

카르복시메틸화 RMP를 이용한 효소 고정화시트의 제조

조남석[†]

(2003년 2월 14일 채택; 2003년 4월 25일 접수)

Manufacturing of Enzyme Immobilized Sheet Using Carboxymethylated RMP Substrate

Nam-Seok Cho[†]

(Received on February 14, 2003; Accepted on April 25, 2003)

ABSTRACT

This study was performed to develop the new type enzyme immobilization sheet from carboxymethylated refiner mechanical pulp (CRMP) substrate. Enzyme immobilization was attempted to couple carboxyl groups of CRMP with amino groups of the enzyme, trypsin, through the reaction of carbodiimide reagent, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide (EDC). Immobilization carrier, water insoluble CRMP fraction (CRMP-IS), was successfully reacted with the enzyme, formed peptide linkage like -CONH- at 1680cm^{-1} and new ester linkage like $-\text{COOCH}_3$, methylester at 1735cm^{-1} , and produced enzyme immobilized substrate (CRMP-IST). The enzyme immobilized handsheet was prepared by mixing the above chelated enzyme immobilized substrate (CRMP-IST) with kraft pulp by paper sheet machine like papermaking process. The sheet weight and strength were increased with increasing dosage of CRMP-IST, and decreased at more than 10% mixing of CRMP-IST, but higher than the controls. Concerning activities of immobilized trypsin (CRMP-IST) sheet by caseinolysis, the teared-off sheet with shaking was shown higher enzyme activities than sheet shape without shaking.

In conclusion, this enzyme immobilized sheet would be expected easy handling for practical application and reutilization.

Keywords: *carboxymethylated, refiner mechanical pulp, immobilization, trypsin, enzyme immobilized sheet*

• 본 연구는 1998 농림기술센터의 연구비 [농특과제 “저이용 목질계재료를 이용한 고반응성 기질의 제조 및 고부가 신소재 개발연구”] 지원에 의하여 수행되었음.

• 충북대학교 산림과학부(School of Forest Resources, Chungbuk National University, Cheongju, Korea)

† 주저자(Corresponding author) : e-mail: nscho@chungbuk.ac.kr

1. 서론

셀룰로오스의 유도체분야는 역사나, 그 용도가 매우 많으며, 따라서 가장 많이 이용되고 있는 셀룰로오스의 에틸화 제품가운데 카복시메틸화 (Carboxymethylation) 유도체가 널리 이용되고 있다. 우리나라의 경우 1999년의 통계에 의하면, 셀룰로오스제품의 수입량이 약 5,000천톤, 금액으로 환산하여 8억불에 상당하는데, 그 가운데 셀룰로오스 유도체로서 3천만불이나 수입하며, 특히 식품첨가물, 호료, 약품, 화장품등 그용도가 매우 넓은 Carboxymethyl cellulose 만도 약 1,000톤에 달해, 금액으로서 280만불이나 되며, 금후도 그 수요는 점증하여 그 수입량 또한 계속하여 늘어날 전망으로 있는 실정이다. 이러한 CM화는 전술한 셀룰로오스 제품으로서의 용도 이외에 펄프 및 종이의 결합강도를 증진시키기 위한 연구¹⁻³⁾ 또한 많이 진행되었으며, CM 치환도의 증가와 종이의 강도가 직선적인 증가현상을 결과하였다. 근년에 와서 기능성 고분자에 관련된 연구⁴⁻⁷⁾가 주목을 끌고 있으며, Cellulose 에 관해서도 종래까지의 소재로서의 용도로 부터, 유도체를 만들므로서 인한 기능성 고분자 재료의 제조 및 그 용도 개발에 관심이 기우려지고 있는 실정이다. 셀룰로오스 유도체⁸⁻¹²⁾로서 이용되는 분야는 섬유 및 직물의 호료제조, 성형프라스틱, 필름, 식품첨가물, 화장품, 각종 의약품, 농약, 도료, 도기, 폭약 등 광범위하게 이용되고 있다. 나아가서 고성능 기능성을 가진 유도체로서 역삼투막, 한외여과막, 정밀여과막, 투석막의 수요가 매우 많으며, 셀룰로오스의 난연화, 이온교환체, 흡착제, 광전도체, 생물 활성물질, 액정분야에 까지 걸쳐, 그 용도가 매우 다양하여 금후의 기술개발이 크게 기대되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 전보^{13,14)}에 이어서 자기가수분해 처리한 목질계 시료를 이용하여 제조된 고반응성 시료를 재료로 하여 CMC를 제조하고 이 CM화 시료를 이용, 시트 (Sheet) 상의 효소고정화를 시도하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 공시재료

본 실험에서는 캐나다로부터 수입한 침엽수 리파이 나기계펄프(Refiner mechanical pulp, RMP)을 사용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 카르복시메틸화

Isopropanol 을 이용한 표준용매법^{3,15)}에 의해 카르복시메틸화를 수행하였다. 15g의 RMP를 400ml의 isopropanol alcohol에 넣고 잘 교반하면서 30%의 NaOH 40 ml를 30분간 천천히 적하시키면서 교반을 계속, 실온에서 1시간 반응시켰다. 다음 monochloroacetic acid 18g을 30분간에 걸쳐서 천천히 가해주며, 반응용기를 55℃의 항온수조로 옮겨, 3시간 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝나면 바로 여과하여 카르복시메틸화물을 80% ethanol에 현탁시키고, 현탁액중의 과잉으로 포함되어 있는 알칼리를 중화시키고 여과하여 30% ethanol로 3 회 세척하고, 다시 100% ethanol로 수회 세척하여 진공건조시켜 CRMP를 얻었다.

2.2.2 CRMP의 정제

CRMP를 실온에서 3회이상 이온교환수로로 추출하여 물가용부(CRMP-S)와 물불용부(CRMP-IS)를 얻었다. CRMP-S는 45℃에서 농축하여 동결건조시키고, 산가용성 리그닌함량을 측정하였다.¹⁶⁾ CRMP-IS는 80%의 ethanol 및 methanol로 용매치환시킨 후, Klason 리그닌 및 산가용성 리그닌량을 구하였다.

2.2.3 단백질분해효소(trypsin)의 고정화

CRMP-IS 5 g에 0.2 M(pH 5.0) 인산완충용액에 현탁시키고, trypsin효소 5 g을 가하였다. 이에 carbodiimide 시약인 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)를 5 g 가하고, 교반시키면서 실온에서 8 시간 반응, 여과하여 반응을 중지시키고, 인산완충용액 (0.1 M, pH 5.0)으로 2 회, 염산-구연산나트륨 완충용액(0.1 M, pH 3.0, 1 M NaCl)으로 8 회, 이온교환수로 5 회 세척후 적당량의 이온교환수에 현탁시켜 CRMP에 trypsin을 고정화시킨 CRMP-IST를 조제하여, 동결건조시켜 보존하였다.

2.2.4 고정화 CRMP-IST 의 효소활성 측정

CRMP-IST를 10, 20, 50mg 취하고, 0.1N NaOH로 pH를 조절한 1% 카제인용액 2 ml, 0.2M, pH 7.5의 인산완충용액 1.5ml와 혼합후, 35℃에서 30분간 반응시켰다. 반응은 trichloroacetic acid 수용액 5

ml를 가하여 중단시키고, 생성된 침전은 원심분리시켜 제거하고, 상등액의 흡광도를 280nm에서 측정하여 카세인으로부터 분해 생성된 아미노산의 농도를 측정함으로써 trypsin의 활성을 측정하였다.

2.2.5 고정화효소 시트제조

제조한 고정화효소의 사용 및 취급을 편리하게 하기 위한 방법으로서 섬유형태를 살려서 고정화효소 시트를 조제하고자 하였다. 표백 침엽수 크라프트펄프(Softwood bleached kraft pulp, SwBKP)를 PFI mill을 사용, 고해처리하고, 이 고해펄프와 단백질분해효소(trypsin)를 고정화시킨 시료를 혼합, 초지하여 고정화효소시트를 제조하였으며, 조습후 인장강도 및 시트의 효소활성을 측정하였다.

1) SwBKP 의 고해

SwBKP를 PFI mill을 사용하여 1.8kg/cm, Clearance 0.2mm, 펄프농도 10% 조건에서 5,600 회전 고해처리 하였다.

2) 고정화효소시트의 조제

전항에서 고해한 펄프와 단백질분해효소(trypsin)를 고정화시킨 CRMP-IST를 혼합, 현탁시켜 원통형 수초지기에서 초지하였다.

3) 고정화효소 시트의 활성측정

상기 2.2.4 항의 방법으로 활성을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 CRMP의 성상

RMP를 표준적인 용매법으로 55℃에서 3시간 반응시켜 조제한 CRMP 및 이를 물로 추출하여 얻은 가용부(CRMP-S), 그리고 불용분(CRMP-IS)의 리그닌함량을 측정한 결과를 Table 1에 나타냈다. Tuyet 등^{17,18)}은 Klason리그닌함량 26.4%, 산가용성리그닌함량 0.2%의 RMP를 사용하여 Kalson lignin 함량 25%, 산가용성 리그닌함량 0.7%의 RMP-IS를 얻을 수 있었으며, 본 연구의 결과와 거의 일치하고 있다.

Carbodiimide 시약의 반응을 통한 고정화과정은 CRMP 시료가 가지고 있는 carboxyl기에 carbodiimide

Table 1. Lignin content of carboxymethylated RMP(CRMP) products

Sample	Klason lignin, %	Acid soluble lignin, %
RMP(control)	27.5	0.35
CRMP-IS	25.6	1.4
CRMP-S		2.0

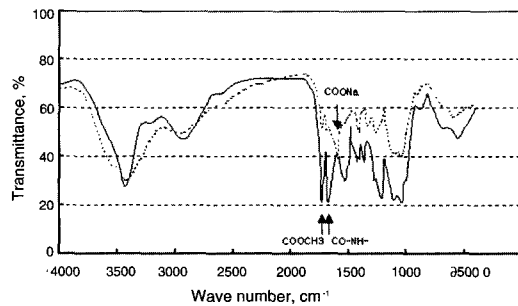


Fig. 1. Peptide formation between CRMP and its methyl ester.

... CRMP-IS; — CRMP-IST

시약인 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide(EDC)를 사용하여 효소단백질이 가지는 amino기를 peptide결합시켜 효소를 CRMP에 고정화시키는 것이다. Fig. 1 은 CRMP-IS와 EDC, 그리고 단백질분해효소인 trypsin을 반응시켜 얻은 IR 스펙트럼이다. 그림에서 보는 바와 같이 원료로 사용한 CRMP-IS 가 가지고 있던 1600 cm⁻¹의 -COONa 흡수대(Nakano 등, 1990)가 2시간 EDC와 반응시킨 결과, 이 흡수가 없어지고 -CONH-의 peptide 결합에 의한 1680cm⁻¹ 및 -COOCH₃ methylester의 1735cm⁻¹의 새로운 흡수대가 확인되었다. 그리고 이 반응을 경시적으로 살펴본 결과, carbodiimide가 peptide결합을 형성시키는 것은 반응후 불과 5분정도 경과되었을 때였으며, 매우 신속하게 일어나는 반응으로서 60분이면 반응이 모두 끝나는 것으로 확인되었다. 이러한 결과로부터 carbodiimide의 반응은 저분자의 아미노산과 반응시켰을때 비록 불균일계 반응이라 하더라도 실온에서 신속하게 일어남을 확인할 수 있었다.

3.2 단백질분해효소(trypsin)의 고정화

Trypsin은 alginine 또는 lysine의 carboxyl기측의 peptide결합을 우선적으로 분해시키는 효소로서 소, 돼지의 췌장에 들어 있으며, 분자량은 23,000-

24,000이며, 최적 pH는 8-9 정도로 알려져 있다. 그리고 이 효소는 피혁의 제조, 비단의 처리등에 사용되고 있다. 단백질분해효소의 활성측정은 기질로서 casein을 사용하는 Caseinolysis(Casein 가수분해법)를 사용하였다. Casein은 고분자단백질로서 등전점부근의 pH에서는 물에 녹이기 어려우며, pH 2.0-3.5, pH 6.0-11.0에서는 물에 불용성이다. 따라서 0.2M 인산 완충용액(pH 7.5)으로 casein을 희석시켜, 아미노산의 방향핵에서 유래되는 280 nm에서의 흡수를 사용하여 검량선을 작성하였다. 1% casein(pH 7.5)에 단백질분해효소인 trypsin을 가하고 소정시간 반응시켜, 가수분해시킨 다음, 5% trichloroacetic acid 용액을 가하면 가수분해되지 않은 고분자의 casein분자 및 단백질로부터 유래되는 효소도 활성을 잃으면서 침전되므로 이들 침전을 원심분리시켜 제거할 수 있으며, 상등액을 280nm에서의 흡수로부터 생성된 아미노산의 농도를 측정하고 trypsin의 활성을 측정할 수

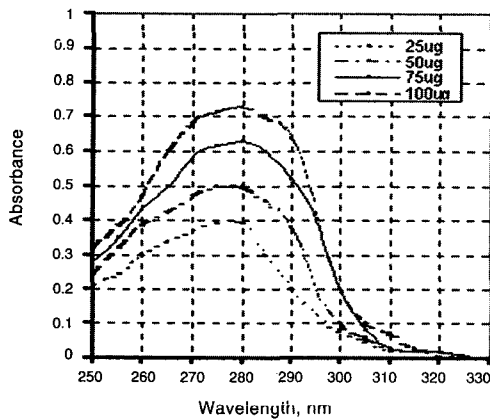


Fig. 2. UV spectra for calibration curve of Trypsin.

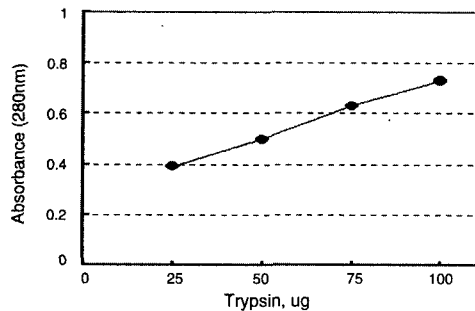


Fig. 3. Calibration of trypsin activity by caseinolysis.

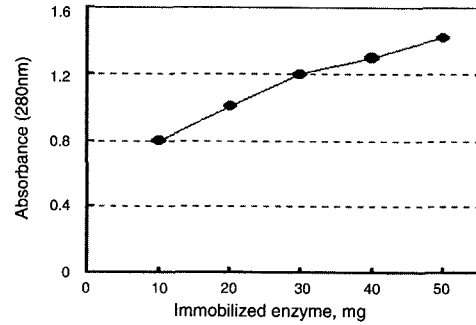


Fig. 4. Activity of immobilized trypsin(CRMP-IST) on CRMP-IS.

있다. Fig. 2 및 Fig. 3는 이러한 방법으로 구한 trypsin의 검량선이다.

Fig. 4는 고정화효소(CRMP-IST)의 총중량은 고정화전후의 중량 변화로부터 CRMP기질에 결합된 효소량을 구하고, 이로부터 고정화효소중의 조효소량을 환산하였을 때 x축의 10, 20, 30, 40, 50mg은 각각 1.2, 2.4, 3.6, 4.7 및 5.9mg이다. 따라서 고정화된 양이 많을수록 활성이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

3.3 고정화효소 시트제조

제조한 고정화효소의 사용 및 취급을 편리하게 하기 위한 방법으로서 CRMP-IS가 가지는 섬유형태를 살려서 고정화효소 시트를 조제하였다. 먼저 고정화효소 시트를 제조하기 위하여 SwBKP를 PFI mill을 사용하여 고해한 펄프와 단백질분해효소(trypsin)를 고정화시킨 CRMP-IST를 5, 10, 20% 혼합하여, 현탁시켜 원통형 수초지기에서 초지하였으며, 20°C, 65%의 관계습도조건에서 조습후 인장강도 및 시트의 효소활성을 측정하였다.

고정화 trypsin을 펄프에 혼합하여 동일한 평량이 되도록 시트를 제조하였으나 제조된 시트의 무게는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 효소의 첨가량이 증가함에 따라 증가되는 것으로 나타났으며, 그림에서의 중량증가값으로 보았을 때 고정화효소가 100% 시트에 잔류됨을 알 수 있었다.

고정화효소를 첨가함에 따른 종이의 두께의 변화를 조사한 결과 Fig. 6에 나타낸 바와 같이 대조구에 비하여 고정화효소를 첨가함으로써 시트의 두께가 다소 증가되는 것으로 나타났다. 그러나 두께의 증가율이 무게의 증가율만큼 크지는 않았다.

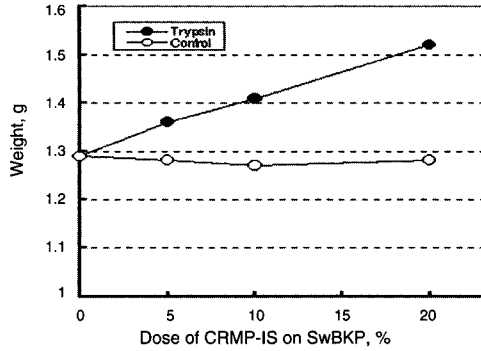


Fig. 5. Effect of dose of immobilized trypsin (CRMP-IST) on weight of handsheet.

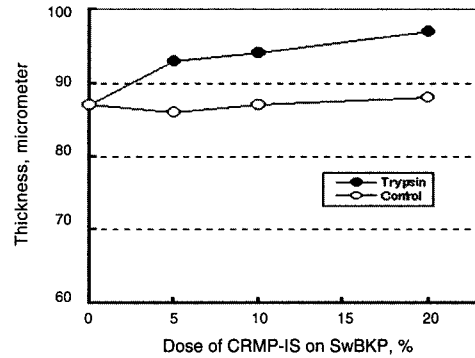


Fig. 6. Effect of dose of immobilized trypsin (CRMP-IST) on thickness of handsheet.

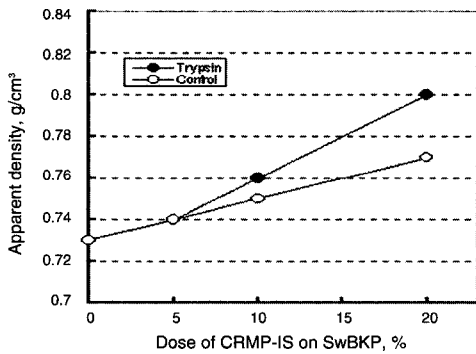


Fig. 7. Effect of dose of immobilized trypsin (CRMP-IST) on apparent density.

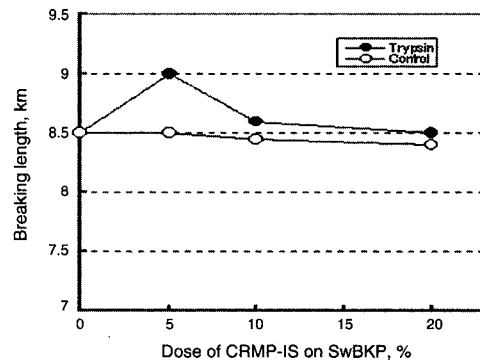


Fig. 8. Effect of dose of immobilized trypsin (CRMP-IST) on handsheet strength.

Fig. 7은 초지시 고정화효소를 첨가하였을 경우 밀도의 증가현상을 나타낸 것으로서, 전술한 바와 같이 종이두께의 증가율이 무게의 증가율만큼 크지 않기 때문에 첨가량이 많아짐에 따라 밀도가 직선적으로 증가하는 현상을 나타냈다. 이러한 사실은 고정화시키지 않은 CRMP가 펄프현탁액중에서 충분히 팽윤되면서 고정화시킨 시료에 비하여 훨씬 bulky한 상태로 펄프간에 결합이 일어나므로써 시트의 밀도가 낮아지는 것으로 생각된다.

초지한 종이의 강도를 Fig. 8에 나타냈는바, 고정화 효소를 첨가한 경우에는 대조구에 비하여 강도가 높게 나타났으며, 첨가량이 증가할수록 열단장이 감소하는 것으로 나타났다. 그리고 5% 정도 첨가한 경우에는 대조구의 강도보다 상당히 높는데 대하여, 10% 이상 첨가하면 시트의 강도차이가 줄어드는 결과를 보여주었다. 이러한 현상은 첨가량이 적은 경우 그 분포가 많지 않기 때문에 응력집중의 불균일로 인하여 일정한 장소에 응력이 집중되는 현상을 나타내서 강도의 차이가

크게 나타나는 것으로 생각된다. 반대로 첨가량이 많아지는 경우에는 충분히 팽윤된 원료들이 잘 분산되어 시트를 이룸으로서 시트의 전 면적에 응력의 집중이 일어나기 때문에 강도의 차이가 크게 나타나지 않는다. 그리고 대조구의 펄프를 충분히 해섬하여 시트를 제조한 경우 강도의 오차가 적어지면서 전체적인 강도는 증가됨을 확인할 수 있었다.

Fig. 9은 사례상에 1매의 고정화시트를 놓고 casein의 분해반응을 관찰한 결과로서 반응중 진탕을 하지 않았다. 그림에서 보는 바와 같이 흡광도의 값이 효소량의 첨가량이 증가하더라도 그다지 증가되지 않았는데, 이는 효소의 촉매작용이 시트의 표면에서만 일어난 결과로 생각된다.

Fig. 10는 시트를 세단하고 진탕하면서 반응시킨 결과로서 고정화 효소의 첨가량이 증가할수록 흡광도의 변화가 매우 크게 나타났다. 이는 고정화시트를 세단하므로써 시트의 반응 표면적이 늘어났으며, 아울러 진탕 효과가 첨가되면서 높은 효소의 활성을 나타내고 있다.

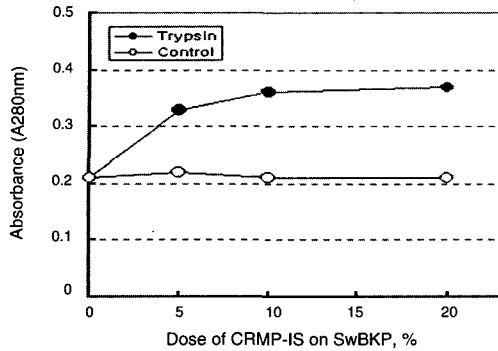


Fig. 9. Activity of immobilized trypsin(CRMP-IST) sheet by caseinolysis (sheet shape, without shaking).

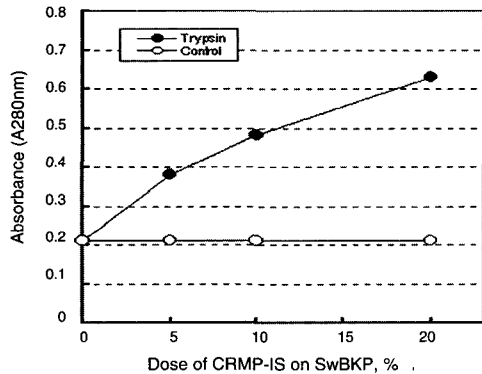


Fig. 10. Activity of immobilized trypsin(CRMP-IST) sheet by caseinolysis (teared-off sheet, with shaking).

4. 결론

리파이나기계펄프(Refiner mechanical pulp, RMP)를 카르복시메틸화하여 물로 추출함으로써 카르복시메틸화 RMP 불용분 (CRMP-IS)을 70%의 수율로 얻었다. 이 불용분은 고도로 카르복시메틸화(Carboxymethylated, CM화)된 다당류분자로 이루어지는데 펄프중에 잔존하는 리그닌분자가 물리적, 화학적으로 작용하여 고도로 치환도를 가지면서 친수성화된 재료이면서도 물에 불용인 상태로 섬유 형태를 유지하였다. 그리고 액체의 흡수성이 우수하였으며, 이들 CM기에 효소류를 peptide 결합시킴으로써 매우 우수한 chelate 재료를 조제할 수 있었다. CRMP 시료에 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide (EDC)를 사용하여 효소단백질이 가지는 amino기를

peptide결합시켜 효소를 CRMP에 고정화시킨 결과, 원료인 CRMP-IS의 1600cm^{-1} 의 $-\text{COONa}$ 흡수대가 없어지고 $-\text{CONH}-$ 의 peptide 결합에 의한 1680cm^{-1} 및 $-\text{COOCH}_3$ methylester의 1735cm^{-1} 의 새로운 흡수대가 확인되었다. 그리고 이 반응을 경시적으로 살펴본 결과, carbodiimide가 peptide결합을 형성시키는 것은 반응후 불과 5분정도 경과되었을 때였으며, 매우 신속하게 일어나는 반응으로서 60분이면 반응이 모두 끝나는 것으로 확인되었다.

고정화효소를 첨가한 경우 대조구에 비하여 강도가 높게 나타났으며, 첨가량이 증가할수록 열단장이 감소하였다. 5% 정도 첨가한 경우에는 대조구의 강도보다 상당히 높은데 대하여, 10% 이상 첨가하면 시트의 강도차이가 줄어드는 결과를 보여주었다. 반대로 첨가량이 많아지는 경우에는 충분히 팽윤된 원료들이 잘 분산되어 시트를 이룸으로서 시트의 전 면적에 응력의 집중이 일어나기 때문에 강도의 차이가 크게 나타나지 않는다.

본 연구에서는 이러한 방법을 이용하여 카르복시메틸화기에 trypsin 효소를 peptide 결합시켜 고정화효소를 제조하였으며, 충분히 높은 효소활성을 가지고 있었다. 이 재료가 가지는 섬유형태를 갖춘 불용분의 특성을 살려 침엽수펄프와 혼합초지함으로서 취급이 매우 편리한 trypsin 를 고정화시킨 고정화효소시트를 제조할 수 있었다. 이 효소고정화시트는 크라프트펄프만으로 초지한 종이의 강도와 비교하여 강도의 저하가 크지 않았으며, 반응시 다시 세단하고 진탕하므로써 충분히 높은 활성을 나타내게 할 수 있었다.

인용문헌

1. Fujimoto, R., Wakasaki, W., M. Hosono and Tsuji, W., Carboxymethylation of cotton fabrics by one step method, *Sen-I Gakkaishi* 30(5,6):137~143(1974).
2. Alince, B., Interfiber bonding by partial carboxymethylation of pulp, *Svensk Papperstidn.* 8:259~262(1976).
3. Green, J.W., Carboxymethyl Cellulose. *In: Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. III, Academic Press, N.Y. pp. 322~327(1963).
4. Freeman, C. and L. Pyle, 1977. Methane Generation by Anaerobic Fermentation, *Intermediate Technol. Publ. Co., London.* pp. 121~250.

5. Kim, S.K., Hong, S.I. and Kang, T.J., Liquid crystalline properties of phenylacetoxo- and trimethylsilyl-cellulose, *In: Cellulose, Structural and Functional Aspect*, Ellis Horwood Ltd., pp. 361~366(1989).
6. Okamura, K., *Chemistry of Organic Resources*, Tokyo Kagakudojin (1981).
7. Ohara, H., *Chemical Reaction of High Polymer, I*, Tokyo Kagakudojin (1972).
8. Haines A.H., Relative reactivity of OH groups in carbohydrates, *Adv. Carbohydr. Chem. Bioeng.* 33:101~109(1970).
9. Bikales, N.M., Ethers from α , β -unsaturated components, *Cellulose Cellulose Derivatives*, 811-833, Wiley Intersci. N.Y. (1971).
10. Tesoro, G.C. and Willard, J.J., Crosslinked cellulose. *In: Cellulose and Cellulose Derivatives* (Bikales, N.M. and L. Segal Eds.), Wiley Intersci. N.Y., 835~875(1971).
11. Balsler, K. and Iseringhausen, M., Cellulose ather. *In: Ullmann Encyklopadie der Technischen Chemie*, 4th Ed., vol. 9, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 192~ 212 (1975).
12. Buytenhuys, F.A. and Bonn, R., 1977. Distribution of substituents in CMC, *Papier* 31 : 525~ 527 (1977).
13. 조남석, 김병로, 백기현, 저급목재의 자기가수분해 전처리에 의한 고순도 셀룰로오스기질의 제조, *목재공학* 30(4): 8-16(2002).
14. 조남석, 탈리그닌한 자기가수분해시료로부터 준비한 카르복시메틸화 시료의 특성, *목재공학 (투고중)* (2003).
15. Nakano T., Honma, S., Ehata, S. and Matsumoto, A., Carboxymethylation of wood by ethanol-water reaction medium. *Mokuzai Gakkaishi* 36(3):193-199(1990).
16. 박상진, 이종윤, 조남석, 조병목, 목재과학실험서, 광일문화사, pp. 489~534(1993).
17. Tuyet, L.T.B., Ishizu, A. and Nakano, J., Preparation of carboxymethyl cellulose from refiner mechanical pulp. *Kamipa Gikyoshi* 35(9): 44-50(1981).
18. Tuyet, L.T.B., Iiyama, K. and Nakano, J., Preparation and properties of liquid absorbent from carboxymethylated mechanical pulp. *Mokuzaigakkaishi* 31(9): 752-760 (1985).