

자성 미세입자에 고정된 효소를 통한 요소 전환

박예슬* · 권지은* · 정승준* · 조혁진* · 신고운하늘* · 조강익* · 박진원*[†] · 이경혁**[†]

*서울과학기술대학교 화공생명공학과
01811 서울특별시 노원구 공릉로 232
**K-water연구원 K-water

34350 대전광역시 대덕구 신탄진로 200

(2023년 5월 18일 접수, 2023년 6월 2일 수정본 접수, 2023년 6월 5일 채택)

Urea Conversion via Enzymes Immobilized on Magnetic Microparticles

Yeseul Park*, Jieun Kwon*, Seungjun Jung*, Hyukjin Cho*, Gounhanul Shin*, Gangik Cho*,
Jin-Won Park**[†] and Kyung-Hyuk Lee**[†]

**Department of Chemical and Biomolecular Engineering, College of Energy and Biotechnology,
Seoul National University of Science and Technology, Gongreung-ro 232, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea*

***K-water Research Institute Water & Wastewater Research Center, 125, Yuseong-daero 1689beon-gil, Yuseong-gu, Daejeon 34045, Korea*

(Received 18 May 2023; Received in revised from 2 June 2023; Accepted 5 June 2023)

요 약

요소분해효소가 자성입자표면에 공유결합으로 고정되어 요소의 중탄산음이온 전환을 촉진하였으며, 이 전환을 정성적으로 고압액체크로마토그래피와 UV/Vis분광법으로 확인하고 순환전압전류법을 사용하여 정량적으로 분석하였다. 시간에 따른 전환량을 측정하고 이를 반응속도식으로 분석하여 0.0474 min⁻¹의 반응속도 상수를 산출하였다. 처음 1~3 회에서는 90% 이상의 전환율을 확인하였으며, 50% 전환율까지 8회 재활용이 가능하였다. 30일 동안의 저장에 대하여 평가된 안정성은 유지되는 것으로 관찰되었다. 본 연구의 결과, 지지체에 공유결합으로 고정된 요소분해효소는 초순수 제조 목적으로 요소제거에 활용될 수 있음을 알 수 있다.

Abstract – The urease is covalently immobilized on the surface of the magnetic particles to catalyze the conversion of urea to bicarbonate anion. The conversion was confirmed qualitatively using high-pressure liquid chromatography and UV/Vis spectrometry, and analyzed quantitatively with cyclic voltammetry. The amount of conversion with respect to time was measured and analyzed by the reaction rate equation to calculate a reaction rate constant of 0.0474 min⁻¹. In the 1 to 3 cycles, a conversion percentage of over 90% was found, and it was possible to reuse the urease 8 times up to the percentage of 50%. It was also observed that the stability evaluated for storage for 30 days was maintained. As a result of this study, it can be seen that the urease covalently immobilized on the scaffold can be used for urea removal for the purpose of producing ultrapure water.

Key words: Urea, Bicarbonate, Enzyme immobilization, Magnetic particles

1. 서 론

초순수는 미세구조제조, 정밀화학, 그리고 제약 등과 같은 첨단 산업에 핵심적으로 사용되며, 흡착, 이온 교환, 탈기, 막 여과 및 자외선 산화와 같은 여러 공정들을 거쳐 생산된다[1]. 초순수 제조과정에서, 비휘발성, 난산화성, 내오존성, 비이온성, 고수용성, 그리고

저분자량인 요소는 기존의 물리화학적 방법에 의해 쉽게 제거될 수 없는 것으로 인식된다[2]. 더 나아가서, 상기된 물성으로 인하여 요소는 우수한 겨울철 제빙화합물로 활용되며 농업분야에 필수적인 비료는 요소의 잠재적 공급원이므로, 수자원이 요소로 오염될 가능성이 상존하고 있다[3,4].

현재 물에서 요소를 제거하는 이상적인 방법은 기존의 수질 정화 공정으로 쉽게 제거할 수 있는 화합물로 분해하는 것이다. 현재 요소를 제거하기 위해 주로 UV 산화와 고도산화처리(Advanced oxidation process, AOP)가 활용된다. UV와 persulfate를 조합한 방법이 효과적이라는 연구결과가 있으며, Evoqua의 Vanox AOP 기술은 처리수의 TOC를 0.5 µg/L 이하로 안정적으로 유지할 수 있는 것으로 발표

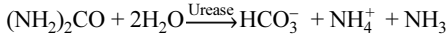
[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jwpark@seoultech.ac.kr, kh.lee@kwater.or.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

되었다[2,5]. 그리고, 오존보다 반응성이 100배 더 높은 차아염소산 기반 산화 공정에서 요소가 산화될 수 있는 것으로 보고되었다[6].

요소는 신장의 기능을 평가하고 위와 십이지장에서 헬리코박터 파일로리(*H. pylori*) 박테리아의 존재를 감지는 지표물질로 활용된다[7,8]. 그리고, 요소는 요소분해효소에 의해 pH 5와 7 사이의 범위에서 가수분해가 촉진되어 중탄산음이온과 암모늄양이온으로 전환된다[9]. 이 가수분해 반응식은 아래에 제시되어있다.



본 연구에서는, 추가물질이 투입되며 상대적으로 높은 전력이 소모되는 AOP의 대안으로서 고정된 요소분해효소에 의해 초순수에 용해된 요소로부터 중탄산음이온이 전환됨을 확인하고 이 전환반응에 대한 정량적인 분석을 수행하였다. 실제 공정으로의 적용을 모색한다면, 유체 흐름이 노출되므로 전단응력에 의한 영향도 간과될 수 없을 것이다.

2. 실험

2-1. 효소고정화

요소분해효소는 공유결합을 통해 자성 입자에 고정되었다. 직경 1.5 μm 입자 원액 150 μL를 pH 6.0에서 20 mM MES 완충액으로 세 번 세척하였다. 이 입자들을 45분간 2.5%(v/v) ethyl(dimethyl aminopropyl)carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide를 반응시켜 기능화한 후에, 50 U 요소분해효소를 포함하는 20 mM MES 50 mL에 3시간 동안 침지하였다. 효소 고정화 확인을 위해 X선광전자 분광법을 사용하였다. Bradford 시약을 사용하여 농도 주입된 효소와 결합되지 않은 효소가 파악되었다. 농도 고정화 효소의 양은 167 μM로

추정되었다[10]. 요소분해효소가 고정화된 입자들에 요소 수용액을 가하여 반응시켰다.

2-2. 고압액체크로마토그래피 분석

요소 분해에 대한 HPLC분석이 Waters사의 QDA, H-Class UPLC에서 Premier BEH C18 (pore size 130 Å, particle size 1.7 μm, 2.1 × 100 mm 컬럼)으로 수행되었다. 이동상으로 0.1 mM 염화암모늄 수용액을 1 mL/min으로 사용하였다. 요소와 중탄산음이온의 *M/Z*가 유사하여 용출시간(Retention time)을 기준으로 분석하였으며, 분석의 비교군으로 요소와 중탄산음이온의 비율(10 ppm:10 ppm, 50 ppm:10 ppm, 100 ppm:10 ppm, 200 ppm:10 ppm)을 고려하였다. 요소 10 ppm의 분해능이 미흡하여, 요소 200 ppm 수용액이 효소와 2시간 이상 반응된 후 분석되었다.

2-3. UV/Vis 분광법 분석

요소 분해에 대하여 UV/Vis 흡광도(Absorbance)의 측정이 수행되었다. Shimadzu사의 UV-1800이 이용되었으며, 파장으로 250 nm 전후가 고려되었다. 요소 10 ppm 수용액에 대한 흡광도를 측정하고, 이 용액 4 mL를 고정화된 효소에 가하여 2시간 이상 반응시켰다. 효소가 고정된 입자들을 자기력으로 분리한 후, 반응 후의 용액을 회수하여 흡광도를 평가하였다. 변화된 흡광도의 비교를 위하여, 요소 5 ppm과 중탄산음이온 5 ppm으로 구성된 수용액의 흡광도와 비교하였다.

2-4. 순환전압전류법 분석

순환전압전류법(Cyclic voltammetry; CV) 실험은 Zive 전기화학 워크스테이션으로 수행되었다. 요소분해효소가 고정화된 입자들에

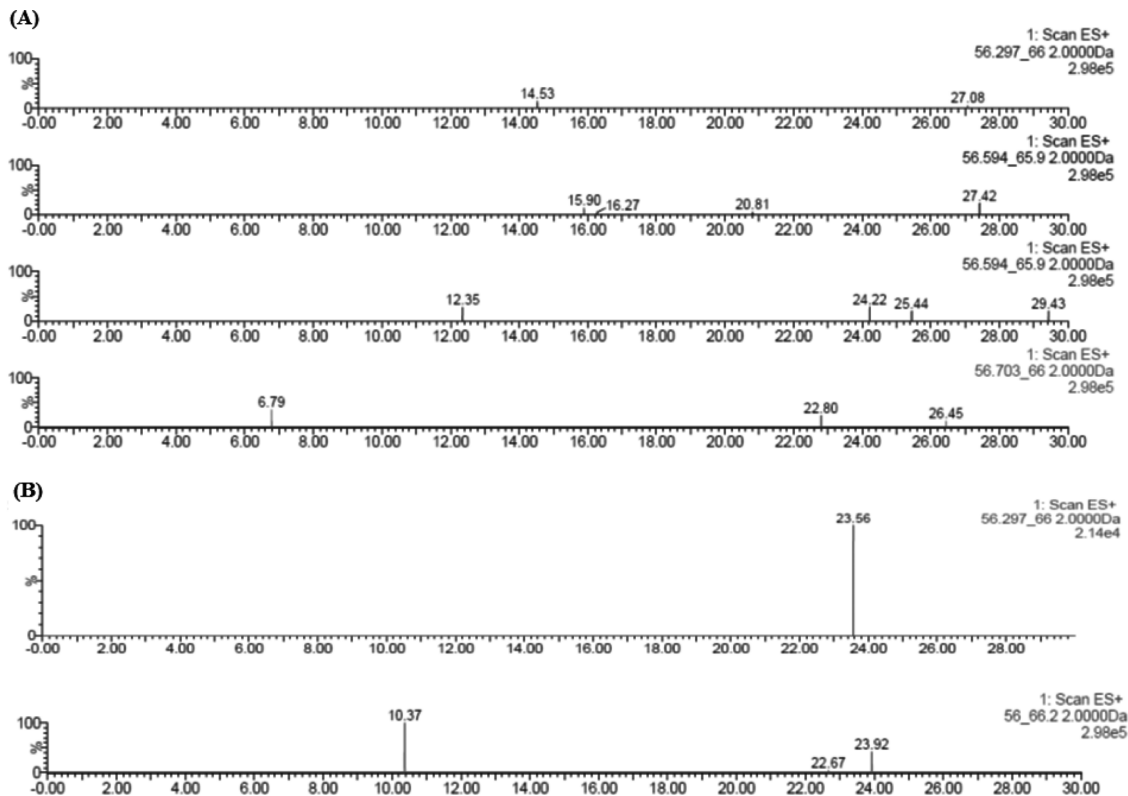


Fig. 1. (A) Elution times according to urea:bicarbonate anion ratio-10 ppm:10 ppm, 50 ppm:10 ppm, 100 ppm:10 ppm, 200 ppm:10 ppm from top to bottom (B) Elution times of 200 ppm urea aqueous solution before and after treated with immobilized urease.

요소 수용액을 가하여 반응시킨 후에, 시간 별로 수용액을 추출하여 Pyrex 유리 셀에 이송하였다. Ag/AgCl 기준 전극, Pt 와이어 상대 전극 및 유리질 탄소 작업전극을 완충용액에 넣고, 전류가 측정되었다. 전위는 기준 전극 대비 900~250 mV 범위에서 0.05 mV/s의 스캔 속도로 순환되었다.

3. 결과 및 고찰

비교군인 요소와 중탄산음이온의 수용액과 효소에 의해 분해된 요소 수용액의 HPLC 분석 결과는 Fig. 1에 제시되어 있다. Fig. 1(A)는 위에서부터 순차적으로 요소의 비율(요소:중탄산음이온) 증가 -10 ppm:10 ppm, 50 ppm:10 ppm, 100 ppm:10 ppm, 200 ppm:10 ppm에 따라 그래프들이 제시되어 있으며, 정량적인 값이 파악되기 어려우나 25~30분 구간의 봉우리가 증가되는 양상을 보이고 있다. 따라서, 10~15분 구간의 봉우리는 중탄산음이온의 유출에 해당되는 것으로 판단된다. Fig. 1(B)는 요소 200 ppm 수용액과 이 수용액이 고정화된 효소에 의해 분해된 후에 대한 결과를 순차적으로 제시하

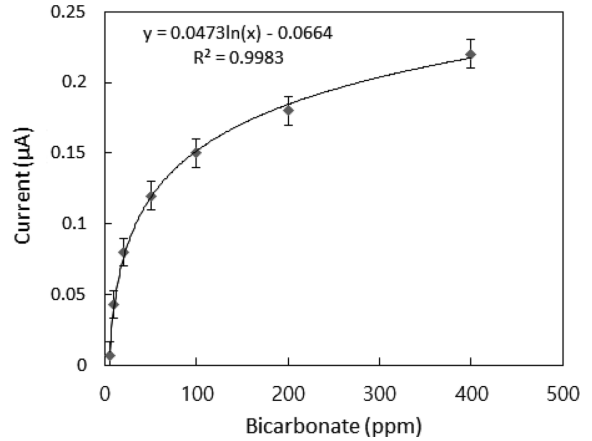


Fig. 4. Cyclic-voltammetry value according to the concentration of bicarbonate anion.

고 있다. 정성적으로 요소가 중탄산음이온으로 전환됨을 확인할 수 있다.

UV-Vis 분광기를 이용한 흡광도 측정을 통해서 요소의 중탄산음이온 전환이 확인될 수 있다. Fig. 2는 과장에 따른 흡광도를 제시하고 있다. 요소 10 ppm 수용액에 대하여 흡광도를 측정하였으며, 이 용액을 고정화된 효소에 반응시킨 후 회수하여 흡광도를 측정하였다. 비교군인 요소와 중탄산음이온(5 ppm: 5 ppm)의 수용액에 대하여 측정된 흡광도가 유사한 양상을 보이고 있다.

고정된 효소로 요소가 분해됨에 따라 측정된 CV의 결과가 Fig. 3에 제시되어 있다. 이는 자유로운 상태에서의 효소에 대한 결과와 매우 유사하여 고정화에 의한 효소활성 변화는 미미한 것으로 판단된다. 요소 10 ppm 수용액을 효소와 반응시키기 전과 후에 각각 측정하였다. 반응에 의해 전류변화의 폭이 확장된 것이 관찰된다. 이는 이온증가에 의한 변화로 분석되며, 요소가 중탄산음이온으로 전환된 것에 기인한 것으로 판단된다. 정량화를 목적으로 중탄산음이온의 농도에 따른 전류변화 폭을 측정하여 표준곡선을 도출하였다(Fig. 4). 이 곡선은 CV의 전류가 전위차에 선형적으로 비례하도록 가해지므로, 중탄산음이온 농도와 전류 폭의 관계식은 이온 농도와 전위차 사이를 나타내는 이론식-Nernst 식의 형태와 일치할 것으로 예상되었다. 그리고, 예상이 그대로 실험 결과에 일치함에 따라 CV

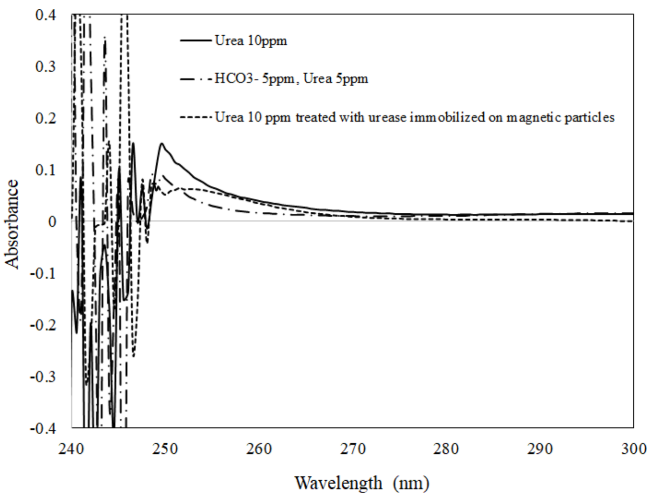


Fig. 2. Absorbance of 10 ppm urea aqueous solution (solid line), 5 ppm urea and 5 ppm bicarbonate aqueous solution (dotted and solid lines), and 10 ppm urea aqueous solution after treated with immobilized urease (dashed line).

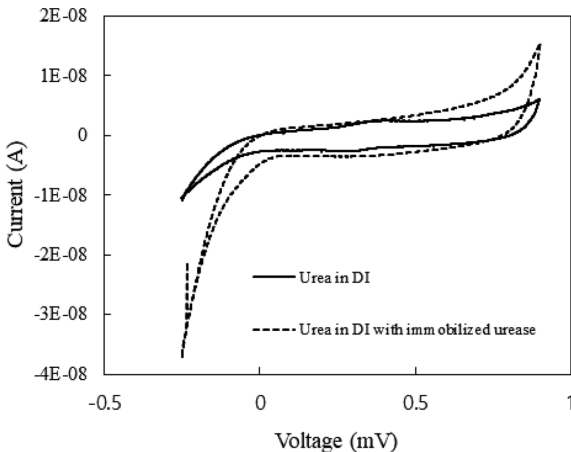


Fig. 3. Cyclic-voltammetry curve before (solid line) and after (dotted line) treated with immobilized urease.

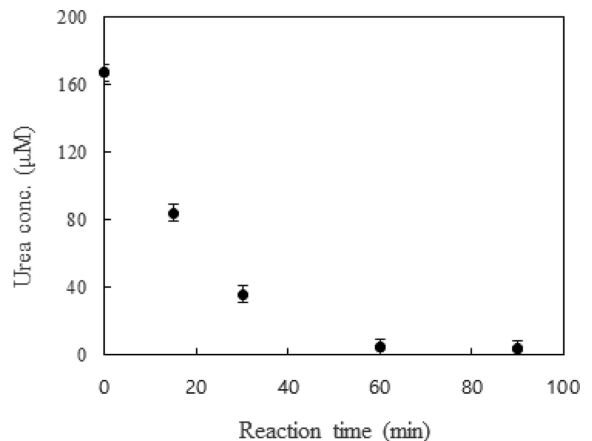


Fig. 5. Urea concentration of 10 ppm urea aqueous solution as a function of reaction time.

측정이 타당하게 수행되었음을 인지할 수 있었다. 도출된 표준곡선을 이용하여 요소가 중탄산음이온으로 바뀌는 전환율을 산출할 수 있다.

시간에 따라 요소가 중탄산음이온으로 전환되는 양상을 분석하였다. 반응시간이 1시간 가량 지나면 대부분의 요소가 전환되며 1시간 30분이면 요소의 전환이 포화된 것으로 나타났다(Fig. 5). 효소에 의한 반응속도 분석을 위하여, 효소 반응에 대해 가장 일반적인 모형식인 Michaelis-Menten식을 아래와 같이 고려하였다.

$$\frac{d[\text{Urea}]}{dt} = \frac{k_{cat}[\text{Urea}][E]}{k_m + [\text{Urea}]}$$

위 모형식에서 [E]는 효소의 농도, k_{cat} 는 촉매 속도 상수이고 k_m 은 Michaelis-Menten 상수이다. 이 식의 상수들을 산출하기 위하여, 다음과 같은 과정들을 수행하였다. 초기 요소의 농도는 제조사의 주입양으로부터 산출하였다. 그리고, 더 이상 값의 변화가 없는 1시간 30분에서의 전류값으로부터 중탄산음이온 값을 구하였으며, 화학 반응식의 계수비 관계로 요소의 양을 추산하였다. 그리고, 요소와 중탄산음이온의 분자량(요소 60.06 g/mol, 중탄산음이온 61.0168 g/mol)으로 몰 수를 산출하였다. 즉, 여기에서 구한 시간에 따른 중탄산음이온의 몰 농도를 초기 요소의 몰 농도에서 차감하였다. 따라서, 시간에 따른 요소의 몰 농도를 구할 수 있었다. 또한 시간에 대한 요소 농도의 변화율은 중탄산음이온 농도의 변화율을 이용할 수 있다. 따라서, Michaelis-Menten식이 변형된 Lineweaver-Burk Plot이 Fig. 6에 제시되어 있다[11].

Fig. 6에 제시된 직선의 결과와 같이, 실험값들을 fitting한 결정계수가 0.743으로 Lineweaver-Burk Plot이 실험 결과와의 일치성이 높지 않은 것으로 판단된다. 따라서, 이 Plot으로부터 산출되는 k_{cat} 는 대표성을 갖기 어려운 것으로 판단된다. 따라서, 본 실험의 요소 전환을 아래와 같이 요소 농도의 1차반응으로 고려하여 해석하였다[12,13].

$$\frac{d[\text{Urea}]}{dt} = k[\text{Urea}]$$

이 식에서 k는 반응속도 상수로, 효소의 활성화도에 대한 척도이다. 위 모형식으로 fitting한 결과는 Fig. 7에 제시되어 있다. 1차 반응으로 fitting한 결정계수는 0.9353으로 반응의 특성을 나타내기에

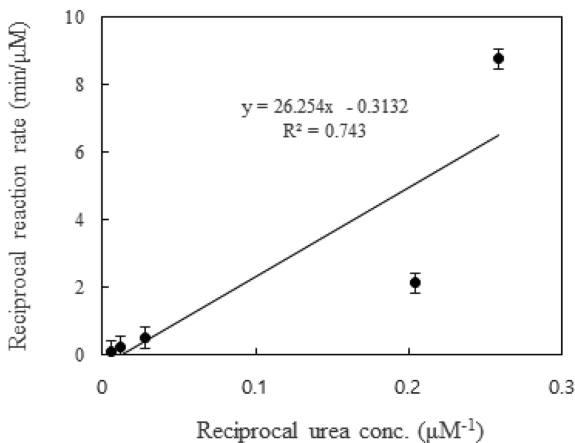


Fig. 6. Lineweaver-Burk Plot of urea concentration of 10 ppm urea aqueous solution as a function of reaction time.

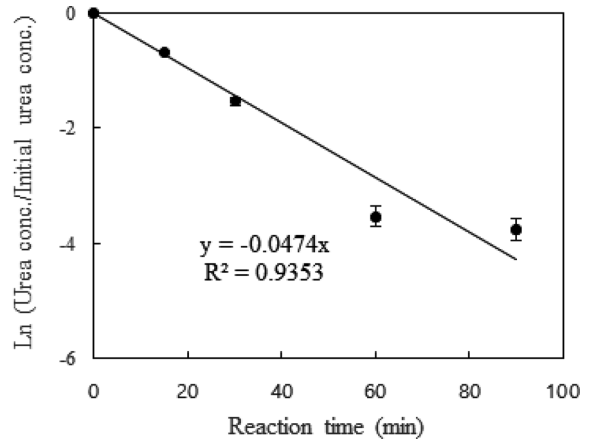


Fig. 7. Plot of first-order equation for urea concentration over time.

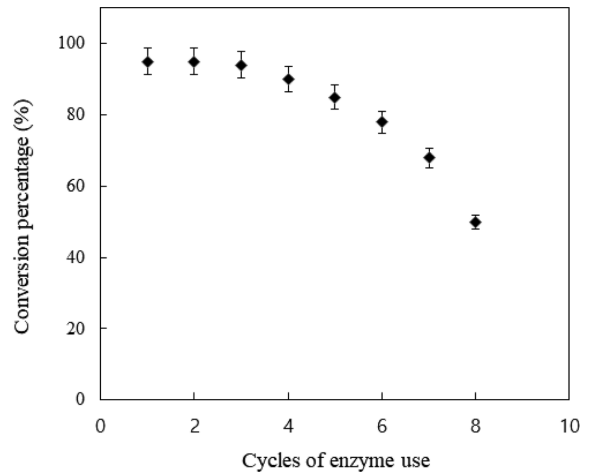


Fig. 8. Conversion efficiency of urea to bicarbonate anion by reuse number.

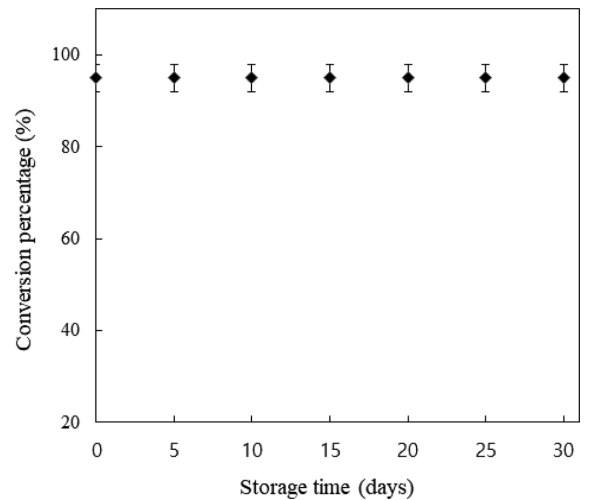


Fig. 9. Conversion efficiency of urea to bicarbonate anion according to storage time.

적합하며, 반응 속도상수는 0.0474 min⁻¹로 산출된다. 1차 반응 모형이 효소 반응에 일반적이지 않음에도, 요소분해효소에 대한 선행 연구들에서 적용됨이 확인되었다[14,15].

요소분해효소가 고정화된 자성입자를 회수하여 요소를 분해하는

과정이 반복되었다. 전환율 50%가 되는 시점까지 반복되었으며, 여덟 번째 재활용할 때 50%에 이르는 결과가 산출되었다. 처음 1~3회까지는 90% 이상의 전환율이 보이며, 이후에 재활용 횟수에 따라 점진적으로 전환율이 낮아지는 것이 관찰되었다. 재활용 횟수에 따른 전환율 결과가 Fig. 8에 제시되어 있다. 고정화된 요소분해 효소의 저장성에 대하여 평가되었다. 5일 간격으로 30일 동안 조사되었으며, 이 기간 동안에 효소의 활성 감소는 관찰되지 않았다 (Fig. 9). 이 결과는 효소 고정화가 구조의 변화를 억제하여 나타난 결과로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 자성입자에 공유결합을 통해 고정화시킨 요소분해효소가 가지는 요소의 분해정도, 재활용성, 저장에 대한 안정성 등을 평가하였다. 고정화를 위하여 EDC/NHS 반응에 의해 요소분해효소와 자성입자표면 사이에 결합을 형성하였다. 요소로부터 중탄산음이온이 생성되는 것을 HPLC와 UV/Vis분광기로 확인하였으며, CV로 정량적인 전환율을 측정하고 이를 반응속도식으로 분석하여 0.0474 min^{-1} 의 활성화도를 산출하였다. 처음 1~3회에서는 90% 이상의 전환율을 확인하였으며, 50% 전환율까지 8회 재활용이 가능하였다. 30일 동안의 저장에 대하여 평가된 안정성은 유지되는 것으로 관찰되었다. 본 연구의 결과, 지지체에 공유결합으로 고정된 요소분해효소는 초순수제조 목적으로 요소제거에 활용될 수 있음을 알 수 있다. 후속 공정으로서 이온교환 또는 역삼투와 연계되어 초순수 제조에 접목이 기대된다.

감 사

본 연구는 한국수자원공사(K-water)의 개방형 혁신 R&D (OTSK_2022_003) 사업의 일환으로 수행되었습니다.

References

1. KAIA Issue Report, Ultrapure-water industry and technology (May, 2013).
2. Choi, J. and Chung, J., "Evaluation of Urea Removal by Persulfate with UV Irradiation in An Ultrapure Water Production System," *Water Res.*, **158**, 411-416(2019).
3. Ryzdzewski, J. H. and Carr, G., "Advanced Organics Oxidation-Removing Urea from High-purity Water," *Ultrapure Water* **20**, 20-26(2003).
4. Godec, R., "Measurement and Removal of Trace Levels of Urea," *Ultrapure Water* **20**, 27-33(2003).
5. Coulter, B., Sundstrom, G., Hall, C. and Doung, S., "An Advanced Oxidation Process Update for Removal of Low Organic Levels, Ultrapure Water Micro," *Ultrapure Water Micro*, Dec., Phoenix, AZ, U.S.A., 1-11(2014).
6. Joko, I. and Miwa, S., "Treatment Method for Water Containing Nitrogen Compounds," US Patent 6132627A(1997).
7. Traynor, J., Mactier, R., Geddes, C. C. and Fox, J. G., "How to Measure Renal Function in Clinical Practice," *BMJ*, **333**, 733-737(2006).
8. Manaf, M. R. A., Hassan, M. R., Shah, S. A., Johani, F. H. and Rahim, M. A. A., "13C-Urea Breath Test Accuracy for Helicobacter pylori Infection in the Asian Population: A Meta-Analy-

9. Karplus, P. A., Pearson, M. A. and Hausinger, R. P., "70 years of Crystalline Urease: What Have We Learned?," *Acc. Chem. Res.*, **30**, 330-337(1997).
10. Kang, M. J. and Park, J.-W., "Amplification of Urea Detection Based on pH-sensitive Liposomes," *Electron. J. Biotechnol.*, **52**, 30-34(2021).
11. Lee, J., *Biochemical Engineering*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ(1992).
12. Lee, S.-R., Park, Y. and Park J.-W., "Kinetic and Thermodynamic Studies of Cinnamycin Specific-adsorption on PE-Included-Membranes Using Surface Plasmon Resonance," *J. Biotechnol.*, **320**, 77-79(2020).
13. Shin, G., Kunn, H., Lee, S. and Park, J.-W., "Binding Behavior Between Transforming-Growth-Factor-Beta1 and Its Receptor Reconstituted in Biomimetic Membranes," *Membranes*, **13**, 446(2023).
14. Andrich, L., Esti, M. and Moresi, M., "Urea Degradation Kinetics in Model Wine Solutions by Acid Urease Immobilised Onto Chitosan-derivative Beads of Different Sizes," *Enzyme Microb. Technol.*, **46**, 397-405(2010).
15. Lasisi, A. A. and Akinremi, O. O., "Kinetics and Thermodynamics of Urea Hydrolysis in the Presence of Urease and Nitric Inhibitors," *Can. J. Soi Sci.*, **101**, 192-202(2021).

Authors

Yeseul Park: Researcher, Department of Chemical and Biomolecular Engineering, College of Energy and Biotechnology, Seoul National University of Science and Technology, Gongreung-ro 232, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea; grso2003@naver.com

Jieun Kwon: Senior Student, Department of Chemical and Biomolecular Engineering, College of Energy and Biotechnology, Seoul National University of Science and Technology, Gongreung-ro 232, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea; 20101608@seoultech.ac.kr

Seungjun Jung: Senior Student, Department of Chemical and Biomolecular Engineering, College of Energy and Biotechnology, Seoul National University of Science and Technology, Gongreung-ro 232, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea; tbwn621@naver.com

Hyukjin Cho: Senior Student, Department of Chemical and Biomolecular Engineering, College of Energy and Biotechnology, Seoul National University of Science and Technology, Gongreung-ro 232, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea; kechiwu9999@naver.com

Gounhanul Shin: Senior Student, Department of Chemical and Biomolecular Engineering, College of Energy and Biotechnology, Seoul National University of Science and Technology, Gongreung-ro 232, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea; sky000928@gmail.com

Gangik Cho: Senior Student, Department of Chemical and Biomolecular Engineering, College of Energy and Biotechnology, Seoul National University of Science and Technology, Gongreung-ro 232, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea; chogi0203@naver.com

Jin-Won Park: Professor, Department of Chemical and Biomolecular Engineering, College of Energy and Biotechnology, Seoul National University of Science and Technology, Gongreung-ro 232, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea; jwpark@seoultech.ac.kr

Kyung-Hyuk Lee: Head Researcher, K-water Research Institute Water & Wastewater Research Center, 125, Yuseong-daero 1689 beon-gil, Yuseong-gu, Daejeon 34045, Korea; kh.lee@kwater.or.kr