

Effect of functional group on activity and stability of lipase immobilized on silica-coated magnetite nanoparticles with different functional group

Hye Rin Lee¹, Moon Il Kim², Sang Eun Hong³, Jaeyeong Choi³, Young Min Kim⁴,
Kuk Ro Yoon³, Seungho Lee³ and Sung Ho Ha^{1,*}

¹Department of Advanced Materials & Chemical Engineering, Hannam University, Daejeon 34054, Korea

²Department of BioNano Technology, Gachon University, Gyeonggi 13120, Korea

³Department of Chemistry, Hannam University, Daejeon 34054, Korea

⁴Department of Biological Sciences and Biotechnology, Hannam University, Daejeon 34054, Korea

(Received April 19, 2016; Revised May 22, 2016; Accepted June 17, 2016)

실리카 코팅된 자성 나노입자로의 효소 고정화에 사용된 작용기가 리파아제의 활성과 안정성에 미치는 영향

이혜린¹ · 김문일² · 홍상은³ · 최재영³ · 김영민⁴ · 윤국로³ · 이승호³ · 하성호^{1,*}

¹한남대학교 화공신소재공학과, ²가천대학교 바이오테크놀로지학과,

³한남대학교 화학과, ⁴한남대학교 생명시스템학과

(2016. 4. 19. 접수, 2016. 5. 22. 수정, 2016. 6. 17. 승인)

Abstract: The present study investigated the immobilization of lipases on silica nanoparticles and silica-coated magnetite nanoparticles as supports with a functional group to enhance the stability of lipase. The influence of functional groups, such as the epoxy group and the amine group, on the activity and stability of immobilized lipase was also studied. The epoxy group and the amino group were introduced onto the surface of nanoparticles by glycidyl methacrylate and aminopropyl triethoxysilane, respectively. Immobilized *Candida rugosa* lipase on silica nanoparticles and silica-coated magnetite nanoparticles with a functional group showed slightly lower initial enzyme activities than free enzyme; however, the immobilized *Candida rugosa* lipase retained over 92 % of the initial activity, even after 3 times reuse. Lipase was also immobilized on the silica-coated magnetite nanoparticles by cross-linked enzyme aggregate (CLEA) using glutaraldehyde and covalent binding, respectively, were also studied. Immobilized *Candida rugosa* lipase on silica nanoparticles and silica-coated magnetite nanoparticles by CLEA and covalent binding showed higher enzyme activities than free enzyme, while immobilized *Candida rugosa* lipase retained over 73 % of the initial activity after 5 times reuse.

요약: 고정화 지지체로 사용된 실리카 나노입자와 실리카 코팅된 자성 나노입자에 작용기를 부착시켜 기능성을 부가한 후 효소인 리파아제를 고정화하여 리파아제의 안정성을 향상시키고자 연구를 수행하였다. 지지체에 부착하는 작용기가 고정화된 효소의 활성과 안정성에 미치는 영향도 살펴보았다. 실리카 나

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-629-8896 Fax : +82-(0)42-629-8835

E-mail : shha@hannam.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

노입자와 실리카 코팅된 자성 나노입자에 부착한 작용기인 epoxy group과 amine group은 glycidyl methacrylate과 aminopropyl triethoxysilane을 통해 실리카 나노입자와 실리카 코팅된 자성 나노입자 표면에 각각 부착하였다. 작용기가 부착된 실리카 나노입자와 실리카 코팅된 자성 나노입자에 고정화한 *Candida rugosa* lipase는 자유효소에 비해 초기반응속도는 다소 낮았지만, 3 회 재사용한 후 측정된 활성이 최초 활성 대비 92 % 이상의 활성을 유지하였다. 또한, 실리카 코팅된 자성 나노입자에 glutaraldehyde를 이용한 cross-linked enzyme aggregate (CLEA) 방법과 공유결합법을 통해 라파아제를 각각 고정화한 연구를 수행한 결과, 실리카 나노입자와 실리카 코팅된 자성 나노입자에 CLEA 방법과 공유결합법으로 각각 고정화한 *Candida rugosa* lipase는 자유효소에 비해 초기반응속도 뿐만 아니라 최종 활성도 높았고, 5 회 재사용한 후 측정된 활성이 최초 활성 대비 73 % 이상의 활성을 유지하였다.

Key words: nanoparticle, silica-coated magnetite nanoparticles, lipase, immobilization, activity, stability

1. 서 론

실리카 (silica)는 높은 내구성을 가지며 균일한 크기와 여러 모양으로 디자인하기 쉬워 나노입자로 많이 사용하고 있다.¹ 실리카는 크게 천연 실리카 (natural silica)와 합성 실리카 (synthetic silica)로 나뉘며, 합성 실리카는 합성법에 따라서 피로제닉 실리카 (pyrogenic silica)와 침전 실리카 (precipitated silica)로 나뉜다. 침전 실리카는 주로 100 °C 이하의 온도에서 강한 산과 water glass를 이용하여 실리카 분말을 합성하는 방법으로 암모니아를 촉매로 빠르게 실리카 분말을 합성할 수 있어 많은 연구가 진행되고 있다.² Stber에 의해 염기조건에서 tetraethoxy orthosilicate (TEOS)와 같은 실란 (silane)으로 구형 실리카를 만드는 방법이 연구되면서 구형의 실리카 입자는 산업적으로도 중요한 물질로 매우 다양한 분야에 사용되고 있으며,^{3,4} 실리카 표면은 생체 적합성을 가지고 있어 DNA transfection, 약물 전달, 효소 고정화 등을 위한 지지체로도 많이 사용되어지고 있다.⁵⁻⁸

실리카 코팅된 자성 나노입자는 다양한 생물학적 응용으로 잠재성이 뛰어나며, 균일한 사이즈의 자성 나노입자의 합성이 가능하여, 최근들어 자성성질을 가지고 있는 실리카 나노입자의 연구가 활발해지고 있다.⁹⁻¹² 대부분의 나노입자는 소수성 capping reagents를 사용하여 유기용매에서 합성되어지기 때문에 소수성 유기용매에서 잘 분산되는 반면 친수성 용매에서의 분산성이 매우 떨어지기 때문에 생물학적 분야로의 응용이 크게 제한되었다. 그러나, 최근들어 친수성 용매에서 분산성을 가진 자성 나노입자의 합성이 이루어지는 몇몇 논문들이 발표되고 있다.¹³⁻¹⁵ 실리카 코팅된 자성 나노입자의 친수성을 향상시키기 위해 합

성 시 reverse micelles을 형성하여 합성하는 방법으로 친수성 용매에서의 분산성을 높일 수 있게 하는 방법이다.¹⁶ 이러한 친수성 용매에서 분산성을 가진 실리카 코팅된 자성 나노입자의 합성이 가능해짐으로써 효소 고정화 지지체로도 적합한 나노입자로 사용할 수 있게 되었다.¹⁷

지방을 지방산과 글리세롤로 가수분해하는 생물학적 효소인 리파아제 (lipase)는 수용액에서의 가수분해반응 뿐만 아니라 무수의 유기용매에서 에스테르화반응, 트랜스에스테르반응 아미노분해반응 등을 촉매하는 산업적으로 매우 유용한 효소로, 최근들어 천연 화합물 및 합성화학물의 선택적인 아실화반응 및 탈아실화반응, 라세믹 화합물의 분할 등의 반응에도 활발하게 적용하는 연구가 진행되고 있는 효소이다.¹⁸⁻²¹ 그러나, 대부분의 생물학적 효소는 구형 단백질로 구성되어 있어 물에 쉽게 용해되기 때문에 회분식 공정에서 회수하거나 재사용하기가 매우 힘들뿐 아니라 온도에도 민감하게 반응을 한다.

이러한 문제점들을 보완하기 위하여 효소를 물리적으로 혹은 화학적으로 불용성 담체의 표면 또는 내부의 한정된 공간속에 가두어 두는 것을 효소 고정화라고 한다.^{22,23} 효소 고정화는 효소활성에 있어서 더 좋은 환경이 마련될 수 있고, 분리나 회수도 간편해 효소 재이용이나 회수 및 정제공정의 생략과 같은 장점이 많은 이점을 가질 수 있어 효소 고정화를 통한 효소의 재사용은 생물화학공정에서 핵심적인 요소 중 하나이다. 또한, 생산물의 순도가 향상되며, 유출물 처리 문제도 최소화된다.^{22,23} 효소 고정화 방법으로 크게 가두기와 표면 고정화로 나뉜다.²³ 가두기는 효소를 한정된 공간 속에 물리적으로 가두는 것을 말하며, 표면 고정화는 효소를 지지체 표면에 흡착 또는 공유결

합을 통해 부착시키는 방법이다. 본 연구에서 사용되는 고정화 방법은 표면 고정화이다. 표면 고정화 방법 중 흡착 (adsorption)은 효소를 약한 물리적 힘에 의하여 지지체의 표면에 부착하는 것이다. 하지만 약한 결합력 때문에 외부에서 강한 힘이 존재할 때 효소의 탈착이 문제가 되는데, 이러한 문제는 glutaraldehyde (GA)를 이용한 cross-linked enzyme aggregate (CLEA) 방법에 의하여 안정화 될 수 있으며, 효율적인 고정화를 위하여 지지체의 표면을 전처리하기 위한 방법으로도 쓰인다.²⁴ 공유결합법은 효소와 지지체를 공유결합시키는 방법과 효소와 효소를 공유결합시키는 방법이 있다. 효소를 공유결합에 의해 지지체의 표면에 부착시키는 방법은 지지체에 여러 작용기를 부착시켜 효소와 공유결합을 시킨다. 효소-효소 공유결합시키는 방법으로는 효소끼리 직접 공유결합시키는 CLEA 방법 또는 효소와 화학물질을 첨가하여 결정 형태로 공유결합하는 방법이다.^{7,23-25}

이에 본 연구에서는 단위부피당 큰 표면적을 가지고 있는 나노입자를 이용한 효소 고정화를 통해 효소의 안정성을 높이기 위해 연구를 수행하였다. 고정화 지지체로 사용된 실리카 나노입자와 실리카 코팅된 자성 나노입자에 각각 epoxy group, epoxy-amine group, amine group의 작용기를 부착시켜 기능성을 부가한 후 리파아제를 고정화하였으며, 작용기를 달리하여 고정화된 효소의 활성 및 안정성 비교를 통해, 고정화시킬 때 부착한 작용기가 효소의 활성과 안정성에 미치는 영향을 관찰하였다.

2. 실험

2.1. 실험재료

본 연구에 사용된 효소인 리파아제는 *Candida rugosa* lipase, *Rhizopus oryzae* lipase, *Porcine pancreas* lipase, *Aspergillus niger* lipase, *Trametes versicolor* lipase, *Candida antarctica* lipase, *Candida antarctica* lipase B, *Pseudomonas cepacia* lipase는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다.

실험에 사용한 시약인 xylene, sodium dodecylbenzenesulfonic acid (NaDBS), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, hydrazine (34 wt% aqueous solution), tetraethyl orthosilicate (TEOS), ethylenediamine (EDA), toluene, aminopropyl triethoxysilane (APTES), glycidyl methacrylate (GMA), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (AIBN), cetyltrimethylammonium

bromide (C_{16}TAB), glutaraldehyde (GA) (25 % in H_2O), N,N-dimethylformamide (DMF), *p*-nitrophenyl butyrate는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 그 외 모든 시약은 분석시약급의 제품을 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 실리카 나노입자의 합성

균일한 크기의 실리카를 얻기 위하여 ethanol 171.3 mL에 TEOS 57 mL를 충분히 분산시킨 후, ethanol 1,710 mL과 NH_4OH 57 mL를 혼합한 혼합액을 첨가하여 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 그런 다음 원심분리하고 ethanol로 세척한 후 냉장 보관하였다. 실리카 나노입자의 크기와 균질 여부는 dynamic light scattering (DLS) (Dynapro NanoStar, Wyatt Technology, USA)과 asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) (Eclipse channel, Wyatt Technology, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.2.2. 실리카 코팅된 자성 나노입자의 합성

자성 나노입자를 형성하는 중에 TEOS를 첨가함으로써 실리카가 자성 나노입자를 코팅하는 one-pot 합성 방법에 따라 실리카 코팅된 자성 나노입자를 합성하였다.¹⁷ Xylene 15 mL에 NaDBS 1.75 g을 첨가 후 sonication하여 형성된 microemulsion에, deionized water에 0.75 mmol $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 1.5 mmol $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 를 용해하여 만든 metal salt solution을 첨가한 후 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 그런 다음 argon gas 상에서 1시간 동안 천천히 90 °C까지 가열한 후, 1 mL의 hydrazine (34 wt% aqueous solution)을 주입하여 3시간 동안 반응하였다. 반응이 끝난 후 1시간 동안 천천히 40 °C까지 낮춘 후, TEOS를 주입하여 10시간 동안 반응하였다. 이렇게 형성된 실리카 코팅된 자성 나노입자의 구성 성분은 X-ray diffraction (XRD) (SmartLab, Rigaku, Japan)을 이용하여 분석하였으며, 자성 나노입자 크기와 코팅된 실리카의 두께는 transmission electron microscopy (TEM) (Jeol Ltd, Japan)을 이용하여 분석하였다.

2.2.3. 나노입자 및 실리카 코팅된 자성 나노입자의 작용기 부착

효소를 나노입자 또는 실리카 코팅된 자성 나노입자로 고정화하기 위해 epoxy group, epoxy-amine group, amine group을 다음과 같은 방법으로 나노입자 또는

실리카 코팅된 자성 나노입자에 각각 부착하여 기능 화시켰다. 1) Epoxy group 부착 - 나노입자 또는 실리카 코팅된 자성 나노입자 2 g에 GMA 3.85 mL, AIBN 50 mg, C₁₆TAB 3 g을 첨가 후 2일 동안 70 °C에서 질소 환류 하에 반응하였다. 2) Epoxy-amine group 부착 - Epoxy gorup이 부착된 나노입자 또는 실리카 코팅된 자성 나노입자 2 g에 EDA 200 mL을 첨가하여 7 시간 동안 80 °C에서 질소 환류 하에 반응하였다. 3) Amine group 부착 - Toluene 40 mL에 나노입자 또는 실리카 코팅된 자성 나노입자 2 g, APTES를 2% (v/v) 첨가하여 15시간 동안 80 °C에서 아르곤 환류 하에 반응하였다. 1), 2), 3) 과정 후 rotary evaporator로 용매를 증발시키고 80 °C, vacuum oven에서 하루 동안 건조시켜 파우더 형태로 보관하여 사용하였다. 작용기의 부착 여부는 attenuated total reflection (ATR-FTIR) 을 이용하여 확인하였다.

2.2.4. 작용기가 부착된 나노입자 및 실리카 코팅된 자성 나노입자로의 효소 고정화

나노입자 및 실리카 코팅된 자성 나노입자에 부착된 작용기에 따라 효소인 리파아제를 다음과 같이 고정화하였다.

1) Epoxy group이 부착된 나노입자로의 효소 고정화

Epoxy group이 부착된 나노입자 또는 실리카 코팅된 자성 나노입자 10 mg을 100 mM carbonates buffer (pH 9.0)로 세척 한 후 free enzyme 용액 (5 mg/mL in 10 mM sodium phosphate buffer (SP buffer) (pH 6.5))을 첨가하여 vortexing 후 sonication을 통해 분산시켰다. 그런 후 25 °C, 250 rpm으로 shaking incubator에서 4시간 동안 반응한다. 고정화 후 10 mM SP buffer (pH 6.5)로 세척 후 냉장 보관하였다.

2) Epoxy-amine group이 부착된 나노입자로의 효소 고정화

Epoxy-amine group이 부착된 나노입자 또는 실리카 코팅된 자성 나노입자 10 mg을 100 mM SP buffer (pH 8.0)에 세척 한 후 0.1% (w/w) GA를 첨가하여 25 °C, 250 rpm으로 shaking incubator에서 30분 동안 반응하였다. 반응 후 100 mM SP buffer (pH 8.0)와 10 mM phosphate buffer (pH 6.5)로 각각 2번 세척 후 free enzyme 용액 (5 mg/mL in 10 mM SP buffer (pH 6.5))을 첨가하여 vortexing 후 sonication을 통해 분산시켰다. 그런 후 25 °C에서 250 rpm의 속도로 교반하며 4시간 동안 반응하였다. 그런 후 100 mM Tris-HCl buffer (pH8.0)을 첨가하여 25 °C에서 250 rpm의

속도로 교반하며 3시간 동안 반응하였다. 그런 후 10 mM SP buffer (pH 6.5)로 세척 후 냉장 보관하였다.

3) CLEA 방법을 이용한 amine group이 부착된 나노입자로의 효소 고정화

Amine group이 부착된 나노입자 또는 실리카 코팅된 자성 나노입자 5 mg을 free enzyme 용액 (5 mg/mL in 10 mM SP buffer (pH 6.5))에 첨가하여 vortexing 후 sonication을 통해 분산시킨 후 25 °C, 250 rpm으로 shaking incubator에서 1시간 동안 반응하였다. 그런 다음 세척한 후 나노입자에 흡착된 효소를 가교 (cross-linking)하기 위해 0.1% (w/w) GA를 첨가하여 25 °C에서 250 rpm의 속도로 교반하며 30분 동안 반응한 후 100 mM SP buffer (pH 8.0)로 세척하였다. 그런 후 100 mM Tris-HCl buffer (pH8.0)을 첨가하여 25 °C에서 250 rpm의 속도로 교반하며 30분 동안 반응하였다. 그런 후 10 mM SP buffer (pH 6.5)로 세척 후 냉장 보관하였다.

4) 공유결합법을 이용한 amine group이 부착된 나노입자로의 효소 고정화

Amine group이 부착된 나노입자 또는 실리카 코팅된 자성 나노입자 5 mg에 0.1% (w/w) GA를 첨가하여 25 °C, 250 rpm으로 shaking incubator에서 1시간 동안 반응한 후 100 mM SP buffer (pH 8.0)로 세척하였다. 그런 다음 free enzyme 용액 (5 mg/mL in 10 mM SP buffer (pH 6.5))에 첨가하여 vortexing 후 sonication을 통해 분산시킨 후 25 °C에서 250 rpm의 속도로 교반하며 1시간 동안 반응하였다. 그런 후 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)을 첨가하여 25 °C에서 250 rpm의 속도로 교반하며 30분 동안 반응하였다. 그런 후 10 mM SP buffer (pH 6.5)로 세척 후 냉장 보관하였다.

2.2.5. 고정화된 리파아제의 정량 분석

나노입자에 고정화된 리파아제의 양은 단백질 정량 분석법인 Lowry 법을 적용하여 측정하였다.²⁶ 측정할 효소 용액 100 µL에 동일한 양의 alkaline copper tartrate 용액을 첨가한 후 실온에서 15분 동안 반응하였다. 그런 후 1 N Folin-Ciocalteu 시약을 300 µL 첨가한 후 실온에서 45분 동안 반응하였다. 그런 후 분광광도계 (BioMATE 3S, Thermo, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 한 후 분석하였다. 표준시료로는 효소 고정화로 사용한 리파아제인 *Candida rugosa* lipase를 사용하였다.

2.2.6. 효소 활성화

리파아제의 효소활성은 10 mM SP buffer (pH 6.5) 10 mL에 50 mM *p*-nitrophenyl butyrate (in DMF) 100 μL를 첨가한 후 리파아제를 첨가하여 25 °C에서 250 rpm으로 교반하여 반응을 진행하였을 때, *p*-nitrophenyl butyrate가 리파아제의 가수분해 반응으로 생성되는 *p*-nitrophenol을 주기적으로 샘플링하여 400 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.²⁷ 측정된 흡광도는 아래의 식을 이용하여 효소의 활성을 측정하였다.

2.2.7. 고정화 효소의 작동 안정성

고정화 효소의 작동 안정성을 측정하기 위해 2.2.6 절의 가수분해 반응이 종료된 용액을 원심분리하여 상층액을 걸러내고 고정화 효소만을 회수하였다. 이때 고정화 효소는 잔류하는 기질이 없도록 10 mM SP buffer (pH 6.5)로 깨끗이 세척한 후 2.2.6 절의 동일한 방법으로 고정화 효소의 활성을 측정하였다. 이 과정을 5번 반복하여 사용한 고정화 효소의 활성을 최초 활성과 비교하고 그 잔류활성 (residual activity)을 계산하여 작동 안정성을 측정하였다.

입자는 dynamic light scattering (DLS)과 asymmetric flow field-flow fractionation (AF4)를 이용하여 실리카 나노입자의 크기가 균일하게 분포되어 있는지를 분석하였다. AF4를 이용하여 실리카 나노입자의 머무름 시간을 확인할 수 있었으며, 최대 peak의 머무름 시간으로부터 수화직경 (hydrodynamic diameter, D_h)을 계산한 결과 200 nm의 크기를 가지고 있음을 확인할 수 있었으며, DLS 측정결과 또한 유사한 크기를 가지고 있음을 보여주고 있다 (Fig. 1). 본 연구에서는 평균 210 nm의 실리카 나노입자를 효소 고정화 지지체

3. 결과 및 고찰

3.1. 실리카 나노입자 분석

효소 고정화를 위한 지지체로 합성한 실리카 나노

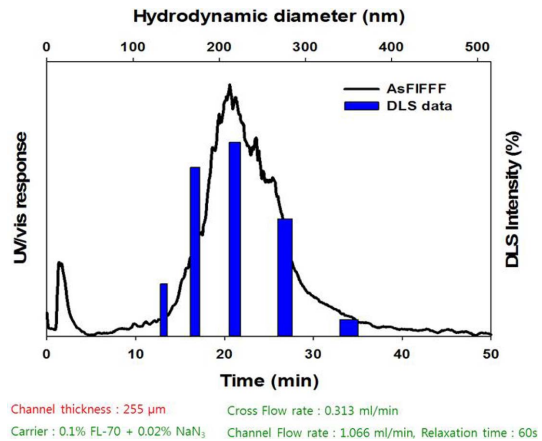


Fig. 1. Analysis of particle size of silica nanoparticles using DLS and AF4.

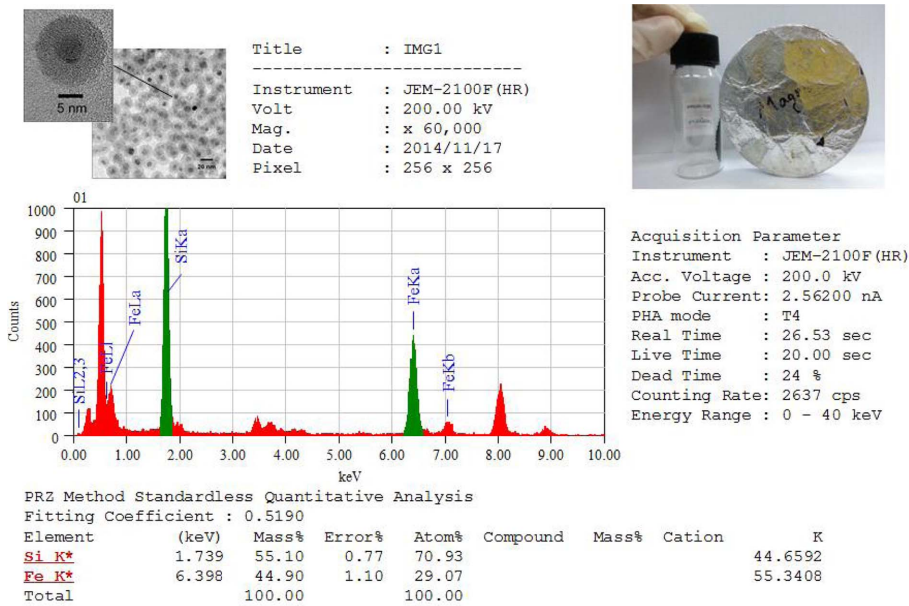


Fig. 2. Analysis of silica-coated magnetite nanoparticles using TEM and XRD.

로 사용하였다.

3.2. 실리카 코팅된 자성 나노입자 (silica-coated magnetite nanoparticles) 분석

실리카 코팅된 자성 나노입자의 구성성분과 크기는 TEM과 XRD를 통해 분석을 하였다. Fig. 2에 보인 바와 같이 TEM을 통해 5 nm의 자성입자에 실리카가 1 nm의 두께로 코팅되어 직경이 7 nm인 실리카 코팅된 자성 나노입자가 형성되었음을 알 수 있었으며, XRD 분석을 통해 55.1%의 실리카 성분과 44.9%의 Fe 성분으로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서는 직경이 평균 7 nm의 실리카 코팅된 자성 나노입자를 효소 고정화 지지체로 사용하였다.

3.3. 고정화를 위한 효소 선정

나노입자에 고정화하기 위한 최적의 리파아제를 선정하기 위해, 많이 사용되는 8종의 리파아제의 자유 효소 (free enzyme) 활성을 *p*-nitrophenyl butyrate의 가수분해 반응으로 측정하여 비교하였다. Fig. 3에 보인 바와 같이 *Porcine pancreas* lipase, *Trametes versicolor* laccase는 거의 활성을 보이지 않았다. *Candida antarctica* lipase는 다른 효소들에 비해 높은 활성을 보였으나, *Candida rugosa* lipase가 가장 높은 초기반응속도와 효소 활성을 보였다. 따라서 본 연구에서는 고정화를 위한 효소로 *Candida rugosa* lipase를 선정하여 진행하였다.

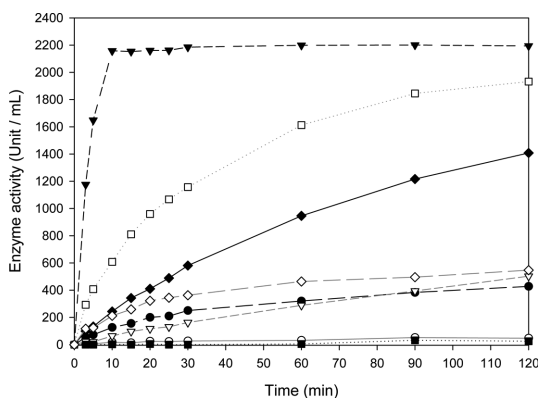


Fig. 3. Hydrolysis activities of lipases from different sources. (● *Rhizopus oryzae* lipase, ○ *Porcine pancreas* lipase, ▼ *Candida rugosa* lipase, ▽ *Aspergillus niger* lipase, ■ *Trametes versicolor* laccase, □ *Candida antarctica* lipase, ◆ *Candida antarctica* lipase B, ◇ *Pseudomonas cepacia* lipase)

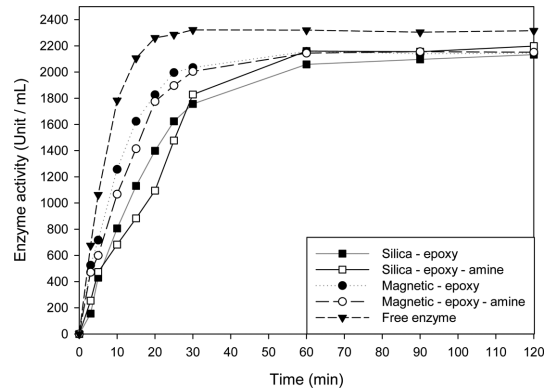


Fig. 4. Hydrolysis activities of immobilized lipases on silica nanoparticles and silica-coated magnetite nanoparticles.

3.4. Epoxy group과 epoxy-amine group이 부착된 나노입자에서의 효소 활성

Epoxy group과 epoxy-amine group을 각각 부착한 실리카 나노입자와 실리카 코팅된 자성 나노입자에 *Candida rugosa* lipase를 고정화하여 효소활성을 비교하였다. Fig. 4에 보인 바와 같이 고정화하지 않은 자유 효소 (free enzyme)의 초기반응속도가 epoxy group과 epoxy-amine group에 부착된 실리카 나노입자 및 실리카 코팅된 자성 나노입자에 고정화한 효소의 초기반응속도보다 약간 높음을 볼 수 있다. 이는 자유 효소가 효소 입자들이 고정화한 효소보다 자유롭기 때문에 더 높은 초기활성을 가지는 것으로 보인다. 하지만 최종 활성은 고정화 여부와 상관없이 비슷함을 보이는데, 이로부터 실리카 나노입자나 실리카 코팅된 자성 나노입자를 지지체로 이용한 고정화 방법이 효소 활성에 나쁜 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

3.5. Epoxy group과 epoxy-amine group이 부착된 나노입자에서의 효소 안정성

Epoxy group과 epoxy-amine group을 각각 부착한 실리카 나노입자와 실리카 코팅된 자성 나노입자에 고정화한 *Candida rugosa* lipase의 안정성을 측정하였다 (Fig. 5). 이를 위해 효소 반응 후 반응이 종료된 용액에서 고정화 효소만을 회수하여 활성을 측정하였으며, 이 과정을 5번 반복하여 실험하였다. 그 결과, 3회에 걸쳐 재사용하였을 때 epoxy group과 epoxy-amine group을 각각 부착한 실리카 나노입자와 실리카 코팅된 자성 나노입자에 고정화한 *Candida rugosa* lipase는 최초 활성 대비 92.82%, 91.38%, 93.58%, 92.70%의 활성을 유지하였으며, 5회까지 평균 69%

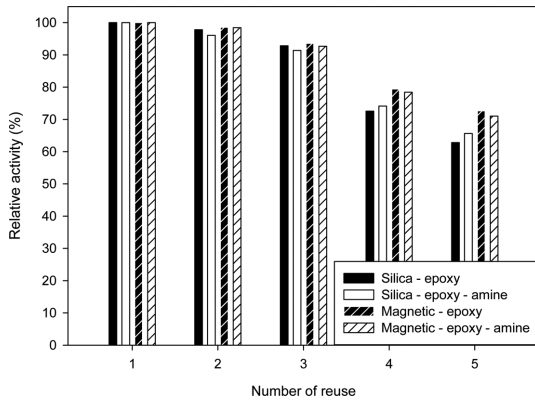


Fig. 5. Stability of lipases immobilized on silica nanoparticles and silica-coated magnetite nanoparticles.

이상의 활성을 유지함을 보였다. 또한, 실리카 나노입자와 실리카 코팅된 자성 나노입자로 나누어 내구성 및 안정성을 비교해 보았을 때, 5 회까지 재사용 후 실리카 나노입자는 63% 정도의 활성을 유지하는 반면 실리카 코팅된 자성 나노입자는 75% 정도의 활성을 유지하는 것으로 실리카 나노입자보다 실리카 코팅된 자성 나노입자가 내구성과 안정성이 우수함을 알 수 있었다.

3.6. Amine group이 부착된 실리카 코팅된 자성 나노입자에서의 효소 활성

3.4 절의 결과로부터 내구성과 안정성이 우수한 실리카 코팅된 자성 나노입자를 지지체로 선정하였으며, 실리카 코팅된 자성 나노입자에 amine group을 부착한 후 cross-linked enzyme aggregate (CLEA) 방법과 공유결합법으로 각각 달리하여 효소를 고정화시킬 때

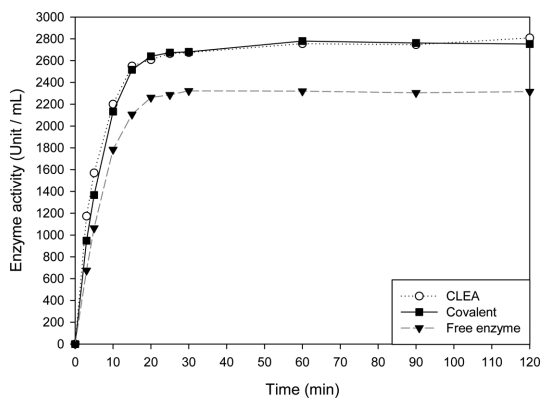


Fig. 6. Hydrolysis activities of immobilized lipases on silica-coated magnetite nanoparticles with amino group.

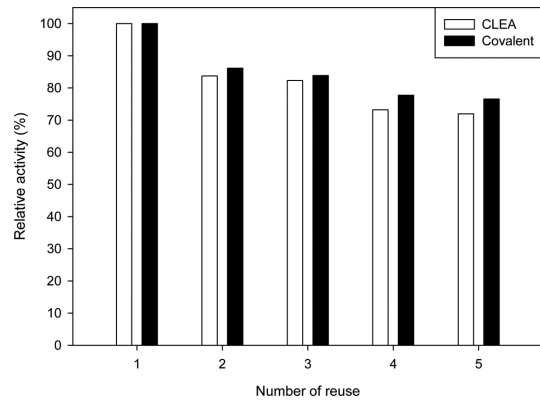


Fig. 7. Stability of lipases immobilized on silica-coated magnetite nanoparticles with amino group.

고정화된 효소의 활성을 측정하였다. Fig. 6에 보인 바와 같이 고정화 방법이 다름에도 불구하고 초기 반응속도와 최종활성이 모두 유사하였고, 자유 효소의 활성과 비교하였을 때 더 높은 활성을 가짐을 알 수 있었다.

3.7. Amine group이 부착된 실리카 코팅된 자성 나노입자에서의 효소 안정성

실리카 코팅된 자성 나노입자에 amine group을 부착한 후 CLEA 방법과 공유결합법으로 각각 다르게 효소를 고정화시킬 때 고정화된 효소의 안정성을 비교하였다. Fig. 7에 보인 바와 같이 3 회에 걸쳐 재사용하였을 때 CLEA 방법과 공유결합법으로 각각 달리하여 amine group이 부착된 실리카 코팅된 자성 나노입자에 고정화한 *Candida rugosa* lipase는 82.31%, 83.87%의 활성을 유지하였으며, 5 회까지 평균 73% 이상의 활성을 유지함을 보였다. 그러나, 5 회까지 재사용 후 CLEA 방법으로 고정화한 *Candida rugosa* lipase는 71.95%의 활성을 유지하는 반면 공유결합법으로 고정화한 *Candida rugosa* lipase는 보다 높은 76.55%의 활성을 유지하는 것으로 보아 CLEA 방법보다 공유결합법이 고정화된 *Candida rugosa* lipase의 안정성에 좋은 효과를 보이는 것을 알 수 있다.

4. 결 론

리파아제의 재사용, 내구성 등의 안정성을 높이기 위해 실리카 나노입자와 실리카 코팅된 자성 나노입자를 효소 고정화를 위한 지지체로 사용하였다. 각 지지체 표면에 효소를 고정화하기 위해 epoxy group,

amine group을 각각 부착시켜 효소 고정화를 진행하였다. 고정화에 적합한 리파아제를 찾기 위해 8가지 종류의 리파아제 가수분해 활성을 측정한 결과 *Candida rugosa* lipase가 가장 높은 활성을 나타내어 이 효소를 표면고정화 방법을 이용하여 지지체에 고정화하였다.

실리카 나노입자 및 실리카 코팅된 자성 나노입자에 epoxy group, amine group을 각각 부착시켜 리파아제를 고정화하여 활성을 측정한 결과, 고정화하지 않은 자유 효소의 초기반응속도가 다소 높았으나, 최종 활성은 부착한 작용기 및 지지체 여부와 상관없이 고정화한 효소의 활성이 유사하게 관찰되어 실리카 나노입자 및 실리카 코팅된 자성 나노입자 지지체에 효소를 고정화 하였을 때 효소 본래의 활성에는 영향을 미치지 않고 고정화됨을 알 수 있었다. 또한 내구성과 안정성 측정을 위한 재사용 실험 결과, 3 회 재사용하였을 때 최초 활성 대비 92% 이상의 활성을 유지하였으며, 5 회까지 평균 69% 이상의 활성을 유지함을 보였다. 또한 실리카 나노입자 및 실리카 코팅된 자성 나노입자 지지체를 비교해 보았을 때, 실리카 코팅된 자성 나노입자의 내구성과 안정성이 우수함을 알 수 있었다.

내구성과 안정성이 우수한 실리카 코팅된 자성 나노입자 지지체에 CLEA 방법과 공유결합법으로 각각 다르게 고정화한 효소의 활성을 측정한 결과, CLEA 방법과 공유결합법으로 고정화한 효소가 자유 효소보다 높은 활성을 가짐을 보였다. 또한 5 회에 걸쳐 재사용하였을 때 공유결합법으로 고정화한 효소의 활성이 CLEA 방법보다 높은 활성을 유지함을 나타내어 CLEA 방법보다는 공유결합법으로 고정화한 효소의 내구성과 안정성이 우수함을 알 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구가 수행되었습니다.

References

1. D. Napierska, L. C. Thomassen, D. Lison, J. A. Martens and P. H. Hoet, *Part Fibre Toxicol.*, **7**(1), 39-71 (2010).
2. R. K. Iler, 'The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica', Wiley, New York, 1979.
3. W. Stber, A. Fink and E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.*, **26**(1), 62-69 (1968).
4. Y.-H. Lee, J.-O. Lee and K.-S. Chun, *Anal. Sci. Technol.*, **23**(6), 579-586 (2010).
5. M. N. V. Ravi Kumar, M. Sameti, S. S. Mohapatra, X. Kong, R. F. Lockey, U. Bakowsky, G. Lindenblatt, H. Schmidt and C. M. Lehr, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **4**(7), 876-881 (2004).
6. I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C. W. Wu and V. S. Lin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**(11), 1278-1288 (2008).
7. M. I. Kim, H. O. Ham, S. D. Oh, H. G. Park, H. N. Chan and S. H. Choi, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **39**(1-4), 62-68 (2006).
8. O. Salata, *J. Nanobiotechnology*, **2**, 3-8 (2004).
9. S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst and R. N. Muller, *Chem. Rev.*, **108**(6), 2064-2110 (2008).
10. C. Sun, J. S. Lee and M. Zhang, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **60**(11), 1252-1265 (2008).
11. P. Xu, G. M. Zeng, D. L. Huang, C. L. Feng, S. Hu, M. H. Zhao, C. Lai, Z. Wei, C. Huang, G. X. Xie and Z. F. Liu, *Sci. Total Environ.*, **424**, 1-10 (2012).
12. A. K. Johnson, A. M. Zawadzka, L. A. Deobald, R. L. Crawford and A. J. Paszczynski, *J. Nanopart. Res.*, **10**(6), 1009-1025 (2008).
13. Y. Sahoo, H. Pizem, T. Fried, D. Golodnitsky, L. Burstein, C. N. Sukenik and G. Markovich, *Langmuir*, **17**(25), 7907-7911 (2001).
14. H. Lee, E. Lee, D. K. Kim, N. K. Jang, Y. Y. Jeong and S. Jon, *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (22), 7383-7389 (2006).
15. H.-L. Liu, S. P. Ko, J.-H. Wu, M.-H. Jung, J. H. Min, J. H. Lee, B. H. An and Y. K. Kim, *J. Magn. Magn. Mater.*, **310**(2), 815-817 (2007).
16. Y. Lee, J. Lee, C. J. Bae, J.-G. Park, H. -J. Noh, J. -H. Park and T. Hyeon, *Adv. Funct. Mater.*, **15**(3), 503-509 (2005).
17. J. W. Lee, Y. J. Lee, H. B. Na, T. Y. Yu, H. Kim, S. M. Lee, Y.-M. Koo, J. H. Kwak, H. G. Park, H. N. Chang, M. S. Hwang, J. G. Park, J. B. Kim and T. H. Hyeon, *Small*, **4**(1), 143-152 (2008).
18. P. Villeneuve, J. M. Muderhwa, J. Graille and M. J. Haas, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **9**(4-6), 113-148 (2000).
19. S. H. Ha, M. N. Lan, S. H. Lee, S. M. Hwang and Y.-M.

- Koo, *Enzym. Microb. Technol.*, **41**(4), 480-483 (2007).
20. S. H. Ha, M. N. Lan and Y.-M. Koo, *Enzym. Microb. Technol.*, **47**(1-2), 6-10 (2010).
21. S. H. Ha, S. H. Lee, D. T. Dang, M. S. Kwon, W.-J. Chang, Y. J. Yu, I. S. Byun and Y.-M. Koo, *Korean J. Chem. Eng.*, **25**(2), 291-294 (2008).
22. W. Tischer and F. Wedekind, *Top. Curr. Chem.*, **200**, 95-126 (1999).
23. J. M. Guisan, 'Immobilization of Enzymes and Cells', 2nd Ed., Humana Press, New Jersey, 2006.
24. M. I. Kim, J. B. Kim, J. W. Kim, S. J. Shin, H. B. Na, T. H. Hyeon, H. G. Park and H. N. Chang, *Micropor. Mesopor. Mater.*, **111**(1-3), 18-23 (2008).
25. M. I. Kim, J. B. Kim, J. W. Lee, H. Jia, H. B. Na, J. K. Youn, J. H. Kwak and A. Dohnalkova, *Biotechnol. Bioeng.*, **96**(2), 210-218 (2007).
26. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
27. D. T. Dang, S. H. Ha, S.-M. Lee, W. -J. Chang and Y.-M. Koo, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **45**(3-4), 118-121 (2007).