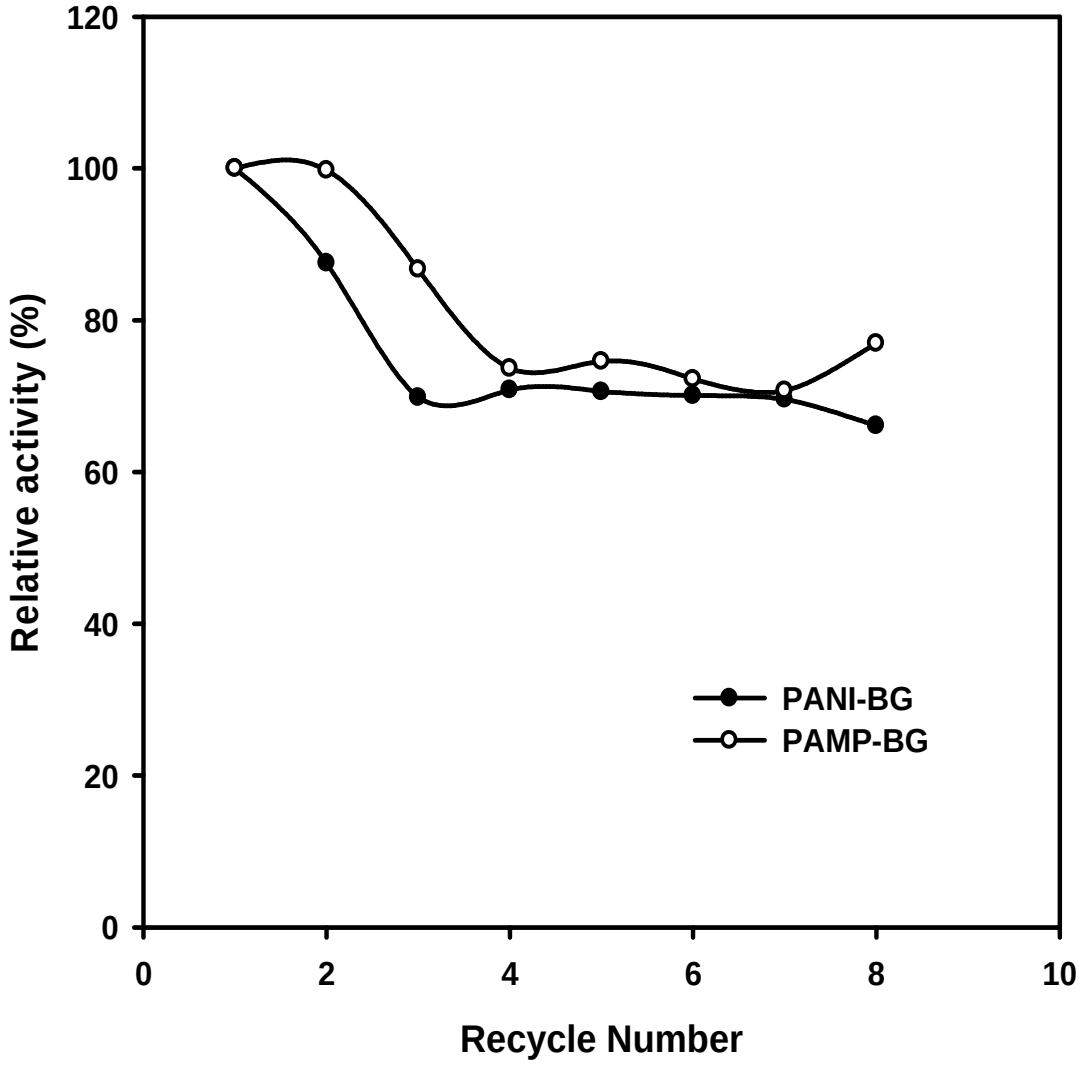

Figure 16. Effect of recycle on enzyme activity

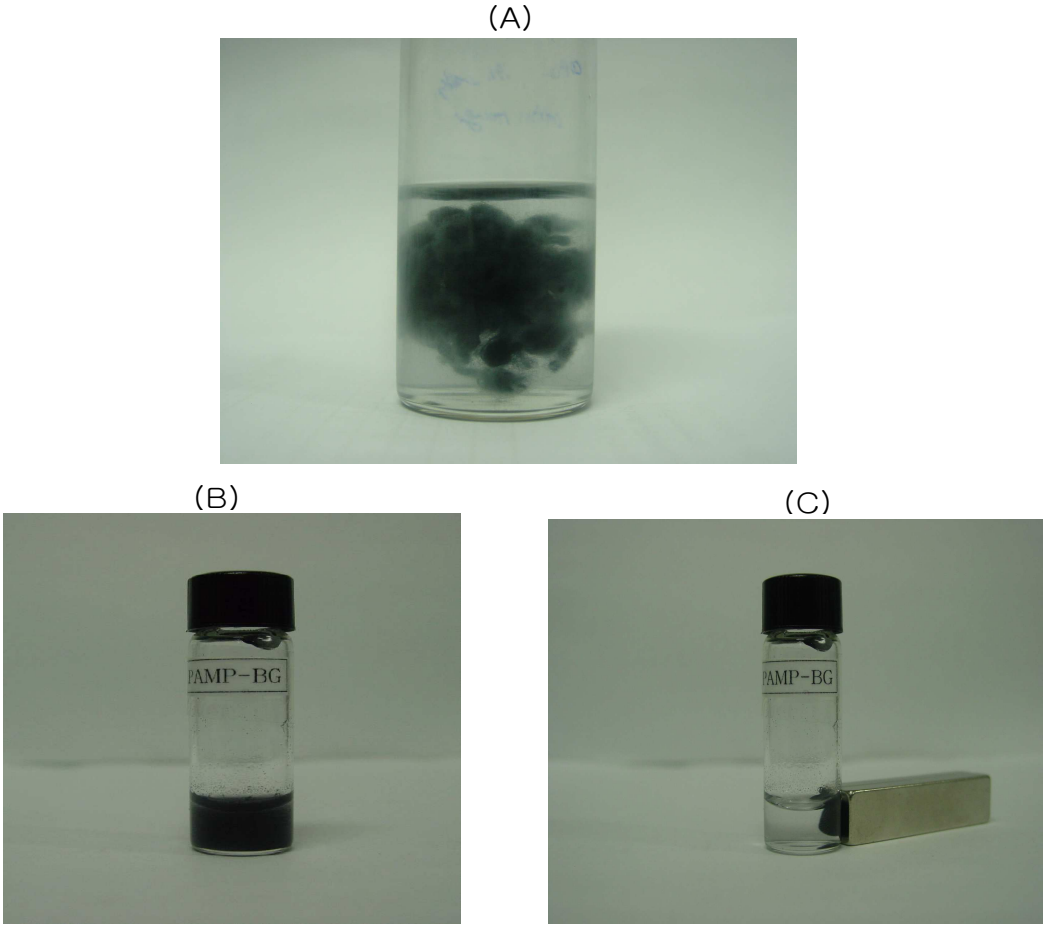

Figure 17. The immobilized enzymes (A : cotton−PANI−BG, B : PAMP−BG) and recovered with magnets (C)

제 4 장 결론

Polyaniline 의 산업적 응용분야 중 효소의 고정화 지지체로서의 가능성을 확인하기 위한 방법으로 beta-glucosidase 를 glutaraldehyde 를 이용한 공유결합에 의한 고정화를 시도, 여러 가지 반응조건에서의 활성변화를 자연 효소와 비교해 보았으며, 자석에 의해 회수가 용이한 고정화 효소를 이용하여 hexylglucoside 를 합성함에 있어서 가장 바람직한 반응공정을 제시하였다.

1. PANI, PAMP 에 고정화 할 때 beta-glucosidase 의 최적 고정화 양은 1mg/mL 였으며 pH 최적 활성 조건은 pH 5.0, 최적 온도 조건은 55℃로 자연효소와 동일하였다. 또한 40℃에서 자연효소와 고정화 효소를 7 일 동안 저장하였을 때 잔존 효소 활성을 측정한 결과 3 일째 저장한 경우 자연효소의 잔존 활성은 38.8%였고, 7 일째는 1.0%였다. PANI-BG 는 3 일째 27.9%였고 7 일째 3.0%였다. PAMP-BG 의 경우 3 일째 80.4%로 높은 활성을 유지하였고 7 일째 40.2%로 비교적 높은 활성을 유지하여 효소 고정화로 인해 열에 대한 안정성이 높아졌음을 확인하였다. 자연 효소와 고정화 효소를 25℃에서 흔들어 주는 조건하에 장기저장 하면서 잔존 효소 활성을 측정한 결과 저장 16 일째 자연 효소는 32%정도의 활성을 유지하였고, PANI-BG 는 36%로 자연효소 보다 4~13%정도 활성이 높았고, PAMP-BG 의 경우는 76%로 자연 효소보다 37~44%정도의 높은 활성을 유지하여 효소의 고정화로 인해 장기저장에 따른 효소의 안정성이 향상 되었음을 확인하였다.

2. 자석에 의해 반응공정으로부터 회수가 용이한 고정화 효소를 이용하여 회분식 반응기, PFR, CSTR에서 hexylglucoside를 합성하여 자연 효소에 의해 합성된 hexylglucoside의 농도와 비교한 결과, 회분식

반응기에서 자연 효소에 의해 합성한 경우 6.76% 전화율을 보였고, PANI-BG에 의한 경우 4.19%, PAMP-BG에 의한 경우 6.58%의 전화율을 보였다. CSTR 에서 cotton-PANI-BG를 이용하여 합성한 경우 14.68% 전화율을 보였으며, PFR반응기에서 머무름 시간을 1시간으로 하였을 때 7.09%, 2시간으로 하였을 때 22.22%, 4시간으로 하였을 때 57.83%로 매우 높은 전화율을 보였다. 이는 기존에 연구된 hexylglucoside 합성[13] 전화율이 최고 26%였음을 고려할 때, 본 연구에서 고정화 효소를 이용한 PFR 반응기에서의 hexylglucoside 합성 반응공정은 이에 매우 효과적임을 알 수 있으며, 나아가 알킬글루코사이드의 연속생산공정을 상업적으로 발전시킬 수 있는 가능성을 제시한 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Santos, A.M.P., M.G. Oliveira, and F. Maugeri, Modelling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design. Bioresource Technology, 2007. **98**(16): p. 3142-3148.

2. Funda Yagiz, D.K.a.A.N.A., Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. Chemical Engineering Journal, 2007. **134**(1-3): p. 262-267.

3. Zhengpeng Yang, S.S.a.C.Z., Study on the activity and stability of urease immobilized onto nanoporous alumina membranes. Microporous and Mesoporous Materials, In Press. Corrected Proof, Available online 2007. **17**.

4. Vitolo, E.J.T.a.M., Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(5): p. 1020-1025.

5. Zhen-Xing Tang, J.-Q.Q.a.L.-E.S., Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. Materials Letters, 2007. **61**(1): p. 37-40.

6. Zemanova, I., J. Turkova, M. Capka, L. A. Nakhapetyan, F. Svec, and J. Kalal, Effect of nature of proteins on their

coupling to different epoxide-containing suppotrs. Enzyme Microb. Technol, 1981. **3**: p. 229-232.

7. Whiddon, C.R., C.A. Bunton, and O. Soderman, Aromatic nucleophilic substitution in nonionic alkylglucoside micelles. Journal of Colloid and Interface Science, 2004. **278**(2): p. 461-464.
8. Louisa Dahbi, M.A.-H., Pierre Lesieur, Claudie Bourgaux and Michel Ollivon, A long ripple phase in DLPC decylglucoside mixture evidenced by synchrotron SAXS coupled to DSC. Chemistry and Physics of Lipids, 2006. **139**(1): p. 43-53.

9. Rajesh A. Salkar, H.M.a.M.H., Alkylglucosides with isoprenoid-type hydrophobic chains-effects of hydrophobic chain size on the aqueous phase behavior. Chemistry and Physics of Lipids, 2004. **127**(1): p. 65-75.

10. Amélie Ducret, M.T.a.R.L., Comparison between various commercial sources of almond β-glucosidase for the production of alkyl glucosides. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006. **38**(2): p. 91-94.

11. Gudrun Ljunger, P.A.a.B.M., Enzymatic synthesis of octyl-β-glucoside in octanol at controlled water activity. Enzyme and Microbial Technology, 1994. **16**(9): p. 751-755.

12. Thomas, G.V.a.D., Enzyme-catalysed synthesis of alkyl β-

D−Glucosides in organic media. Tetrahedron Letters, 1992. **33**(32): p. 4567−4570.

13. Paul Christakopoulos, M.K.B., Dimitris Kekos and Basil J. Macris, Enzymatic synthesis of trisaccharides and alkyl β−D−glucosides by the transglycosylation reaction of β−glucosidase from Fusarium oxysporum. International Journal of Biological Macromolecules, 1994. **16**(6): p. 331−334.

14. eréz Balogh, L.B.a.J.K., Novel reaction systems for the synthesis of O−glucosides by enzymatic reverse hydrolysis. Tetrahedron Letters, 2004. **60**(3): p. 679−682.

15. Adlercreutz, M.A.a.P., A kinetic study of almond−β−glucosidase catalysed synthesis of hexyl−glycosides in low aqueous media: Influence of glycosyl donor and water activity. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001. **14**(4−6): p. 69−76.

16. Bradford, M.M., A raped and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein−dye binding. Anal. Biochem, 1976. **72**: p. 245−248.

17. A. Martino, M.D., P. G. Pifferi, G. Spagna and G. Bianchi, Immobilization of β−glucosidase from a commercial preparation. Part 1. A comparative study of natural supports.

Process Biochemistry, 1996. **31**(3): p. 281-285.

18. Dae-Won Park, H.-s.K., Joon-KI Jung, Seungjoo Haam, Enzymatic synthesis of alkylglucosides by amphiphilic phase enzyme reaction. Biotechnology Letters, 2000. **22**: p. 951-956.

19. Godfrey, T., Immobilized enzyme. In Industrial Enzymology-The application of enzymes in industry-. 1983. **1983**: p. 437-439.

20. Goldstein, L., Kinetic behavoir of immobilized enzyme systems. . In Methods in Enzymology, Mosbach, K.(ed.) Academic Press, New York, 1976. **44**: p. 397-443.

21. Jang-Woo Ahn, K.H.P.a.J.-H.S., Comparison of Kinetic Parameters, pH and Thermal Properities of Soluble and Immobilized Transglucosidase from Aspergillus niger. Korean Food SCI. Technol, 1998. **30**: p. 630-637.

22. Juang, M.-Y.C.a.R.-S., Use of chitosan clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β-glucosidase. Biochemical Engineering Journal, 2007. **35**(1): p. 93-98.

23. Manolov, R.j., Kambourova, M.S. and Emanuilova, E.I., Immobilization and properties of Bacillus stearothermophilus

pullulanase. Biochem, 1993. **18**: p. 409−415.

24. Davis, S.a.R.G.B., Covalent immobilisation of laccase of activated carbon for phenolic effluent treatment. Microbiol. Biotechnol, 1992. **37**: p. 474−479.

25. Wilson, S.A., K. Peek, R. M. Daniel, Immobilization of proteinase from the extremely thermophilic organism Thermus RT41A. Biotechnol. Bioeng, 1994. **43**: p. 235−239.

26. Gottschalk, N.a.R.F., Authenticity and reconstiution of immobilized enzymes: characterization and denaturation: renaturation of glucomylaseII. Biotechnol.Appl. Biochem, 1991. **14**: p. 324−335.

27. Clark, D.S., Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? Trends Biotechnol, 1994. **12**: p. 439−443.

28. Monsan, P.a.C., D., Enzyme stabilization by immobilization. In Methods in Enzymology, Colowick, S.P. & Kaplan, N.O.(ed.) Academic Press, 1988. **137**: p. 584−598.

감사의 글

대학원 석사과정을 마무리 하기까지 많은 도움과 아낌없는 성원을 주신 분들께 이 자리를 빌어 깊은 감사를 드립니다. 특히 눈, 코 뜰새 없이 바쁘심에도 불구하고 항상 모든 일에 있어 세심한 지도와 가르침을 주시고 어렵고 힘겨울 때 길이 되어주신 이중헌 교수님께 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 또한 바쁘신 가운데도 본 논문을 지도하며 심사하여 주시고 깊은 가르침을 주신 조병욱 교수님, 김정규 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 그리고, 항상 따뜻한 격려와 지도를 아끼지 않으신 우리 화학공학과의 권규혁 교수님, 김선일 교수님, 송연호 교수님, 신현재 교수님, 이재욱 교수님, 차월석 교수님, 홍완해 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 제 학위과정에 있어서 늘 가까이에서 힘과 용기를 북돋아주고 세심한 배려와 진심 어린 충고를 아끼지 않았던 김려화 선배님에게 깊은 감사를 드리며, 실험실에서 같이 생활하며 서로 도움을 주었던 이고운, 주홍일 에게도 감사 드립니다. 본 논문을 준비하는데 많은 도움을 준 지용, 지순, 현 에게도 고마운 마음을 함께 전합니다.

마지막으로 끝없는 사랑과 정성으로 힘이 되어주신 식구들 특히 힘드신 와중에도 큰 사랑과 정성으로 보살펴 주시고 물심양면으로 아낌없이 도와주신 어머님께 진심으로 감사 드리며 사랑하는 아들 지훈이와 정민이 그리고 지훈아빠에게 이 하나의 작은 결실로 조금이나마 감사의 마음을 대신하고자 합니다.

2007년 11월

김 효 정

저작물 이용 허락서

학 과	생명화학공학과	학 번	20057098	과 정	석사
성 명	한글: 김 효 정 한문: 金 孝 貞 영문 : Hyo joung Kim				
주 소	광주광역시 북구 용봉동 1207-2번지				
연락처	E-MAIL : 6351502@hanmail.net				
논문제목	한글: 고정화 효소를 이용한 CSTR 과 PFR에서의 hexyl-glucoside의 합성에 관한 연구 영어: Use of enzyme coated nanofiber for the synthesis of hexylglucoside using CSTR and PFR				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 -조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의 (●) 반대 ( )

2008년 2 월 일

저작자: 김 효 정 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하