

Polyacrylamide gel에서 Progesterone의 확산 거동

김명희 · 김말남 · 민병례

상명여자대학교 생물학과

Diffusion of Progesterone in Polyacrylamide Gel

Kim, Myung-Hee, Mal-Nam Kim and Byung-Re Min

Department of Biology, Sang Myung Women's University, Seoul 110-743, Korea

ABSTRACT: Diffusion and partition of progesterone into the polyacrylamide gel was examined. Diffusion coefficient of progesterone decreased down to an asymptotic value as the concentration of the organic solvents in the diffusing medium increased. However the partition coefficient diminished steadily. Crosslinking density in the gel didn't affected the diffusion coefficient considerably but lowered the partition coefficient due to the contraction of pore volume of the gel. Progesterone showed higher diffusion coefficient as well as partition coefficient in the polyurethane than in the polyacrylamide gel, which seems to be ascribed to the difference in hydrophobicity, pore volume and pore size of the polymer matrix.

KEY WORDS □ *Rhizopus nigricans*, Progesterone, Polyacrylamide gel, Partition coefficient, Diffusion coefficient.

Immobilization 기술은 enzyme 이외에도 미생물 혹은 동식물 세포의 고정화에까지 응용되고 있다 (Brodelius와 Vandamme, 1987). Steroids의 transformation 반응은 생존하는 미생물을 효소원으로 하는 것이 필요하므로 고정화 과정에서 유발되는 독성이 낮은 수준이어야 한다. Polyacrylamide gel을 이용하여 고정화시킨 *Rhizopus nigricans*는 progesterone의 11 α -hydroxylation 반응에 대하여 높은 활성을 보이므로 (Kim 등, 1990) polyurethane polymer와 더불어 이 반응을 위한 고정화 재료로 적합하다고 할 수 있다. 특히 polyacrylamide gel은 투명하며 물에 용해되지 않고 pH나 온도변화에 대하여 안정하며 수화되어도 swelling만 될 뿐 stable한 우수한 특징을 가지고 있다.

이와 같은 gel entrapped system은 substrate와 product의 물질전달저항을 증가시키며, 이 때 물질전달저항의 정도는 permeability 혹은 확산계수의 값으로부터 결정된다. Polyurethane의 경우 diol을 이루는 hydrophobic part의 propylene oxide와 hydrophilic part인 ethylene oxide block의 상대적인 길이와 공

중합체의 분자량 및 CO₂ 기체발생 속도 등에 의하여 polymer의 porosity와 gel/diffusing substance의 affinity가 결정된다. Polyacrylamide gel은 acrylamide와 methylene-bisacrylamide의 조성에 따라 그 물성이 좌우되며 후자는 이 polymer의 가교제역할을 하므로 이의 함량이 높을수록 gel이 더욱 단단해진다. Gel entrapment를 위한 중합반응은 발열반응이며, 특히 polyacrylamide의 생성반응은 그 발열량이 크므로 반응온도를 조절하기 위하여 적절한 반응 촉매 및 억제제를 선택함으로써 온도상승에 따른 고정화 효소의 활성감소를 줄이는 것도 아울러 고려되어야 한다 (Atkinson, 1974). Substrate 혹은 product의 물질전달속도는 gel의 pore size와 distribution, 확산물질의 분자크기 및 농도, 확산온도 및 gel, 재료와 확산물질 상호간의 친화도 등에 의존한다. 특히 pore size에 원하는 반응의 고정화 재료를 선택하는데 가장 중요한 인자라고 할 수 있다. Gel의 pore가 클수록 substrate와 product 분자가 더욱 쉽게 확산할 수 있으나 고정화된 미생물이 더 쉽게 leak 되는 문제점이 발

이 논문은 1988년도 문교부 학술연구 조성비 지원에 의하여 연구되었음

생활 확률이 커진다. Acrylamide gel의 pore size와 pore volume은 monomer와 crosslinking agent의 비율에도 의존하지만 고정화 용액내의 polymer 함량에도 큰 영향을 받는다(White, 1960). 고정화 matrix/반응기질계의 확산에 관한 연구는 주로 수용성 기질을 사용하였으며 Ca-alginate gel (Cheetham 등, 1979; Klein 등, 1983; Tanaka 등, 1984)과 K-carrageenan gel (Nguyen과 Luong, 1986)을 이용하여 White 등 (White, 1960; White와 Dorion, 1961)은 무기염, sucrose 및 D₂O 등과 polyacrylamide gel system의 확산거동을 다루었다. 그러나 이들은 고정화 gel/확산용액의 분배계수를 1로 한 수용성 기질에 대하여만 조사하였으며 steroid와 같은 물에 대한 용해도가 낮은 물질에 대하여 polyacrylamide gel내의 물질전달에 관하여는 아직 연구된 바 없다.

본 연구에서는 progesterone과 물 및 유기용매계와 polyacrylamide계의 확산속도를 다룸으로써 확산저항이 progesterone의 11 α -hydroxylation 반응에 미치는 영향의 정도를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

Gel preparation

Polyacrylamide gel : 고체 사면 배지에서 48시간 동안 배양시킨 *Rhizopus nigricans* 의 모균주에 멸균 증류수 7 ml를 넣어 포자현탁액을 준비하였다. 이 포자 현탁액 4 ml(5.0 \times 10⁶ spores/ml)를 취하여 200 ml의 액체배지에 접종하고 28 $^{\circ}$ C, 180 rpm.의 Rotary shaker에서 14시간 배양하였다. 여기에 cyclohexamide를 0.5 g/l의 농도로 주입하고 다시 5시간 배양하여 균사체의 활성을 없앤 후 멸균 증류수로 4~5회 세척하였다. Acrylamide 1.5 g과 N,N'-methylene bisacrylamide 0.12 g을 0.05 M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 6 ml에 녹인 후 6.28 ml의 buffer에 효소 활성을 없앤 균사체 0.5 g(wet weight)이 포함된 균사체 현탁액과 혼합하였다. 여기에 10% TEMED 0.3 ml와 5% ammonium persulfate 0.3 ml를 주입하여 잘 섞은 다음 즉시 polymerization chamber에 붓고 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 정도 두어 고정화 하였다.

Polyurethane gel : Roux culture bottle에 배양시킨 stock에 멸균 증류수를 넣어 포자 현탁액을 만든 후 멸균된 glass wool로 통과시키고 원심분리(10,000 rpm. \times 15분)하여 농축시켰다. 250 ml의 유리비이커에 NEORINE-302(한국폴리올사 제품) 10g을 넣고 여기에 B 8680 0.1g, D-TL 0.05g과 포자현탁액 0.1 ml(5.0 \times 10⁶ spores/ml)를 첨가하여 섞었다. MDI 2.678 g을 넣고 부풀 때까지 잘 저었다. 4 $^{\circ}$ C냉장고에 24시간 방치하여 고정화하였다. Spore 발아를 위하여 gel을 10 \times 10 \times 1 mm의 크기로 잘라 액체 성장배지에서 20

시간 배양시켰다. 여기에 cyclohexamide를 0.5 g/l의 농도로 첨가하고 다시 5시간 배양하여 균사체를 불활성화 시킨 후 멸균 증류수로 4~5회 세척하였다.

확산계수의 측정

Polyacrylamide gel과 polyurethane gel내의 progesterone의 확산계수를 측정하기 위하여 먼저 항온조 내에서 250 ml의 삼각플라스크에 1 mm 두께의 세포를 고정화시킨 gel matrix 25 ml를 물 100 ml와 혼합한 후 30 \pm 0.1 $^{\circ}$ C로 유지되게 하였다. 그 후 progesterone의 최종 농도가 0.05 g/l가 되도록 녹인 유기용매 용액을 주입하였으며 이 시간으로부터 용액내에 잔존하는 progesterone의 농도변화를 magnetic bar로써 용액을 빠른 속도로 교반하면서 250 nm의 UV spectrophotometer로 측정하였다. 채취된 시료는 O.D. 측정 후 바로 확산용액에 투입하여 sampling에 따른 확산용액의 부피 변화가 없게 하였다. 미 중합 acrylamide 혹은 기타 저분자량 물질이 확산 용액속으로 용출되어 나오므로 progesterone과 유기용매를 투입하기 전에 gel을 충분히 세척하였다. 확산속도식은 Crank(1975)가 얇은 sheet상의 matrix 속으로 확산 물질이 확산 하는 경우에 대하여 유도한 식을 그대로 사용하였으며 이 식 중의 parameter α 와 분배계수 K는 각각

$$\alpha = \frac{V \text{ solution}}{V \text{ sheet } K}$$

$$K = \frac{V \text{ solution}}{V \text{ sheet}} \frac{C_0 - C_{\infty}}{C_{\infty}}$$

로 두어 계산하였다. 여기서 V solution 및 V sheet는 용액 및 gel의 부피를 각각 나타내며 C₀와 C _{∞} 는 각각 용액내 progesterone의 초기 농도와 평형 농도이다.

결과 및 고찰

Polyacrylamide gel(acrylamide methylene bisacrylamide copolymer)을 효소 활성을 없앤 균사체와 함께 고정화하여 methanol/ 물의 조성을 달리 하면서 progesterone의 확산속도를 측정한 것을 Fig. 1에 나타내었다. 실선은 확산 속도식을 이용하여 계산한 농도변화를 나타내며, 실험 결과와 비교적 잘 일치하고 있다. Fig. 1에서의 실험 data와 가장 잘 일치하고 있는 이론값으로부터 구한 확산계수 및 분배계수를 용액 속의 methanol 농도의 함수로 나타낸 것이 Fig. 2이다. 용액 중의 methanol 함량에 따라 분배계수 뿐만 아니라 확산계수도 크게 변화함을 알 수 있다. 물속의 methanol 함량이 증가함에 따라 확산계수가 감소하다가 일정해지는 경향을 나타냈다. 그러나 분배계수는

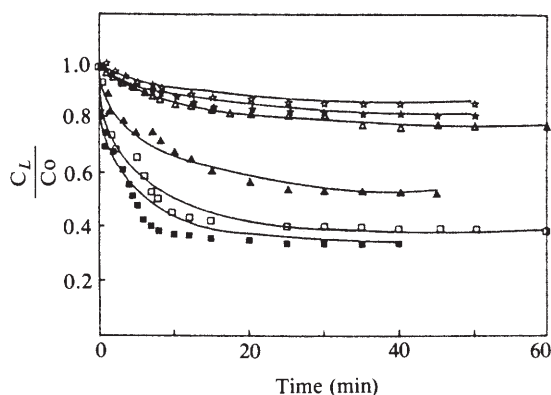


Fig. 1. Diffusion of progesterone from solution into the polyacrylamide gel at 30°C.

■—■: Methanol 1 wt%, □—□: Methanol 4 wt%, ▲—▲: Methanol 6 wt%, △—△: Methanol 10 wt%, ★—★: Methanol 15 wt%, ☆—☆: Methanol 20 wt%

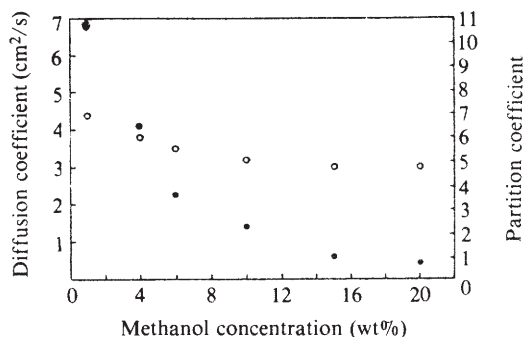


Fig. 2. Diffusion and partition coefficient of progesterone in the polyacrylamide gel/water-methanol system.

○ : Diffusion coefficient, ● : Partition coefficient

계속하여 감소하였다. 확산 용액 중의 methanol 함량이 증가함에 따라 확산계수가 감소하는 것은 polyacrylamide gel이 methanol보다는 물에 의하여 더 쉽게 swelling 되므로 methanol 함량의 증가에 따라 gel의 pore size와 pore volume이 감소하기 때문으로 보인다. Methanol 함량에 따라 분배계수가 낮아지는 것은 progesterone이 methanol 용액에 더 쉽게 용해되기 때문이며 gel이 contraction되어 pore volume이 감소하는 것도 그 원인 중의 하나라고 판단된다. 높은 methanol 함량에서는 polymer gel이 contraction되어 pore size가 감소하여 확산계수가 크게 저하할 것으로 예상한 바와는 달리 거의 일정한 값을 나타내는 현상을 설명하기 위하여는 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

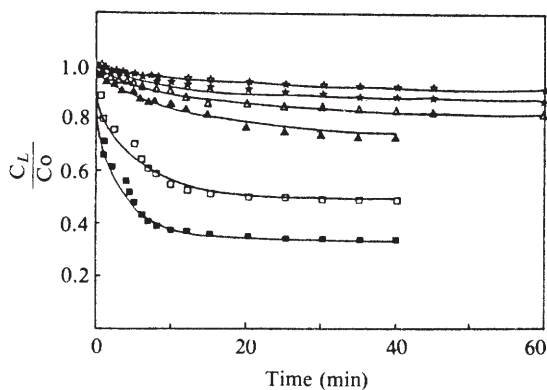


Fig. 3. Diffusion of progesterone from solution into the polyacrylamide gel at 30°C.

■—■: THF in the solution 1 wt%, □—□: THF in the solution 4 wt%, ▲—▲: THF in the solution 6 wt%, △—△: THF in the solution 10 wt%, ★—★: THF in the solution 15 wt%, ☆—☆ THF in the solution 20 wt%

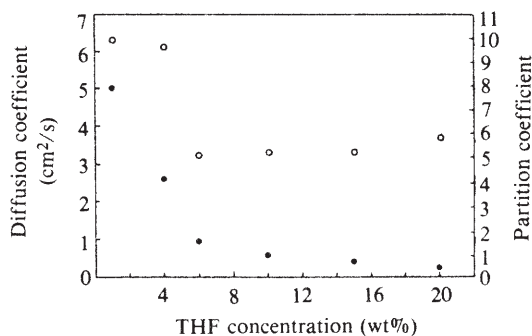


Fig. 4. Diffusion and partition coefficient of progesterone in polyacrylamide/water-THF system.

○ : Diffusion coefficient, ● : Partition coefficient

유사한 현상이 용매를 달리하였을 때도 관찰되었다. 즉 Fig. 3 및 Fig. 4의 polyacrylamide/water-THF계의 결과에서도 분배계수는 유기용매의 함량이 높아짐에 따라 점차 감소하였으나 확산계수는 감소하다가 높은 유기용매의 함량에서 일정해지는 현상이 관찰되었다.

따라서 progesterone의 transformation 반응속도가 유기용매의 함량에 따라 감소하는 것은(Kim과 Kim, 1987) 유기용매의 toxicity 이외에도 확산계수와 분배계수의 감소도 그 한 원인이라고 할 수 있다.

Fig. 5는 gel의 acrylamide/methylene bisacrylamide 비율을 달리하였을 때 1 및 10 wt% methanol 수용액에서의 progesterone의 확산계수와 분배계수를 나타낸다. Methylene bisacrylamide의 비율이 높아짐에 따라 crosslinking density가 상승하므로 gel 이

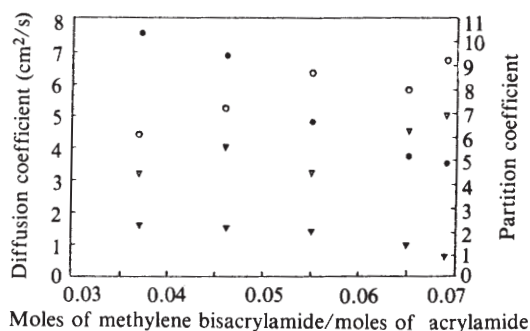


Fig. 5. Diffusion and partition coefficient of progesterone in the polyacrylamide/water-methanol system as a function of crosslinking agent content.

○: Diffusion coefficient in 1 wt% methanol solution, ●: Partition coefficient in 1 wt% methanol solution, ▽: Diffusion coefficient in 10 wt% methanol solution, ▼: Partition coefficient in 10 wt% methanol solution

더욱 단단해지나 확산계수는 오히려 약간씩 증가하는 경향을 나타내며 분배계수는 계속 감소하였다. 따라서 crosslinking density가 1 crosslinking unit/16 monomer unit 이하일 때 crosslinking의 정도는 확산계수에 영향을 미치지 못함을 알 수 있다. 분배계수가 더 작은 값을 보이는 것은 crosslinking agent가 첨가됨에 따라 gel의 hydrophilicity가 감소하여 분배계수를 상승시키는 것보다 pore volume의 감소 등으로 인하여 분배계수가 저하되는 영향이 더 크게 나타나기 때문으로 판단된다. Crosslinking agent의 비율이 같을 때는 모든 comonomer의 비율에서 methanol 함량이 높을 때 더 낮은 확산계수를 나타내며 분배계수도 더 낮았다. White 등은(White, 1960; White와 Dorion, 1961) KCl, D₂O, urea 및 sucrose와 같은 water soluble substance의 확산 계수가 crosslinking agent의 비율에 무관함을 보고하였으며, Tanaka 등(1984)도 Ca-alginate계에서 확산물질의 분자량이 glucose, L-tryptophan 혹은 α-lactalbumin과 같이 낮을 때에는 gel 형성 과정에서의 Ca-alginate 농도와 CaCl₂ 사용 비율에 무관하게 일정하다고 보고하였다.

Fig. 6 및 Table 1은 polyurethane/water-methanol

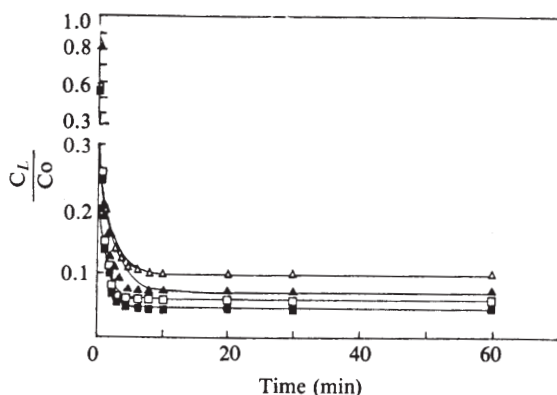


Fig. 6. Diffusion of progesterone into the polyurethane gel.

■—■: Methanol 1 wt%, □—□: Methanol 4 wt%, ▲—▲: Methanol 6 wt%, △—△: Methanol 10 wt%

Table 1. Diffusion and partition coefficient of progesterone in polyurethane/water-methanol system.

Methanol concentration (wt%)	Diffusion coefficient (cm ² /s)	Partition coefficient
1	11.2×10^{-6}	84.9
4	5.7×10^{-6}	86.9
6	6.0×10^{-6}	51.6
10	6.5×10^{-6}	37.3

계에서 progesterone의 확산계수와 분배계수를 나타낸 것이다. Polyacrylamide gel의 경우에 비하여 확산계수 및 분배계수의 methanol 농도에 대한 의존성이 적음을 알 수 있다. Polyacrylamide gel에 비하여 확산계수가 약간 더 크게 나타나며 분배계수가 매우 큰 것은 polyurethane의 polarity가 더 낮기 때문에 progesterone이 더 쉽게 흡착되기 때문으로 판단된다. Polyurethane의 pore volume과 pore size가 polyacrylamide gel과 다른 것도 이 변화에 대한 요인일 수 있다.

적 요

Polyacrylamide gel 내로의 progesterone의 확산거동을 조사하였다. 확산 용액내의 유기용매 함량에 따라 gel의 swelling 감소로 인하여 확산계수가 감소하였으며 높은 유기용매 함량에서는 일정해지는 경향을 나타내었다. 그러나 분배계수는 계속 감소하였다. Polyacrylamide gel의 crosslinking density는 확산계수에 큰 영향을 미치지 않았으나 분배계수는 감소하였으며 이는 pore volume의 감소에 기인하는 것으로 보인다. Polyurethane는 hydrophobicity, pore volume 및 pore size의 차이로 인하여 polyacrylamide gel보다 더 큰 확산계수와 분배계수를 나타내었다.

생활 확률이 커진다. Acrylamide gel의 pore size와 pore volume은 monomer와 crosslinking agent의 비율에도 의존하지만 고정화 용액내의 polymer 함량에도 큰 영향을 받는다(White, 1960). 고정화 matrix/반응기질계의 확산에 관한 연구는 주로 수용성 기질을 사용하였으며 Ca-alginate gel (Cheetham 등, 1979; Klein 등, 1983; Tanaka 등, 1984)과 K-carrageenan gel (Nguyen과 Luong, 1986)을 이용하여 White 등 (White, 1960; White와 Dorion, 1961)은 무기염, sucrose 및 D₂O 등과 polyacrylamide gel system의 확산거동을 다루었다. 그러나 이들은 고정화 gel/확산용액의 분배계수를 1로 한 수용성 기질에 대하여만 조사하였으며 steroid와 같은 물에 대한 용해도가 낮은 물질에 대하여 polyacrylamide gel내의 물질전달에 관하여는 아직 연구된 바 없다.

본 연구에서는 progesterone과 물 및 유기용매계와 polyacrylamide계의 확산속도를 다룸으로써 확산지향성 progesterone의 11 α -hydroxylation 반응에 미치는 영향의 정도를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

Gel preparation

Polyacrylamide gel : 고체 사면 배지에서 48시간 동안 배양시킨 *Rhizopus nigricans* 의 모균주에 멸균 증류수 7 ml를 넣어 포자현탁액을 준비하였다. 이 포자 현탁액 4 ml (5.0 \times 10⁶ spores/ml)를 취하여 200 ml의 액체배지에 접종하고 28°C, 180 rpm.의 Rotary shaker에서 14시간 배양하였다. 여기에 cyclohexamide를 0.5 g/l의 농도로 주입하고 다시 5시간 배양하여 균사체의 활성을 없앤 후 멸균 증류수로 4~5회 세척하였다. Acrylamide 1.5 g과 N,N'-methylene bisacrylamide 0.12 g을 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 6 ml에 녹인 후 6.28 ml의 buffer에 효소 활성을 없앤 균사체 0.5 g (wet weight)이 포함된 균사체 현탁액과 혼합하였다. 여기에 10% TEMED 0.3 ml와 5% ammonium persulfate 0.3 ml를 주입하여 잘 섞은 다음 즉시 polymerization chamber에 붓고 4°C에서 1시간 정도 두어 고정화 하였다.

Polyurethane gel : Roux culture bottle에 배양시킨 stock에 멸균 증류수를 넣어 포자 현탁액을 만든 후 멸균된 glass wool로 통과시키고 원심분리(10,000 rpm. \times 15분)하여 농축시켰다. 250 ml의 유리비이커에 NEORINE-302(한국폴리올사 제품) 10g을 넣고 여기에 B 8680 0.1g, D-TL 0.05g과 포자현탁액 0.1 ml (5.0 \times 10⁶ spores/ml)를 첨가하여 섞었다. MDI 2.678 g을 넣고 부풀 때까지 잘 저었다. 4°C냉장고에 24시간 방치하여 고정화하였다. Spore 발아를 위하여 gel을 10 \times 10 \times 1 mm의 크기로 잘라 액체 성장배지에서 20

시간 배양시켰다. 여기에 cyclohexamide를 0.5 g/l의 농도로 첨가하고 다시 5시간 배양하여 균사체를 불활성화 시킨 후 멸균 증류수로 4~5회 세척하였다.

확산계수의 측정

Polyacrylamide gel과 polyurethane gel내의 progesterone의 확산계수를 측정하기 위하여 먼저 항온조 내에서 250 ml의 삼각플라스크에 1 mm 두께의 세포를 고정화시킨 gel matrix 25 ml를 물 100 ml와 혼합한 후 30 \pm 0.1°C로 유지되게 하였다. 그 후 progesterone의 최종 농도가 0.05 g/l가 되도록 녹인 유기용매 용액을 주입하였으며 이 시간으로부터 용액내에 잔존하는 progesterone의 농도변화를 magnetic bar로써 용액을 빠른 속도로 교반하면서 250 nm의 UV spectrophotometer로 측정하였다. 채취된 시료는 O.D. 측정 후 바로 확산용액에 투입하여 sampling에 따른 확산용액의 부피 변화가 없게 하였다. 미 중합 acrylamide 혹은 기타 저분자량 물질이 확산 용액속으로 용출되어 나오므로 progesterone과 유기용매를 투입하기 전에 gel을 충분히 세척하였다. 확산속도식은 Crank(1975)가 얇은 sheet상의 matrix 속으로 확산 물질이 확산 하는 경우에 대하여 유도한 식을 그대로 사용하였으며 이 식 중의 parameter α 와 분배계수 K는 각각

$$\alpha = \frac{V \text{ solution}}{V \text{ sheet } K}$$

$$K = \frac{V \text{ solution}}{V \text{ sheet}} \frac{C_0 - C_\infty}{C_\infty}$$

로 두어 계산하였다. 여기서 V solution 및 V sheet는 용액 및 gel의 부피를 각각 나타내며 C₀와 C_∞는 각각 용액내 progesterone의 초기 농도와 평형 농도이다.

결과 및 고찰

Polyacrylamide gel(acrylamide methylene bisacrylamide copolymer)을 효소 활성을 없앤 균사체와 함께 고정화하여 methanol/ 물의 조성을 달리 하면서 progesterone의 확산속도를 측정한 것을 Fig. 1에 나타내었다. 실선은 확산 속도식을 이용하여 계산한 농도변화를 나타내며, 실험 결과와 비교적 잘 일치하고 있다. Fig. 1에서의 실험 data와 가장 잘 일치하고 있는 이론값으로부터 구한 확산계수 및 분배계수를 용액 속의 methanol 농도의 함수로 나타낸 것이 Fig. 2이다. 용액 중의 methanol 함량에 따라 분배계수 뿐만 아니라 확산계수도 크게 변화함을 알 수 있다. 물속의 methanol 함량이 증가함에 따라 확산계수가 감소하다가 일정해지는 경향을 나타냈다. 그러나 분배계수는