

## 포스파젠 고분자의 친수성 겔을 이용한 효소의 고정

권 석 기 · 음 성 진

홍익대학교 과학기술대학 공업화학과  
(1993년 11월 4일 접수, 1994년 1월 25일 채택)

### Enzyme Immobilization with Polyphosphazene Hydrogels

Suk-Ky Kwon and Sung-Jin Eum

Dept. of Ind. Chem., Hongik Univ., Seoul 121-791, Korea  
(Received November 4, 1993, Accepted January 25, 1994)

**요 약 :** 에테르기를 가진 수용성 포스파젠 고분자를 감마광선에 노출시켜 좋은 수분-팽윤도를 가진 친수성 겔을 만들었다. 이 친수성 겔들의 물리적 강도가 감마광선의 강도에 따라 조절될 수 있었다. 트립신과 수용성 포스파젠 고분자를 함께 감마광선에 쬐어 트립신을 겔의 망 사이로 고정시켰다.

고정된 트립신의 활성도는 N- $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide와 반응시킨 후 분광학적인 방법으로 조사하였다. 고정된 트립신은 적어도 500시간 후에도 상당히 좋은 활성도 수율과 안정도를 가지고 있었음을 보여주었다.

**Abstract:** The water-soluble polyphosphazene possessing ether side groups was exposed to  $\gamma$ -rays to prepare hydrogels with good water-swellability. The physical strength of these hydrogels could be controlled by irradiation dose of  $\gamma$ -rays. Trypsin and water-soluble polyphosphazene were irradiated together by  $\gamma$ -rays for entrapment of enzymes into hydrogel networks.

The activities of immobilized trypsin were examined spectrophotometrically after the reaction with N- $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide in phosphate buffer. The immobilized trypsin was found to have good activity yield and stability after at least 500 hours.

### 1. 서 론

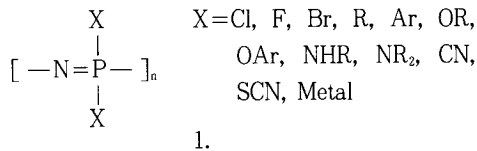
효소 및 다른 생물학적으로 유용한 여러 물질들을 그 고유한 성질을 유지시킨 채로 고분자 내부 또는 표면에 고정화시키는 것에 대한 연구는 활발히 전개되어 왔다[1-3]. 효소를 불용성물질에 고정시킴으로써 생기는 데 두 가지의 큰 장점이 있다. 첫번째로는 효소를 고정시킴으로써 효소를 안정화시킬 수 있다는 데에 있다. 용해된 효소보다 고정된 효소는 훨씬 장기간 동안 활성도를 유지한 채로 안정화될 수 있다. 두번째로는 불용성 물질에 고정된 효소는 반응액

으로부터 쉽게 분리되어질 수 있다. 이러한 이유들로 인해 효소의 고정에는 여러 가지 생체공학, 산업 및 분석분야에 널리 응용되어진다[4].

효소의 고정 등에 사용되어졌던 물질에는 유기 천연 고분자나 유기합성 고분자와 같은 유기물질 외에도 세라믹 등의 무기화합물들도 많이 사용되어왔다. 그러나 과거에 사용되었던 고분자 및 세라믹 등의 경우 그 합성과정이나 합성방향이 그다지 다양하지 못한 것으로 알려져 왔다. 따라서 보다 합성이 용이하고, 또한 그 고분자의 성질을 쉽게 변형시킬 수 있는 새로운 골격구조가 요구되어왔다[5]. 특별히 의

료용으로 사용되기 위해서는 사용되는 고분자의 독성이 생물학적으로 적어야 하며 또한 좋은 친수성 및 배위능력을 가져야 한다. 이에 따른 효소의 고정을 위한 새로운 고분자 재질에 관한 연구가 활발히 전개되어왔다[6].

포스파젠 고분자는 유기 및 무기 치환체가 붙어 있는 무기 골격을 가진 고분자로서 다음과 같은 구조(1)를 가지고 있다[7].

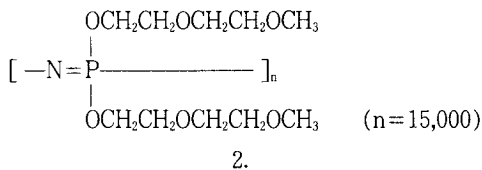


이러한 구조의 포스파젠 고분자가 의료용 고분자로서 사용 가능한 지에 대해서는 지난 몇 년 동안 많은 연구가 되어져왔다[8-11].

포스파젠 고분자는 생체 적합성이 뛰어나고, 치환기가 바뀌어짐에 따라 용해도, 유연성, 결합능력 및 산도를 쉽게 변화시킬 수 있는 장점을 가진 것으로 알려졌다[12]. 특히 에테르기가 치환된 poly[bis(methoxyethoxyethoxy)phosphazene](2)는 쉽게 물에 녹으며 강한 산과 강한 염기에서의 안정도가 높아 여러 가지 의료산업분야에 좋은 재료가 사용되어질 수 있다[13].

포스파젠 고분자(2)는 수용성인 상태, 또는 건조한 필름 상태에서 감마광선에 의해 쉽게 가교되어 친수성 겔을 형성한다[14].

따라서 본 연구에서는 수용성 포스파젠 고분자(2)를 먼저 합성하고 그 고분자를 이용해



효소들을 고정시키며, 또한 고정된 효소들의 활성도를 조사함으로써 유기 포스파젠 고분자가 효소의 고정에 있어 한 가지의 좋은 재질로 사용될 수 있음을 보여주고자 한다.

## 2. 실험

### 2. 1. 분석 및 실험기기

<sup>31</sup>P NMR을 얻기 위해서는 JEOL FX 90Q FT NMR 분광기가 사용되었고, 적외선 스펙트럼은 Perkin-Elmer FT IR 1700 분광기를 사용하였다. UV 스펙트럼은 Hewlett-Packard Model 8540A UV/VIS를 사용하였다. 분리를 위해서는 International Clinical Model 4583 원심분리기가 사용되었으며, GPC결과는 Hewlett Packard 1090 Liquid Chromatograph를 사용하였다. <sup>60</sup>Co γ 광선 실험은 펜실바니아 주립대학에 있는 Breazeale 핵 반응기에서 실시하였다.

### 2. 2. 시 약

Tetrahydrofuran(THF)는 질소하에서 sodium과 benzophenone을 넣고 흑색색으로 바뀐 후 증류하여 사용하였다. Hexachorocyclotriphosphazene(3)(mp 110~112°C)는 사량체-삼량체 혼합물을 n-hexane에서 분별결정시킨 후 60°C(0.5Torr)에서 진공 분별승화 시키고 이것을 두 번 반복한 후에 정제된 상태로 사용했다. Poly(dichorophosphazene)(4)는 cyclotrimer(3)를 250°C에서 열에 의한 고리개환중합시켜서 얻는다. Trypsin과 N-α-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide(BANA)는 Sigma사로부터 구입하여 0°C에 보관한 후 사용한다. Methoxyethoxyethanol, sodium spheres, sodium hydride, potassium phosphate 등은 Aldrich사로부터 구입해 정제없이 바로 사용하였다.

### 2. 3. [NP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>3</sub>의 합성

4.8g의 sodium hydride(0.12mol, 60% dispersion in mineral oil)를 50ml의 THF에 분산시킨 용액에 16.8g의 2-(2-methoxyethoxy)ethanol(0.14mol)를 가한다. 상온에서 30분간 용액을 저어주며 sodium hydride가 전량 반응하게 한다. 5g의 염화 포스파젠 삼량체(3)(0.014mol)를 50ml의 THF에 녹인 다음, 그 용액을 sodium 2-(2-methoxyethoxy)ethoxide용액에 서서히 가해준다. 최종 반응액을 25°C에서 6시간 동안 교반시킨 다음 용매를 증발시키고 잔류물질 중 원하는 생성물을 크로마토그래피에 의해 정제한다.

### 2. 4. [NP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>의 합성[13]

7.82g의 sodium spheres(0.34mol)를 400ml의 THF에 분산시킨 용액에 48g의 2-(2-methoxyethoxy)ethanol(0.41mol)를 서서히 가해준 다음 so-



Table 1. Characterization Data for Polymer(2)

Instrument	Analysis data
<sup>31</sup> P NMR	a singlet at -7.7ppm <sup>a</sup>
IR	P=N stretch at 1250cm <sup>-1</sup> C-O stretch at 1050cm <sup>-1</sup>
<sup>1</sup> H NMR	a singlet at 3.3ppm multiplet at 3.4~4.1ppm
GPC	average molecular weight > 1×10 <sup>6</sup>
Elemental analysis	expected : %C : 46.48, %H : 8.02 result %N : 1.94, %Cl : 0 obtained : %C : 46.48, %H : 8.19 result %N : 2.68, %Cl : <0.02

a : Chemical shift positions were relative to aqueous 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

한 방사선의 조사량이 증가함에 따라 겔의 팽윤도가 점점 감소함을 알 수 있는데 이것은 가교도가 방사선 조사량에 따라 증가함에 기인된다. 만일 3.6Mrad의 광도를 가지고 고분자(2)를 가교시키면 얻어지는 겔 1g이 수분을 20g 정도 흡수할 수 있다는 것을 발견하였다.

### 3. 3. 1. 친수성 포스파젠 겔의 안정도 조사

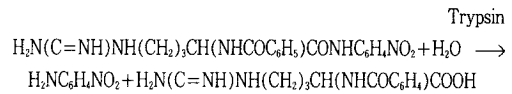
일반적으로 수용성 포스파젠 고분자는 약한 산과 약한 염기에서 높은 온도로 가열하면 쉽게 분해되는 경향을 갖고 있다. 특별히 수산화기나 아민기 등을 함유한 포스파젠 고분자의 경우 온도가 올라감에 따라 수산화기나 아민기 등이 인과 질소의 안정된 이중결합을 공격하게 되면 쉽게 가수분해 등에 의해 고분자의 사슬이 분해되는 경향을 볼 수 있다.

그러나 에테르기로 치환된 포스파젠 고분자는 가교 전이나 가교 후에도 모두 산과 염기에서 매우 좋은 안정도를 갖는 것으로 나타났다. 특별히 80% 초산 용액, 또는 0.1N 수산화 나트륨용액에서 100℃로 가열하였으나 24시간 후에도 고분자의 사슬의 어떤 분해 현상도 발견되지 않았다. 수용성 고분자의 경우 GPC 및 <sup>31</sup>P NMR을 통해 어떤 고분자 내의 변화나 분자량 감소가 일어나지 않았음을 알 수 있었고, 포스파젠 겔의 경우는 물리적인 관찰 등을 통해 이와 같은 조건하에서도 좋은 안정도를 가지고 있음을 알 수 있었다.

### 3. 4. 친수성 포스파젠 겔을 이용한 효소의 고정화 반응

트립신의 활성도를 조사하기 위해서는 BANA를

이용한 분광분석법이 사용되었는데 이에 대한 일반적인 반응식은 아래와 같다[18]. 트립신과 BANA를 반응시켜서



얻어지는 p-nitroaniline은 406nm에서 강한 흡수 스펙트럼을 얻을 수 있는데, 이 부분의 흡광도를 측정해 활성도를 비교하였다[19].

#### 3. 4. 1. 효소 자체의 감마광선 처리에 따른 활성도 조사

10mg의 트립신을 각각 건조한 상태나 또는 4ml의 정제된 물에 녹인 후 3.6Mrad의 강도를 갖는 감마광선에 노출시켰다. 감마광선으로 처리한 후 트립신의 활성도를 BANA를 사용해 조사하였고 이에 따른 활성도의 변화를 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서 볼 수 있는 것처럼 건조한 상태의 트

Table 2. Activities of Trypsin after  $\gamma$ -ray Irradiation

	Dried trypsin	Trypsin in aqueous solution
Reagent	BANA	BANA
Buffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH	7.5	7.5
Wavelength	406nm	406nm
Absorbance	0.5567	0.0804
Activity yield	85.4%	12.3%

립신은 감마광선을 투여한 후에서 그 활성도가 크게 변하지 않은 것을 알 수 있었으나, 트립신을 수용액에서 용해시킨 후 감마광선을 투여시키면 그 활성도가 크게 감소하는 것을 알 수 있었다.

#### 3. 4. 2. 고정화된 트립신의 활성도 조사

고분자(2)와 효소를 감마광선에 노출시키는데 다음의 4가지 방법을 사용했다.

- 1) 고분자(2)를 효소에 녹인 수용액에 넣고 용해시킨 후 수용액
- 2) 고분자(2)를 효소수용액에 용해시킨 후 건조시킨 필름
- 3) 효소를 고분자(2)의 수용액에 용해시킨 수용액
- 4) 효소를 고분자(2)의 수용액에 용해시킨 후 건조시킨 필름

각각의 경우에 대해 BANA와 phosphate buffer를 넣고 조사한 활성도의 값을 아래에 나타내었다.

감마광선 투여에 따른 고정화된 트립신의 활성도

투여상태	1	2)	3)	4)
활성도수율	0%	21%	0%	32%

위의 결과를 통해 보면 트립신을 고분자 수용액에 녹인 상태에서 감마광선을 투여시키면 트립신의 활성도가 거의 남아 있지 않았고 단지 건조시켜서 얻은 고분자 필름을 감마광선에 노출시킨 경우에만 20~30% 정도의 활성도만을 가지고 있음을 알 수 있었다. 만일 아민이 치환된 포스파젠 등과 같은 다른 수용성 포스파젠 고분자를 사용한다해도 수용액상에서 감마광선을 투여하면 위와 같이 효소의 활성이 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 수용액상에서는 효소의 활성화기들이 감마광선에 의해 변조되거나 또는 분해, 결합되어서 활성도를 잃는 것으로 추측되어진다. 다른 수용성 포스파젠 고분자의 경우에는 화학적 방법 등에 의해 가교시킬 수 있는 장점이 있지만 위에서 언급한 것과 같이 그 고분자가 산이나 염기에 대해 높은 온도에서 좋은 안정도를 갖지 못하는 단점이 있다. 그러나 에테르기가 치환된 포스파젠 고분자의 경우에는 산과 염기에 대해 좋은 안정도를 갖는 대신에 오직 감마광선에 의해서만 친수성 겔을 얻을 수 있었다. 특히 이 경우에도 건조시킨 후 감마광선을 투여시켜야만 상당한 정도의 효소의 활성도를 유지시킬 수 있었다.

3.4.3. 시간에 따른 고정화된 트립신의 활성도 조사

에테르기가 치환된 포스파젠 고분자에 트립신을 넣고 건조시켜서 얻은 고분자 slab에 감마광선을 투여하여 트립신을 고정시켰다. 친수성 겔 속으로 고정된 트립신을 온도를 25℃로 유지시킨 채로 pH 7.5에 phosphate buffer용액 내에서 보관시켰다. 활성도를 측정하기 위해서는 과량의 BANA를 넣고 Vortex교반기를 통해 1분간 교반시킨 후 얻은 반응용액을 완충용액으로 20배 내지 30배 정도 희석시켜 분광분석기를 통해 흡광도를 얻었다. 저장시간에 따른 고정된 트립신의 활성도를 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1에서 볼 수 있는 것처럼 고정된 트립신의 활성도는 초기에는 다소 감소하였으나 이후부터는 500

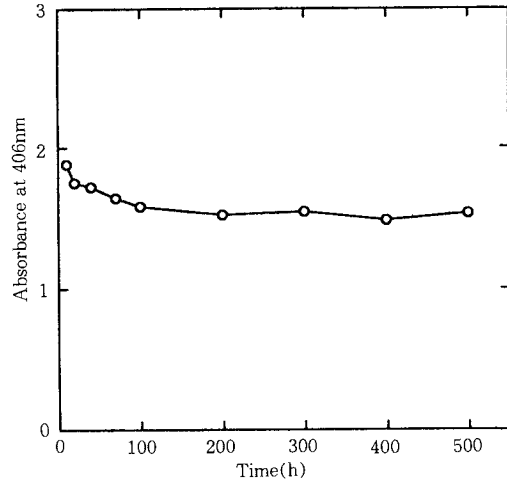


Fig. 1. Immobilized trypsin activity vs. storage time.

시간 동안 거의 일정한 안정도를 갖는 것으로 나타났다. 단지 감마광선을 통해 트립신을 고정시킬 경우 초기의 활성도 수율이 20~30% 정도밖에 되지 않는 것이 다른 매체의 고정화 수율에 비해 다소 떨어지는 것으로 보여진다.

그러나 일단 안정된 상태로 고정된 효소의 활성도는 저장시간이 증가함에 따라서도 크게 감소하지 않는 장점을 가진 것으로 나타났다.

3.4.4. 트립신의 Lowry Protein Assay

트립신을 포스파젠 겔에 고정시키는 과정에 있어 실제로 고정화된 트립신의 양을 활성도와 관계없이 세척용액에 씻겨 나온 트립신의 양을 Lowry assay를 통해 조사하였다[20]. Lowry assay는 특정한 Folin-phenol 시약을 사용해 용액상에 있는 단백질의 양을 측정하는 방법으로 트립신의 경우 여러 번 반복 실험 후 씻겨나온 실제적인 트립신의 양을 계산할 수 있었다. 본 실험을 통해 세척용액에 있는 트립신의 양은 투여된 트립신의 총량의 10% 미만인 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 대부분의 트립신은 가교된 고분자의 그물구조 사이에 entrapment된 것으로 추정된다.

4. 결 론

포스파젠 고분자를 이용해 효소를 고정하기 위해

에테르기를 가진 수용성 포스파젠 고분자를 합성하였고 합성된 고분자와 효소를 함께 감마광선에 노출시켜 고정화된 효소를 함유한 포스파젠 겔을 만들었다. 이러한 실험을 통해 얻은 결론은 다음과 같다.

1. 포스파젠 삼중체를 모델로 한 합성실험을 통해 고분자의 합성조건을 택하였는데 이것이 잘 적용되었다.

2. 합성된 수용액 포스파젠 고분자(2)는 감마광선에 의해 쉽게 가교되었고, 얻어진 친수성 겔은 산과 염기용액 가운데서 매우 안정한 것으로 나타났다.

3. 효소를 고분자와 함께 감마광선에 노출시킬 경우 건조한 필름상태에서 고정화시키는 것이 가장 높은 수율을 갖는 것으로 나타났다.

4. 고정화된 효소의 활성도 수율은 최고 32%로 나타났고 세척용액의 Lowry assay를 통해 cross-linked polymer network속에 들어 있는 트립신의 양은 투여된 양의 90% 이상임이 밝혀졌다.

5. 고정화된 효소는 적어도 500시간 이상 안정된 활성도를 갖는 것으로 나타났다.

## 감 사

이 논문은 1992년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 지방대학 육성과제 연구비에 의하여 연구되었습니다.

## 참고문헌

1. R. A. Messing, "Immobilized Enzymes for Industrial Reactors", Academic, New York(1975)
2. O. R. Zarborsky, "Immobilized Enzymes", CRC, Cleveland(1973)
3. H. H. Weetal, "Immobilized Enzyme Technology", Plenum, New York(1975)
4. G. M. Whitesides and C. H. Wong, *Aldrichimica Acta*, **19**, 2, 27(1983)
5. R. B. Dunlap, "Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography", Plenum, New York (1974)
6. H. R. Allcock, *Chem. Eng. & News*, **63**, 22 (1985)
7. H. R. Allcock and R. L. Kugel, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4216(1965)
8. H. R. Allcock and P. E. Austin, *Macromolecules*, **14**, 1616(1981)
9. H. R. Allcock and T. J. Fuller, *Macromolecules*, **13**, 1338(1980)
10. T. X. Neenan and H. R. Allcock, *Biomaterials*, **3**, 2, 78(1982)
11. H. R. Allcock and A. G. Scopclianos, *Macromolecules*, **16**, 715(1983)
12. H. R. Allcock and S. Kwon, *Macromolecules*, **22**, 75(1989)
13. H. R. Allcock, P. E. Austin, T. X. Neenan, J. T. Sisko, P. M. Blonsky, and D. F. Shriver, *Macromolecules*, **19**, 6, 1508(1986)
14. H. R. Allcock, S. Kwon, G. H. Riding, R. J. Fitzpatrick, and J. L. Bennett, *Biomaterials*, **9**, 509(1988)
15. H. R. Allcock and S. Kwon, *Macromolecules*, **21**, 7, 1981(1988)
16. P. M. Blonsky, D. F. Shriver, P. E. Austin, and H. R. Allcock, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 6854 (1984)
17. H. R. Allcock, M. Gebura, S. Kwon, and T. X. Neenan, *Biomaterials*, **9**, 500(1988)
18. C. K. Glassmeyer and J. D. Ogle, *Biochemistry*, **10**, 5(1971)
19. H. R. Allcock and S. Kwon, *Macromolecules*, **19**, 1502(1986)
20. O. H. Lowry, N. J. Resebrough, A. I. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **95**1, 265(1951)