

## 자석에 의해 분리가 가능한 고정화 Trypsin 개발

류 지 순 · † 이 중 현

조선대학교 생명화학공학과

(접수 : 2007. 8. 13., 게재승인 : 2008. 6. 9.)

## Development of Magnetically Separable Immobilized Trypsin

Ji Soon Ryu and Jung Heon Lee<sup>†</sup>

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Chosun University

(Received : 2007. 8. 13., Accepted : 2008. 6. 9.)

Magnetically separable immobilized trypsin was developed and their biocatalytic activity was evaluated for the different immobilization media. The activity, recyclability, pH effect, and stability of immobilized enzymes were evaluated for the different supporting media. The biocatalytic activity of immobilized trypsin was highest with magnetically separable polyaniline (PAMP), and  $V_m$  and  $K_m$  of PAMP were 0.169 mM/min and 0.263 mM respectively. With increased pH, the biocatalytic activity increased for all supporting materials used. Immobilized enzymes were recycled and recycle activities were over 90% of their original activity after ten times reuse. The operational stabilities of enzymes were greatly improved with enzyme immobilization.

**Key Words** : Trypsin, Magnetically separable, immobilized enzyme

### 서 론

트립신은 단백질을 분해하는 효소로서 단백질체 연구를 위한 단백질 분해효소로 많이 사용하고 있으며[1, 2] 트립신 자체가 단백질인 자기 자신을 분해하기 때문에 고정화 효소를 개발한 경우 고정화 담체의 우수성을 증명하기 위해 많이 연구되어 왔다[3-5]. 또한 식품 산업에서 식품의 특성을 높이기 위해 남아 있는 단백질을 제거하기 위해 많이 사용되어 왔다[6-8].

최근의 나노바이오테크놀로지의 발달과 더불어 나노담체를 이용한 효소의 고정화에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[9, 10]. 기존의 고정화 담체의 경우에는 입자의 크기가 크고 효소를 고정화 할 수 있는 양이 한정되어 있어 제조 후에도 고정화 효소 자체의 물질 전달저항 때문에 고정화 효소의 효율이 떨어지는 단점이 많았다. 최근 나노테크놀로지의 발달에 따라 고정화 담체의 크기를 나노사이즈로 감소시킬 수 있고 이러한 담체에 효소를 고정화 시킴으로써 효율을 극대화 시키는 기술이 개발되어 왔다[11]. 이렇게 제조된 고정화 효소의 재사용을 확대하기 위해 원심분리나 필터를 사용하여 반응 용액으로부터 효소를 분리하여 사용하는 경우가 대부분이었

다. 최근 산화철을 이용한 나노입자 제조기술이 발달함에 따라 자성을 보유한 나노입자를 이용하여 효소를 제조 함으로써 자석으로 분리가 가능한 입자를 만들고 있으며 이를 활용하는 기술이 급격히 발전하고 있다[12, 13].

현재까지 개발된 대부분의 기술은 분자간의 흡착을 사용하여 이를 효소고정화에 활용하였기 때문에 고정화된 효소의 안정성이 크게 떨어지는 단점이 있다. 이러한 단점의 해결책으로 단백질과 담체가 공유결합을 함으로서 더욱 강력한 결합으로 안정성을 유지하는 기술이 개발되어 왔다[9-11, 14].

본 연구에서는 자석으로 분리가 가능한 고정화 담체를 제조하고 이러한 담체에 트립신을 고정화 시켜 안정성을 측정함으로써 자석으로 분리가 가능한 고정화 담체를 고정화 효소로 제조하여 사용할 수 있는 가능성을 검토하였다.

### 실험 재료 및 방법

#### 실험재료

단백질 분해효소인 트립신, N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA), Glutaraldehyde (GA), tetrahydrofuran (THF), Carboxymethylcellulose (CMC), diethylaminoethyl cellulose (DEAE) and N,N-dimethylformamide (DMF)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입 하였으며 ironoxide nanoparticle의 size는 평균 20-100 nm을 사용하였으며 표면을 개질 한 후 사용

<sup>†</sup> Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759 KOREA

Tel : +82-62-230-7159, Fax : +82-62-230-7226

E-mail : leejh@chosun.ac.kr

하였다. Polystyrene (PS,  $M_w=900\ 000$ )과 polystyrene-comaleic anhydride(PSMA,  $M_w=224\ 000$ ; maleic anhydride content=7 wt%)는 각각 Pressure Chemical Company (Pittsburgh, PA, USA) and Aldrich (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 25% glutaraldehyde는 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며 실험에 사용된 시약은 시중에서 구할 수 있는 시약 중에 높은 등급의 시약을 사용하였다.

#### 자석으로 분리가 가능한 PS/PSMA nanofiber 제조

PS/PSMA (1:2) 고분자용액 (0.9 ml)을 자성을 보유한 나노입자가 혼탁되어 있는 hexane 용액 (0.1 ml)과 섞은 다음 3 ml 유리주사기에 넣은 다음 8-10 KV의 전압 (ES30P-10W, Gamma High Voltage Research, Ormond Beach, FL, USA)을 걸어 electrospinning 하면서 8-10cm 거리에서 nanofiber를 수집한다. Nanofiber를 모으기 위해 접지된 알루미늄 호일을 펼친 상태로 사용했으며 수집된 nanofiber는 효소 고정화를 위해 보관하였다.

#### 자석으로 분리가 가능한 polyaniline nanofiber 제조

자석으로 분리가 가능한 polyaniline nanofiber의 제조를 위해서 시약상에서 구입한 iron oxide 나노입자를 고분자 중합 시 첨가하여 반응을 시켜 polyaniline 중합 시 nanoparticle 등이 끼워 들어가는 형태 또는 nanoparticle 표면에 polyaniline이 coating 되는 형태의 자석에 의해 분리가 가능한 나노입자 또는 nanofiber의 제조가 가능하였다. 이렇게 제조된 nanofiber는 증류수로 4번 이상 씻은 다음 효소의 고정화를 위해 냉장고에 보관하여 두었다.

#### 자석으로 분리가 가능한 cellulose 담체 제조

자석으로 분리가 가능한 cellulose 담체를 제조하기 위해 diethylaminoethyl cellulose (DEAE)와 carboxymethyl cellulose (CMC)를 사용하였다. 100 mg의 자성을 보유한 나노입자를 증류수에 담긴 DEAE와 CMC에 넣어 500 rpm으로 2시간 동안 격렬하게 흔들어서 나노입자가 cellulose 담체에 골고루 분포하도록 유도한다. 용액 내에서 담체를 분리하여 cellulose에 흡수되지 않은 나노입자를 제거하고 충분히 흡착되지 않은 나노입자를 제거하기 위해 증류수로 나노입자가 나오지 않을 때까지 여러 번 씻는다. 제조된 담체는 동결 건조한 후 효소 고정화를 위해 냉장고에 보관하여 두었다.

#### Polyaniline nanofiber (PANI) 제조

Polyaniline nanofibers를 제조하기 위해서 ammonium peroxydisulfate 0.1% (질량분율)와 aniline 용액 (1 M HCl 용액)을 격렬하게 섞는다. 고분자 중합 반응에 의해 nanofiber가 만들어지면 nanofiber 내에 있는 HCl용액을 제거하기 위해 4번 이상 증류수로 씻어낸다. 제조된 시료는 사용을 위해 냉장 보관하여 두었다.

#### 자석으로 분리가 가능한 polyaniline nanofiber (PAMP) 제조

자석으로 분리가 가능한 polyaniline nanofiber의 제조를 위해서 시약상에서 구입한 iron oxide 나노입자를 고분자 중합 시 첨가하여 반응을 시켜 polyaniline 중합 시 nanoparticle 등이 끼워 들어가는 형태 또는 nanoparticle 표면에 polyaniline이

coating 되는 형태의 자석에 의해 분리가 가능한 나노입자 또는 nanofiber의 제조가 가능하였다. 이렇게 제조된 nanofiber는 증류수로 4번 이상 씻은 다음 효소의 고정화를 위해 냉장고에 보관하여 두었다.

#### Nanofiber에 효소 고정화

효소를 고정화 시키기 위해서 2 mg의 nanofiber와 2 mg의 트립신을 1 ml (10 mM phosphate buffer, pH 7.9)에 넣어 효소와 nanofiber가 잘 섞이도록 상온에서 30분 동안 200 rpm으로 흔들어서 준다. 잘 섞인 상태의 용액을 냉장고에 넣어 30분 동안 추가로 30 rpm으로 흔들어서 냉장고에 2시간 동안 보관하여 둔다. Glutaraldehyde 용액을 첨가하여 0.5%가 되도록 하여 냉장고에서 17시간 30 rpm으로 흔들면서 반응을 시킨다. 효소가 고정화 된 nanofiber를 10 mM buffer (pH 7.9)와 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)로 고정화 되지 않은 효소와 반응되지 않은 glutaraldehyde를 제거한다. 이 과정을 반복함으로써 고정화 되지 않은 효소가 충분히 제거될 때까지 반복한다. 제조된 효소가 고정화된 nanofiber를 효소의 활성도를 측정된 후에 효소반응에 사용하기 위해 냉장고에 보관하여 둔다

#### 트립신 활성도 측정

트립신의 활성도는 기질인 N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA)를 분해하는 속도를 기준으로 측정 하였다. BAPNA를 10 mM sodium acetate buffer에 녹여 최종 농도가 2 mM이 되도록 한 후 효소 또는 고정화 효소를 첨가한 후 반응을 시작하여 시간에 따라 생성되는 p-nitroaniline을 측정함으로써 효소의 활성도를 측정하였다. 또한 효소의 활성도는 p-nitroaniline의 생성속도를 측정하여 나타내었다. 이는 효소 첨가 후 100 ul 샘플을 증류수 900 ul에 섞은 다음 400 nm에서 흡광도를 측정하였으며 보정곡선을 사용하여 시간당 생성되는 p-nitroaniline의 농도를 계산하여 표시하였다.

## 결과 및 고찰

#### 전자주사현미경 (Scanning Electron Microscopy) 사진분석

Fig. 1은 트립신을 고정화 한 담체를 SEM을 이용하여 촬영한 사진이다. CMC를 이용하여 고정화 한 경우에는 표면에 불규칙하게 나노입자들이 부착되어 있는 사진을 보여주고 있으며 반면에 DEAE를 이용하여 고정화 한 사진의 경우에는 나노입자가 골고루 부착되어 있음을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 고정화 효소 활성도에 직접적인 영향을 미치게 되는데 Table 1에서와 같이 DEAE에 고정화 한 효소의 활성도가 CMC에 고정화 한 효소의 활성도 보다 높은 것으로 나타났다. PANI에 고정화 한 경우에는 나노 fiber 다발이 엉켜져 있는 상태에서 효소들이 표면에 부착되는 현상을 보이며 나노 fiber 사이에는 충분한 공간이 있어 기질의 물질전달 속도의 감소가 거의 없을 것으로 판단된다. Fig. 1의 사진은 동결 건조된 상태의 샘플들로 수용액상에서는 분산되어 있는 상태로 존재하게 되어 PANI 및 PAMP의 경우에는 효소 반응 속도가 CMC나 DEAE에 비해 훨씬 빠른 것으로 나타났다. Fig. 1(d)에서 보는 바와 같이 PAMP는 더욱 밀집된 결합을 하고 있으며 이러한

결합은 나노입자에 의해 이루어 지고 있었다.

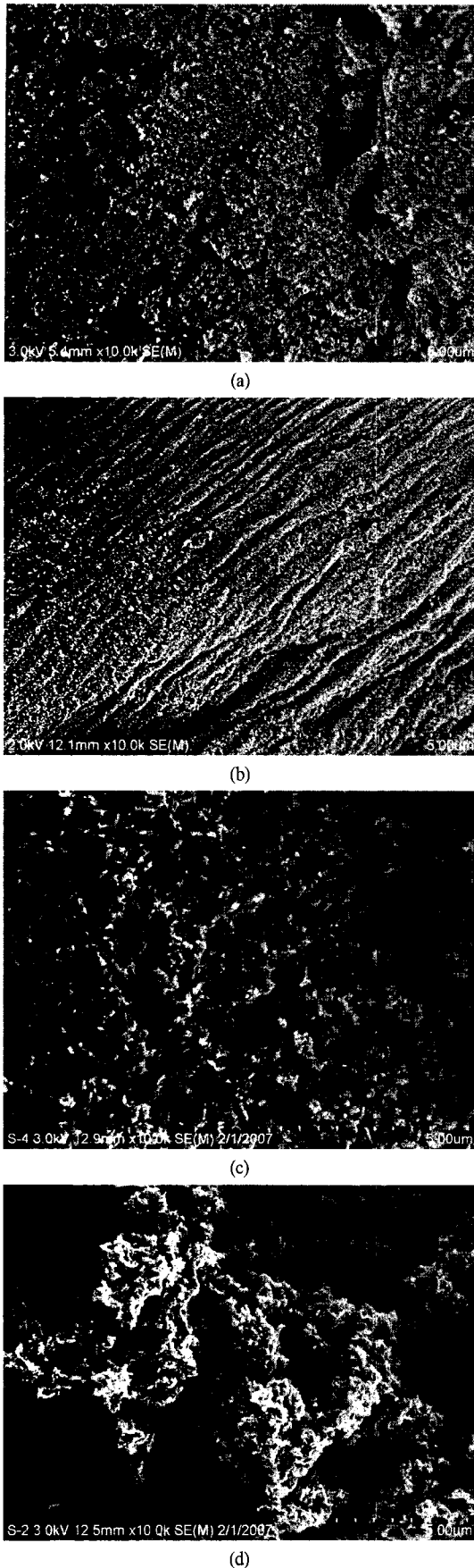


Figure 1. SEM images of (a) CMC, (b) DEAE, (c) PANI, and (d) PAMP. The scale bars shown in the figures are 5 μm.

고정화 효소 동특성

고정화 매체에 따른 효소 고정화 특성을 조사하기 위해 다음의 6가지 고정화 담체에 따른 효소의 생축매 특성을 조사하였다. 각 생축매는 자유효소를 기준으로 각 효소의  $V_m$ ,  $K_m$  및  $k_{cat}$  값의 변화를 Michaelis-Menten식을 사용하여 추정하였다(Fig. 2). 본 효소의 활성도 측정에 사용된 효소의 양은 고정화 효소의 경우에는 고정화된 효소 중 1 mg을 사용하였다.

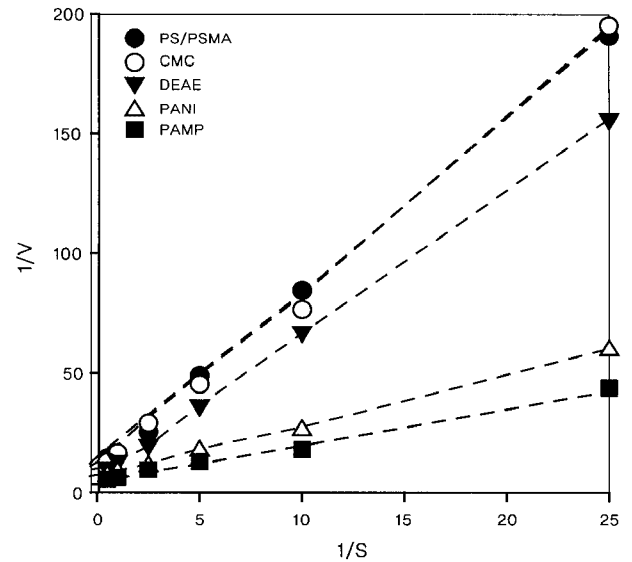


Figure 2. Estimation of kinetic parameters of immobilized trypsin for the various media (Kinetic constants were obtained by using software (Enzyme Kinetics Pro from ChemSW, Farifield, CA) that performs nonlinear regression based on the least-square method).

각 고정화 담체의 효소 특성을 조사한 결과 PAMP의 특성이 제일 우수한 것으로 나타났으며 다른 담체의 경우에는 비슷한 효소반응 동특성을 나타내는 것으로 판단되었다. 특히 PAMP의 경우에는 나노입자에 효소가 고정화 되어있기 때문에 반응 동특성이 뛰어나고 효소 사용 후 회수가 잘되는 장점이 있었다. 자석으로 분리가 가능한 다른 효소들의 특성을 고찰하여 보아도 비슷한 특성을 가지는데 DEAE가 CMC 보다는 우수한 효소 활성도 특성을 보유하고 있는 것으로 나타났다. CMC와 PS/PSMA는 거의 비슷한 동특성을 나타내고 있는 것으로 나타났다. 본 연구에서 사용한 PANI의 경우에는 PAMP와 다른 고정화 담체의 중간적인 특성을 나타내는데 이는 PANI가 다른 나노화이버 보다는 표면적이 넓고 퍼져있기 때문에 우수한 특성을 보여주고 있다.

Table 1. Catalytic activity of trypsin immobilized on magnetically separable supporting materials

	$V_m$ (mM/min)	$K_m$ (mM)
PS/PSMA	0.092	0.701
CMC	0.096	0.726
DEAE	0.126	0.791
PANI	0.150	0.344
PAMP	0.169	0.263

자석을 이용한 고정화 효소 회수

Fig. 3은 자석으로 분리가 가능한 고정화 효소의 분리과정을 나타낸 것이다. 일반적인 고정화 효소와는 달리 자석으로 분리가 가능한 고정화 효소는 자석을 사용한 경우 자석에 끌리어 쉽게 분리할 수 있다. 고정화 효소를 사용하여 반응을 시키고 다시 자석을 대어 분리하고 다시 사용할 수 있는 반복적으로 사용할 수 있는 지속적으로 사용 가능한 효소 반응 시스템의 개발이 가능하다. 본 연구에서 개발된 고정화 효소는 자석으로 분리하는데 충분한 자성을 띄고 있어 빠른 시간 내에 분리되는 장점을 가지고 있으며 용액 상태에서는 입자들이 분산되어있는 상태를 보여 효소반응에 유용한 것으로 판단되었다.

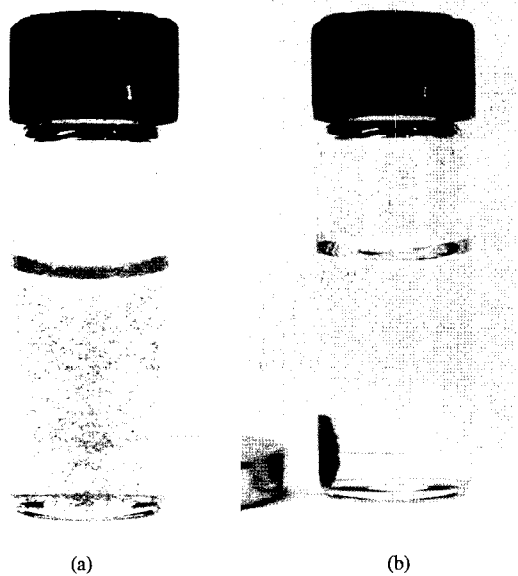


Figure 3. Recovery of enzyme with magnets (a) suspended immobilized enzymes (DEAE) and (b) recovered immobilized enzyme with magnets.

고정화 효소 회수 후 활성도

고정화 효소의 재사용가능성을 검토하기 위해 반응 후 자석을 이용하여 회수한 후에 고정화 효소의 활성도를 측정하였다. Fig. 3은 반응 후 회수에 따른 활성도의 변화를 보여주며 회수율은 5번 회수 했을 경우 남아있는 효소의 활성도는 97% 이상을 나타내어 본 연구에서 개발한 고정화 효소가 자석으로 회수가 용이한 시스템임을 보여주고 있다. 본 연구에서 사용된 산화철 나노입자를 함유하지 않은 PANI의 경우에는 자석으로 분리가 불가능하나 원심 분리기를 사용하면 낮은 수준의 원심분리기 (5000 g)에서도 분리가 가능하여 재사용이 가능하다.

pH 변화에 따른 효소 활성도 변화

Fig. 4는 pH 변화에 따른 효소의 활성도 변화를 나타낸다. pH 증가에 따라 활성도는 증가함을 보였고 낮은 pH에서는 작은 크기의 고정화 효소의 활성도가 감소하는 현상을 보였으나 트립신의 최적 pH인 8로 증가할수록 활성도가 다른 고정화 효소에 비해 높음을 보여주고 있다. 이러한 현상은 낮은 pH에서는 작은 크기의 고정화 효소가 영향을 많이 받으나 최적 pH는 표면적의 증가로 인하여 활성도가 크게 증가함을 보여주고 있는 것이다.

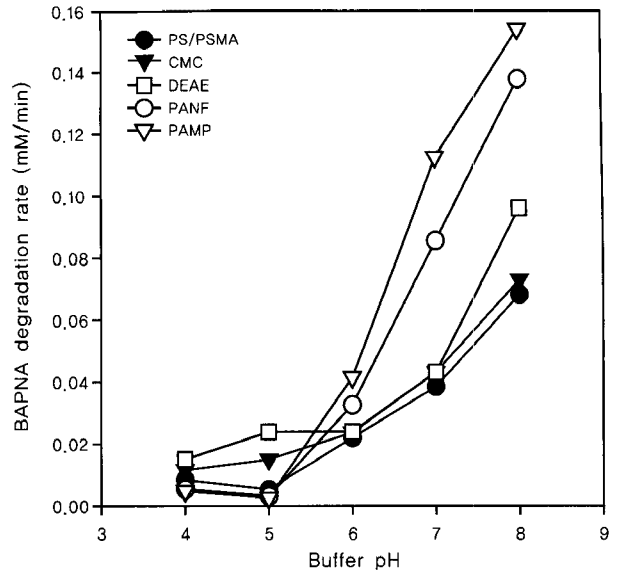


Figure 4. Effect of pH on the activity of immobilized trypsin. Activity of immobilized trypsin increased with pH increase.

효소 안정성 조사

고정화 효소의 안정성을 검토하기 위하여 상온에서 진탕하는 조건에서 효소의 남아있는 효소의 활성도를 측정하였다. Fig. 5에서 보는 것과 같이 효소의 안정성은 고정화 담체의 크기가 큰 경우에 안정성이 높음을 측정할 수 있었으며 고정화 담체의 크기가 작은 경우에는 잔여 활성도가 급격히 떨어짐을 측정할 수 있었다. 특히 PAMP를 사용한 경우 트립신의 활성도는 급격히 떨어져 2일 이내에 10% 아래로 떨어지는 현상을 보였으나 DEAE 및 PS/PSMA에 고정화 된 효소의 경우에는 64일이 지난 경우에도 활성도가 각각 55%와 40%를 보여 비교적 안정함을 보여 주고 있다.

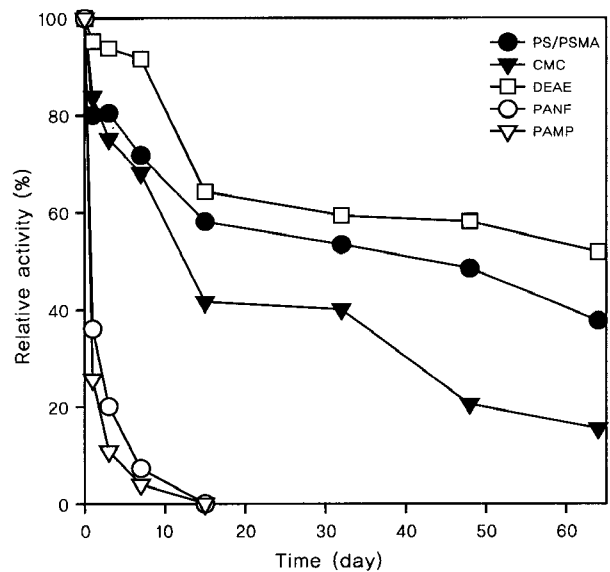


Figure 5. The stabilities of immobilized trypsin in an aqueous buffer solution (10 mM phosphate, pH 7.9, and room temperature) on vigorous shaking conditions (200 rpm). Following each measurement of the catalytic activity, the sample was washed thrice in excess buffer solution to remove both the residual substrate and product. The relative activity was calculated from the ratio of the residual activity at each time point to the initial activity.

## 결 론

본 연구에서는 자석으로 분리가 가능한 나노효소 고정화 담체에 단백질 분해 효소인 트립신을 고정화 시켜 각 효소의 안정성을 검토 하였다. 본 연구에서 제조된 고정화 담체인 PS/PSMA, DEAE, CMC 및 PAMP는 모두 자석으로 쉽게 분리가 가능하며 효소의 재활용이 가능하였다. PANI의 경우에는 낮은 회전수의 원심분리로 효소의 회수가 가능하였으며 이의 재활용이 가능하였다. 고정화 효소의 활성도는 pH의 증가에 따라 증가하였으며 상온에서의 효소의 안정성은 DEAE를 이용한 경우에 가장 높음을 실험을 통하여 확인하였다. 비교적 담체상호간의 접근이 용이한 담체인 PAMP의 PANI의 경우에는 트립신의 활성도가 급격히 감소하여 3일이 지났을 때 10% 이하로 감소하였다. 본 연구에서 제시된 담체들은 효소 고정화 목적으로 사용이 가능함을 보여 주었으며 다양한 용도로 활용이 가능할 것이다.

## 요 약

본 연구에서는 나노담체를 이용하여 효소를 고정화 하였으며 고정화 효소의 활성도, 재사용 가능성, pH 영향 및 시간에 따른 안정성을 검토하였다. 고정화 효소의 활성도는 PAMP를 사용한 경우 가장 빠른 것으로 나타났으며 이때  $V_m$ 값은 0.169 mM/min였고  $K_m$ 값은 0.263 mM 이었다. 이는 PS/PSMA를 사용한 경우보다 2배 이상의 효소 반응속도 향상을 보여 주었다. 그림을 통하여 효소의 재활용가능성을 제시 하였으며 여러 번 재사용한 경우에도 활성도를 잃지 않고 유지하였다. 고정화한 트립신은 공통적으로 pH증가에 따라 활성도가 증가하였으며 PAMP, PANI, DEAE, CMC, PS/PSMA 순으로 활성도가 높음을 확인 할 수 있었다. 트립신이 자체 효소를 분해하는 특성을 고려할 때 고정화 되지 않은 트립신의 안정성은 매우 낮게 된다. 본 연구에서 사용된 담체 중에 크기가 아주 작은 담체인 PAMP와 PANI의 경우에는 활성도가 급격히 감소하는 현상을 보였으나 비교적 크기가 큰 다른 담체의 경우에는 고정화 효소의 안정성이 우수한 것으로 나타났다.

## REFERENCES

- Barrett, J., Brophy, P. M., and Hamilton, J. V. (2005), Analysing proteomic data. *International Journal for Parasitology* **35**, 543.
- Stults, J. T., Arnott, D., and Burlingame, A. L. (2005), Proteomics. In *Methods in Enzymology*. p245, Academic Press.
- Mitsui, K., Doi, H., Nukina, N., and Indu Kheterpal and Ronald, W. (2006) Proteomics of Polyglutamine Aggregates. In *Methods in Enzymology* pp63-76, Academic Press.
- Ota, S., Miyazaki, S., Matsuoka, H., Morisato, K., Shintani, Y., and Nakanishi, K. (2007), High-throughput protein digestion by trypsin-immobilized monolithic silica with pipette-tip formula. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **70**, 57-62.
- Zhang, K., Wu, S., Tang, X., Kaiser, N. K., and Bruce, J. E. (2007), A bifunctional monolithic column for combined protein preconcentration and digestion for high throughput proteomics research. *Journal of Chromatography B* **849**, 223-230.
- Kong, X., Zhou, H., and Qian, H. (2007), Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry* **101**, 615-620.
- Ringseis, R., Matthes, B., Lehmann, V., Becker, K., Schops, R., Ulbrich-Hofmann, R., and Eder, K. (2005), Peptides and hydrolysates from casein and soy protein modulate the release of vasoactive substances from human aortic endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1721**, 89-97.
- Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R., and Mulligan, C. (2004), Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International* **37**, 123-131.
- Lee, J., Lee, J., Na, H. B., Kim, B. C., Youn, J. K., Kwak, J. H., Moon, K., Lee, E., Kim, J., Park, J., Dohnalkova, A., Park, H. G., Gu, M. B., Chang, H. N., Grate, J. W., and Hyeon, T. (2005), A magnetically separable, highly stable enzyme system based on nanocomposites of enzymes and magnetic nanoparticles shipped in hierarchically ordered, mesocellular, mesoporous silica. *Small* **1**, 1203-1207.
- Lee, J., Kim, J., Kim, J., Jia, H. F., Kim, M. I., Kwak, J. H., Jin, S. M., Dohnalkova, A., Park, H. G., Chang, H. N., Wang, P., Grate, J. W., and Hyeon, T. (2005), Simple synthesis of hierarchically ordered mesocellular mesoporous silica materials hosting crosslinked enzyme aggregates. *Small* **1**, 744-753.
- Kim, B. C., Nair, S., Kim, J., Kwak, J. H., Grate, J. W., Kim, S. H., and Gu, M. B. (2005), Preparation of biocatalytic nanofibres with high activity and stability via enzyme aggregate coating on polymer nanofibres. *Nanotechnology* **16**, S382-S388.
- Gupta, A. K. and Gupta, M. (2005), Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995-4021.
- Simonian, A. L., Good, T. A., Wang, S. S., and Wild, J. R. (2005), Nanoparticle-based optical biosensors for the direct detection of organophosphate chemical warfare agents and pesticides. *Analytica Chimica Acta* **534**, 69-77.
- Kim, J. and Grate, J. W. (2003), Single-enzyme nanoparticles armored by a nanometer-scale organic/inorganic network. *Nano Letters* **3**, 1219-1222.