

Chitosan Matrix에 Urease의 固定化

李 治 榮 · 金 成 鎬

朝鮮大學校 藥學大學

Immobilization of Urease on Chitosan Matrix

Chi Young Lee and Sung Ho Kim

(Received March 15, 1985)

For the effective immobilization of urease on chitosan matrix with glutaraldehyde, optimal activation methods were studied, and its enzymatic properties was investigated. In the stability of enzyme, the retained activity of the native urease was 55% after it was soaked at pH 7 for 10 hrs., while the retained activity of immobilized one was about 62% after soaked at pH 6.5-8.5 for the same time. After heat treatment at 60°C for 10 hrs., the native urease lost the most of its activity, while immobilized urease retained 54% of its activity by the same treatment. The retained activity of immobilized urease did not decrease nearly when it was stored at room temperature for 25 days.

From Linweaver-Burk plots, the V_{max} value of native urease was 66 μ M/l and that of immobilized urease was 41 μ M/l, while Km value 40mM/l for both enzymes was unaltered.

Chitosan은 chitin(2-acetamido-2-deoxy-D-glycopyranose)을 deacetylation한 유리 amine 基을 가지고 있는 物質로서 현재까지 藥學分野에 거의 利用되지 않고 있는 天然의인 生體高 分子로서 有機溶媒나 물에는 溶解되지 않고 acetic acid, hyperchloric acid, hydrofluoric acid에 溶解되는 高分子化合物이다. 自然界에서는 原生生物인 녹조류, 곰팡이의 세포벽 및 갑각류의 껍질에 存在하고 있으며,¹⁾ 人間에 있어서는 結체조직의 多糖類로서 hyaluronic acid, kelatin sulfate, heparin 등과 유사한 구조를 취하고 있으며 最近에는 manosyl-D-N-acetylchibose의 内部構造로 알려져 있다.²⁾ 한편 chitosan 유도체는 人間組織中에서 monomer,

College of pharmacy, Cho Sun University

※ Chitosan의 藥學的 研究(第1報)

dimer로 存在하고 있을 것으로 생각되며 포유동물에서는 胃粘液中의 chitinase에 依해서만 가수분해되며³⁾ 人間에서는 소화관내에 chitinase가 存在하지 않으나 少量의 chitin을 食品으로 利用하고 있다. Sugano 等⁴⁾은 토끼에 chitosan을 投與하면 顯저하게 中性 steroid의 배설을 증가시키고 低 cholesterol 作用을 나타낸다고 보고 하였으며 Smiley와 Strandberg⁵⁾는 가교제인 glutaraldehyde를 利用하여 aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, fructose-1,6-diphosphatase 等の 酵素들을 chitosan 의 matrix에 固定化시켰으며 Nozawa 等⁶⁾은 chitosan matrix에 가교제 없이 直接 trypsin을 固定시켜 酵素活性을 持續시켰다고 보고하였다.

近來에 chitosan의 양호한 生體適合性 때문에 生體醫藥分野에 널리 利用되어지고 있음에 착안하여 저자 등은 人工膜 開發의 一環으로 chitosan에 가교제인 glutaraldehyde를 利用하여 尿素分解酵素인 urease을 固定化시키고 *in vitro*에서 고정화시키지 않은 native urease와 그 酵素活性을 比較分析하였다. 그 結果 얻은 약간의 知見을 報告하고자 한다.

實 驗 方 法

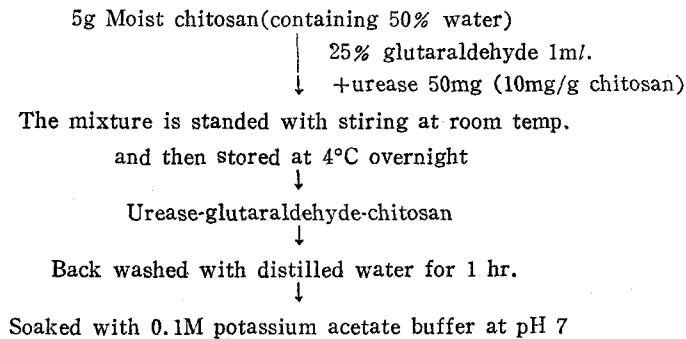
시약, 재료 및 기기—Urea는 E. Merck의 시약급을 사용하였으며 수산화나트륨, 빙초산, 인산이수소나트륨, 초산나트륨 및 25% glutaraldehyde 용액은 일본 和光純藥工業(株)의 특급 또는 일급시약을 사용하였다. 기타 시약은 시판 특급 또는 일급을 사용하였다. Urease는 Sigma Co. (U. S. A.)로부터 구입하여 재결정하지 않고 본 실험에 그대로 사용하였으며 chitosan은 본 연구실에서 아래와 같이 제조하여 사용하였다. 기기로는 spectrophotometer (Hitachi 181, Japan)를 사용하였다.

Chitosan의 제조—Hackman方法⁷⁾에 따라서 새우 껍질(*Penaeus orientalis*, Penaeidae)을 물로 세척하여 껍질에 부착된 蛋白質을 완전히 제거한 다음, 100°C에서 건조한 후에 220g의 새우 껍질에 2N염산 2l를 加하여 실온에서 5시간 동안 처리하여 석회질을 제거한 후에 고형물을 다시 물로 세척하고 100°C에서 건조한 다음 미세한 粉末로 하였다. 이것에 2N염산 500ml을 注加한 다음 48시간 동안 처리한 후에 원심분리하여 얻은 잔사를 100°C에서 1N수산화나트륨액 500ml로 中和시키고 잔사를 다시 원심분리하고 수회 무수 ethanol과 ether로 세척하여 37g의 chitin을 얻었다.

Horton等⁸⁾의 方法에 따라서 chitin에 질소 기류하에서 40% 수산화나트륨용액을 加하여 115°C에서 6시간 동안 deacetylation한 다음 여과하고 중성이 될 때까지 물로 세척한 후에 건조시키고 10% 초산에 용해시켰다. 24時間 後에 원심분리하고 40% 수산화나트륨용액으로 처리하여 백색 침전물을 얻은 후에 여과하여 증류수, 에탄올, 에틸로 차례로 세척하여 건조하였다. 다음 재정제하기 위하여 90°C에서 40% 수산화나트륨용액으로 1시간 동안 처리한

후에 원심분리하여 증류수로 세척하고 에탄올, 에테르 반복하여 세척한 후에 건조한 다음 40% 초산으로 다시 용해시키고 여과한 다음 여액에 2.5N 수산화나트륨액으로 처리한 후에 증류수, 에탄올, 에테르 차례로 세척하였다. 이 과정을 3회 반복하여 건조시키고 분쇄하여 100mesh를 통과한 chitosan을 본 실험의 재료로 利用하였다.

Urease의 고정화—50% 수분을 함유한 chitosan 5g에 25% glutaraldehyde 용액 1ml를 넣고 urease 50mg을 넣어 실온에서 교반하여 고정화시켰다. 고정화 과정은 Scheme 1에 도시하였다.



Scheme 1—Urease immobilization.

Urease의 活性度 測定—Urease와 고정화된 urease의 活性度는 urea를 기질로 하여 Laidler 등의 方法⁹⁾에 따라서 5分동안 incubation하여 생성된 암모니아량을 최대흡수파장인 480nm에서 흡광도를 측정하여 算出하였다.

實驗結果 및 考察

고정화 Urease의 pH에 대한 안정성—고정화효소의 pH에 대한 안정성을 考察하기 위하여 native urease와 immobilized urease를 초산염 완충액(pH 5~7)과 인산염 완충액(pH 7.5~9)을 使用하여 pH가 다른 각각의 완충액에 10時間씩 soaking하였다. 다음 각각의 처리액을 pH 7로 조절한 後에 urea을 基質로 하여 30±1°C에서 酵素活性를 測定하였다. Table I에 서와 같이 urease는 pH 7에서 가장 안정하며 약 55% 잔여활성을 나타내고 있으며 pH가 增加함에 따라서 잔여 活性이 감소하며 urease의 최적 pH는 7을 나타내고 있는 反面에 urease를 chitosan matrix에 固定化 시켰을 때는 pH 6.5~8.5의 비교적 넓은 범위에서 안정하며 약 62%의 잔여활성을 나타내었다. 이는 pH 6.5~8.5의 다소 넓은 범위에서도 고정화 효소가 보다 안정함을 의미한다. 이것은 基質인 urea를 chitosan에 固定化한 酵素로 加水分解하면 buffer-mediated proton이 移動하는 것으로 보이며 matrix가 電氣的으로 陰性을 나타낼

Table I—Influence of pH on Activity of Immobilized and Native Ureases at 30°C.

pH	Native Urease		Immobilized Urease	
	Released NH ₃ (μ M/min.)	Retained Activity (%)	Released NH ₃ (μ M/min.)	Retained Activity (%)
5	5.3	10	22.8	43
6	17.5	33	26.5	50
6.5	24.4	49	31.2	59
7	29.2	55	32.9	62
7.5	26.5	50	32.9	62
8	15.9	30	32.3	61
8.5	10.6	20	31.8	60
9	10.1	19	21.7	40

경우 bulk phase의 pH는 감소하게 되며 chitosan matrix의 수소 ion이 증가되어서 기질에 대한 최적 pH는 alkali 쪽으로 移動한다¹⁰⁾는 것과 일치하게 되며 효소반응율은 증가하게 된다.

固定化 Urease의 溫度에 대한 안정성—Urease와 chitosan에 固定化한 urease를 수욕상에서 30±1°C, 40±1°C, 50±1°C, 60±1°C, 70±1°C의 溫度로 10時間 동안 처리한 後 30±1°C의 溫度에서 효소의 활성을 測定한 결과를 Table II에 나타내었다.

고정화시키지 않은 urease는 30~40°C 사이에서 안정하였으나 溫度가 增加함에 따라서 그 活性도가 급격히 감소하였다. 반면에 chitosan에 urease를 固定化한 酵素는 30, 40, 50°C에서 안정하였으며 60°C에서는 54%의 잔여활성을 유지하였고 70°C에서는 10%의 잔여활성을 유지하였다.

Table II—Effect of Temperature on Activity of Immobilized and Native Ureases at pH 7.

Temp. (°C)	Native Urease		Immobilized Urease	
	Released NH ₃ (μ M/min.)	Retained Activity (%)	Released NH ₃ (μ M/min.)	Retained Activity (%)
30	30.2	57	32.9	62
35	30.3	57	30.2	60
40	30.7	58	32.9	62
50	23.8	45	32.3	61
55	20.7	39	31.3	61
60	1.6	3	28.6	54
70	—	—	5.3	10

Urease를 chitosan에 固定化시키면 native urease보다 높은 溫度에서도 안정성이 높은 것은 Yogari 等¹¹⁾이 酵素를 polyglutamate에 固定化시킴으로 熱에 對한 안정성을 增大시킨다

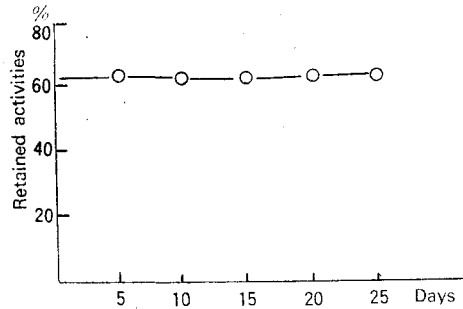


Figure 1—Retention of activities of immobilized urease during storage at room temperature.

는 報告와 一致된다. 이것은 酵素蛋白質이 chitosan matrix에 固定化되면 熱에 의한 酵素의 變性이 억제되는 것으로 사료된다.

固定化 Urease의 저장성—고정효소의 저장성을 관찰하기 위해서 고정효소를 $20 \pm 1^\circ \text{C}$ 에서 25일 동안 밀폐저장한 것의 잔여활성을 Fig. 1에 圖示하였다.

이에서 보는 바와 같이 urease을 chitosan에 고정화함으로써 실온에서 25일 동안 효소의 活性이 감소되지 않고 維持하고 있음으로 보아 酵素力價를 장기간 保持할 수 있을 것으로 생각된다.

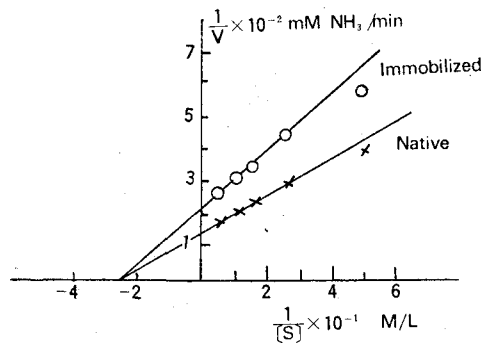


Figure 2—Lineweaver-Burk plot for native urease and immobilized urease on chitosan matrix.

Key : ○, immobilized urease; ×, native urease;

Urease의 Kinetics—Urease를 chitosan matrix에 固定化할 경우 기질과의 친화성은 i) 고정화된 urease-matrix 주위에서 일어나는 bulk solution의 영향, ii) 고정화된 urease matrix內的 細孔을 통하여 移動되는 基質 및 生成物의 擴散現象, iii) matrix 表面에서의 酵素反應으로 인한 native urease와의 基質에 對한 친화성의 차이 등에 따라 여러 형태로 나타

나게 된다. 基質에 대한 固定化된 urease와 native urease의 작용을 Lineweaver-Burk式으로 表示하면 Fig. 2와 같다.

Urease 및 固定化된 urease의 Michaelis 定數는 양자 모두 40mM/l이었고 最大反應速度에 있어서 고정화된 urease의 V_{max} 는 41 μ M/l이고 native urease의 V_{max} 는 66 μ M/l이었다. 이는 chitosan matrix가 固定化된 urease의 active site에 가역적 비경쟁적 억제 작용을 하거나 또는 chitosan matrix에 고정화된 urease에의 基質의 제한된 확산으로 생각되며 고정화 urease의 효소활성은 입체장애의 영향을 받는 것으로 생각된다.

結 論

Chitosan에 가교제인 glutaraldehyde을 利用하여 urease를 고정화하고 그 효소활성을 native urease와 여러 조건에서 비교 검토하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 고정화 urease는 pH 6.5~8.5의 범위에서 안정하였으며 62%의 잔류활성을 나타내었다.
2. 고정화 urease는 60 \pm 1°C에서 10시간후 54%의 잔류활성을 나타낸 반면 native urease는 거의 失活되어 열안정성이 매우 우수하였다.
3. 고정화 urease를 실온에서 25일간 보관할 경우 잔류활성이 감소되지 않았다.
4. 고정화 urease 및 native urease의 Km値는 40mM/l이었으며 고정화효소의 V_{max} 는 41 μ M/l이었다.

이상의 事實로부터 chitosan matrix가 生體에 人工膜 또는 extracopored shunt에 利用될 수 있는 기초적 정보를 얻었다고 생각된다.

文 獻

- 1) R.D. Preston, *The Physical Biology of Plant Cell Wall*, Chapman and Hall, London, England(1974)
- 2) R. Konnfeld and S. Cornelius, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 217(1976)
- 3) C. Jeuniaux and C. Cornelius, *Distribution and activity of chitinolytic enzymes in the digestive tract of birds and mammals*, in Proc. first intl. conference on chitin and chitosan, R. A.A. Muzzarelli and E.R. (Eds.), M.I.T Sea Grant, Cambridge, U.S.A. (178)
- 4) M. Sugano, T. Fujikawa, Y. Hiratsuji, and Y. Hasegawa, *Nutr. Rept. Int.*, **18**, 531 (1978)
- 5) K.L. Smiley and G.W. Strandberg, Immobilized Enzymes, in *Advances in Applied Microbiology*, D. Perlman. (Ed) Vol. 15, 13~37(1972)
- 6) Y. Nozawa, T. Matsushita, T. Matsushita, K. Yamashina and F. Higashide, *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 753(1982)
- 7) R.H. Hackman, *Australian J. Biol. Sci.*, **7**, 168(1954)
- 8) D. Horton and D.R. Lineback, N-Deacetylation Chitosan from Chitin, in *Method in Carbo-*

-
- hydrate Chem.*, **5**, 403 (1965)
- 9) K.J. Laidler and J.P. Hoare, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2599 (1949)
- 10) M.D. Trevan, Immobilized Enzymes in *Introduction and Applications in Biotechnology*, John Wiley & Sons Ltd. N.Y. U.S.A. pp.41~44(1980)
- 11) Y. Yugari, Y. Ninamoto, K. Komiya, K. Komiya, K. Mitsugi, and N. Mimura, *Enz. Eng.*, **4**, 223(1978)