

흡착과 포획 방법에 의한 리파아제의 고정화

형희준*, 김의용, 손정훈¹

서울시립대학교 화학공학과, ¹한국생명공학연구원 미생물 기능 연구실
(heejun76@hotmail.com*)

Immobilization of lipases by entrapment and adsorption

Hee-Jun Hyung*, Eui-Yong Kim, Jung-Hoon Sohn¹

Dept. of Chemical Engineering University of Seoul,

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

(heejun76@hotmail.com*)

서론

리파아제(triacylglycerol acylhydrolase. EC. 3. 1. 1. 3.)는 지방을 지방산과 글리세롤로 가수분해하는 생물학적 효소로서 현재 지방산, 식품공업에 많이 사용되고 있다. 대부분의 생물학적 효소는 구형 단백질로 구성되어 있어 물에 쉽게 용해되기 때문에 회분식 공정에서 회수하거나 재사용하기가 매우 힘들뿐 아니라 온도에도 민감하게 반응을 한다. 이러한 문제점을 보완하기 위해서는 효소를 화학적 또는 물리적 방법에 의해 불용성 담체의 표면 또는 내부에 고정화 시켜서 사용하면 보다 높은 반응 효율을 기대할 수 있을 뿐 아니라, 분리나 회수도 간편해 효소를 재사용할 수 있어 경제적으로도 많은 이점을 가질 수 있다.

효소의 고정화에는 크게 공유결합에 의한 화학적인 방법과 흡착이나 기타 다른 물질로 효소를 포괄하는 물리화적인 방법이 있다. 화학적인 고정화 방법은 반응조건이나 반응조작이 복잡하고 비교적 반응이 격렬하기 때문에 고정화 도중 효소가 비활성화 될 수 있는 단점이 있다. 반면에 반데르발스 힘 또는 분산력과 같은 물리적 힘에 의한 흡착이나 미세한 격자 안에 효소를 집어넣는 격자형이나 반투막성의 폴리머 피막으로 효소를 피복하는 마이크로캡슐형과 같은 포괄법은 효소의 활성을 감소시키지 않고 조작도 간단하기 때문에 많이 이용되고 있다.

실험방법

1. Sol-Gel 방법에 의한 고정화

Sol-Gel 과정은 이름이 의미하는 것처럼 콜로이드 부유 상태(Sol)를 만들고, 이 졸의 겔화 과정을 통해 졸을 액체상의 망상조직(Gel)으로 변화시켜 무기질 망상조직을 만드는

과정을 말한다.

4mL의 TMOS(tetramethoxysilane)에 물0.2mL과 5 μ l의 40mM HCl을 시험관에 넣고 균일하게 잘 섞어 준다. 그런 다음 이 혼합액을 4°C로 냉장 시킨 후, phosphate buffer 1 mL을 첨가시키고, buffer에 녹인 리파아제(*Candida rugosa*) 용액 1mL을 첨가시키고 잘 교반한다. 위의 용액을 Celite 545 담체 1 g과 잘 섞은 다음 실온에서 하루 건조시키고 다시 냉동건조 시킨 후 덩어리를 막자 사발에 넣고 파쇄하여 사용하였다(1).

2. 흡착에 의한 고정화

Amberlite XAD-7 resin을 메탄올과 sodium phosphate buffer로 씻은 다음 버퍼용액과 함께 37°C에서 1시간 교반 후 필터로 걸러 준다. 준비된 리파아제 용액을 전처리가 끝난 resin에 첨가하고 이를 37°C, 200rpm으로 shaking incubator에서 8시간 동안 흡착시킨다. 위의 용액을 filtration한 후 다시 냉동건조 시켜 리파아제를 흡착성을 가지고 있는 resin에 고정화 시켰다(2).

3. 효소의 활성도 분석 및 전환율 계산방법

효소의 활성도는 p-nitrophenyl palmitate (pNPP) 방법을 이용하여 분석하였고, biodiesel의 분석은 Gas chromatography을 이용하여 분석하였다. 또 hydrolysis 반응의 전환율은 전환된 자유지방산의 양을 측정하여 계산하였으며, 자유지방산의 전환율은 적정을 통한 산가 측정법인 KSM 0065방법을 통하여 이루어 졌고 계산은 아래식으로 하였다.

$$\text{Acid value} = \frac{B \times F \times 5.611}{S}$$

B : Titration volume (mL)
F : 0.1N KOH-EtOH concentration factor
S : Sample weight(g)

결론

Sol-Gel 방법에 의하여 리파아제가 고정화 되었는지 확인하기 위하여 SEM(Scanning Electron Microscopy)사진을 찍어 보았다. 왼쪽의 사진이 고정화 하기 전의 Celite545 사진이며 오른쪽이 Sol-Gel 고정화를 마친 후의 사진이다. 사진에서 알 수 있듯이 Celite 표면에 고정화된 리파아제가 피복되어 있는 것을 알 수 있다.

Celite545에 고정화된 리파아제를 재사용했을 때 효소의 활성도를 알아보기 위하여 식물성 오일에 물을 첨가하여 지방산을 생산하는 반응을 수행하였다. Hydrolysis 반응을 시킨 후 리파아제를 회수하여 다시 새로운 반응을 6번 반복해 실험한 결과 시간에 따른 전환율이 처음 반응에 비해 거의 감소하지 않았다. Sol-Gel 방법에 의해 고정화된 리파아제는 가수분해 반응에 재사용했을 때 리파아제 활성도가 감소되지 않았으며, 효소의

재사용에 있어서도 좋은 결과를 가져왔다(Table 1.).

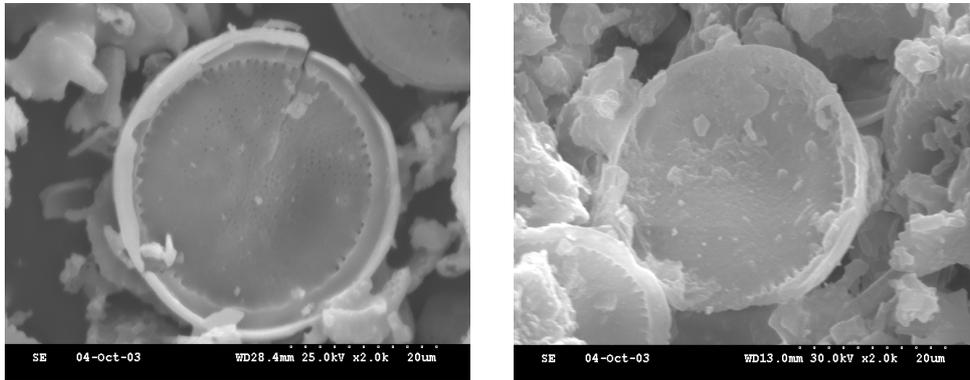


Figure 1. Sol-Gel 방법에 의한 고정화 전후의 SEM 사진

Table 1. Reuse of immobilized lipase for hydrolysis reaction

	Hydrolysis Conversion (%)		
	2 hr	4 hr	10 hr
First reaction	49.5	72.3	98.5
Second reaction	47.5	71.6	97.7
Third reaction	46.2	69.9	96.9
Fourth reaction	43.5	69.8	96.8
Fifth reaction	42.6	67.3	95.5
Sixth reaction	43.2	68.2	94.7

흡착에 의한 리파아제의 고정화 실험을 위하여 여러 종류로부터 추출된 리파아제를 동일한 활성도를 가진 수용액으로 만든 후 Amberlite XAD-7 resin에 흡착 시켰다. 리파아제 종류에 따라 초기 흡착량의 차이는 있었으나 일정시간이 지난 후에는 모든 리파아제가 99% 이상의 높은 흡착율을 보였다(Table 2.). 또한 *Thermomyces lanuginosus*로부터 추출된 리파아제를 농도를 달리해서 흡착 시켜본 결과 리파아제의 농도가 60%에서도 8 시간 동안 흡착시키면 99% 이상 높은 흡착율을 보였다(Table 3.).

Amberlite에 흡착된 리파아제를 식물성 오일과 메탄올을 반응시켜 바이오 디젤을 생산하는 공정에 이용해본 결과 3번의 재 사용을 통해서 모두 70% 이상의 높은 전환율(A)을 보였을 뿐만 아니라 리파아제의 손실 없이 쉽게 회수 할 수 있었다. 또한 초기에 증가하던 hydrolysis 반응(B)도 시간이 지남에 따라 감소해 지방산이 점차 바이오 디젤로 전환 되는 것을 알 수 있었다.

Table 2. Adsorption yield for different lipase

Lipase	Time	Adsorption yield (%)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1 (hr)	99.4
	4 (hr)	99.7
	8 (hr)	99.8
<i>Bacillus stearothermo-philus</i>	1 (hr)	91.8
	4 (hr)	96.6
<i>Candida rugosa</i>	1 (hr)	99.5
	4 (hr)	99.7
	8 (hr)	99.9
<i>Candida cylindracea</i>	1 (hr)	98.9
	4 (hr)	99.3
	8 (hr)	99.8

Table 3. Adsorption yield for different lipase concentration

Lipase concentration	Time	Adsorption yield (%)
10 (%)	1 (hr)	99.3
	4 (hr)	99.9
20 (%)	1 (hr)	98.6
	4 (hr)	99.5
30 (%)	1 (hr)	97.5
	4 (hr)	99.3
40 (%)	1 (hr)	96.2
	4 (hr)	98.1
	8 (hr)	99.9
60 (%)	1 (hr)	91.7
	4 (hr)	96.7
	8 (hr)	99.8

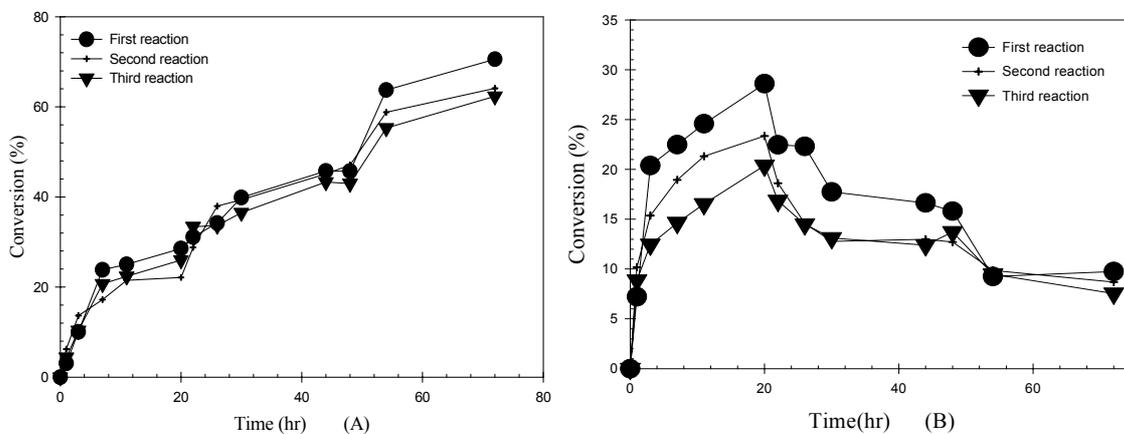


Figure 2. Reuse of immobilized lipase by adsorption

참고 문헌

1. Koei Kawakami, Shigehiro Yoshida : Thermal Stabilization of Lipase by Sol-Gel Entrapment in Organically Modified Silicates Formed on Kieselguhr. *J. Fermentation and Bioengineering*. (1996) 82, 239-245
2. A. Roy, H.P.S. Chawla : Biocatalysis in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. (2001) 29,490-493