

열 응답성 Poly(N-isopropylacrylamide) 수화겔에의 Invertase의 고정화에 관한 연구

김 기 훈[†] · 신 영 조

부산대학교 고분자공학과

(1994년 1월 10일 접수)

Immobilization of Invertase in Thermoresponsible Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogel

Kee Hoon Kim[†] and Young-Jo Shin

Dept. of Polymer Science & Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received January 10, 1994)

요 약 : 열응답성을 갖는 poly(N-isopropylacrylamide) 수화겔은 온도의 변화에 따라 가역적으로 수축과 팽윤을 하는 특성을 갖는다. 이러한 온도에 민감한 수화겔에 효소를 고정화시키면 수화겔의 팽윤과 수축에 따라 효소가 그의 활성을 나타내던가 혹은 그의 활성을 나타 낼 수 없는 이론바 온도에 따른 촉매로서의 효소활성의 "switch on-off" 기능을 기대할 수 있다. 본 연구에서는 poly(N-isopropylacrylamide) 수화겔에 sucrose 분해효소인 invertase를 고정화시킨 다음 sucrose 분해 반응에서 invertase의 반응촉매로서의 온도에 따른 효소활성 조절 및 고정화된 효소의 재사용에 관하여 고찰하였다. Poly(N-isopropylacrylamide) 수화겔에 고정화된 효소를 사용하여 수화겔의 상전이 온도 이하인 30°C에서 sucrose를 분해반응시켰을 경우에는 glucose가 생성되었으나 수화겔의 상전이 온도 이상인 40°C에서 반응을 시켰을 경우에는 glucose의 생성이 정지되었다. 30°C와 40°C에서의 반복적인 반응온도의 변화에서도 효소는 그의 활성을 유지하였으며 반응 후 회수된 고정화효소는 재사용이 가능한 것을 관찰하였다.

Abstract : Poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel which has thermoresponsibility swells and shrinks reversibly as temperature changed. In this work, invertase which hydrolyzes sugar was immobilized in the poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel and its activity was studied while the hydrogel shows iterative swelling and shrinking as the temperature changed. At 30°C, which is below the LCST of hydrogel, enzyme showed its activity. As temperature increased to 40°C which is above the LCST, enzyme did not show its activity. Immobilized invertase has a good switch on-off characteristic as a function of temperature. Immobilized invertase kept its activity and could be reused after repeated temperature cycling, at 30°C and 40°C.

서 론

외부로부터의 자극에 민감한 반응을 나타내는 수화겔에 대한 많은 연구가 행해지고 있다. 이러한 수화겔들은 pH,¹ 전류,² 화학물질,³ 용매조성⁴ 및 온도⁵ 등의 자극에 대해 아주 적은 범위의 특정영역에서

반응을 나타내는 특성을 갖는다. 이러한 열가역적 팽윤과 수축의 특성을 나타내는 수화겔들은 주변환경으로 혹은 주변환경으로부터의 물질 전달 및 회수,⁶ 약전달 시스템,⁷ 분리기술,⁸ 효소^{9,10,11}나 미생물¹⁰ 등의 고정화에 사용되어지고 있다.

Poly(N-isopropylacrylamide)(pNIPAAm) 수화겔

은 온도의 변화에 따라 가역적으로 팽윤과 수축을 하는 상전이 온도(lower critical solution temperature, LCST)를 갖는 열자극성 수화겔으로써 널리 알려져 있다. 즉, 온도를 높이면 수화겔은 불투명한 상태가 되면서 수축하고 온도를 낮추면 팽윤되어 투명한 수화겔이 되는 온도의 자극에 대해 반응하는 특성을 갖는다.^{12,13} 이러한 팽윤과 수축 현상은 수화겔의 상전이 온도를 포함하는 온도의 범위에서 온도를 변화시킬때 일어나는 현상으로 pNIPAAm 수화겔은 32°C~34°C에서 상전이 온도를 갖는다.⁹ PNIPAAm의 수화겔은 기초적인 연구재료로서 뿐만 아니라 응용적 연구의 소재로서 광범위하게 이용되어진다. 이의 주된 이유는 이 수화겔이 pNIPAAm의 아미드기와 물의 상호작용에 의해 상전이점을 기준으로하여 상전이 온도 이상의 온도와 상전이 온도 이하의 온도에서 팽윤과 수축을 하는 흥미로운 특성을 갖고 있는데 기인한다. PNIPAAm에 가교제로서 N, N'-methylenebisacrylamide(MBAAm)를 첨가하면 pNIPAAm의 비닐기의 이중결합과 MBAAm의 이중결합 부분이 라디칼중합으로 가교되어 3차원 망목상의 구조를 갖게되며 MBAAm에 의해 가교된 pNIPAAm은 물을 흡수하여 팽윤은 하지만 물에 용해되지 않는 친수성 고분자겔을 형성하게 된다.¹⁰ 이 겔은 상전이 온도 이상의 온도에서는 수축을 하여 겔은 조금 딱딱하고 반투명하거나 불투명하게 되지만 온도가 상전이 온도 이하로 내려가게 될 경우에는 겔은 부드럽고 투명한 팽윤된 상태가 된다. 이러한 팽윤과 수축 현상은 아주 좁은 온도 범위내에서 일어난다.⁹

PNIPAAm 수화겔에 효소를 고정화시키면 수화겔의 팽윤과 수축에 따라 효소가 그의 활성을 나타내던가 혹은 그의 활성을 나타낼 수 없는 이른바 온도에 따른 촉매로서의 효소활성의 "switch on-off" 기능을 기대할 수 있을 뿐만 아니라 고가의 효소를 회수하여 재사용할 수 있으며 온도에 의해 효소반응을 조절할 수 있는 여러가지의 장점을 지니고 있다. 따라서 이러한 특성을 이용하여 amylase,¹⁴ β -galactosidase,¹⁵ protease¹⁶ 및 Vitamin B12¹⁷ 등의 고정화에 관한 많은 연구가 수행되어 졌다.

본 연구에서는 pNIPAAm 수화겔에 sucrose분해효소인 invertase를 고정화시킨 다음 sucrose 분해 반응에서 invertase의 반응촉매로서의 온도에 따른 기능 및 고정화된 효소의 재사용에 관하여 고찰하였다. 효소의 활성은 sucrose가 분해된 뒤 생성되는 glucose의 농도에 의해 확인하였다. 효소가 수화겔에 고정되었는지의 여부는 효소가 고정화된 수화겔을 sucrose 분해반응에 첨가시켰을 경우와 첨가시키지 않았을 때 생성되는 glucose의 양에 의해 확인하였다. 수화겔에 고정화된 효소를 사용하여 상전이 온도 이하인 30°C에서 sucrose를 분해반응시켰을 경우에는 glucose가 생성되었으나 수화겔의 상전이 온도 이상의 온도인 40°C에서 반응을 시켰을 경우에는 glucose의 생성이 정지되는 것을 관찰하였다.

실 험

시약 및 기기. N-isopropylacrylamide(NIPAAm)은 Kohjin사의 1급시약을 벤젠과 hexan용액에서 재결정하여 냉동건조시킨 다음 사용하였다. 가교제로 사용된 N, N'-methylenebisacrylamide(MBAAm)는 Fluka사의 일급시약을 사용하였으며 정제하지 않고 바로 사용하였다. 개시제로서는 ammonium persulfate(APS)를 사용하였으며 중합촉진제로서는 N, N, N', N'-tetraethylmethylenediamine(TEMED)을 사용하였다. Invertase(EC 3.2.1.26, *Candida* sp.)는 분자량 260,000인 Toyobo사의 진단시약용을 사용하였고, sucrose가 분해되어 생성되는 glucose는 Wako사의 glucose CII test kit에 의해 착색된 시료를 분광광도계를 사용하여 505 nm의 UV하에서 정량적으로 측정하였다. Micropipet에서 생성된 직경 1.45 mm의 수화겔은 팽윤과 수축비를 측정하는데 사용되었으며 이 팽윤/수축비는 5°C에서 60°C까지 시료의 온도조절이 가능한 Makroskop M420 현미경으로 측정하였다. Membrane 형태의 수화겔은 cuvette 크기로 잘라서 온도에 따른 투광도를 측정하는데 사용하였다. 투광도는 Hitachi사의 220A 분광광도계를 사용하여 수화겔을 폭 1 cm의 cuvette속에 넣은 다음

spacer로 고정시키고 분당 1°C씩 온도를 올리면서 측정하였다.

수화젤의 제조 및 효소의 고정화. 7.70 g의 NI-PAAm과 0.32 g의 MBAAm을 물에 용해하여 50 ml가 되게 한 후 50 mg의 APS와 적정량의 invertase를 첨가하여 완전히 용해된 것을 확인한 후 질소를 통과시켜 용존 산소를 제거한다. 그 뒤 반응촉진제인 TEMED 50 mg를 첨가하여 반응을 개시시킨다. Pre-gel 용액 속에서 TEMED를 균일하게 분산시킨 후 곧바로 2장의 유리판 사이와 micropipet에 pre-gel 용액을 주입시켜 효소가 고정화 된 수화젤을 형성할 때까지 약 1시간 동안 질소분위기 하의 빙속 중에 방치해 둔다. 수화젤이 형성된 것을 확인한 후 유리판 및 micropipet을 제거하고 얻어진 수화젤을 증류수로 세척하여 미반응 단량체 및 화학물과 미고정화된 효소를 제거한다. 유리판 사이에서 얻어진 수화젤은 적당한 크기로 잘라서 저온에 보관하여 온도에 따른 빛의 투과도 측정에 사용하였고 micropipet에 의해 생성된 수화젤은 온도에 따른 직경의 변화를 측정하여 팽윤과 수축비를 측정하는데 사용하였다.

고정화 효소의 온도에 의한 활성 조절. PNIPAAm 수화젤에 효소가 안정하게 고정되어 있는지의 여부를 알기 위해 0.5 mol의 sucrose용액 속에 invertase를 고정화 시킨 수화젤을 넣고 30°C에서 반응을 시키면서 5분 간격으로 시료를 채취하여 glucose의 생성량을 3회 측정한 다음 이 반응에서 수화젤을 제거 한 후 5분 간격으로 다시 시료를 3회 채취하여 glucose의 농도를 측정한다. 효소가 수화젤에 완전히 고정되어 있다면 수화젤의 존재 하에서 반응이 진행될 경우에는 glucose의 생성이 계속적으로 증가하게 되나 수화젤을 제거시켰을 경우에는 효소의 촉매 효과를 기대할 수 없기 때문에 생성되는 glucose는 일정한 농도를 유지하게 된다.

온도에 의한 효소활성의 조절은 0.5 mol의 sucrose 용액 속에 효소가 고정화 된 수화젤을 넣고 반응온도를 30°C와 40°C로 반복적으로 변화시키면서 반응을 진행하여 생성되는 glucose의 농도를 측정한다. 즉, pNIPAAm 수화젤이 상전이 온도 이하인 30

°C에서는 팽윤된 상태이기 때문에 수화젤 내부에 고정화된 효소가 그의 활성을 나타 낼 수 있지만 상전이 온도 이상인 40°C에서는 수화젤이 수축하기 때문에 효소가 그의 활성을 나타 낼 수 없게 된다.

고정화 효소의 재사용. PNIPAAm에 고정화 된 효소의 재사용 및 수회의 반복적인 온도 cycling 후의 효소의 활성을 조사하기 위해서 효소가 고정화된 수화젤을 30°C와 40°C에서 수회의 팽윤과 수축을 반복한 다음 sucrose 분해반응에 사용하였다. 한 가지의 기질 용액속에 한 가지의 고정화 효소를 사용하여 온도 cycle의 회수를 달리 하면서 sucrose가 분해되어 생성되는 glucose의 양을 정량적으로 측정한다. 그리고 온도 cycle을 거친 고정화 효소의 sucrose 분해반응 속도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 고정화 효소가 온도 cycle을 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30회씩 거치게 한 다음 같은 농도의 기질 용액 속에서 생성되는 glucose의 양을 측정하여 sucrose의 분해반응 속도를 조사하였다.

결과 및 고찰

MBAAm에 의해 가교된 pNIPAAm 수화젤의 팽윤

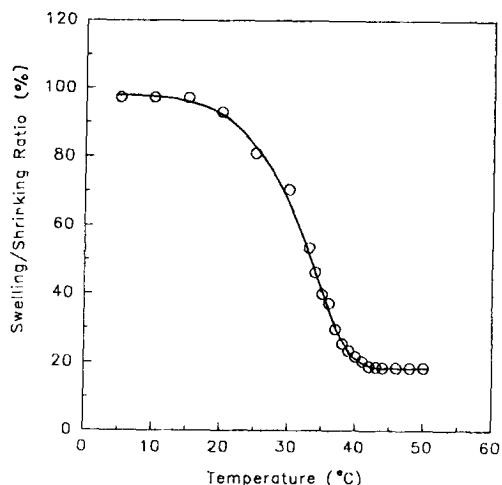


Fig. 1. Swelling/shrinking ratio of pNIPAAm hydrogel as a function of temperature.

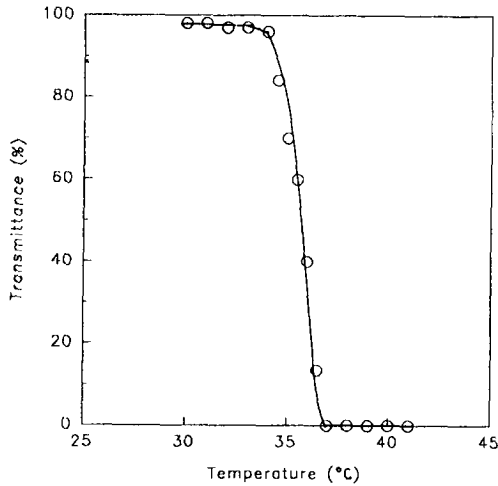


Fig. 2. Transmittance of pNIPAAm hydrogel as a function of temperature.

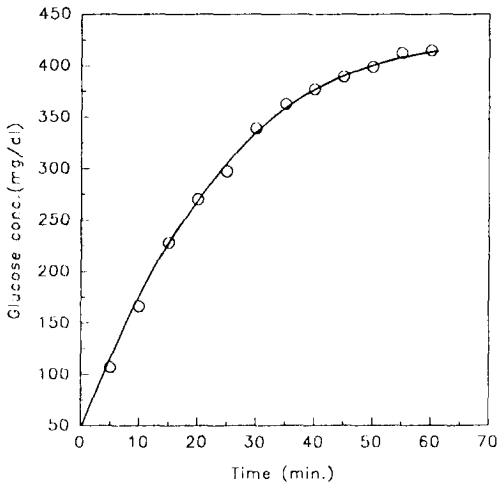


Fig. 3. Amount of produced glucose by the catalysis of immobilized invertase.

과 수축특성의 온도에 대한 의존성은 Fig. 1에 나타나 있다. 그림에서와 같이 pNIPAAm 수화겔은 상전이 온도 이하의 온도에서는 팽윤한 상태이고 상전이 온도 부근과 그 이상의 온도에서는 급격하게 수축하게 된다. 이러한 상전이 현상은 수화겔을 구성하는 물질의 친수성과 소수성의 균형에 의해서 일어나게 된다. 온도가 상승하게 되면 소수성 분자들 부근을

둘러 싸고 있던 물분자들의 탈수화가 일어나고 이 현상으로 인하여 소수성결합이 강화되어 수화겔은 수축을 하게 된다.¹⁸ 수화겔이 수축하게 되면 빛은 수화겔을 투과할 수 없게 되며 수화겔이 다시 팽윤을 하게 되면 빛은 수화겔을 투과할 수 있게 된다. 수화겔을 통한 투광도의 변화는 온도 상승에 의한 고분자의 침전과 수화겔 고분자 농도의 불균일성으로 설명되어 진다.¹⁹ 즉, 온도상승에 의한 탈수화가 일어날 때 수화겔의 표면에서부터 탈수화가 일어난다. 따라서 수화겔 내부와 외부의 고분자 사슬 농도의 불균일성에 의해 투광도를 떨어지게 한다. 온도에 따른 빛의 수화겔에 대한 505 nm에서의 투광도는 Fig. 2에 나타나 있다. Fig. 3은 수화겔에 고정화된 효소가 촉매로서 sucrose를 분해하여 glucose를 생성하는 경향을 나타내고 있다.

Invertase가 pNIPAAm 수화겔에 완전하게 고정화 되어 있는지의 여부에 대한 실험은 Fig. 4에 나타나 있다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이 효소가 고정화된 수화겔을 반응에 첨가시켰을 경우에는 촉매의 영향으로 glucose가 생성되었으나 효소가 고정화된 수화겔을 반응에서 제거시켰을 경우에는 glucose가 전혀 생성 되지 않았다. 그리고 기질 용액 중에도 수화겔

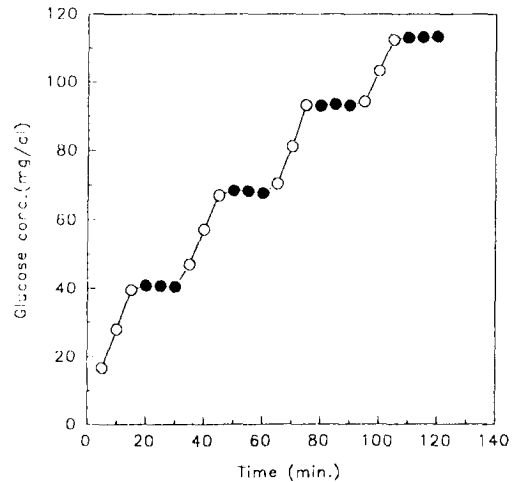


Fig. 4. Effect of immobilized invertase on the hydrolysis of sucrose (○ : with and ● : without enzyme immobilized hydrogel).

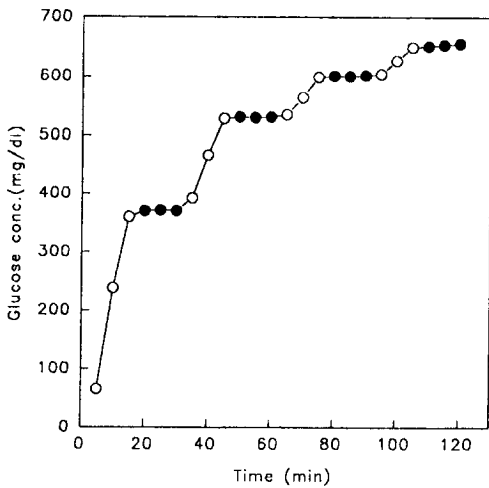


Fig. 5. Effect of temperature on the hydrolysis of sucrose by immobilized invertase(○ : 30°C, ● : 40°C).

에서 떨어져 나온 잔류 효소가 존재하지 않은 것은 일정시간 경과 후 기질 용액 속의 glucose 농도를 측정하여 알 수 있다. Invertase의 50% 정도는 탄수화물로 구성되어 있기 때문에 이 탄수화물이 수화겔의 소수성 부분과의 소수성결합에 의해 안정하게 고정화 되어 있다.

PNIPAAm 수화겔에 고정화된 invertase 활성의 온도 의존성은 Fig. 5에 나타나 있다. 열응답성 고분자로써의 pNIPAAm은 고정화 효소반응을 일으킬 수 있는 반응장으로 제공되며 pNIPAAm 수화겔의 내부에 고정화된 효소 반응의 개시 및 정지는 온도에 의해 가역적으로 제어할 수 있다. PNIPAAm 수화겔이 상전이 온도 이하의 온도에서는 팽윤 특성을 갖고 있기 때문에 팽윤된 수화겔의 pore를 통하여 반응기질이 수화겔 속에 고정화 된 효소까지 투과되어 분해반응을 일으킨다. 즉, 반응온도가 상전이 온도 이하인 30°C일 때는 sucrose의 분해반응이 계속되어 glucose가 생성된다. 일정시간 경과 후 상전이 온도 이상인 40°C에서 고정화 효소반응을 개시하면 수화겔은 수축되어 있기 때문에 기질이 수화겔 안으로 투과되는 것이 억제되어 반응은 일어나지 않는다. 다시 반응액의 온도를 30°C로 하였을 경우에 수화겔

은 팽윤하여 기질이 수화겔의 내부로 투과되어 고정화 효소반응이 개시되기 때문에 glucose가 생성된다. 이러한 반복적인 온도 cycling에 의한 고정화 효소반응의 개시 및 정지는 온도에 의해 가역적으로 제어할 수 있다.

PNIPAAm 수화겔에 고정화된 효소는 1회 반응 이후에도 효소의 회수가 가능하기 때문에 효소의 재사용이 가능하다. Fig. 6에서는 30°C와 40°C의 온도 cycling을 거친 다음 효소가 sucrose를 분해할 때 glucose가 생성되는 경향을 나타내고 있다. 온도 cycling에 의한 고정화 효소반응은 반응을 30°C에서만 하였을 경우에 생성되는 glucose의 경향(Fig. 3)과 거의 일치하는 경향을 나타내 주고 있다. 이는 온도 cycling을 거친 뒤에도 효소는 온도 변화에 영향을 받지 않고 pNIPAAm 수화겔에 고정화되어 있으며 그 활성을 계속 유지하고 있는 것이다. Fig. 7과 Fig. 8에서는 30°C와 40°C의 온도 cycling을 거친 다음 효소의 sucrose 분해 경향 및 분해 반응속도를 각각 나타내고 있다. Fig. 7에서는 고정화 효소가 온도 cycle의 회수가 많아 질 수록 그 sucrose 분해능은 점점 감소하지만 어느 정도는 sucrose의 분해

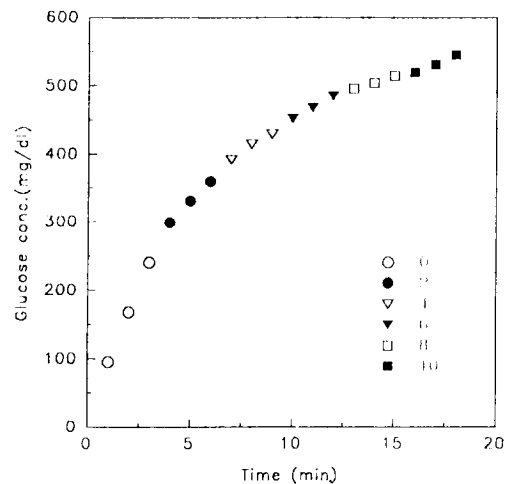


Fig. 6. Effect of iterative temperature cycling on the catalysis of sucrose(○ : 0, ● : 2, ▽ : 4, ▼ : 6, □ : 8, ■ : 10 times of temperature cycling).

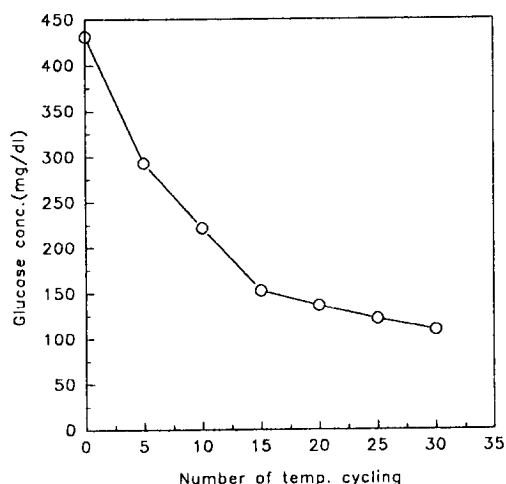


Fig. 7. Effect of temperature on the enzyme activity of immobilized invertase in the hydrolysis of sucrose.

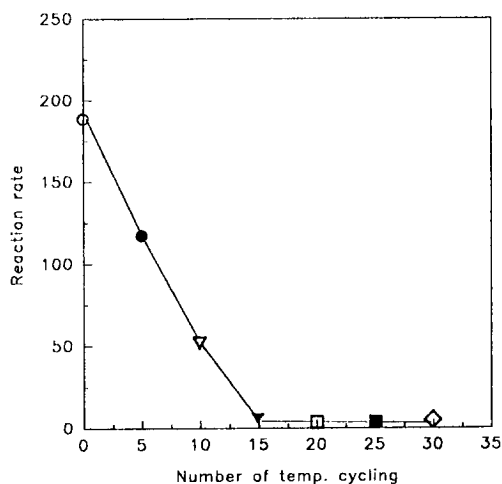


Fig. 8. Reaction rate of immobilized invertase after iterative temperature cycling(○ : 0, ● : 5, ▽ : 10, ▼ : 15, □ : 20, ■ : 25, ◆ : 30 times of temperature cycling).

반응에 활성을 나타내고 있는 것을 알 수 있다. Fig. 8에서는 같은 농도의 기질을 사용하였을 때 온도 cycle이 고정화 효소의 촉매효과에 미치는 영향을 나타내고 있다. Sucrose의 분해반응 속도는 30°C와 40°C의 온도 cycling이 10회 정도가 될 때까지는 어느 정

도를 유지하다가 15회 이상을 초과하게 되면 반응속도는 현저하게 떨어지게 된다.

일반적으로 분말상태의 효소는 저온에서는 장기간 동안 저장이 가능하나 용해된 상태에서는 그의 활성을 장기간 동안 지속하기가 어렵다. 본 실험에 사용된 효소는 약 8개월 간 수화젤에 고정된 상태 하에서 용액 중에서 냉장 보관하였다. 효소를 수화젤에 고정화하면 효소가 용해된 상태에서도 그의 활성을 유지하고 있기 때문에 용해된 효소의 저장 문제에 있어서도 큰 장점을 얻을 수가 있다.

결 론

LCST를 갖는 수화젤에 고정화된 효소는 온도에 의해 그의 활성을 조절할 수 있는 이른바 "switch on-off"의 효소기능을 나타낸다. 열 응답 특성을 갖는 poly(N-isopropylacrylamide) 수화젤에 sucrose 분해효소인 invertase를 고정화시켜 invertase의 활성 및 고정화 효소의 재사용에 관한 본 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 수화젤의 상전이 온도 이하의 온도범위에서는 고정화된 효소가 그의 활성을 나타내지만, 상전이 온도 이상의 온도범위에서는 효소는 그의 활성을 나타낼 수가 없게 된다. 즉, 고정화 효소의 온도에 의한 "switch on-off" 기능이 가능하다.
2. 수화젤이 상전이 온도를 기준으로 하여 온도의 cycle에 의한 반복적인 팽윤과 수축을 거듭함에 따라 고정화 된 효소의 활성도는 다소 감소하는 경향이 있지만 효소는 그의 활성은 지니고 있다. 그리고, 고정화된 효소는 분해반응 후 회수하여 재사용이 가능하다.
3. 고정화된 효소는 효소가 용해된 상태에서도 그의 활성을 유지하며 장기간 동안의 저장이 가능하다.

참 고 문 헌

1. R. A. Siegel and B. A. Firestone, *Macromolecules*, **21**, 3254 (1988).

2. T. Tanaka, I. Nishio, S. T. Sung, and S. U-Nishio, *Science*, **218**, 467 (1982).
3. K. Ishihara, M. Kobayashi, N. Ishimaru, and I. Shinohara, *Polym. J.*, **16**, 625 (1984).
4. T. Tanaka, *Phys. Rev. Lett.*, **40**, 820 (1978).
5. Y. H. Bae, T. Okano, and S. W. Kim, *J. Polym. Sci.*, **28**, 923 (1990).
6. X. Huang, T. Akehata, H. Unno, and O. Hirasa, *Biotechnology and Bioengineering*, **34**, 102 (1989).
7. A. S. Hoffman, Conventional and Environmentally-Sensitive Hydrogels for Medical and Industrial Uses, Polymer Gels, Plenum Press, New York, 1991.
8. S. Sakohara, F. Muramoto, and S. Sakai, Separation of Organic Solvent/Water Mixtures by Acrylamide Gel Membrane, Polymer Gels, Plenum Press, New York, 1991.
9. M. Heskins and J. E. Guillet, *J. Macromol. Sci.-Chem.*, **A2**(8), 1441-1455 (1986).
10. A. S. Hoffman, A. Afrassiabi, and L. C. Dong, *Journal of Controlled Release*, **4**, 213-222 (1986).
11. T. H. Maugh II, *Science*, **223**, 474-476 (1984).
12. S. Katayama, and A. Ohata, *Macromol.*, **18**, 2782 (1985).
13. Y. Hirokawa and T. Tanaka, *J. Chem. Phys.*, **81**, 6379-6380 (1984).
14. K. Hoshino and M. Taniguchi, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **22**, 54-59 (1989).
15. T. G. Park and A. S. Hoffman, *Applied Biotechnology and Biotechnology*, **19**, 1 (1988).
16. M. Fujimura, T. Mori, and T. Tosa, *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, April (1987).
17. A. Afrassiabi, A. S. Hoffman and L. A. Cadwell, *Journal of Membrane Science*, **33**, 191-200 (1987).
18. K. Otake, H. inomata, M. Konno, and S. Saito, *Macromolecules*, **23**, 283 (1990).
19. H. Katano, K. Sanui, N. Ogata, T. Okano, and Y. Sakurai, *Polymer Journal*, **23**, 1179 (1991).