

공유결합으로 다공성 막에 고정화된 효소에 의한 이산화탄소 포집

박진원*

Carbon Dioxide Sequestration of Enzyme Covalently Immobilized on Porous Membrane

Jin-Won Park*

접수: 2013년 5월 17일 / 게재승인: 2013년 7월 25일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Bovine Carbonic anhydrase (BCA) was immobilized on a submicro-porous membrane through covalent immobilization. The immobilization was conducted on the porous membrane surface with the treatment of polyethyleneimine, glutaraldehyde, and the anhydrase, in sequence. The immobilization was confirmed using X-ray photon spectrometer. The pH values of carbon-dioxide saturated solution with buffer were monitored with respect to time to calculate the catalytic activities of hydration of carbon-dioxide for free and immobilized CA. The catalytic rate constant values for free CA, immobilized CA on polystyrene nanoparticles, and immobilized CA on a porous cellulose acetate membrane were 0.79, 0.67, and 0.56 s⁻¹, respectively. Reusability was studied up to 10 cycles of CO₂ sequestration. The activity for the CA immobilized on the membrane was kept to 95% after 10 cycles, and comparable to the CA on the nanoparticles. The stabilities for heat and storage were also investigated for the three cases. The results suggested that the CA immobilized the membrane had the least loss rate of the activity compared to the others. From this study, the porous membrane was feasible as a carrier for the CA immobilization in hydration and sequestration of carbon-dioxide.

Keywords: Carbon-dioxide, Carbonic anhydrase immobilization, Porous membrane, Sequestration

서울과학기술대학교 화공생명공학과
Department of Chemical & Biomolecular Engineering, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea
Tel: +82-2-970-6605, Fax: +82-2-977-8317
e-mail: jwpark@seoultech.ac.kr

1. 서론

환경으로의 이산화탄소 배출량 증가는 지구 온난화로 연결되어 오늘날 큰 관심사로 대두되고 있다. 지구의 기후는 지구 궤도의 변화, 태양강도의 변화, 해류의 변화, 화산 배출과 온실 기체 농도의 증가 (GHG) 농도와 같은 다양한 요인에 의해 지속적으로 변화하고 있다. 온실기체효과는 물, 수증기, 이산화탄소, 메탄 및 다른 대기 기체가 지구 밖으로 나가는 적외선을 흡수함으로써 지구의 온도 상승을 유발시키는 현상이다 [1]. 대기 중의 과도한 온실 기체는 바다의 수위 상승과 바다 폭풍 및 홍수의 증가 등 환경 문제에 대한 원인인 것으로 알려져 있다 [2]. 온실 기체 중 이산화탄소는 지구 온난화의 주요 원인으로 대략 55%의 영향을 끼치는 것으로 관측되며, 온실효과의 65% 가량을 차지하는 것으로 알려져 있다 [3]. 기후변화에 관한 정부간협의체(Intergovernmental Panel on Climate Change; IPCC)에 따르면, 2100년까지 이산화탄소의 대기 중 농도가 570 ppmv에 달할 것으로 보이며 그에 따라 지구의 평균 온도는 1.9°C 증가하고 해수면의 평균 수위는 3.8 m 상승할 것으로 예상되었다. 현재 전세계 에너지 요구량의 85%가 석탄, 석유 및 기체 등의 화석 연료 발전에 의해 공급되고 있다. 이와 같은 연료 화력 발전소는 총 이산화탄소 배출량의 약 40%를 차지하고 있으며, 주된 요인은 석탄 연소 발전소들이다 [4]. 발전소에서 배출되는 연소기체로부터의 이산화탄소 포집은 탄소포집과 저장 비용에서 4분의 3을 차지하고 있다. 더 많은 국제적인 관심이 지구온난화에 집중됨에 따라, 글로벌 관점에서 중요한 연구 사항으로서 더욱 중요해지고 있다 [5]. 장기적인 이산화탄소 감축 목표를 달성하기 위하여, 전세계적으로 증가하는 에너지수요를 고려하면서 저비용의 이산화탄소 포집과 이에 수반되는 격리 과정들이

평가될 필요가 있다. 현재, 이산화탄소 포집을 위하여, 흡수, 흡착, 기체 분리 등의 기술이 개발되어 온 상태이다.

자연의 살아있는 유기체(효소)에서 일어나는 이산화탄소의 반응을 토대로 이산화탄소만을 선택적으로 제거할 수 있다. 중공사에 고정화된 탄산 탈수 효소 (CA)을 사용한 실험실 규모의 상압·상온 공정에서 90%의 이산화탄소가 포집 및 재생되었음이 관찰되었다. 탄산 탈수 효소를 이용한 공정은 흡수와 관련한 에너지 소모를 감소함으로써 매우 낮은 열을 나타내고 있다. 물에서 이산화탄소의 용해 속도는 이산화탄소의 수화에 의해 제한되고, 수화는 완충용량에 의해 제한된다. 탄산 탈수 효소의 추가는 이산화탄소의 용해를 촉진시키며, 촉진되는 정도는 1초당 효소 분자 1개당 600,000개의 이산화탄소를 수화시키는 것으로 알려져 있다. 최종적으로는 압력 스윙 탈착이나 고체 탄산의 침전에 의한 공정 등이 수반되면서 농축된 흐름으로 이산화탄소가 포집공정으로부터 방출될 수 있다 [6].

효소의 고정화는 고가의 효소를 재활용하며 생성물로부터 효소를 쉽게 분리할 수 있다는 측면에서 장점을 가지고 있다. 효소를 고정화함으로써 효소의 촉매특성이 향상된 사례들이 있으며, 이는 탄산 탈수 효소에서도 나타나고 있다 [7]. 본 연구에서는 다공성 막에 공유결합을 통해 고정화시킨 탄산 탈수 효소가 가지는 이산화탄소의 포집정도, 재활용성, 열 및 저장에 대한 안정성들을 평가하고자 한다.

2. 재료 및 방법

소혈청 탄산 탈수 효소 (Bovine Carbonic Anhydrase, BCA), 평균 분자량이 750,000인 폴리에틸렌이민 (Polyethyleneimine, PEI), 직경이 1 μm 인 폴리스타이렌 (Polystyrene, PS) 미세입자, 글루타랄데하이드 (Glutaraldehyde, GA), 트리스 (히드록시메틸)아미노에탄-염산 (Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride), 그리고 브래드포드 시약은 모두 시그마알드리치 (St. Louis, MO, USA)에서 구매되었으며 별도의 정제과정 없이 사용되었다. 염화칼슘 (Calcium chloride)는 삼천화학 (대한민국, 서울특별시, 강남구)에서 구매되었고, 세공의 직경이 450 nm이고 직경이 25 mm인 셀룰로스 아세테이트 다공성 막 (Cellulose Acetate Porous Membrane, CAPM)은 대한과학 (대한민국, 강원도, 원주시)으로부터 구매되었으며 사용 직전에 오존으로 처리되었다.

Fig. 1은 CAPM의 세공표면에 BCA를 공유결합으로 고정화시키기 위해 수행된 과정들을 제시하고 있다. CAPM은 1분간 오존으로의 노출을 통해 산화되었으며, 산화된 표면을 5% (v/v) PEI, 50 mM 탄산나트륨, pH 8 수용액에 2시간 동안 담궈 두었다. PEI로 기능화된 표면은 질소흐름에 건조시키고 건조된 상태로 사용직전까지 보관되었다. 건조된 PEI 처리 표면은 2.5% (v/v) GA, 20 mM 인산나트륨, pH 7.5 수용액에 3시간 동안 담궈졌으며, 비반응 시료들의 제거를 위해 초음파로 처리되고 초순수로 세척되었으며 질소흐름으로 건조되

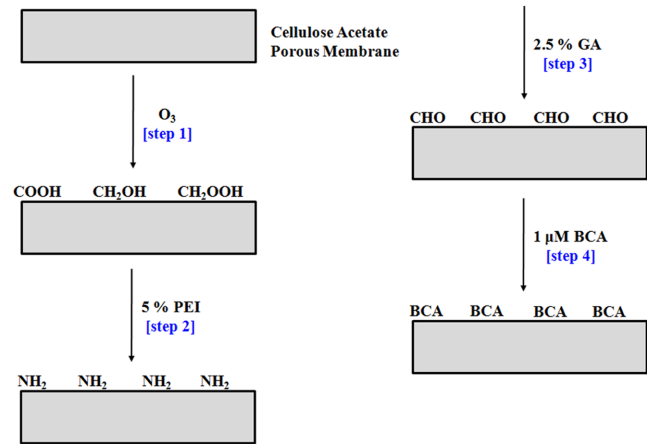


Fig. 1. Surface modification steps for BCA immobilization.

었다. BCA의 고정화는 GA로 처리된 표면을 3 mg/mL BCA, 100 mM 인산나트륨, pH 7의 수용액에 담궈서 수행되었다. BCA의 고정화를 위해 수행된 각 단계들은 모두 25°C이며, 150 rpm 속도의 교반 조건이었다. BCA의 고정화는 X선 광전자 분광기 (모델명-PHI 5800, Physical Electronics, Inc., Chanhassen, MN, USA)로 확인되었다. PS 미세입자표면에 BCA를 고정화시키기 위하여, 첫 단계로 과망간산칼륨과 황산으로 산화되며 PEI로 처리하는 그 다음 단계부터는 셀룰로스 다공성 막 세공표면에서의 과정과 동일하게 수행되었다. 각각의 경우에 대하여, 브래드포드 방법으로 주입된 BCA와 고정화되지 못한 BCA의 양이 산출되었다. 따라서, 고정화된 BCA의 농도가 계산되었다.

자유상태의 BCA, PS 미세입자표면에 고정화된 BCA, 그리고 CAPM 세공표면에 고정화된 BCA의 효소활성은 시간에 따른 pH값의 변화를 측정함으로써 연구되었다. 이산화탄소의 수화는 BCA의 활성부위와 이를 둘러싸 주위 사이의 수소 양이온 교환을 필요로 한다 [8]. 초순수에 이산화탄소 기체 방울을 공급하여 이산화탄소로 포화된 용액을 제조하고, 이 중 50 mL를 0.2 M Tris-HCl pH 7 용액 20 mL에 가한 후에 1.0, 1.5, 2.0 μM 의 BCA 농도에서 각각 pH값을 0.2초 간격으로 수집하였다. pH값의 모니터링은 pH의 변화가 더 이상 나타나지 않을 때까지 수행되었다. 모니터링이 종료된 후, CAPM은 다음 회 실험을 위한 용액으로 바로 옮겨졌다. PS 미세입자들은 분리를 위한 원심분리과정을 추가로 거친 후에, 다음 회 실험 용액으로 옮겨졌다. 수화된 이산화탄소 용액은 4% 염화칼슘, 0.5 M Tris-HCl pH 10 용액으로 1시간 동안 처리되어 탄산칼슘이 석출되었다. 석출된 탄산칼슘은 여과 및 건조되어 질량이 측정되었고, 이 질량으로부터 해당 이산화탄소의 질량을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

X선 광전자 분광기를 이용한 표면 원소 분석 결과는 Table 1

Table 1. XPS results for each step of surface treatments

	CAPM	O ₃ Treatment	PEI Treatment	GA Treatment	BCA Immobilization
C 1s	49.8%	39.6%	37.2%	43.7%	45.5%
N 1s	0.1%	0.1%	12.0%	9.4%	11.2%
O 1s	50.1%	60.3%	50.8%	46.9%	43.1%
S 2p					0.2%

에 정리되어 있다. 각각의 표면처리 단계마다 분석이 수행되었고, 원소별 함량비가 Table에 제시되어 있다. 각 원소마다 전자껍질 (i.e., 1s 또는 2p)에 분포한 전자의 결합에너지가 다르므로, 결합에너지에 따른 봉우리의 분포는 표면에서의 상대적인 원소함량을 나타낸다. 표면처리과정이 시작되기 전인 순수한 셀룰로스 아세테이트 다공성 막의 표면 성분은 대부분 탄소와 산소만으로 구성된다. 오존처리 후, 산소함량비가 늘어난 것이 확인되었고, PEI로 처리한 후에는 질소 성분비가 급격히 높아가는 것이 관찰되었다. 이는 PEI 성분이 CAPM 표면에 물리적으로 강하게 흡착되어 있음을 의미한다. 그 다음 단계로 수행된 GA처리 후에 관찰된 탄소 비율의 증가와 BCA고정화에 따른 질소 비율의 증가는 각각 예상과 일치한다.

이산화탄소의 수화는 시간에 따른 pH 값의 측정으로 모니터링되었다. Fig. 2는 1 μM BCA, 25°C에서 자유상태의 BCA, PS미세입자에 고정화된 BCA, CAPM에 고정화된 BCA에 대하여 측정된 pH 변화를 나타내고 있다. 각 조건에 따른 pH 값 변화의 차이가 명확하게 들어나는 조건을 고려하여, pH 7에서 측정을 수행하였고 완충용액을 사용하였다. 시간에 따른 pH 값의 변화가 자유상태의 BCA에 대하여 가장 빠르며 CAPM에 고정화된 BCA에 대하여 가장 느린 것을 알 수 있다. 이 결과는 BCA에 대한 이산화탄소 접근의 용이성이 반영된 결과인 것으로 판단된다. 그러나, 대략 10초 남짓 시간 후에는, 더 이상 변화가 없는 상태에 도달되는 pH의 값은 매우 유

사한 것으로 관찰되었다. 따라서, 고정화된 BCA에서도 효소의 활성이 유지됨을 알 수 있다. 효소 농도 변화에 따른 결과를 확인하기 위하여, 자유상태의 BCA가 각각 다른 농도들 (1.0, 1.5, 2.0 μM)로 주어진 조건에서도 실험이 수행되었다. BCA의 농도가 증가할수록 반응속도가 가시적으로 확인될 만큼 빠른 것으로 측정되었다 (Fig. 3).

BCA에 의한 이산화탄소 수화에 대한 반응속도 분석을 위하여, 모형식으로써 Michaelis-Menten식을 아래와 같이 고려하였다.

$$-\frac{d[CO_2]}{dt} = \frac{k_{cat}[CO_2][E]}{k_m + [CO_2]}$$

위 모형식에서 [E]는 효소의 농도, k_{cat} 는 촉매 속도 상수이고 k_m 은 Michaelis-Menten 상수이다. 이 식의 상수들을 산출하기 위하여, 다음과 같은 과정들을 수행하였다. 초기 이산화탄소의 농도는 석출된 탄산칼슘의 질량으로부터 구하였다. 그리고, 더 이상 값의 변화가 없는 시점까지 pH 값을 측정하였으며, 여기에서 구한 시간에 따른 수소양이온의 몰 농도를 초기 이산화탄소의 몰 농도에서 차감하였다. 따라서, 시간에 따른 이산화탄소의 몰 농도를 구할 수 있었다. 또한 시간에 대한 이산화탄소 농도의 변화율은 수소의 변화율을 이용할 수 있다. 따라서, Lineweaver-Burk Plot의 적용이 가능하였다 [9]. 시간에 따른 pH값의 변화를 이산화탄소 농도의 변화로 나타낸 곡선과 Lineweaver-Burk Plot이 적용된 곡선이 Fig. 4에 제시되어 있다. Lineweaver-Burk Plot의 결과로 자유상태의 BCA, PS미세입자에 고정화된 BCA, CAPM에 고정화된 BCA에 대하여 구한 k_{cat} 와 k_m 이 Table 2에 정리되어 있다.

고정된 BCA의 재활용성과 열 및 저장에 대한 안정성을 평가하였다. 활용횟수에 따른 BCA의 활동도를 평가한 결과가 Fig. 5에 제시되어 있다. 10회까지 재활용을 하면서 활동도 변화를 관찰하였고, CAPM에 고정화된 BCA의 경우에 1회 시의 활동도 대비 평균 95%로 유지되었다. 반복 실험은 3회 수

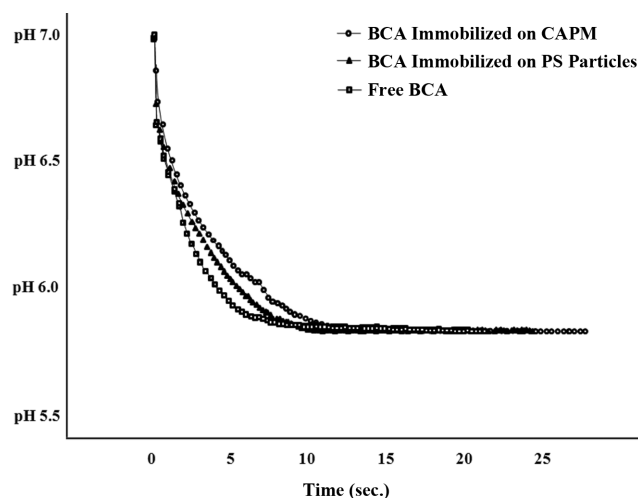


Fig. 2. Measurement of pH value for 1 μM free BCA, BCA immobilized on PS particles, and BCA immobilized on CAPM.

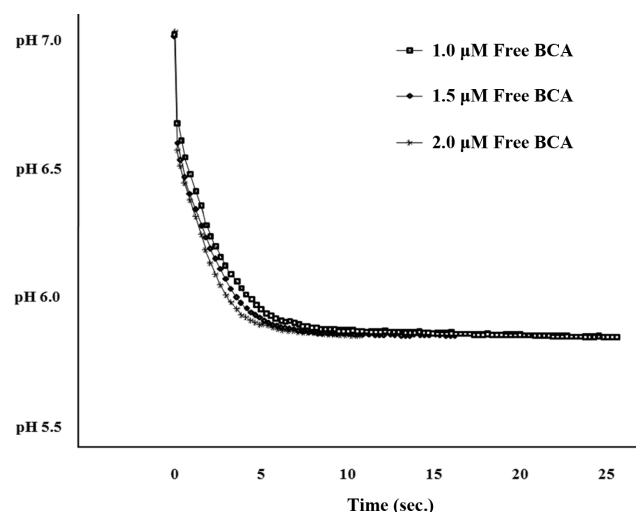


Fig. 3. Measurement of pH value for different BCA concentrations.

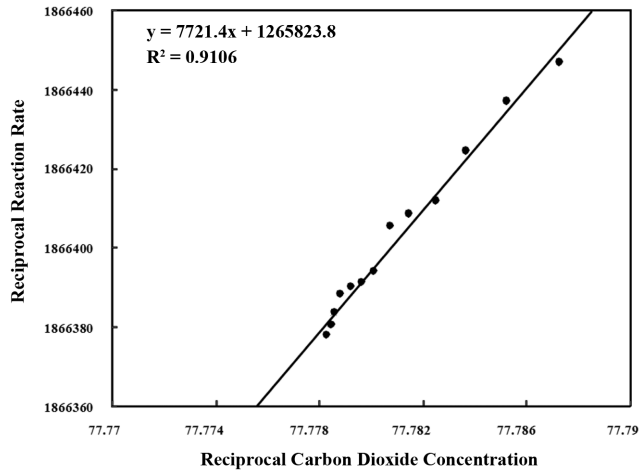


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot for carbon dioxide hydration.

Table 2. Activity of BCAs for free BCA, BCA immobilized on PS particles, and BCA immobilized on CAPM

	Free BCA	BCA Immobilized on PS Particles	BCA Immobilized on CAPM
K_{cat} (s ⁻¹)	0.79	0.67	0.56
K_m (mM)	6.1	6.0	5.8
K_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)	129.51	111.67	96.55
CaCO ₃ (mg)	90.4	90.1	88.5

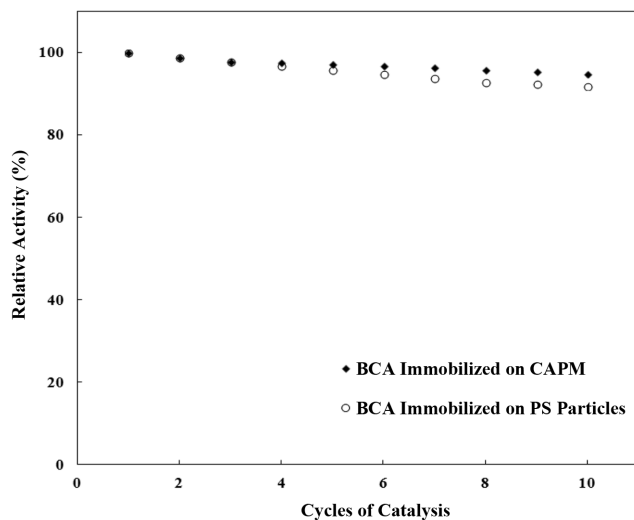


Fig. 5. Relative activity change with respect to the number of reuse.

행되었으며, 두 차례는 96%, 한 차례는 93%의 결과를 얻었다. PS에 고정화된 BCA에서는 평균 92%로 유지되었으며 한 차례는 94%, 두 차례는 91%의 결과를 나타내었다.

그리고, 20, 25, 30, 35, 그리고 40°C에서 실험을 수행하여

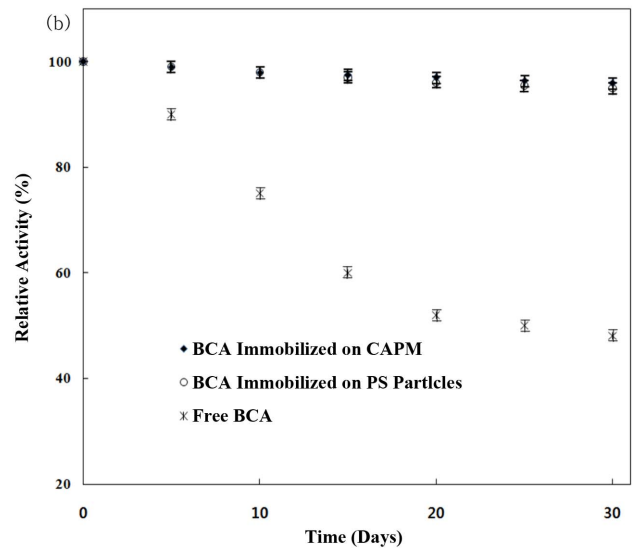
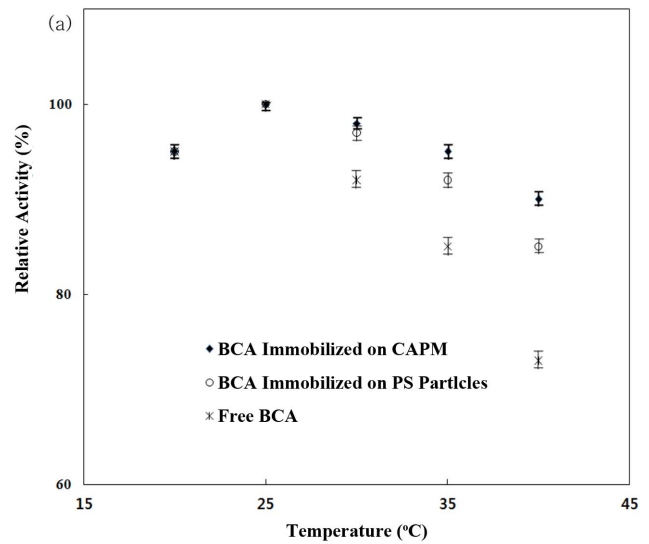


Fig. 6. Stability change with respect to (a) thermal effect and (b) storage.

온도가 끼치는 영향을 파악하고자 하였다. 다른 문헌에서 발표된 결과와 동일하게, 25°C에서 활동도가 가장 높은 것으로 나타났으며 25°C의 활동도를 기준으로 다른 온도에서의 상대적인 활동도를 관찰하였다 [10]. 20°C에서는 활동도는 세 가지 경우에 모두 유사하게 나타났다. 이는 반응에 영향을 주는 BCA 구조가 25°C보다 높은 온도에서 변형되는 것으로 해석할 수 있다. 25°C 이상의 온도에서 자유상태의 BCA에서보다 고정된 BCA에서 활동도 감소가 상대적으로 적게 관찰되었다. 자유상태의 BCA는 40°C에서 25°C보다 활동도가 20% 이하로 감소되었으나, 고정화된 BCA에서는 10% 남짓 감소되었다. 이 결과들은 Fig. 6(a)에 제시되어 있다. 고정화된 BCA에서 활동도 감소의 폭이 낮은 결과는, 고온으로 나타나는 BCA 구조의 변성이 자유상태와 비교하여 상대적으로 적게 일어났음을 의미한다.

저장에 대한 안정성은 25°C에서 5일 간격으로 30일 동안 조

사되었으며, 고정화된 BCA에서 활동도 감소가 작은 것으로 관찰되었다 (Fig. 6(b)). 이 결과도 역시 단백질의 고정화가 구조 변화를 방해하면서 나타난 결과로 판단된다. 재활용성과 저장에 대한 안정성측면에서 CAPM과 PS에 고정화된 BCA들의 결과는 거의 차이가 나타나지 않는 것으로 관찰되었으나, 열적 안정성에서는 CAPM에 고정화된 BCA이 더 우수한 것으로 나타났다. 열적 안정성에서만 나타난 다소 상이한 결과는 BCA구조에 대한 열적 영향이라기보다는 온도변화에 따른 물질전달의 변화에 기인한 것으로 판단된다. 위에서 이미, 25°C에서 CAPM에 고정화된 BCA의 활성도가 PS미세입자에 고정화된 경우보다 낮은 결과가 물질의 접근성에 기인한 것으로 추정한다고 기술한 바 있다. 이와 같은 맥락에서, 물질전달이 온도의 영향을 받아 열적 안정성 결과를 나타낸 것으로 판단된다. 다공성 막에서의 온도에 따른 물질전달변화에 대해, 이전에 수행되었던 연구결과가 이 가설을 뒷받침한다 [11].

4. 결론

본 연구에서는 다공성 막에 공유결합을 통해 고정화시킨 탄산탈수 효소가 가지는 이산화탄소의 포집정도, 재활용성, 열 및 저장에 대한 안정성들을 평가하였다. 고정화를 위하여 PEI, GA, BCA의 순서로 표면처리를 수행하였으며, 고정화된 결과는 X선 광전자 분광기를 통해 확인하였다. 이산화탄소가 포획된 용액에서 pH값을 측정하고 측정값을 이용하여 탄산탈수효소의 촉매작용을 계산하였다. 그 결과, 자유상태의 BCA, PS에 고정화된 BCA, 그리고 CAPM에 고정화된 BCA에서 각각 0.79, 0.67, 그리고 0.56 s⁻¹의 활성화도가 나타났다. 재활용면에서 10회 이용에도 95%의 활성이 유지됨을 확인하였으며, 열 및 저장에 대하여 평가된 안정성은 CAPM에 고정화된 BCA에서 활성화도의 저하율이 가장 낮은 것으로 관찰되었다. 본 연구의 결과, 다공성 막은 이산화탄소의 포집을 위한 탄산탈수효소의 담지체로 활용될 수 있음을 알 수 있다.

감사

이 연구는 서울과학기술대학교 교내 학술연구비 지원으로

수행되었습니다.

REFERENCES

1. IPCC (2007) Summary for policymakers. In: climate change 2007: the physical science basis, contribution of working group i to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. *World Meteorological Organization/United Nations Environment Program*. Geneva, Swiss.
2. Lu, J. G., M. Cheng, Y. Ji, and Z. Hui (2009) Membrane-based CO₂ absorption into blended amine solutions. *J. Fuel Chem. Technol.* 37: 740-746.
3. IPCC (1990) Policymaker's summary of the scientific assessment of climate change; report to IPCC from working group. *Meteorological Office*. Branknell, UK. www.ipcc.ch/activity/srccs
4. Yang, H., Z. Xu, M. Fan, R. Gupta, R. B. Slimane, and A. E. Bland (2008) Progress in carbon dioxide separation and capture: A review. *J. Environ. Sci.* 20: 14-27.
5. Choi, W. J., J. B. Seo, S. Y. Jang, J. H. Jung, and K. J. Oh (2009) Removal characteristics of CO₂ using aqueous MEA/AMP solutions in the absorption and regeneration process. *J. Environ. Sci.* 21: 907-913.
6. Dilmore, R., C. Griffith, Z. Liu, Y. Soong, S. W. Hedges, and R. Koepsel (2009) Carbonic anhydrase-facilitated CO₂ absorption with polyacrylamide buffering bead capture. *Int. J. Greenh. Gas Con.* 3: 401-410.
7. Vinoba, M., M. Bhagiyalakshmi, S. K. Jeong, Y. Yoon, and S. C. Nam (2012) Immobilization of carbonic anhydrase on spherical SBA-15 for hydration and sequestration of CO₂. *Colloids Surf. B* 90: 91-96.
8. Mirjafari, P., K. Asghari, and N. Mahinpey (2007) Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO₂ sequestration purposes. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46: 921-926.
9. Lee, J. M. (1992) *Biochemical Engineering*, Prentice Hall, pp. 21-31. Englewood Cliffs, NJ, USA.
10. Vinoba, M., D. H. Kim, K. S. Lim, S. K. Jeong, S. W. Lee, and M. Alagar (2011) Biomimetic Sequestration of CO₂ and Reformation to CaCO₃ Using Bovine Carbonic Anhydrase Immobilized on SBA-15. *Energy & Fuel* 25: 438-445.
11. Martinez Diez, L. and M. I. Vazquez Gonzalez (1996) Temperature polarization in mass transport through hydrophobic porous membranes. *AIChE J.* 42: 1844-1852.