



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2020년 8월  
석사학위논문

효소 고정화를 위한 PDMS  
기반 폴리아닐린 나노섬유  
제조 및 응용

조선대학교 대학원

화학공학과

이 란 희

효소 고정화를 위한 PDMS  
기반 폴리아닐린 나노섬유  
제조 및 응용

Development and Application of PDMS-based  
Polyaniline Nanofibers for Enzyme  
Immobilization

2020년 8월 28일

조선대학교 대학원

화학공학과

이 란 희

효소 고정화를 위한 PDMS  
기반 폴리아닐린 나노섬유  
제조 및 응용

지도교수 이 중 현

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2020년 5월


조선대학교 대학원

화학공학과

이 란 희

## 이란희의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이정수 

위원 조선대학교 교수 안성훈 

위원 조선대학교 교수 이중현 

2020년 6월

조선대학교 대학원

## 목 차

<b>List of Tables</b> .....	<b>v</b>
<b>List of Figures</b> .....	<b>vi</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>viii</b>
<b>Abbreviations</b> .....	<b>x</b>
<b>제1장 서론</b> .....	<b>1</b>
제1절 연구 배경 .....	1
제2절 문헌 배경 .....	3
1. 효소 고정화 .....	3
가. 흡착법 .....	3
나. 공유결합법 .....	4
다. 가교결합법 .....	4
2. 고정화 효소의 응용 .....	5
가. 고정화된 Lipase .....	5
나. 고정화된 $\beta$ -Galactosidase .....	5
다. 효소 고정화 담체로서 나노섬유의 이용 .....	6
3. 전기방사 된 나노섬유의 특성 .....	8
4. PDMS 적용 .....	9
5. Polyaniline 합성 .....	9
6. Microreactor .....	12

<b>제2장 실험재료 및 방법</b> .....	<b>13</b>
제1절 실험 재료 .....	13
제2절 Polyaniline 합성 .....	14
1. Polyaniline Nanofibers 제조 .....	14
2. Emeraldine Base 제조 .....	14
3. Alkyl group으로 doping된 PANI .....	16
4. Polyaniline 분석 .....	17
가. Polyaniline FT-IR 분석 .....	17
나. SEM 분석 .....	17
다. Polyaniline의 용해성 평가 .....	17
제3절 나노섬유 담체 제조 .....	18
1. PDMS 마이크로패턴 제조 .....	18
2. 전기방사 고분자 용액 제조 .....	19
가. PVDF-HFP Solution 제조 .....	19
나. PVdF-HFP/PANI Blending 용액 제조 .....	19
3. 전기방사 조건 .....	20
4. Polyaniline 나노 섬유 분석 .....	22
가. PVdF-HFP/Polyaniline 나노섬유 FT-IR 분석 .....	22
나. SEM 분석 .....	22
제4절 효소 고정화 .....	23
1. 효소 고정화 방법 .....	23
2. 효소 활성 측정 .....	25
제5절 담체 안정성 평가 .....	27
1. pH와 열에 대한 효소 안정성 .....	27
2. 장기 저장성과 재사용성 .....	27

제6절 Microreactor 공정 최적화 .....	28
1. Microreactor 설계 .....	28
2. 반응 조건 최적화 .....	29
3. 연속 흐름 반응 .....	29
제7절 $\beta$ -Galactosidase 고정화 .....	30
1. 효소 고정화 방법 및 활성 측정 .....	30
가. $\beta$ -Galactosidase 고정화 방법 .....	30
나. $\beta$ -Galactosidase 활성 측정 .....	30
2. pH와 열에 대한 효소 안정성 .....	31
3. 장기 저장성과 재사용성 .....	31
4. Microreactor에 적용 .....	31
<b>제3장 결과 및 고찰 .....</b>	<b>32</b>
제1절 Polyaniline Nanofibers .....	32
1. Polyaniline의 FT-IR 분석 .....	32
2. SEM 분석 .....	35
3. Polyaniline의 용해성 .....	36
제2절 PVdF-HFP/PANI 나노섬유 제조 .....	37
1. 나노섬유 Morphology 분석 .....	37
2. 나노섬유 FT-IR 분석 .....	41
제3절 고정화 효소 특성 .....	44
1. Polyaniline 농도에 따른 효소 고정화 결과 .....	44
2. pH와 열에 따른 효소 안정성 평가 .....	47
가. pH 안정성 측정 .....	47



나. 열 안정성 측정 .....	49
3. 장기저장성과 재사용성 평가 .....	51
가. 재사용 안정성 측정 .....	51
나. 장기저장 안정성 측정 .....	53
제4절 Microreactor .....	56
1. 체류시간에 따른 전환율 .....	56
2. Microreactor 조건 최적화 .....	58
3. 효소 연속 반응 운전 안정성 .....	61
제5절 $\beta$ -Galactosidase 고정화 .....	64
1. pH와 열에 대한 안정성 .....	64
2. 재사용과 저장 안정성 .....	66
3. Microreactor 조건 최적화 .....	68
4. 연속 반응 안정성 .....	70
<b>제4장 결론 .....</b>	<b>72</b>
<b>Reference .....</b>	<b>74</b>

## List of Tables

Table 1. The applications of nanofibers supports in enzyme immobilization .....	7
Table 2. List of dopants and their chemical structure .....	11
Table 3. Electrospinning conditions for developing nanofibers .....	20
Table 4. Lists of IR absorption peaks of PANI, PANI-AMPSA and AMPSA .....	34
Table 5. Comparision of absorption peaks in PVdF-HFP and PVdF-HFP/PANI (20 wt%)	43
Table 6. Immobilized lipase activity and yield for the different PANI concentration .....	45

## List of Figures

Figure 1. Schematic view of electrospinning process. ....	8
Figure 2. Chemical structures of polyaniline and its most common forms. ....	10
Figure 3. Synthesis of polyaniline emeraldine salt and emeraldine base. ....	15
Figure 4. Synthesis of (A) PANI-EB and (B) PANI-AMPSA. ....	16
Figure 5. Nanofiber morphology with increasing polyaniline concentration. ....	19
Figure 6. Schematic diagram of the electrospinning method. ....	21
Figure 7. Standard curve for the determination of protein concentration. ....	24
Figure 8. Reaction scheme of <i>p</i> -nitrophenyl butyrate ( <i>p</i> -NPB) hydrolysis in the presence of Lipase. ....	25
Figure 9. Standard curve for the determination of <i>p</i> -nitrophenol concentration. ....	26
Figure 10. Schematic diagram of microreactor system. ....	28
Figure 11. Reaction scheme of <i>o</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) hydrolysis in the presence of $\beta$ -Galactosidase. ....	30
Figure 12. Fourier transform infrared (FTIR) spectra of PANI-EB, PANI-AMPSA and AMPSA. ....	33
Figure 13. SEM images of pure PANI and AMPSA-doped PANI. (A) PANI, (B) PANI-AMPSA. ....	35
Figure 14. PANI-EB, PANI-ES and PANI-AMPSA in solvent. ....	36
Figure 15. SEM images and size distribution of electrospun fibers prepared with an 14 wt% PVdF-HFP solution and PANI-AMPSA at (A) 0 wt%, (B) 5 wt%, (C) 10 wt% and (D) 20 wt%. ....	38
Figure 16. Fiber diameter distribution for the different PANI concentration : (A) 0 wt%, (B) 5 wt%, (C) 10 wt% and (D) 20 wt%. ....	39
Figure 17. The changes of average diameters for the different polyaniline concentration. ...	40
Figure 18. Fourier transform infrared (FTIR) spectra of PVdF-HFP and PVdF-HFP/PANI (20 wt%). ....	42
Figure 19. The effect of various nanofiber on immobilization yields. ....	46

Figure 20. Effect of pH on the activity of free and immobilized lipase. ....	48
Figure 21. Effect of temperature on the activity of free and immobilized lipase. ....	50
Figure 22. Effect of enzyme recycle on the activity of immobilized lipase. ....	52
Figure 23. Stability of free lipase and immobilized lipase while storing at (A) 4°C and (B) 25°C. Polyaniline concentration : 0, 5, 10 and 20 wt%. ....	54
Figure 24. Residual activity of immobilized lipase after 2 months storage at 4°C and 25°C. ....	55
Figure 25. Effect of residence time on conversion using immobilized lipase microreactor. ....	57
Figure 26. Effects of flow rate on the conversion and productivity. Reaction conditions : temperature 25°C, substrate concentration 0.1 mM. ....	59
Figure 27. Conversion of <i>p</i> -NPB in a batch (○) and in a miniaturized continuous flow reactor (●). Reaction conditions : substrate concentration 0.1 mM <i>p</i> -NPB, temperature 25°C, 200rpm (for the batch reaction). ....	60
Figure 28. Effects of operation time and temperature on conversion. Reaction conditions: temperature 25, 60 and 70°C, flow rate 4 mL/min, substrate concentration 0.1 mM. ....	62
Figure 29. Effects of operation time on conversion. Reaction condition : temperature 25°C, flow rate 4 mL/min, substrate concentration 0.1 mM. ....	63
Figure 30. Effect (A) pH and (B) temperature on the activity of free $\beta$ -Galactosidase (●) and immobilized $\beta$ -Galactosidase(■). ....	65
Figure 31. (A) Effect of enzyme recycle on the activity of immobilized $\beta$ -Galactosidase. (B) Stability of free (▲) and immobilized (●) $\beta$ -Galactosidase while storing at 4°C and 25°C. ....	67
Figure 32. Effects of flow rate on the conversion and productivity. Reaction conditions : temperature 25°C, substrate concentration 0.1 mM. ....	69
Figure 33. Effects of operation time on conversion. Reaction conditions: temperature 25°C flow rate 3 mL/min, substrate concentration 0.1 mM. ....	71

## ABSTRACT

### Development and Application of PDMS-based Polyaniline Nanofibers for Enzyme Immobilization

Lee, Ran-hee

Advisor : Prof. Lee, Jung-heon, Ph.D.

Department of Chemical Engineering,

Graduate School of Chosun University

Nanofibers with high surface area to volume ratio were prepared using polyaniline (PANI) and the surface of electrospun poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene) (PVdF-HFP) was coated with them for enzyme immobilization. In order to overcome the low solubility of PANI, 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPSA) and 4-dodecylbenzenesulfonic acid (DBSA) with long alkyl chains were used to resolve PANI. Since the viscosity increased rapidly with the addition of PANI, the PANI concentration was limited to a maximum of 20 wt% for electrospinning. In order to control the size and handle the fiber carrier easily, nanofibers were electrospun on the surface of micropatterned polydimethylsiloxane (PDMS) and used as an enzyme reactor for immobilization. PVdF-HFP/PANI was incorporated into a microfluidic device consisting of a reaction chamber with inlet and outlet flows. It has been found that polyaniline can be used as an additive to improve the enzymatic activity and stability of nanofibers. The presence of amine groups in PVdF-HFP/PANI nanofibers confirmed improved enzyme activity and stability, pH, thermal stability, good reuse and long-term storage.

The immobilized lipase and  $\beta$ -galactosidase showed excellent reusability even after 10 cycles of reaction and the residual activities of them were over 90% and 60%, respectively. The PVdF-HFP/PANI/Lipase showed enhanced enzyme catalytic performance at a residence time of 7.8 s using microreactor. 27.1% of *p*-nitrophenol conversion and 12.3 mol/h·L of

productivity were achieved with 0.1 mM of *p*-NPB. PVdF-HFP/PANI/Lipase retain over 75.2% of their initial activity after 65 days. The PVdF-HFP/PANI/ $\beta$ -galactosidase microreactor showed enhanced catalytic performance at a residence time of 10.4 s. 27.4% of *o*-nitrophenol conversion and 9.4 mol/h·L of productivity of were achieved with 0.1 mM of ONPG. The enzyme reaction rates using developed microreactor increased 1081.3 times for lipase and 248.7 times for  $\beta$ -galactosidase more than those with batch reactor.

Key word : Polyaniline, PVdF-HFP, PDMS, Electrospinning, Immobilization, Enzyme, Lipase,  $\beta$ -Galactosidase, Microreactor

## Abbreviations

AMPSA	2-Acrylamido-2-methyl-1-propanulfonic acid
DBSA	4-Dodecylbenzenesulfonic acid
EAPC	Enzyme adsorption, precipitation, and crosslinking
EB	Emeraldine base
ES	Emeraldine salt
GA	Glutaraldehyde
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
PANI	Polyaniline
PDMS	Polydimethylsiloxane
<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -Nitrophenyl butylate
PVdF-HFP	Poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene)

# 제1장 서론

## 제1절 연구 배경

효소 고정화는 효소 활성, 안정성 및 저장 수명을 증가시키고 천연 생 촉매의 응용을 넓히는데 중요한 역할을 한다. 효소 고정화에 사용되는 담체는 불안정한 pH 및 온도 조건, 재사용, 저장 안정성에서 효소를 보호 할 수 있다 [1].

최근에 나노구조로 된 재료를 사용한 효율적인 효소의 고정화가 입증되었다. 효소 고정화를 위해 사용되는 재료들은 나노섬유 [2], Polymeric Monolith [3], Mesoporous materials [4], Nanotubes [5], Membrane [6], 셀룰로오스 [7] 등과 같이 큰 표면적을 가진다. 이와 같은 재료는 Enzyme loading 증가와 반응속도를 촉진시킴으로써 산업 응용을 위한 바이오촉매의 효율을 향상 시킨다 [8]. 그중에서 나노섬유는 높은 비 표면적, 섬유 간 다공성, 용이 한 취급 및 우수한 기계적 강도로 인해 가장 바람직한 지지체 중 하나이다. 이와 관련하여, 특히 전기 방사 된 나노 섬유 물질에 효소를 고정화 하는 것에 대한 과학적 및 산업적 관심이 증가하고 있다 [2, 9].

전기방사는 폴리머를 Blending하여 복합 재료를 제조할 수 있는 효과적인 방법 중 하나다 [10]. 최근 전기방사에 의한 섬유 구조의 다양화는 Janus [11], Twisted [12], Core-shell [13] 공학에 의해 표시되어 있다. 이러한 구조 이외에 더 큰 접촉 면적을 나타내는 비드 섬유도 유망한 구조로서 등장하였다 [14, 15]. 전기 방사 섬유는 높은 다공성 및 나노-마이크로 구조로 인해 높은 표면적 대 부피 비를 나타낸다. 이는 효소의 촉매작용을 증가시키며, 고정화 된 효소의 방출을 막는데 유리하다 [16].

나노섬유 제조에 많은 폴리머의 가능성이 조사되었으며, 그 중에서 PVdF-HFP는 높은 안정성, 우수한 성형성, 낮은 유리전이온도 및 결정화도로 다른 폴리머 중합체를 첨가하는 변형에 초점이 맞춰진 고분자이다 [17]. 하지만 효소 고정화 담체로 사용하기 위해서는 섬유 표면에 효소가 결합할 수 있는 작용기가 존재해야 한다. 따라서 고정화 담체에 대한 대안적 방법으로 아민 그룹(-NH)이 풍부한 PANI를 Blending 폴리머로 선택하였으며, 낮은 불용성을 해결하기 위해 도판트(유기산화제)를 도입하여 PANI의 용해성을 높였다 [18]. 또한 제조된 나노섬유를 효소 고정화 담체로 사용하기 위해 PDMS로 마이크로 패턴의 얇은 메쉬(mesh)를 제조한 뒤, 프레임으로 적용하여 크기 제어의 용이성을 높이고 용액 상에서 컨트롤하기 쉽도록 하였으며, Microreactor 내에 안정적으로 위치하도록 하며, 효소반응 측정 중 나노섬유 지지체의 손상이 일어나지 않



도록 하였다.

본 연구에서는 전기 방사 기술에 의해 PVdF-HFP 폴리머 용액에 PANI를 Blending하여 나노섬유를 제조하여 효소 고정화 지지체로서 응용 가능성을 확인하였다. 얻어진 나노섬유의 형태적 및 구조적 특성을 주사 전자 현미경(SEM), 푸리에-변환 적외선 분광법(FT-IR)에 의해 조사하였다. 고정화 효소로 Lipase (from *Aspergillus niger*)와  $\beta$ -Galactosidase (from *Kluyveromyces lactis*)를 선정하였으며 효소의 활성은 다양한 pH 및 온도, 재사용성, 장기저장성, 연속 사용성으로 연구되었으며, Microreactor에 적용하여 기질과 효소의 손실을 최소화하고 빠른 반응속도와 높은 전환율로 고순도의 제품을 낮은 운전비용으로 얻을 수 있다. 또한, PVdF-HFP/PANI 복합 나노섬유는 높은 전도성소재로서 효소 고정화 기술과 더하여 생물의학, 생물 전자공학, 바이오 촉매, 바이오센서 등의 분야에서 활발히 연구될 것으로 기대된다.

## 제2절 문헌 배경

### 1. 효소 고정화

효소는 생촉매로서 화학촉매에 비해 환경 친화적이고 기질특이성이 뛰어나며 생성물의 순도가 매우 높다. 그러나 주변 환경에 활성이 불안정하며, 가격이 비싸고 회수가 불가능하여 재사용이 어렵기 때문에 산업적 이용에 한계점을 가지고 있다. 이러한 효소의 문제점을 극복하기 위해 효소 고정화 기술이 연구되고 있다. 하지만 효소가 촉매 작용하기 위해 몇 가지 아미노산 잔기로 구성된 활성부위가 필요하다. 따라서 효소가 고정화된 상태에서 촉매작용을 발현하기 위해 아미노산 잔기가 변하지 않으면서 효소의 3차 구조가 유지되어야 한다 [19]. 고정화 효소는 활성이 떨어지는 단점이 있지만 산업현장에서 편리하게 사용가능하며, 반복사용이 가능하고, 생성물에서 효소를 분리할 수 있어 효소의 단가를 낮출 수 있다. 또한 유기용매에서의 반응과 고온 반응, 불안정한 pH 등에서 효소의 안정성을 증대시킬 수 있어서 다양한 시스템 개발이 가능하다 [20]. 따라서 효소를 불용성 고체 지지체에 고정하여 물리 화학적으로 쉽게 분리하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 효소 고정화 방법은 크게 흡착법, 공유결합법, 가교결합법 등이 있다.

#### 가. 흡착법

효소나 지지체의 화학적 개질 과정이 필요하지 않아 매우 간단하고, 효소의 구조를 크게 변형시키지 않아 효소의 활성을 잘 유지할 수 있다는 장점을 가지고 있지만, 가장 큰 문제점은 반응 중에 효소가 지지체로부터 떨어져 나올 수 있어 산업적 이용에 한계가 있다는 점이다 [21]. 흡착법은 반데르발스 힘(van der Waals force), 소수성 상호작용 또는 분산력 같은 약한 힘에 의해 담체 표면에 효소를 고정화한다. 흡착법은 고정화 지지체에 화학적 개질이 필요하지 않아 매우 간단하며, 비용이 적게 들고, 화학적 첨가제가 사용되지 않아 효소의 구조가 크게 변형되지 않고 활성이 유지된다는 장점이 있다. 그러나 반응 중에 효소가 떨어져나갈 가능성이 높아 산업적 이용에 한계가 있다 [22, 23].

## 나. 공유결합법

고체 지지체에 대한 공유 결합에 의한 고정화 방법은 생축매 공정 동안 효소와 담체 사이의 강한 상호 작용의 이점을 가져 효소를 매우 안정적으로 만든다. 결합이 가능한 작용기는 아미노기, 카르복실기, 하이드록시기, 페닐기 및 이미다졸기 등이 있다. 공유 결합법은 효소의 특이성과 높은 축매 활성을 유지하며, 효소를 고정화하는데 비용이 적게 든다. 그러나 공유 결합법은 제조 조건이 엄격하고 고정화 공정 동안 효소의 활성을 잃을 수 있고 일부 커플링 시약(Coupling reagent)에 독성이 있다는 단점이 있다 [24, 25].

## 다. 가교결합법

효소를 화학적으로 지지체에 결합시키는 방법으로 Glutaraldehyde (GA)와 같은 Crosslinking reagent를 이용한 방법이다. 지지체 표면의 작용기와 효소가 갖는 작용기를 GA로 아민기를 활성화 시켜 효소와 담체 사이를 매우 단단하게 가교하여 외부 환경이 변화하더라도 효소가 떨어져 나갈 가능성이 거의 없어 재사용성이 높지만, 강하게 결합되어 결합 후 효소 활성을 감소시킬 수 있고, 지지체 표면을 효소와 결합할 수 있는 형태로 개질시켜야 한다는 단점을 갖고 있다 [26, 27]. 이러한 단점에도 불구하고 산업적 측면에서 가장 중요하게 여기는 높은 안정성과 재사용성을 갖고 있기 때문에 연구가 활발하게 진행되고 있다.

## 2. 고정화 효소의 응용

### 가. 고정화된 Lipase

Lipase는 유지나 지방의 가수분해 반응, 알코올분해 반응, 에스테르화 반응, 에스테르 교환반응을 촉매 할 수 있는 효소이다 [28]. Lipase가 촉진할 수 있는 반응들은 계면활성제, 지방 또는 유지의 분해, 의약품, 바이오디젤 및 화장품 생산 등의 다양한 분야에 사용되어 산업적으로 큰 관심을 받고 있다. 많은 생물공정에서 고순도의 바이오디젤을 얻기 위한 촉매로 고정화 Lipase를 사용하여 반응의 선택성과 효율성을 증가시키고 있다[29].

최근 Lipase를 고정화한 연구는 친수성인 Poly(vinyl alcohol) (PVA)와 소수성을 띠는 Polylactic acid (PLA) 나노섬유에 고정화한 결과 PLA에 고정화한 Lipase가 더 높은 활성, 우수한 선택성 및 안정성을 나타냈으며, 10회 재사용후에도 80%이상 보존하였다 [30]. 또한 Lipase의 높은 활성 및 안정한 공유 고정화를 위해 에폭시기 및 친수성 폴리에틸렌 옥사이드(PEO) 사슬을 함유하는 전기 방사 된 나노 섬유막 (P(GMA-co-MA)-g-PEO)을 제조하여 에폭시기와 Lipase를 고정화하였다. 그 결과 150 mg/g의 높은 효소 로딩과 0.673 U/mg의 최대 활성을 달성하였다 [31].

### 나. 고정화된 $\beta$ -Galactosidase

$\beta$ -Galactosidase는 중합체, 올리고당 또는 2차 대사 산물로부터 D-galactosyl 잔기를 가수분해하며, 유제품 산업에서 가장 큰 관심을 갖는 효소 중 하나이다. 그것은 대부분의 동물, 식물 및 미생물에 의해 생산된다.  $\beta$ -Galactosidase는 유당에서 단당류, 글루코스 및 갈락토스로 생체 내 가수 분해를 촉매한다 [32]. 또한 갈락토스를 갖는 서로 다른 당류의 가수 분해 또는 올리고당의 생합성과 같은 몇 가지 새로운 적용이 과거에 제안되어왔다.  $\beta$ -Galactosidase의 두 가지 주요 용도는 유당 불내증 환자를 위한 유제품에서 유당 제거와 효소 처리하여 유제품의 단맛, 용해도, 풍미 및 소화성을 향상시킨 제품 생산이 있다 [33].

최근 연구된  $\beta$ -Galactosidase 고정화는 화학적으로 변형 된 폴리스티렌 나노 섬유 (PSNF)에 효소 고정화를 위한 작용기를 도입하기 위해  $\text{HNO}_3$  처리하여 카르복실기와 히드록실기를 생성 후  $\beta$ -Galactosidase를 고정화하였다. 그 결과 1분 체류시간에 41% 갈락토올리고당 수율과 88%의 유당 전환율이 달성되었다 [9]. 또한 폴리메타크릴레이트

모노리스에  $\beta$ -Galactosidase의 고정화에 대한 가교제 영향을 연구한 결과 0.05% GA를 사용한 경우 최대 효소 활성 0.8 U을 나타냈다 [34].

#### 다. 효소 고정화 담체로서 나노섬유의 이용

나노 섬유는 높은 다공도, 상이한 구조의 이용 가능성, 생체 적합성, 생분해성, 친수성, 무독성과 같은 많은 기능적 및 구조적 장점으로 인해 효소 고정화 가능성이 매우 높으며, 효소의 3 차원 구조를 보호한다 [9].

현재까지 나노섬유를 효소 지지체로 사용한 연구를 살펴보면 PVdF-HFP에 Lipase를 고정화하기 위해 1,4-Diaminobutane (DA)와 Epichlorohydrin (EPI) 리간드를 나노섬유 표면에 부착하였으며, 그 결과 열 안정성 실험에서 효소활성이 안정적이었고 탈착 비율도 감소하였다 [35]. 또 PVdF와 ZIF-8 (zeolitic imidazolate framework)을 간단하게 물리적으로 blending하여 제조한 나노섬유는 ZIF-8을 첨가함으로써 흡착능력을 향상시켜 효소 촉매로서 기능을 입증하였다 [36]. 그밖에 Poly(acrylic acid)/MWCNTs 나노복합섬유를 제조하여 Acetylcholinesterase (AChE)를 고정화하였더니 10회 재사용 후에 90% 이상 유지하였으며 [37], PVdF-HFP에 이온빔을 조사하거나 [38], Polyethersulfone 나노섬유에 플라즈마 처리를 통해 소수성 섬유표면을 친수성으로 개질하여  $\alpha$ -amylase를 고정화한 연구 [39]와 PVA에  $Zn^{2+}$ 를 첨가하여 효과적인 효소고정화 지지체로 입증하였다. PVA와 금속이온 사이의 화학적 상호작용으로 인해 효소의 안정성이 증가하였고, 18회 재사용후에도 50%의 활성을 유지하였다 [40]. 이처럼 현재 나노섬유를 효소고정화 담체로 이용하기 위한 많은 연구가 진행 중이며, 앞으로의 동향을 보아 그 수는 점점 늘어날 것으로 예상된다 (Table 1).

Table 1. The applications of nanofibers supports in enzyme immobilization

Support	Enzyme	Functional reagent	Immobilization method	Ref.
Poly(lactic acid)	Lipase	-	Adsorption	[30]
Poly(glycidyl methacrylate-co-methylacrylate)-g-polyethylene oxide	Lipase	Epoxy groups, Polyethylene oxide	Covalent binding	[31]
Poly(vinyl alcohol)	Lipase	Zn <sup>2+</sup>	Adsorption, Cross-linking	[40]
Poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene)	Lipase	1,4-Diaminobutane, Epichlorohydrin	Covalent binding	[35]
Polystyrene nanofibers	$\beta$ -Galactosidase	HNO <sub>3</sub>	Covalent binding	[9]
Polymethacrylate monolith	$\beta$ -Galactosidase	Glutaraldehyde, hexamethylene diisocyanate	Cross-linking	[34]
Poly(vinylidene fluoride)	Cellulase	Zeolitic imidazolate framework (ZIF-8)	Adsorption	[36]
Poly(acrylic acid)/Multi-walled carbon nanotube	Acetylcholinesterase	3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES), glutaraldehyde	Cross-linking	[37]
Polyethersulfone	$\alpha$ -Amylase	Oxygen plasma treatment, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)	Covalent binding	[39]

### 3. 전기방사 된 나노섬유의 특성

나노 기술은 원자나 분자들이 적층된 정도의 미세한 사이즈의 물질을 다루는 기술로 형태학적인 특성에 기인한 물리적, 화학적인 장점을 활용한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 섬유 제조방법을 이용할 경우 얻어지는 섬유의 직경은 보통 1  $\mu\text{m}$  이상이지만 전기방사(Electrospinning)법을 이용하면 고전압 전기장 내에서 폴리머 용액을 분사하여 20 nm에서 100  $\mu\text{m}$ 스케일의 직경을 가지는 연속 중합체 섬유를 얻을 수 있으며, 기존에 알려진 방법(주형 합성, 자기조립, 상분리)보다 접근이 쉽고 제한이 적다 [41]. 전기방사 기술은 양전하 또는 음전하를 띠는 고분자를 반대 전하를 띤 기관으로 쏘는 원리를 이용한다 (Figure 1). 방사 용액은 천연 폴리머, 합성 폴리머 및 무기물 등 광범위하게 사용 가능하며 고분자 용액 농도, Blending 비율, 후 처리 공정을 조합하여 다양한 특성으로 섬유를 제조할 수 있다. 전기 방사 공정의 변수 중 전압, 팁과 콜렉터 사이의 거리(TCD), 콜렉터 회전 속도, 온도, 습도는 제조되는 섬유의 형태를 결정하는 중요한 요인이다 [42]. 전기방사로 제조된 나노섬유는 다른 형태의 섬유에 비하여 직경이 작고 매우 높은 비 표면적을 갖으며, 3차원 웹 형태를 얻을 수 있어 효소와 상호 작용에 큰 이점으로 작용하며 멤브레인, 촉매, 슈퍼 캐패시터, 센서, 조직 공학에 적용할 수 있다 [43, 44].

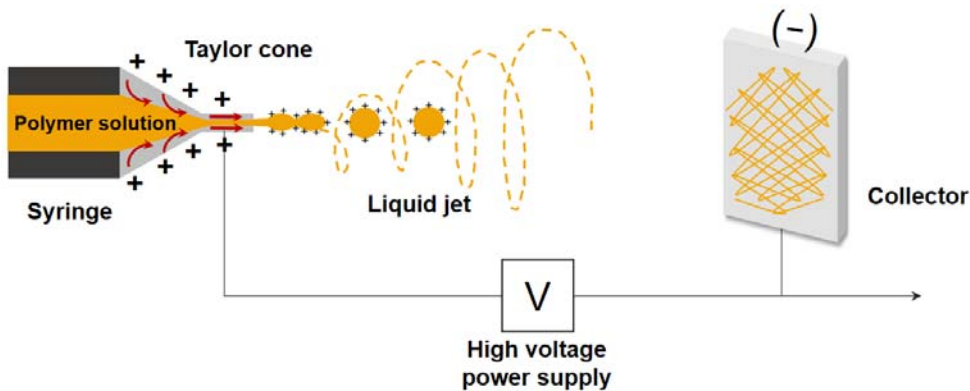


Figure 1. Schematic view of electrospinning process.

## 4. PDMS 적용

Polydimethylsiloxane (PDMS)은 센서, 미세 유체 장치 및 트랜듀서와 같은 다양한 응용 분야에 광범위하게 적용된다. PDMS는 광학적 투명성, 상대적으로 낮은 모듈러스, 높은 유연성, 생체 적합성과 같은 장점을 갖는다 [45, 46]. 고분자 탄성 재료로 이루어져 단열 능력이 우수하며, 소형화를 효과적으로 이룰 수 있다. 또한 재료 원가가 저렴하고, 여러 층의 적층이 쉬우며, 대량 생산이 가능하고 제작비용을 크게 낮출 수 있다 [47]. 또한 PDMS는 수용성 용매가 침투하여 팽창하지 않으므로 PDMS 구조는 변형 없이 물이나 알코올과 같은 용매와 함께 사용할 수 있다. 패터닝 된 PDMS 얇은 층을 기판으로 사용하여 다층구조로 적층하게 되면 모듈형 리액터, 마이크로 및 Numbering-up 연구를 포함하여 체외 약물 분석 및 생물학적 연구의 응용 가능성을 가지고 있다 [48, 49].

## 5. Polyaniline 합성

가장 일반적으로 알려진 Polyaniline 합성법은 MacDiamid 합성법이다. 산화 상태에 따라서 완전 산화형, 중간 산화형, 완전 환원형으로 나뉘지며 (Figure 2), 수용액의 양성자 존재 하에 Ammonium sulfate와 같은 산화제를 사용하여 아닐린을 직접 산화시켜 얻을 수 있다. 다양한 구조를 가지고 있는 Polyaniline은 벤젠고리 및 질소에 다양한 치환기가 도입된 단량체와 다양한 산화제를 조합하여 이루어진다 [50]. Polyaniline (PANI)은 높은 전기 전도성과, 우수한 환경 안정성, 가공성 및 경제성으로 인하여 큰 관심을 받고 있다. 그러나 PANI의 Conjugate double bond 구조로 인하여 대부분의 용매에 불용성으로 응용에 제한을 받는다 [51]. 따라서 PANI의 가공성을 높이기 위한 연구들로 Precursor법 [52], 화학적 개질법 [53], 기능성 도판트 [54]를 사용하는 방법이 있다. 폴리머 골격에 Sulfonic acid, CSA, DBSA와 같은 도판트를 도입하는 것은 간단한 공정으로 유기용매와 수용액에 용해도를 높일 수 있는 방법이다 [55]. 기능성 도판트의 Protonic acid group은 PANI의 Imine기와 결합하고, 남아있는 Organic group은 무극성이거나 약한 극성의 유기용매와 혼화성을 가지게 되어 용해도를 증가시킨다 [56].



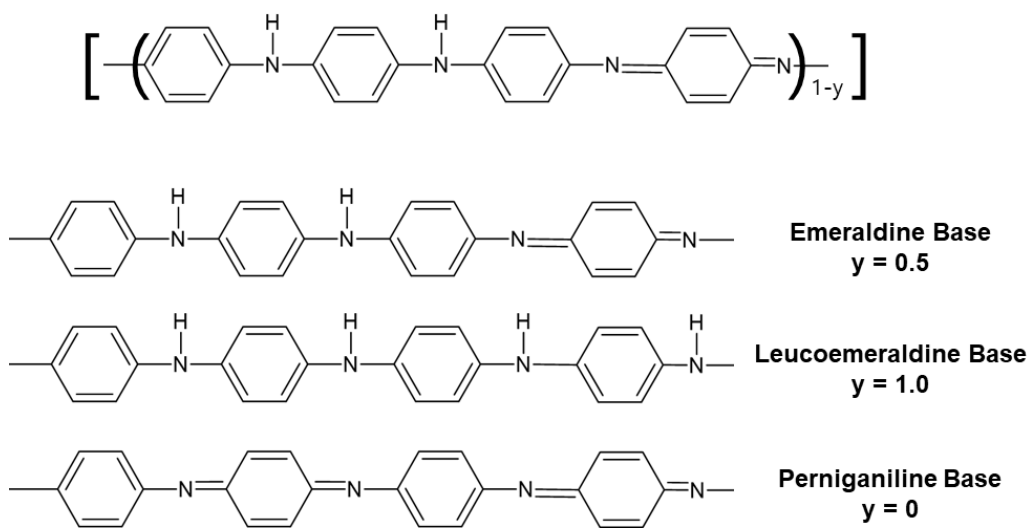
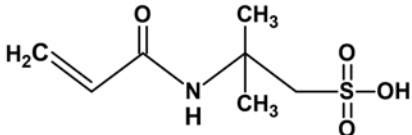
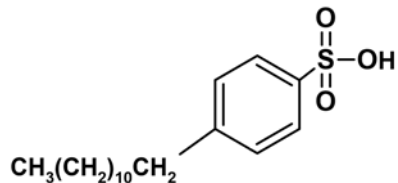
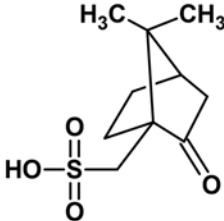
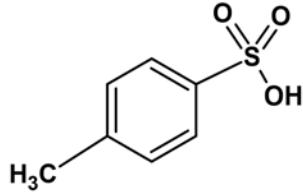
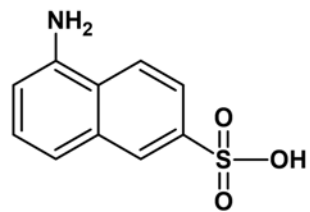


Figure 2. Chemical structures of polyaniline and its most common forms.

Table 2. List of dopants and their chemical structure

Name	Chemical formula	Structure formula
AMPSA (2-acrylamido-2-methyl-1-prop anesulfonic acid)	$C_7H_{13}NO_4S$	
DBSA (dodecylbenzenesulfonic acid)	$C_{18}H_{30}O_3S$	
CSA (camphorsulfonic acid)	$C_{10}H_{16}O_4S$	
PTSA (p-toluene sulfonic acid)	$CH_3C_6H_4SO_3H$	
NSA ( $\beta$ -naphthalene sulfonic acid)	$C_{10}H_8O_3S$	

## 6. Microreactor

Microreactor는 소량의 반응물을 연속적으로 흐르게 하여 화학적 반응을 일으켜 반응 시간 단축, 빠른 물질 및 열전달, 확산 거리 최소화, 부반응(Side reaction)의 최소화하는 방법이다. Microreactor 공정은 학술 연구뿐만 아니라 생물, 제약, 화학 산업의 응용 분야에도 관심을 보이고 있다 [57]. 최근에는 새로운 화학물질을 제조하거나, 우수한 품질을 갖는 약물, 형태 및 크기 분포가 제어된 나노입자를 합성하는데 이용된다 [58]. 일반적으로, 효소-기질 반응은 배치 시스템에서 진행되기 때문에 정밀한 제어가 어렵고 긴 반응 시간이 필요하다. 그러나 Microreactor의 경우 짧은 반응시간으로 지속적인 생산이 가능하며, 반응기의 수를 늘리는 Numbering-up으로 사용가능하여 개선된 공정이 가능하다. 또한 반응이 마이크로 규모의 반응기에서 진행되기 때문에 반응 시간을 1/100 미만으로 줄일 수 있으며, 높은 표면적으로 열 및 물질 전달에 더 효율적이다. 결과적으로 화학 반응의 선택도와 수율을 높여 고순도의 균질한 생성물을 얻을 수 있다 [59,60].

## 제2장 실험재료 및 방법

### 제1절 실험 재료

PANI 제조 시약으로 99% Aniline, Ammonium persulfate (Sigma-Aldrich, USA), HCl (Dae-jung, Korea)에서 구입하여 실험을 진행하였으며, 도핑에 사용된 도판트는 2-Acrylamido-2-methyl-1-propansulfonic acid (AMPSA)와 Dodecylbenzenesulfonic acid (DBSA)를 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

전기방사 고분자 용액으로 Poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene) (PVdF-HFP, Mw = 400,000)을 사용하였으며, Polydimethylsiloxane (SYLGARD 184 A&B, Dow corning, USA)으로 나노섬유를 고정하였다. 고정화한 효소는 Lipase (from *Aspergillus niger*)와  $\beta$ -Galactosidase (from *kluyveromyces lactis*)이며, 사용한 기질은 *p*-Nitrophenyl butyrate와 *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside (ONPG)이고, 생성물 표준시약으로 *p*-Nitrophenol과 *o*-Nitrophenol을 Sigma-Aldrich에서 구매하여 실험하였다.

## 제2절 Polyaniline 합성

### 1. Polyaniline Nanofibers 제조

1.5 M HCl 용액 250 mL를 제조하여 100 mL를 비커에 옮겨 담은 후 4°C에서 Ammonium persulfate 6.58 g을 자석교반기로 완전히 용해시켰다. 남아있는 1.5 M HCl 150 mL를 베이스로 0.365M 아닐린을 제조한 후 4°C에 보관하였다. 0.365 M 아닐린 용액을 4°C에서 자석교반기로 교반하면서 Ammonium persulfate 용액을 서서히 첨가하였다. 저온에서 중합할수록 반응시간이 길어지고, 개시제로부터 라디칼 설페이트 화학종이 천천히 생겨 높은 분자량의 PANI를 얻을 수 있기 때문에 4°C에서 합성을 진행하였으며, 반응이 진행됨에 따라 색 변화는 노란색에서 붉은색, 푸른색, 청남색, 어두운 초록색으로 변하였다. 총 4 h동안 중합하였으며 중합이 완료된 용액은 원심 분리(8,000 rpm, 6 min)하여 PANI particle과 상등액을 분리하였다. 증류수로 맑은 물이 나올 때까지 세척한 후 메탄올로 미 반응 올리고머를 제거하였다.

### 2. Emeraldine Base 제조

위 실험에서 얻은 PANI는 Cl<sup>-</sup>로 도핑되어있는 Emeraldine Salt이다 (Figure 3). 따라서 용매에 용해도가 매우 낮은 불용성 고분자이므로 용해도를 높이기 위해 PANI에 붙어있는 Cl<sup>-</sup>를 제거하는 탈 도핑 과정이 필요하다. 3 wt% NaOH를 준비하여 위 실험에서 얻은 PANI-ES (Emeraldine Salt)를 4 h 동안 상온에서 충분히 자석교반기로 교반한다. 시간이 지날수록 어두운 초록색이었던 PANI가 청남색으로 변한다. 탈도핑된 PANI-EB (Emeraldine base)는 Buchner Funnel와 필터(Whatman No.4)로 여과하고 푸른색물이 투명해질 때까지 증류수, 메탄올, 아세톤 순서로 세척 후 50°C에서 24 h동안 건조하였다. 중합한 PANI를 보관할 경우 중성상태인 EB형태로 보관하는 것이 바람직하다.

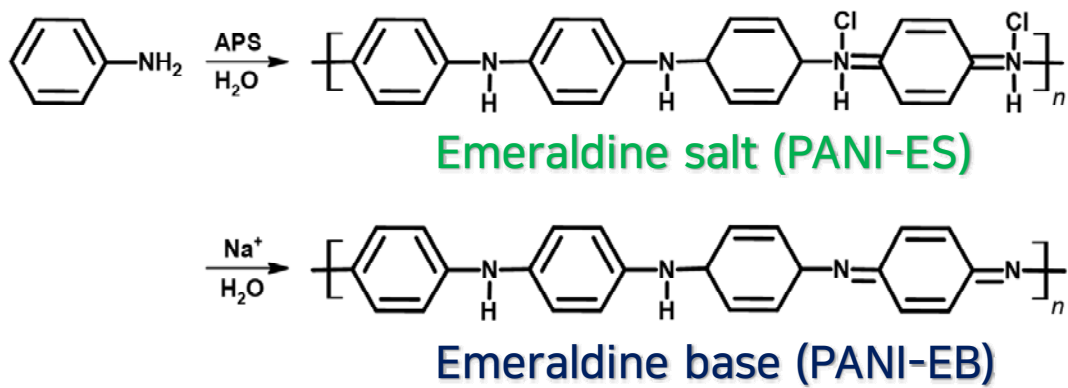


Figure 3. Synthesis of polyaniline emeraldine salt and emeraldine base.

### 3. Alkyl group으로 doping된 PANI

PANI의 용해도를 높이기 위해 긴 Alkyl Chain을 가지고 있는 기능성 도판트로 재도핑하는 과정이 필요하다. 사용한 도판트는 2-Acrylamido-2-methyl-1-propansulfonic acid (AMPSA)와 Dodecylbenzenesulfonic acid (DBSA)를 사용하였으며 PANI-EB를 완전히 도핑하기 위해서 1.0 g (EB) : 1.4 g (Dopant) 비율로 과량 첨가하였다. AMPSA 1.4 g을 증류수 10 mL에 완전히 용해시킨 뒤 막자사발로 곱게 갈은 PANI-EB 1.0 g과 함께 24 h 동안 자석교반과 sonication을 하였다. 청남색이었던 PANI-EB가 초록색을 띠는 PANI (AMPSA)로 바뀐 것을 확인하고 Buchner Funnel와 필터(Whatman No.4)로 PANI 입자를 걸러낸 후 증류수, 메탄올, 아세톤 순서로 세척한 다음 50°C, 24 h 동안 건조한 다음 막자사발로 곱게 갈아 준비하였다 (Figure 4).

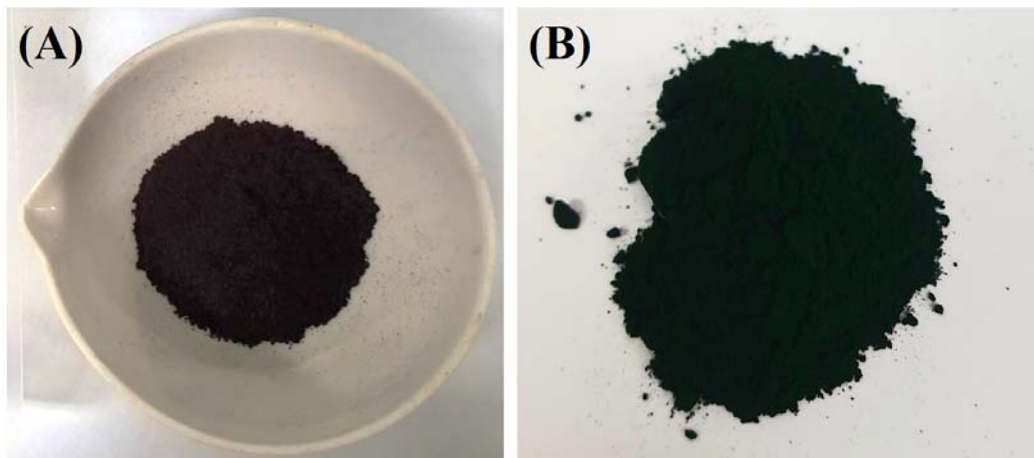


Figure 4. Synthesis of (A) PANI-EB and (B) PANI-AMPSA.

## 4. Polyaniline 분석

### 가. Polyaniline FT-IR 분석

폴리 아닐린 중합 후 Dedoping을 통해 제조된 EB와, Alkyl group으로 Redoping 하여 얻은 PANI-AMPSA를 FT-IR 분석으로 확인하였다. Shimadzu사의 IRAffinity-1S Fourier Transform Infrared Spectrophotometer 장비를 사용하여 측정하였으며, 4,000-500  $\text{cm}^{-1}$  파장 범위에서 수행하였다.

### 나. SEM 분석

제조된 PANI와 AMPSA로 도핑된 PANI를 주사 전자 현미경(SEM, Hitachi Co., Japan)을 이용하여 이미지 분석하였다. PANI의 입자 형태와 크기 차이를 분석하기 위하여 각각의 샘플을 Pt로 코팅 한 후 15.0 kV 가속 전압에서  $\times 50,000$  확대하여 조사하였다.

### 다. Polyaniline의 용해성 평가

PANI의 용해도를 확인하기 위하여 순수한 PANI와 탈도핑한 PANI-EB, Alkyl group으로 도핑된 PANI-AMPSA를 각각 20 wt%가 되도록 N,N'-DMF/Acetone (7:3, v/v)에 용해하였다. PANI 용액을 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후 커버 글라스로 덮어 용액을 고르게 분산시켜준 다음, 광학현미경으로 PANI 입자 존재의 유무를 확인하였다.



### 제3절 나노섬유 담체 제조

#### 1. PDMS 마이크로패턴 제조

PDMS로 마이크로패턴의 얇은 메쉬(mesh)를 생성하는 가장 간단한 기술은 소프트리소그래피법이다. 순수한 PDMS Sylgard 184를 사용한 패터닝 접근법은 마이크로 범위의 두께를 갖는 mesh를 얻기 위해 사용되었다. SYLGARD 184 A와 B를 무게 비 10:1로 준비하여 10 min 동안 고르게 섞어준다. 섞으면서 공기가 들어가 기포가 생기므로 1 min 동안 미니원심기를 작동하여 기포를 제거한 다음 1×1 mm 크기로 격자 구조를 갖는 몰드(전체 규격 24×24 mm)에 서서히 부어준다. 매끈한 표면을 만들기 위해서 Vacuum chamber에 넣고 5 min 동안 탈기시켰다. 사용한 경화제는 열을 가할수록 굳는 성질이 있어 60°C에서 120 min이상 충분히 경화하였다.

## 2. 전기방사 고분자 용액 제조

### 가. PVDF-HFP Solution 제조

불용성 나노섬유 담체를 제조하기 위해 초소수성 고분자로 알려진 PVdF-HFP를 전기방사 기본 용액으로 선택하여 나노섬유의 뼈대를 구성하였다. 베이스 용매는 PVdF-HFP 20 wt%가 되도록 N,N'-DMF에 용해하였으며 70°C에서 1 h 이상 교반하였다. 냉각 후 DMF와 아세톤의 무게 비가 7:3이 되도록 아세톤을 첨가하였다. PVdF-HFP의 최종 농도는 14 wt%로 제조되었다.

### 나. PVdF-HFP/PANI Blending 용액 제조

PVdF-HFP 고분자 용액에 PANI-EB와 Alkyl group으로 도핑된 PANI를 전체부피의 0, 5, 10, 15 wt%가 되도록 첨가한 후 (Figure 5), 1 h 동안 Sonicator로 샘플의 입자를 초음파 교반한 뒤 완전히 녹이기 위하여 12 h 동안 자석교반기로 교반하였다.

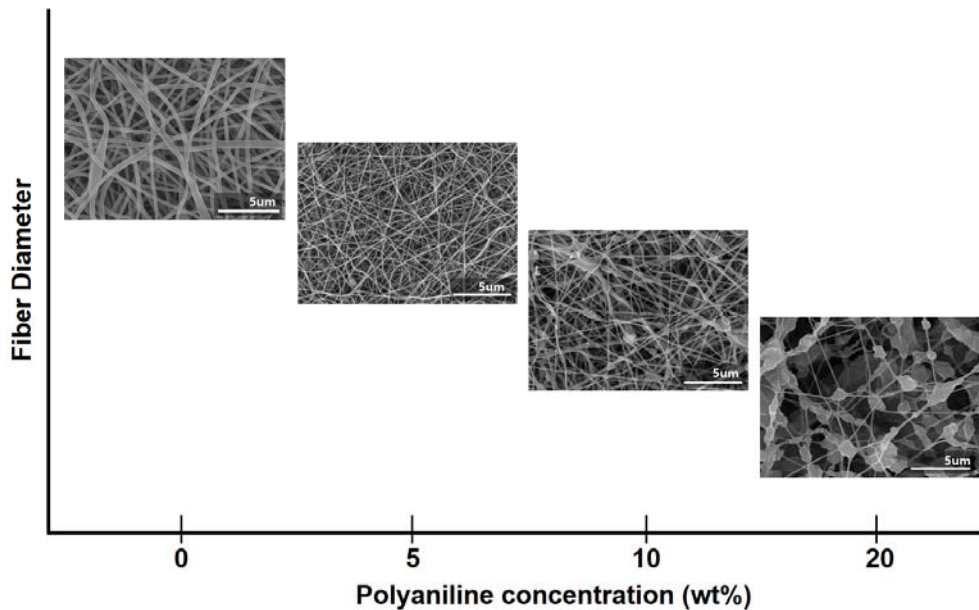


Figure 5. Nanofiber morphology with increasing polyaniline concentration.

### 3. 전기방사 조건

본 실험에서 사용한 전기방사 장치는 고전압을 걸어줄 수 있는 발생장치(High voltage power supply), 고분자 공급 실린지(Syringe driver), 토출부(Needle)와 고분자 섬유상을 모으는 회전드럼 수집기(Collector)로 구성되어있으며 (Figure 6), 전기방사에 사용된 전압은 20 kV이고, 양전하가 걸린 주사 바늘과 음전하가 걸린 집속장치와의 거리 (Tip-to-collector distance, TCD)는 12 cm로 진행하였다 (Table 3). 전기방사 고분자 용액을 담은 주사기는 유리로 제조된 20 mL 주사기를 사용하였으며, 0.61 mm 직경을 갖는 주사바늘을 사용하였다. 고분자 용액 공급 속도는 시간 당 0.2 mL로 고정하였고, 집속 장치의 회전속도는 200 rpm으로 설정하였다. 전기방사를 통해 제조된 PVdF-HFP/PANI 나노섬유는 50°C에서 24 h동안 건조하였다.

Table 3. Electrospinning conditions for developing nanofibers

<b>PVdF-HFP/PANI</b>	
Flow rate	0.2 mL/h
Applied voltage	20 kV
TCD	12 cm
Temperature	Room temperature
Collector	Aluminum foil
Collector rpm	200 rpm

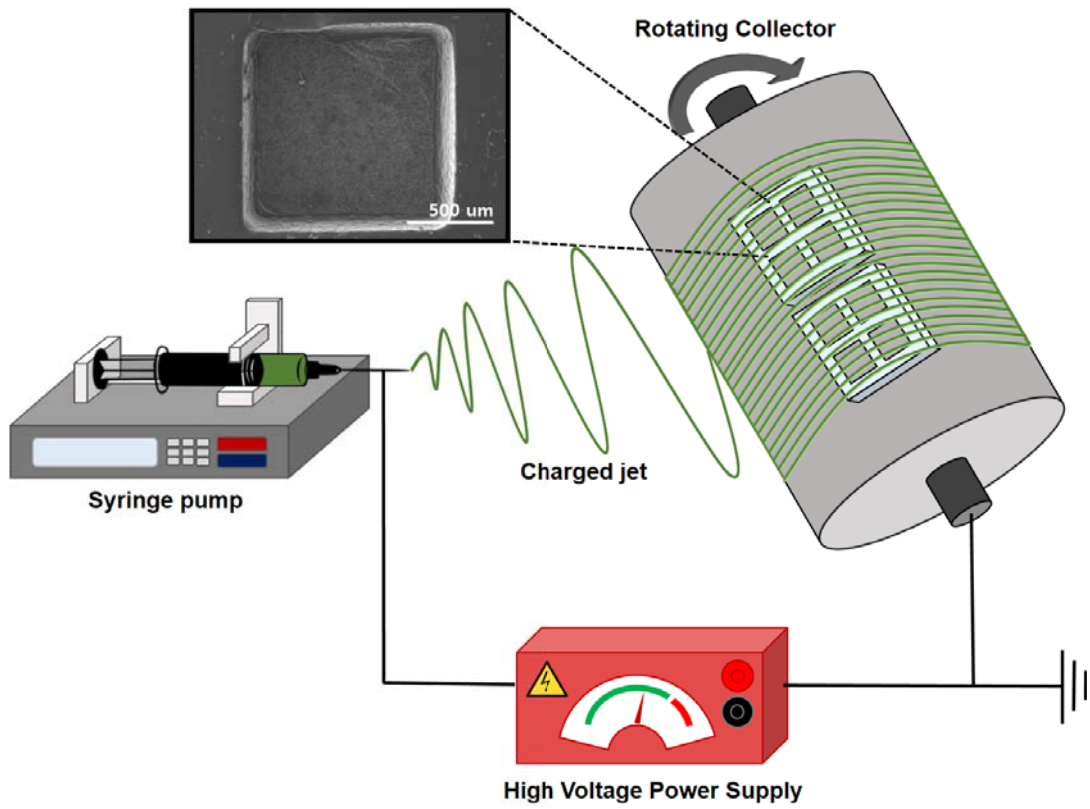


Figure 6. The equipment of electrospinning experiments.

## 4. Polyaniline 나노 섬유 분석

### 가. PVdF-HFP/Polyaniline 나노섬유 FT-IR 분석

PVdF-HFP와 PANI간의 화학적 상호작용을 확인하기 위해 PVdF-HFP 나노섬유와 PVdF-HFP/PANI (AMPSA) 20 wt% 나노섬유를 FT-IR 분석하여 비교하였다. Shimadzu사의 IRAffinity-1S Fourier Transform Infrared Spectrophotometer 장비를 사용하여 측정하였으며, 4,000-500  $\text{cm}^{-1}$  파장 범위에서 수행하였다.

### 나. SEM 분석

전기방사 결과 제조된 나노섬유의 표면 분포 형태와 평균 직경을 조사하기 위해 주사 전자 현미경(SEM, Hitachi Co., Japan)을 이용하여 분석하였다. 섬유의 Morphology를 확인하기 위하여 각각의 샘플을 Pt로 코팅 한 후 15.0 kV 가속 전압에서  $\times 5,000$ ,  $\times 10,000$ ,  $\times 50,000$  확대하여 조사하였다. 나노 섬유의 평균 직경은 Image j 프로그램(National Institute of Health, USA)을 사용하였으며, 임의로 나노섬유 직경 100개를 선정하여 평균 직경과 섬유 분포도를 나타내었다.

## 제4절 효소 고정화

### 1. 효소 고정화 방법

나노섬유의 표면과 섬유와 섬유 간에 형성되는 공간에 효소를 효과적으로 고정시키기 위하여 우수한 효소 안정성과 높은 효소 로딩이 가능한 EAPC법으로 효소를 고정화 하였다 [61]. EAPC법은 나노섬유 표면에 효소를 흡착시킨 다음 Ammonium sulfate를 첨가하여 크기가 매우 작은 효소를 응집시키고, 가교제를 첨가하여 효소 집합체와 섬유간의 공유결합을 형성시켜 고정화하는 방법이다.

본 실험에서는 PDMS에 고정된 나노섬유 담체를 1×1 cm 사이즈로 준비하여 Lipase 효소액(1 mg/mL) 1 mL를 첨가한 다음, 효소의 응집을 위해 Ammonium sulfate 0.5 g을 넣고 30 min동안 200 rpm으로 Shaking하였다. 담체와 효소의 공유결합을 위해 가교제로 Glutaraldehyde (GA)를 전체 부피의 0.5 % 함유하도록 첨가한 뒤 17 h 동안 4°C에서 보관하였다. Tris-HCl (pH 7.5)로 30 min동안 미 반응 GA를 제거 한 후, 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 수차례 세척한 뒤 사용하기 전까지 Buffer에 보관하였다. 고정된 효소의 양은 고정화하기 전 효소액 1 mg/mL와 고정화 후 잔여 효소액과 세척액의 단백질을 Bradford법으로 UV-Vis spectrum photometer (UV-1800, Shimadzu)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 함량은 BSA로 만든 표준곡선에 대입하여 간접적으로 계산하였으며, 고정화 수율은 식 (1), (2)에 따라 평가하였다.

$$E(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Bound protein (mg/mL)} = (C_0 - C) \times \frac{V}{W} \quad (2)$$

$C_0$ 와  $C$ 는 각각 초기 단백질의 농도, 최종 단백질의 농도( $\mu\text{g/ml}$ )이고,  $V$ 는 용액의 부피(mL),  $W$ 는 나노섬유의 질량(mg)이다.

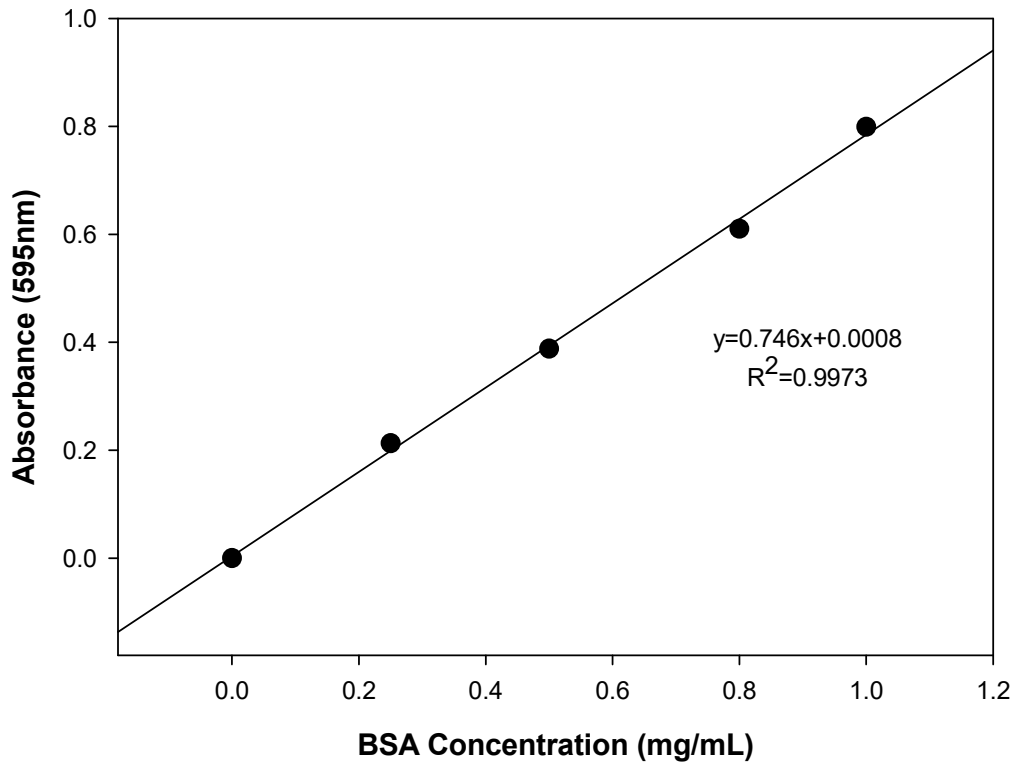


Figure 7. Standard curve for the determination of protein concentration.

## 2. 효소 활성 측정

나노섬유 담체에 고정화 된 Lipase의 활성을 측정하기 위해 *p*-Nitrophenyl butyrate (*p*-NPB)를 기질로 사용하여 UV-Vis spectrum photometer (UV-1800, Shimadzu)로 분석하였다. Free Lipase 또는 Lipase가 고정화된 나노섬유 담체 1개와 990 uL의 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 10 mM *p*-NPB를 10 uL를 첨가하여 반응을 시작하였다. 기질용액은 10 mM *p*-NPB Stock solution을 아세토나이트릴에 제조하여 사용하였다 (Figure 8). 반응 시작 후 2, 5, 10, 15, 20 min 때 흡광도를 측정하여 반응시간 대 *p*-Nitrophenol 생성량의 기울기를 구하여 초기 속도로 나타내었다. Lipase가 *p*-NPB를 가수분해하여 생성되는 *p*-Nitrophenol의 증가를 410 nm에서 흡광도를 측정하여 상대 활성으로 계산하여 평가하였다.

$$\text{Relative activity (\%)} = \frac{A_1}{A_0} \times 100$$

$A_0$  : Lipase의 초기 활성

$A_1$  : 일정 반응 시간 이후 활성

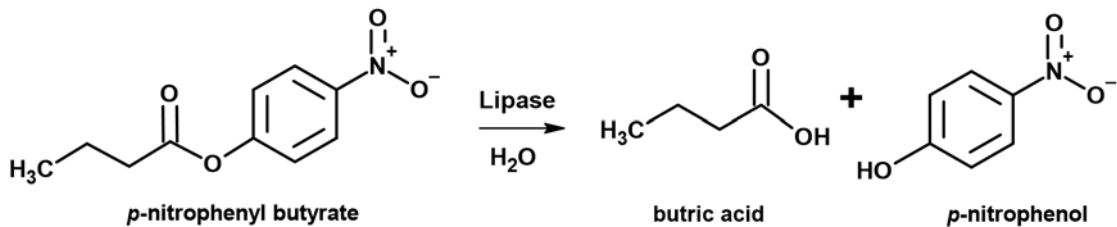


Figure 8. Reaction scheme of *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB) hydrolysis in the presence of Lipase.



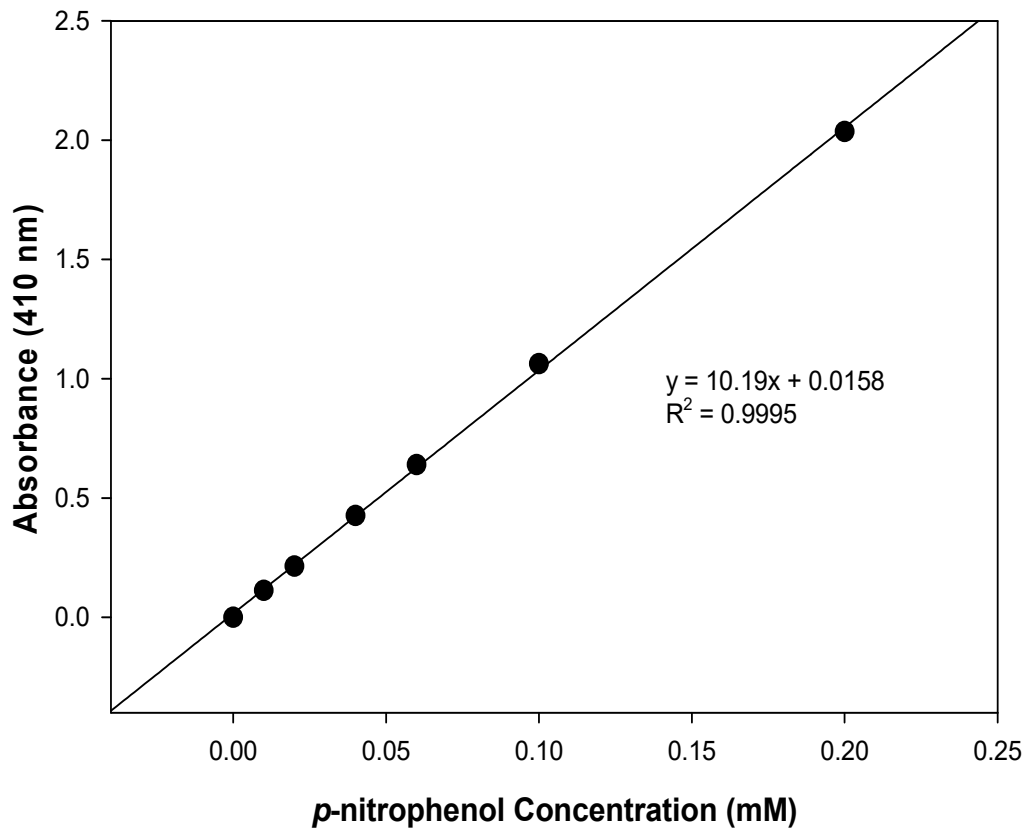


Figure 9. Standard curve for the determination of *p*-nitrophenol concentration.

## 제5절 담체 안정성 평가

### 1. pH와 열에 대한 효소 안정성

고정화 된 Lipase의 열과 pH에 대한 안정성은 조건 변화 전 활성과 변화 후 남아있는 활성을 측정하여 계산하였다. pH 안정성은 20°C에서 pH 4-10 범위에서 측정 하였으며, pH 4-5는 Sodium acetate buffer, pH 6-8은 Potassium phosphate buffer, pH 8.5는 Tris-HCl buffer, pH 9-10은 Glycine hydroxide buffer를 사용하였으며 실험에 사용된 Buffer는 모두 50 mM으로 제조하였다. pH 안정성은 0.1 mg/mL Free Lipase와 Lipase가 고정화된 나노섬유 담체 1개를 조건별 pH에서 2 h동안 보관 후 남아있는 활성을 측정하여 상대 활성도를 계산하여 나타내었다.

Free Lipase와 고정화 된 Lipase의 열 안정성을 평가하기 위해 pH 7.5에서 20-70°C 범위에서 측정하였다. 먼저, 990 uL 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 Lipase가 고정화 된 담체 1개를 넣고 각 온도 별로 2 h 동안 보관한 후 기질 용액이 0.1 mM 이 되도록 *p*-NPB를 첨가하여 가수분해 활성을 측정하였고, Free Lipase는 0.1 mg/mL로 제조하여 기질과 효소를 10 min동안 반응 시킨 뒤 분해 된 *p*-Nitrophenol을 410 nm에서 UV-Vis spectrum photometer (UV-1800, Shimadzu)로 분석하였다.

### 2. 장기 저장성과 재사용성

고정화 된 Lipase의 장기 저장 안정성은 고정화 한 나노섬유 담체를 50 mM Potassium phosphate (pH 7.5)에 저장하였으며, 4°C와 25°C에서 65일 동안 저장하면서 잔여 활성을 0.1 mM *p*-NPB로 측정하였다. 기질의 가수분해되는 속도를 구하여 상대 활성도로 환산하여 평가하였으며, 초기 활성을 100%로 두고 계산하였다.

산업적 응용 가능성을 확인하기 위해 고정화 된 Lipase를 반복적으로 활성을 측정하여 재사용성을 평가하였다. 연속으로 사용하여도 Lipase의 활성이 유지되는지 확인하기 위해 10회 반복하여 측정하였으며, 기질과 반응한 담체는 증류수로 2회 세척, 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 2회 세척 후 동일한 방법으로 효소 활성을 측정하여 Relative activity로 계산하여 나타내었다.

## 제6절 Microreactor 공정 최적화

### 1. Microreactor 설계

고정화된 Lipase는 산업에 유용한 연속식 반응이 가능하다는 장점이 있다. 이를 확인하고자 앞서 실험한 batch mode와 반응 특성을 비교하기 위해 효소 안정성이 가장 높았던 PVdF-HFP/PANI (20 wt%) 나노섬유 담체를 사용하였다. 반응 챔버(1.0×1.3×0.4 cm<sup>3</sup>)에 Lipase가 고정화 된 담체를 패킹한 다음 Input과 Output에 각각 Silicon tubing을 연결한 후 Watson-Marlow Pump로 기질 용액을 공급하였다. 반응 챔버의 부피는 520 uL 이며, 항온 수조를 이용하여 온도를 유지하도록 설계하였다 (Figure 10). 고정화 효소의 연속흐름 반응에서 장기안정성을 평가하기 위해 각 온도에서 0.1 mM *p*-NPB를 4 mL/min 속도로 흘려주어 가수분해 된 *p*-Nitrophenol의 농도를 측정하여 효소의 잔여 활성을 계산하였다. 다시 측정하기 전까지 각 온도에서 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 계속 흘려주었다.

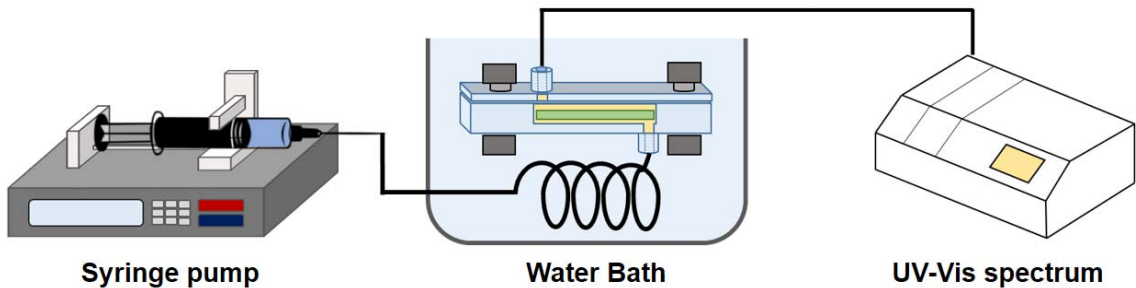


Figure 10. Schematic diagram of microreactor system.

## 2. 반응 조건 최적화

Microreactor의 흐름속도를 정하기 위하여 상온에서 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL/min 속도로 기질을 흘려보냈을 때 가수분해 된 *p*-Nitrophenol의 흡광도를 측정하여 Productivity를 계산하였다. 각 흐름속도를 측정할 때 마다 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 맑은 물이 나올 때까지 세척 후 다음 흐름속도로 효소-기질 반응을 진행하였다.

## 3. 연속 흐름 반응

장기적으로 사용 시 안정성을 평가하기 위하여 상온, 60°C, 70°C에서 최적 Productivity 속도인 4 mL/min으로 연속적으로 작동하여 출구 농도로 Relative activity를 계산하였다. 장기 운행에 의한 안정성을 평가하기 위해 기질농도를 0.1 mM로 하고 유량을 4 mL/min으로 고정하여 65일 동안 연속운전을 실시하였고, 이에 대한 안정성을 평가하였다.

## 제7절 $\beta$ -Galactosidase 고정화

### 1. 효소 고정화 방법 및 활성 측정

#### 가. $\beta$ -Galactosidase 고정화 방법

효소 안정성이 가장 높았던 PVdF-HFP/PANI (20 wt%) 1×1 cm 사이즈로 준비하여  $\beta$ -Galactosidase (from *kluyveromyces lactis*) 효소액 0.5 mL와 100 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0) 0.7 mL를 넣은 뒤 효소의 응집을 위해 Ammonium sulfate 0.5 g을 넣고 30 min동안 200 rpm으로 교반하였다. 담체와 효소의 공유결합을 위해 가교제로 Glutaraldehyde (GA)를 전체 부피의 0.5% 함유하도록 첨가한 뒤 17 h 동안 4°C에서 보관하였다. Tris-HCl (pH 7.5)로 30 min동안 미 반응 GA를 제거 한 후, 50 mM 100 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 수차례 세척 후 사용하기 전까지 버퍼용액에 보관하였다.

#### 나. $\beta$ -Galactosidase 활성 측정

$\beta$ -Galactosidase의 활성은 *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside (ONPG)를 기질로 사용하여 효소 반응에 의해 생성된 *o*-nitrophenol의 발색을 UV-Vis spectrum photometer (UV-1800, Shimadzu)로 측정하여 나타냈다 (Figure 11). Free  $\beta$ -Galactosidase와  $\beta$ -Galactosidase가 고정화된 PVdF-HFP/PANI (20 wt%) 1개와 980 uL의 100 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 5 mM ONPG를 20 uL를 첨가하여 반응을 시작하였다. 기질용액은 5 mM ONPG Stock solution을 DMF에 제조하여 사용하였다. 반응 시작 후 2, 5, 7, 10 min 때 흡광도를 측정하여 반응시간 대 *o*-Nitrophenol 생성량의 기울기를 구하여 초기 속도로 나타내었다.

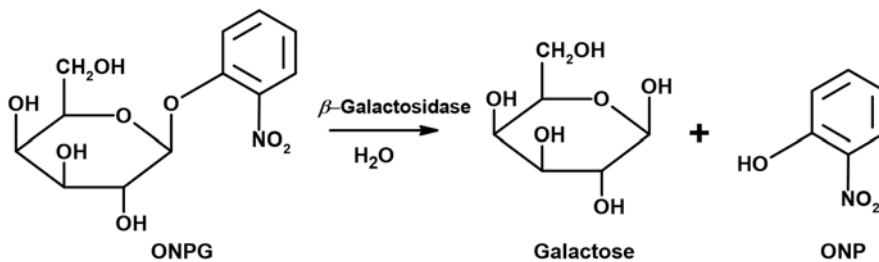


Figure 11. Reaction scheme of *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) hydrolysis in the presence of  $\beta$ -Galactosidase.

## 2. pH와 열에 대한 효소 안정성

고정화 된  $\beta$ -Galactosidase의 열과 pH에 대한 안정성은 조건 변화 전 활성과 변화 후 남아있는 활성을 측정하여 계산하였다. pH 안정성은 25°C에서 pH 5-9 범위에서 측정하였으며, pH 5는 Sodium acetate buffer, pH 6-8은 Potassium phosphate buffer, pH 9는 Glycine hydroxide buffer를 사용하였으며 실험에 사용된 buffer는 모두 100 mM으로 제조하였다. pH 안정성은 구간별 pH에서 1 h동안 보관 후 남아있는 활성을 측정하여 나타냈다.

열 안정성을 평가하기 위해 pH 7.0에서 20-60°C 범위에서 측정하였다.  $\beta$ -Galactosidase가 고정화 된 담체 1개를 넣고 각 온도 별로 1 h 동안 보관한 후 기질 용액이 0.1 mM이 되도록 ONPG를 첨가하여 가수분해 활성을 측정하였다.

## 3. 장기 저장성과 재사용성

$\beta$ -Galactosidase의 저장 안정성은 담체를 4°C와 25°C에서 30일 동안 100 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 저장하여 잔여 활성을 측정하였다. 기질의 가수 분해되는 속도를 구하여 상대 활성도로 환산하여 평가하였으며, 초기 활성을 100%로 두고 계산하였다. 고정화된  $\beta$ -Galactosidase 반복적으로 활성을 측정하여 재사용성을 평가하였다. 연속으로 사용하여도  $\beta$ -Galactosidase의 활성이 유지되는지 확인하기 위해 10회 연속 재사용하여 활성을 측정하였으며, 기질과 반응한 담체는 증류수로 2회 세척, 100 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 2회 세척 후 동일한 방법으로 효소 활성을 측정하여 Relative activity로 계산하여 나타내었다.

## 4. Microreactor에 적용

PVdF-HFP/PANI (20 wt%) 나노섬유에 고정화 된  $\beta$ -Galactosidase를 Microreactor에 접목하여 연속적인 생산을 확인하였다. 최적 Flow rate를 찾기 위해 0.5-5 mL/min 속도로 기질을 공급하여 출구의 *o*-Nitrophenol의 Productivity를 계산하였다.

## 제3장 결과 및 고찰

### 제1절 Polyaniline Nanofibers

#### 1. Polyaniline의 FT-IR 분석

본 연구에서는 긴 Alkyl 사슬 구조를 가지고 있는 것으로 알려진 AMPSA를 도핑하여 PANI-AMPSA를 제조하였다. Figure 12는 전기방사 전에 PANI의 결합 구조의 변화를 관찰하기 위해 FT-IR을 측정된 결과이며, Table 3에 주요 피크를 정리하여 나타내었다. PANI-EB의 스펙트럼은 이전에 보고된 자료와 같이  $1588\text{ cm}^{-1}$ 과  $1500\text{ cm}^{-1}$ 은 Stretching 퀴노이드 고리의 C=C 특성 피크와 C=N 벤젠노이드 고리의 특성 결합에 해당하며 방향족(Aromatic ring) 아민을 나타낸다 [62].  $1307\text{ cm}^{-1}$  (C-N 스트레칭진동)와  $1163\text{ cm}^{-1}$  (C=N 스트레칭 진동)에서 PANI의 특징적인 피크를 나타내었으며,  $840\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타난 1,4-이중 치환된 고리에서 C-H 스트레칭은 PANI-EB형태와 동일하였다 [63]. AMPSA와 PANI-AMPSA의 FT-IR 스펙트럼에서  $1670\text{-}1583\text{ cm}^{-1}$ 에 위치한 피크는 C=O 스트레칭 진동(secondary amid), 컨쥬게이션된 C-N 스트레칭 진동 그리고 N-H의 변형진동(amidII)이다 [64].  $1311\text{ cm}^{-1}$ 와  $1307\text{ cm}^{-1}$ 의 피크는 양성자화 또는 C-N-C 스트레칭 진동을 통해 폴리머에 유도된  $\pi$ -전자 비편재화에 할당될 수 있으며, 강한 피크를 보인  $1236\text{ cm}^{-1}$ 와  $1241\text{ cm}^{-1}$ 의 피크는 Alkyl aryl ether (C-O 스트레칭진동)에 의해 발생한다 [65, 66]. PANI-AMPSA와 AMPSA의  $1078\text{ cm}^{-1}$ 와  $1081\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타난 피크는 PANI와 AMPSA의  $\text{SO}_3$ 기의 상호작용에 기인하며 [67],  $948\text{ cm}^{-1}$ 와  $943\text{ cm}^{-1}$ 은 C-S의 스트레칭 진동을 나타낸다. AMPSA와 PANI-AMPSA에 대한 FT-IR 스펙트럼에서  $1078$ ,  $1081$ ,  $948$  및  $943\text{ cm}^{-1}$ 에서의 흡수 피크는 PANI 방향족 고리에 부착된  $\text{SO}_3$ 기의 존재를 나타내며, 이는 제조된 PANI-AMPSA가 도핑 상태에 있음을 나타낸다 [63].

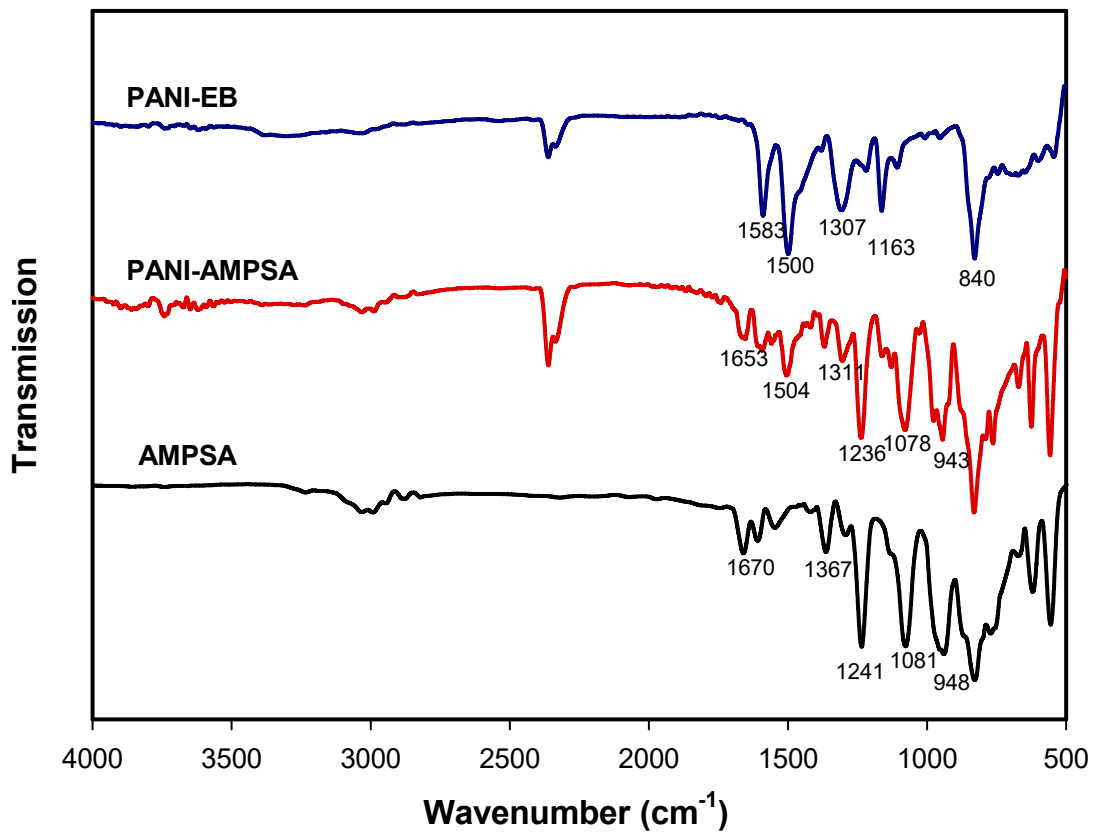


Figure 12. Fourier transform infrared (FTIR) spectra of PANI-EB, PANI-AMPSA and AMPSA.



Table 4. Lists of IR absorption peaks of PANI, PANI-AMPSA and AMPSA

Assignments	Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )		
	PANI-EB	PANI-AMPSA	AMPSA
C-H stretching (alkene)		2980	2980
O=C=O stretching (carbon dioxide)	2350	2350	
C=O stretching (secondary amid)		1653	1670
N-H bending (amine)	1588-1500	1568-1504	1600-1550
C-N stretching (aromatic amine)	1307-1160	1318	
C-O stretching (alkyl aryl ether)		1236	1241
Sulfonic group		1078, 943	1081, 948

## 2. SEM 분석

순수한 PANI와 AMPSA로 도핑된 PANI의 표면을 분석하였다. Figure 13 (A)는 120 nm 평균 크기를 갖는 막대 형태의 나노파이버를 합성하였음을 확인하였다. Figure 13 (B)는 AMPSA로 도핑된 PANI가 응집되어 있는 형태가 관찰되었으며, 중합반응 동안 실타래 같은 PANI 입자가 서로 뭉쳐 Globular한 구조를 갖는 2차 입자를 생성하는 것을 확인하였다.

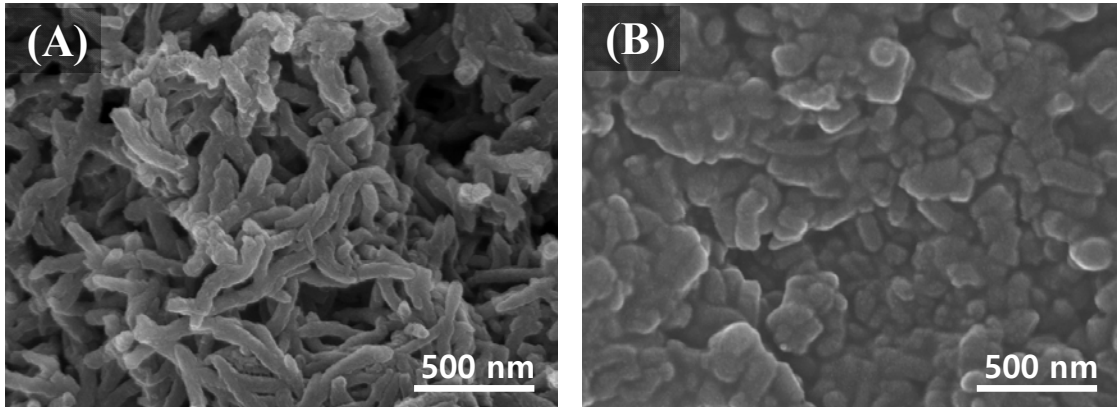


Figure 13. SEM images of pure PANI and AMPSA-doped PANI. (A) PANI, (B) PANI-AMPSA.

### 3. Polyaniline의 용해성

PANI는 고분자 기본 구조가 비극성인 방향족 화합물로서 극성이 큰 용매에는 거의 용해되지 않는 것으로 알려져 있다 [68]. 그러나 본 실험에서는 AMPSA를 기능성 도판트로 사용하여 제조한 PANI-AMPSA를 N,N'-DMF/Acetone (7:3, v/v)에 20 wt% 녹인 경우 광학현미경을 통해 확인한 결과 완전히 용해된 것을 확인하였다. 도핑 되지 않은 PANI와 탈도핑된 PANI-EB는 거의 용해되지 않아 PANI 입자가 발견되었다(Figure 14). 따라서 용해성이 개선된 PANI-AMPSA를 전기방사용 PVdF-HFP 용액에 Blending하여 복합나노섬유를 제조하였다.

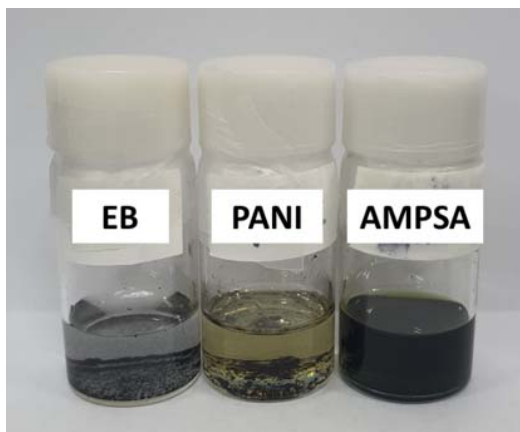


Figure 14. PANI-EB, PANI-ES and PANI-AMPSA in solvent.

## 제2절 PVdF-HFP/PANI 나노섬유 제조

### 1. 나노섬유 Morphology 분석

전기 방사 된 섬유의 형태, 평균 직경 및 직경 분포를 조사하여 제시하였다. PVdF-HFP와 PANI를 blending하여 복합 나노섬유를 제조하였다. 전기방사 용매에 PANI의 농도가 높아질수록 점도가 높아지며, 문헌에 따르면 20 wt% 이상의 PANI를 함유하는 방사 용액은 높은 점도로 인하여 방사에 부적합하다고 알려졌다 [69]. 따라서 PANI의 농도를 0, 5, 10, 20 wt%로 조절하였다.

Figure 15는 순수한 PVdF-HFP만으로 이루어진 나노섬유와 PANI 농도에 따른 PVdF-HFP/PANI 복합 나노섬유의 SEM 이미지이며, 섬유의 직경 분포도를 Figure 16에 나타내었다. PVdF-HFP 나노섬유의 표면 형태는 균일하고 Bead가 존재하지 않는 매끄러운 섬유를 관찰하였다. PANI를 첨가한 섬유의 표면은 Bead가 관찰되었으며, 농도가 증가할수록 Bead의 양도 증가하였다. PANI의 용해성을 높이기 위해 첨가한 도판트로 인하여 PANI의 전도성이 상승하였다. 따라서 이동제트에 의해 운반되는 순 전하 밀도를 증가시키며, 증가 된 순 전하는 나노섬유에서 PANI 볼을 형성하는 제트에 가해지는 힘을 증가시켜 Bead를 생성하였다 [70].

PANI가 첨가되지 않은 PVdF-HFP의 평균직경은 263.7 nm이었으며, Polyaniline 농도를 각각 5, 10, 20 wt%로 증가할수록 179.6 nm, 156.4 nm 그리고 114.9 nm 로 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 17). 일반적으로 전기방사용액의 고분자 농도가 증가할수록 섬유 직경이 증가하는데, PANI의 Complex ion 구조가 섬유의 직경을 감소시키는 역할을 하였다고 사료된다.

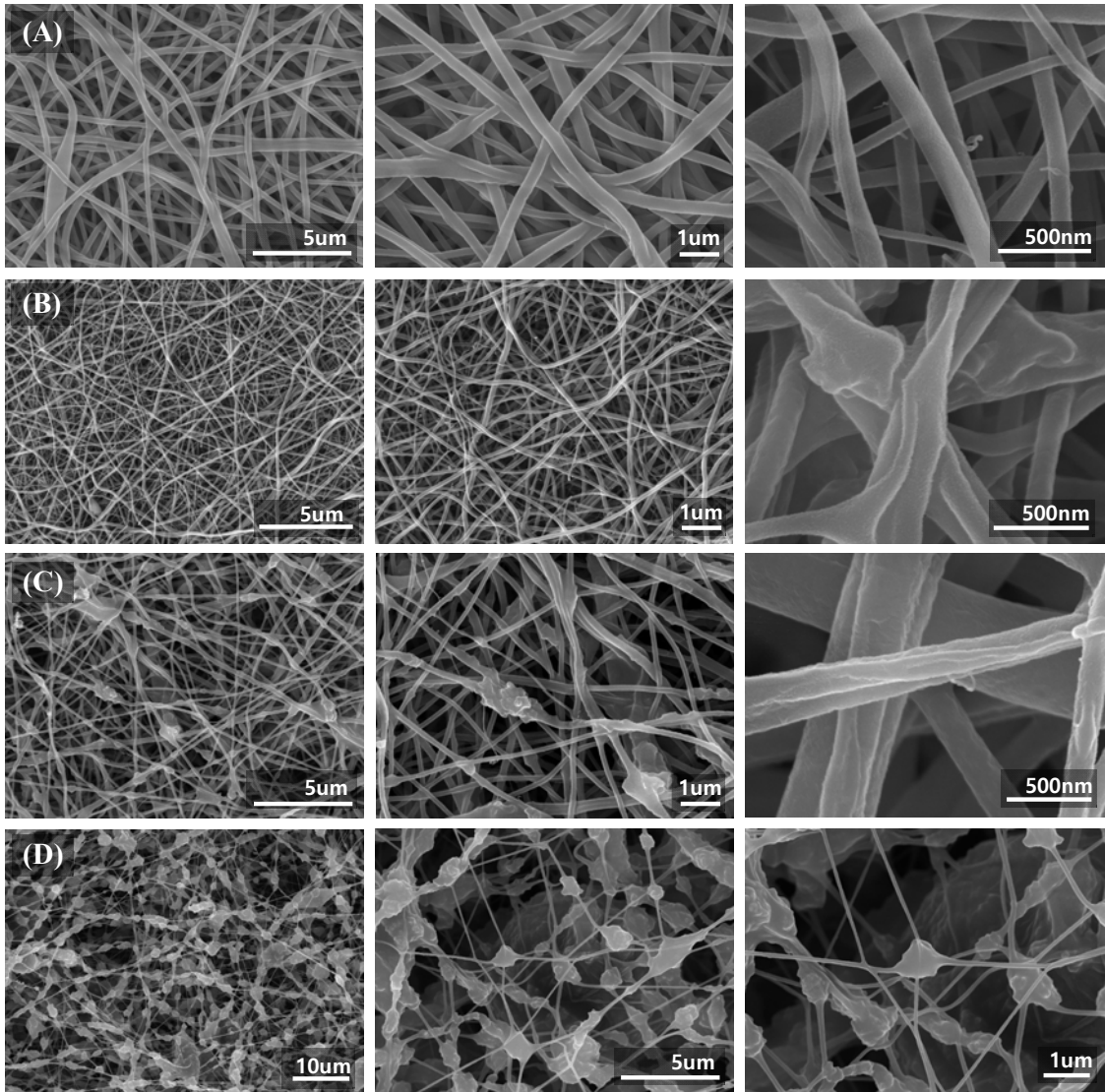


Figure 15. SEM images and size distribution of electrospun fibers prepared with an 14 wt% PVdF-HFP solution and PANI-AMPSA at (A) 0 wt%, (B) 5 wt%, (C) 10 wt% and (D) 20 wt%.

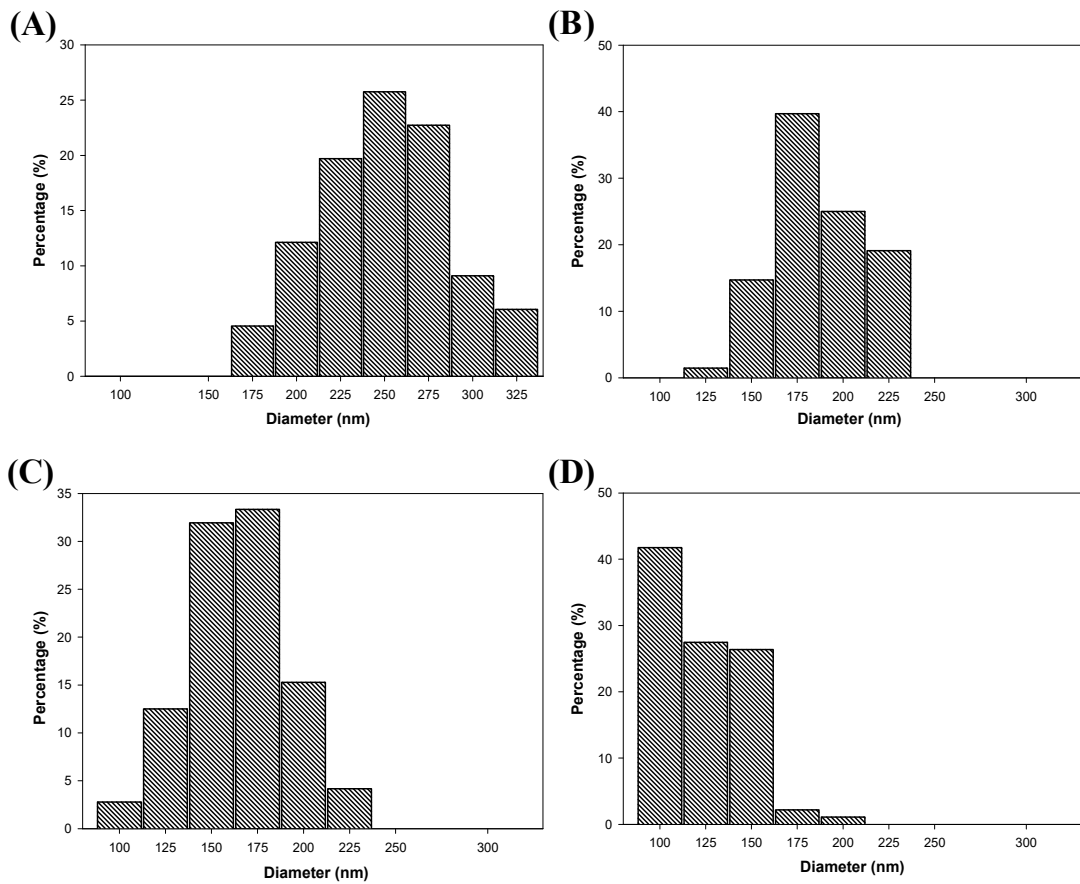


Figure 16. Fiber diameter distribution for the different PANI concentration : (A) 0 wt%, (B) 5 wt%, (C) 10 wt% and (D) 20 wt%.

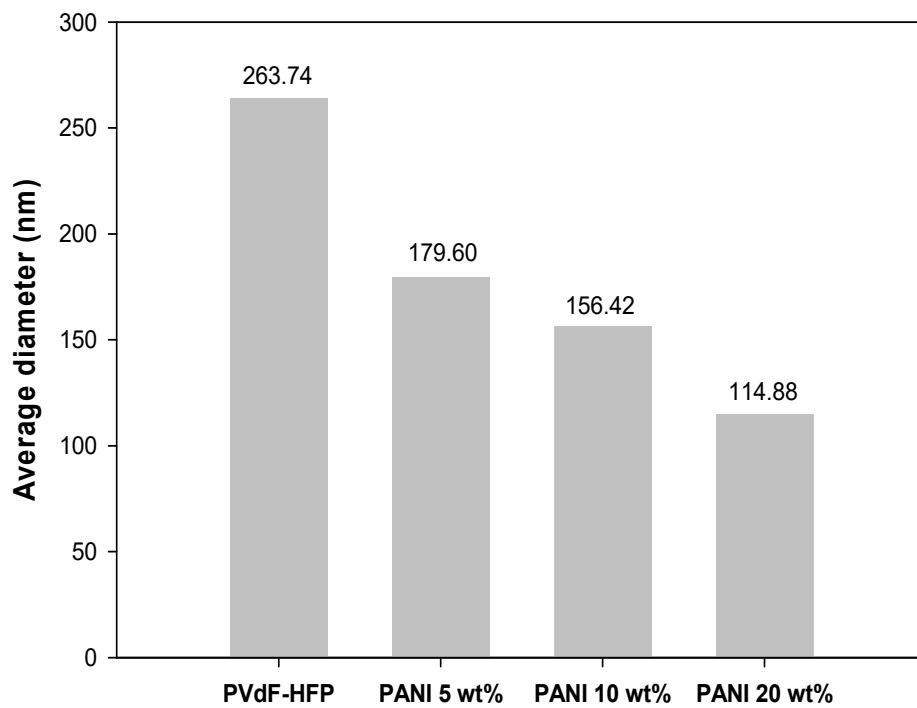


Figure 17. The changes of average diameters for the different polyaniline concentration.

## 2. 나노섬유 FT-IR 분석

PANI 첨가로 인한 화학적 변화는 Figure 18과 같이 순수한 PVdF-HFP 나노섬유와 비교하여 FT-IR 피크 강도와 변화를 분석하여 조사하고, 주요 피크는 Table 5에 나열하였다. PVdF-HFP 나노섬유의 특성 피크가 관찰되었다.  $1408\text{ cm}^{-1}$ 에서 피크는  $-\text{CH}_2$  (Wagging mode)를 나타내며,  $1189\text{ cm}^{-1}$ 의 피크는  $-\text{CF}_2$ 의 대칭 스트레칭 진동의 특징이며,  $-\text{CF}_3$ 의 스트레칭 진동은  $1073\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타났다 [71].  $885\text{ cm}^{-1}$  및  $844\text{ cm}^{-1}$ 에서 피크는 폴리머의 비정질상에서 C-F 스트레칭(Vinylidene)에 해당한다 [72]. PVdF-HFP에 PANI의 혼합으로 순수한 PVdF-HFP 나노섬유의 특성 피크는 보존되었지만 몇 가지 새로운 피크가 나타났다.  $1608\text{ cm}^{-1}$ 은 컨쥬게이션 된 알켄의 C=C 스트레칭 진동을 나타내며,  $1507\text{ cm}^{-1}$ 와  $1463\text{ cm}^{-1}$ 에서 피크는 각각 N-H (Amin group)과 벤젠 고리에서 C-N 스트레칭 진동에 해당한다. 그리고  $1049\text{ cm}^{-1}$ 의 피크는 S=O 스트레칭 진동으로 Sulfonic acid를 나타낸다 [55, 73]. PVDF-HFP의 골격 구조에 있는 강력한 전자 흡인 작용기(-CF)를 확인하였으며, PANI의 첨가로 나타난 작용기(-NH)는 효소와 공유 결합을 형성 할 수 있다.



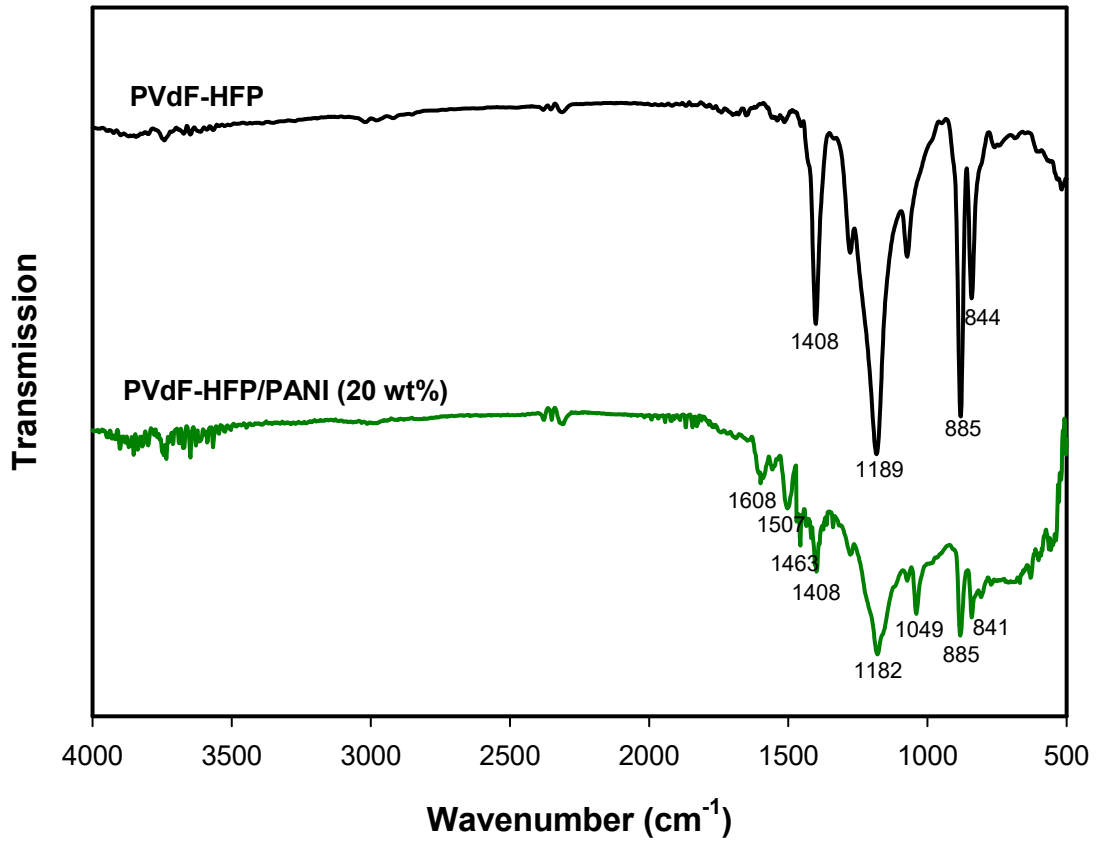


Figure 18. Fourier transform infrared (FTIR) spectra of PVdF-HFP and PVdF-HFP/PANI (20 wt%).

Table 5. Comparison of absorption peaks in PVdF-HFP and PVdF-HFP/PANI (20 wt%)

Assignments	Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	
	PVdF-HFP	PVdF-HFP/PANI (20wt%)
C=C stretching (conjugated alkene)		1608
N-H bending (amine)		1507
C-N stretching (quinoid ring)		1463
-CH <sub>2</sub> wagging mode	1408	1408
-CF <sub>2</sub> - (Fluoro compound)	1189	1182
S=O stretching (sulfonic acid)		1049
C-F <sub>2</sub> stretching (vinylidene)	885	885
C-F (halo compound)	844	841

### 제3절 고정화 효소 특성

#### 1. Polyaniline 농도에 따른 효소 고정화 결과

PANI 농도에 따른 나노섬유를 제조하여 동일한 양의 Lipase를 고정화 후 남아있는 Lipase의 단백질 함량을 측정하여 고정화율을 나타내었다 (Table 6). 효소를 고정화 할 때 Ammonium sulfate를 첨가하여 효소를 응집시킨 다음 단백질을 가교시킬 수 있는 물질로 알려진 GA를 첨가하여 PANI의 아민기와 효소의 아민기간의 가교 반응을 유도하였다 [74]. GA는 가교제 역할 뿐만 아니라 PANI의 아민기를 알데하이드기로 활성화시키는 물질로 알려져있다 [75].

본 실험에서는 GA를 넣는 순서를 달리하여 아민기간의 가교를 통한 고정화와 작용기를 알데하이드기로 활성화 시켜 비가역적인 이민 결합을 형성한 고정화방법을 비교하였다. 동일한 양의 담체에 효소를 고정화 시킨 후, 담체와 결합한 Lipase의 양을 측정한 결과 PANI를 첨가하지 않은 PVdF-HFP는 23.4%로 가장 낮았으며, PANI-AMPSA를 5 wt% 함유하는 담체는 29.08%, 10 wt%는 33.95% 이었으며, 20 wt% 함유하는 담체가 40.5%로 가장 높은 것을 확인하였다. Figure 19에서 PANI의 함량이 높아질수록 고정화율도 높아지는 것을 보아 Lipase를 나노섬유에 고정시킴에 있어 PANI의 아민기가 주된 역할을 한 것이라 생각할 수 있다. 또한, AMPSA로 도핑한 PANI와 DBSA로 도핑한 PANI를 20 wt%로 동일하게 함유하도록 제조한 담체를 비교한 결과 40.5%와 38.4%로 큰 차이가 나지 않았다. 이 결과로 Sulfonic acid 종류는 효소 고정화에 큰 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. GA를 넣는 순서를 달리하여 아민기간의 가교를 통한 고정화와 작용기를 알데하이드기로 활성화시켜 비가역적인 이민 결합을 형성한 고정화방법을 비교하였을 때 GA로 섬유의 표면의 작용기를 Treatment한 담체가 46.9%로 더 높은 효소 결합을 보였다.

효소 고정화에 있어 고정화 된 효소의 양도 중요하지만 고정화 후 효소의 활성도 공정 응용에 있어 중요한 요소이다. 따라서 효소가 고정화 된 담체의 활성과 동일한 양의 효소의 활성을 측정하여 상대적 활성으로 나타내었다. 상대적 활성은 고정화율이 가장 낮았던 PVdF-HFP에서 높게 나타났다. 이는 효소가 섬유 표면에 안정적으로 고정화 되지 않아 붙어있던 효소들이 떨어져나가게 되고 기질 용액 내에서 Free enzyme으로 작용하게 되어 높은 활성을 나타낸 것으로 사료된다.

Table 6. Immobilized lipase activity and yield for the different PANI concentration

Carrier	PANI Content (%)	Add lipase (mg)	Immobilized lipase	
			Immobilization yield (%)	Activity yield (%)
PVdF-HFP	-	1	23.35	31.09
PANI	3	1	24.02	28.83
PANI-AMPSA	5	1	29.08	29.61
	10	1	33.95	31.85
	20	1	40.48	38.17
PANI(DBSA)	20	1	38.37	35.15
Treatment	20	1	46.94	41.10

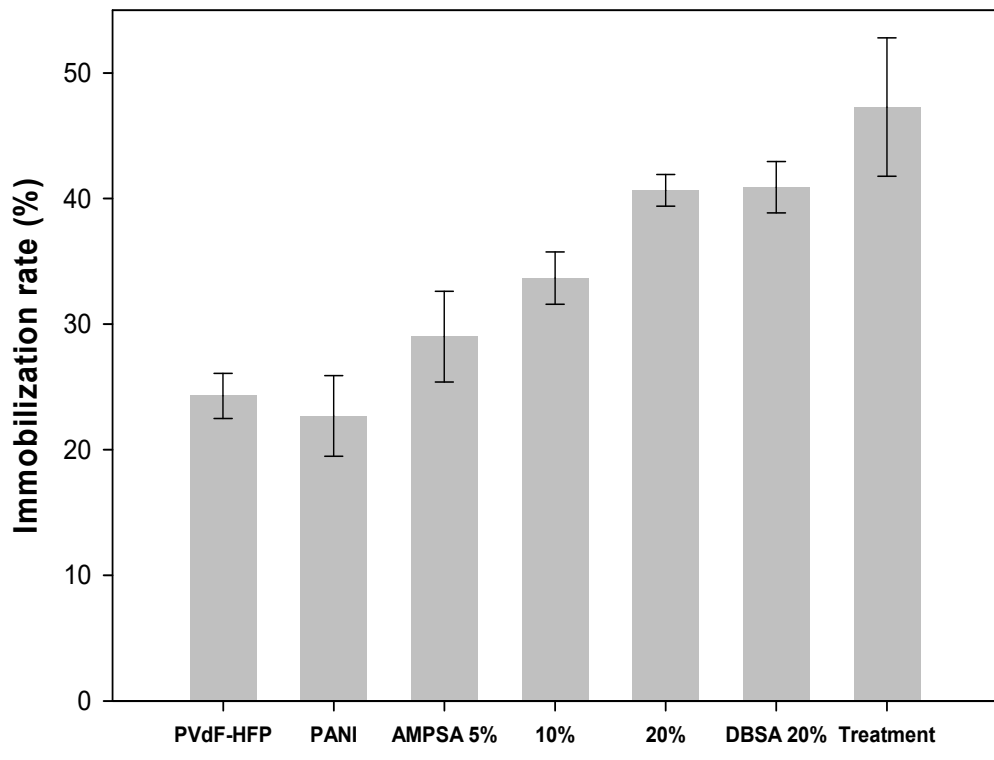


Figure 19. The effect of various nanofiber on immobilization yields

## 2. 열과 pH에 따른 효소 안정성 평가

### 가. pH 안정성 측정

Figure 20는 Free Lipase와 고정화 된 Lipase의 pH (5.0-10.0) 변화에 따른 안정성 결과이며, 상대 활성으로 환산하여 비교 하였다. Free Lipase의 활성은 pH 5.0에서 pH 8.0 범위에서 활성이 점점 증가하다가 pH 8.0에서 최대 활성을 보이고 다시 감소하였으며, 고정화된 Lipase의 경우 pH 8.5에서 최대 활성을 나타냈다. PVdF-HFP/PANI 나노섬유에 고정화 된 Lipase와 Free Lipase의 pH 안정성은 비슷한 경향을 보였지만, 담체에 효소가 고정화 되면서 효소의 미세한 환경이 변화하기 때문에 최대 활성이 다르게 나타났다. 고정화된 Lipase와 Free Lipase는 염기성 조건에서 큰 활성 저하를 보였으며, 이는 PVdF-HFP/PANI 나노섬유가 열에 의한 효소의 구조변화는 방지할 수 있었으나 이온화 변화에서는 한계를 갖는 것으로 보인다.

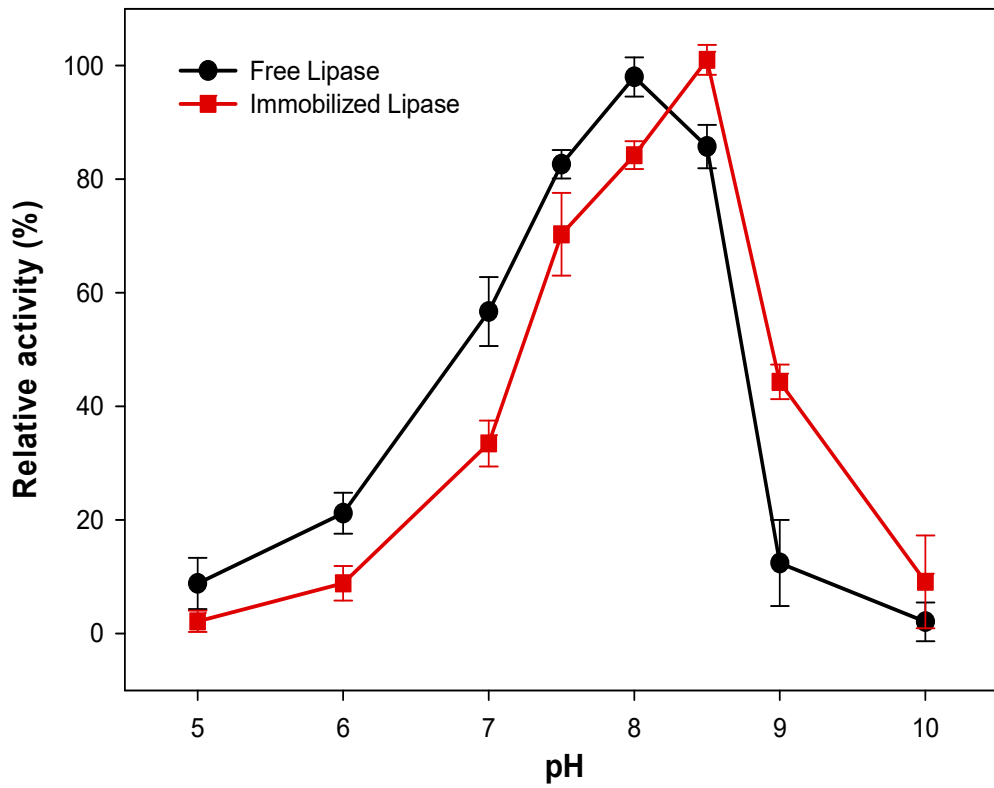


Figure 20. Effect of pH on the activity of free (●) and immobilized lipase (■).

## 나. 열 안정성 측정

온도 변화에 따른 Free Lipase와 고정화된 Lipase의 안정성을 비교하기 위하여 20°C부터 70°C까지 온도를 변화시켜 측정하였다. Figure 21에 나타난 바와 같이 Free Lipase의 경우 30°C에서 최대 활성을 보였으며, 온도가 높아짐에 따라 활성이 점점 감소하여 70°C에서는 최대 활성의 약 50%만 나타내었다. 반면에 고정화된 Lipase는 온도가 높아짐에 따라 활성이 증가하다가 30-70°C의 구간에서도 높은 활성을 유지하는 것을 확인하였다. 이는 Lipase가 나노섬유에 고정화됨으로써 고온에서 Lipase의 구조적 유연성과 실활이 제한되었으며, 효소에 강성을 부여하였기 때문이다 [76]. 또한 공유결합으로 고정화된 효소는 Free enzyme에 비해 열에 의한 변성에 강하다고 알려져 있으며 [77], 따라서 PVdF-HFP/PANI 나노섬유와 Lipase간의 강한 공유 결합이 높은 열로부터 효소를 보호하여 높은 안정성을 보인 것으로 판단된다.



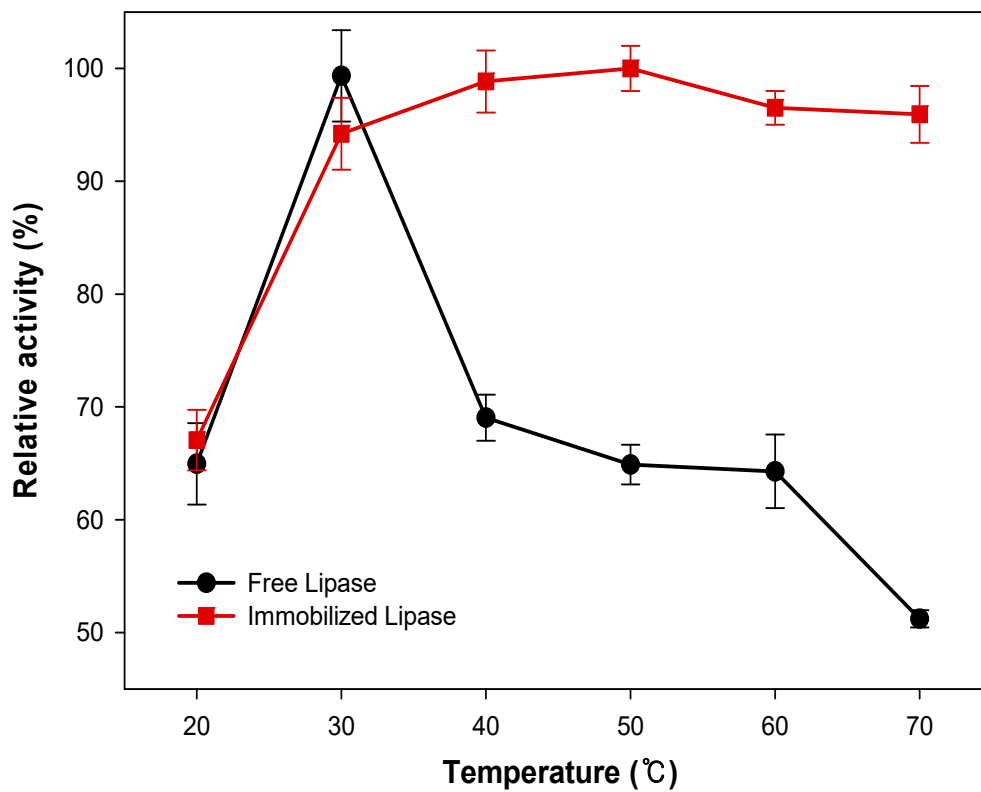


Figure 21. Effect of temperature on the activity of free (●) and immobilized lipase (■).

### 3. 장기저장성과 재사용성 평가

#### 가. 재사용 안정성 측정

효소의 재사용은 공정의 경제적인 측면에서 중요하기 때문에 제조한 PVdF-HFP/PANI (20 wt%)에 고정화 한 Lipase의 재사용성에 대해 평가하였다. 효소-기질 반응 후 고정화 된 담체를 Buffer로 여러번 세척하여 반응하지 않은 기질과 생성물을 제거한 다음, 새로 제조 된 *p*-NPB에 반응을 시켰다. 동일한 담체를 반복적으로 기질과 반응시켰음에도 Lipase의 활성의 감소가 매우 천천히 일어나는 것을 관찰하였다 (Figure 22). 10회 반복 사용 후에도 초기 활성의 90%이상 남아있었다. PVdF-HFP/PANI 나노섬유와 효소의 2차 상호 작용(공유 결합)으로 효소의 3차원 구조의 변성을 감소시켜 재사용성이 향상되었으며, 제조한 PVdF-HFP/PANI 복합 나노섬유가 반복되는 공정에서도 안정성을 지니고 있다는 것을 밝힐 수 있다.

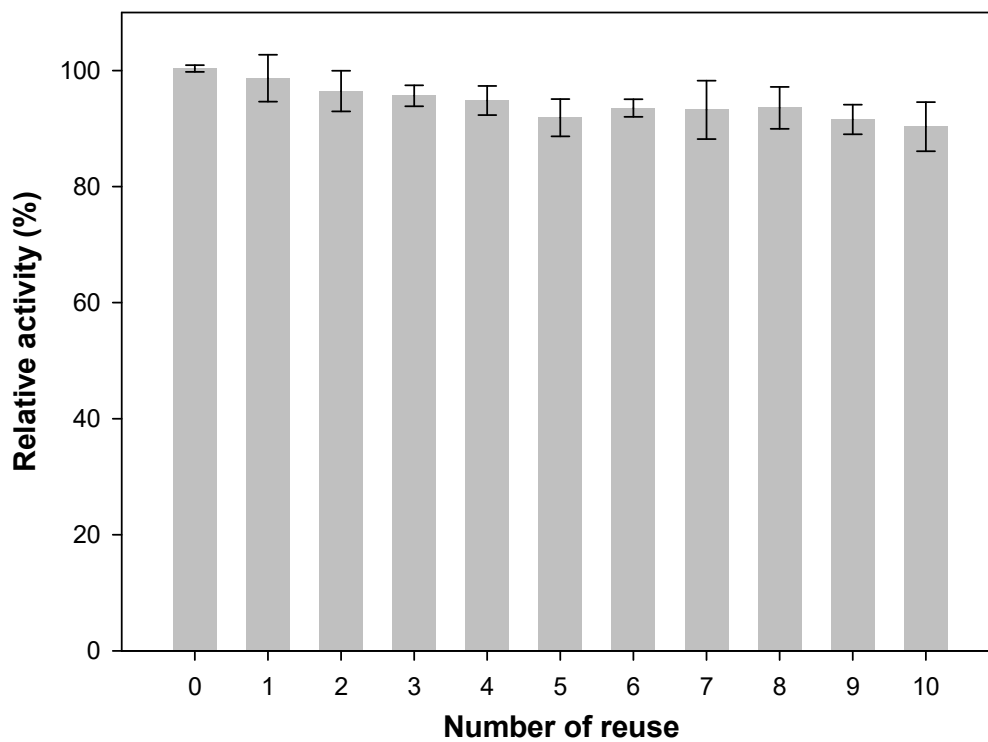


Figure 22. Effect of enzyme recycle on the activity of immobilized lipase.

## 나. 장기저장 안정성 측정

촉매를 저장하는 동안 활성의 급격한 감소와 반응 후의 어려운 회수는 효소의 광범위한 적용을 제한하는 요소이다. 고정화 효율을 평가하기 위해서는 고정화 효소의 저장 안정성이 중요한 요구 사항으로 고려되어야 한다. Free Lipase와 고정화 된 Lipase의 저장 안정성은 두 가지 온도 조건(4°C와 25°C)에서 65일 동안 phosphate buffer에 보관하고 효소의 활성을 주기적으로 테스트하여 저장 안정성을 평가하였으며 결과는 Figure 22에 나타내었다. 4°C에서 Free Lipase의 경우, 65일 후에 초기 활성의 41.1%만 남아있었고, PVdF-HFP에 PANI를 0, 5, 10, 20 wt%가 되도록 첨가한 담체는 약 69.5%, 83.6%, 95.1% 및 95.2%로 높은 잔여 활성을 보였다 (Figure 23 (A)). Lipase를 25°C에서 보관할 경우 65일 후에 Free Lipase는 21.2%만 유지한 반면에 나노섬유 담체의 경우 40.2%, 53.5%, 67.6%, 76.3%의 활성이 남아있었다 (Figure 23 (B)). 저장 온도와 관계없이 Free Lipase보다 나노섬유에 고정화한 Lipase가 저장 안정성이 더 높았으며, PANI의 농도가 증가할수록 효소의 안정성도 증가되었다 (Figure 24).

Wan et al. [78]은 중공 자성 실리카 섬유질에 고정화된 Lipase를 30일 동안 4°C에서 저장할 경우 잔여활성이 80%이상이었지만, 25°C에서 보관할 경우엔 50%를 보존하는 것을 발견하였다. 한편 Salehi et al. [79]는 그래핀 옥사이드/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>에 고정화한 Lipase를 4°C와 25°C에서 보관할 경우 30일 이후에 각각 74.5%와 70.7% 유지하는 것으로 보고되었다.

본 연구에서 얻은 결과는 이전에 문헌에 공개된 결과와 비교하였을 때 효소의 활성을 상당히 연장시켰다. PVdF-HFP/PANI 담체의 저장 안정성은 PANI와 효소의 공유 결합에 기인 할 수 있다. 이 공유 결합은 효소의 구조적 변화를 방지하고 결과적으로 촉매 활성을 보존하는 데 도움이 되었다. 이러한 결과로 효소 고정화 및 생촉매 적용을 위해 PVdF-HFP/PANI 나노섬유를 사용할 수 있는 큰 잠재력을 보여주었다.

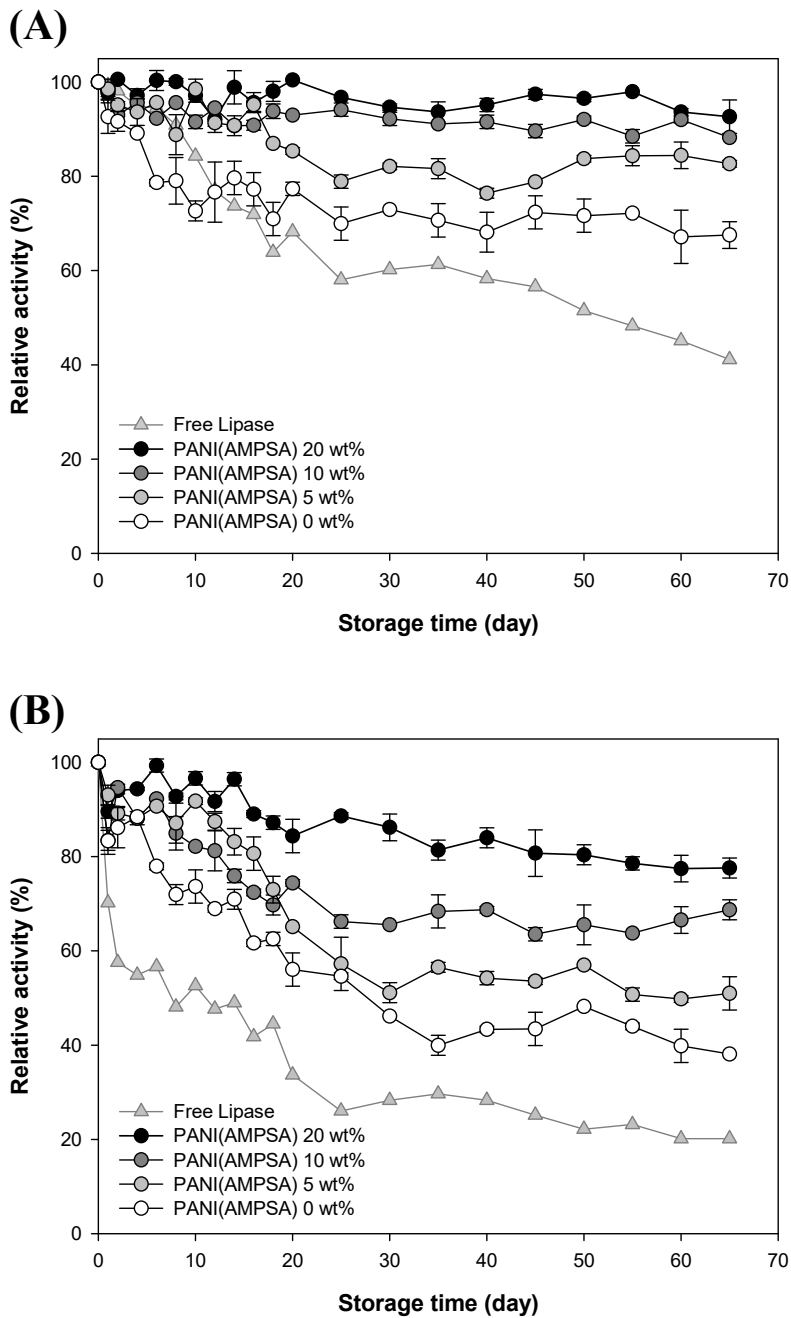


Figure 23. Stability of free lipase and immobilized lipase while storing at (A) 4°C and (B) 25°C. Polyaniiline concentration : 0, 5, 10 and 20 wt%.

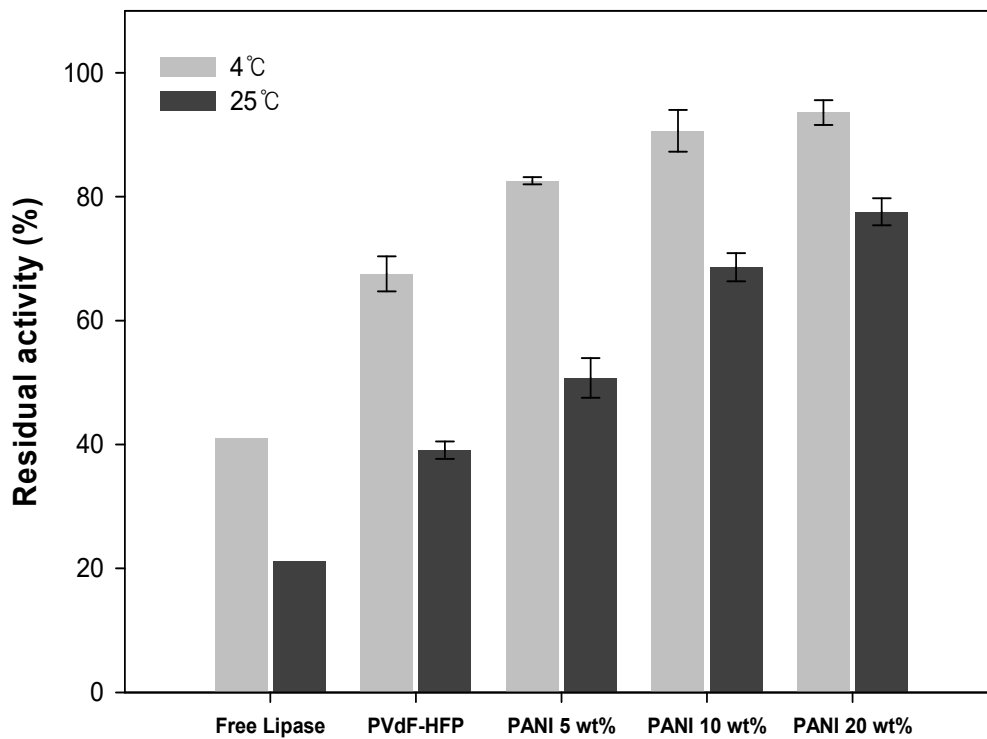


Figure 24. Residual activity of immobilized lipase after 2 months of storage at 4°C and 25°C.

## 제4절 Microreactor

### 1. 체류시간에 따른 전환율

Microreactor에서 더 높은 수율을 얻을 수 있는 가장 중요한 변수 중 하나는 체류시간이다. 사용한 Microreactor의 부피는 520  $\mu\text{L}$ 이며 흐름속도에 따른 정상 상태에서 전환율의 변화를 관찰하기 위해 Lipase microreactor의 연속 반응을 실시하였다. 반응기에서 고정화 된 Lipase 활성의 체류시간 의존성은 0.25-6 mL/min로 Flow rate를 조절함으로써 5.2-124.8 s 범위의 체류시간( $\tau$ )에서 조사되었다.

Figure 25에서 흐름속도가 증가할수록 물질전달 저항을 감소시키는 효과가 있지만 기질과 효소 활성 부위의 분포와 접촉시간이 줄어들고 생성물의 농도가 낮아지게 된다. 기질이 Microreactor에 머무는 시간이 길어질수록 효소와 기질의 접촉시간이 늘어나기 때문에 출구의 생성물 농도는 점점 증가하였으며, 체류시간( $\tau$ )이 124.8 s (0.25 mL/min)일 때 95.20%의 최대 전환율을 보였다.

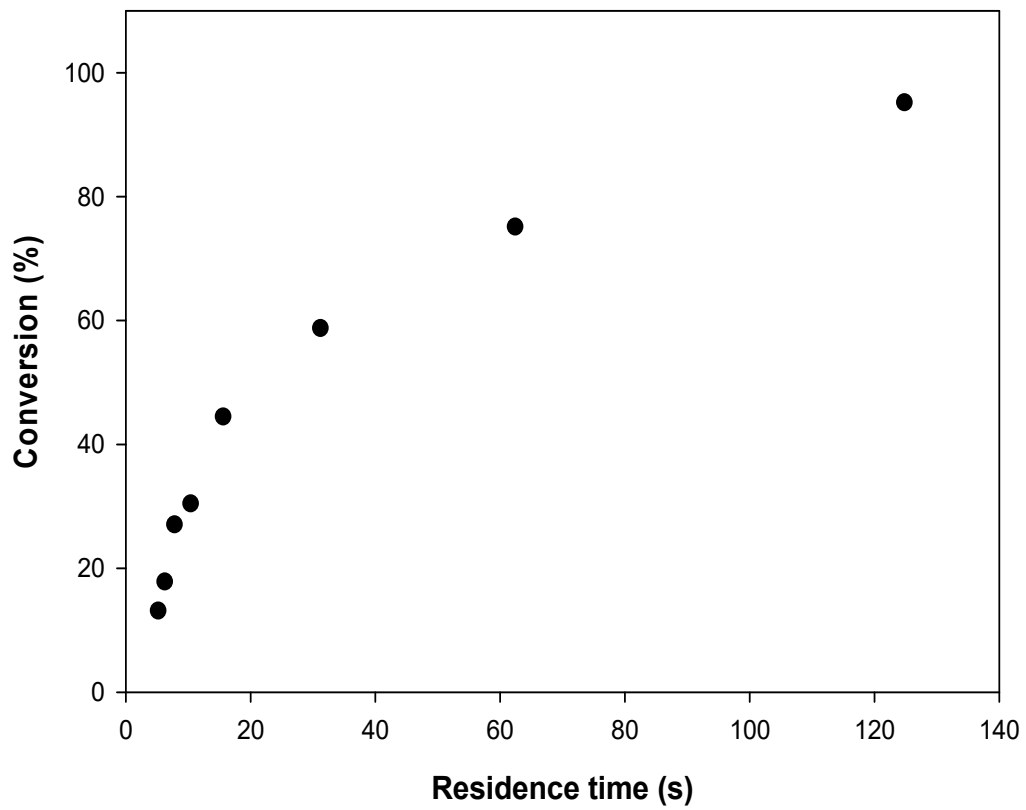


Figure 25. Effect of residence time on conversion using immobilized lipase microreactor.



## 2. Microreactor 조건 최적화

고정화 된 Lipase를 실제 공정에 접목시키기 위하여 활성이 가장 높았던 PANI(20 wt%) 담체로 Microreactor를 제조하여 반응을 연속적으로 수행하였으며, Flow rate의 변화로 출구 생성물 농도에 미치는 영향을 Figure 26에 나타내었다.

기질(0.1 mM)을 25°C에서 주입하였으며, Flow rate가 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL/min으로 증가하면 체류시간( $\tau$ )은 31.2, 15.6, 10.4, 7.8, 6.24, 5.2 s 이고, Lipase에 의해 가수분해된 *p*-Nitrophenol의 농도는 각각 0.059, 0.044, 0.030, 0.026, 0.017, 0.012 mM으로 감소하였다. 이는 반응 기질의 유속이 느릴수록 효소와 기질의 접촉하는 시간이 길어지므로 효소-기질반응을 할 수 있는 시간이 증가하여 Hydrolysis 반응이 증가하고, 따라서 출구의 *p*-Nitrophenol의 농도가 증가하였다. Microreactor의 Flow rate에 대한 전환율을 계산하여 생산성을 나타내었을 때 *p*-Nitrophenol의 Productivity는 Flow rate가 빨라질수록 점차 증가하다가 감소하는 경향을 보였다. Flow rate가 증가함에 따라, 반응기에서 나노섬유의 체류시간이 단축되고 출구에서 *p*-Nitrophenol의 농도가 감소하였다. 경계층을 통한 물질 전달속도가 유속에 따라 감소하기 때문에 유속이 4 mL/min ( $\tau=7.8$  s)으로 증가함에 따라 생산성이 최대 12.32 mol/h·L에 도달하였다. 따라서 최적 Flow rate를 4 mL/min으로 설정한 후 연속 생산을 위해 장시간 작동시켰다. 동일한 PVdF-HFP/PANI 담체를 같은 체적의 Batch 반응보다 Microreactor에 접목한 경우 1081.3배 증가하였다. 연속흐름반응기는 Batch 반응에 비해 증가된 생산성을 보여주었다 (Figure 27). 이는 확산 경로를 감소시키기 위한 나노섬유 담체의 증가 된 표면적과 미세 혼합이 가능한 작은 부피의 반응 챔버로 효소-기질간의 반응성을 증가시켰기 때문이다.

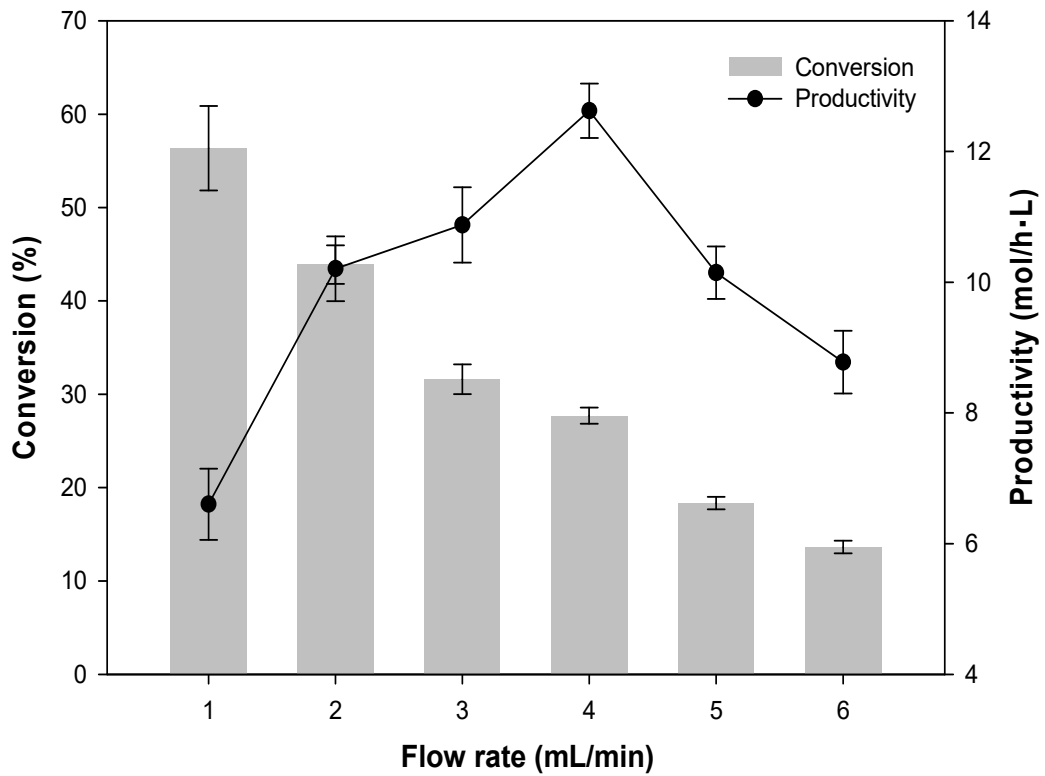


Figure 26. Effects of flow rate on the conversion and productivity.

Reaction conditions : temperature 25°C, substrate concentration 0.1 mM.

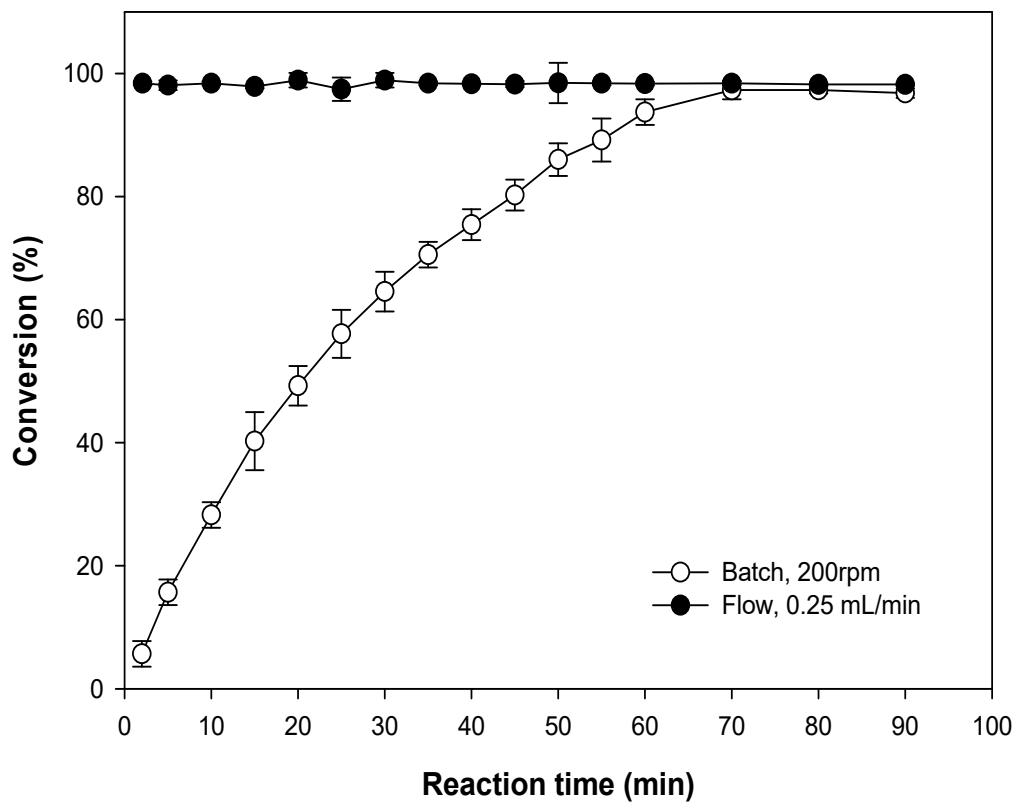


Figure 27. Conversion of *p*-NPB in a batch (○) and in a miniaturized continuous flow reactor (●). Reaction conditions : substrate concentration 0.1 mM *p*-NPB, temperature 25°C, 200 rpm (for the batch reaction).

### 3. 효소 연속 반응 운전 안정성

Microreactor에서 기질인 *p*-NPB를 공급하면서 Lipase의 가수분해 활성을 연속적으로 측정하였다 (Figure 28). Water bath를 이용하여 온도 조건을 25, 60, 70°C로 유지하면서 Lipase의 활성을 측정하여 상대 활성으로 나타내었다.

Free Lipase는 60°C에서 90 min 후에 활성을 잃어버린 반면에 고정화된 Lipase는 60°C에서 90 min경과 후 잔여활성이 78.8%, 70°C에서는 69.5%를 유지하였다. 장시간동안 연속운전을 실시하여 효소의 활성 변화를 측정한 결과 9 h 경과 후 25°C에서 여전히 초기 활성을 유지하였다. 반응온도가 높아질수록 효소 활성을 빠르게 잃었으며 60°C에서 잔여 활성은 55.0%, 70°C의 경우 36.1% 남아있는 것을 확인하였다. Free Lipase에 비해 고정화 효소의 열 안정성 증가는 나노섬유의 복잡한 구조가 열의 영향을 감소시키고, Lipase와 PANI가 첨가된 PVdF-HFP 나노 섬유 사이의 상호 작용으로 효소의 구조적 변화가 감소되어 열 안정성이 높아졌다고 사료된다. 따라서 PVdF-HFP/PANI에 고정화한 Lipase는 연속 흐름 반응으로 사용할 경우 불안정한 온도에서도 연속적으로 생산이 가능하기 때문에 안정성과 생산성에서 모두 우수함을 알 수 있다.

투입되는 기질의 속도를 4 mL/min으로 고정하고 *p*-NPB의 농도를 0.1 mM로 하여 25°C에서 연속 흐름 운전을 65일 동안 장기적으로 실시한 결과가 Figure 29에 나와있다. 시간이 지날수록 전환율은 서서히 감소하였지만 30일이 지난 후에는 86.4% 활성이 남아있었고, 65일이 지난 후에는 75.2% 활성을 유지하여 장기간 연속반응의 안정성을 입증하였다.

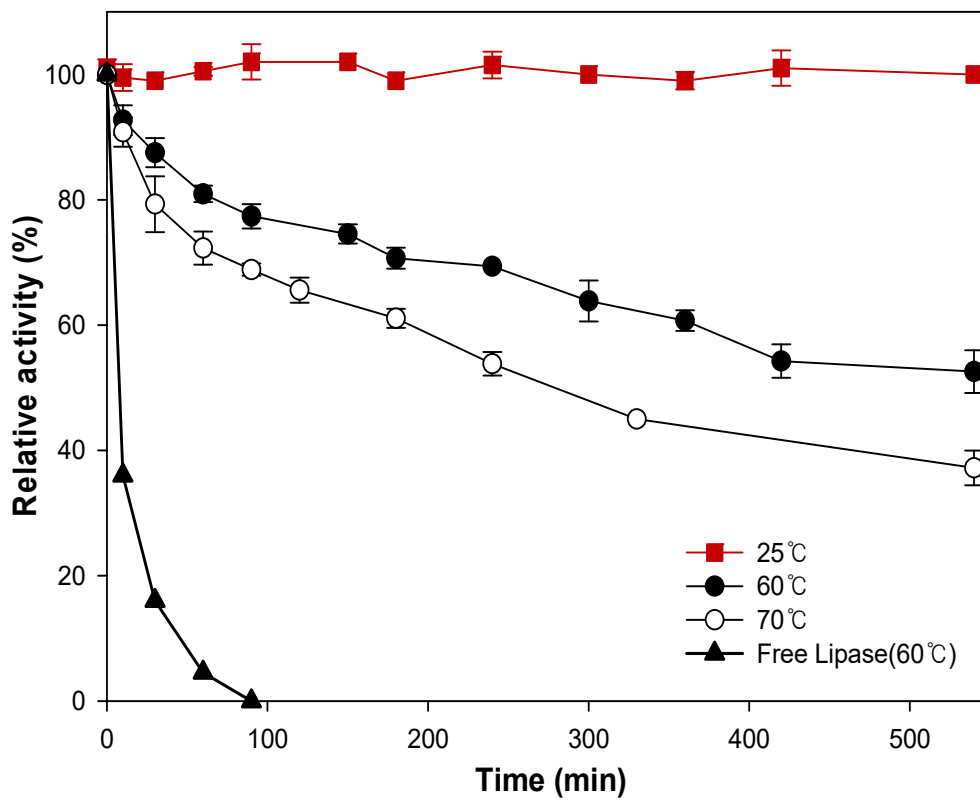


Figure 28. Effects of operation time and temperature on conversion.

Reaction conditions: temperature 25, 60 and 70°C, flow rate 4 mL/min, substrate concentration 0.1 mM.

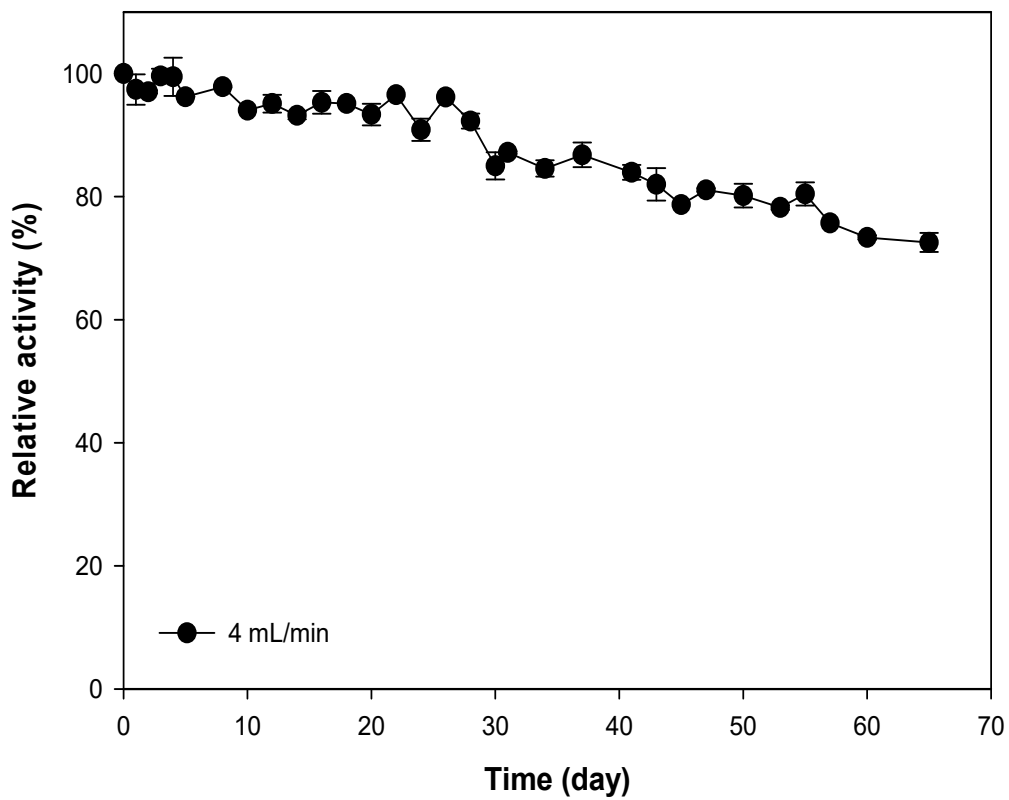


Figure 29. Effects of operation time on conversion. Reaction conditions: temperature 25°C flow rate 4 mL/min, substrate concentration 0.1 mM.

## 제5절 $\beta$ -Galactosidase 고정화

### 1. pH와 열에 대한 안정성

Figure 30 (A)는 Free  $\beta$ -Galactosidase와 고정화 된  $\beta$ -Galactosidase의 활성에 대한 pH의 영향을 나타내었다.  $\beta$ -Galactosidase의 최적 pH는 7.0으로 동일하게 나타났으며 산성과 염기성 pH 범위에서 Free  $\beta$ -Galactosidase 보다 더 높은 활성을 나타냈다. 산성 (pH 5.0)에서 고정화된 효소는 44.3%의 활성을 유지한 Free 효소보다 77.3%의 활성을 유지하였고, 염기성 (pH 9.0)에서 고정화된 효소는 60.2% 유지한 반면 Free 효소는 33.9%만을 유지하였다. 이러한 결과로부터, PVdF-HFP/PANI 나노섬유에 고정화 된  $\beta$ -Galactosidase는 산성 조건뿐만 아니라 염기성 조건에서도 더 우수한 잔여 활성을 나타냈다. 이러한 개선된 활성은 지지체 상에 이온화 가능한 작용기의 존재 및  $\beta$ -Galactosidase와 PANI 사이의 강한 공유 결합으로 인한 효소 분자의 안정화 효과로 인해 발생할 수 있다.

Figure 30 (B)는 Free  $\beta$ -Galactosidase와 고정화 된  $\beta$ -Galactosidase의 열에 의한 영향을 나타내었으며, Free와 고정화된 효소는 30°C에서 최대 활성을 나타내었다.  $\beta$ -Galactosidase의 고정화로 인하여 20°C에서 37°C까지 더 넓은 범위에서 안정적인 활성을 나타냈다. 또한 50°C에서 Free  $\beta$ -Galactosidase는 급격하게 효소 활성이 감소하여 5.9%만 남은 반면에 고정화된 효소는 38.5%를 유지하였다. 높은 활성을 갖는 넓은 온도 범위는 PVdF-HFP/PANI 나노섬유에 의한 효소에 제공되는 고정화 효과에 기인할 수 있다. Pereira-Rodríguez et al. [80]에 따르면, *K. lactis*의  $\beta$ -Galactosidase의 사량체는 이량체의 집합체로서, 사량체 구조보다 이량체의 해리 에너지가 더 높기 때문에 용액에 있을 때 효소의 이량체와 사량체 형태 사이에 평형을 일으킨다. 지지체에 효소의 결합은 어느 한 형태의 서브 유닛의 분해를 방지할 수 있고 효소의 구조가 안정화된다. 고정화 효소는 불균일 촉매이지만, pH 및 온도에 대한 넓은 범위는 상이한 조건하에 적용을 허용하여 산업적 용도를 개선함으로써 고정화 효소를 선택할 수 있다.

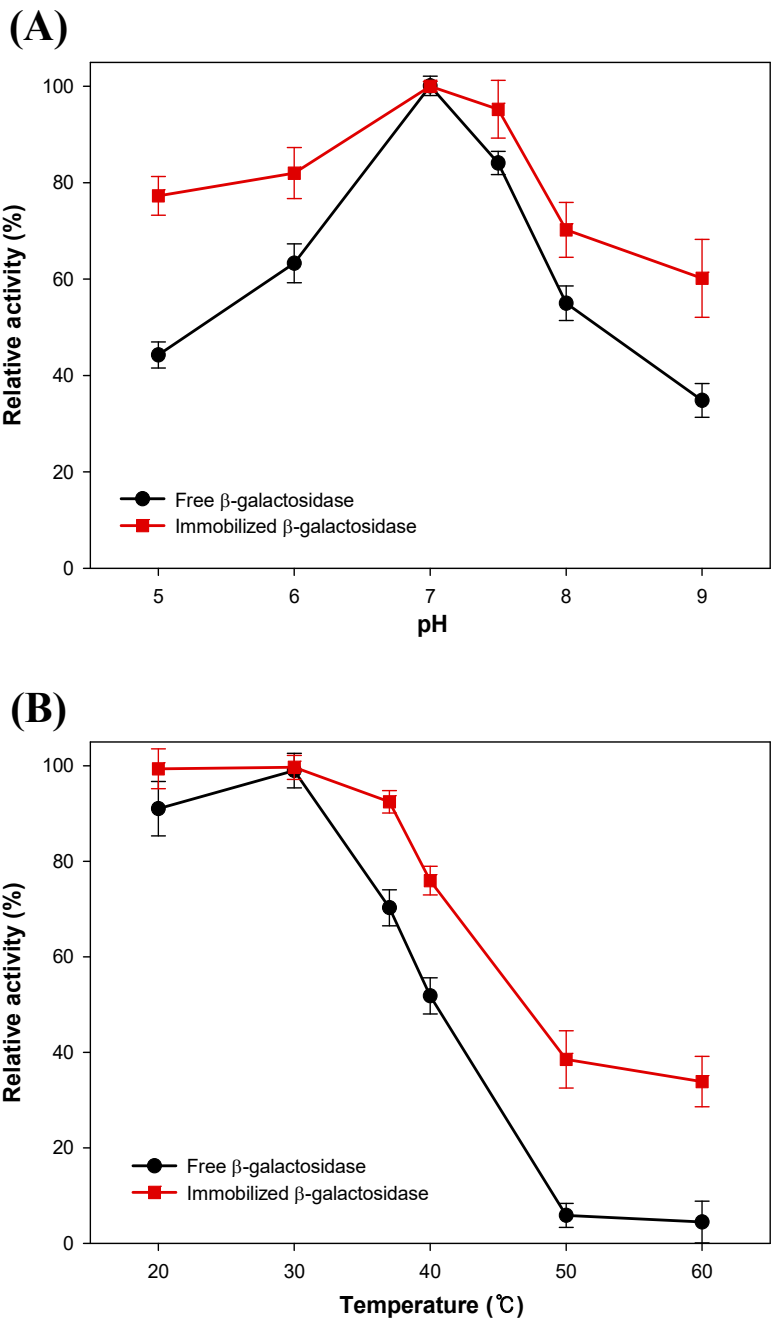


Figure 30. Effect (A) pH and (B) temperature on the activity of free  $\beta$ -Galactosidase (●) and immobilized  $\beta$ -Galactosidase (■).



## 2. 재사용과 저장 안정성

고정화 된 효소의 재사용에 관한 연구는 반복(Batch) 또는 연속 공정을 위한 생촉매의 산업 잠재력을 평가하는 데 중요하다. PVdF-HFP/PANI에 고정화 된  $\beta$ -Galactosidase의 재사용성은 Figure 31 (A)에 나타내었다. 고정화 된 효소는 5번째까지 초기 활성의 80% 이상을 유지 하였고 10회의 재순환 후, 고정화된  $\beta$ -Galactosidase는 초기 활성의 약 60%를 유지하였다. 이러한 감소는 반복 사용 동안 나노섬유의 표면으로부터 효소 분자가 탈리되기 때문일 것이다. 많은 연구에 따르면 저장 동안 효소 안정성이 감소하는 것으로 나타났다. Free  $\beta$ -Galactosidase와 고정화된  $\beta$ -Galactosidase의 저장 안정성 테스트는 다른 온도 조건(4°C와 25°C)에서 30일 동안 측정되었다 (Figure 31 (B)). Free  $\beta$ -Galactosidase는 10일 이내에 활성을 잃었지만 고정화 된  $\beta$ -Galactosidase는 10일이 경과하였을 때 73.2% (4°C), 44.2% (25°C)의 잔여 활성을 유지하였다. 30일 후 4°C에서 49.0%의 활성을 유지 하였고, 25°C에 저장된 고정화 효소의 경우 30.0% 활성이 남아있었다. 고정화 된  $\beta$ -Galactosidase의 증가된 열 안정성은 일부 열을 흡수하여  $\beta$ -Galactosidase를 열 변성으로부터 보호하는 안정화 된 PANI 때문이라고 사료된다.

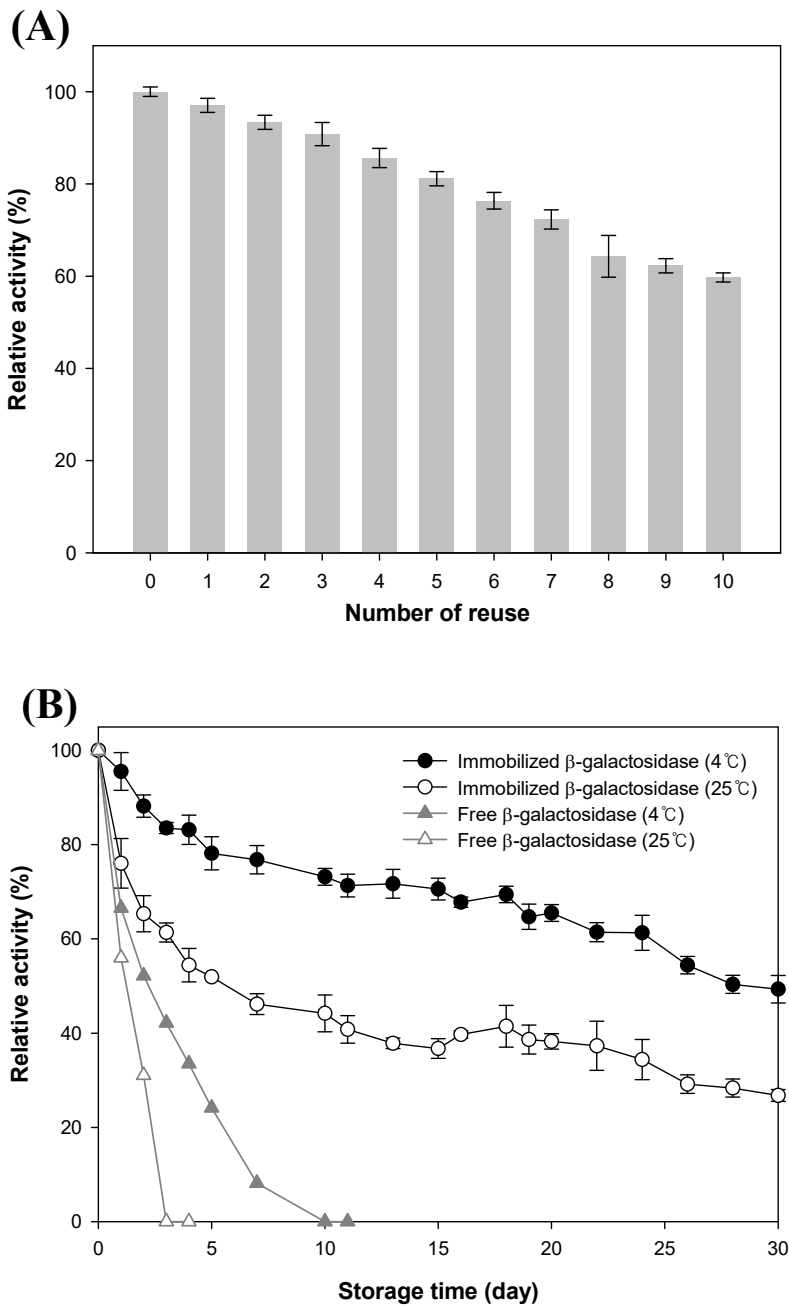


Figure 31. (A) Effect of enzyme recycle on the activity of immobilized  $\beta$ -Galactosidase. (B) Stability of free ( $\blacktriangle$ ) and immobilized ( $\bullet$ )  $\beta$ -Galactosidase while storing at 4°C and 25°C.

### 3. Microreactor 조건 최적화

고정화 된  $\beta$ -Galactosidase를 실제 공정에 적용하기 위해 연속 반응을 수행하였다. Flow rate의 변화로 인한 출구 생성물 농도의 영향을 Figure 32에 나타내었다. 기질(0.1 mM)을 25°C에서 주입하였으며, Flow rate를 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL/min으로 증가시켰을 때 체류시간( $\tau$ )는 62.4, 31.2, 15.6, 10.4, 7.8, 6.24 s 이고,  $\beta$ -Galactosidase에 의해 분해된 *o*-Nitrophenol의 농도는 각각 0.054, 0.044, 0.031, 0.027, 0.015, 0.011 mM으로 감소하였다. 이는 반응 기질의 유속이 느릴수록 효소와 기질의 접촉하는 시간이 길어지므로 효소-기질반응을 할 수 있는 시간이 증가하였기 때문이다. Microreactor의 부피를 고려하여 Flow rate에 대한 전환율을 계산하여 생산성을 계산한 결과 *o*-Nitrophenol의 Productivity는 Flow rate가 빨라질수록 점차 증가하다가 감소하는 경향을 보였다. Flow rate가 3 mL/min ( $\tau=10.24$  s)로 흐를 때 생산성은 최대 9.38 mol/h·L에 도달하였다. 따라서 최적 Flow rate를 3 mL/min으로 설정한 후 연속 생산을 위해 장시간 작동시켰다. 동일한 PVdF-HFP/PANI 담체를 같은 체적의 Batch 반응과 비교하였을 때 Microreactor에 접목한 경우 효소 반응속도가 248.7배 증가함을 확인하였다.

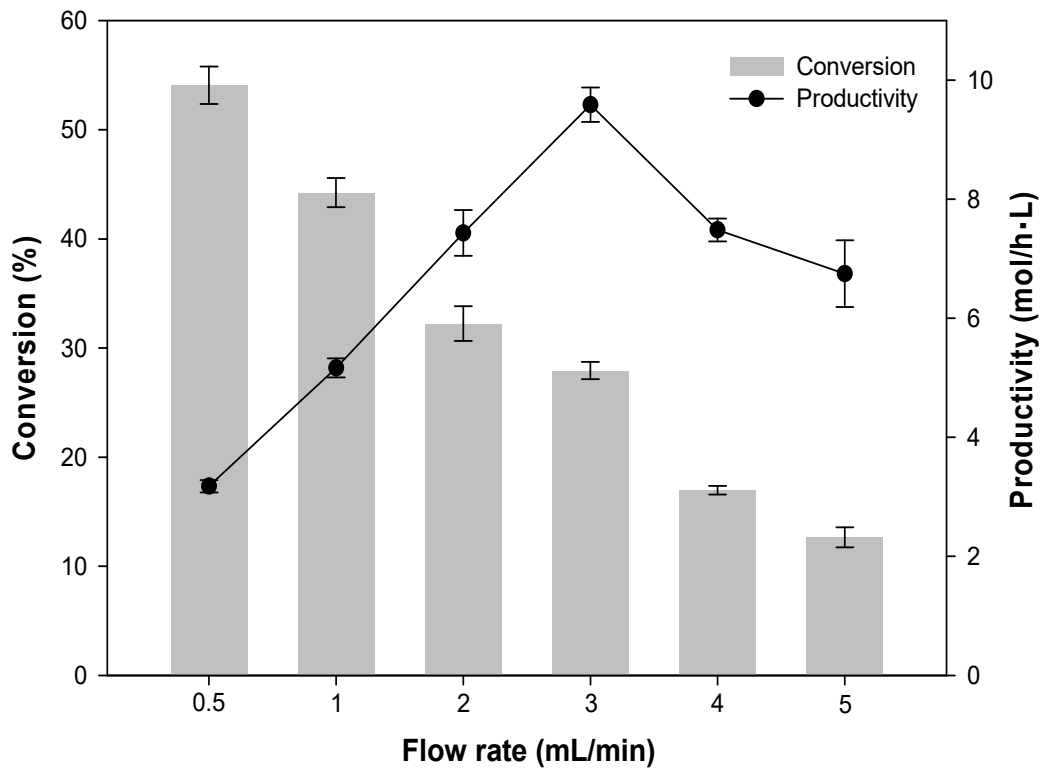


Figure 32. Effects of flow rate on the conversion and productivity.

Reaction conditions : temperature 25°C, substrate concentration 0.1 mM.

#### 4. 연속 반응 안정성

Microreactor에서 기질인 ONPG를 공급하면서  $\beta$ -Galactosidase의 활성을 연속적으로 측정하였다. 투입되는 기질의 속도를 3 mL/min으로 고정하고 ONPG의 농도를 0.1 mM로 하여 25°C에서 연속 흐름 운전을 30일 동안 장기적으로 실시한 결과가 Figure 33에 나타나있다. 시간이 지날수록 전환율은 서서히 감소하였지만 10일이 지난 후에는 81.31% 활성이 남아있었고, 30일이 지난 후에는 65.81% 활성을 유지하여 장기간 연속반응의 안정성을 입증하였다.

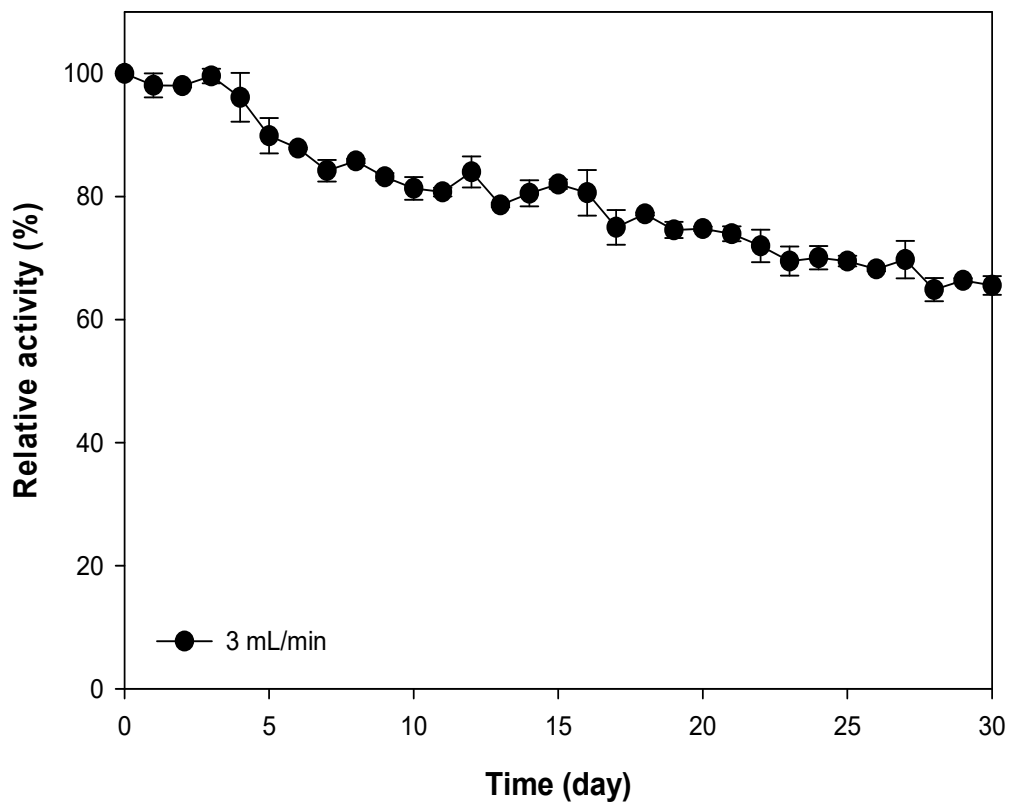


Figure 33. Effects of operation time on conversion. Reaction conditions: temperature 25°C, flow rate 3 mL/min, substrate concentration 0.1 mM.

## 제4장 결론

본 연구에서는 PANI과 PVdF-HFP를 Blending하여 복합 나노섬유를 제조한 뒤 효소 담체로 이용하여 Lipase (from *Aspergillus niger*)와  $\beta$ -Galactosidase (from *kluyveromyces lactis*)를 고정화하는 연구를 수행하였다. 불용성 고분자인 PANI의 용해도를 높이기 위해 AMPSA를 도핑하여 N,N'-DMF/Acetone (7:3, v/v)용매에 20 wt% 용해시키는데 성공하였다. 나노섬유에 PANI의 농도가 증가할수록 효소의 안정성도 향상되었다.

결과는 다음과 같다.

1) PVdF-HFP 고분자 용액에 PANI를 각각 0, 5, 10, 20 wt% 함유한 담체에 1 mg/mL 농도의 효소를 고정화 시킨 후 고정화율을 측정한 결과 PANI의 농도가 높아질수록 고정화율도 높아졌다. 따라서 효소를 나노섬유에 고정하는데 PANI의 아민기가 주된 역할을 하였다.

2) 고정화된 Lipase의 pH와 열에 대한 안정성을 평가한 결과, PVdF-HFP/PANI 나노섬유와 Lipase간의 강한 공유결합으로 높은열로 부터 Lipase의 구조변화는 방지할 수 있었으나 이온화 변화에서는 한계를 갖는 것으로 보인다.

3) 고정화 된  $\beta$ -Galactosidase는 산성 조건뿐만 아니라 염기성 조건에서도 더 우수한 잔여 활성을 나타냈으며, 더 넓은 온도범위에서 안정적인 활성을 나타냈다. 따라서 PVdF-HFP/PANI 고정화된  $\beta$ -Galactosidase는 불안정한 온도와 pH에서도 적용될 수 있다.

4) Lipase와  $\beta$ -Galactosidase는 저장 온도(4°C, 25°C)와 관계없이 나노섬유에 고정화함으로써 효소의 저장 안정성이 향상되었으며, PANI의 농도가 증가할수록 효소의 안정성도 증가되었다.

5) 고정화된 Lipase의 경우 Flow rate가 4 mL/min ( $\tau=7.8$  s)일 때 12.3 mol/h·L의 최대 생산성을 보였다. 동일한 PVdF-HFP/PANI 담체를 같은 체적의 Batch 반응보다 Microreactor에 접목한 경우 반응속도가 1081.3배 증가하였다. 연속 흐름 운전을 65일 동안 장기적으로 실시한 결과, 75.2%의 활성을 유지하여 장기간 연속반응의 안정성을 입증하였다.

6) 고정화 된  $\beta$ -Galactosidase의 경우 flow rate가 3 mL/min ( $\tau=10.4$  s)로 흐를 때 생산성은 최대 9.38 mol/h·L에 도달하였다. 동일한 PVdF-HFP/PANI 담체를 같은 체적의

Batch 반응과 비교하였을 때 Microreactor에 접목한 경우 248.7배 생산속도가 빨라짐을 확인하였다.  $\beta$ -Galactosidase Microreactor를 30일 동안 연속운전 후에도 65.81% 활성을 유지하여 장기간 연속반응의 안정성을 입증하였다.

본 연구를 통하여 PANI를 Blending하여 제조한 PVdF-HFP/PANI 복합 나노섬유가 효소의 고정화에 매우 효과적인 담체로 사용될 수 있음을 확인하였다. 특히, PVdF-HFP/PANI(20 wt%)에 고정화된 Lipase와  $\beta$ -Galactosidase는 불안정한 pH와 온도조건, 재사용성과 장기 저장성에서 안정성이 향상되는 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 PANI 나노섬유를 효소 고정화 지지체로서 활용할 수 있는 방안으로 제시할 수 있다. 또한, PANI는 높은 전도성소재로서 효소 고정화 기술과 더하여 생물의학, 생물전자공학, 바이오 촉매, 바이오센서 등의 분야에서 활발히 연구될 것으로 기대된다.



## 참고문헌

1. Cowan, D.A. and R. Fernandez-Lafuente, *Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization*. Enzyme and Microbial Technology, 2011. 49: p. 326-346.
2. Li, J., et al., *Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun magnetic nanofibers for phenol removal*. Ecotoxicology and environmental safety, 2019. 170: p. 716-721.
3. Hasan, F.A., et al., *Zeolite monoliths with hierarchical designed pore network structure: Synthesis and performance*. Chemical engineering journal, 2013. 223: p. 48-58.
4. Jin, W.-B., Y. Xu, and X.-W. Yu, *Improved catalytic performance of lipase under non-aqueous conditions by entrapment into alkyl-functionalized mesoporous silica*. New Journal of Chemistry, 2019. 43: p. 364-370.
5. Gupta, S., C. Murthy, and C.R. Prabha, *Recent advances in carbon nanotube based electrochemical biosensors*. International journal of biological macromolecules, 2018. 108: p. 687-703.
6. Aghababaie, M., et al., *Novel approaches to immobilize Candida rugosa lipase on nanocomposite membranes prepared by covalent attachment of magnetic nanoparticles on poly acrylonitrile membrane*. RSC advances, 2018. 8: p. 4561-4570.
7. Liu, D.-M., J. Chen, and Y.-P. Shi,  *$\alpha$ -Glucosidase immobilization on chitosan-modified cellulose filter paper: Preparation, property and application*. International journal of biological macromolecules, 2019. 122: p. 298-305.
8. Liu, J., R.-T. Ma, and Y.-P. Shi, *"Recent advances on support materials for lipase immobilization and applicability as biocatalysts in inhibitors screening methods"-A Review*. Analytica Chimica Acta, 2019.

9. Misson, M., et al., *Interfacial Biocatalytic Performance of Nanofiber-Supported  $\beta$ -Galactosidase for Production of Galacto-Oligosaccharides*. *Catalysts*, 2020. 10: p. 81.
10. Ghasemi-Mobarakeh, L., et al., *Electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering*. *Biomaterials*, 2008. 29: p. 4532-4539.
11. Wang, B., et al., *Hollow polycaprolactone composite fibers for controlled magnetic responsive antifungal drug release*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016. 145: p. 757-767.
12. Zhang, C., et al., *Janus particle synthesis via aligned non-concentric angular nozzles and electrohydrodynamic co-flow for tunable drug release*. *RSC advances*, 2016. 6: p. 77174-77178.
13. Niu, Q., et al., *Bimetal-organic frameworks/polymer core-shell nanofibers derived heteroatom-doped carbon materials as electrocatalysts for oxygen reduction reaction*. *Carbon*, 2017. 114: p. 250-260.
14. Huang, J.J., et al., *Fabrication of bead-on-string polyacrylonitrile nanofibrous air filters with superior filtration efficiency and ultralow pressure drop*. *Separation and Purification Technology*, 2020. 237: p. 116377.
15. Yao, Z.-C., et al., *Controlled morphing of microbubbles to beaded nanofibers via electrically forced thin film stretching*. *Polymers*, 2017. 9: p. 265.
16. Bhushani, J.A. and C. Anandharamakrishnan, *Electrospinning and electrospaying techniques: Potential food based applications*. *Trends in Food Science & Technology*, 2014. 38: p. 21-33.
17. Wang, X., et al., *Fabrication and properties of PVDF and PVDF-HFP microfiltration membranes*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2018. 135: p. 46711.

18. Guo, H., et al., *Thermal conductivity of PVDF/PANI-nanofiber composite membrane aligned in an electric field*. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2018. 26: p. 1213-1218.
19. Datta, S., L.R. Christena, and Y.R.S. Rajaram, *Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials*. 3 Biotech, 2013. 3: p. 1-9.
20. Basso, A. and S. Serban, *Industrial applications of immobilized enzymes—A review*. Molecular Catalysis, 2019. 479: p. 110607.
21. Peng, Z., K. Hidajat, and M. Uddin, *Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles*. Journal of colloid and interface science, 2004. 271: p. 277-283.
22. Jesionowski, T., J. Zdarta, and B. Krajewska, *Enzyme immobilization by adsorption: A review*. Adsorption, 2014. 20: p. 801-821.
23. Liu, D.-M., J. Chen, and Y.-P. Shi, *Tyrosinase immobilization on aminated magnetic nanoparticles by physical adsorption combined with covalent crosslinking with improved catalytic activity, reusability and storage stability*. Analytica chimica acta, 2018. 1006: p. 90-98.
24. Ding, C., et al., *Photothermal enhanced enzymatic activity of lipase covalently immobilized on functionalized Ti3C2TX nanosheets*. Chemical Engineering Journal, 2019. 378: p. 122205.
25. Zdarta, J., et al., *A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility*. Catalysts, 2018. 8: p. 92.
26. Melo, R.R.d., et al., *New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation: a tool for enzyme immobilization at neutral pH*. Molecules, 2017. 22: p. 1088.
27. Kumar, S., et al., *Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase from Bacillus licheniformis*. International journal of

- biological macromolecules, 2017. 98: p. 24-33.
28. Rodrigues, R.C., et al., *Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions*. *Biotechnology advances*, 2019. 37: p. 746-770.
  29. Miao, C., et al., *Lipase immobilization on amino-silane modified superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production*. *Fuel*, 2018. 224: p. 774-782.
  30. Sti, P.L., et al., *Electrospun polylactic acid and polyvinyl alcohol fibers as efficient and stable nanomaterials for immobilization of lipases*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2016. 39: p. 449-459.
  31. Liu, X., et al., *Electrospun nanofibrous membranes containing epoxy groups and hydrophilic polyethylene oxide chain for highly active and stable covalent immobilization of lipase*. *Chemical Engineering Journal*, 2018. 336: p. 456-464.
  32. Husain, Q.,  *$\beta$  Galactosidases and their potential applications: a review*. *Critical reviews in biotechnology*, 2010. 30: p. 41-62.
  33. Oliveira, C., P.M. Guimarães, and L. Domingues, *Recombinant microbial systems for improved  $\beta$ -galactosidase production and biotechnological applications*. *Biotechnology advances*, 2011. 29: p. 600-609.
  34. Dahari, R.F., C.M. Ongkudon, and M. Misson, *Effect of Crosslinkers on Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase on Polymethacrylate Monolith*. *Transactions on Science and Technology*, 2018. 5: p. 106-113.
  35. Kayhan, N., V. Eypoęlu, and Ő. Adem. *The immobilization of lipase on PVDF-co-HFP membrane*. in *AIP Conference Proceedings*. 2016. AIP Publishing LLC.
  36. Xu, W., et al., *Immobilization of cellulase proteins on zeolitic imidazolate framework (ZIF-8)/polyvinylidene fluoride hybrid membranes*. *New Journal of*

Chemistry, 2018. 42: p. 17429-17438.

37. Ebadi, S.V., et al., *Immobilization of acetylcholinesterase on electrospun poly (acrylic acid)/multi-walled carbon nanotube nanofibrous membranes*. RSC Advances, 2015. 5: p. 42572-42579.
38. Shawky, A.I., et al., *Enhancing antimicrobial properties of poly (vinylidene fluoride)/hexafluoropropylene copolymer membrane by electron beam induced grafting of N-vinyl-2-pyrrolidone and iodine immobilization*. RSC advances, 2016. 6: p. 42461-42473.
39. Ghollasi, M., *Electrospun polyethersulfone nanofibers: a novel matrix for alpha-amylase immobilization*. Journal of Applied Biotechnology Reports, 2018. 5: p. 19-25.
40. Işik, C., et al., *Synthesis and characterization of electrospun PVA/Zn<sup>2+</sup> metal composite nanofibers for lipase immobilization with effective thermal, pH stabilities and reusability*. Materials Science and Engineering: C, 2019. 99: p. 1226-1235.
41. Xue, J., et al., *Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications*. Chemical reviews, 2019. 119: p. 5298-5415.
42. Teo, W.-E., R. Inai, and S. Ramakrishna, *Technological advances in electrospinning of nanofibers*. Science and technology of advanced materials, 2019.
43. Ding, J., et al., *Electrospun polymer biomaterials*. Progress in Polymer Science, 2019. 90: p. 1-34.
44. Li, Y., et al., *Electrospun nanofibers for sensors*, in *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*. 2019, Elsevier. p. 571-601.
45. Rathod, M., et al., *Hybrid polymer microfluidic platform to mimic varying vascular compliance and topology*. Lab on a Chip, 2017. 17: p. 2508-2516.
46. Cha, M., et al., *Biomolecular detection with a thin membrane transducer*. Lab on

- a Chip, 2008. 8: p. 932-937.
47. Rathod, M.L., et al., *Engineered ridge and micropillar array detectors to quantify the directional migration of fibroblasts*. RSC advances, 2017. 7: p. 51436-51443.
  48. Thangawng, A.L., et al., *An ultra-thin PDMS membrane as a bio/micro-nano interface: fabrication and characterization*. Biomedical microdevices, 2007. 9: p. 587-595.
  49. Kim, S., S. Han, and J. Lee, *Asymmetric bead aggregation for microfluidic immunodetection*. Lab on a Chip, 2017. 17: p. 2095-2103.
  50. MacDiarmid, A., et al., *Polyaniline: a new concept in conducting polymers*. Synthetic Metals, 1987. 18: p. 285-290.
  51. Molapo, K.M., et al., *Electronics of conjugated polymers (I): polyaniline*. 2012.
  52. Uh, K., et al., *A precursor approach to electrospun polyaniline nanofibers for gas sensors*. Macromolecular Materials and Engineering, 2016. 301: p. 1320-1326.
  53. Zeghioud, H., et al., *Chemical synthesis and characterization of highly soluble conducting polyaniline in mixtures of common solvents*. Journal of the Serbian Chemical Society, 2015. 80: p. 917-931.
  54. Ayad, M.M. and E.A. Zaki, *Doping of polyaniline films with organic sulfonic acids in aqueous media and the effect of water on these doped films*. European Polymer Journal, 2008. 44: p. 3741-3747.
  55. Bhadra, J., et al., *Polyaniline/polyvinyl alcohol blends: Effect of sulfonic acid dopants on microstructural, optical, thermal and electrical properties*. Synthetic metals, 2014. 191: p. 126-134.
  56. Karaođlan, N. and C. Bindal, *Synthesis and optical characterization of benzene sulfonic acid doped polyaniline*. Engineering science and technology, an international journal, 2018. 21: p. 1152-1158.

57. Hamidović, M., F. Ender, and A. Springer. *A Novel Enzymatic Microreactor: Towards Transforming the Pharmaceutical Industry*. in *International Conference on Medical and Biological Engineering*. 2019. Springer.
58. Mason, B.P., et al., *Greener approaches to organic synthesis using microreactor technology*. *Chemical reviews*, 2007. 107: p. 2300-2318.
59. Budžaki, S., et al., *Is there a future for enzymatic biodiesel industrial production in microreactors?* *Applied Energy*, 2017. 201: p. 124-134.
60. Gkantzou, E., M. Patila, and H. Stamatis, *Magnetic microreactors with immobilized enzymes—from assemblage to contemporary applications*. *Catalysts*, 2018. 8: p. 282.
61. Kim, H., et al., *Immobilization of glucose oxidase into polyaniline nanofiber matrix for biofuel cell applications*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. 26: p. 3908-3913.
62. Mustaffa, N.A., et al., *Dodecylbenzene sulfonic acid concentration effect on electrical and thermal properties of polyaniline*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 2017. 21(4): p. 950-957.
63. Khalid, M., et al., *Electrical conductivity studies of polyaniline nanotubes doped with different sulfonic acids*. *Indian Journal of Materials Science*, 2013.
64. Gribkova, O.L., et al., *Preparation of polyaniline in the presence of polymeric sulfonic acids mixtures: the role of intermolecular interactions between polyacids*. *Chemical Papers*, 2013. 67: p. 952-960.
65. Shao, W., et al., *The effect of a small amount of water on the structure and electrochemical properties of solid-state synthesized polyaniline*. *Materials*, 2012. 5: p. 1811-1825.
66. Shen, J., et al., *Enhanced adsorption of cationic and anionic dyes from aqueous solutions by polyacid doped polyaniline*. *Synthetic Metals*, 2018. 245: p. 151-159.
67. Bhadra, J., et al., *High performance sulfonic acid doped polyaniline-polystyrene*

- blend ammonia gas sensors*. Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 2016. 27: p. 8206-8216.
68. Simotwo, S.K., C. DelRe, and V. Kalra, *Supercapacitor electrodes based on high-purity electrospun polyaniline and polyaniline-carbon nanotube nanofibers*. ACS applied materials & interfaces, 2016. 8: p. 21261-21269.
  69. Merlini, C., et al., *Electrospinning of doped and undoped-polyaniline/poly (vinylidene fluoride) blends*. Synthetic Metals, 2016. 213: p. 34-41.
  70. Elayappan, V., et al., *Development of a conjugated polyaniline incorporated electrospun poly (vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene) composite membrane electrolyte for high performance dye-sensitized solar cells*. Journal of Applied Polymer Science, 2015. 132.
  71. Ahmad, A.L. and N.A. Hameed, *Influence of Solvent and Thickness Variation on the Performance of Poly (Vinylidene Fluoride-co-hexafluoropropylene) Polymer Membrane*. Journal of Physical Science, 2018. 29.
  72. Dognani, G., et al., *Effective chromium removal from water by polyaniline-coated electrospun adsorbent membrane*. Chemical Engineering Journal, 2019. 372: p. 341-351.
  73. Fang, F.F., Y.-Z. Dong, and H.J. Choi, *Effect of oxidants on morphology of interfacial polymerized polyaniline nanofibers and their electrorheological response*. Polymer, 2018. 158: p. 176-182.
  74. López-Gallego, F., et al., *Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports*. Journal of Biotechnology, 2005. 119: p. 70-75.
  75. Barbosa, O., et al., *Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization*. Rsc Advances, 2014. 4: p. 1583-1600.
  76. Hay, I.D., et al., *Microbial alginate production, modification and its applications*.



- Microbial biotechnology, 2013. 6: p. 637-650.
77. Huang, X.-J., et al., *Immobilization of Candida rugosa lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011. 70: p. 95-100.
  78. Wan, D., et al., *A novel mesoporous nanocarrier: Integrating hollow magnetic fibrous silica with PAMAM into a single nanocomposite for enzyme immobilization*. Microporous and Mesoporous Materials, 2019. 280: p. 46-56.
  79. Salehi, Z., et al., *Lipase immobilized on functionalized superparamagnetic few-layer graphene oxide as an efficient nanobiocatalyst for biodiesel production from Chlorella vulgaris bio-oil*. 2020.
  80. Pereira-Rodríguez, Á., et al., *Structural basis of specificity in tetrameric Kluyveromyces lactis  $\beta$ -galactosidase*. Journal of structural biology, 2012. 177: p. 392-401.