

우레아제(Urease) 고정막에 의한 요소(Urea)의 가수분해

김병식[†] · 김 민* · 허광범 · 홍주희 · 나원재* · 김재훈*

동국대학교 생명·화학공학부, *동국대학교 안전환경시스템공학과
(2006년 4월 4일 접수, 2007년 1월 3일 채택)

Hydrolysis of Urea by Immobilized Urease Membrane

Byoung-Sik Kim[†], Min Kim*, Kwang-Beom Heo, Joo-Hee Hong, Won-Jae Na*, and Jae-Hun Kim*

Department of Chemical & Biochemical Engineering, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

*Department of Safety & Environmental System Engineering, Dongguk University, Gyeongsangbuk-do 780-714, Korea

(Received April 4, 2006; accepted January 3, 2007)

본 연구에서는 인체의 해로운 요소를 분해하고 분해 생성물인 암모니아(NH₃)의 제거를 위한 우레아제 고정막 제조와 가수분해 특성에 관하여 검토되었다. 우레아제 고정막은 방사선 그래프트 중합법에 의해 다공성 중공사막에 음이온 교환기로서 DEA를 도입한 후 요소의 가수분해를 위해 우레아제를 고정시켜 제조하였다. 음이온 교환기가 도입된 막에 우레아제가 고정된 경우 그래프트율이 증가할수록 고정량이 증가하였다. 이것은 그래프트율이 증가할수록 그래프트 체인이 신장하여 단백질이 다층으로 고정되기 때문이다. 한편, 가교제의 첨가는 우레아제 고정막의 세척 과정에서 발생하는 탈리 현상을 억제할뿐 아니라 막의 반복사용도 가능하게 하였다. 5 h의 가교 반응을 통하여 탈리현상이 발생되지 않는 우레아제 고정막을 제조하였으며, 이때 제조된 우레아제 고정막은 1 mol과 4 mol의 요소 용액에서 각각 98%와 50% 이상의 가수분해 성능을 나타내었다.

In this study, we examined the preparation and hydrolysis property of immobilized urease membrane to decompose harmful urea in the body and remove ammonia which was produced by its decomposition. Urease immobilized membrane was prepared by introducing anion-exchange group DEA into porous hollow-fiber membrane by radiation graft polymerization method, and immobilization of urease. When urease was immobilized at membrane introduced with anion-exchange group, the more increasing grafting rate, the more increasing immobilization amount. The result originates from the fact that a greater amount of protein was immobilized by forming a multilayer on the longer grafted chain. Meanwhile, the addition of the cross-linker was possible not only to suppress separation phenomenon produced during a washing process of immobilized urease membrane but also to enable the recycling of membrane. Urease Immobilized membrane with no separation phenomenon was prepared by cross-linking reaction for 5 h, and the hydrolysis rate of prepared urease immobilized membrane was over 98% and 50%, respectively, in 1 mol and 4 mol urea solutions.

Keywords: peritoneum dialysis, graft polymerization, hydrolysis, urease membrane, urea

1. 서 론

신장이란 인체내의 혈액 또는 조직세포 속에 있는 액체를 우리가 생활하기에 가장 적당한 상태로 조절하기 위해 몸 밖으로 요소, 요산, 크레아틴황산염, 석탄산 등의 노폐물과 여분의 수분을 배설할 뿐 아니라 나트륨 이온(Na⁺), 염소 이온(Cl⁻), 마그네슘(Mg²⁺), 칼슘(Ca²⁺), 수소 이온(H⁺)과 같은 전해물질량을 조절하는 장기이다[1].

신장의 문제는 경미한 요로감염에서부터 진행성 신부전증에 이르기까지 다양하며 지난 수세기 동안 많은 과학적인 진보가 있는 덕에 신장질환으로 고통을 받고 있는 환자들을 진단하고 치료하는 기술이 발달해 있으며 설사 신장기능이 정지되더라도 신장 투석(kidney

dialysis)이나 신장 이식(kidney transplant)과 같은 치료 방법으로 수 많은 사람들에게 새로운 희망과 삶을 줄 수 있게 되었다[2].

이식에 의한 방법은 이식시 거부반응을 억제하기 위한 면역억제제 복용과 그에 따른 부작용, 지속적인 외래 추적관리, 거부반응 가능성에 관한 심적 부담을 갖게 될 뿐 아니라 이식된 신장의 평균 신장수명은 이식자와 기증자의 세포 적합도에 따라서 다소 차이가 있을 수 있으나 약 10년에서 20년 정도로 수명에 제한이 있다[3].

한편, 투석에 의한 방법으로는 투석기(인공 신장기)를 이용하여 혈액으로부터 노폐물을 걸러주고 신체내의 전해질 균형을 유지하며 과잉의 수분을 제거하는 혈액 투석법[4]과 환자의 복부에 특수 제조된 부드러운 관을 삽입하며 이 관을 통해 투석액을 주입하고 배액함

[†] 주 저자 (e-mail: bskim@dongguk.edu)

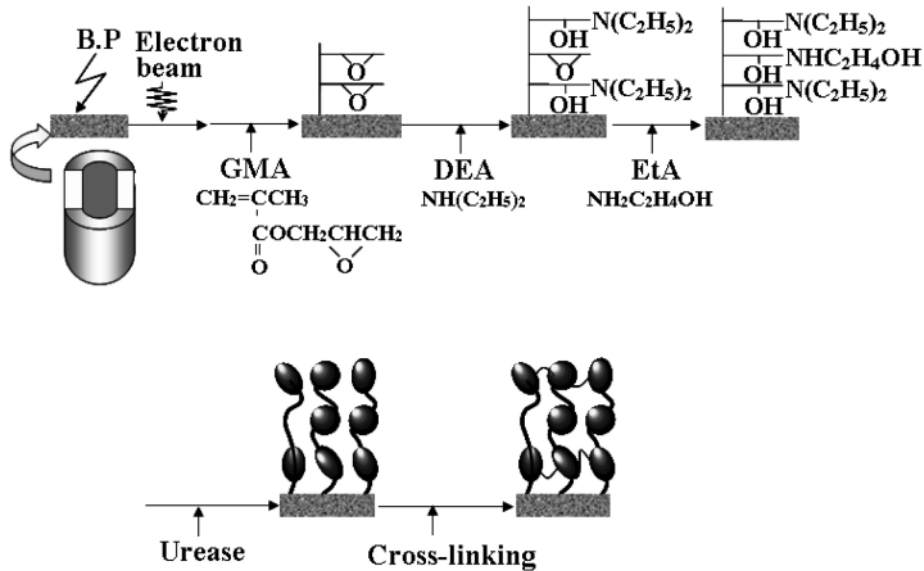


Figure 1. Preparation scheme of immobilization of urease onto porous hollow fiber membrane.

로써 체내 노폐물과 수분 등을 제거하는 복막 투석법[5]이 있다.

혈액 투석법은 고정된 스케줄에 맞춰 주 2~3회 투석을 위하여 투석용 기계가 설치된 병원(또는 투석실)에 와야 하는 번거로움과 주 2~3회만 투석하므로 식이나 수분의 제한이 심하다. 또한, 투석과 투석사이에 쌓인 노폐물을 몇 시간에 빠므로 투석 후 피로하거나 허약감을 느낄 수 있는 단점이 있다[5]. 그러나, 복막 투석은 혈액투석과 비교하면 특별한 장치가 필요 없고 항응고제가 필요 없고 비용도 적게 들며 요독증상 물질의 제거 효율도 높고 수분과 전해질의 조정에도 뛰어난 효과가 있다[6]. 최근에는 환자 자신이 직접 실시함으로써 혈액 투석에 비해 병원에 자주 가지 않고 일상생활 및 직장 생활의 지속이 가능하다는 장점 때문에 복막투석이 환자들에게 큰 호응을 얻고 있다[6]. 그러나 이 방법은 많은 양의 투석액을 사용하게 됨으로써 장시간의 투석시간을 필요로 하며 복막의 섬유화 현상 및 도관 출구 감염 등의 문제점을 갖고 있다[5]. 또한, 요소의 제거와 함께 다량의 단백질과 전해물질이 유출되어 엄격한 식이요법 및 수분 제한과 함께 보조약제의 복용이 필요하다는 문제점도 갖고 있다[6]. 따라서, 요소(urea; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$)의 제거와 함께 다량의 유익한 이온의 손실 양과 투석액의 소모량을 감소시키는 방법이 최근 투석법 연구의 초점이 되어왔다[7].

이러한 노력의 일환으로 투석액 중의 노폐물 중 잘 알려진 것으로 요소, 크레아티닌, 요산과 중간 분자량 노폐물을 투석액으로부터 제거하기 위해 흡착에 의한 방법과 우레아제를 사용하여 가수분해시켜 제거하는 방법이 이용되어 왔다. 흡착을 이용한 방법은 활성탄을 사용하여 요소를 직접 제거하는 방법이다[8]. 그러나 이 경우는 크레아티닌, 요산 및 중간 분자량 노폐물 등이 잘 제거됨이 밝혀졌으나, 요소의 제거에는 많은 양의 활성탄이 소요됨이 밝혀졌다[9]. 요소를 가수분해시켜 제거하는 방법에서는 요소가 가수분해 될 때 인체에 유해한 암모니아를 발생시킨다. 따라서 암모니아(amonia; NH_3)를 제거하기 위하여 암모니아를 인산 지르코늄 나트륨(sodium zirconium phosphate; $\text{NaZr}_2(\text{PO}_4)_3$)을 사용하여 침전시켜 제거하는 방법[10], 우레아제와 이온 교환수지를 마이크로 캡슐화(micro-encapsulation)시켜 암모니아를 제거하는 방법[11], 칼슘, 마그네슘, 암모니아 중에서 암

모니아만을 선택적으로 흡착시키는 실리콘 코팅 제올라이트(silicon-coated zeolite)법이 연구되어 왔다[12].

본 연구에서는 인체에 해로운 요소를 분해하기 제거를 위한 복막 투석용 우레아제(urease)고정 막의 제조에 있어서 가교제 첨가에 의한 우레아제 고정 및 가수분해 특성에 관한 연구를 수행하였다.

2. 실험

2.1. 기제 및 시약

기제로는 내경 1.9 mm, 외경 3.0 mm, pore size 0.34 μm , 공극율 71%인 폴리에틸렌(Polyethylene; PE) 다공성 중공사 정밀 여과막(Asashi Chemical 제조)을 공급받아 사용하였다. 그래프트 중합을 위해 에폭시기를 가지고 있는 Glycidyl methacrylate (Aldrich 15123-8, GMA)를 사용하였다. 음이온교환기 도입에 사용된 시약으로는 Diethylamine (Junsei Chemical, DEA)를 사용하였고, 이온교환기 도입 반응 후 잔존 에폭시기를 제거하기 위하여 Ethanamine (Junsei Chemical, EtA)을 사용하였다. 우레아제(Sigma u-1500, Urease)와 요소(Sigma u-1250, Urea)는 Sigma에서 나온 제품을 사용하였고, 완충용액으로는 Tris-HCl buffer (Sigma T-1503)를 사용하였다. 그 외의 시약은 특급이나 그 이상의 등급의 것을 사용하였다.

2.2. 우레아제 고정을 위한 음이온 교환막의 제조

우레아제 고정막은 방사선 그래프트 중합법에 의해 다공성 중공사막에 음이온 교환기를 도입한 후, 우레아제를 고정시켜 제조하였다. 우레아제 고정막의 제조 방법은 Figure 1에 나타난 바와 같이 방사선 그래프트 중합에 의한 음이온교환기 도입반응과 우레아제의 고정반응으로 나눌 수 있다. 폴리에틸렌 중공사막에 전자선을 조사한 후 10 v/v%의 GMA/MeOH 용액에서 일정시간 반응시켜, GMA그래프트 중합막을 제조하였다. 이 때 얻어진 막의 중량 변화로부터 그래프트율(Degree of grafting)을 다음과 같이 정의하였다.

Table 1. Preparation Conditions for Immobilization of Urease Membrane

Radiation-induced graft polymerization	
Irradiation dose	200 kGy
Concentration of GMA	10 v/v% in methanol
Reaction temperature	313 K
Functional group DEA-EtA	
Concentration of DEA	NH(C ₂ H ₅) ₂ 50 v/v%
Reaction temp.	313 K
Concentration of EtA	NHC ₂ H ₄ OH 100%
Immobilization of urease	
urease concentration	2 g/L
pH	7.0

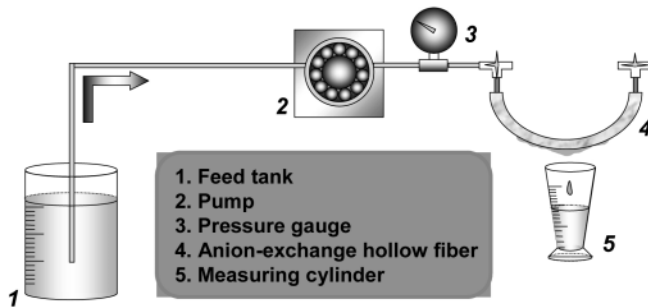


Figure 2. Experimental apparatus for immobilization of urease.

$$\text{Degree of grafting}[\%] = \frac{(W_1 - W_0)}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

여기서, W_0 , W_1 는 기재, GMA그래프트 중합막의 중량을 나타낸다.

그 후, 제조된 GMA그래프트 막에 음이온 교환기인 DEA를 도입하였다. 이 때 얻어진 막을 DEA막이라 하였다. 또한, 이온교환기 도입 반응 후 막에 잔존 에폭시기를 제거하기 위하여 EtA를 반응시켜 최종적으로 DEA-EtA막을 제조하였다. 얻어진 막의 음이온교환기의 밀도(density)와 전하율(Conversion)은 다음 식으로부터 구하였다.

$$\text{Density of Ion Exchange group}[\text{mmol/g}] = \frac{(W_2 - W_1)}{W_2 M_2} \times 1000 \quad (2)$$

$$\text{Conversion}[\%] = \frac{(W_2 - W_1) M_1}{(W_1 - W_0) M_2} \times 100 \quad (3)$$

여기서, W_0 , W_1 , W_2 는 기재, GMA막, 이온교환막의 무게를 나타내고, M_1 , M_2 는 각각 GMA와 반응에 사용된 이온교환기의 분자량을 나타낸다. 우레아제 고정 막의 반응 조건에 대해 Table 1에 나타내었다.

2.3. 우레아제의 고정

Figure 2는 우레아제의 고정을 위한 실험 장치의 개략도이다. 한 쪽의 Feed tank에 2 g/L 우레아제(phosphate 완충 용액 내에 함유, pH 7)를 넣고, 압력을 0.1 MPa로 일정하게 막의 내면에서부터 막의 외면으로 투과시켜, 우레아제 고정 막을 합성하였다. 투과해 나온 용액의 농도를 자외선-가시광선 분광계(UV-VIS Spectrometer; Shimadzu Co.)를 이용하여 280 nm에서 분석하였다. 이 때 측정된 농도

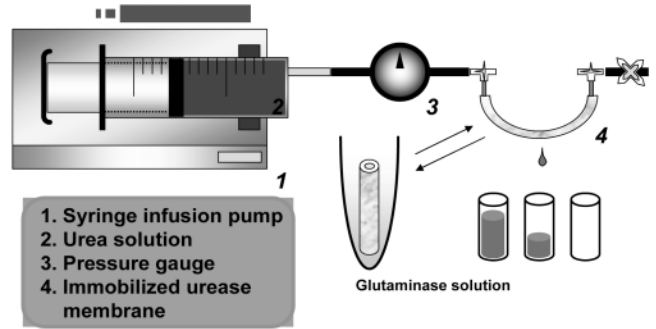


Figure 3. Experimental apparatus for hydrolysis of urea.

로부터 음이온의 고정량을 다음 식에 의하여 구하였다.

$$q = \int_0^{V_e} (C_0 - C) dV/W [\text{mg/g}] \quad (4)$$

여기서, V_e 는 C 가 C_0 에 도달하였을 때의 투과체적이고, W 는 건조된 막의 중량이다.

또한, 우레아제가 흡착된 막에 0.5 mol의 염화나트륨(NaCl) 용액을 투과시켜 탈리를 하였으며, 이때 탈리량(E)은 다음 식에 의하여 구하였다.

$$E = \int_0^{V_0} c dv/W [\text{mg/g}] \quad (5)$$

여기서, c 는 탈리액에 의해 용출되어 나온 용액의 농도, v 는 탈리액의 투과체적, V_0 는 용출되어 나온 용액의 농도가 0이 될 때의 투과체적이다.

2.4. 우레아제 고정막의 가교 특성

우레아제가 고정된 막에 있어서 효소는 실험 조건에 따라 그 활성도가 변화되며 고정된 우레아제가 탈리되는 현상이 발생하기 때문에, 탈리되는 현상을 막기 위하여 0.05% 글루타미나아제(glutaminase)를 사용하여 가교시켰다. 즉, 0.05%의 가교제가 첨가된 용액에 우레아제 고정 막을 일정시간 동안 침전시켜 가교중합 반응을 시켰다. 시간 변화에 따른 가교율을 조사하였으며 최적의 가교 시간을 구하고자 하였다.

2.5. 우레아제 고정막을 이용한 요소의 가수분해

합성된 우레아제 고정막에 요소를 투과시켜 가수분해 성능을 조사하였다. 가수분해된 용액의 분석은 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatograph; Model UV-1575, Jasco Co.)를 이용하였다. Figure 3에 가수분해에 사용된 실험 장치를 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 우레아제 고정을 위한 음이온 교환막의 도입

방사선 그래프트 중합법에 의해 얻어진 막의 단면 SEM사진($\times 7,000$)을 Figure 4에 나타내었다. 밝은 곳은 막의 matrix부분이며

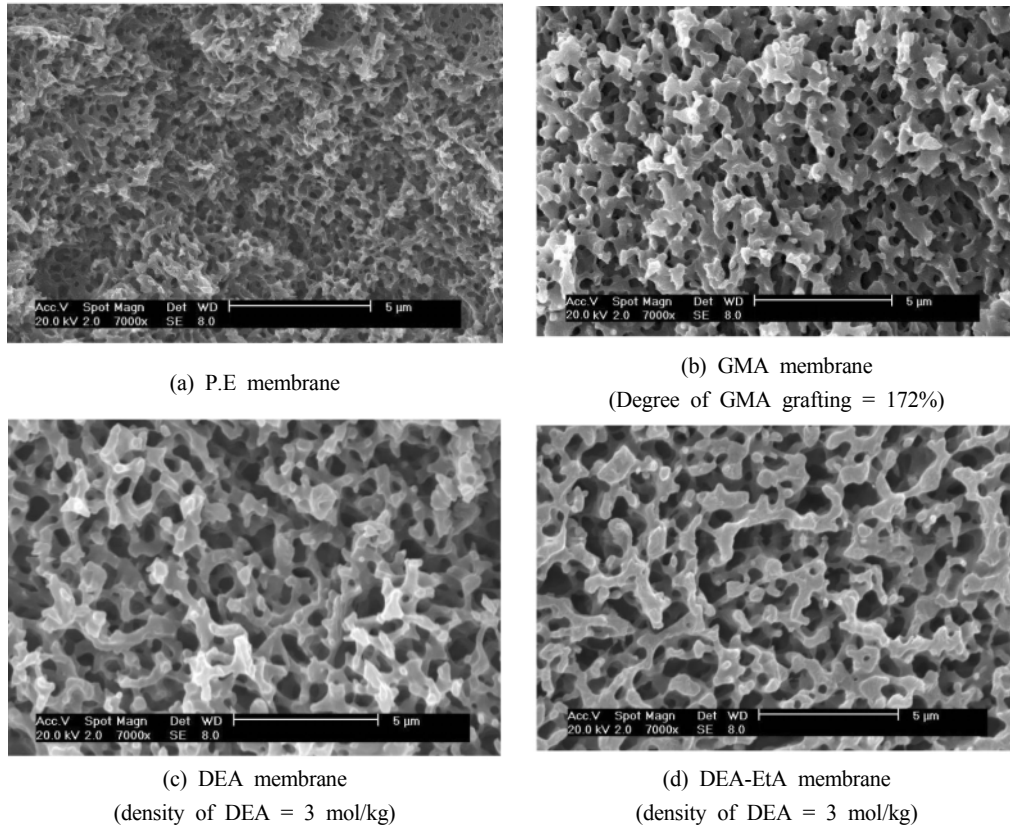


Figure 4. SEM photographs of membrane.

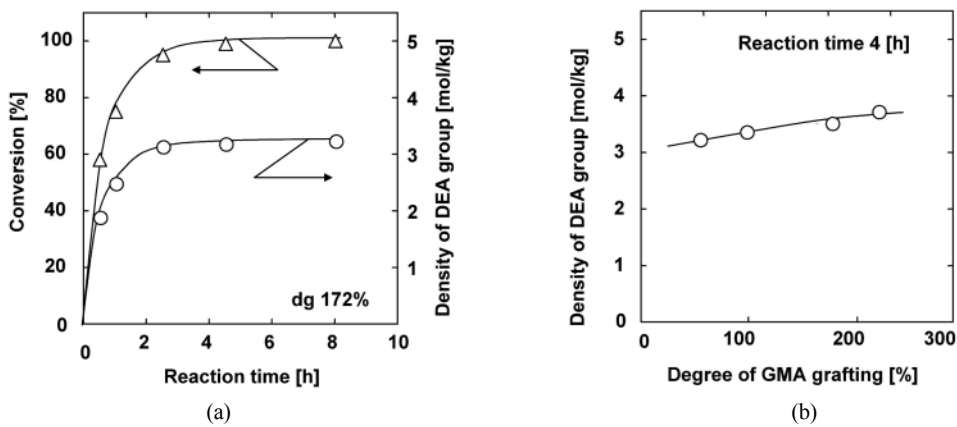


Figure 5. (a) the conversion and density of DEA on reaction time, and (b) Density of DEA group on degree of GMA grafting.

어두운 곳은 막의 기공(pore)부분으로, pore내면에 형성된 그래프트 체인에 도입된 관능기에 의해 우레아제가 고정된다. GMA막은 폴리에틸렌 기재보다 기공 크기가 커졌다. 이와 같은 결과는 그래프트 체인이 막의 표면뿐만 아니라 막의 내부에도 생성되었기 때문이다. 한편, 음이온교환기가 도입된 막의 기공 크기는 GMA막의 기공 크기에 비해 커다란 차이가 없었다. 이것은 음이온 교환기가 그래프트 체인 사이에 생성되어 막의 물리적 변화에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

음이온교환기 도입반응에 있어서 반응 시간에 따른 전하율 및 이온교환밀도를 Figure 5(a)에, 또한 GMA 그래프트율 변화에 따른 이

온교환기 밀도를 Figure 5(b)에 나타냈다. GMA그래프트율 172% 막을 사용하여 DEA를 도입시켰을 때 반응시간 4 h에 전하율 100%로 밀도는 3.0 mmol/g의 DEA막을 얻었으며, 또한 GMA 그래프트율이 높아질수록 DEA의 밀도가 높아졌다.

3.2. 음이온 교환막에 우레아제의 고정화

음이온 교환기가 도입된 다공성 막에 우레아제의 고정, 탈리 곡선을 Figure 6(a)에 나타내었다. 우레아제 용액에 일정한 압력을 주어 중공사 막의 내면에서부터 외면으로 투과시켰다. 그리고 유출액 중의 우레아제 농도를 추적하여 무차원 체적과 무차원 농도와의 관계

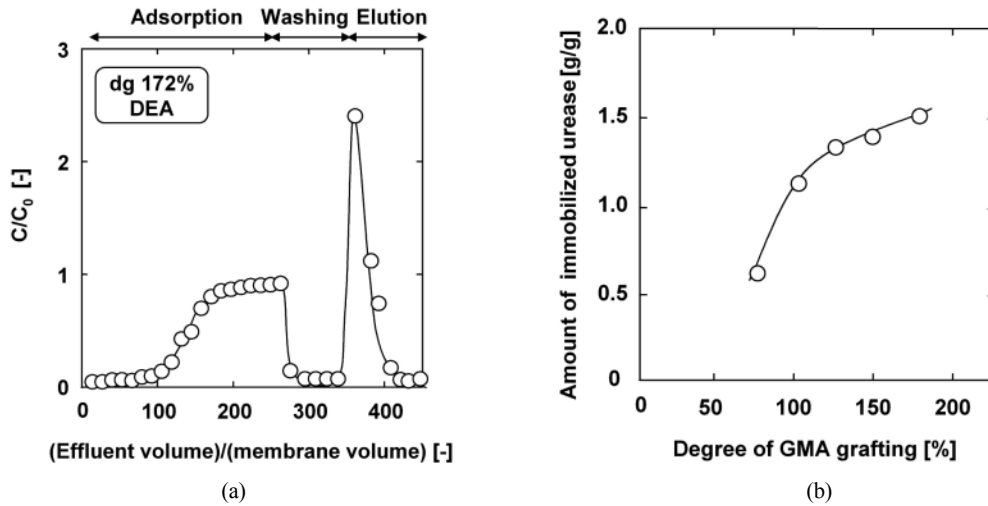


Figure 6. (a) Breakthrough curve of DEA-EtA membrane for urease, and (b) amount of urease immobilized of the degree of GMA grafting.

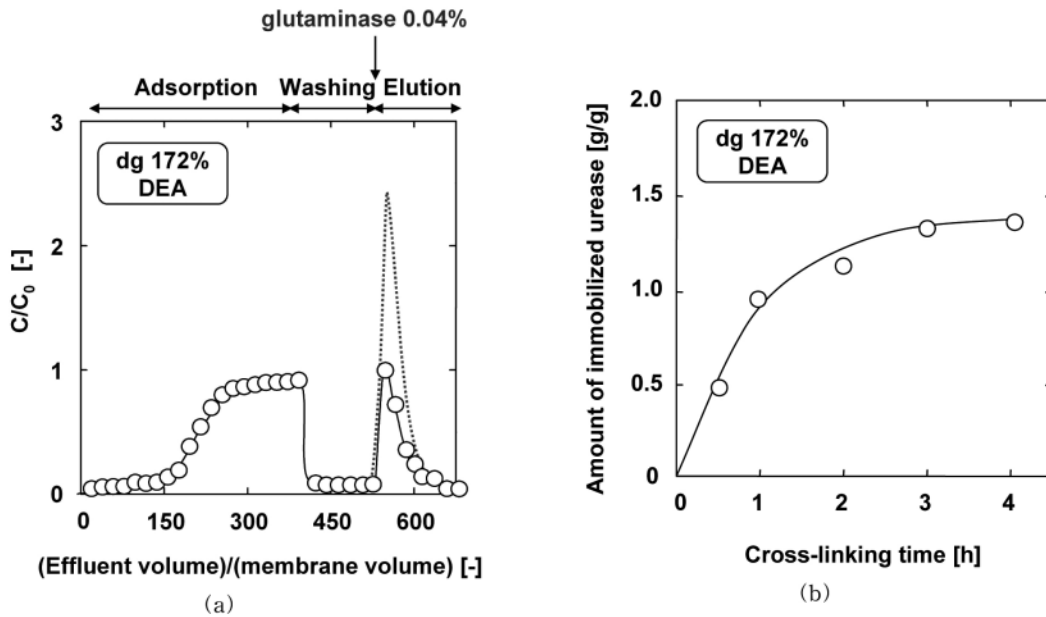


Figure 7. (a) Breakthrough curve of DEA-EtA membrane for urease (after cross-linking), and (b) the amount of urease immobilized with cross-linking time.

를 나타내는 곡선(Breakthrough Curve)을 나타내었다. 횡축과 종축은 다음과 같은 식으로 정의하였다.

$$DEV[-] = \frac{\text{Effluent volume}}{\text{Membrane volume}} \quad (6)$$

$$\frac{C}{C_0} [-] = \frac{\text{Effluent concentration}}{\text{Feed concentration}} \quad (7)$$

이후 1 M 염화나트륨 용액을 투과 시켰을 때 우레아제는 대부분 탈리가 이루어졌다. 고정된 우레아제의 탈리량은 약 98%로 나타났다.

또한 GMA 그래프트올 변화에 따른 우레아제의 고정량 변화를 Figure 6(b)에 나타냈다. GMA 그래프트올이 증가할수록 고정량이

증가하는 것을 알 수 있다. GMA 그래프트올이 증가할수록 그래프트 체인이 신장하기 때문에 우레아제가 그래프트 체인 사이에 다층으로 고정됨으로서, 고정량이 증가하였다. $4.9 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 크기를 가진 우레아제의 점유면적($1.5 \times 10^{-16} \text{ m}^2$)을 계산하였을 때, 우레아제가 중공사막에 단층 흡착한다고 가정하여 계산하면 0.03 g/g 으로 나타난다[13]. 이것을 다음에 나타난 계산식에 의해 구한 결과, 적층수는 40층으로 나타났다.

$$\text{Degree of multilayer binding} = \frac{\text{Immobilized urease}}{\text{Monolayer binding capacity}} \quad (8)$$

$$\text{Monolayer binding capacity}[-] = \frac{a_v \cdot M_r}{a \cdot N_A} \quad (9)$$

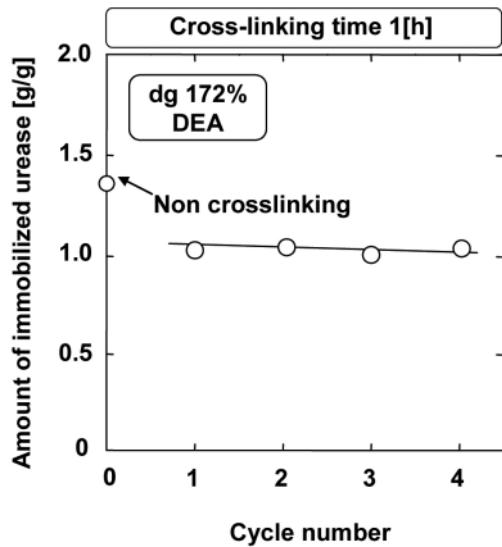


Figure 8. The amount of immobilized urease vs recycle number of membrane.

여기서, a_v 는 막의 비표면적, M_r 은 우레아제의 분자량(480,000), a 는 단백질분자의 점유면적, N_A 는 아보가드로수를 나타낸다.

3.3. 우레아제 고정막에 가교제 첨가특성

음이온 교환기가 도입된 다공성 막에 우레아제의 고정시키는 후, 글루타미나아제를 사용하여 우레아제를 가교 고정시킨 후의 흡착 및 탈리 곡선을 Figure 7(a)에 나타내었다. 우레아제의 고정화 과정에서 우레아제가 음이온 교환기에 고정되었으나, 지속적인 가수분해 과정과 세척과정에서 탈리 현상이 발생하였다. 이러한 탈리 현상을 방지하고자 가교제를 첨가하였고, 가교전과 가교후의 탈리 곡선을 점선과 실선으로 나타내었다. 가교시키기 전 탈리량은 98%로 나타났으나 가교시킨 후 탈리량은 20% 정도로 나타났다. 또한 가교시간에 따른 우레아제의 고정량을 Figure 7(b)에 나타내었다. 그 결과 5 h 가교시켰을 경우 우레아제의 고정량이 80% 이상 고정된다는 것을 알 수 있었으며, 가교시켰을 때 우레아제의 고정량이 일정하게 유지되며 탈리 현상이 일어나지 않았다.

또한 가교후 막의 반복사용에 있어서 우레아제의 탈리 현상을 조

사한 결과를 Figure 8에 나타내었다. 가교제 첨가후 지속적인 물리적 탈리용액(1 M NaCl)의 투과 과정에서도 우레아제가 탈리되지 않았으며, 5회의 반복 사용에도 고정량이 일정한 것을 나타내었다. 이것은 가교제 첨가에 의한 막의 반복 사용이 가능하다는 것으로 막의 재사용 및 고정화 특성이 우수하였다.

3.4. 우레아제 고정막을 이용한 요소의 가수분해특성

우레아제 고정막을 이용한 가수분해 성능을 조사한 결과를 Figure 9에 나타내었다. 요소의 농도가 1 M(60 g/L)의 경우, 98% 이상의 가수분해를 나타내었다. 그러나 요소의 농도가 높아질수록, 가수분해율이 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 요소의 농도별 투과 유속을 1 ~ 10 mL/h로 변화시켰을 때에도, 투과 유속이 증가할수록 가수분해율이 감소하는 것을 알 수 있었다. 이 때 요소의 우레아제 고정막의 체류시간[14]은 5 ~ 50 s로 계산되어 진다. 이것은 요소가 가수분해하기 위해서는 일정 시간의 체류시간이 필요하였다. 이것은 가수분해 과정에서 우레아제와 요소의 접촉시간이 충분히 유지 되어야만 가수분해 효율이 높게 나타났다.

4. 결 론

본 연구에서는 방사선 그래프트 중합법을 이용하여 다공성 중공사막에 음이온 교환기 DEA를 도입하여 음이온 교환막을 제조하였고, 요소를 효율적으로 가수분해시키기 위하여 우레아제를 고정시켜 우레아제 고정막을 제조하고 우레아제 고정, 가교제 첨가 및 가수분해 특성 등을 검토하여 다음의 결론을 얻었다.

음이온 교환기가 도입된 막에 우레아제를 고정시켰을 경우 그래프 트율이 증가할수록 고정량이 증가하였다. 이것은 그래프트율이 증가할수록 그래프트 체인이 신장하기 때문에 단백질이 다층으로 고정되기 때문으로 판단된다. 그러나, 우레아제 고정막의 세척 과정에서 발생하는 우레아제가 탈리 현상은 가교제 첨가에 의하여 억제할 수 있으며 이로 인하여 막의 반복 사용이 가능하였다. 5 h 가교 반응시켜 제조한 우레아제 고정막은 탈리 현상이 발생되지 않았으며 또한, 1 mol과 4 mol의 요소 용액에서 각각 98% 이상, 50% 이상의 가수분해 효율을 나타내었다.

위와 같은 결과로부터 본 연구에서 제조된 우레아제 고정막에 의하여 요소가 암모니아로의 분해가 가능하였다.

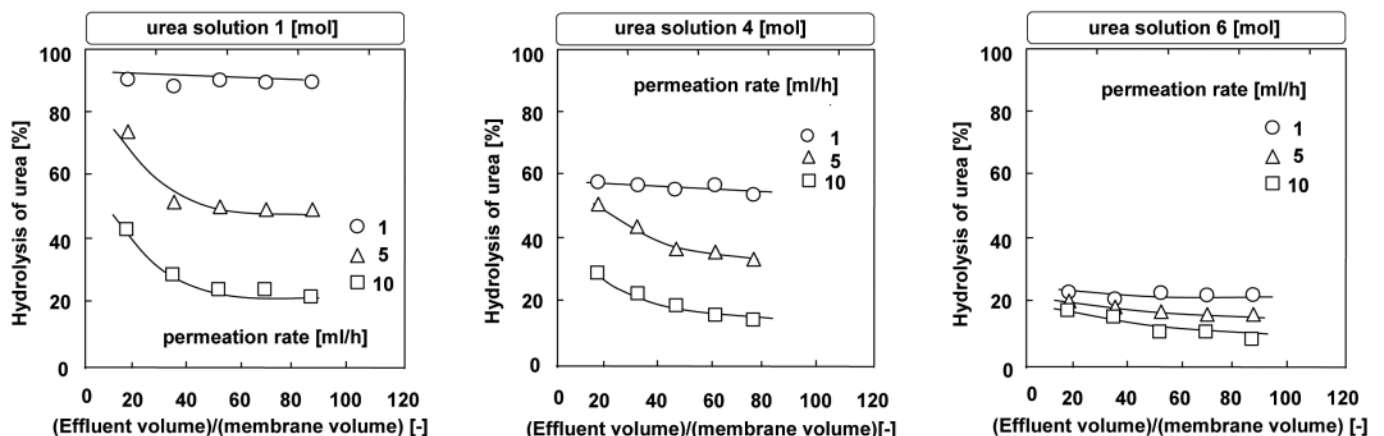


Figure 9. Percentage hydrolysis of urea and permeation rate vs effluent volume.

참 고 문 헌

1. <http://www.onreport.co.kr/data/272/F271431.html>.
2. <http://www.mr.doctor.co.kr/kidney.html>.
3. <http://www.kidney2000.co.kr/menu/in3.htm>.
4. Y. Nose, *CRC Critical Reviews in Bioengineering*, **1**, 25 (1972).
5. T. J. Comstock and L. Y. Young, *Applied therapeutics: The clinical use of drugs*. 6th ed. Lippincott williams & Wilkins Vancouver, WA **31**, 1 (1995).
6. H. N. Chang and W. H. Hwang, *Korean Chem. Eng. Res.*, **17**, 273 (1979).
7. W. J. Kolff, *Kidney Int. Suppl.*, **7**, 3 (1976).
8. T. M. S. Chang and N. Malave, *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organ.*, **16**, 14 (1976).
9. W. D. Huang and R. E. Sparks, *Proc. Annu. Conf. Eng. Med. Biol.*, **18**, 294 (1976).
10. H. Ma, R. H. Davis, and C. N. Bowman, *Macromolecules*, **33**, 331 (2000).
11. A. Gordon, *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organ.*, **17**, 253 (1971).
12. R. E. Sparks, *Chem. Eng. Prog. Symp. Series*, **67**, 1 (1971).
13. S. Kobayashi, S. Yonezu, H. Kawakita, K. Saito, and K. Sugita, *Biotechnol. Prog.*, **19**, 396 (2003).
14. S. Nishiyama, A. Goto, K. Saito, K. Sugita, M. Tamada, T. Sugo, T. Funami, Y. Goda, and S. Fujimoto, *Anal. Chem.*, **74**, 4933 (2002).