

해조류 및 다당류로부터 포도당 생산을 위한 나노효소 개발 및 특성

김려화 · 이중헌*

조선대학교 생명화학공학과

Development of Nanoenzymes for the Production of Glucose from Seaweed and Various Polysaccharide

Lie Hua Jin and Jung Heon Lee*

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract The magnetically separable polyaniline nanofiber enzymes were developed for the recycle of enzyme and enhanced enzyme stability. The stability of enzyme was maintained over 90% for 8 days under room temperature and vigorous shaking conditions (200 rpm). The residual activity of immobilized enzyme was over 60% after 8 days incubation at 55°C. Glucose was produced from various polysaccharides, agarose, curdlan, cellulose, and sea weed, using magnetically separable immobilized enzyme. Glucose production rate with curdlan was 1.2 g/(l h) and showed high decomposition rate due to high mass transfer. After 10 times recycle, the residual activity of immobilized enzyme was over 75%. 1 g/L of glucose was produced with 5 mg of immobilized enzymes.

Keywords: nanoenzyme, seaweed, enzyme stability, glucose production

서 론

최근 원유가격의 상승에 따른 대체에너지의 개발 필요성 대두와 더불어 바이오 에탄올을 생산하는 공정이 개발되고 있으나 대부분의 경우에는 식량유래의 탄소원의 사용에 따른 식량가격의 상승으로 경제적인 부담이 증가하고 있다. 이러한 문제의 해결을 위해 비곡물 유래의 바이오에탄올 생산을 위한 기술개발을 선진국에서 추진하고 있으며 대안의 하나가 해조류를 이용한 에탄올의 생산이다 [1-3]. 또한, 대기 중의 이산화탄소의 증가에 따라 이산화탄소를 저감시키는 기술의 개발이 필요한데 이러한 이산화탄소를 전환하는 방법의 하나가 바다에서 해조류를 배양하여 대기 중의 이산화탄소를 제거하는 것이다. 대부분의 해조류는 1년생으로 1년 동안

80 cm 이상 자라며 질량도 크게 늘어난다. 이러한 해조류를 활용하는 기술의 개발이 대두되고 있다 [4-5].

현재 조류의 산업적인 응용은 갈조류의 경우에는 갈조류에서 추출한 알긴산을 사용하여 섬유, 식품, 제지 및 의약품에 사용되고 있다 [6-8]. 알긴산은 흡수성이 우수하여 현탁제, 안정제, 유화제, 농후제, 겔화제 등으로 다양한 용도로 쓰이고 있으며 홍조류의 경우에는 홍조류로부터 추출한 아가와 카라기난이 널리 이용되고 있다 [9-10]. 아가의 경우에는 미생물의 배지로 많이 사용되고 있으며 순도가 높은 아가로스 전기영동용 시약으로 사용되고 있으며 화장품의 첨가물로 많이 사용되고 있다. 카라기난도 다른 다당류와 같이 분산제, 유화제 등의 안정제로 그 활용성이 높다.

최근 해조류를 이용한 다양한 기술개발이 확대되고 있다. 해조류의 cellulose를 이용하여 종이를 만드는 기술이 개발되었으며 이러한 기술의 개발은 해조류내의 cellulose가 많이 함유되어 있음을 보여주고 있으며 향후 해조류 유래의 탄소원을 이용한 다양한 기술의 개발 가능성을 열어주고 있다.

*Corresponding author

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

e-mail: leejh@chosun.ac.kr

미역으로부터 유래되는 포도당 등의 다당류를 활용하여 혈당 저하 등에 활용되고 있다고 보고하고 있다 [8].

일반적으로 다당류를 분해하는 효소는 재사용이 불가능하고 효소의 안정성이 떨어지기 때문에 이를 산업적으로 활용하기는 매우 열악한 실정이다. 효소의 활용성을 높이기 위한 일환으로 효소의 고정화 및 안정화 기술이 많이 개발되어 왔으나 효소를 고정화 하는 경우에는 polysaccharide의 접근성 문제로 거의 활성도가 없는 것으로 나타나 고정화된 효소를 적용하기 어려웠다. 최근 나노공학의 발달에 따라 나노물질을 이용한 생명공학에의 적용이 활발히 진행되고 있다 [11-13]. 효소를 자석으로 분리가 가능한 나노물질에 고정화함으로써 효소의 지속적인 재활용이 가능하며 연속적인 활용이 가능해졌다.

본 연구에서는 자석으로 분리가 가능한 고정화 나노효소를 활용하여 glucan, agarose 및 cellulose를 glucose로 전환시켜 고정화 나노효소의 효율 및 해조류를 이용한 포도당의 생산 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

실험재료

분해효소인 lysing enzyme, aniline 및 iron oxide nanoparticle은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입 하였으며 iron oxide nanoparticle의 size는 평균 20-100 nm을 사용하였으며 표면을 개질한 후 사용하였다. 25% glutaraldehyde는 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며 실험에 사용된 시약은 시중에서 구할 수 있는 시약 중에 높은 등급의 시약을 사용하였다. 미역줄기는 미역을 수확하고 남은 미역 줄기를 믹서를 활용하여 잘게 부순 후 사용하였다. Curdlan (β -1,3-glucan)은 발효를 통하여 생산하여 분리 생산된 제품 (Takeda, Japan)을 사용하였다.

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 nanofiber 제조

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

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

Nanofiber에 효소 고정화

효소를 고정화시키기 위해서 5 mg의 nanofiber와 40 mg의 lysing enzyme을 1 mL (50 mM citrate-phosphate buffer, pH 5.0)에 넣어 효소와 nanofiber가 잘 섞이도록 상온에서 30분동안 200 rpm으로 흔들어서 준다. 잘 섞인상태의 용액을 냉장고에 넣어 30분동안 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 50 mM buffer (pH 5.0)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.

Nanoenzyme을 이용한 다당류 분해

고정화 효소를 사용하여 물리적인 형태가 다른 각 다당류를 분해하는 실험을 수행하였다. 본 연구에서 사용된 다당류는 curdlan, agarose, cellulose particle, cellulose fiber와 seaweed를 사용하여 생산되는 포도당의 농도를 비교하였다. 다당류의 초기농도를 5 g/L로 하였으며 반응부피를 2 mL로 하여 고정화된 효소를 5 mg 첨가하여 교반조건 (150 rpm) 하에서 반응을 진행하였다. 광학 현미경을 사용하여 고정화 효소와 기질의 접촉상태를 관찰하였다.

미역줄기를 이용한 포도당 생산

미역을 수확하고 남은 미역 줄기를 믹서를 활용하여 잘게 부순 후 건조 질량의 농도가 10 g/L가 되도록 하여 반응부피 2 mL에 lysing enzyme이 고정화 된 nanoenzyme을 5 mg 첨가하여 1일 동안 반응 시키면서 포도당의 농도를 측정한다.

실험결과 및 고찰

고정화 효소의 광학 현미경 특성

고정화 효소를 사용한 경우 각 다당류에 따라서 분해되어 생산되는 포도당 농도가 크게 다르게 나타나는데 이러한 원인을 찾기 위해서 광학 현미경을 사용하여 기질과 고정화

효소와의 접촉에 따른 변화를 관찰하였다. Fig. 1(d)에서와 같이 curdlan의 경우에는 중성 상태에서 입자상태로 존재하나 입자의 크기가 매우 작아 고정화 효소에 의해 분해되는 특성이 우수한 것으로 나타났다. Cellulose fiber나 agarose의 경우에는 fiber와 고정화 효소가 유리되어 접촉 확률이 적기 때문에 생산되는 포도당의 양이 매우 작음을 설명할 수 있다. 미역을 갈아서 직접 사용하는 경우에도 agarose 및 cellulose fiber와 비슷한 특성을 보여 다당류가 분해되어 glucose가 생산되는 속도가 다른 fiber를 분해하는 속도와 비슷함을 알 수 있었다.

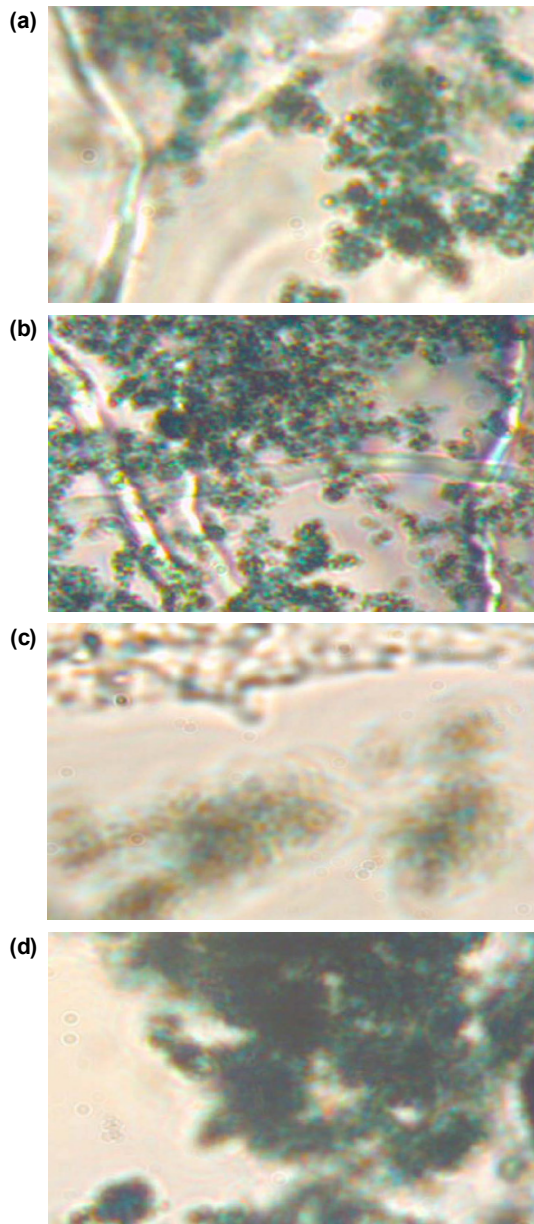


Fig. 1. Degradation of polysaccharide with magnetically separable immobilized lysing enzyme. (a) Agarose, (b) cellulose fiber, (c) sea weed, and (d) curdlan degradation.

고정화 효소 특성

polyaniline coated magnetic nanoparticle (PAMP)을 사용하여 재활용이 가능한 cellulase, glucanase 및 agarase를 고정화 하여 고정화 효소의 특성을 조사하였다. 시간에 따른 효소 활성도의 변화를 측정하기 위해 초기농도 5g/L polysaccharide등을 기질로 하여 시간에 따른 효소의 활성도의 변화를 측정하였다. Fig. 2는 curdlan, agarose, cellulose, cellulose fiber 및 미역의 다섯가지 기질에 대한 고정화 효소의 특성을 관찰하였다. 광학 현미경 사진을 통하여 관찰하였듯이 고정화 효소와 접촉력이 우수한 curdlan의 분해속도가 가장 빠름을 알 수 있다. Glucose의 생산 속도는 curdlan을 사용했을 경우 다른 기질을 사용했을 경우 보다 3-5배 이상 빠름을 알 수 있었다. 본 연구에서 curdlan을 분해하는 경우 glucose 생산 속도는 약 1 g/L/h로 나타났다.

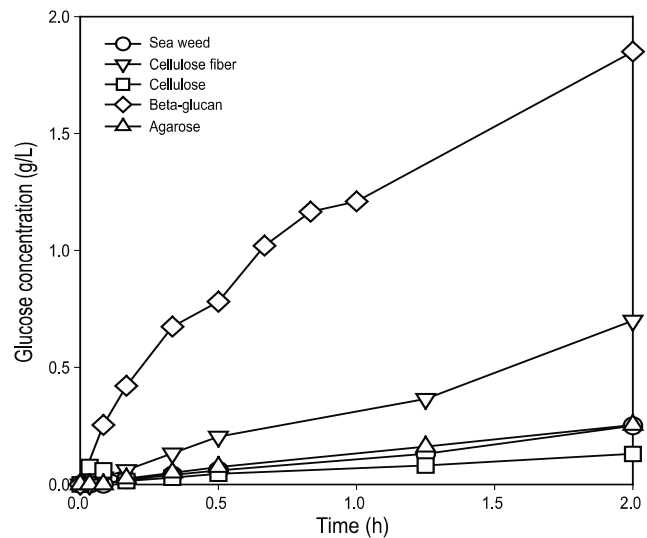


Fig. 2. Production of glucose using various carbohydrate using PAMP immobilized lysing enzyme.

온도에 따른 활성도 변화

Fig. 3은 효소 반응온도를 25°C, 55°C 및 75°C로 했을 때 효소 활성도의 변화를 측정하였다. 온도가 증가 할수록 효소의 활성도는 증가 하였으며 아주 높은 온도인 75°C의 경우에도 beta-glucanase의 활성도가 높아 glucose의 생산이 빠르게 나타남을 보였다. 이는 lysing enzyme의 최적 활성도가 55°C임을 감안하면 높은 온도 때문에 초기에 효소 활성도가 높았던 것으로 판단된다. Agarose의 경우에도 curdlan을 사용한 경우와 같이 glucose로 분해되는 속도가 75°C일 때 가장 높은 것으로 나타났다. 상온에서 분해 반응을 시킨 경우에도 분해반응은 일어나나 아주 느리게 일어나는 결과를 보였다. 향후 polysaccharide를 이용한 에탄올 발효에서는 초기에 온도를 높여서 polysaccharide를 분해시키고 분해시킨 당류를 이용하여 에탄올을 생산하는 단계적인 공정이

필요할 것으로 판단된다.

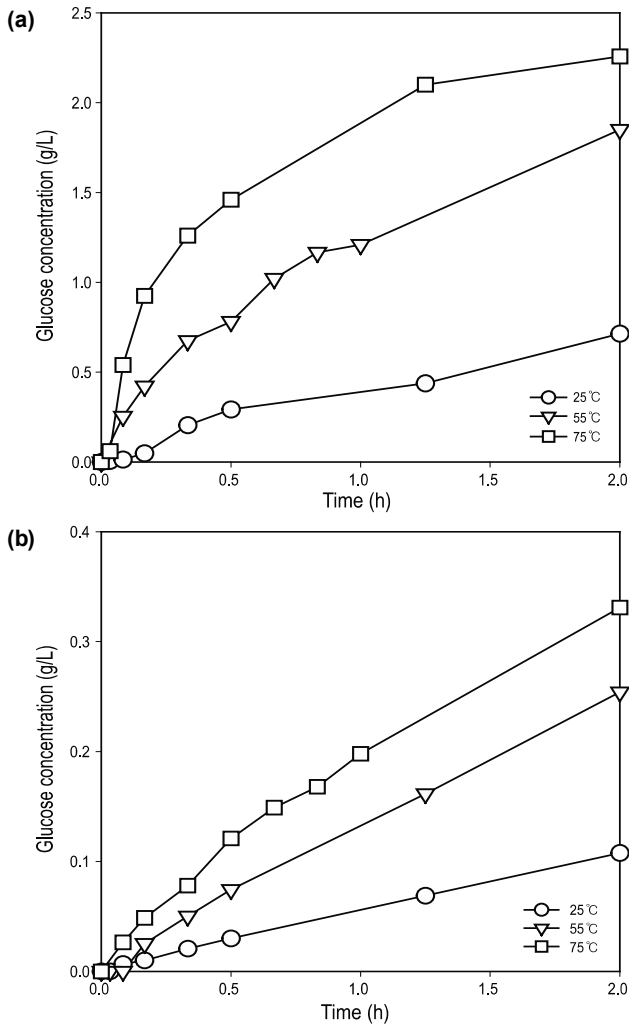


Fig. 3. Effect of temperature on glucose production using lysing enzyme. (a) curdlan was used as substrate and (b) agarose was used as substrate

고정화 효소 안정성

고정화 효소를 사용하여 curdlan 및 agarose를 분해하여 생산되는 glucose의 농도를 측정함으로써 효소의 열적 안정성을 측정하였다. 효소의 안정도는 온도가 높은 경우에 효소의 비활성화에 의하여 빠른 속도로 감소하였다 (Fig. 4). Curdlan을 분해하는 lysing enzyme 속의 glucanase에 비해 agarose를 분해하는 agarase의 비활성 속도가 높은 것으로 나타났다. Glucanase의 경우에는 8일 동안에 상온에서 90%의 activity를 유지하였으나 55°C 경우에는 60%를 유지하고 75°C인 경우에는 활성도가 없는 것으로 나타났다. 이러한 안정성의 유지는 효소의 나노물질에 결합 한 경우 낮은 온도에서는 안정된 결합을 하다가 높은 온도에서는 결합상태가 쉽게 유리되어 바로 유리된 효소가 비활성화 되어 전체적인

안정성이 떨어지는 것으로 측정되었다.

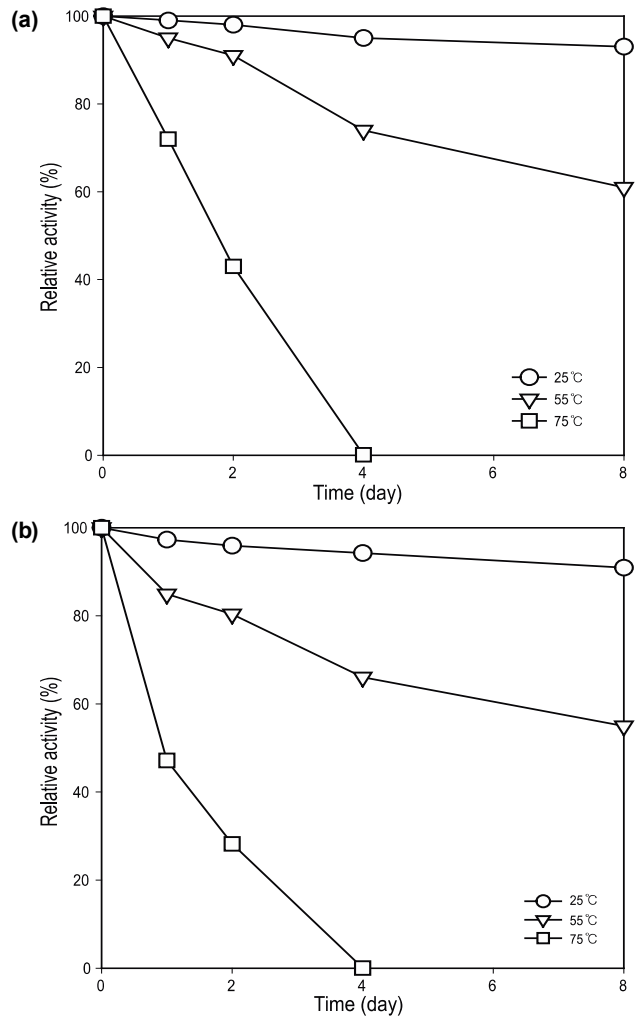


Fig. 4. Effect of temperature on the stability of enzyme coating on the surface of PAMP. (a) β -glucanase and (b) agarase.

고정화 효소 재사용 가능성

자석으로 분리가 가능한 고정화 담체인 PAMP에 효소를 고정화 시킨 후에 이를 사용하여 glucan를 분해하여 glucose를 만드는 과정을 반복하여 실험하였다. 이러한 일련의 실험은 효소의 재활용을 통하여 효소의 사용량을 감소시키고 효소의 재사용을 통하여 경제적인 효과를 얻기 위한 과정이었다. 본 연구를 통하여 고정화 효소를 사용하고 이를 자석을 통하여 회수 한 후에 다시 사용하는 반복되는 과정을 통하여 사용한 결과 한번 회수 할 때마다 회수되는 효소의 양이 95% 이상으로 10번 반복해서 사용한 경우 회수되는 효소의 양이 초기 효소활성도의 75%의 회수율을 보여주었다. 효소의 회수율의 감소는 효소반응온도가 55°C인 고온인 관계로 효소의 활성도 감소 및 고정화 효소가 탈착되어 총괄적인 효소의 활성도 감소로 나타난 것이다. 효소의 재사용과정에

서 초기 glucan의 농도가 높은 경우에는 자석으로 분리가 어려웠으나 glucan의 분해에 따라서 점성이 감소하기 때문에 자석으로 분리가 가능하였다. Fig. 5(b)는 효소의 회수 과정을 사진으로 보여준 것이다. 본 연구에서 개발한 효소는 자석에 빠른 속도로 붙기 때문에 분리가 용이하면서 반응액으로부터 깨끗하게 분리되는 모습을 보여주고 있다.

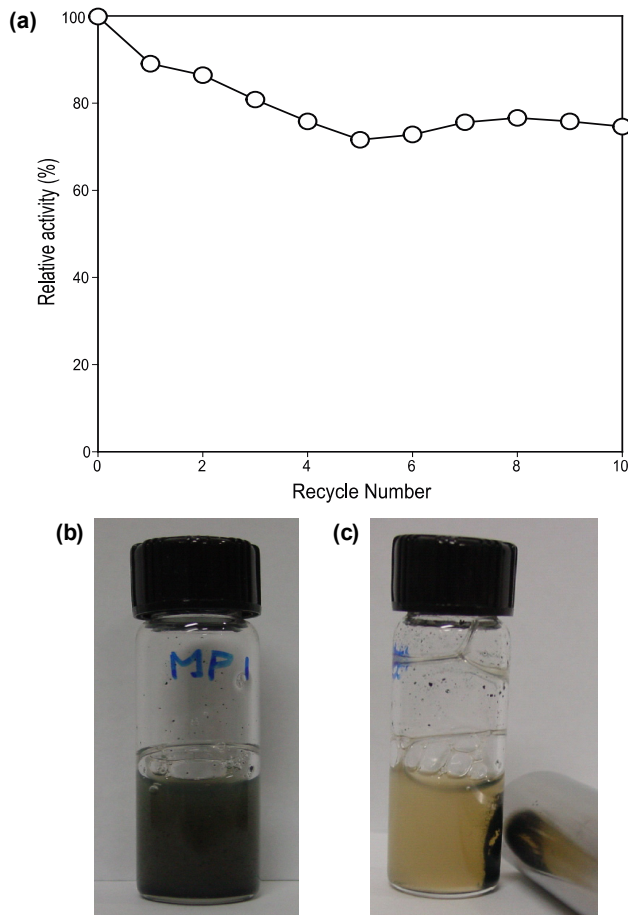


Fig. 5. Effect of immobilized enzyme recycle on (a) enzyme activity. The immobilized enzymes are homogenized (b) and recovery with magnets (c)

효소를 이용한 포도당 생산

Lysing enzyme을 PAMP에 고정화시켜 미역으로부터 glucose를 생산하는 공정을 개발하였다. 고정화 시킨 효소와 고정화 시키지 않은 효소를 이용하여 생산되는 glucose 농도를 측정하여 Fig. 6에 표시하였다. 고정화 효소의 경우에는 고정화 시키지 않은 효소보다 더 많은 효소를 이용했음에도 불구하고 기질을 분해하는 능력의 차이 때문에 생산되는 포도당의 농도가 낮음을 측정할 수 있었다. 분해 반응 초기에는 분해속도가 빨랐으나 시간이 지남에 따라서 분해되는 속도가 줄어드는 현상을 볼 수 있었는데 이러한 현상은 고분자가 저분자로 분해되면서 효소의 active pore 또는 고정화

효소의 pore를 막아서 반응 속도가 저해되는 현상을 보이고 있는 것으로 판단되었다.

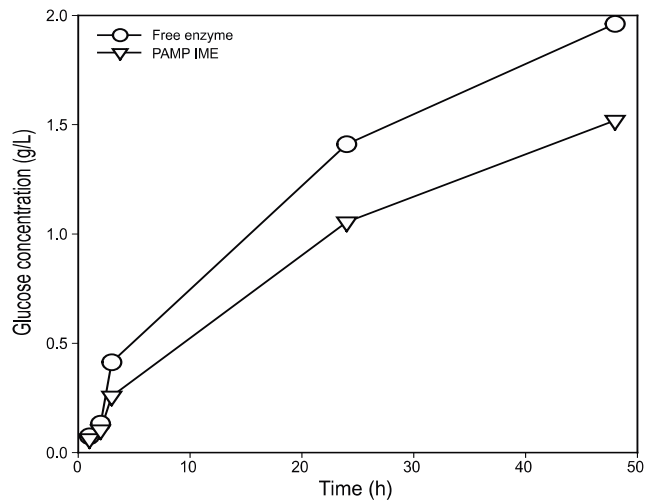


Fig. 6. Production of glucose using free and immobilized lysing enzyme. 50 g/L of sea weed (wet weight) was used as substrate for the production of glucose. 1 mL of sea weed and 1 mL of citrate phosphate buffer was mixed and 40 mg of free lysing enzyme or 5 mg of PAMP immobilized enzyme was added to initiate glucose production. The reaction temperature was 55°C.

결론

본 연구에서는 자석으로 분리가 가능한 나노물질 합성하여 고정화 담체로 활용하여 다당류를 분해하는 효소로 사용하였다. 다당류를 분해하여 생산되는 포도당의 농도를 측정하여 각 기질의 분해 특이성을 관찰하여 고정화 효소와 기질과의 결합성이 중요한 요소임을 밝혀내었다. 본 연구를 통하여 효소의 열적 안정성, 활성도 및 효소의 재사용 가능성을 확인하였으며 본 연구의 결과를 바탕으로 향후 다당류를 이용한 포도당의 생산 등의 연구에서 본 연구를 통하여 개발된 고정화 효소를 사용하여 공정의 개발이 가능함을 보여주었다.

요약

본 연구에서는 효소의 재활용성과 안정성을 확보하기 위해 자석으로 분리가 가능한 polyaniline nanofiber를 개발하였다. 개발된 고정화 효소는 상온에서 8일 동안 90% 이상의 활성도를 보유하였으며 온도가 높은 55°C에서는 60% 이상의 활성도를 보유하여 안정성의 유지현상을 보였다. 개발된 고정화 효소는 자석으로 분리가 가능하였으며 이 효소를 이용하여 curdlan, agarose, cellulose, 및 미역을 분해한 결과 포도당을 생산하였으며 curdlan을 분해시킨 경우

에는 분해 속도가 1.2 g/L/h로 나타나 다른 다당류에 비해 3-10배 이상 빠른 속도를 나타내었다. 고정화 효소를 반복하여 사용하는 경우 10번 반복 사용했을 때 75% 이상의 활성도를 유지하는 것으로 측정되었다. 젖은 미역 줄기를 10 g/L를 분해하기 위하여 5 mg의 고정화 효소를 사용한 결과 24시간 만에 1 g/L의 glucose를 생산하였다.

접수 : 2010년 9월 10일, 게재승인 : 2010년 10월 21일

감 사

본 논문은 국토해양부 해양생명공학사업 (해양바이오 에너지 생산기술개발)에 의해 수행된 결과이며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Demirbas, A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science* 33: 1-18.
2. Reijnders, L. and M. A. J. Huijbregts (2007) Life cycle greenhouse gas emissions, fossil fuel demand and solar energy conversion efficiency in European bioethanol production for automotive purposes. *Journal of Cleaner Production* 15: 1806-1812.
3. Pfeffer, M., W. Wukovits, G. Beckman, and A. Friedl (2007) Analysis and decrease of the energy demand of bioethanol-production by process integration. *Applied Thermal Engineering* 27: 2657-2664.
4. El-Sikaily, A., A. E. Nembr, A. Khaled, and O. Abdelwehab (2007) Removal of toxic chromium from wastewater using green alga *Ulva lactuca* and its activated carbon. *Journal of Hazardous Materials* 148: 216-228.
5. Joaquim, M., Oliveira, J. M. R. Grech, I. B. Leonor, J. F. Mano, and R. L. Reis (2007) Calcium-phosphate derived from mineralized algae for bone tissue engineering applications. *Materials Letters* 61: 3495-3499.
6. Deacon, J. W., R. K. W. Macdonald, F. M. Fox, and D. Lascares (1998) Application of alginate gel for protection of wounds against crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*). *Plant Pathology* 37: 522-528.
7. Pandey, R., Z. Ahmad, S. Sharma, and G. K. Khuller (2005), Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 301: 268-276.
8. Finotelli, P. V., M. A. Morales, M. H. Rocha-Leão, E. M. Baggio-Saitovitch, and A. M. Rossi (2004) Magnetic studies of iron (III) nanoparticles in alginate polymer for drug delivery applications, *Materials Science and Engineering: C* 24: 625-629.
9. Wei Z. and H. Li (2007) Development of an eco-friendly agar extraction technique from the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis*. *Journal of Biotechnology* 131: S194-S195.
10. Vilar, V. J. P., C. M. S. Botelho, and R. A. R. Boaventura (2007) Kinetics and equilibrium modelling of lead uptake by algae *Gelidium* and algal waste from agar extraction industry. *Journal of Hazardous Materials* 143: 396-408.
11. Vamvakaki, V. and N. A. Chaniotakis (2007) Immobilization of enzymes into nanocavities for the improvement of biosensor stability. *Biosensors and Bioelectronics* 22: 2650-2655.
12. Salimi, A., E. Sharifi, A. Noorbakhsh, and S. Soltanian (2007) Direct electrochemistry and electrocatalytic activity of catalase immobilized onto electrodeposited nano-scale islands of nickel oxide. *Biophysical Chemistry* 125: 540-548.
13. Tang, Z.-X., J.-Q. Qian, and L.-E. Shi (2007) Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. *Materials Letters* 61: 37-40.