

Chitosan Matrix 에 Pepsin 의 固定化

環境衛生科 李 治 榮
 副 教 授

朝鮮大學校 田 成 珠
 大 學 院

I. 序 論

chitosan 은 chitin (1→4-2-acetoamido-2-Deoxy-D-glycopyranose) 을 알카리로 脫 acetyl 化하여 遊離 amino 基를 갖고 있으며 (Fig.1) 天然物質로서 有溶媒나 물에 不溶性에 acetic acid 또는 以外의 다른 弱酸에 溶解되는 cellulose 의 誘導體이다.

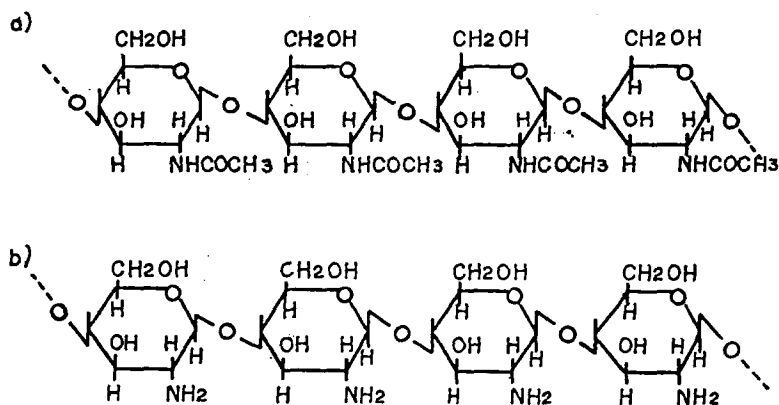


Fig.1. Structural formular of chitin^{a)} and chitosan^{b)}

自然에서 chitosan 은 背椎動物의 骨格 (skeletal), 甲殼類 껍질, 곰팡이 또는 綠藻類의 構成 成分으로 存在하며¹⁾ 다른 有機物質, 蛋白質, CaCO₃, 微量의 金屬등과 密接하게 結合된 人間結體組織의 多糖類로서 hyaluronic acid, keratin sulfate, heparin 등의 비슷한 構造를 하고 있으며 最近에는 manosyl-D-N-acetylchibose의 內部 (core) 構造로 알려져 있으므로²⁾ chitosan의 誘導體는 人間組織 中에서 monomer, dimer로 存在하고 있을 것으로 생각되며 哺乳動物에는 胃 粘液膜의 chitinase에 의해서만 加水分解된다고 하였다.³⁾ 그러나 人間の 消化管 內에서는 chitinase가 存在하지 않으나 少量의 chitin을 食品으로 利用하고 있다.

M. Sugano 등⁴⁾은 토끼에 chitosan을 投與하면 顯著하게 中生 steroid 배설을 增加시키고 低 cholesterol 作用을 한다고 報告하였으며 Nagyvary와 그의 共同研究者⁵⁾들은 水溶性인 chitosan acetate가 一般的으로 hypolipidemic agent로서 pectin보다 더 優秀하다고 하였고 Knorr⁶⁾은 食品의 機能的인 면이 있어서 食品의 添加物로서의 使用 可能性을 指摘하였다.

Landes 등⁷⁾은 chitosan의 毒性은 아주 적을 것이라고 하였으며, chitosan의 生體內 主作用은 lipid의 吸收 및 代謝와 關聯性이 있을 것으로 생각되며 J.L. Naussi⁸⁾은 膽汁 酸鹽과 dodecyl sulfate, 牛膽汁(oxibile)로 mixed Micelle를 形成하며 chitosan과 結合력을 測定한 바 낮은 pH에서 mixed Micelle과 固定化하였다고 發表하였다.

Taiji 등⁹⁾은 人間の 體液內의 lysozyme이 chitin으로 形成된 器管(chitinous organism)의 分解作用이 있다고 報告하였으며 chitin oligomer로서 lysozyme의 活性을 測定하였다. 한편 Neson¹⁰⁾ 등이 酵母로부터 抽出한 invertase를 活性炭에 附着시켜 똑같은 酵素의 活性을 얻은 뒤부터 酵素 蛋白質을 不溶性인 擔體(matrix)에 物理化學的 方法으로 固定시켜서 觸媒로 使用하였다.

이러한 酵素의 誘導體는 安全性과 特異性이 높고 實質的으로 經濟的이어서 利用하기에 便利하며 酵素의 物理化學的 性質을 選擇的으로 變化시킬 수 있어 安定化를 기할 수 있으므로 이러한 점에서 chitosan이 酵素에 지지체(support)로서 妥當性 研究가 시작되어 Riccardo A.A. mazzarelli 등¹¹⁾은 polyamino saccharide인 chitosan을 lysozyme과 結合體를 利用하지 않고 固定化하였고 最適 pH에서 chitosan column이 2% propylamine溶液의 가장 좋은 流出劑로서 作用한 것을 報告하였다.

Y. Nozawa 등¹²⁾은 chitosan을 여러가지 酵素의 擔體로 利用하여 固體狀態(solid-state)에서 混合分解(mix-grinding)하여 trypsin을 固定化한 것은 液體狀態(solution system)에서 固定化하는 것보다 酵素의 殘餘活性이 增加하였다고 하였으며 可能性 trypsin最適 pH에서 수일내에 酵素活性을 喪失하였지만 固定狀態(solid state)에서 固定化한 trypsin 活性이 室溫에서도 減少하지 않았다고 發表하였다.

W.L. Stainley 등¹³⁾은 glutaraldehyde를 架稿材로 하여 (Fig.2) latase α -chymotrypsin, 酸性 phosphatase을 chitosan에 固定化하여 酸素들의 最適 pH를 調査한 바 chitosan에 固定化된 latase는 可溶性인 latase의 最適 pH보다 酸性쪽으로 移動하였으며 固定化된 酸性 phosphatase로 酸性쪽으로 移動하였다.

한편, chitosan과 chymotrypsin을 固定化된 酵素의 最適 pH는 alkali 쪽으로 移動하였다고 하였으며 固定化된 latase의 活性은 可能性 酵素活性의 60% 活性을 維持하였다고 發表하였다. glutaraldehyde를 架稿材로 使用하지 않는 固定化 lastase는 그 活性이 없었고 chitosan에 固定化된 α -chymotrypsin나 酸性 phosphatase일 경우에는 그 酸素의 活性 자리에 高次構造(conformation) 效果 때문에 그 活性이 可溶性 酵素보다 增加하였

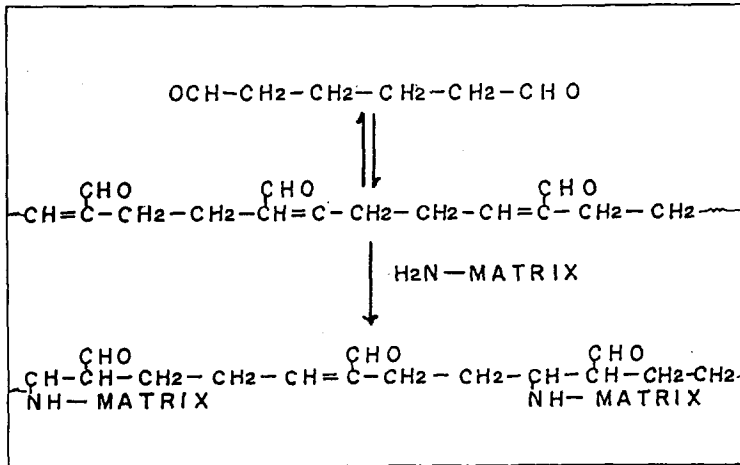


Fig.2. A probable mechanism for the reaction of glutaraldehyde with matrix.

다고 하였다.

J.F. Kenedy 등¹⁴⁾은 titanium과 chitosan을 錯化合物(chelates)로 하여 그의 活性을 比較하였고 W.L Stanley 共同研究者 등¹⁵⁾은 chitin과 glucose isomerase를 glutaraldehyde 架橋法과 吸着法을 利用하여 그 酵素活性을 測定한 바 架橋材를 利用한 方法으로 매우 滿足할만한 sensitivity를 觀察하였다. Yamaguchi 등¹⁶⁾은 glucoamylase를 새로운 固定化 方法으로 polycation인 chitosan과 poly anion인 dextran sulfate Na, polyvinylsulfate potassium, heparin 등과 混合(incorporation)하여 그의 活性을 測定해서 chitosan dextran sulfate를 混合한 固定化 酵素가 가장 높은 活性을 보여 주었다.

近來에 chitosan은 이러한 固定化 酵素의 matrix로 널리 利用되어지고 있음에 착안하여 산성하에서 pepsin과 glutaraldehyde 가교법에 의한 固定化 酵素의 特性에 대한 結果를 얻었기에 知見을 報告하고자 한다.

II. 實驗材料 및 方法

A. 實驗材料

hemoglobin (Merk, Co. Germany), L-tyrosine (Merk, Co, Germany), pepsin (Merk, Co. Germany)을 購入하여 再 結晶하지 않고 使用하였으며 chitosan은 本 研究室에서 製造하여 本 實驗에 利用하였다.

B. Chitosan의 製造

a. 새우 껍질에서 chitin 製造

Hackman 方法¹⁷⁾에 따라서 새우(*Penaeus orientalis penaeidae*) 껍질을 물로 洗滌하여 껍질에 附着된 蛋白質을 完全히 除去한 다음 100 °C에서 乾燥한 후의 220 g의 새우 껍질에 2N-HCl 2 l를 加하여 室溫에서 5 시간 동안 處理하여 石灰質을 除去한 後 固形物을 다시 물로 洗滌하고 100 °C에서 乾燥한 다음 微細한 粉末로 하여 2N-HCl 500 ml을 注加하고 48 시간 處理 後 遠心分離하여 얻은 殘渣를 100 °C에서 N-NaOH 500 ml의 溶液으로 中和시키고 殘渣를 다시 遠心分離하고 수회 無水 ethanol과 ether로 洗滌하여 30 g의 chitin을 얻었다.

b. Chitin에서 Chitosan의 製造

Hortan 等¹⁸⁾의 方法에 따라서 chitin을 室素下에서 40 % NaOH 溶液을 加하여 115 °C에서 6時間동안 deacetylation하여 여과하고 中性이 될 때까지 물로 洗滌한 후 乾燥시키고 10 % acetic acid에 溶解시킨 후 24時間 後에 遠心分離하고 40 % NaOH 溶液으로 處理하여 백색 沈澱物을 얻은 後에 濾過하여 蒸溜水, ethanol, ether로 洗滌하여 乾燥한 後 再整製하기 위하여 90 °C에서 46 % NaOH 溶液으로 1時間동안 處理한 後에 乾燥한 다음 4 % acetic acid로 再溶解시키고 濾過한 다음 餘液에 25N-NaOH 溶液으로 處理한 後에 蒸溜水, ethanol, ether로 洗滌하여 이 過程을 3회 反復하여 乾燥시키고 粉碎하여 100 mesh를 通過한 chitosan을 本實驗에 材料(matrix)로서 利用하였다.

C. Pepsin의 固定化

50 % 水分을 含有한 chitosan 5 g을 25 % glutaraldehyde (Wako, Japan) 1 ml을 架橋材(cross linker)로 하여 pepsin (1 mg/g)을 室溫(20±1 °C)에서 攪拌하여 固定化하였으며 이 過程을 Fig.3에 圖示하였다.

D. Pepsin의 活性測定

pepsin 活性은 Folin과 Ciocalteu¹⁹⁾의 phenol reagent로 Wirnt Rick²⁰⁾ 등에 의한 方法으로 haemoglobin (Merk co)을 基質로 하여 이때 1分間에 生成되는 tyrosin 量을 U. V spectrometer (Hitachi 140, Japan)를 최대 흡수과장 578nm에서 흡광도를 測定하고 검량선으로부터 유관된 tyrosin 量을 Anson²¹⁾의 hemoglobin을 加水分解하는 酵素의 量

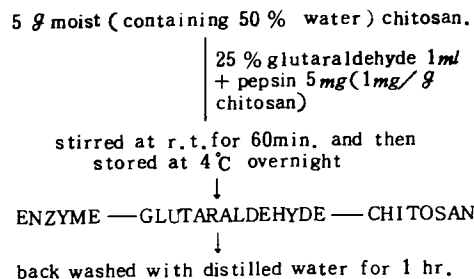


Fig. 3. Immobilization of pepsin on chitosan matrix with glutaraldehyde.

으로 表示한 國際單位로 나타냈으며 固定化한 酵素의 活性도는 solid-state에서 攪拌하면서 天然酵素와 同法으로 測定하였다.

Ⅲ. 實驗結果 및 考察

A. Chitosan matrix에 Pepsin의 固定化

1. 固定化 Pepsin의 pH에 대한 影響

chitosan 擔體에 glutar aldehyde를 架橋材(cross linker)로 하여 天然酵素와 固定化酵素를 HCl buffer (pH 1~3)와 acetate buffer (pH 3~6)을 使用하여 각 pH에서 hemoglobin을 基質로 하여 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 酵素活性을 測定하였다.

Table 1과 Fig.4에서 表示한 바와같이 pepsin을 chitosan matrix에 固定化하였을 경우 그의 活性은 pepsin에 비해서 65%의 殘餘活性(retained activity)이 있었으며, pepsin의 最適 pH 2에 pepsin을 固定化 하였을 경우 最適 pH가 1.5 units로 酸性쪽으로 移動하였음을 보여 주었다.

이와 같은 最適 pH의 移動現象은 D. Treven 등이²²⁾ acetyl L-tyrosine ethyl ester에 作用한 chymotrypsin을 polyanion인 ethylene-maleic anhydride copolymer에 固定化 하였을 때 最適 pH가 alkali쪽으로 移動한 것을 觀察하였고 반대로 chymotrypsin을 polyornithine에 固定化하였을 경우에는 pH가 酸性쪽으로 移動하였다고 하였으며 W.L. Steinley 등¹²⁾이 glutaraldehyde로 lactase를 chitosan에 固定化하였을 경우 最適 pH의 移動은 lactase 最適 pH 4에서 pH unit 3.0 ~ 3.5로 移動한 것을 觀察하여 이러한 現象은 固定酸化의 polymer 表面에 置損되지 않은 amino基가 原因일 것이라 指摘하였다.

이와 같은 最適 pH의 活性曲線이 變化는 酵素蛋白質 自體의 電子狀態의 變化, 또는 擔體 表面의 荷電의 影響으로 생각할 수 있으며 最適 pH가 酸性쪽으로 移動現象은 polycationic

Table I. Effect of pH on PU^{hb} of native pepsin and immobilized pepsin on chitosan matrix.

pH	Native pepsin PU ^{hb}	Immobilized pepsin PU ^{hb}
1.0	805,273	583,248
1.5	—	747,754
1.8	—	725,321
2.0	1150,390	—
2.5	1058,359	628,113
3.0	454,404	478,563
4.0	230,078	299,102
5.0	57,519	134,598
6.0	23,008	74,775

擔體에 酵素가 結合하면 酵素蛋白質에 陽이온이 많아져서 固定化 酵素領域 (microenvironment)의 pH가 外部溶液 (bulk phase) pH보다 alkali性이 되며 이러한 pH에 의한 活性置換 (activity displacement)는 polymer 擔體에 ionized group에 의해서 proton의 分配效果에 의한 것이며 固定化 酵素領域 (microenvironment)과 外部溶液 (macroenvironment) 사이의 H⁺의 不均衡的인 分配 (partitioning)에 의한 것으로 사료된다. Table I, Fig.4

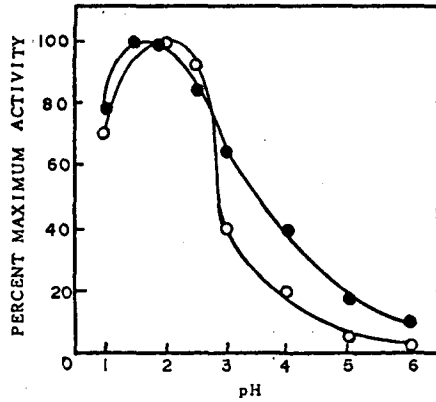


Fig.4. Effect of pH on percent maximum activity of native pepsin and immobilized pepsin on chitosan matrix.
○... native pepsin
●... immobilized pepsin

2. 固定化된 pepsin의 溫度에 대한 影響

酵素的 活性은 보통 化學的 觸媒와 같이 溫度에 依存하지만 일정 溫度 이상이 되면 酵素蛋白質의 變性 때문에 酵素的 活性이 喪失한다. 酵素를 固定化하였을 경우 溫度에 依存性이 變할 것인바 pepsin을 chitosan 擔體에 glutaraldehyde를 架橋材로 하여 固定化한 후 각 溫度에서 그 活性을 天然 pepsin과 비교하여 Fig.5, Table 2에 圖示하였다. 天然 pepsin은 溫度가 증가함에 따라 活性이 점차로 감소하였고 pepsin을 chitosan에 固定化했을 경우, 溫度 (30 °C ~ 65 °C)에서도 最適 溫度를 유지하고 있었으며 80 °C에서도 48 % 殘餘活性 (retained activity)을 가지고 있다. Table 2, Fig.5.

Table II. Effect of temperature on PU^{hb} of native pepsin and immobilized pepsin on chitosan matrix at pH₂

Temp °C	Native pepsin PU ^{hb}	Immobilized pepsin PU ^{hb}
25	632,082	747,754
30	1081,367	747,754
35	1150,390	747,754
40	1023,847	747,754
50	690,234	747,754
60	368,125	747,754
70	23,008	665,311
80	-	358,922

3. 固定化 Pepsin의 動力學定數

酵素를 固定化하였을 경우 酵素的 蛋白質의 構造가 變하여 擔體 (matrix)와 基質과 親和力 (affinity)을 表示하는 定數는 보통 Michelis constant (Km)²³⁾으로 나타낸다. 이 定

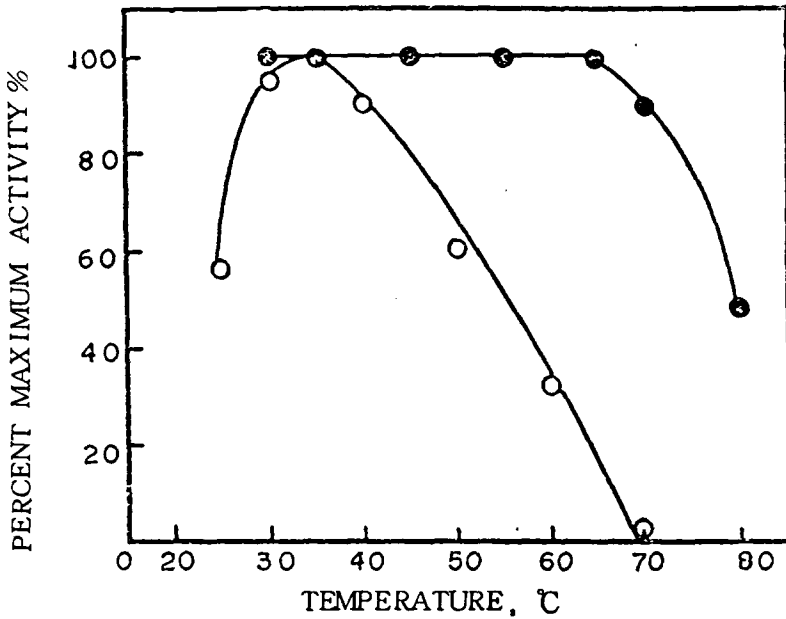
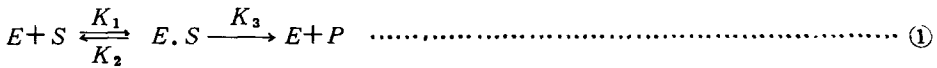


Fig.5. Effect of temperature on percent maximum activity of native pepsin and immobilized pepsin on chitosan matrix at pH₂
 ○... native, ●... immobilized pepsin

數값을 決定하기 위해



(K₁K₂K₃는 速度常數)

式 ①로부터 [ES]가 生成되는 速度는

$$\frac{dEs}{dt} = K_1 [E - ES] \cdot [S]$$

[ES]가 分解되는 速度는

$$\frac{dEs}{dt} = K_2 [ES] + K_3 [ES], V = [ES] \text{의 速度가 steady state (정류상태)일때}$$

$$K_1 [[E - ES]] \cdot [S] = K_2 [ES] + K_3 [ES]$$

따라서 $\frac{[S] [[E] - [ES]]}{[ES]} = \frac{K_2 + K_3}{K_1} = Km \dots\dots\dots ②$

反應速度 V = [ES]에 비례하며 酵素가 擔體 (matrix)에 飽和되었을 경우의 모든 酵素는

[ES]로 存在하고 反應速度는 最大(V_{max})가 되므로 $V=K_3[ES]$, $V_{max}=K_3[E]$ 이 式을 ②에 代入하면

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \dots\dots\dots ③$$

式 ③을 역수를 취하면

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \text{ (Lineweaver-Burk)}^{24)} \dots\dots\dots ④$$

速度 V 에 대하여 $V/[S]$ 로 表示하면

$$V_{max} = \frac{V \cdot K_m}{[S]} + V \dots\dots\dots ⑤$$

式 ⑤를 K_m 으로 나누면 Dixon and Webb²⁵⁾

$$\text{式 ⑥를 } \frac{V}{[S]} = \frac{1}{K_m} \times V \frac{V_{max}}{K_m} \dots\dots\dots ⑥$$

얻을 수 있다. 式 ④를 利用하여 圖示하면 Fig.6에서 pepsin의 K_m 치는 0.476 % 이었으며 V_{max} 는 1.333 m/min 이었다.

반면에 pepsin을 chitosan에 固定化했을 때의 K_m 치는 0.417 %이었고 이 固定化酵素의 V_{max} 는 0.769 $\mu M/min$ 을 나타냈다. 이것은 chitosan擔體에 Pepsin을 固定化하였을 때 천연 pepsin보다 Michaelis constant(K_m)가 더 적은 농도에서 [E.S] 복합체를 이루므로 chitosan을 glutaraldehyde를 架橋材로 하여 pepsin을 固定化이므로 基質 hemoglobin과의 親和力은 더 큰 것으로 나타났으며 이것은 anion의 hemoglobin과 polycation인 chitosan擔體(matrix)와의 상호작용(Interaction)에 의한 것으로 固定化 pepsin과 hemoglobin과의 分配效果(partitioning effet)로 생각할 수 있다.

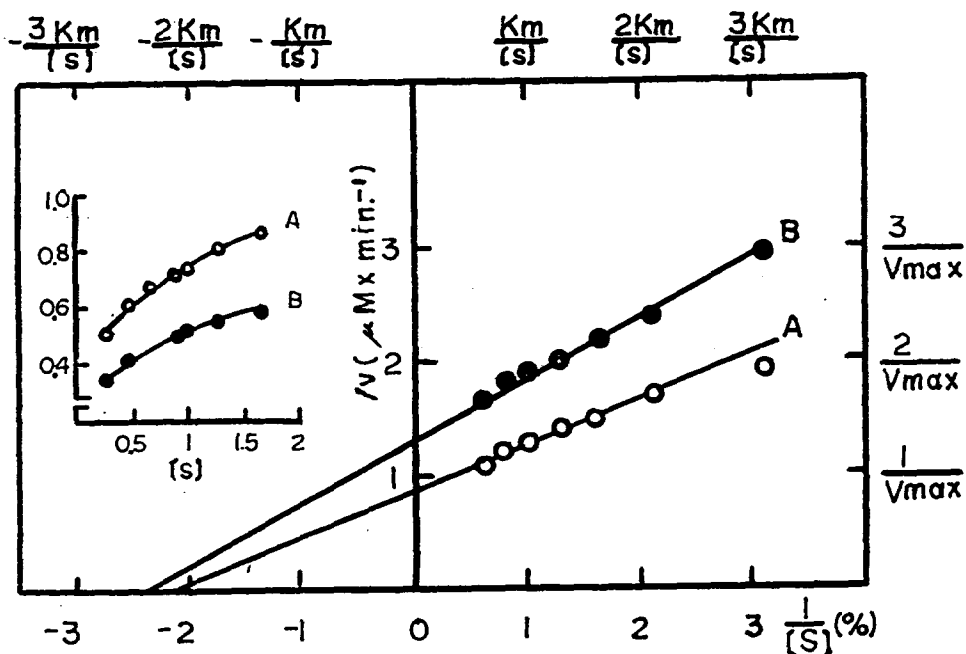


Fig. 6. Double reciprocal ($1/V$ versus $1/[S]$) Lineweaver-Burk plot for native pepsin (A) and immobilized pepsin on chitosan matrix (B)

IV. 結 論

chitosan biopolymer를 利用하여 glutaraldehyde를 架橋材로 chitosan matrix에 固定化한 pepsin의 特性은 다음과 같다.

1. pepsin을 chitosan matrix에 固定化하므로 65%의 殘餘活性이 있었고 pepsin의 最適 pH 2.0에서 pH 1.5로 移動하였으며 30°C~65°C에서도 最適溫度를 維持하였다.

2. 酵素의 基質과 親和性은 天然 pepsin의 Michaelis 定數(K_m)는 0.476%, $V_{max} = 1.333 \mu M/l$ 이었고 固定化酵素의 K_m 치는 0.417%, $V_{max} = 0.769 \mu M/l$ 로서 固定化 pepsin이 基質과 親和性이 더 큰 것은 상호작용에 의한 分配 效果에 (partition effect)기 인한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. R. D. Preston, The physical biology of plant cell walls, Chapman and Hall Sondon, England(1974).
2. R. Konnfeld S. Cornelius, *Annu. Rev. Biochem.* 45, 217(1976).

3. C. Jeuniaux and Cornelius, Distribution and activity of chitonolytic enzyme 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. (1978).
4. M. Sugano, T. Fujikawa, Y. Hiratsujii, and Y. Hasegawa, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 33 : 787~793(1980).
5. Nagyvary, J. J., et al, *Nutr. Rep. Int.* 10, 677~684, 1979 quoted in J. L. Nauss et al, *Lipids* 18, 714 (1983).
6. Knorr, D. J. *Flood Sci.*, 47, 593~595(1982), quoted in J. L. Nauss, et al, *Lipids* 18, 714(1983).
7. Landes, D. R. and Bough, W. A. (1976) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 15, 555~563, quoted in J. L. Nauss, et al, *Lipids* 18, 714(1983).
8. J. L. Nauss, J. L. Thompson, and J. Nagyvary, *Lipids*, 18, 10, 714~719(1983).
9. Taiji, Yagishita, *Agr. Biol. Chem* 35, 7, 1154~1156(1971).
10. L. B. Wingard, Jr. Epharain Katchalskik atzir, L. Goldstein, *Applied biochemistry and bioengineering*, Academic Press New York, U. S. A., 1974, 2, 1046~1057.
11. Riccardo A. A. Muzzarelli, Gateano barontini, and Roberto Rocchetti, *Biotechnology and Bioengineering*, 20, 87~94(1978).
12. Y. Nozawa, T. Matsushita, K. Yamashina, F. Higashide, *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 753~756 (1982).
13. W. L. Stanley, G. G. Watters, B. Chan, and J. M. Mercer, *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 315 ~326(1975).
14. J. F. Kennedy and C. E. Doyle, *Carbohydrate Research*, 28, 89~92(1973).
15. W. L. Stanley, G. G. Watters, S. H. Kelly, B. G. Chan, J. A. and J. E. Schade, *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 439~443(1976).
16. Yamauchi, Aai, Hirano and Ito, *Agric. Biol. Chem.* 42, 1297~1299(1978).
17. J. N. Bemiller, Chitin, *Method in carbohydrate chemistry*, 5, 104(1965).
18. D. Horton and D. R. Lineback, *Method in carbohydrate chemistry*, 103, 403~406(1965).
19. O. Folin and Ciocalteu, "phenol reagent", *Methods of enzymatic Analysis*, (Ed.), 2nd, Hans Ulrich Bergmeyer Academic Press New York, U. S. A., 2, 1046~1057(1974).
20. Wint Rick and Wolf-penta Hritsch, "pepsin", *Methods of enzymatic Analysis*, (Ed.), 2nd, Hans Ulrich Bergmeyer Academic Press New York, U. S. A., 44, 104(1976).
21. M. L. Anson, *J. gen. physiol.* 22, 79(1939), quoted in Wint Rick and Wolf-peter Fritsch, *Methods of enzymatic analysis*, 2, 1049(1974).
22. D. Trevan, "Immobilized enzyme", John Wiley and Sons, New York, U. S. A., 21~24(1980).
23. G. Michal, "Determination of Michaelis constant and inhibitor constant, *Methods of enzymatic analysis*, (Ed.), 2nd, Hans Ulrich Bergmeyer, Academic Press New York, U. S. A., 1, 144~145(1974).
24. G. Michal, "Determination of Michaelis constant and inhibitor constants", *Methods of enzymatic analysis*, (Ed.), 2nd, Hans Ulrich Bergmeyer, Academic Press : New York, U. S. A., 1, 146~149(1974).
25. G. Michal, "Determination of Michaelis constant and inhibitor constants", *Methods of enzymatic analysis*, (Ed.), 2nd, Hans Ulrich Bergmeyer, Academic Press : New York, U. S. A., 1, 144~145(1974)

Immobilization of Pepsin on Chitosan Matrix**Chi-young Lee***Dept of Environmental Sanitation
Kwangju Health Junior College***Sung-joo Jun***Graduate School Chosun University**>Abstract<*

For the effective immobilization of pepsin on chitosan matrix with glutaraldehyde, optimal activation methods were studied, and its enzymatic properties were investigated.

In immobilizing pepsin activity experiments where it was immobilized on to chitosan matrix with glutaraldehyde, we found that the immobilized pepsin retained 65% activity.

The optimum pH of the soluble pepsin was 2.0, while immobilized pepsin was 1.5. The effect of temperature on the activity of the immobilized pepsin was compared with that of the native pepsin. The result indicated that the native pepsin was 35°C, while immobilized pepsin was most active over a temperature range from 35°C to 65°C. From Line Weaver-Burk plots, the following kinetic data were obtained : for the immobilized pepsin, $K_m=0.417\%$ and $V_{max}=0.769\mu\text{m} / \text{L}$: for the native pepsin, $K_m=0.476\%$ and $V_{max}=1.333\mu\text{M} / \text{L}$.