

Glucose Oxidase의 고정화에 관한 연구

노유경, 이신희, 박수민

부산대학교 섬유공학과

1. 서론

효소는 광범위하게 사용되는 생촉매로서 의약분야에서 식품분야에 이르기까지 여러 분야에서 사용되어 왔다. 그러나 free enzyme은 그 활성 유지와 효율적 사용성에서 제한이 있어 고정화하는 방법이 제안되어 왔다. 기질로서는 독성이 없어야 하며, 효소반응에 적당한 큰 표면적을 가지고 있어야 한다.

키토산은 천연 생체고분자인 키틴을 탈아세틸화하여 만든 것으로 셀룰로오스와 화학적으로 비슷한 구조를 가지고 있다. 키토산은 2번 탄소 위치에 아미노기(-NH₂)를 가지고 있어 셀룰로오스와 키틴에 비해 높은 용해성과 반응성을 가진다. 또한 천연고분자이기 때문에 생체적합성, 무독성이며 아미노기는 높은 반응성으로 효소를 고정화하는데 효과적이다.

가교제로 사용된 epichlorohydrin은 가교촉매가 알칼리이며, 이 알칼리는 또한 반응 후 용매를 중화하는 상분리제이기도 하다. 따라서 가교반응의 부산물인 HCl과 용매인 acetic acid의 경쟁반응에 의해 가교와 상분리가 일어나므로 가교속도 및 상분리 속도를 제어할 수 있다.

본 연구는 생체적합성을 가지고 있는 키토산을 기질로 하여 epichlorohydrin을 가교제로 사용하여 막을 제조하고 여기에 여러 조건을 달리하여 glucose oxidase(GOD)를 고정화하고 고정화의 최적조건을 검토해보았다.

2. 실험

2.1 시료 및 시약

키토산((주)태훈키토산 제공)은 탈아세틸화도 95%(적정법) 분자량 약 20만(점도측정법)을 사용하였으며, epichlorohydrin, glucose oxidase(GOD), β -D-glucose, peroxidase(POD), o-dianisidine, buffer solution(pH 5, 6, 7, 8)은 특급시약으로 정제없이 그대로 사용하였다.

2.2 가교 키토산의 제조

키토산 1 g을 40ml의 1 M acetic acid에 넣어 충분히 용해시킨 후 0.1, 0.5, 1.0 M 농도의 epichlorohydrin/acetic acid 용액 80ml에 넣어 25℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 이렇게 가교된 키토산을 2M의 NaOH를 넣어 중화하고 증류수로 여러 번 씻은 후 filtering하고 건조

시켜 형성한다. 형성된 가교 키토산은 무게 0.15g의 직경 4cm의 원형으로 잘라 사용하였다.

2. 3 효소의 고정

효소를 고정화하기 위해 제조된 가교 키토산을 여러 농도의 glucose oxidase(GOD)/buffer(pH 5, 6, 7, 8) 용액 10 ml에 넣고 여러 온도(20, 25, 30, 35°C)에서 여러 시간(30, 60, 90, 120 min)동안 반응시켜 최적의 pH, 농도와 온도, 시간을 측정한다.

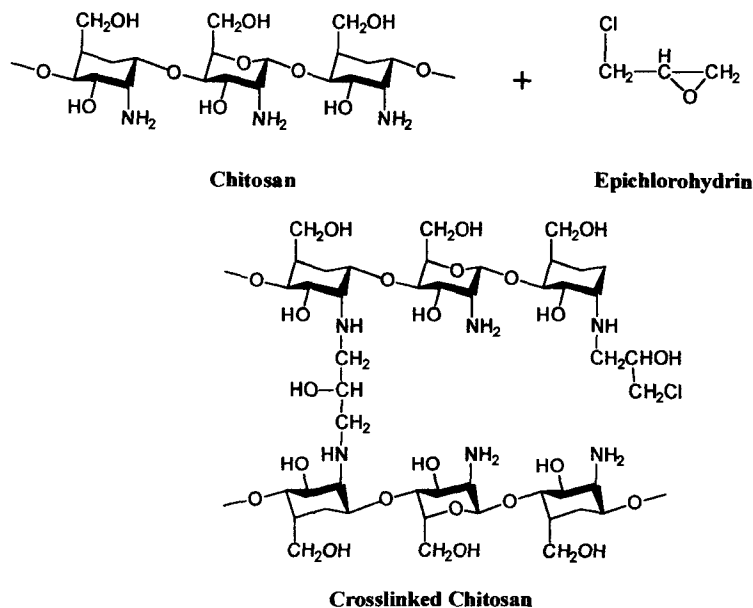
고정된 GOD의 양은 UV spectrophotometer(Shimadzu UV-1601, Japan)을 사용하여 276nm에서의 calibration curve를 측정하였다.

$$\text{Immobilized GOD(mg/g polymer)} = \frac{(C_o - C_d) \times V}{m}$$

여기에서 C_o 와 C_d 는 고정된 GOD(mg/ml)의 초기와 마지막 농도; m 은 가교 키토산의 무게; V 는 수용액의 총부피(ml)를 나타낸다.

고정된 GOD의 activity는 glucose conversion에서 발생하는 과산화수소의 양을 측정하였다. POD(1.5 mg)와 o-dianisidine(3.3 mg)가 들어있는 50 ml의 pH 7의 phosphate buffer를 25°C에서 10분간 반응시킨 후 2.5 ml를 0.1 ml의 GOD로 산화시킨 D-glucose를 첨가하여 assay mixture를 제조한다. 10분 후 1.5 ml의 sulphuric acid solution(30 v/v%)을 넣어 색상을 안정시킨다. 효소의 activity는 최대 흡수파장 528nm에서 측정하였다.

한 단위의 glucose oxidase는 1 μ mol의 β -D-glucose를 D-gluconic acid와 과산화 수소를 발생시키는 양으로 정의되며 이때의 조건은 25°C, pH 7이다.

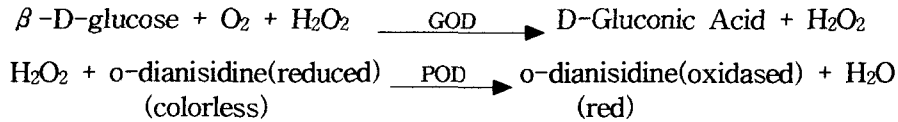


Scheme 1. The reaction for crosslinking of chitosan with epichlorohydrin

3. 결과

Scheme 1.은 키토산과 epichlorohydrin과의 가교반응을 나타내었다.

β -D-glucose의 GOD에 의한 산화반응은 다음과 같다.



3. 1 고정화 시간의 변화에 따른 영향

고정화 시간에 따른 효소의 고정화 양을 알아보기 위한 실험으로 0.1, 0.5, 1.0M의 epichlorohydrin으로 가교한 키토산을 0.1 mg/ml의 GOD 용액(pH7) 10 ml에 25℃에서 30, 60, 90, 120분으로 처리하였다. 가교 키토산 1g당 고정화된 GOD의 activity를 Fig. 1에 나타내었다. 결과, 고정화 activity가 전반적으로 가장 높게 나타난 60분을 효소 고정화 시간으로 결정하였다. 가교제 epichlorohydrin의 농도가 증가할수록 activity가 감소하는 이유는 유리 아미노기의 감소 때문으로 가교도가 가장 낮은 0.1 M 농도에서 가장 큰 활성을 나타낸다.

3. 2 고정화 농도의 변화에 따른 영향

고정화 농도에 따른 영향을 알아보기 위한 실험으로 각각의 시료를 25℃에서 60분간 0.05, 0.5, 1.0, mg/ml의 GOD 용액(pH 7)에 처리하였다. 그 결과를 Fig. 2에 나타내었으며 고정화된 효소의 활성은 0.1 mg/ml에서 가장 높게 나타났고 이 농도를 효소 고정화 농도로 결정하였다.

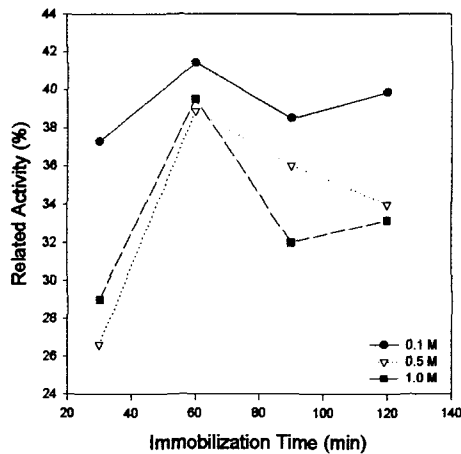


Fig. 1 Effects of immobilization time on GOD immobilization. Immobilization conditions; pH, 7.0 ;temp, 25℃; GOD initial conc., 0.1 mg/ml ; aqueous phase, 10 ml of phosphate buffer

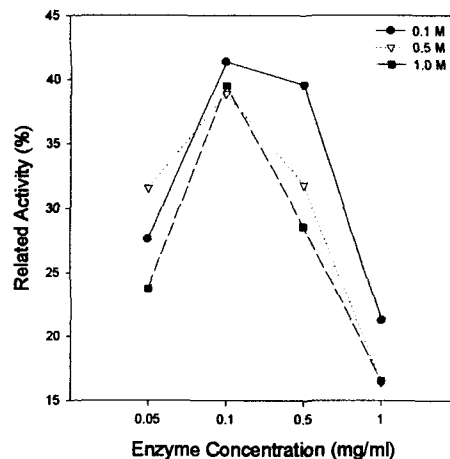


Fig. 2 Effects of GOD initial concentration on GOD immobilization. Immobilization conditions; pH, 7.0; temp., 25℃; time, 60min; aqueous phase, 10 ml of phosphate buffer

3. 3 고정화 온도의 변화에 따른 영향

고정화 온도에 따른 영향을 알아보기 위해 각각의 가교 키토산을 0.1 mg/ml의 GOD 용액 (pH 7)에 60분 동안 20, 25, 30, 35°C로 고정화하였다. 그 결과를 Fig. 3에 나타내었으며 30°C에서 가장 큰 활성을 보였고, 이 온도를 고정화 온도로 결정하였다.

3. 4 고정화 pH의 변화에 따른 영향

고정화시 pH에 따른 영향을 알아보기 위해 시료를 30°C에서 60분 동안 0.1 mg/ml 농도의 GOD 용액-pH 5, 6, 7, 8의 buffer solution에서 처리하였다. 그 결과를 Fig. 4에 나타내었으며 그 결과 pH 6에서 가장 큰 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

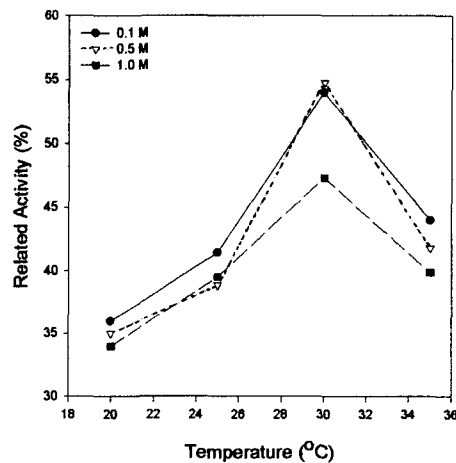


Fig. 3 Effects of immobilization temperature on GOD immobilization. Immobilization conditions ; pH, 7.0; time, 60min; GOD initial conc., 0.1 mg/ml; aqeous phase, 10 ml of phosphate buffer

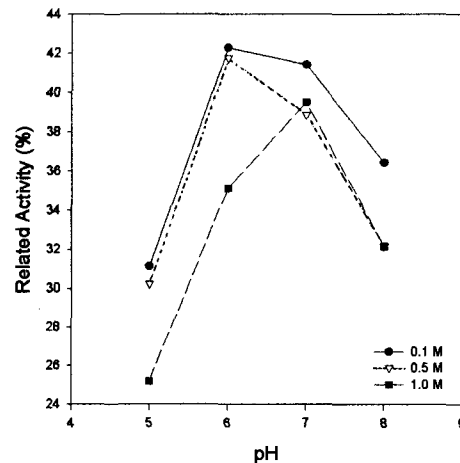


Fig. 4 Effects of immobilization pH on GOD immobilization. Immobilization conditions; GOD initial conc., 0.1 mg/ml; temp., 30°C; time, 60min; aqeous phase, 10 ml of phosphate buffer

4. 결론

epichlorohydrin 가교된 키토산에서의 효소 glucose oxidase(GOD)의 고정화에 관한 연구로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 가교제 epichlorohydrin의 농도가 증가할수록 상대활성(related activity)가 감소하였다.
2. 효소 고정화 시간 60분에서 최대 활성을 나타내었다.
3. 고정화 효소 농도 0.1 mg/ml에서 최대 활성을 나타내었다.
4. 고정화 온도 30°C에서 활성이 가장 크게 나타났다.
5. 고정화시 pH 6에서 최대활성을 나타내었다.

5. 참고문헌

1. M. Yakup Arica, Vasif Hasirci, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 58, 287(1993)
2. Claudio Airoidi, Oyrton A.C. Monterio, JR, *J. Appl. Polym. Sci.*, 77, 797(2000)
3. Deepak A. Musale, Ashwani Kumar, *Separ. Purif. Technol.*, 21, 27(2000)