

5'-린산디에스테라제의 키토잔자성담체고정화에 미치는 몇가지 요인의 영향

김진미, 리승룡

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물공학, 화학을 발전시키는것은 인민들의 먹고 입는 문제를 비롯하여 인민생활을 높이는데서 매우 중요한 의의를 가집니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 487페이지)

나노기술의 발전과 함께 출현한 여러가지 자성나노립자들은 자기의 고유한 특성으로 하여 효소고정화, 물질의 분리정제, 표적약물의 합성 등에 널리 리용되고있다.[1]

한편 맥주공장에서 폐설물로 나오는 보리길금뿌리로부터 추출한 5'-린산디에스테라제는 핵산을 분해하여 5'-뉴클레오타이드를 생성하는 효소로서 5'-뉴클레오타이드의 생산에 광범히 리용되고있다. 현재 5'-뉴클레오타이드들은 약물제조와 조미료, 기능성식품, 화장품생산 등에서 널리 쓰이고있다.

이로부터 우리는 뉴클레오타이드생산에 리용되는 5'-린산디에스테라제를 키토잔자성담체에 고정화하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

재료 실험에서는 분자량이 310 000이고 탈아세틸화도가 87.0%, 수분함량 0.30%, 회분함량 0.50%, 단백질함량 0.02%인 키토잔을 리용하였다. 실험에 리용한 시약은 모두 분석순이었다.

방법 효소액은 선행방법[2]에 따라 다음과 같이 준비하였다.

보리길금뿌리추출액을 원심분리(5 000r/min에서 30min)하여 모은 상등액을 65℃에서 15min동안 열처리하였다. 여기에 고체류산암모니움을 60% 포화되게 첨가하고 30min동안 방치한 다음 원심분리(5 000r/min, 15min)하여 침전물을 모아 4℃에서 하루밤 투석하였다. 다음 세파덱스 G-200 및 DEAE-세파덱스 A-50 탑크로마토그래프를 통하여 활성이 276RU/mL인 5'-린산디에스테라제를 얻었다.

효소활성은 선행방법[2]에 준하여 측정하였다.

키토잔자성담체는 선행방법[3]에 따라 다음과 같이 제조하였다.

나노Fe₃O₄립자 1g을 25mL의 키토잔초산용액(1.5%)에 넣고 10min동안 초음파처리(1 200 r/min에서 2h동안 교반)하여 분산시킨 다음 3구플라스크에 넣고 0.1mol/L NaOH용액을 방울방울 떨어뜨려 pH를 10으로 조절한 다음 20min동안 교반하였다. 중성이 될 때까지 증류수로 세척하고 자석으로 분리하였다.

고정화방법 100mL들이 3구플라스크에 1g의 키토잔자성립자와 일정한 농도의 글루타르

알데히드용액 20mL를 넣고 30℃에서 2h동안 반응시킨 다음 증류수로 세척하여 여분의 글루타르알데히드를 제거하였다. 다음 여기에 2 760RU의 효소액을 넣고 고정화를 위한 총반응액의 체적을 30mL로 되게 한 다음 30℃에서 6h동안 반응시켰다. 반응후 증류수로 세척하고 활성검토에 리용하였다. 완충액으로는 각이한 pH의 트리스-HCl완충액을 리용하였다.

효소의 상대활성은 해당한 반응조건에서 제일 높은 활성을 100%로 보고 그것에 대한 매개 효소활성의 비로 계산하였다.

결과 및 논의

1) 효소의 고정화조건

효소고정화에 미치는 글루타르알데히드농도의 영향 글루타르알데히드의 농도를 1.6%까지 변화시키면서 고정화효소의 상대활성을 검토한 결과는 그림 1과 같다.

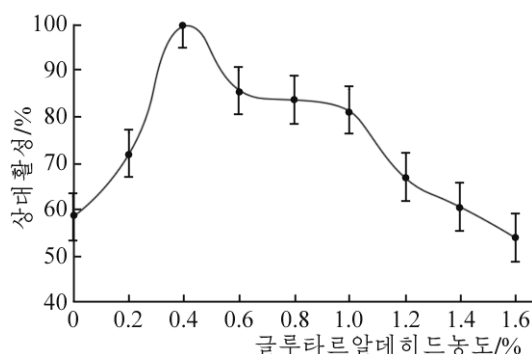


그림 1. 글루타르알데히드의 농도에 따른 고정화효소의 상대활성변화
담체량 1g, 활성화시간 3h, 효소 2 760RU, 반응온도 30℃, pH 6.0, 고정화시간 6h

글루타르알데히드가 없는 조건(0%)에서는 효소가 물리적흡착의 방법으로 담체에 고정화되게 된다. 글루타르알데히드를 넣어주면 글루타르알데히드에 의한 담체의 활성화가 일어나며 결국 활성화된 담체의 알데히드기와 효소분자속에 있는 아미노기사이에 Schiff염기형성반응이 일어나 담체에 효소가 고정되게 된다.

그림 1에서 보는바와 같이 글루타르알데히드농도가 0.4%일 때 상대활성이 제일 높았다. 그러나 글루타르알데히드의 농도가 0.4%보다 높을 때 효소활성은 글루타르알데히드의 농도가 증가함에 따라 감소하였다.

효소고정화에 미치는 활성화시간의 영향 글루타르알데히드에 의한 키토잔자성담체의 활성화시간을 1h로부터 10h까지 점차 늘어가면서 고정화효소의 상대활성을 검토한 결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 시간이 지남에 따라 효소의 상대활성은 증가하다가 활성화시간이 2h일 때 최대가 되며 그후에는 변화되지 않는다. 이것은 키토잔자성담체의 아미노기와 글루타르알데히드의 알데히드기사이의 반응이 2h이면 완결된다는것을 보여준다. 결과는 글루타르알데히드를 리용하여 가교를 진행한 선행연구결과[4, 5]와도 일치한다.

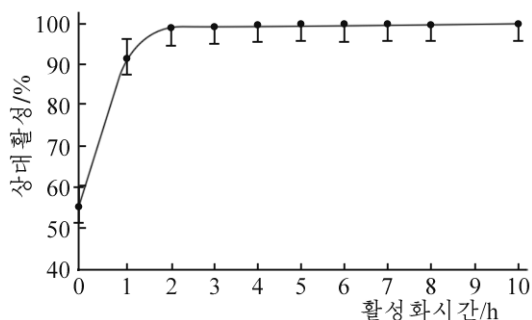


그림 2. 활성화시간에 따른 고정화효소의 상대활성변화
담체량 1g, 글루타르알데히드 0.4%, 효소 2 760RU, 반응온도 30℃, pH 6.0, 고정화시간 6h

효소고정화에 미치는 효소량의 영향 효소량을 276RU로부터 점차 늘어가면서 고정화효소의 상대활성을 검토한 결과는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 효소량이 증가함에 따라 고정화효소의 상대활성은 증가하다가 1 656RU일 때 최대로 되고 그 이후부터는 효소량이 증가하여도 상대활성에서의 변화는 없었다. 그것은 효소량이 1 656RU일 때 담체의 표면에 있는 알데히드가 모두 효소분자내에 있는 아미노기와 결합하므로 효소량을 아무리 늘여도 효소고정화가 더는 일어날수 없기때문인 것 같다.

효소고정화에 미치는 pH의 영향 pH에 따르는 고정화효소의 상대활성변화를 검토한 결과는 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는바와 같이 pH가 5.2부터 5.8사이에 있을 때 상대활성이 제일 높았다. 이것은 아마도 pH에 따라 효소분자의 해리상태가 달라지기때문인것 같다.

효소고정화에 미치는 고정화시간의 영향 고정화시간에 따르는 고정화효소의 상대활성을 검토한 결과는 그림 5와 같다.

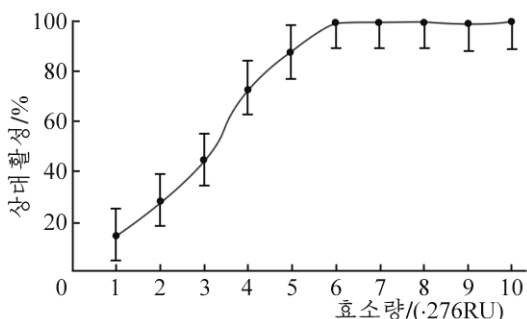


그림 3. 효소량에 따르는 고정화효소의 상대활성변화

담체량 1g, 글루타르알데히드 0.4%, 활성화시간 2h, 반응온도 30°C, pH 6.0, 고정화시간 6h

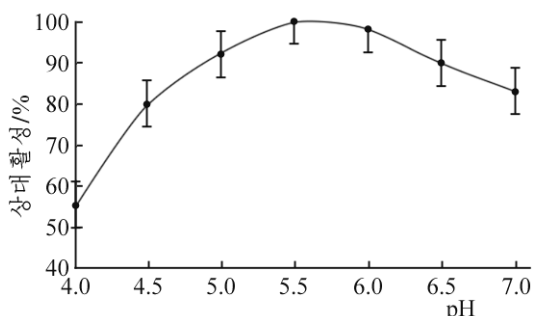


그림 4. pH에 따르는 고정화효소의 상대활성변화

담체량 1g, 글루타르알데히드 0.4%, 활성화시간 2h, 효소 1 104RU, 반응온도 30°C, 고정화시간 6h

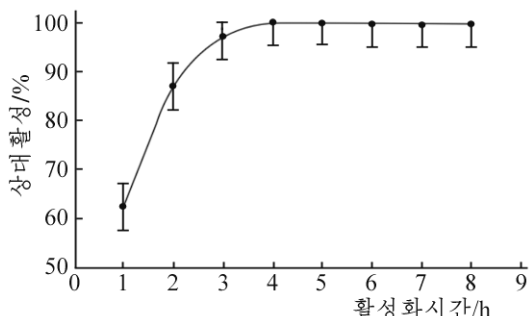


그림 5. 고정화시간에 따르는 고정화효소의 상대활성변화

담체량 1g, 활성화시간 2h, 글루타르알데히드 0.4%, 효소 1 104RU, 반응온도 30°C, pH 6.0

그림 5에서 보는바와 같이 상대활성은 고정화시간이 길어짐에 따라 증가하다가 4h이 지난 후에 최대로 되었다. 이것은 고정화반응이 4h이내에 완성되었다는것을 보여준다.

2) 품질공학적방법에 의한 효소고정화조건검토

단인자실험결과에 따라 효소의 활성화에 영향을 주는 주요한 4개 인자를 선택하고 품질공학적방법으로 최적조건을 찾기 위한 실험을 진행하였다.

표 1. 인자와 수준

인자	수준 1	수준 2	수준 3
A(글루타르알데히드농도/%)	0.35	0.40	0.45
B(효소활성/RU)	828	1 104	1 380
C(고정화시간/h)	3	4	5
D(pH)	5.2	5.5	5.8

인자와 수준은 표 1과 같다.

$L_9(3^4)$ 직교표에 따르는 실험결과를 표 2와 같다.

보조표, 수정항 CF, 변동량, 분산, 기여률을 구하고 분산분석표를 작성하였다.(표 3)

표 2. $L_9(3^4)$ 직교표에 따르는 실험결과

No.	효소활성/RU		SN비	No.	효소활성/RU		SN비	No.	효소활성/RU		SN비
	y_1	y_2			y_1	y_2			y_1	y_2	
1	516.62	512.06	54.22	4	520.84	503.09	54.18	7	335.66	332.60	50.48
2	479.20	474.97	53.57	5	603.53	598.20	55.58	8	480.41	476.17	53.29
3	490.06	485.74	53.77	6	507.57	516.25	54.18	9	425.49	421.73	52.54

표 3. 분산분석표

인자	자유도(f)	변동량(S)	분산(V)	순변동	기여률(P)
A	2	9.32	4.66	8.44	53.21
B	2	2.50	1.25	1.62	10.23
C	2	0.88	0.44		
D	2	3.16	1.58	2.28	14.38
R	2	0.88	1.44	1.76	22.18

기여률에 따르는 인자들의 순위를 보면 $A > D > B > C$ 와 같다. 최적조건은 $A_2B_2C_1D_3$ 즉 글루타르알데히드농도 0.4%, 효소활성 1 380RU, 고정화시간 4.0h, pH 5.8이었다. C인자는 A, B, D인자에 비해 분산이 작으므로 오차집계하였다. $A_2B_2D_3$ 에서 공정평균을 추정하고 그것의 믿음한계를 구하였다. 즉 $\mu_{\text{최적}}(A_2B_2D_3)=381.88\text{dB}$, $\mu_{\text{기초}}(A_2B_2D_2)=377.78\text{dB}$, $B=2.69$ 이다. 따라서 SN비의 리득은 4.10dB이다.

최적조건의 재현성을 검토하기 위하여 확인실험을 진행(3번 반복)한 결과 상대활성이 109.4%이고 믿음확률이 95%로서 재현성이 보장되었다.

이로부터 고정화에 가장 큰 영향을 주는 요인은 글루타르알데히드의 농도이며 최적조건은 $A_2B_2C_1D_3$ 이라는 결론을 얻었다.

일반적으로 고정화효소의 활성은 본래활성보다 낮아지는데 키토잔자성담체에 고정화한 5'-린산디에스테라제의 활성(754.9RU/g)은 본래효소활성(1 380RU)의 54.7%로 되었다.

지금까지 5'-린산디에스테라제의 고정화에는 키토잔미소구[4], DEAE섬유소[5] 등이 이용되어왔는데 여기서 효소활성거듭률은 각각 53.6, 50%였다. 이로부터 우리는 제조한 키토잔자성담체가 반응후 분리정제에서뿐만아니라 고정화후에도 우월한 특성을 가지고있다는 것을 알 수 있다.

맺는 말

품질공학적수법을 리용하여 5'-린산디에스테라제를 키토잔자성담체에 고정화하기 위한 최적조건을 밝힌데 의하면 글루타르알데히드농도 0.4%, 효소활성 1 380RU, 고정화시간 4h, pH 5.8이다. 여기서 글루타르알데히드의 농도가 가장 큰 영향을 미친다.

참 고 문 헌

- [1] M. Faraji; J. Iran. Chem. Soc., 7, 1, 1, 2010.
- [2] N. Prentice; Journal of Cereal Science, 5, 175, 1987.
- [3] A. Lin et al.; Yao Xue Xue Bao, 42, 323, 2007.
- [4] L. E. Shi et al.; Chem. Biochem. Eng. Q., 25, 1, 83, 2011.
- [5] L. E. Shi et al.; Braz. J. Chem. Eng., 27, 1, 151, 2010.

주제 105(2016)년 4월 5일 원고접수

Influence of Several Factors on Immobilization of 5'-Phosphodiesterase on Chitosan Magnetic Nanoparticles

Kim Jin Mi, Ra Sung Ryong

In this paper, the optimal condition was evaluated by orthogonal experimental method for immobilization of 5'-phosphodiesterase on chitosan magnetic nanoparticles. They were glutaraldehyde concentration 0.4%, enzyme activity 1 380RU, immobilized time 4h, and pH 5.8.

And we found that the concentration of glutaraldehyde was a major factor that determined the immobilization rate.

Key words: chitosan magnetic nanoparticle, 5'-phosphodiesterase, immobilization