

N-Isopropylacrylamide/Acrylamide 공중합수화겔의 상전이현상과 이 수화겔에 고정화된 Invertase의 효소 활성에 관한 연구

김 기 훈[†] · 신 영 조

부산대학교 고분자공학과

(1994년 8월 31일 접수)

Phase Transition Behavior of N-Isopropylacrylamide/ Acrylamide Copolymer Hydrogel and Its Effects on Enzymatic Activity of Immobilized Invertase

KeeHoon Kim[†] and Young-Jo Shin

Dept. of Polymer Science and Engineering,

Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received August 31, 1994)

요 약 : N-Isopropylacrylamide와 친수성 공단량체인 acrylamide에 가교제를 사용하여 자유 라디칼 중합반응에 의한 공중합수화겔을 제조하고, 이 공중합수화겔의 온도변화에 따른 팽윤/수축비, 함수율, 투광도 및 상전이온도의 변화를 조사하였다. 그리고, N-isopropylacrylamide/acrylamide 공중합수화겔에 sucrose 분해효소인 invertase를 고정화하여 온도변화에 대한 효소활성의 특성에 대하여 연구하였다. Acrylamide의 함량이 증가할수록 공중합수화겔의 팽윤/수축비, 함수율 및 상전이온도는 증가하였다. 공중합수화겔의 팽윤/수축비는 온도가 20, 30, 40℃ 일때 7, 20, 80% 까지 각각 증가하였고, 30℃에서의 함수율은 공단량체의 함량이 3, 5, 7, 10%일때 11, 19, 22, 44% 씩 각각 증가하였다. N-Isopropylacrylamide의 상전이온도는 32~34℃이지만 공단량체의 함량이 증가할수록 공중합수화겔의 상전이온도는 증가하여 53℃ 까지 이르게 된다. 공중합수화겔에 고정화된 invertase의 활성은 공중합수화겔의 각각의 상전이온도에 따라 효소활성의 “switch on-off” 현상을 나타내고 있다.

Abstract : N-Isopropylacrylamide/acrylamide copolymer hydrogels were prepared with cross-linking agent by free radical polymerization. Swelling/shrinking ratio, amount of water uptake, transmittance, and the change of phase transition temperature of copolymer hydrogel were studied. Invertase, sucrose hydrolase, was immobilized within N-isopropylacrylamide/acrylamide copolymer hydrogels with different content of acrylamide and its enzymatic activities as a function of temperature were also studied. As the acrylamide content increased, swelling/shrinking ratio, amount of water uptake, and the phase transition temperature were increased. Swelling/shrinking ratios of copolymer hydrogel were increased up to 7, 20, 80% when the temperatures were 20, 30 and 40℃, respectively. Amounts of water uptake by copolymer hydrogel at 30℃, were increased as much as 11, 19, 22 and 44% when the contents of acrylamide was 3, 5, 7 and 10%, respectively. Phase transition temperature of N-isopropylacrylamide hydrogel is 32~34℃. As the content of acrylamide increased, phase transition temperature of copolymer hydrogel was increased up to 53℃. Enzymatic activities

of invertase immobilized within copolymer hydrogels with different content of acrylamide were switched on and off by the change of reaction temperature below and above their respective phase transition temperature of copolymer hydrogel.

Keywords : Thermoresponsive, hydrogel, enzyme immobilization.

서 론

Poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAAm) 수화겔 혹은 이의 공중합수화겔은 그들 각각의 상전이온도(Lower Critical Solution Temperature, LCST)를 기준으로하여 온도를 올리거나 내릴 때 수화겔이 수축하거나 팽윤되는 상전이현상을 나타낸다. 공중합수화겔의 상전이현상 즉, 팽윤/수축비, 투광도 및 상전이온도 등은 수화겔의 공단량체의 종류,¹ 공단량체의 비,^{2,3} 가교제의 농도⁴ 등에 의해 조절할 수 있다. 공단량체가 더욱 소수성일 경우, 상전이온도는 pNIPAAm 수화겔의 상전이온도보다 낮아지며, 공단량체가 더욱 친수성을 띠는 경우, 공중합수화겔의 상전이온도는 pNIPAAm 수화겔의 상전이온도보다 더욱 높아지게 된다.⁵ 제조된 수화겔은 상전이온도 혹은 그 이상의 온도에 이를 때 아주 좁은 온도 범위 내에서 수축하게 되며, 온도를 내리게 되면 다시 팽윤하는 특성을 갖고 있다. 수화겔의 온도변화에 따른 팽윤/수축 특성을 이용하여 수화겔에 이미 흡착되었거나 고정화된 물질을 특정 온도에서 방출⁶⁻⁹하는데 이용될 수 있으며, 특정 물질의 어떤 특정 온도에서의 흡착에 의한 물질의 분리¹⁰⁻¹²에도 이용할 수 있다.

상전이현상을 나타내는 수화겔에 고정화 된 효소는 산업적인 응용 뿐만 아니라 질병의 진단, 분석 등의 의료용¹³으로도 많이 응용되고 있다. 상전이현상을 나타내는 수화겔에 고정화된 효소의 활성은 온도에 의해 조절할 수가 있다. 즉, 수화겔의 상전이온도보다 낮은 온도 범위에서는 효소가 그의 활성을 유지하지만, 온도가 수화겔의 상전이온도 보다 높은 영역에서는 효소가 그의 효소활성을 나타낼 수 없게 된다. 그러나 온도를 내릴 경우 효소가

다시 활성을 나타내는 이른바, 온도에 의한 효소활성의 “switch on-off” 기능은 효소를 고정화하고 있는 수화겔이 온도의 변화에 따라 수축과 팽윤을 하는 특성에 기인한다. 즉, 수화겔의 상전이온도 보다 낮은 온도 영역에서는 수화겔이 팽윤된 상태로 있기 때문에 기질이 수화겔의 팽윤된 pore를 통하여 효소까지 도달 하여 효소반응을 일으킬 수 있지만, 온도가 상승하여 수화겔의 상전이온도 이상의 온도영역에 도달하게 되면 수화겔은 수축하기 때문에 수축된 수화겔의 pore를 통한 효소반응은 일어날 수가 없게 된다. 고정화 효소는 온도의 변화에 따른 효소활성의 조절 뿐만 아니라 효소를 회수하여 재사용할 수 있는 장점이 있기 때문에 많은 연구가 행해지고 있다.^{9,14-16}

본 실험에서는 pNIPAAm/AAm 공중합수화겔을 제조하고, 이 공중합수화겔의 온도에 따른 팽윤/수축비, 함수량, 투광도 및 상전이온도의 변화 등에 관해 연구하였다. 그리고, pNIPAAm/AAm 공중합수화겔에 sucrose 분해효소인 invertase를 고정화시키고, 공중합수화겔의 공중합체의 조성에 따른 상전이온도의 변화와 이에 따른 효소활성의 특성에 대하여 연구하였다.

실 험

시약 및 기기. N-Isopropylacrylamide(NIPAAm)는 Kohjin사의 1급 시약을 벤젠과 헥산용액에서 재결정하여 냉동건조시킨 다음 사용하였으며, acrylamide(AAm)는 Fluka사의 일급시약을 정제하여 사용하였다. 가교제로 사용된 N,N'-methylenebisacrylamide(MBAAm)와 개시제인 ammonium persulfate(APS)는 Fluka사의 일급 시

약을 사용하였으며, 중합촉진제로서는 Wako사의 N,N,N',N' - tetraethylmethylenediamine(TEMED)을 사용하였다. Invertase(EC 3.2.1.26, Candida sp.)는 분자량 260,000인 Toyobo사의 진단 시약을 사용하였으며, sucrose 분해반응 뒤 생성되는 glucose는 Wako사의 glucose CII test kit를 사용하여 정량적으로 측정하였다. 수화젤의 팽윤/수축비는 5℃에서 60℃까지 시료의 온도 조절이 가능한 Makroskop M420 현미경을 사용하여 측정하였다. 공중합수화젤의 투광도는 Hitachi사의 220A 분광광도계를 사용하여 1분당 1℃씩 승온하면서 측정하였다.

공중합수화젤의 제조 및 효소의 고정화. N-Isopropylacrylamide를 주단량체로 하여 acrylamide를 0, 3, 5, 7, 10%씩 첨가하여 수화젤을 제조하였다.

본 실험에서는 전체 단량체의 양을 7.70g으로 고정하였다. 각각 다른 단량체 조성의 NIPAAm과 AAm을 물에 용해 시키고, 0.32g의 MBAAm을 첨가하여 물에 완전하게 용해하여 전체 용액의 양이 50ml가 되게 한 후 50mg의 APS와 적정량의 invertase를 첨가하고 질소를 통과시켜 용존 산소를 제거하여 pre-gel용액을 만든다. 그리고, 반응 촉진제인 TEMED 50mg을 첨가하여 반응을 개시시킨다. Pre-gel용액 속에서 TEMED를 균일하게 분산시킨 후 곧바로 2장의 유리판 사이와 micropipet에 pre-gel용액을 주입시켜 효소가 고정화 된 수화젤을 형성할 때까지 약 1시간 동안 질소 분위기 하에서 0~1℃의 빙속 중에 방치해 둔다. 수화젤이 형성된 것을 확인한 후 유리판 및 micropipet을 제거하고 얻어진 수화젤을 증류수로 세척하여 미반응 단량체 및 화합물과 미고정화된 효소를 제거한다. 유리판 사이에서 얻어진 공중합수화젤은 적당 크기로 잘라서 저온에 보관하여 함수율, 투광도 변화 및 온도변화에 따른 효소활성의 측정에 사용하였으며, micropipet에 의해 생성된 공중합수화젤은 온도에 따른 직경의 변화를 측정하여 팽윤과 수축비를 측정하는데 사용하였다.

공중합수화젤의 상전이 특성 측정. Micropipet에서 생성된 공중합수화젤의 직경을 5℃에서 60℃까지 시료의 온도조절이 가능한 Makroskop M420 현미경으로 측정하고, 측정된 직경을 수화젤의 부피로 환산하여 팽윤과 수축비를 결정하였다. 공중합수화젤의 함수율은 각각 다른 단량체 조성의 공중합수화젤을 건조시킨 다음 함수율을 측정할려는 온도에서 평형에 도달할 수 있도록 충분한 시간동안 방치한 뒤 중량법에 의해 측정하였다. 공중합수화젤의 투광도는 유리판 사이에서 제조된 공중합수화젤을 cuvette속에 넣고 spacer로 고정시킨 후, 1분당 1℃씩 올리면서 505nm에서 측정하였다.

고정화 효소의 온도에 따른 활성 측정. PNIPAAm/AAm 공중합수화젤에 고정화된 효소의 활성을 알아보기 위하여 sucrose의 분해반응온도를 10, 20, 30, 40, 50, 60℃로 변화시키면서 공단량체의 함량이 각각 다른 공중합수화젤에 고정화된 효소의 sucrose 분해반응속도를 측정하였다. 0.5mol의 sucrose수용액에 invertase가 고정화된 공중합수화젤을 넣고 각 반응온도에서 반응을 시키면서 5분 간격으로 시료를 3회 채취하여 sucrose가 분해하여 생성된 glucose의 양으로부터 분해반응속도를 측정하였다.

온도에 의한 효소활성의 조절은 0.5mol의 sucrose 용액 속에 invertase를 고정화한 공중합수화젤을 넣고 상전이온도를 기준으로 하여 그 이상의 온도와 그 이하의 온도를 왕복하는 반복적인 온도 변화 속에서 측정하였다. 즉, 공단량체의 함량에 따라 상전이온도가 각각 다른 공중합수화젤이 팽윤된 상태로 있는 상전이 온도 이하의 반응온도에서 sucrose의 분해반응속도를 3회 측정한 후, 반응온도를 상전이온도 이상으로 올려서 공중합수화젤이 수축한 상태에서 sucrose의 분해반응 속도를 3회 측정하였다. 그리고 반응온도를 상전이온도 이하로 내리는 반복적인 온도변화의 과정을 통하여 온도변화에 의한 효소활성을 측정하였다. 각 공중합수화젤이 상전이온도 이하에서는 공중합수화젤 내부에

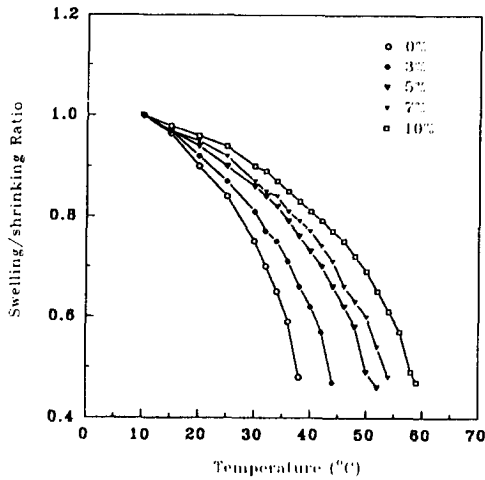


Fig. 1. Swelling/shrinking ratio of copolymer hydrogels which have different content of acrylamide as a function of temperature.

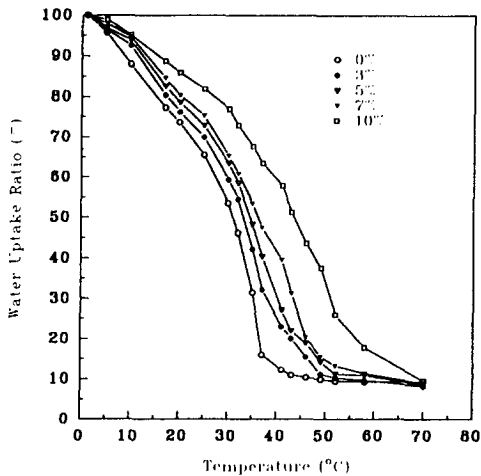


Fig. 2. Amount of water uptake by copolymer hydrogel as a function of temperature.

고정화된 효소가 그의 활성을 나타 낼 수 있지만 상전이온도 이상에서는 공중합수화겔이 수축하기 때문에 효소가 그의 활성을 나타 낼 수 없게 된다.

결과 및 고찰

공중합수화겔의 팽윤/수축특성. 공중합수화겔의

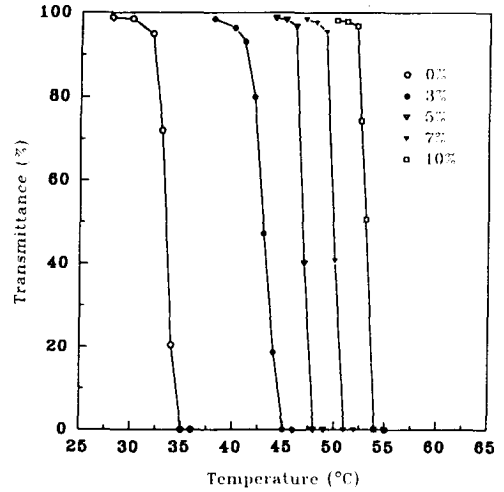


Fig. 3. Effect of temperature on the transmittance of copolymer hydrogel of different content of acrylamide.

팽윤/수축비, 함수율, 투광도 및 상전이온도는 고분자의 친수성, 가교제의 성질과 함량 및 공단량체의 조성 등에 따라 달라지게 된다. 공단량체의 조성이 각각 다른 공중합수화겔의 팽윤/수축비의 온도 의존성은 Fig. 1에 나타나 있다. 저온에서는 공중합수화겔이 팽윤된 상태로 평형을 유지하고 있다가 온도를 상승시키면 공중합수화겔이 수축하여 팽윤/수축비는 감소하게 된다. 온도가 상승하면 공중합수화겔의 주위에 있던 물분자들이 탈수되면서 공중합수화겔의 소수성결합이 강화되어 공중합수화겔은 수축하게 된다. 친수성 단량체인 AAm이 공중합되어 있을 경우, 이 친수성 공단량체가 공중합수화겔의 소수성결합을 약화시키며 따라서, 온도의 상승에 따른 물분자의 탈수화도 지연되게 된다. 친수성 공단량체인 AAm의 함량이 증가할수록 일정한 온도에서 공중합수화겔의 수축이 지연되며 팽윤/수축비는 커지게 된다. 공중합수화겔이 수분을 흡수하게 되는 것은 공중합수화겔 내부와 외부와의 삼투압 차이에 의해서 일어나게 된다. 온도가 상승하면 공중합수화겔은 수축을하게 되고 따라서 함수율은 감소하게 된다. 온도의 변화에 따른 공중합수화겔의 함수율에 관한 그림은 Fig. 2에 나타나 있

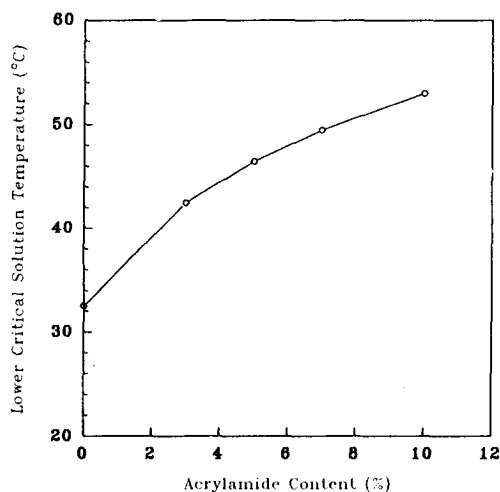


Fig. 4. Changes of lower critical solution temperature of copolymer hydrogel as a function of the content of acrylamide.

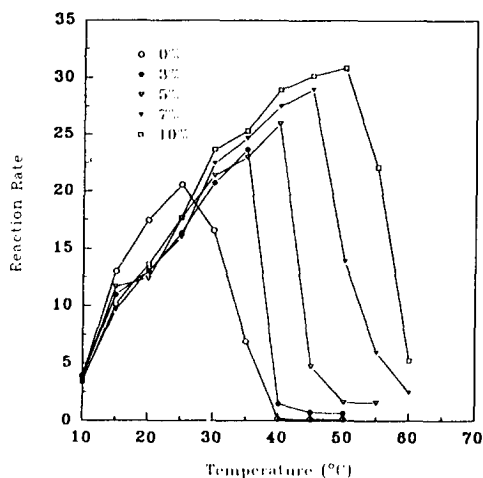


Fig. 5. Reaction rate of sucrose hydrolysis by invertase immobilized within pNIPAAm/AAm copolymer hydrogel as a function of temperature.

다. 친수성 공단량체의 비율이 커질수록 함수율은 증가한다. 공중합수화겔의 온도에 따른 투광도의 변화는 Fig. 3에 나타나 있다. 공중합수화겔이 상전이온도 이하에서는 팽윤되어 투명한 상태에 있다가 상전이온도 이상에서는 수축되어 빛을 투과시킬

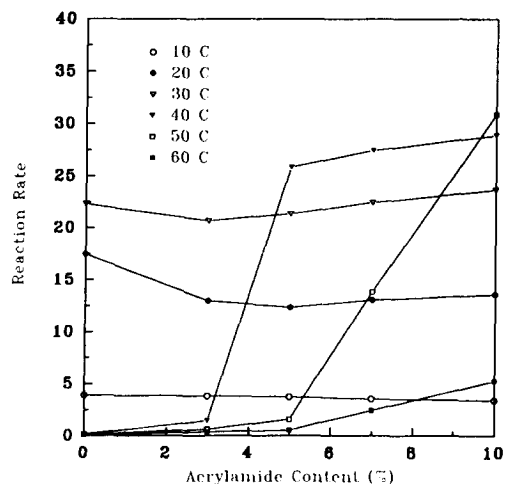


Fig. 6. Effect of acrylamide content on the reaction rate of sucrose hydrolysis by invertase immobilized within pNIPAAm/AAm copolymer hydrogel.

수가 없게 된다. AAm의 함량이 커질수록 상전이온도가 높아지며 공중합수화겔이 수축되어 빛을 투과시킬 수 없는 온도 영역은 점점 높아지게 된다. 공중합수화겔을 구성하는 공단량체가 소수성일 경우에는 상전이온도가 낮아지지만, 공단량체가 친수성일 경우에는 상전이온도가 높아진다. PNIPAAm 수화겔의 상전이온도는 32~34°C로 알려져 있다. 친수성 공단량체인 AAm의 함량이 높아질수록 공중합수화겔의 상전이온도는 높아지지만, AAm의 함량이 15% 이상일 경우에는 공중합수화겔의 상전이현상을 관찰할 수가 없게 되었다. AAm의 공단량체 비율에 따른 상전이온도의 변화는 Fig. 4에 나타나 있다.

고정화된 효소의 온도에 의한 활성 측정. 상전이현상을 나타내는 공중합수화겔에 고정화된 효소는 상전이온도의 변화에 따라 효소가 그의 활성을 나타내던가 나타낼 수 없게 된다. 즉, 상전이온도 이하에서는 공중합수화겔이 팽윤된 상태로 존재하고 있기 때문에 기질이 공중합수화겔의 pore를 통하여 효소까지 도달할 수 있어서 효소반응이 일어날 수 있다. 그러나, 공중합수화겔의 상전이온도 이상의 온도에서는 공중합수화겔이 수축하여 pore

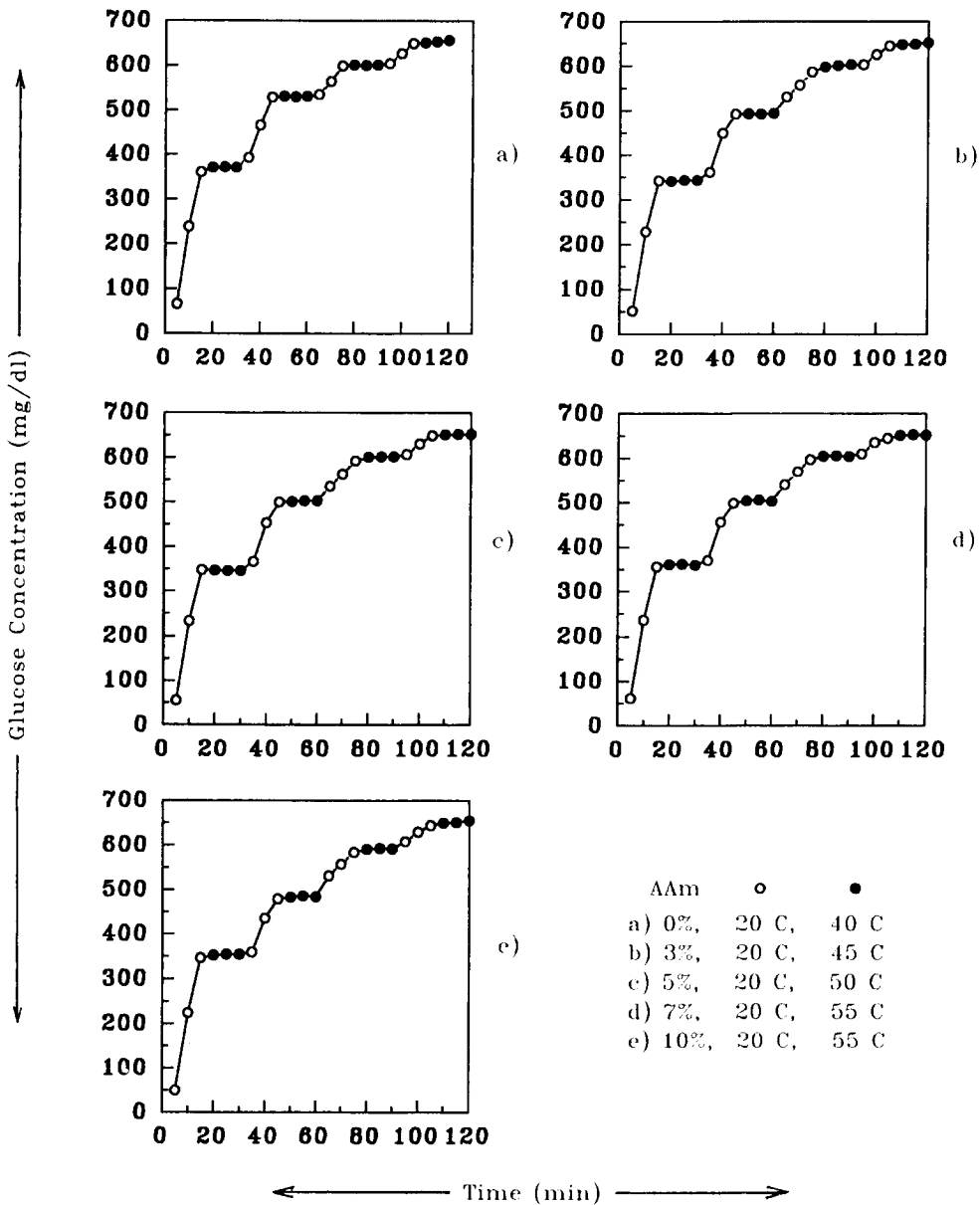


Fig. 7. Control of enzyme activity of immobilized invertase by temperatures below and above the LCST of co-polymer hydrogel.

를 통하여 기질이 효소까지 도달 할 수가 없게 된다. 따라서 효소반응은 일어날 수 없게 되는 것이다. 그러므로 고정화된 효소촉매반응의 활성과 비활성을 상전이온도를 기준으로하여 조절할 수가 있

는 것이다. 공단량체의 조성이 각각 다른 공중합수화겔의 온도 변화에 따른 효소의 촉매반응속도를 Fig. 5에서 나타내고 있다. 효소의 촉매반응속도는 온도가 상승하면 증가한다. 공단량체의 조성이 각

각 다른 공중합수화젤에 고정화된 효소는 각 공중합수화젤의 상전이온도 이하에서는 활성을 나타내지 않지만, 상전이온도 이상에서는 효소의 활성은 나타나지 않는다. 효소의 활성이 점점 높은 온도 영역으로 이동하는 것은 공단량체의 함량이 증가할수록 상전이온도가 높아지게 되며 공중합수화젤의 수축 현상이 점점 높은 온도에서 일어나기 때문이다. Fig. 6에서는 공단량체의 조성이 각각 다른 공중합수화젤의 공단량체의 조성에 따른 고정화 효소반응의 속도를 나타내고 있다. 온도의 변화에 따른 효소활성의 조절은 Fig. 7에 나타나 있다. 공단량체의 함량에 따라 각각 다른 공중합수화젤의 상전이온도를 기준으로 하여 그온도 이상과 그 온도 이하에서 반응을 할 때, 상전이온도 이하에서는 효소가 그의 활성을 나타내지만 상전이온도 이상에서는 효소가 그의 활성을 나타내지 못하여 sucrose가 분해되어 생성되는 glucose의 양이 일정하게 된다. 이러한 반응에서 온도를 다시 내리면 효소는 활성을 나타내어 glucose는 다시 생성되게 된다.

결 론

상전이현상을 나타내는 수화젤에 고정화된 효소는 상전이온도를 기준으로 하는 온도변화에 의해 효소활성의 조절이 가능하다. 친수성 공단량체인 AAm을 사용하여 pNIPAAm/AAm 공중합수화젤을 제조하고, 이 공중합수화젤의 상전이 특성 및 이에 고정화된 효소의 온도에 의한 활성조절에 관하여 연구하여 아래의 결론을 얻을 수가 있었다.

1. 친수성 공단량체, AAm의 단량체 비율이 커질수록 공중합수화젤의 상전이온도는 점점 높아졌다. PNIPAAm의 상전이온도는 32~34℃이지만, AAm을 3, 5, 7, 10%씩 공단량체로 사용하였을 경우 상전이온도는 43, 47, 50, 53℃까지 각각 높아졌다. 그러나, AAm의 함량이 15% 이상이 되면 공중합수화젤의 상전이현상은 더 이상 관찰할 수가 없었다.

2. AAm의 단량체 비율이 커질수록 공중합수화

젤의 함수율은 높아졌으며, 공중합수화젤의 투광도 감소 현상은 점점 높은 온도 영역으로 전이되고 있다.

3. 공중합수화젤에 고정화된 invertase의 활성은 sucrose의 분해반응온도를 변화시킴으로써 그의 조절이 가능하였다. 즉, 공중합수화젤들이 갖는 그들 각각의 상전이온도 이하에서는 효소가 그의 활성을 나타내지만, 상전이온도 이상에서는 효소가 그의 활성을 나타낼 수가 없게 된다.

참 고 문 헌

1. A. S. Hoffman, "Polymers in Medicine III", p. 161, Elsevier Sci. Publishers, 1988.
2. Y. H. Bae, T. Okano, and S. W. Kim, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **28**, 923 (1990).
3. L. D. Taylor and L. D. Cerenkowski, *J. Polym. Sci.*, **13**, 2551 (1975).
4. M. Ilavsky and J. Hrouz, *Polym. Bull.*, **8**, 387 (1982).
5. F. Herman, Y. H. Bae, F. Jan, and S. W. Kim, *Macromolecules*, **26**, 2496 (1993).
6. Y. H. Bae, T. Okano, R. Hsu, and S. W. Kim, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **8**, 481 (1987).
7. L. C. Dong and A. S. Hoffman, *J. Controlled Release*, **13**, 21 (1990).
8. H. Katono, K. Sanui, N. Ogata, T. Okano, and Y. Sakurai, *Polym. J.*, **23**, 1179 (1991).
9. A. Afrassibi, A. S. Hoffman, and L. A. Cadwell, *J. Memb. Sci.*, **33**, 191, (1987).
10. R. E. S. Freitas and E. L. Cussler, *Chem. Eng. Sci.*, **42**, 97 (1987).
11. F. Herman, Y. H. Bae, F. Jan, and S. W. Kim, *J. Membr. Sci.*, **64**, 283 (1991).
12. A. S. Hoffman, A. Afrassibi, and L. C. Dong, *J. of Controlled Release*, **4**, 213 (1986).
13. N. Monji and A. S. Hoffman, *Appl. Biochem. Biotech.*, **14**, 107(1987).
14. K. Hoshino and M. Taniguchi, *J. of Chem. Engin. (Japan)*, **22**, 54 (1989).
15. T. G. Park and A. S. Hoffman, *Appl. Biochem. Biocech.*, **19**, 1 (1988).
16. M. Fujimura, T. Mori, and T. Tosa, *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, April (1987).