

폴리에틸렌글리콜이 그래프트된 폴리우레탄 막에 α -아밀라제의 고정화

김성호[†] · 하정현

조선대학교 약학대학
(1991년 8월 7일 접수)

Immobilization of α -amylase on Polyethylene Glycol Grafted Polyurethane Film

Sung-Ho Kim and Chung-Hun Ha

College of Pharmacy, Chosun University, Kwang Ju, 501-759, Korea
(Received August 7, 1991)

α -amylase was immobilized on the surface of polyethylene glycol(M.W. 2000) grafted polyurethane film using diisocyanate in an attempt to develop enzyme immobilized polymeric materials. The surface morphology of the modified polyurethane film was examined by SEM. Effects of pH and temperature on the activity of the immobilized α -amylase were investigated. The optimal pH range of the activity was 7.0~7.5. The immobilized α -amylase demonstrated high thermal stability and maintained consistent activity during long-term storage.

Keywords— α -amylase, immobilization, PEG grafted polyurethane, enzyme activity.

특이성과 효율성을 가지고 있는 많은 효소들은 낮은 안정성과 높은 가격 때문에 의학적 및 상업적인 목적으로 이용하기에는 많은 제한이 따르고 있다. 일반적으로 효소는 용액에서 불안정 하여 짧은 시간에 활성이 소실되며 특히 질병치료에 응용되는 효소들은 면역반응 감소를 유도한다.¹⁾ 이에, 효소의 안정성을 높이는 수단으로서 고분자 지지체에 가용성 효소를 고정화 시키면 효소활성이 잔류하여 수용액 상에서도 안정성을 유지하게 된다.²⁾ 효소의 고정화에는 고분자에 효소를 흡착시키거나 또는 가교제를 이용한 공유결합, 포획, 마이크로캡슐화 등의 방법이³⁾ 있다.

폴리우레탄(Biomer)은 불용성 고분자 지지체로서 의료용 고분자 재료에서 많이 활용되고 있으며 인공장기 등이나 많은 혈액 접촉장치에 응용되고 있다.

폴리우레탄의 조성을 변화시킴으로서 다양한 물성을 가지는 융합체를 얻을 수 있으며⁴⁾ 이들의 표면에 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 그래프트시켜 친수화 함으로써 생체적합성이 우수한 폴리우레탄을 얻을 수 있다.⁵⁾

본 연구에서는 α -아밀라제(E.C.3.2.1.1)를 친수화한 폴리우레탄 표면에 고정화 하여 효소활성을 분석하였으며 장기적으로 효소 고정화 재료개발을 목표로 연구하였다.

실험 방법

재료 및 기기

폴리우레탄(Biomer, Ethicon Co., U.S.A), 폴리에틸렌글리콜(PEG, 분자량 2,000, Sigma Chem. Co.,

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

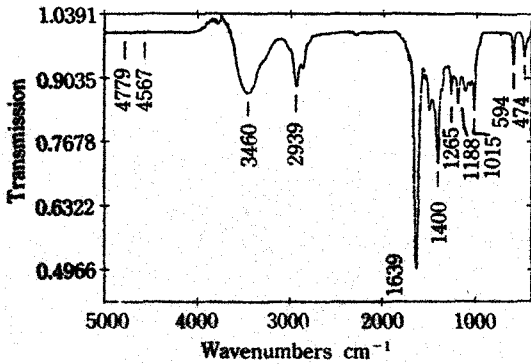


Figure 1—FT-IR spectrum of Biomer-PEG-α-amylase.

U.S.A.), **헥사메틸렌 다이이소시아네이트(HMDI**, Tokyo Kasei Co., Japan), **α-아밀라제(E.C.3.2.1.1.**, Sigma Chem. Co., U.S.A.), **3,5 다이니트로살리실산 (DNSA, Sigma Chem. Co. U.S.A.)** 등이 사용되었으며 모든 시약들은 분석용 특급시약을 정제하여 사용하였다. 기기로서는 **FT-IR(IFS-66 Type, Bruke Mo. Germany)** 주사전자현미경(**SEM, Jeol-Jsm 840 (A)**, Japan) 자외부-가시부 분광광도계(**Shimazu UV 240A, Shimazu. Co. Japan**)를 사용하였다.

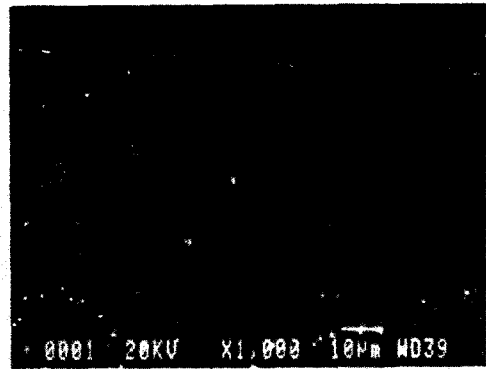
폴리우레탄 표면에 폴리에틸렌글리콜 그리프팅

일정량의 Biomer를 디메틸아세트아미드에 용해한 뒤 60±1℃에서 24시간 동안 유리판 위에서 casting 하여 필름을 제조한 다음 분리하여 24시간 동안 상온에서 진공 건조하였다. 일정한 크기(4.3 cm²)의 필름 표면에 김 등⁵⁾의 방법에 따라서 HMDI을 결합시키고(Biomer-HMDI) 다시 PEG를 결합시켜 친수성 표면성질을 가지는 고분자(Biomer-HMDI-PEG)를 제조하였다.

α-아밀라제의 고정화

일정한 크기의 Biomer-HMDI-PEG 필름 10개를 톨루엔에 넣고 촉매로 stannous octoate 0.5 ml 그리고 HMDI 8 ml를 가한 후에 40±1℃에서 1시간 동안 질소 기류하에서 반응시켜 얻어진 Biomer-HMDI-PEG-HMDI 필름을 톨루엔, 무수 에테르 순서로 3회 세척하여 상온에서 진공건조한 후에 N,N' 다이메틸포름 아미드(DMF) 100 ml에 일정한 크기의 필름 10개와 α-아밀라제 100 mg을 넣고 40±1℃에서 24시간 동안 반응시켜 α-아밀라제를 고정화시켰다.(Biomer-HMDI-PEG-HMDI-α-amylase)

FT-IR 스펙트럼에 의하면 -NCO의 특성피크(2250



(a)



(b)



(c)

Figure 2—Scanning electron micrographs of surface of matrices a) Biomer; b) Biomer-PEG; c) Biomer-PEG-α-amylase.

cm⁻¹)는 사라지고 -OH의 특성피크(3460 cm⁻¹)가 나타났으므로 이 반응이 진행되었음을 알 수 있었다 (Fig. 1). 효소가 고정화된 Biomer의 표면형태를 SEM으로 관찰한 결과를 Fig 2에 나타내었다. 반응 전의 Biomer의 표면은 비교적 매끄러웠으며(Fig. 2 (a)) PEG, α-아밀라제가 결합됨에 따라 표면에 용

Table I—Activity yield after immobilization of α-amylase

Parameter	Set number		
	I	II	III
pH		7	
Activity before immobilization (μm/min/mg)		14.67	
Activity after immobilization (μm/min/mg)	6.730 × 10 ⁻⁴	6.100 × 10 ⁻⁴	6.471 × 10 ⁻⁴
(μm/min/cm ²)	1.555 × 10 ⁻³	1.409 × 10 ⁻³	1.495 × 10 ⁻³
Percentage of remaining activity	4.588 × 10 ⁻³	4.155 × 10 ⁻³	4.411 × 10 ⁻³
Mean activity of yield		4.327 × 10 ⁻³	

집된 형태로 관찰되었다(Fig. 2(a, b)).

고정화 효소의 활성측정

α-아밀라제의 활성은 효소에 의해서 유리되는 환원당을 Berfeld 방법⁶⁾으로 정량하여 측정하였다.

전분에서 유도된 맥아당은 DNSA을 환원시키는 작용을 가지고 있으므로 환원된 DNSA을 측정하여 맥아당을 정량하였으며 0.02 M 인산완충액, pH 7.0, 온도 25°C에서 1% 가용성 전분용액으로부터 1분당 생성되는 1 micromol의 맥아당을 α-아밀라제 활성의 1단위로 하였다.

다이니트로살리실산(DNSA) 발색시약-2 N 수산화나트륨 20 ml에 DNSA 1g을 용해한 다음 롯셀염 30g을 서서히 용해하고 증류수를 가하여 100 ml가 되게하였다.

1% 가용성 전분 용액-0.02 M 인산완충액(pH 7.0) 100 ml에 1.0g 가용성 전분을 용해하여 제조하였다. 이 용액을 용해하기 위하여 끓인 다음 냉각하고 증류수를 가하여 100 ml가 되게하였다. 이 용액을 기질로 사용하기 전에 필요한 온도에서 4~5분 동안 정치시킨 다음 분석에 이용하였다.

가용성 α-아밀라제의 활성-천연효소를 20~60 mcgs/ml의 농도범위로 만들었으며 각 시험관에 효소액 0.5 ml 공시험관에 증류수 0.5 ml 넣은 다음 각 시험관의 온도 평행상태를 유지하기 위해서 수욕상(25±1°C)에서 5분간 보온시킨 후 1% 전분용액 0.5 ml을 시간간격을 두고 각 시험관에 넣고 200 rpm으로 교반하면서 정확하게 5분간 반응시켰다. 시간적 차이를 두고 DNSA 용액 1ml를 각 시험관에 넣고 모든 시험관을 끓는 물속에서 5분간 반응시키고 실온에서 냉각시켰다. 각 시험관에 증류수 10 ml을 가하여 혼합한 다음 분광광도계를 사용하여 476

nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 맥아당량은 맥아당의 표준곡선에 따라 측정하였다.

효소활성은 효소분말의 units/mg로 표시하였다.

units/mg=

$$\frac{\text{micromole maltose liberated}}{\text{mg} \cdot \text{enzyme in reaction mixture} \cdot 5 \text{ minutes}}$$

고정화 효소의 활성-고정화 효소의 활성은 가용성 효소와 같은 방법으로 측정하였다. 1% 가용성 전분용액 0.5 ml와 증류수 0.5 ml을 25°C로 약 5분간 유지시킨 다음 효소가 고정화된 디바이스(4.3 cm²)을 넣고 25±1°C에서 200 rpm으로 교반하면서 일정시간 반응시킨 다음 고정화 효소 디바이스를 제거하고 DNSA 용액을 가하여 발색시킨 다음 분광광도계를 이용하여 496 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 반응을 3회 반복측정하여 평균치를 실험결과로 하였다.

활성 수득률-α-아밀라제 활성은 고정화 전, 후를 측정하였으며 활성 수득률은 초기의 가용성 효소에 대한 고정화 효소의 활성비율로서 나타내었다. 활성비율은 고정화의 화학적 수득률과 불용성 효소의 활성으로서 계산하였다.⁷⁾

활성수득률(%)=

$$\frac{\text{Overall activity of immobilized enzyme}}{\text{Overall activity of initial enzyme}} \times 100$$

실험결과 및 고찰

가용성 효소를 고정화시키면 효소활성이 감소하게 되지만 비교적 효소의 안정도가 증가되는 동시에

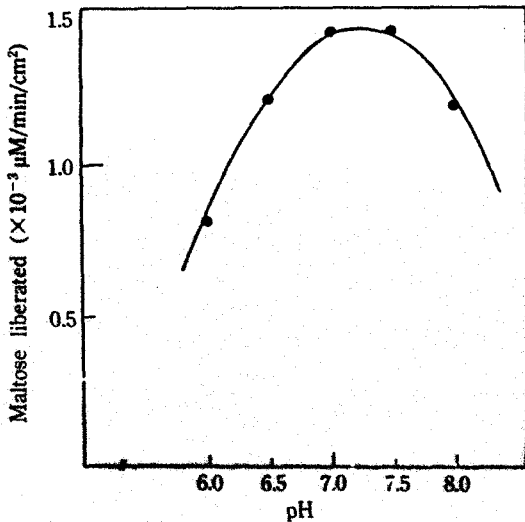


Figure 3—Effect of pH on enzymatic activity of immobilized α -amylase.

반복 사용할 수 있는 장점을 보인다.⁸⁾

α -아밀라제를 glutaraldehyde을 이용하여 혈청 알부민에 고정화시키면 효소활성은 감소하나 최적 pH에서 높은 온도(70°C)에서도 활성을 유지한다는 보고가 있다.⁹⁾ Biomer-PEG에 HMDI을 이용하여 α -아밀라제를 고정화한 Biomer-PEG- α -amylase의 활성은 $1.409 \times 10^{-3} \sim 1.555 \times 10^{-3} (\mu\text{M min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ 이며 각 디바이스의 잔류활성률(%)은 $4.588 \times 10^{-3} \sim 4.155 \times 10^{-3}$ 으로 일반적인 고정화 효소와 같은 특성을 나타내고 있다(Table I).

효소를 고정화 한다음 pH, 온도와 같은 α -아밀라제 활성에 미치는 인자들을 가용성 전분을 기질로 사용하여 측정하였다.

고정화 α -아밀라제에 대한 pH의 영향—고정화 효소의 pH에 대한 영향을 고찰하기 위하여 가용성 α -아밀라제와 고정화 α -아밀라제를 인산염완충액 (pH 6.0~8.0)을 사용하여 pH가 각각 다른 완충액에서 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3회 반복 조작하여 고정화 효소 활성을 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 pH 7.0~7.5에서 가장 안정하며 $1.451 \times 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 의 활성을 나타내고 있다. pH에 따라서 활성이 감소하는 현상은 가용성 효소와 같은 성질을 보이고 있다. Simionescu 등은¹⁰⁾ cellulose에 고정화 한 α -아밀라제의 안정성을 유지하는 pH는 5.8~8.2의 범위를 나타낸다고 보고한 바 있다. Biomer-PEG- α -

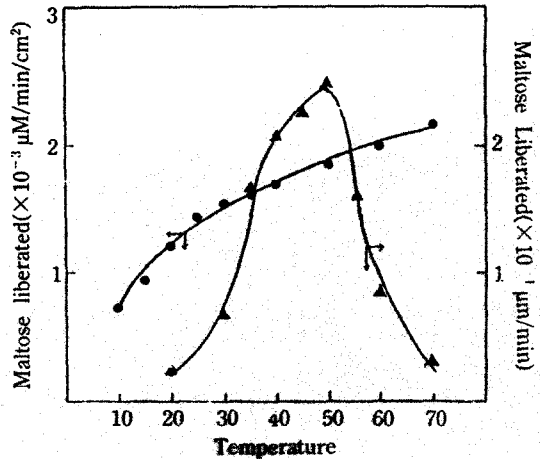


Figure 4—Effect of temperature on enzymatic activity of α -amylase.

●—● Immobilized enzyme ▲—▲ Free enzyme

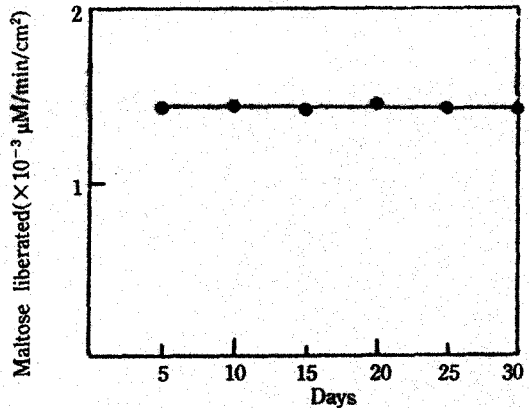


Figure 5—Activity of immobilized α -amylase during the storage at room temperature.

amylase는 pH 7.0~7.5의 범위에서 안정하며 이는 지지체의 성질에 효소활성이 영향을 받음을 시사한다. 효소활성에 대하여 pH가 영향을 미치는 기전으로서 기질인 전분을 Biomer-PEG에 고정화한 효소로 가수분해 하면 완충액 내의 수소이온이 이동하는 것으로 보이며 매트릭스가 전기적으로 음성을 나타낼 경우 반응액의 pH는 감소하게 된다. 즉 Biomer-PEG 디바이스의 수소이온이 증가되어서 기질에 대한 최적 pH는 alkali쪽으로 이동한다고 보이며¹¹⁾ 따라서 효소반응율은 증가하게 된다.

고정화 α -아밀라제에 대한 온도의 영향—10~70°C의 온도범위에서 고정화 효소의 활성을 측정한다

결과를 Fig. 4에 나타내었다. 고정화 효소는 넓은 범위의 온도에서 안정성을 보이고 있으며 이는 α-아밀라제를 혈청 알부민에,⁹⁾ 우레아제를 키토산에¹²⁾ 고정화시킴으로서 열에 대하여 안정성을 유지한다는 보고와 부합된다. 효소단백질이 Biomer-PEG 매트릭스에 고정화되면 열에 의한 효소의 변성이 억제되는 기전은 아직 분명치 않다.

고정화 α-아밀라제의 저장성-고정화 효소(Biomer-PEG-α-amylase) 저장성을 관찰하기 위하여 고정화 효소를 20±1°C에서 30일 동안 밀폐 보관한 것의 효소활성을 Fig. 5에 도시하였다.

α-아밀라제를 Biomer-PEG에 고정화시킴으로써 실온에서 30일 동안 효소활성이 감소되지 않고 유지하고 있음으로 보아 효소역가를 장기간 유지할 수 있어 활용성이 높을 것으로 사료된다.

결 론

- 1) 고정화 α-아밀라제는 pH 7.0~7.5 범위에서 최적의 안정성을 나타내었다.
 - 2) 가용성 효소는 열에 의해서 활성이 거의 소실되었으나 고정화 효소는 넓은 온도범위에서 안정성을 보였다.
 - 3) 고정화 효소는 실온에서 30일 동안 보관하여도 활성이 유지되었다
- 이상의 결과로부터 Biomer-PEG 매트릭스는 효소를 고정화하는데 유용하게 활용할 수 있다고 예상되었다.

감사의 말씀

본 연구의 일부는 1991년도 조선대학교 학술연구지원에 의하여 이루어졌으며 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

- 1) M.H. Keys and S. Sarawathi, Immobilized en-

- zymes, bioactive polymeric systems. (Ed) C.G. Gebelein and C.E. Carraher, Jr. Pleum Press, N.Y. pp. 249 (1985).
- 2) K.L. Smiley and G.W. Strandberg, Immobilized enzyme, advances in applied microbiology (Ed) D. Perlman, vol. 15, Academic Press, N. Y. pp. 13 (1972).
- 3) P.W. Heyman, C.S. Cho, J.C. Mcrea, D.B. Olsen and S.W. Kim, Heparinized polyurethanes: *In vitro* and *In vivo* studies, *J. of Biomatirial Research*, **19**, 419 (1985).
- 4) J.C. Johnson, Immobilized enzymes, Preparation and Engineering, Noyes Data coporation Park Ridge, New Jersey, U.S.A. pp. 244 (1979).
- 5) 김영하, 정서영, 한동근, 조학인, 박전홍, 생체 적합성 고분자 재료 개발에 관한 연구(III) 과학기술처, 1987.
- 6) P. Bernfeld, *Advances in Enzymology*, Vol. 12, A. Meister (Ed) Interscience Publication, New York, pp. 379 (1951).
- 7) G.B. Brown, *Methods in enzymology*, Vol. 44, K. Mosbach (Ed). Marcel Press, New York. pp. 267 (1976).
- 8) G.G. Guilbault, *Handbook of enzymatic methods of analysis*, Marcel Dekker, pp. 446 (1976).
- 9) K.R. Chawala, A.K. Madan, B.D. Miglani and M.N. Guta, *Investingation of depyrogenation of drugs using immobilized enzymes*, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **17**, 391 (1991).
- 10) C. Simionescu and A. Dumitriu, *Biological active compounds immobilized on cellulose derivatives, in polymers in medicine*, (Ed) E. Chiellini and P. Guisti, Pleum Press, N.Y. pp. 115 (1983).
- 11) M.D. Treven, *Immobilized enzymes*, John & Sons. N.Y. pp. 41 (1980).
- 12) 이치영, 김성호, Chitosan matrix에 urease의 고정화, *약제학회지*, **15**, 93 (1985).