



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 원 저작자를 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 권리와 책임은 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)



2020년 8월
석사학위논문

효소 고정화를 위한
TA-Fe^{III}/AAO Membrane 담체
개발 및 Micro-PFR 설계

조선대학교 대학원

화학공학과

조 은 영

효소 고정화를 위한
TA-Fe^{III}/AAO Membrane 담체
개발 및 Micro-PFR설계

**Fabrication of TA-Fe^{III}/AAO Membrane
Carrier for Enzyme Immobilization and
Development of Micro-PFR**

2020년 8월 28일

조선대학교 대학원

화학공학과

조 은 영

효소 고정화를 위한
TA-Fe^{III}/AAO Membrane 담체
개발 및 Micro-PFR 설계

지도교수 이중현

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2020년 5월

조선대학교 대학원

화학공학과

조은영

조은영의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이재욱 (인) 

위원 조선대학교 교수 신현재 (인) 

위원 조선대학교 교수 이중현 (인) 

2020년 6월

조선대학교 대학원

목 차

List of Tables	v
List of Figures	vi
ABSTRACT	ix
Abbreviations	xi
제1장 서론	1
제1절 연구 배경	1
제2절 이론적 배경	4
1. 효소 (Enzyme)	4
가. Lipase	4
가. Tyrosinase	5
2. 효소 고정화 (Enzyme immobilization)	7
3. Anodic aluminum oxide (AAO) membrane	11
4. Tannic acid (TA)	13
5. Plug flow reactor (PFR)	15
제2장 실험재료 및 방법	17

제1절 실험재료 및 기기	17
제2절 효소고정화 담체 제조 및 특성 분석	18
1. TA-Fe ^{III} /AAO membrane 담체 제조	18
가. TA-Fe ^{III} /AAO membrane 제조	18
나. TA-Fe ^{III} /AAO membrane에 효소 고정화	18
2. 효소고정화 특성	19
가. 효소 고정화	19
나. 효소 정량	19
다. 효소 활성 측정 방법	19
3. 고정화 효소의 pH와 온도에 따른 활성측정	20
4. 고정화 효소의 저장안정성	20
5. 고정화 효소의 재사용성 평가	20
제3절 고정화 담체를 이용한 micro-PFR	21
1. LIP/TA-Fe ^{III} /AAO membrane을 이용한 micro-PFR 설계	21
2. 체류시간에 따른 전환율과 생산성 측정	21
3. Micro-PFR에서 장기간 안정성	21
제4절 TA-Fe ^{III} /AAO membrane에 tyrosinase 고정화 및 적용	22
1. Tyrosinase activity 측정	22
2. TA-Fe ^{III} /AAO membrane에 tyrosinase 고정화	22
3. 고정화 tyrosinase의 저장 안정성과 재사용성측정	23

4. TYR/TA-Fe ^{III} /AAO membrane을 micro-PFR 적용	23
5. Micro-PFR의 작동 안정성 및 L-DOPA 연속 생산	23
제3장 결과 및 고찰	29
제1절 TA-Fe ^{III} /AAO membrane	29
1. TA와 FeCl ₃ 합성비율에 따른 효소고정화	29
2. Scanning electron microscopy (SEM) 측정	32
3. Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) 측정	35
제2절 TA-Fe ^{III} /AAO membrane 효소고정화	38
1. 고정화 효소의 pH와 온도에 따른 활성도 변화	38
2. 고정화 효소의 저장 안정성과 재사용성	41
제3절 TA-Fe ^{III} /AAO membrane기반 micro-PFR	44
1. TA-Fe ^{III} /AAO membrane을 이용한 micro-PFR 설계	44
2. 최적 체류시간 선정	47
3. Reactor수에 따른 전환율의 영향	49
4. Micro-PFR의 작동 안정성	51
제4절 TA-Fe ^{III} /AAO membrane에 tyrosinase 고정화 및 적용 ..	
.....	53
1. EA, EAC, EAPC 법에 따른 tyrosinase 활성	53
2. Free tyrosinase와 고정화 tyrosinase의 L-DOPA 생산	56

3. 고정화 tyrosinase의 저장 안정성과 재사용성	59
4. TYR/TA-Fe ^{III} /AAO membrane 기반 Micro-PFR	62
가. 최적 체류시간 선정	62
나. TYR/TA-Fe ^{III} /AAO membrane 기반 Micro-PFR 작동 안정성	64
제4장 결론	67
References	69

List of Tables

Table 1. Enzymes immobilized on nanoparticles and their biotechnological applications	8
Table 2. Application of surface modified AAO membrane	10
Table 3. Physical properties of commercially available AAO membrane	24
Table 4. Immobilization yield and recovery activity of LIP/TA-Fe ^{III} /AAO membranes prepared with the different monomers concentration	30
Table 5. FT-IR peak and corresponding functional groups of tannic acid and TA-Fe ^{III} /AAO membrane	37
Table 6. Effect of reactor types on substrate conversion and product concentration	66

List of Figures

Figure 1. Schematic illustration of procedures of enzyme immobilization onto modified-AAO membrane.	3
Figure 2. Reaction scheme of lipase catalyzed esterification.	4
Figure 3. Conversion mechanism of the L-tyrosine into L-DOPA and from L-DOPA to <i>o</i> -dopaquinone and subsequently transformation into melanin.	6
Figure 4. Methods of enzyme immobilization.	9
Figure 5. The complexation mechanism of TA with Fe ³⁺	14
Figure 6. Standard curve for the determination of protein concentration.	25
Figure 7. Standard curve for the determination of <i>p</i> -Nitrophenol.	26
Figure 8. Standard curve for the determination of L-DOPA.	27
Figure 9. Schematic description of the preparation of the TA-Fe ^{III} /AAO composite membranes.	28
Figure 10. Effect of TA : FeCl ₃ molar ratio on conversion.	31
Figure 11. SEM images of (A) pristine AAO membrane, (B) TA-Fe ^{III} /AAO membrane and cross section of (C) pristine AAO membrane, (D) TA-Fe ^{III} /AAO membrane.	33
Figure 12. SEM image of enzyme immobilized onto TA-Fe ^{III} /AAO membrane. ·	34
Figure 13. Overlapped FT-IR spectra of (A) tannic acid, (B) ferric chloride hexahydrate, (C) pristine AAO membrane and (D) TA-Fe ^{III} /AAO membrane.	36

Figure 14. Effect of pH on the activity of free and immobilized lipase.	39
Figure 15. Effect of temperature on the activity of free and immobilized lipase.	40
Figure 16. The activity changes of free and immobilized lipase with storage time (storage condition: pH 7.5, (A) T=25°C, (B) T=45°C).	42
Figure 17. Residual activity of immobilized lipase after enzyme recycle.	43
Figure 18. (A) Components of TA-Fe ^{III} /AAO membrane micro-reactor (B) Expanded-view schematic of a TA-Fe ^{III} /AAO membrane micro-reactor assembly.	45
Figure 19. (A) Schematic diagram of the continuous flow micro-reactor system to assay the activity of the immobilized lipase. (B) Actual setup of the continuous flow enzymatic membrane micro-reactor system.	46
Figure 20. The effect of residence time on the conversion of <i>p</i> -nitrophenyl butyrate.	48
Figure 21. Effect of residence time on the conversion of LIP/TA-Fe ^{III} /AAO membrane micro-reactor.	50
Figure 22. Operational stability of LIP/TA-Fe ^{III} /AAO membrane micro-reactor (operational condition: flow rate 4 mL/min, pH 7.5, (A) T=20°C (B) T=45°C).	52
Figure 23. The enzyme activities after EA, EAC and EAPC immobilization methods.	54
Figure 24. The storage stabilities of EA, EAC and EAPC immobilization (storage condition: pH 7.0, T=4°C).	55
Figure 25. Production of L-DOPA with free tyrosinase (operational condition:	

0.02 mg of enzyme, V=3 mL, T=25°C).	57
Figure 26. Production of L-DOPA using immobilized tyrosinase on TA-Fe ^{III} /AAO membrane (operational condition: 0.2 mg of enzyme, V=3 mL, T=25°C).	58
Figure 27. Storage stability of free and immobilized tyrosinase with time (storage condition: pH 7.0, T=25°C).	60
Figure 28. Residual activity of immobilized tyrosinase after enzyme recycle.	61
Figure 29. The effect of residence time on the conversion using TYR/TA-Fe ^{III} /AAO membrane micro-reactor.	63
Figure 30. Operational stability of TYR/TA-Fe ^{III} /AAO membrane micro-reactor (operational condition: flow rate 0.1 mL/min, pH 7.0, T=20°C).	65

ABSTRACT

Fabrication of TA-Fe^{III}/AAO Membrane Carrier for Enzyme Immobilization and Development of Micro-PFR

Jo, Eun Yeong

Advisor: Prof. Lee, Jung Heon, Ph.D.

Department of Chemical Engineering

Graduate School of Chosun University

Enzymatic membrane micro-PFR was developed using anodic aluminum oxide (AAO) membrane coated with tannic acid (TA) and iron ions (Fe^{III}) complex. TA has large number of hydroxyl (-OH) groups, which can be functionalized for enzyme attachment to achieve a higher enzyme to carrier ratio. AAO membrane has high surface area for the retention of enzyme, therefore it offers an attractive platform for enzyme immobilization. Lipase (from *Aspergillus niger*) has been used as a model enzyme to be immobilized on the TA-Fe^{III}/AAO membrane. Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy was used to characterize the chemical features of prepared TA-Fe^{III} /AAO membranes. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the surface morphologies (i.e., pore size, thickness). When TA and FeCl₃ concentration ratio was 2:1, the enzyme immobilization yield of TA-Fe^{III}/AAO membrane was the highest (72.04%). The relative activity of the immobilized lipase with TA-Fe^{III} coating is much more stable than that without coating, and it is even higher than that of free lipase without reuse. After 30 days of storage and reuse 9 times, more than 80% of the activity was retained with TA-Fe^{III} coating, while the relative activity was 60% without coating.

The plug flow reactor was developed using TA-Fe^{III}/AAO membrane (V=700 uL).

The lipase was immobilized and used for bioconversion. With the change of flow rate (from 1 to 5 mL/min), the largest productivity was reached 13.57 mol/h·L at 4 mL/min. After 80 days of continuous operation, the enzyme activity was remained over 90%.

Based on the success of lipase immobilization, immobilization of tyrosinase on TA-Fe^{III}/AAO membrane using EAPC method was performed. After 30 days of storage time, more than 70% of the activity was remained using TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane, while that of free tyrosinase was 36%. TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane retained 65% of its initial activity after 6 times reuse. The production of L-DOPA was monitored while applying the TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane micro-PFR. The highest productivity of L-DOPA was reached 0.0862 mol/h·L at 0.1 mL/min. After 30 days of continuous operation, immobilized tyrosinase showed 70% of residual activity at 20°C.

As a result, when micro-PFR was applied using LIP/TA-Fe^{III}/AAO and TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane, the rate of reaction was faster about 134 times and 15 times rather than batch reactor, respectively. This research exhibits the potential application of micro-PFR in the bio-catalytic field.

keyword: Enzyme immobilization, Micro-reactor, Enzymatic membrane, Anodic aluminum oxide, Lipase, Tyrosinase, L-DOPA

Abbreviations

AAO	Anodic aluminum oxide
AS	Ammonium sulfate
BSA	Bovine serum albumin
EA	Enzyme adsorption
EAC	Enzyme adsorption crosslink
EAPC	Enzyme adsorption precipitation crosslink
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy
GA	Glutaraldehyde
LIP	Lipase
L-DOPA	3,4-dihydroxy-L-phenylalanine
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -Nitrophenol
<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -Nitrophenyl butyrate
PFR	Plug flow reactor
RT	Residence time
SEM	Scanning electron microscopy
TA	Tannic acid
TYR	Tyrosinase
UV	Ultraviolet rays

제1장 서론

제1절 연구배경

효소 생 촉매는 친환경 기술로 여겨지며, 매우 온화한 조건에서 반응을 촉매하고, 합성 촉매와 비교 할 수 없는 선택성과 효율성을 나타내며, 또한 기질 특이성과 효소반응에서의 부반응이 없다는 장점으로 인해 실제 산업 공정에서 화학촉매를 대체할 후보로 주목 받고 있다. 반면에 쉽게 변형되고 짧은 수명, 높은 가격 그리고 재사용 및 회수를 할 수 없다는 특징으로 대규모 반응기에 적용하기에 많은 제한이 존재한다. 이러한 한계를 극복하고 많은 공정에서 생체 촉매 생산성을 최대화하기 위해 효소의 재활용을 위한 고정화에 대한 연구가 필요하다 [1-3].

고정화 기술 및 효소 지지체로서 천연, 합성 중합체 또는 무기물질의 개발이 광범위하게 연구되어왔다. 최근 들어 나노기술의 발달로 인해 효소고정화에 적용될 수 있는 다양한 나노 스케일 담체 개발연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중에서도 다공성 구조를 갖는 나노 다공성 담체는 평면표면보다 더 미세 환경을 제공하여 효소를 캡슐화 할 뿐만 아니라 높은 표면적을 제공 한다 [4]. 효소는 다공성 구조 안에서 그의 고유한 형태를 보존 할 수 있어서, 효소분자의 활성부위는 기질분자와의 계면반응을 촉진할 수 있다 [5-7].

효소를 고정화 할 수 있는 나노 다공성 담체의 예로 다공성 막이 있다. 다공성 막은 여러 여과 기술의 사용을 결정하는 마이크로미터에서 나노미터까지의 반경을 갖는 기공을 가지고 있고, 박막에 다양한 생물 활성 화합물을 보유 할 수 있는 우수한 지지체 이다 [8-11]. 그 중 알루미늄의 전기화학적 산화에 의해 제조된 알루미나 막이 있다. 다공성 양극 산화 알루미늄(Anodic Aluminum oxide; AAO) 막은 균일한 기공 및 비 특이적 단백질 흡착에 대한 우수한 내성으로 인해 효소고정화 및 바이오센서 응용을 위한 우수한 플랫폼을 제공 한다 [9,10]. 몇몇 연구들은 AAO membrane 나노 포어 내부에 효소를 포함한 다양한 촉매 활성 성분을 위치시키는 연구에 초점을 맞추었다 [11].

미세반응기는 연속적인 흐름에서 화학반응이 일어날 수 있는 미세 구조화 된 장치이며, 마이크로 크기의 세공 또는 채널로 구성되어 있어 넓은 비표면적을 가지고 있고 작은 크기의 장치임에도 불구하고 열 및 물질 전달에 매우 효율적이기 때문

에 화학반응에서 선택도와 수율을 향상시킬 수 있다. 또한 배치시스템의 작동과 비교하였을 때, 온도, pH, 체류시간, 압력 등과 같은 조건들을 제어하기가 쉽다 [12, 13]. 미세반응기는 최적의 반응기 디자인을 위한 새로운 효과적인 방법으로 제시되었으며, 반응기 수를 늘리는 것이 가능하여 경제적이나 기술적인 수요에 따라 처리량을 쉽게 조절할 수 있다. 또한 소량의 시약을 사용하고 반응시간을 단축할 수 있다. 다공성 효소 막은 이러한 미세반응기에 적용 할 수 있으며 효소 막 기반 미세반응기는 석유 화학, 제약 및 부가가치 물질의 합성에 적용될 수 있다 [14-16].

따라서 본 연구에서는 다공성 양극 산화 알루미늄 막을 효소 고정화 담체로 사용하였으며 막 표면에 다량의 효소를 고정화하기 위해 tannic acid와 FeCl_3 의 복합체로 표면 개질하여 효소 고정화 담체를 제조하고, 이를 이용해 산업적으로 널리 이용되는 효소인 lipase를 고정화 하는 연구를 진행하였다. 제조한 효소 담체로써의 응용 가능성을 확인하기 위해 고정화 된 lipase의 열 안정성, pH 안정성, 재사용성 그리고 장기 저장성을 확인하였다. 또한, 효소가 고정화 된 막을 이용하여 Micro-reactor를 제작하였으며 유속, 접촉시간 그리고 온도 등을 조절하여 최적 조건에서 반응기를 작동하여 매우 안정적인 연속 흐름 마이크로 반응기를 개발하고자 하였다. 다른 종류의 효소 고정화의 가능성을 보기 위해 제작한 담체에 tyrosinase를 고정화하여 저장안정성과 재사용성을 평가하였으며 tyrosinase가 고정화된 막을 Micro-reactor에 적용하였다. 체류시간에 따른 반응기 출구에서의 L-DOPA 생산을 모니터링 하였다.

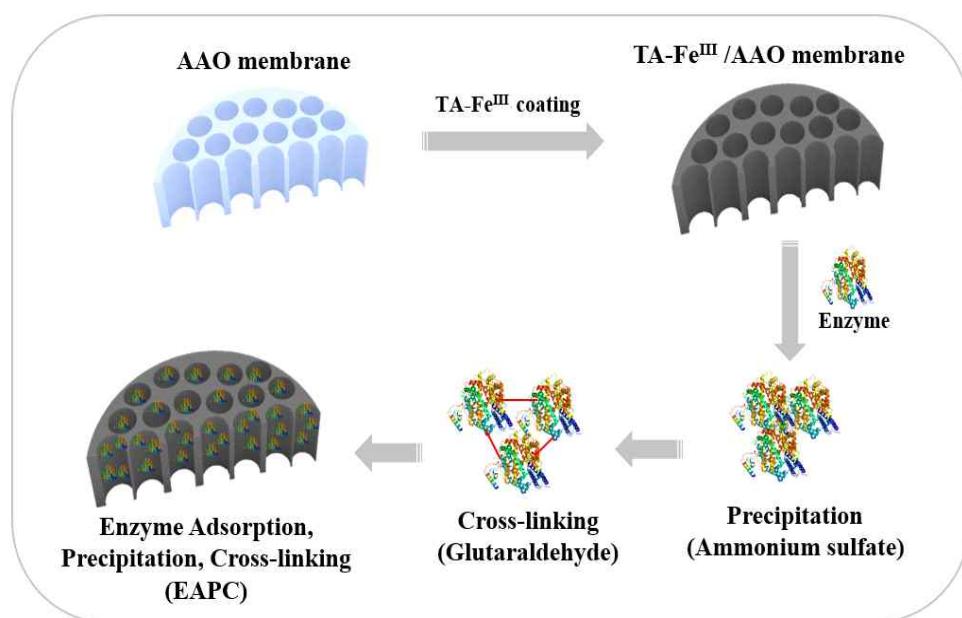


Figure 1. Schematic illustration of procedures of enzyme immobilization onto modified-AAO membrane.

제2절 이론적 배경

1. 효소 (Enzyme)

효소는 세포 내부 또는 외부의 화학 및 생화학 반응을 촉매 할 수 있는 단백질이다. 다른 단백질과 마찬가지로, 효소는 웹타이드 결합에 의해 긴 사슬의 아미노산으로 구성된다. 효소는 3차원 구조로 되어있으며 기질유형에 매우 특이적인 천연촉매이며 온도, 압력, 및 pH의 온화한 조건에서 높은 전환율을 가진다. 기존의 화학촉매는 재생 불가능한 에너지원을 사용하여 높은 온도를 필요로 한다. 또한, 최종 생성물을 수득하기 위해 많은 정제 단계가 필요하며, 원하지 않는 부산물이 존재한다. 이러한 이유로 효소는 기질특이성뿐만 아니라 높은 전환율로 인해 현재 산업적인 공정의 최적화를 위해 연구되고 있다 [17-18].

가. Lipase

Lipase는 매우 안정적인 효소이며, 지방이나 오일을 지방산과 글리세롤로 가수분해 할 뿐만 아니라 무수의 유기용매에서 에스테르화반응, 아미노분해반응, 에스터 교환 반응 등을 촉매하며 산업적으로 매우 유용한 효소 중 하나이다. Lipase는 사람의 체장, 돼지, 식물 등과 같이 자연적 또는 유전공학적으로 처리된 미생물 등에서 얻을 수 있다. 또한 Lipase는 유기용매 내에서 안정적이고 별도의 cofactor를 필요하지 않으며 다양한 기질 특이성과 높은 선택성을 가지고 있어 식품, 바이오디젤 생산, 화장품 및 의약품산업에서 널리 사용된다 [19-21].

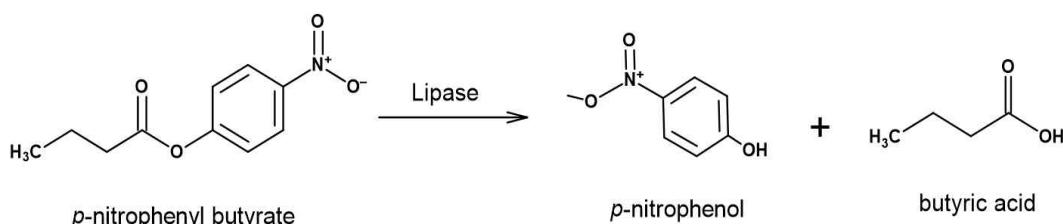


Figure 2. Reaction scheme of lipase catalyzed esterification.

나. Tyrosinase

Tyrosinase는 미생물에서 곰팡이, 식물, 동물에 이르기까지 자연에 널리 분포되어 있으며, 약 100년 이상의 오래된 기간 동안 연구가 진행되었다. Tyrosinase는 활성 부위에 구리를 함유하고 있는 type-3 구리효소로 알려져 있으며, 멜라닌 생합성의 초기단계인 L-tyrosine을 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA)로 산화시키는 cresolase activity와 L-DOPA를 dopaquinone으로 산화시키는 catecholase activity를 갖는 효소로 알려져 있다 (Figure 3). 이외에 다양한 phenolic 화합물의 산화반응을 촉매 할 뿐만 아니라, 의약품 중간체인 L-DOPA생산, phenolic compound의 양을 측정할 수 있는 바이오센서 등에 활용되고 있다 [22-23].

L-DOPA는 dopamine의 전구체로 뇌혈관 장벽을 통과할 수 있어 1967년부터 파킨슨 병 치료제로 사용되었다. 현재 L-DOPA는 화학적인 방법으로 생산하고 있지만 공정이 복잡하고, 비싼 귀금속 촉매가 필요하며 전환율과 광학 선택성이 낮다는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복할 수 있는 방법으로 미생물에 의한 생산방법과 효소를 이용한 biotransformation 방법이 있다. 미생물에 의한 생산방법은 정제과정이 필요하며 배양시간이 일반적으로 10일 이상 걸린다는 단점이 있다. 반면에 효소를 이용한 방법은 짧은 시간, 비교적 높은 전환율로 화학공정에 의한 생산의 한계를 극복하고 친환경적인 방법으로 L-DOPA를 생산하는 연구가 광범위하게 진행되고 있다 [24-26].

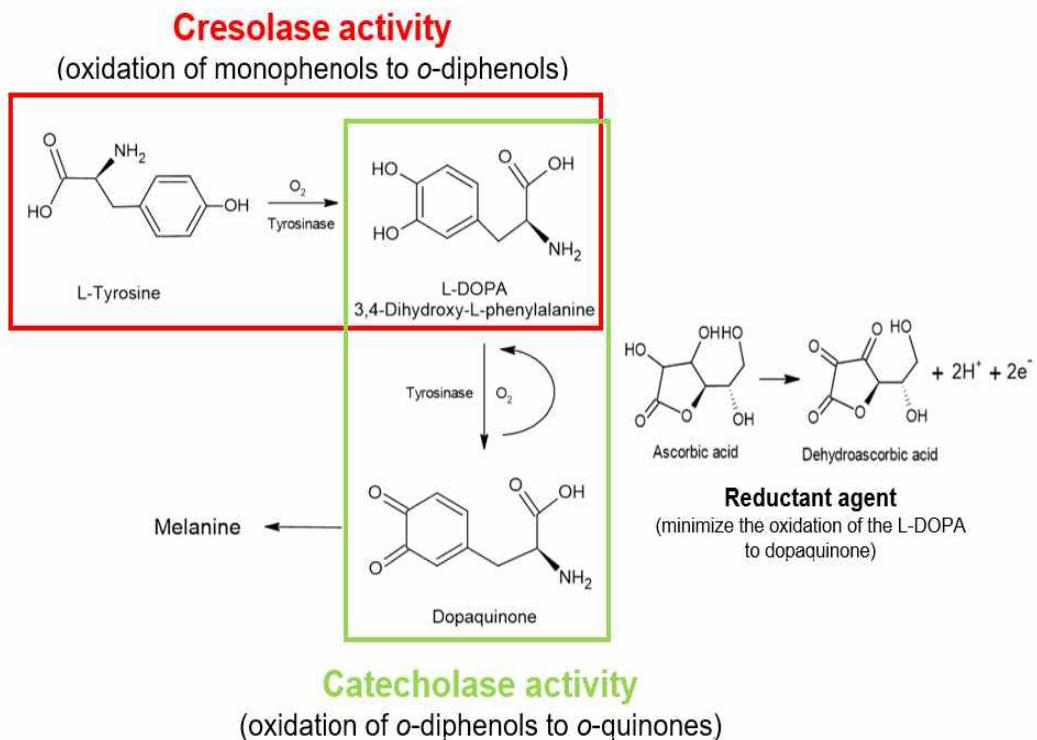


Figure 3. Conversion mechanism of the L-tyrosine into L-DOPA and from L-DOPA to *o*-dopaquinone and subsequently transformation into melanin.

2. 효소고정화 (Enzyme immobilization)

대부분의 효소는 구형 단백질로 되어 있어 물에 쉽게 용해되기 때문에 회분식 반응에서 효소를 회수하거나 재사용하기가 힘들고 온도변화에 민감하게 반응한다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 효소고정화가 있다. 효소 고정화는 그 촉매특성을 일정하게 유지하면서 일정한 공간 안에 효소를 붙이거나 넣는 것을 말한다. 효소 고정화는 일반적으로 물리적 및 화학적 방법으로 분류된다. 물리적 방법은 매트릭스와 효소사이의 약한 상호작용으로 이루어져있으며, 화학적 방법은 매트릭스와 공유결합이 형성된다. 고체지지체 상에 효소를 화학적 또는 물리적 방법으로 고정화하게 되면 효소를 보호 또는 안정화 할 수 있으며 반응물로부터 효소를 쉽게 회수하여 재사용 할 수 있기 때문에 가격 경쟁력이 높아진다는 장점이 있다 [12, 27, 28]. 효소 고정화 방법에는 크게 4가지 방법이 있다. 흡착 (adsorption) 방법은 가장 널리 사용되고 있는 방법으로 반데르발스 힘, 이온상호 작용 및 수소결합을 포함하는 담체와 효소 사이에서 생성된 물리적 상호 작용을 이용한다. 이 방법은 효소의 고유 구조를 변화시키지 않기 때문에 흡착하는 도중 효소의 실활이 상대적으로 적다는 장점이 있다. 그러나 결합이 약하여 흡착된 단백질이 반응 도중 쉽게 탈착되는 단점이 있다. 공유결합 (covalent bonding) 방법은 효소에 존재하는 functional group 즉, 아미노기, 카르복실기, 티올기 등과 효소 지지체와 결합을 이용하여 효소를 고정화시키는 방법이다. 공유결합 방법은 효소와 지지체 사이에 강한 결합으로 인해 효소의 누출이 거의 발생하지 않지만, 효소가 공유결합 되는 과정에서 화학적 변형을 거치게 되면 효소변성을 유발할 수 있다. 포괄법 (entrapment)은 효소가 지지체에 직접적으로 붙지 않고 격자구조 안에 물리적으로 포획되기 때문에 포획 중합체와 화학적으로 상호작용 하지 않아 효소의 안정성을 향상시킬 수 있고 효소침출 및 변성을 최소화 한다. 가교법 (cross-linking)은 효소를 기질 용액 내에 손실을 방지하기 위한 또 다른 비가역적 고정화 방법이다. 가교법은 효소분자를 ammonium sulfate와 같은 응집제를 사용하여 응집시킨 후, 이중 또는 다중작용기가 있는 가교시약을 사용하여 효소 분자 사이의 가교를 형성함으로써 수행된다 [29-34].

효소가 고정화되는 지지체의 특성은 고정화된 효소의 성능을 결정하는데 중요하다. 이상적인 지지체는 물리적 저항, 친수성, 생체 적합성 및 저렴함 비용이 포함된다. 여러 천연 폴리머 재료인 셀룰로오스, 알гин산, 콜라겐, 키토산은 효소지지체

로서 사용된다. 또한 다양한 합성 중합체는 우수한 기계적 안정성을 갖기 때문에 효소 지지체로서 사용된다. 효소 고정화를 위한 다양한 무기지지체로 알루미나, 실리카, 제올라이트, 메조 포러스 실리카 등이 있다. 나노 입자 (nanoparticle)는 생 촉매의 효율을 결정하는 주요 요소인 효소 로딩, 물질 전달 저항, 비 표면적을 포함한 다양한 이상적인 특성 때문에 매우 효율적인 지지체로 작용한다. 거대 분자를 기질로 사용할 때의 확산 문제는 나노입자를 사용함으로써 해결 가능하다. 또한 자성 나노 입자는 자기장을 이용하여 쉽게 분리가 가능하다.

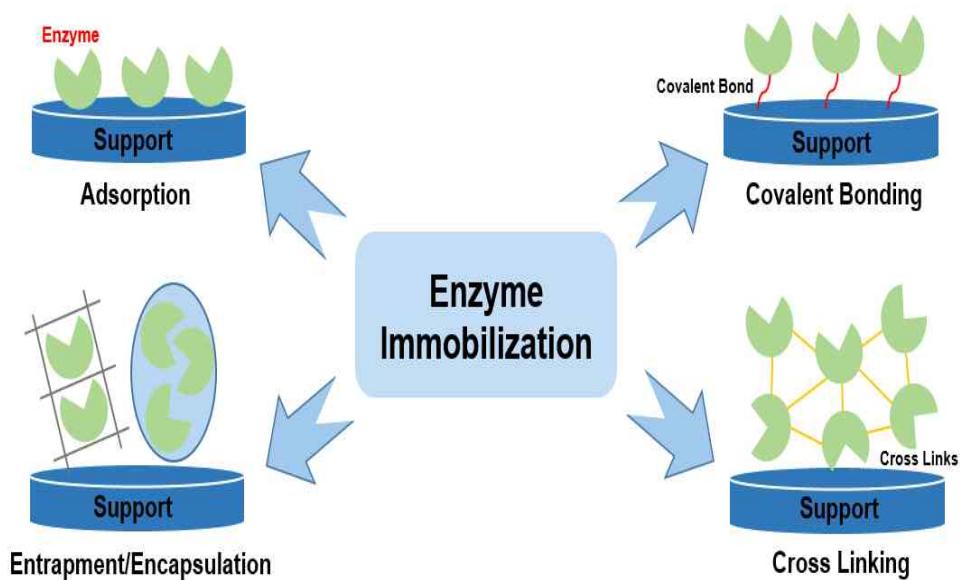


Figure 4. Methods of enzyme immobilization.

Table 1. Enzymes immobilized on nanoparticles and their biotechnological applications

Enzyme	Nanoparticle	Application	Ref.
beta-Glucosidase	Iron oxide	Biofuel production	[35]
Trypsin	Nanodiamond prepared by detonation	Proteolysis	[36]
Horseradish peroxidase	Maganetite silica nanoparticles	Immunoassaus	[37]
Cholesterol oxidase	Fe ₃ O ₄ nanoparticle	Analysis of total cholesterol in serum	[38]
Lipase	Fe ₃ O ₄ nanoparticle	Hydrolysis of <i>p</i> -NPP	[39]
Glucose oxidase	Thiolated gold nanoparticle	Estimation of glucose levelup to 300 mg/mL	[40]
Lipase	Polystyrene nanoparticle	Aminolysis, esterification	[41]
Cellulase	TiO ₂ nanoparticle	Hydrolysis of Carboxy methyl cellulose	[42]
Diastase	Silica coated nickel nanoparticle	Starch hydrolysis	[43]
Lysozyme	Chitosan nanofibers	Antibacterial	[44]
beta-Galactosidase	Con A layered ZnO nanoparticle	Lactose hydrolysis	[45]

3. Anodic aluminum oxide (AAO) membrane

양극 산화 알루미늄 (anodic aluminum oxide, AAO)막은 분자분리, 촉매, 에너지 저장 및 약물전달, 바이오센서 등 매우 넓은 분야에서 응용 가능한 나노 소재이다. AAO는 알루미늄 (Al)의 전기화학적 산화에 의해 제조되었으며 화학적, 열적 안정성, 경도 및 높은 표면적을 가지고 있다. 알루미늄과 같은 부동태 금속은 표면에 1nm 이내의 산화막이 존재하며 금속표면에 양극을 가하고 상대전극에 음극을 가하게 되면 알루미늄 이온이 양이온을 띠게 된다. 이때 알루미늄 이온이 용액으로 용출되고 용액 내에 있는 산소 이온 및 수산화 이온이 알루미늄 산화막으로 이동하게 되면서 알루미늄 이온과 산소의 결합이 알루미나 (Al_2O_3)를 형성하게 된다. 이렇게 생성된 AAO는 하부 알루미늄 기판의 표면에서 수직방향으로 평행한 hexagonal 배열의 기공으로 되어있고, 양극 산화 조건을 조절함으로써, 기공 직경, 벽두께, 내부 포어 거리 등의 파라미터를 제어할 수 있다. 최근에는 나노기술 발달로 인해 나노구조에 대한 산업적 요구와 관심이 증가하면서 나노입자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 전기화학적인 제조방법은 비용절감과 조작의 간편성 등으로 새롭게 각광받고 있다. 이러한 연구동향으로 AAO는 강한 산 존재 하에서 양극 산화된 알루미늄 산화 막으로 규칙성과 이방성이 큰 나노 기공의 특성 때문에 최근에 새롭게 조명되고 있다 [11, 46].

Table 2. Application of surface modified AAO membrane

Molecule	AAO modification	Application	Ref.
Alliinase	Silan	Bioreactor	[47]
Trypsin	Polyethyleneimine (PEI)	Enzyme carrier	[48]
Peroxidase	Polyaniline (PANI)	Enzyme carrier	[48]
Glucose oxidase	Chitosan	Biosensor	[9]
Antibodies	Silica	Chiral drug separation	[49]
Lipase /Tyrosinase	Tannic acid-Fe ^{III}	Bioreactor	This work

4. Tannic acid (TA)

Tannic acid (TA)는 과일껍질, 견과류, 채소 등에서 가장 많이 발견되는 천연폴리페놀중 하나로 중앙에 포도당 코어로 되어있으며, 주변에 5개의 카테콜기(catechol group)와 5개의 갈룰기(gallol group)를 함유하고 있다. TA에 관한 연구는 2000년대까지 항산화 기능에 대한 연구가 주를 이루었지만, 2007년부터 카테콜기를 갖는 분자가 모든 표면개질이 가능함이 밝혀지면서 카테콜기와 유사한 구조를 갖는 갈룰기를 함유하고 있는 물질들을 이용하여 표면 개질 및 접착력에 대한 연구가 시작되었다 [50].

TA의 갈룰기와 카테콜기는 단백질, DNA, 웨타이드 등 다양한 분자들과 수소 결합과 소수성 결합을 통하여 단단한 비공유결합이 가능하다. 또한 인접한 수많은 하이드록실기는 전이금속과 배위결합이 가능하여 Fe(III), Cu와 배위결합을 통해 금속폴리페놀 복합체를 형성하게 된다. 이 방법은 특별한 장비가 필요하지 않으며 재료 구성요소를 쉽게 구할 수 있고 비용이 적게 든다는 장점이 있다. TA에 존재하는 3개의 galloyl 그룹들은 Fe^{III}이온과 반응하여 안정한 착물을 형성 할 수 있으며, 각 TA 분자는 여러 Fe^{III}중심과 반응하여 가교된 필름을 형성할 수 있다. TA는 물질의 크기, 재질, 형태의 제약이 없고 마이크로 사이즈부터 나노사이즈 입자까지도 코팅이 가능하다. 이러한 TA의 표면 결합 친화력으로 인해 광범위한 기관에 적용 가능하여 의학, 식품, 약리학 등 다양한 산업에 사용되어 지며 최근에는 membrane의 표면 개질과 파울링 컨트롤을 위한 연구가 진행되고 있다 [51-54].

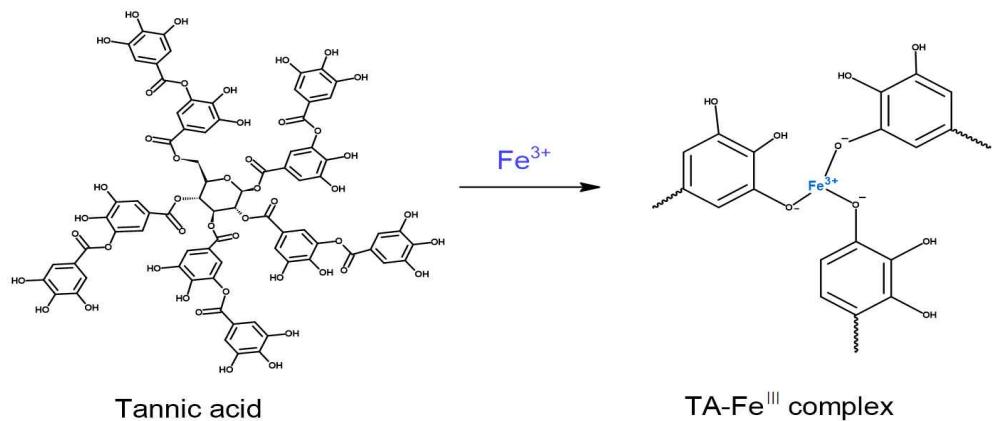
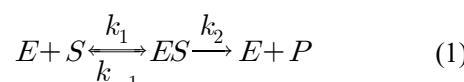


Figure 5. The complexation mechanism of TA with Fe^{3+} .

5. Plug flow reactor (PFR)

플러그 흐름 반응기 (plug flow reactor, PFR)는 긴 원통형의 관으로 연속적인 유동 시스템에서 화학반응을 설명하기 위해 디자인된 반응기이다. 플러그 흐름 반응기는 물질의 흐름이 축 방향 혼합 없이 방향만의 혼합이 일어나며 플러그 흐름으로 흐르는 반응기이다. 이때 온도, 조성, 유속은 한 단면에서는 일정하며 입구로부터의 거리에 따라서 연속적으로 변하게 된다. 플러그 흐름 반응기는 상대적으로 유지 관리가 쉽고 흐름반응기 중에서 반응기 부피당 전환율이 가장 높다. 플러그 흐름 반응기는 액상 및 기상반응 모두 사용될 수 있으며 처리속도와 효율을 동시에 높일 수 있는 반응기이다 [55-57].

플러그 흐름 고정화 효소 반응기의 성능을 설명하기 위해 비가역적 효소 반응에 대한 일반화 된 Michaelis-Menten 방정식이 사용되었다.



여기서 E, S, ES, P는 각각 효소, 기질, 효소-기질 복합체, 생성물을 말하며 k_1, k_{-1}, k_2 는 반응 속도 상수이다. 가정상상태 (pseudo-steady state)를 가정하면 식(1)에 대한 속도 식은 다음과 같다.

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{k_2 E_0 S}{\frac{k_{-1}}{k_1} + S} = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (2)$$

$$(V_{\max} = k_2 E_0, K_m = \frac{k_{-1}}{k_1})$$

여기서 v 는 단위 부피당 반응 속도 ($\text{kmol}/\text{m}^3/\text{s}$)이며 t 는 반응시간 (s), E_0 는 효소 반응에서 자유 효소와 결합된 효소의 전체 몰농도 (kmol/m^3), K_m 은 Michaelis 상수 (kmol/m^3), V_{\max} 는 반응의 최대 속도 ($\text{kmol}/\text{m}^3/\text{s}$)이다.

이상적인 플러그 흐름 고정화 효소 반응기의 경우 다음 설계 방정식을 사용하여 성능을 설명 할 수 있다.

$$\frac{W}{Q}E_i = - \int_{S_0}^S \frac{dS}{v} \quad (3)$$

여기서 Q 는 부피유량 (m^3/s)이며, W 는 반응기 내의 고정화 된 효소 입자의 총 중량 (g), E_i 는 고정화 된 효소 입자의 단위 중량 당 효소 로딩 농도 또는 효소의 양 (mg/g matrix)이다. S 에 대한 적분을 한 후, 다음의 적분 설계방정식이 식 (4)로부터 얻어진다.

$$\frac{W}{Q}E_i = - A \ln(1-x) + Bx \quad (4)$$

여기서

$$A = \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (5)$$

$$B = V_{\max}S_0 \quad (6)$$

S_0 는 초기 기질의 농도 (kmol/m^3)이며, x 는 다음과 같이 정의된 기질의 전환율이다.

$$x = \frac{(S_0 - S)}{S_0} = \frac{P}{S_0} \quad (7)$$

제2장 실험재료 및 방법

제1절 실험재료 및 기기

본 연구에서는 Lipase (Sigma, from *Asperillus niger*)와 Tyrosinase (Sigma, from *Mushroom*)를 고정화 효소로 사용하였다. 고정화 지지체로 직경이 13mm이며 세공크기가 100nm인 Anodic aluminum oxide (AAO) membrane (Whatsman, Germany)을 사용하였으며, Tannic acid (Sigma, USA)와 Iron(III) chloride hexahydrate (Junsei Chemical)를 사용하여 표면개질 하였다. Lipase 활성 측정을 위한 기질로는 4-Nitrophenyl butyrate (98%, Sigma, USA)를 사용하였고, Tyrosinase 활성 측정을 위한 기질로는 L-tyrosine (Sigma, Germany)를 사용하였다. 또한 본 연구에서는 Ammonium sulfate (Junsei Chemical), Tris-HCl (Sigma, USA), 4-Nitrophenol (Sigma, USA), Glutaraldehyde (25%, GA, Sigma), Acetonitrile (Junsei Chemical), 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA, Sigma, China), Sodium hydroxide (NaOH, Junsei Chemical), Hydroxy chloride (HCl, DAEJUNG), L-Ascorbic acid (Sigma, China), Sodium nitrate (Sigma, Germany), Sodium molybdate (DUKSAN)등 시약을 사용하였다. 단백질 정량을 위해 BSA (Sigma, USA), Bradford (Sigma, USA)를 사용하였다.

사용한 기기로는 반응 온도를 일정하게 유지하기 위해 Thermo mixer (Fine mould precision znd.co), 효소활성을 측정하기 위해 UV/Visible-spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham)를 사용하였다. 연속흐름반응기 적용을 위해 LC-20AD Pump (SHIMADZU), Filter Holder (Finetech, 13 mm)를 사용하였다. SEM (HITACHI, S-4800)과 FT-IR (SHIMADZU)을 통해 제조한 담체의 화학적 특징과 표면을 관찰하였다.

제2절 효소 고정화 담체 제조 및 특성 분석

1. TA-Fe^{III}/AAO membrane 담체 제조

가. TA-Fe^{III}/AAO membrane 담체 제조

Tannic acid 와 iron(III) ions 복합체를 제조하기 위해서 0.02 M Tannic acid 용액에 AAO membrane을 넣고 10분간 상온에 방치한 후, 0.01 M Iron(III) chloride hexahydrate 용액을 1:1 부피비율로 첨가하여 200 rpm에서 3시간동안 교반시킨다. TA-Fe^{III} 복합체가 AAO membrane 표면에 중합 반응에 의해 형성되어 연한 푸른색의 AAO membrane이 검정색으로 변하게 된다. 이렇게 제조된 TA-Fe^{III}/AAO membrane 내에 남아있는 용액을 제거하기 위해 3번 이상 중류수로 씻은 후, 건조하여 보관하였다(Figure 9).

나. TA-Fe^{III}/AAO membrane 에 효소 고정화

Vial에 TA-Fe^{III}/AAO membrane을 넣은 후 lipase (1 mg/mL) 1 mL와 ammonium sulfate (AS) 0.25 g을 vial에 넣고 상온에서 200 rpm으로 30분간 반응 시켰다. 25% glutaraldehyde (GA) 용액을 20 uL 넣은 후 4°C에서 17시간동안 반응시켰다. 반응 후 상등액을 버리고 미 반응 GA를 제거하기 위해 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)에 넣고 30분간 반응시킨 후 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 5회 이상 세척하여 사용하였다.

2. 효소 고정화 특성

가. 효소 고정화

Lipase를 pH 7.5 인 50 mM potassium phosphate buffer에 1 mg/mL로 용해시켜 TA-Fe^{III}/AAO membrane에 고정화 하여 효소 활성을 측정하였다.

Tyrosinase (25 KU)는 pH 7.0인 0.1M sodium phosphate buffer에 용해시켜 1.51 mg/mL (10823.53 U/mL)의 stock solution을 제조하여 -20°C에 보관하여 사용하였다. Tyrosinase를 0.2 mg/mL로 희석하여 지지체에 고정화 하여 효소 활성을 측정하였다.

나. 효소 정량

효소 고정화 후 남아있는 효소 정량은 Bradford 시약을 사용하여 측정하였다. Bradford 시약 1000 uL에 sample 33 uL를 혼합하여 5분간 반응시킨 후 595 nm에서 UV/visible-spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 0.1-1.4 mg/mL농도 범위의 Bovine serum albumin (BSA)를 사용하여 작성하였다 (Figure 6).

다. 효소 활성 측정 방법

Lipase의 활성을 기질인 *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB)를 사용하여 *p*-nitrophenol (*p*-NP)과 butyric acid로 가수분해 되는 반응을 통하여 측정하였다 (Figure 2). 여기서 *p*-NP의 생성을 UV/Visible-spectrophotometer를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 10 mM *p*-NPB는 acetonitrile에 용해하여 사용하였다. 반응은 Vial에 10 mM *p*-NPB를 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 100배 희석 하여 넣은 후 free lipase와 고정화 효소를 각각 넣고 상온에서 반응시켜 시간에 따른 효소 활성을 측정하였다. 최종 반응 부피는 1000 uL로 반응시켰다. Standard curve는 농도별로 제조한 *p*-NP를 측정하여 작성하였다 (Figure 7).

3. 고정화 효소의 pH와 온도에 따른 활성 측정

고정화 효소의 온도에 따른 활성 변화를 측정하기 위해 먼저 Thermo mixer를 사용하여 20-70°C로 온도를 변화시켜 효소 활성을 측정하였다. 효소는 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 넣고 각 온도에서 2시간동안 반응시킨 후 실험을 진행 하였다.

pH에 따른 활성변화 측정을 위해 pH 4-10범위의 buffer를 제조하여 20°C에서 2시간동안 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

4. 고정화 효소의 저장 안정성

고정화 lipase와 free lipase의 온도에 따른 저장 안정성을 확인하기 위해 25°C, 45°C로 설정된 thermo mixer에 효소를 보관하여 활성을 측정하였다. 효소 보관 용액으로 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 사용하였으며 측정 방법은 lipase 활성도 측정방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

5. 고정화 효소의 재사용성 평가

고정화 효소의 재사용성을 평가하기 위해 TA-Fe^{III}를 코팅한 후 효소 고정화한 sample과 TA-Fe^{III}를 코팅하지 않고 효소를 고정화한 sample를 이용하여 실험을 진행하였다. 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 각 sample들을 넣은 후 기질 10 mM p-NPB^o 100배 희석되도록 첨가하여 최종 반응 부피를 1000 uL로 반응을 진행하였다. 10분간 반응 시킨 후 410 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 반응 종료 후 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 여러 번 세척하여 연속적으로 재사용하였다.

제3절 고정화 담체를 이용한 micro-PFR

1. LIP/TA-Fe^{III}/AAO membrane을 이용한 micro-PFR 설계

AAO membrane 표면에 TA-Fe^{III}를 코팅한 후 lipase효소를 고정화 한 담체 LIP/TA-Fe^{III}/AAO membrane을 사용하여 700 uL 부피의 반응기를 제작하였다. Micro size의 반응기를 LC-6AD pump와 연결하여 flow rate을 변화주면서 반응시켰다. 반응기의 작동은 clogging문제를 최소화하기 위해 기질이 아래에서 위 방향으로 흐르도록 설계하였다.

2. 체류시간에 따른 전환율과 생산성 측정

최적 체류시간을 선정하기 위해 기질의 flow rate에 따른 생성물의 전환율과 생산성을 측정하였다. Flow rate은 1-5 mL/min으로 변화시키면서 생성물의 농도를 측정하여 전환율로 환산하였다. 분석 sample을 수집하기 전에 정상상태를 위해서 각 flow rate에서 체류시간에 따라 0.5-1시간 동안 평형화 시켰다.

3. Micro-PFR에서 장기간 안정성

20°C와 45°C에서 효소의 활성이 감소 될 때까지 최적 flow rate에서 고정화된 효소 반응기를 연속적으로 작동시켜 반응기의 작동 안정성을 평가하였다. 0.1 mM *p*-NPB 기질을 LC-6AD pump로 micro-reactor에 연속적으로 공급하여 출구에서 나오는 *p*-NP를 1 mL sampling하여 UV/visible-spectrophotometer를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

제4절 TA-Fe^{III}/AAO membrane에 tyrosinase 고정화 및 적용

1. Tyrosinase activity 측정

Mushroom tyrosinase는 기질인 L-tyrosine^o] 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA)으로 산화되는 반응을 이용한 cresolase activity를 측정하였다 (Figure 3). 이때 L-DOPA 가 dopaquinone으로 산화되는 것을 막기 위해 환원제로 L-ascorbic acid를 같이 첨가해 주었다 [23, 25, 58, 59]. 반응은 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 2.5 mM L-tyrosine과 2.5 mM L-ascorbic acid를 녹인 용액을 기질로 사용하였고, 반응 후 얻은 sample 200 uL에 2 M HCl 100 uL, 15% nitrate-molybdate solution (15% sodium molybdate, 15% sodium nitrate) 200 uL, 2 M NaOH 300 uL 그리고 중류수 100 uL를 순서대로 넣은 후 L-DOPA의 생성을 460 nm에서 관찰하였다. L-DOPA의 생성은 시간에 의존적이기 때문에 1시간 후에 측정 하였다. Standard curve는 농도별로 제조한 L-DOPA 용액을 측정하여 작성하였다 (Figure 8).

2. TA-Fe^{III}/AAO에 tyrosinase 고정화

Tyrosinase를 TA-Fe^{III}/AAO membrane에 3가지 고정화 방법(EA, EAC, EAPC)으로 고정화를 진행하였다. EA 방법은 TA-Fe^{III}/AAO membrane에 0.2 mg/mL tyrosinase 용액 1 mL를 넣고 4°C에서 18시간 반응시켰다. EAC 방법은 0.2 mg/mL tyrosinase 용액 1 mL를 넣고 30분간 교반 후 25% (w/v) GA를 0.5%함유 되도록 넣은 후 4°C에서 17시간 반응시켜 제조하였다. EAPC 방법은 EAC방법에서 효소액을 넣은 후 ammonium sulfate (25%, w/v) 넣고 30분간 효소침전을 유도한 후 GA를 0.5% (w/v)함유하도록 넣고 4°C에서 17시간 반응시켰다. 미 반응 알데하이드 그룹을 제거하기 위해 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)에 넣고 30분간 처리 하고 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하여 5회 이상 세척하였다.

3. 고정화 tyrosinase의 저장 안정성과 재사용성 측정

고정화 tyrosinase와 free tyrosinase의 저장 안정성을 측정하기 위해 25°C로 설정된 thermo mixer에서 효소 활성을 측정하였다. 활성 측정 방법은 tyrosinase 활성도 측정 방법과 동일하다. 측정 완료 후 고정화 효소의 경우 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 이상 세척 후 4°C에 보관하였다.

고정화 tyrosinase의 재사용성 측정은 활성측정 방법과 동일하게 측정하였으며, 실험 종료 후 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)으로 여러 번 세척 후 재사용하였다.

4. TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane을 micro-PFR 적용

AAO membrane 표면에 TA-Fe^{III}를 코팅한 후 tyrosinase 효소를 고정화 한 담체 TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane을 사용하여 700 uL 부피의 반응기를 제작하였다. 반응기의 작동과 설계는 lipase 와 동일한 방법으로 진행하였다. Flow rate은 0.02-0.1 mL/min으로 변화시키면서 체류시간에 따른 L-DOPA의 생산을 모니터링 하였다.

5. Micro-PFR의 작동 안정성 및 L-DOPA 연속 생산

L-DOPA를 연속적으로 생산하기 위해 TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane 기반 micro-reactor에 0.1 mL/min의 유속으로 기질을 연속적으로 흘려보내면서 출구에서 나오는 L-DOPA의 농도를 측정하였다. 출구에서 나오는 용액 200 uL를 샘플링 하여 2 M HCl 100 uL, 15% nitrate-molybdate solution (15% sodium molybdate, 15% sodium nitrate) 200 uL, 2 M NaOH 300 uL 그리고 중류수 100 uL를 순서대로 넣은 후 L-DOPA의 생성을 460 nm에서 관찰하였다.

Table 3. Physical properties of commercially available AAO membrane

Property	Range
Pore size	0.01 um; 100 nm
Thickness	56.0-60.0 um
Porosity	40%
Pore density	$10^{10}/\text{cm}^2$
Size	13 mm (no supporting ring)

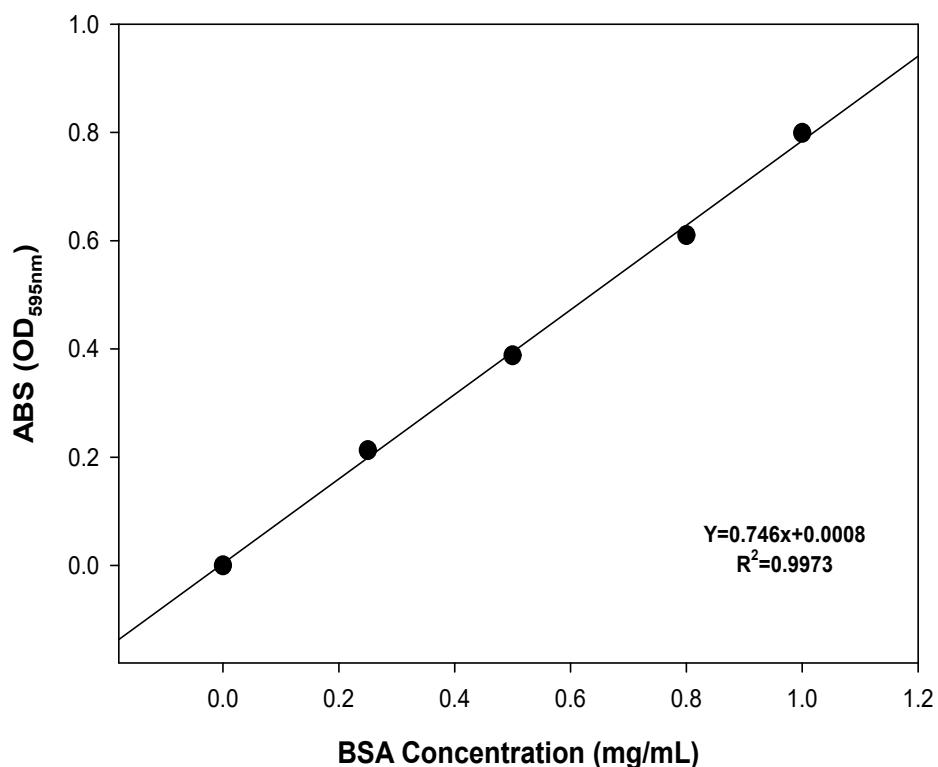


Figure 6. Standard curve for the determination of protein concentration.

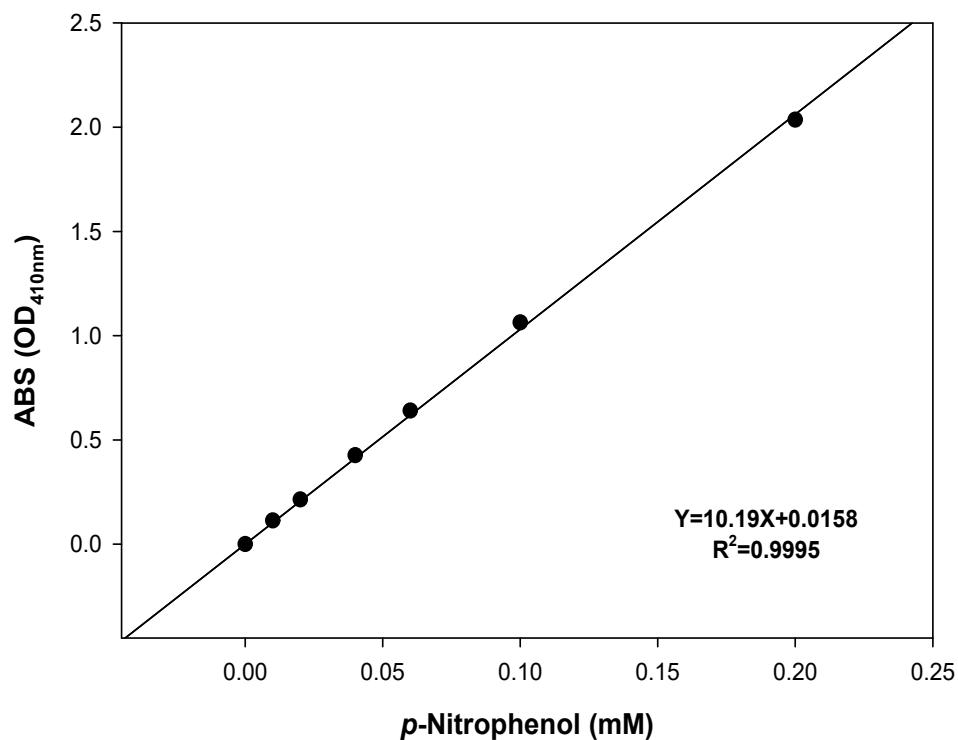


Figure 7. Standard curve for the determination of *p*-nitrophenol.

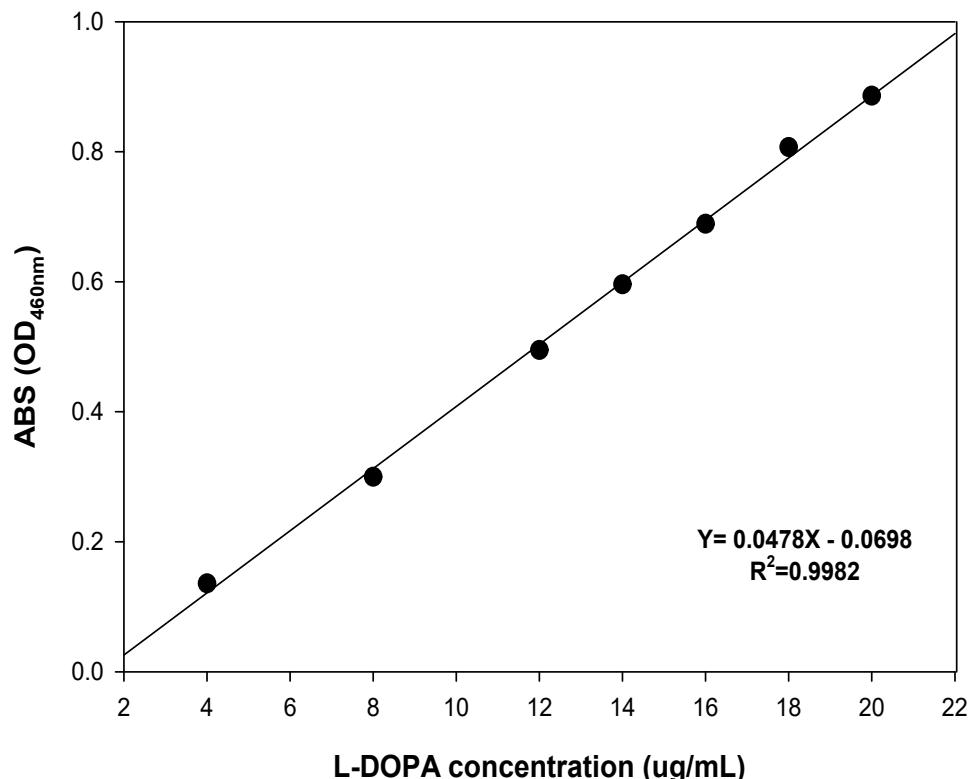


Figure 8. Standard curve for the determination of L-DOPA.

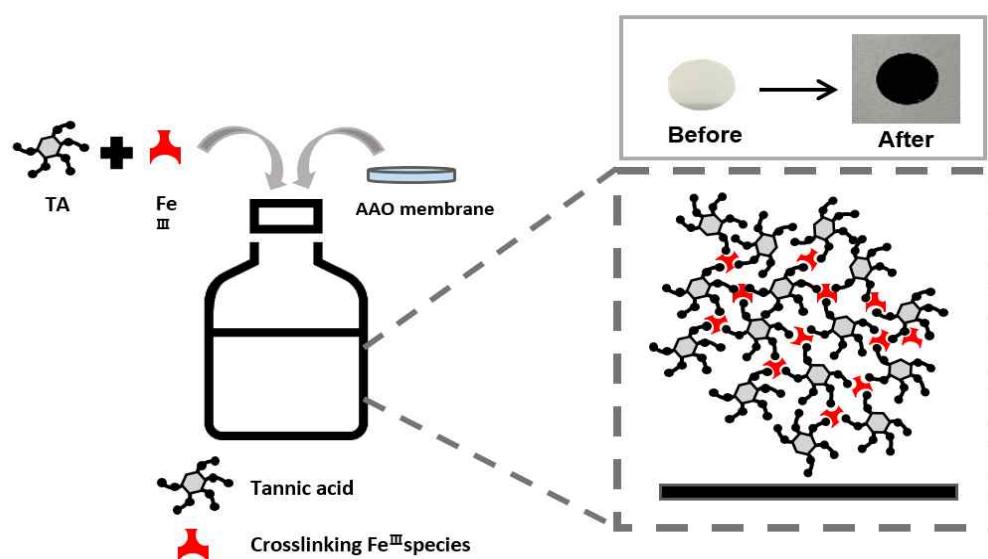


Figure 9. Schematic description of the preparation of the TA-Fe^{III}/AAO composite membranes.

제3장 결과 및 고찰

제1절 TA-Fe^{III}/AAO membrane

1. TA와 FeCl₃ 합성비율에 따른 효소고정화

TA와 FeCl₃의 합성 비율에 따른 최적 조건을 찾기 위한 실험을 진행 하였다. 각 vial에 TA와 FeCl₃의 몰 비율이 1:2 (M1), 1:1 (M2), 3:2 (M3), 2:1 (M4) 이 되도록 넣은 후 AAO membrane을 넣고 상온에서 3시간 동안 200 rpm에서 반응시켰다. 반응 종료 후 5회 이상 중류수로 세척하고 사용한 효소 buffer로 3번 세척 후 동일한 양의 효소를 고정화 하였다. 고정화 후 상등액을 회수하여 남아있는 단백질 양을 Bradford method를 이용하여 측정하였다. Lipase 효소 1 mg/mL를 각 담체에 고정화 하였을 때 M1은 54.48%, M2는 58.36%, M3는 57.55%, M4는 72.04%로 TA와 FeCl₃의 몰 비율이 2:1 일 때 가장 높은 고정화 효율을 보였다. 이는 FeCl₃농도 보다 더 높은 농도의 TA가 존재 할 경우 membrane 표면에 더 많은 양의 OH기로 인해 효소 고정화 효율이 높아진 것으로 사료 된다 (Table 4) [51, 60]. 또한 TA 와 FeCl₃의 몰 비율에 따른 전환율을 보았을 때 M1 31.80%, M2 26.62%, M3 49.76%, M4 69.24%로 2:1의 몰 비율에서 가장 높은 전환율을 보였다 (Figure 10). 이 결과를 바탕으로 TA와 FeCl₃ 합성 몰 비율을 2:1로 고정하여 실험을 진행하였다.

Table 4. Immobilization yield and recovery activity of LIP/TA-Fe^{III}/AAO membranes prepared with the different monomers concentration

Membrane	[TA]	[FeCl ₃]	ratio	Enzyme concentration (mg/mL)	Immobilization yield (%)	Recovered activity (%)
M1	0.02	0.04	1:2	1	54.48	32.38
M2	0.02	0.02	1:1	1	58.36	27.11
M3	0.03	0.02	3:2	1	57.55	50.67
M4	0.02	0.01	2:1	1	72.04	55.08

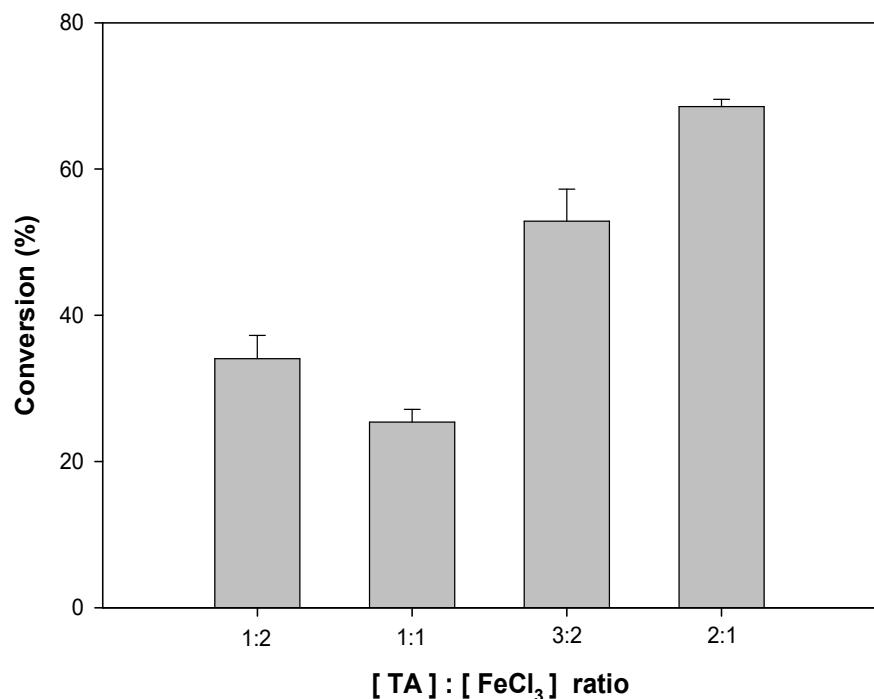


Figure 10. Effect of TA : FeCl_3 molar ratio on conversion.

2. Scanning Electron Microscope (SEM) 측정

제조된 TA-Fe^{III}/AAO membrane의 표면과 cross sectional을 관찰하기 위해 SEM image 분석을 하였다. Sample 분석 전 중류수로 3회 이상 세척 후 동결 건조 하여 측정하였다. Figure 11은 아무것도 처리하지 않은 AAO membrane과 TA-Fe^{III} 코팅 후 AAO membrane의 표면과 cross sectional을 SEM을 통해 관찰한 것이다. Figure 11 (A)를 보면 AAO membrane의 비대칭 세공을 확인 할 수 있으며 직경은 약 100-130 nm 이다. Figure 11 (B)와 (D)는 AAO membrane을 TA와 FeCl₃ 2:1의 농도비율인 용액에 넣고 200 rpm에서 3시간동안 반응시킨 후 SEM image이다. 그 결과 AAO membrane 표면에 TA-Fe^{III}가 코팅된 것을 확인 하였고, 같은 sample을 crack내어 cross sectional을 관찰한 결과 약 100 nm의 pore 내부까지 TA-Fe^{III}가 코팅 된 것을 확인 하였다.

TA-Fe^{III}/AAO membrane 제조 후 효소를 고정화 한 SEM image는 Figure 12에 나타낸다. 효소 고정화 후 TA-Fe^{III}/AAO membrane의 표면은 고정화하기 전 (Figure 11)과 비교하였을 때 표면이 smooth해진 것을 확인 할 수 있으며 pore size가 효소로 인해 작아진 것을 확인할 수 있다.

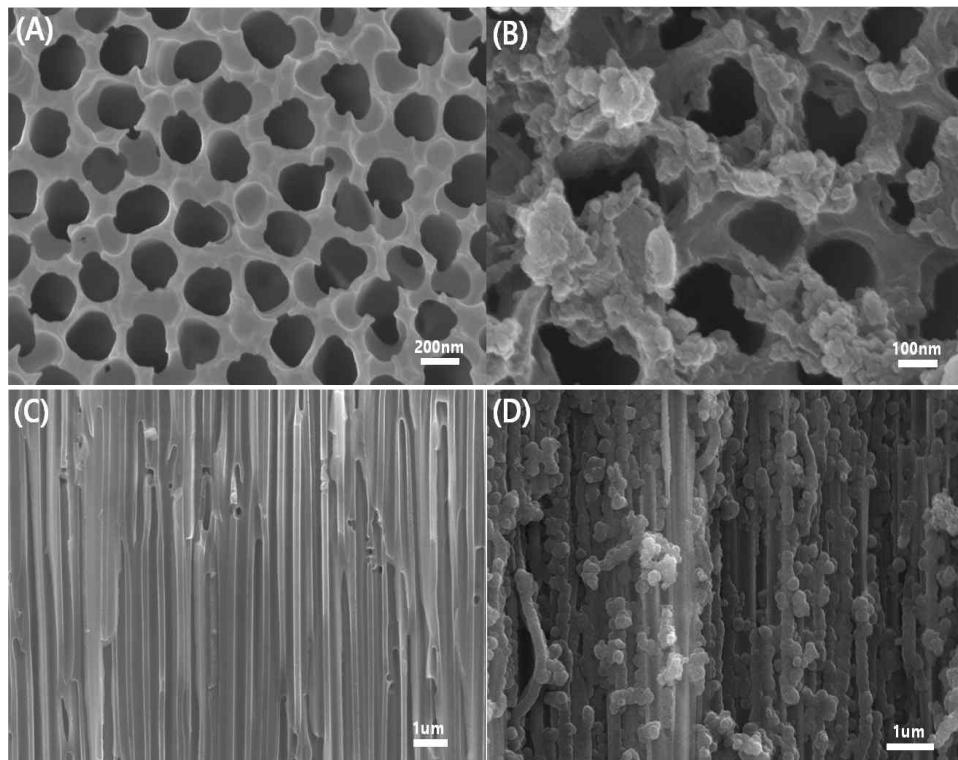


Figure 11. SEM images of (A) pristine AAO membrane, (B) TA-Fe^{III}/AAO membrane and cross section of (C) pristine AAO membrane, (D) TA-Fe^{III}/AAO membrane.

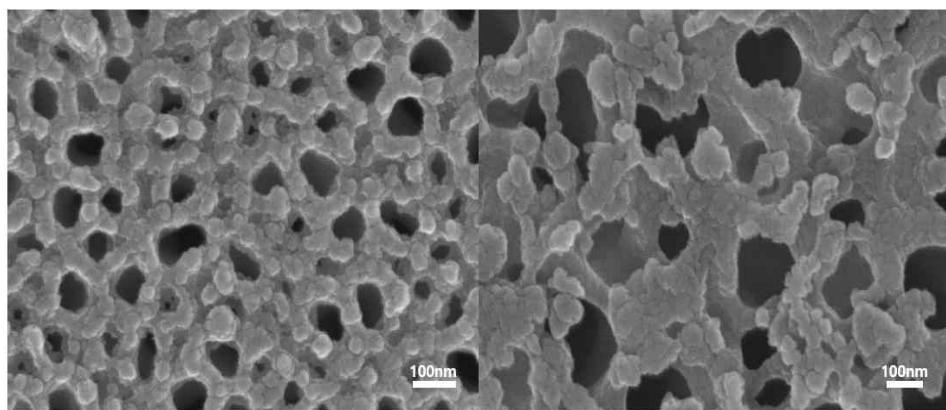


Figure 12. SEM image after enzyme immobilization onto TA-Fe^{III}/AAO membrane.

3. Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy 측정

제조된 TA-Fe^{III}/AAO membrane의 화학적 특징을 특성화하기 위해 FT-IR을 측정하였다. Figure 13는 AAO membrane 표면에 TA-Fe^{III} 합성을 확인하기 위해 FT-IR을 측정한 결과이다. FT-IR spectrum 은 500-4000 cm⁻¹의 파장범위에서 측정 되었다. (A)와 (D) spectrum에서 파장 3000-3500 cm⁻¹의 범위에서 넓은 -OH stretching band가 생긴 것을 확인 할 수 있으며, (A) spectrum에서의 1714 cm⁻¹의 카르보닐 그룹의 C=O stretching band가 (D) spectrum에서 강도가 감소하고, 1704 cm⁻¹로 더 낮은 파수로 위치가 이동함을 확인 할 수 있다. 또한 1450-1710 cm⁻¹의 파장은 aromatic ring에 의한 peak이며, Fe^{III}와 phenolic hydroxyl group 사이에서의 상호작용이 C-O 결합 stretching vibration에 영향을 미치기 때문에 (A) 1319 cm⁻¹의 파장이 (D) 1326 cm⁻¹로 이동한 것을 확인 할 수 있다. (C)와 (D) spectrum 변화는 TA와 Fe^{III}의 착화에 의한 것으로 AAO membrane 표면에 TA-Fe^{III} 합성이 되었음을 확인 하였다. 또한 1000-750 cm⁻¹의 작은 peak들은 치환된 benzene ring에 해당된다 [61]. TA-Fe^{III} 복합체 메커니즘은 Figure 5 에 나와 있다.

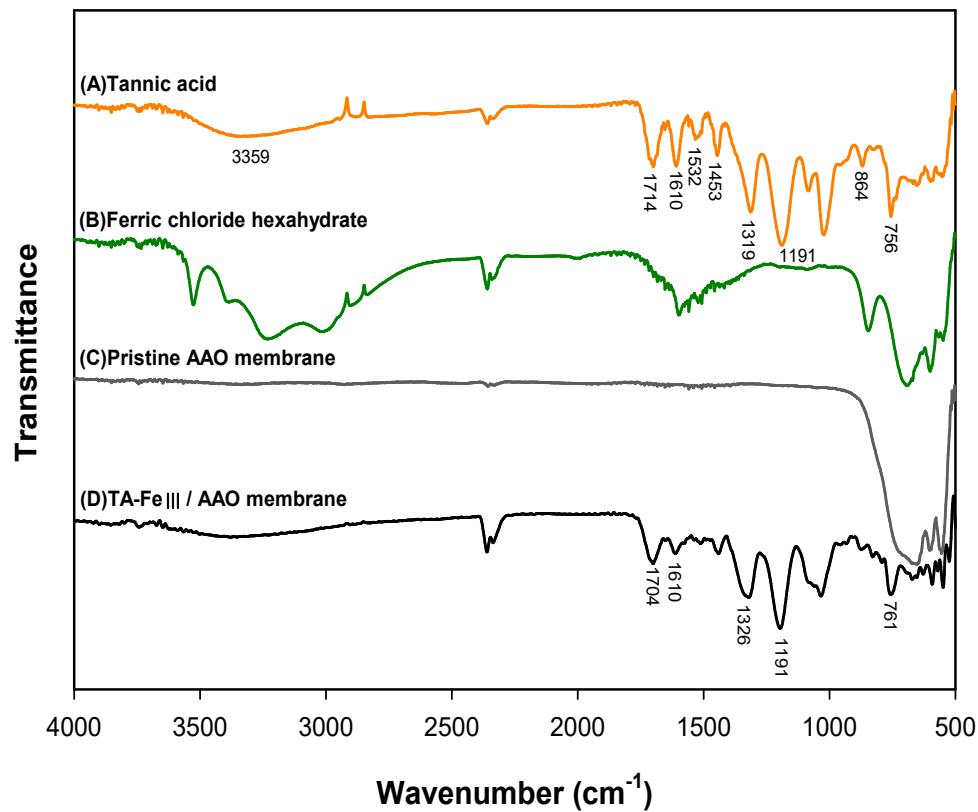


Figure 13. Overlapped FT-IR spectra of (A) tannic acid, (B) ferric chloride hexahydrate, (C) pristine AAO membrane and (D) TA-Fe^{III}/AAO membrane.

Table 5. FT-IR peak and corresponding functional groups of tannic acid and TA-Fe^{III}/AAO membrane

spectrum	Wavenumber (cm ⁻¹)	Functional group	Vibration mode
Tannic acid and TA-Fe ^{III} /AAO membrane	3359	-OH	Stretching vibration
	1714, 1704	C=O	Stretching vibration
	1610	C-O	Aromatic C-O symmetrical stretch
	1532	C=C	Aromatic ring C=C stretching
	1453		
	1319,1326	C-O	Bending vibration
	1191	C-O	Correspond to substituted benzene
	756, 761	C=C	rings

제2절 TA-Fe^{III}/AAO membrane 효소고정화

1. 고정화 효소의 pH와 온도에 따른 활성도 변화

고정화 된 lipase의 pH에 따른 활성도 변화를 측정하기 위해 각 담체를 pH 5-10의 buffer에 두 시간 동안 노출 시켰다. 가장 높은 활성 값을 100%로 하여 상대 활성을 측정하였다. Free lipase의 경우 pH 8에서 가장 높은 활성을 보였고 고정화 lipase의 경우 pH 8.5에서 가장 높은 활성을 보였다. 고정화 lipase의 경우 염기성보다 산성에서 더 큰 활성 저해를 보였다. 또한, 전반적인 최적 pH가 고정화 하였을 때 염기성 쪽으로 이동한 것을 확인 할 수 있다 (Figure 14). 이러한 변화는 TA-Fe^{III}/AAO membrane 표면과 효소사이의 공유결합으로 인해 효소 또는 TA-Fe^{III}/AAO membrane 표면그룹 주위의 미세 환경에 분포하고 있던 산성 또는 염기성아미노산의 이온화강도 변화에 의한 것으로 사료된다 [62-64].

고정화 lipase와 free lipase의 온도에 따른 활성도 변화를 측정하기 위해 각 담체를 20-70°C의 온도범위에서 2시간 동안 노출시켰으며 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 사용하여 활성을 측정하였다. Free lipase의 경우 30°C에서 가장 높은 상대 활성을 보였고, 40°C이상의 온도에서는 60% 이하로 상대 활성이 감소한 것을 확인 할 수 있다. 고정화 lipase의 경우 50°C에서 가장 높은 상대 활성을 보였으며 특히 40-70°C범위에서 free lipase보다 더 넓은 작동 온도 범위를 가지는 것을 확인 할 수 있다. 이는 효소가 고정화 되면서 효소를 안정화 시키고 보호하여 효소의 변성을 감소시켜 온도 안정성을 개선시킨 결과로 사료된다 [65-67].

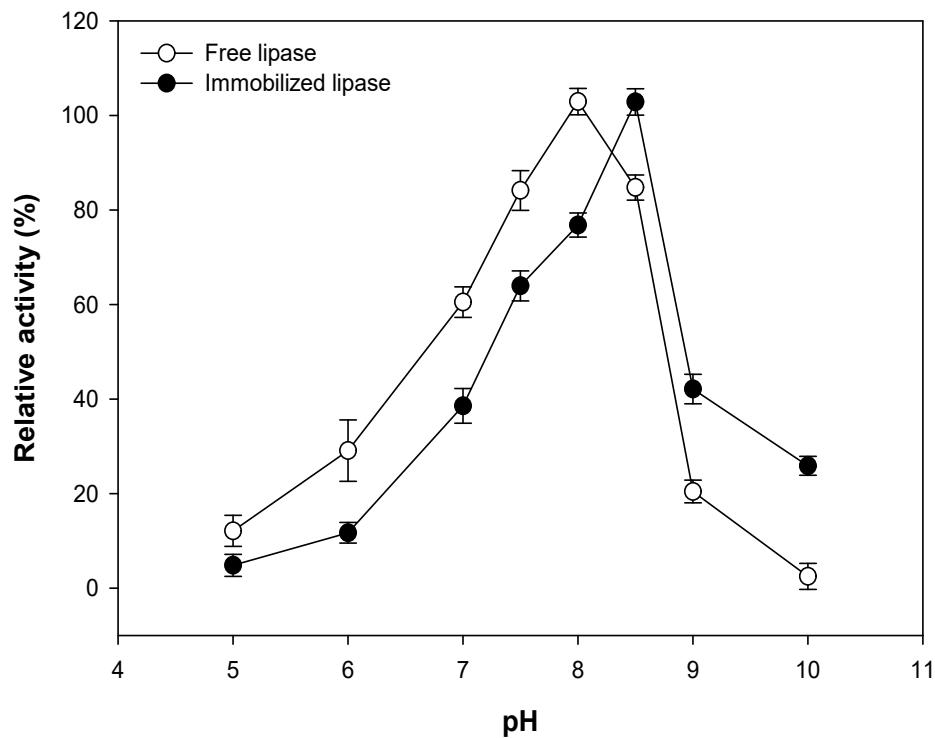


Figure 14. Effect of pH on the activity of free and immobilized lipase.

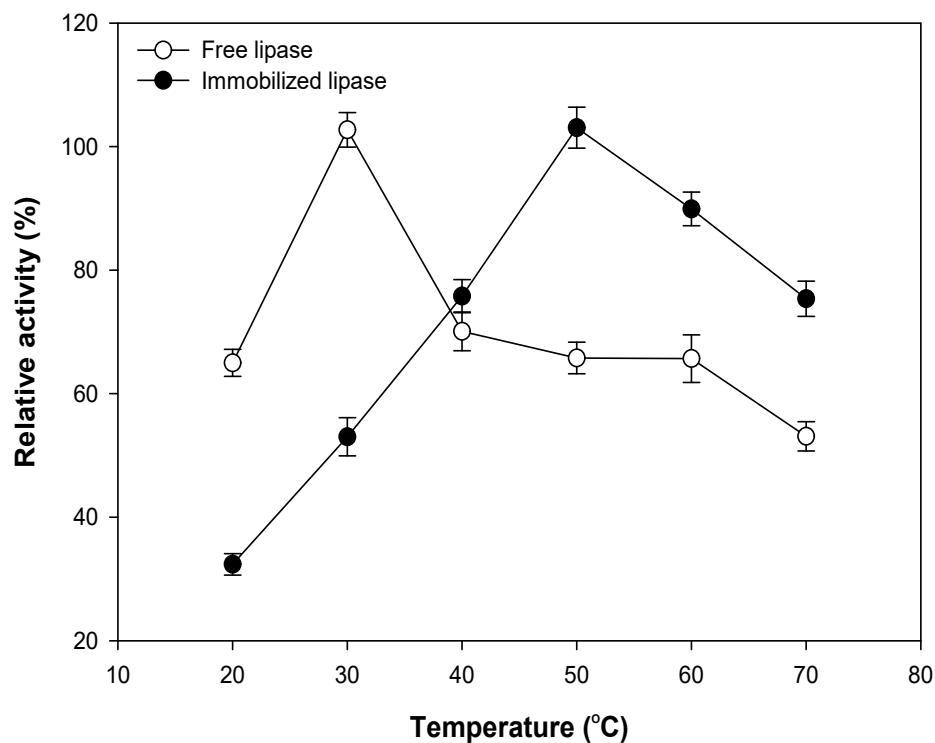


Figure 15. Effect of temperature on the activity of free and immobilized lipase.

2. 고정화 효소의 저장안정성과 재사용성

효소 고정화의 주요 2가지 단점은 확산 장애와 효소 누출로 잘 알려져 있다 [68]. 효소의 확산 장애는 생체촉매 멤브레인의 flow 작동을 통해 부분적으로 극복 할 수 있다. 효소 누출은 TA-Fe^{III}복합체의 코팅에 의해 극복 할 수 있는지 알아보기 위해 저장 안정성과 재사용성 실험을 진행 하였다. TA-Fe^{III}복합체의 코팅이 되지 않은 담체에 고정화된 lipase와 free lipase를 대조군으로 이용하였다. 실험은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에서 free와 고정화 효소를 25°C와 45°C에서 각각 30일, 8일간 보관 하였다. Figure 16 (A)에서 고정화 된 lipase의 상대 활성은 TA-Fe^{III} 복합체 코팅이 된 담체가 코팅이 되지 않은 담체보다 높았으며 free lipase보다는 훨씬 높은 것을 확인 할 수 있다. 30일 이후에도 고정화 효소의 활성이 약 80% 이상이 유지 된 반면 free lipase의 경우 28% 까지 떨어진 것을 확인 할 수 있다. 반면 45°C에서 LIP/TA-Fe^{III}/AAO membrane은 8일 째 49.40%로 잔류활성이 감소하였으며, LIP/AAO membrane은 35.61%, free lipase는 19.40%로 잔류 활성이 감소한 것을 확인하였다. 결과적으로 고정화 lipase가 우수한 저장 안정성을 보였다. 자유효소보다 고정화 효소가 더 높은 활성을 유지하는 이유는 담체에 고정화됨으로써 효소가 보호되어 열 안정성이 증가된 것으로 생각된다.

효소의 재사용성은 산업적 적용에서 중요한 역할을 한다 [69]. 따라서 AAO membrane에 고정화 된 lipase의 재사용을 측정하기 위해 9회 재사용하여 잔류활성을 측정하였다 (Figure 17). 9회 재사용된 이후 TA-Fe^{III}복합체 코팅 담체의 경우 효소의 잔류 활성이 85.7%였으며 코팅이 되지 않은 담체의 경우 60.10%로 잔류 활성이 감소한 것을 확인 할 수 있다. 이는 TA-Fe^{III}복합체 코팅에 의해서 AAO membrane의 표면에 수많은 -OH기로 인해 효소가 더 안정적으로 담체와 결합되어 장기간 저장과 재사용에도 효소의 누출을 줄이는 것으로 추정된다.

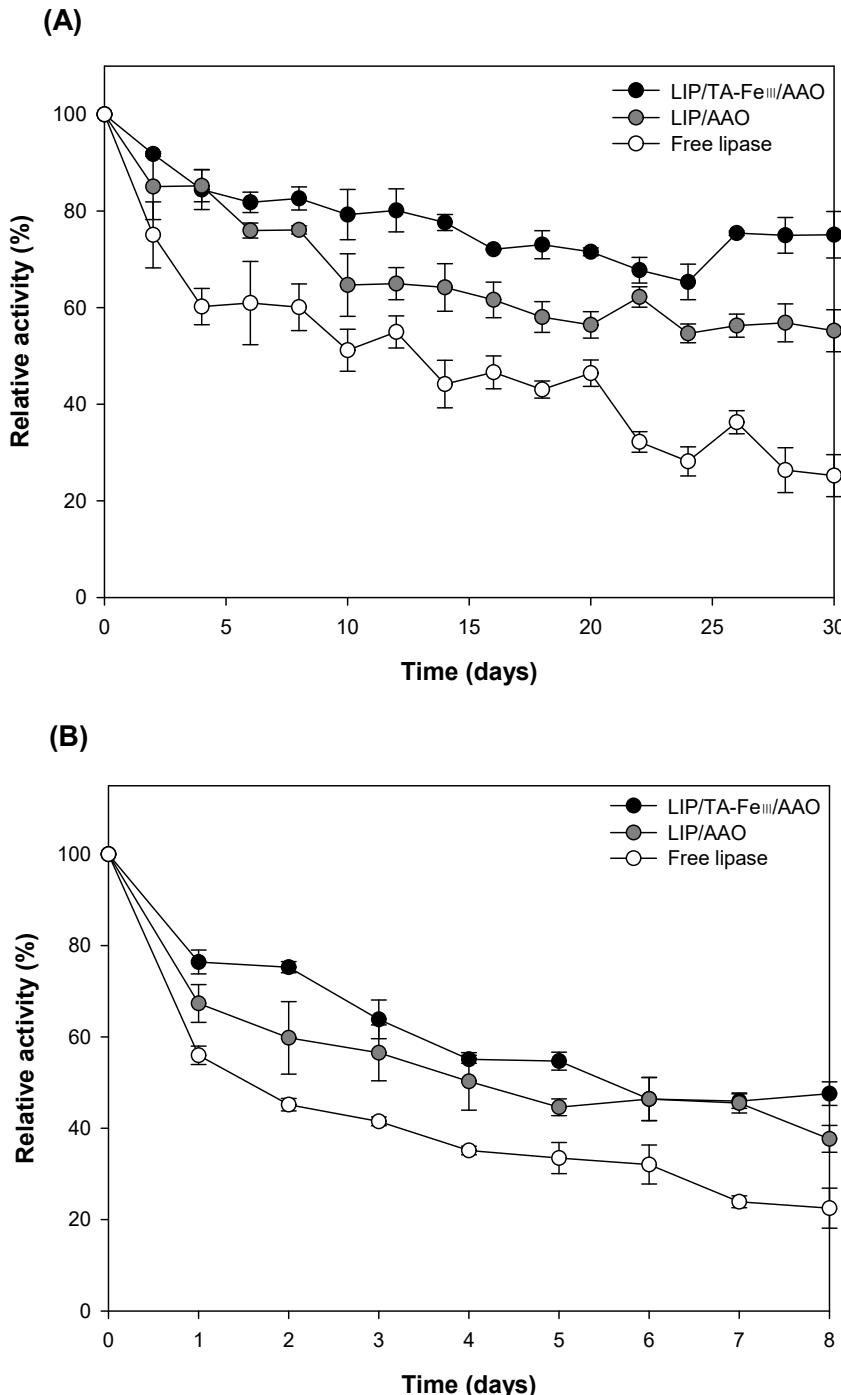


Figure 16. The activity changes of free and immobilized lipase with storage time (storage condition: pH 7.5, (A) T=25°C, (B) T=45°C).

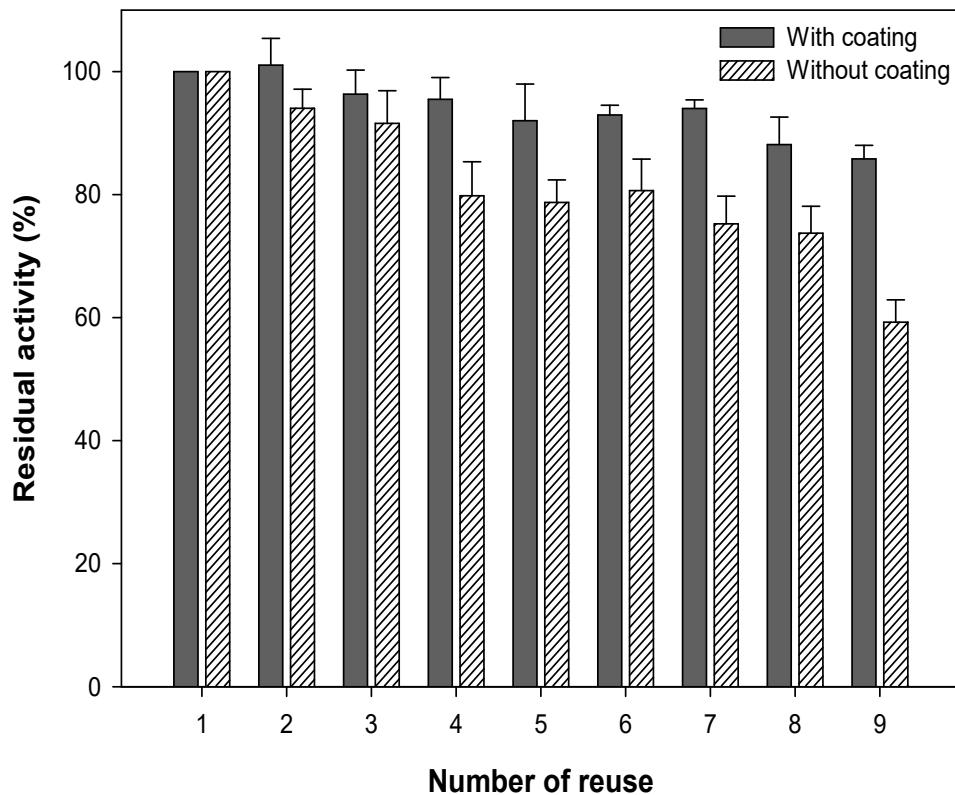


Figure 17. Residual activity of immobilized lipase after enzyme recycle.

제3절 TA-Fe^{III}/AAO membrane기반 micro-PFR

1.TA-Fe^{III}/AAO membrane을 이용한 micro-PFR 설계

TA-Fe^{III}/AAO membrane에 고정화 된 lipase의 공학 성능은 연속 흐름 micro-reactor에서 평가 되었다. LIP/TA-Fe^{III}/AAO membrane은 직경이 13 mm인 filter holder 내부에 위치시켜 Figure 18과 같이 제작하였으며 반응기 부피는 700 uL이다. Micro-reactor에 사용된 펌프는 LC-6AD를 사용하여 유량을 제어하여 체류시간을 조절하였다. 반응 용액은 10 mM *p*-NPB를 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 100배 희석하여 사용하였다. 기질용액은 LC-6AD 펌프를 이용하여 일정 속도로 반응기의 하단입구에서 공급되고 LIP/TA-Fe^{III}/AAO membrane^o] 포함된 micro-reactor를 통과하여 상부의 출구를 통해 생성물인 *p*-NP를 회수하였다. 회수한 용액을 UV/visible-spectrophotometer를 통해 410 nm에서 측정하였다. LIP/TA-Fe^{III}/AAO membrane기반 micro-reactor의 diagram과 실제 모습은 Figure 19에 나타냈다.

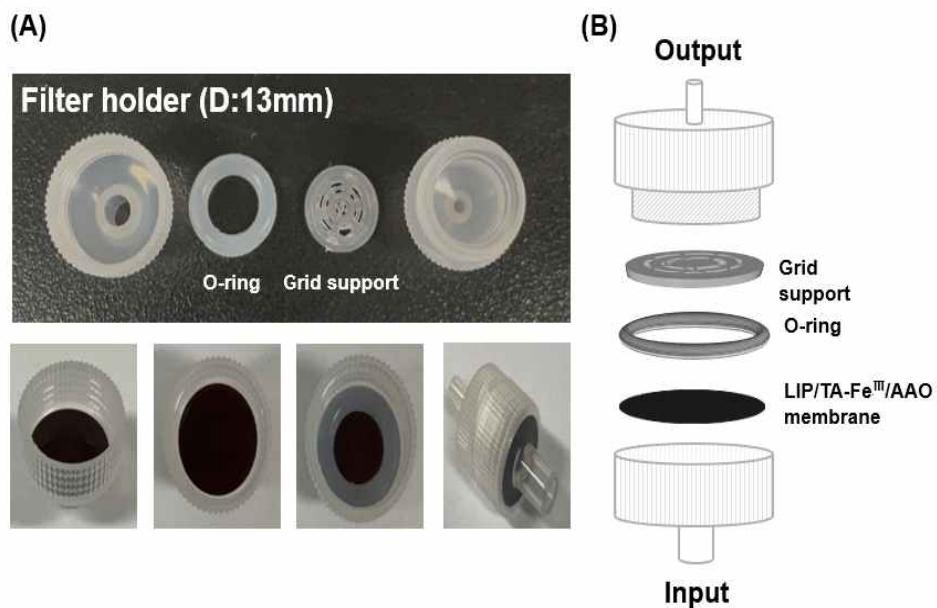


Figure 18. (A) Components of TA-Fe^{III}/AAO membrane micro-reactor (B) Expanded-view schematic of a TA-Fe^{III}/AAO membrane micro-reactor assembly.

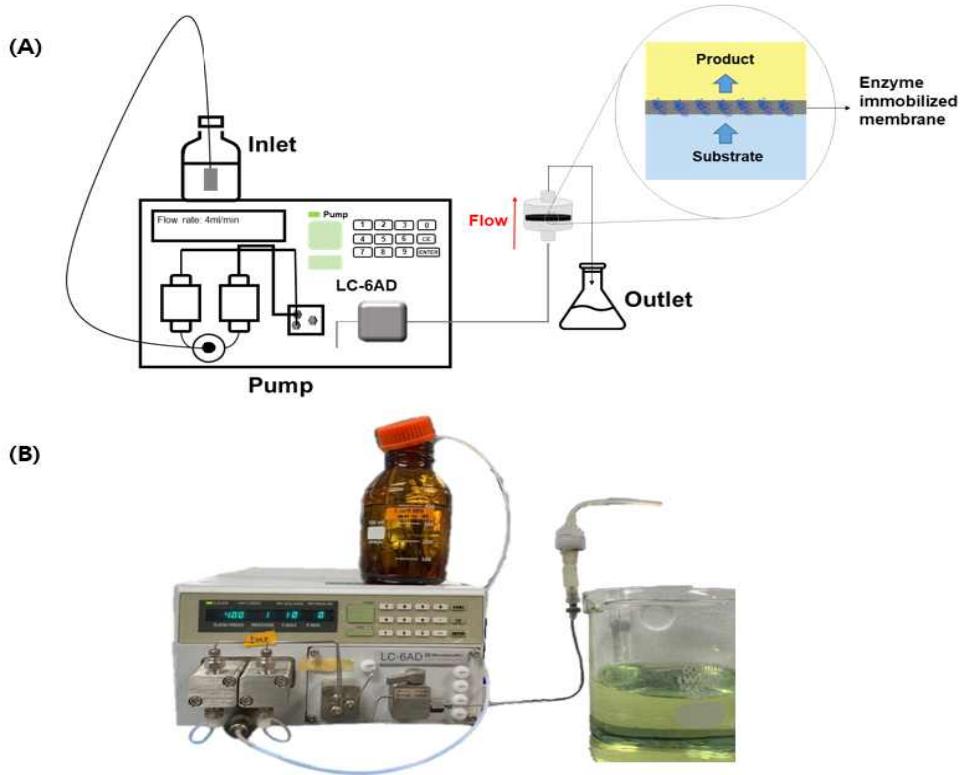


Figure 19. (A) Schematic diagram of the continuous flow micro-reactor system to assay the activity of the immobilized lipase. (B) Actual setup of the continuous flow enzymatic membrane micro-reactor system.

2. 최적 체류시간 선정

Figure 20은 LIP/TA-Fe^{III}/AAO membrane기반 micro-reactor에서 *p*-NPB의 전환율과 생산성에 대한 체류시간의 영향을 보여준다. 체류시간(Residence time, RT)은 반응기의 부피(V)를 유속(flow rate)으로 나누어 준 값이며, flow rate 1, 2, 3, 4, 5 mL/min의 체류시간은 각각 42, 21, 14, 10.5, 8.4초이다. *p*-NPB의 전환율은 flow rate 1 mL/min에서 5 mL/min으로 증가함에 따라 각각 65.38%, 47.79%, 41.58%, 37.82%, 22.77%로 감소한다. 이는 flow rate이 증가함에 따라 기질이 반응기 내에 머무르는 시간이 단축되기 때문이다. 그러나 생산성은 flow rate 1 mL/min에서 4 mL/min까지 증가하다가 4 mL/min에서 13.57 mol/h·L로 가장 높았고 그 이후로 감소하였다. 생산성은 농도, 반응기 부피 그리고 flow rate을 고려하여 계산하였으며 효율적인 생성 속도를 고려했을 때 최적 flow rate을 4 mL/min으로 선택하여 반응기를 작동하였다.

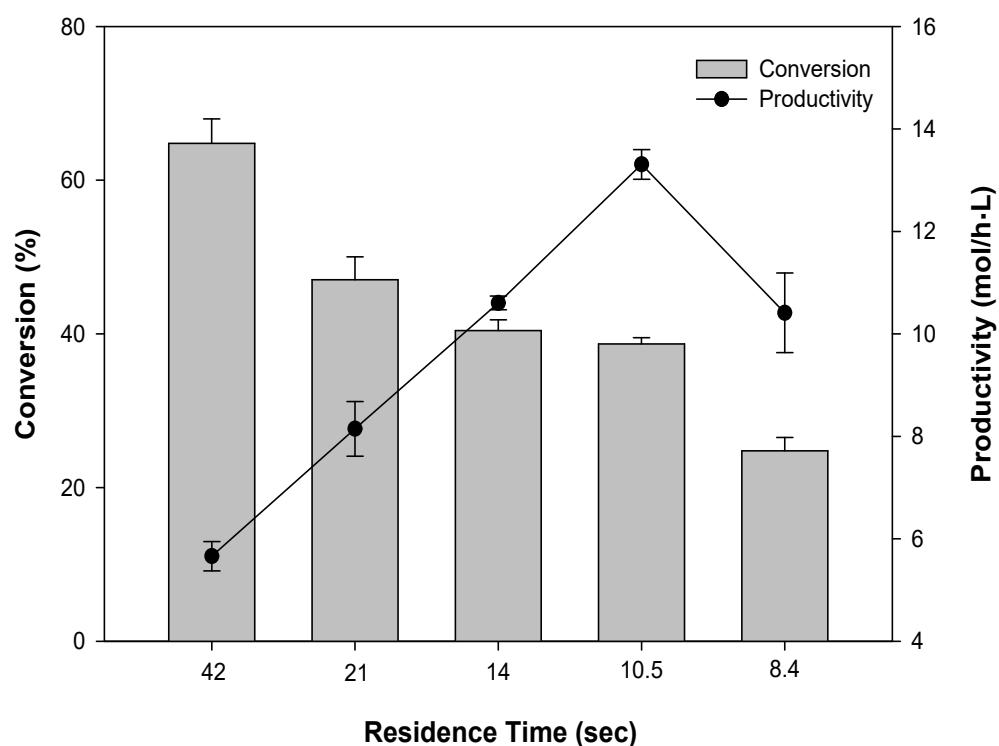


Figure 20. The effect of residence time on the conversion of *p*-nitrophenyl butyrate.

3. Reactor수에 따른 전환율의 영향

Reactor수에 따른 체류시간에서 반응물의 전환율을 연구하기 위해 실험을 진행하였다. 반응기 입구에서 기질용액의 농도는 0.1 mM *p*-NPB를 사용하였으며, 1개부터 6개의 LIP/TA-Fe^{III}/AAO membrane를 연속적으로 연결하여 일정한 유속으로 반응을 진행하였다. 유속은 4 mL/min으로 고정하였으며, reactor수에 따른 체류시간은 각각 1개 (RT: 10.5 sec), 2개 (RT: 21 sec), 3개 (RT: 31.5 sec), 4개 (RT: 42 sec), 5개 (RT: 52.5 sec), 6개 (RT: 63 sec)이다. Figure 21을 보면 reactor를 1개 사용하였을 때 반응물의 전환율은 약 38.48%이며, 2개일 때 63.03%, 3개일 때 77.89%, 4개일 때 86.74%, 5개일 때 92.94%, 6개일 때 96.33%이다. 반응기의 개수를 증가시킴에 따라 반응하지 않고 나온 나머지 반응물을 약 40% 전환하는 것을 확인 할 수 있다. 따라서 4 mL/min의 유속으로 reactor를 6개 사용하였을 경우 63초의 체류시간에 약 96%의 전환율에 도달할 수 있다.

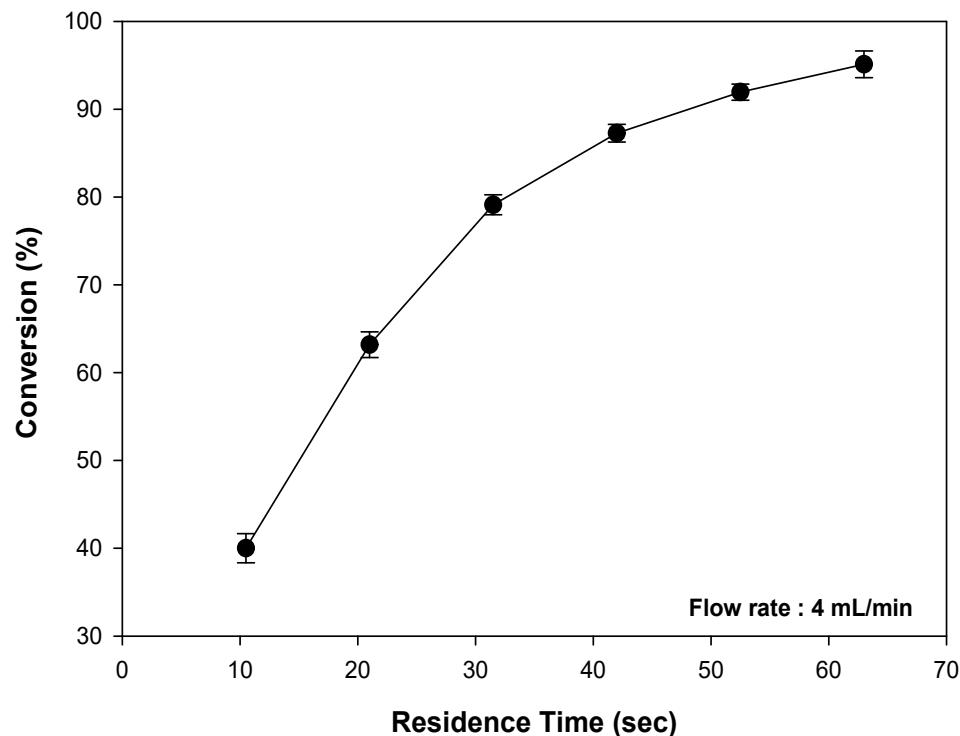


Figure 21. Effect of residence time on the conversion of LIP/TA- Fe^{III} /AAO membrane micro-reactor.

4. Micro-PFR의 작동 안정성

개발된 생물 반응기의 성공은 작동 시간 동안 효소 활성의 유지에 크게 좌우된다. 또한 고정화 효소는 장기간 연속 사용하는 경우가 보통이며, 효소의 열 안정성은 산업적 이용 평가에 중요하다 [16, 69]. 따라서 고정화 된 효소 반응기의 작동 안정성은 4 mL/min ($RT=10.5\text{ sec}$)의 유속으로 20°C와 45°C에서 0.1 mM *p*-NPB의 연속적인 가수분해를 모니터링 함으로써 평가 되었다. 20°C에서 반응기를 80일 동안 작동하였을 때 60일 동안 연속 운전 후에도 97%이상의 상대 활성을 유지 하였으며 80일 작동 후 초기 활성의 약 90% 활성이 유지 되었다 (Figure 22(A)). 또한, 45°C에서 20일간 LIP/TA-Fe^{III}/AAO membrane micro-reactor를 연속 작동하였을 때 9일째 초기 활성의 41.09%가 유지되었다 (Figure 22(B)). 이는 효소가 담체에 고정화되면서 외부로부터 보호받아 효소의 열 안정성이 증가했기 때문이라고 할 수 있다.

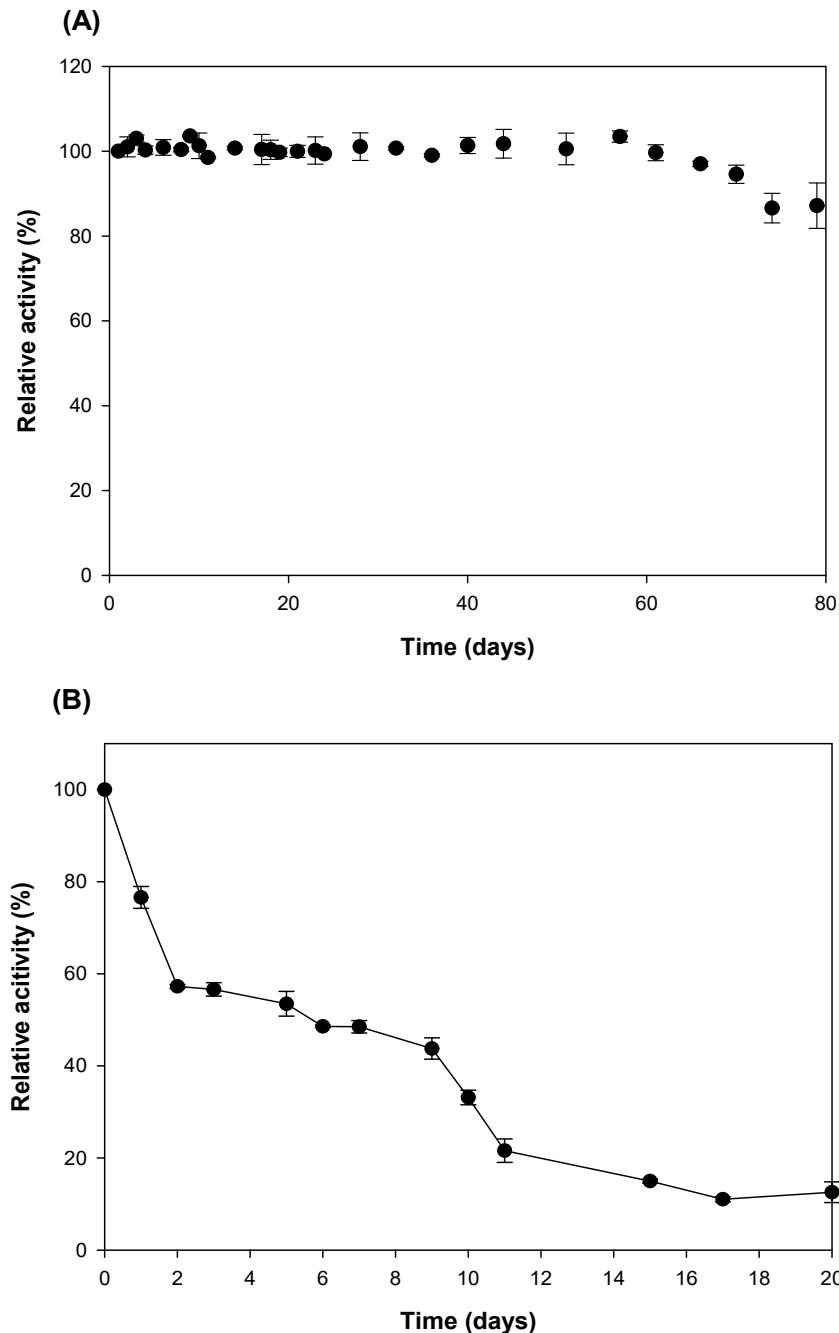


Figure 22. Operational stability of LIP/TA- Fe^{III} /AAO membrane micro-reactor (operational condition: flow rate 4 mL/min, pH 7.5, (A) $T=20^\circ\text{C}$ (B) $T=45^\circ\text{C}$).

제4절 TA-Fe^{III}/AAO membrane에 tyrosinase 고정화 및 적용

1. EA, EAC, EAPC 법에 따른 Tyrosinase 활성

Tyrosinase는 Enzyme Adsorption (EA), Enzyme Adsorption Crosslinking (EAC) 그리고 Enzyme Adsorption Precipitation Crosslinking (EAPC)의 3가지 방법으로 TA-Fe^{III}/AAO membrane에 고정화 되었다. EA는 단순흡착 방법이며, EAC는 GA를 사용한 효소가교가 추가되었고, EAPC는 황산암모늄 침전과 GA의 가교에 의해서 효소가 고정화 되었다. Figure 23은 3가지 고정화 방법에 따른 활성 변화를 보여준다. EA, EAC 그리고 EAPC법 활성은 TA-Fe^{III}/AAO membrane의 단위 중량 당 $\Delta A_{460}/\text{min}$ 으로 각각 0.432, 0.378, 0.691 그리고 0.572 (without coating) 으로 EAPC법이 EA와 EAC법 보다 약 1.5배에서 2배정도 증가한 것을 확인할 수 있다. 또한, EA, EAC, EAPC법의 안정성을 측정하기 위해 4°C에서 보관하면서 활성측정을 하였다 (Figure 24). EA, EAC에서 tyrosinase의 활성이 급격히 감소한 반면에, EAPC법은 30일 이후에서 70%의 상대 활성을 유지함으로써 효소활성의 우수한 안정화를 보였다. EAPC의 더 높은 활성은 효소 침전 후 효과적인 효소 가교로 인해 TA-Fe^{III}/AAO membrane의 단위 중량 당 더 높은 효소로딩으로 설명 될 수 있다. 즉, Ammonium sulfate 첨가로 이온 강도가 증가하여 효소 분자들이 서로 응집 또는 침전이 되어 있어 효과적으로 가교되었다. 그 결과 EAPC법이 더 높은 효소로딩을 초래 하였고, 효소분자끼리의 결합력 증가로 인해 효소의 누출도 감소시켜 안정성 증가에 기여하였다 [70]. 따라서 EAPC법을 사용하여 고정화를 진행하였다.

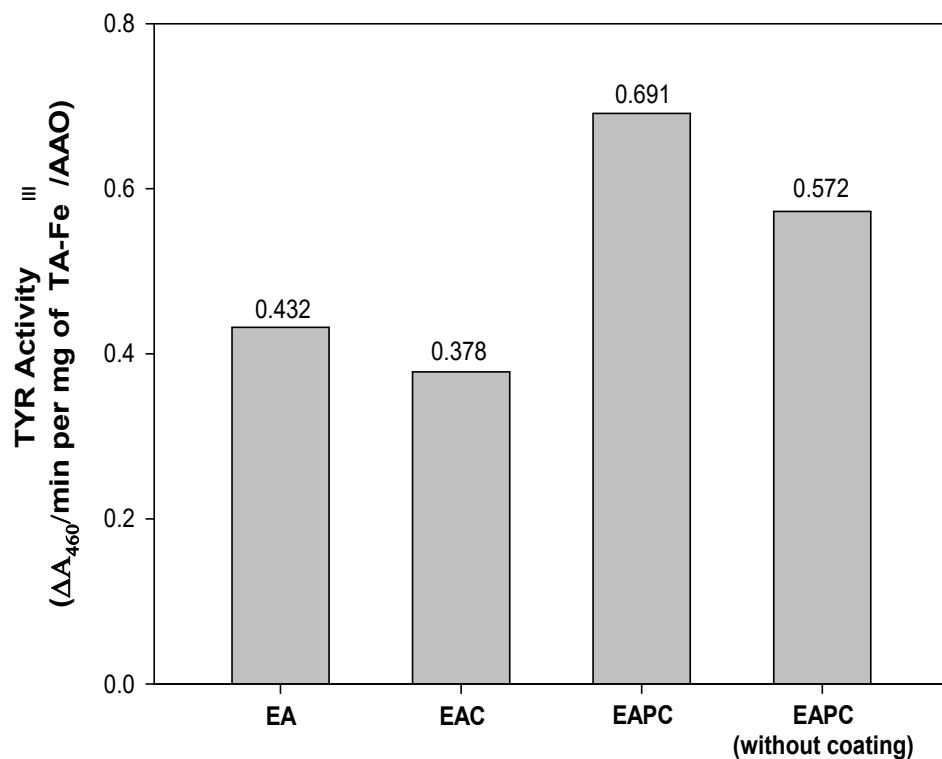


Figure 23. The enzyme activities after EA, EAC and EAPC immobilization methods.

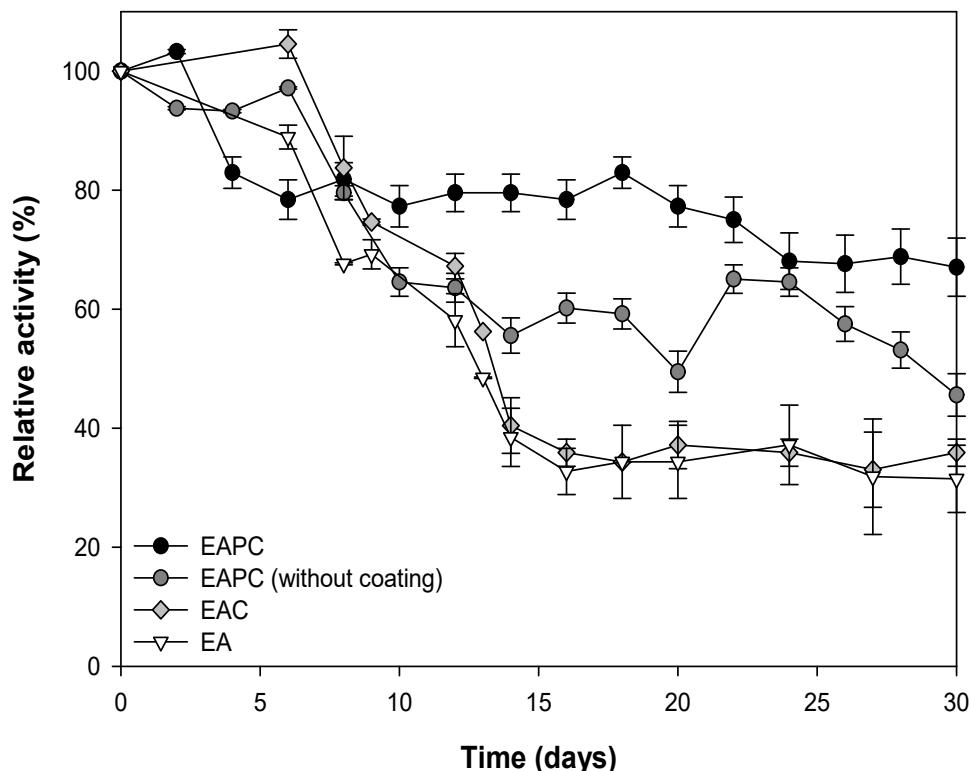


Figure 24. The storage stabilities of EA, EAC and EAPC immobilization (storage condition: pH 7.0, T=4°C).

2. Free tyrosinase와 고정화 tyrosinase의 L-DOPA 생산

Free tyrosinase와 고정화 tyrosinase의 시간에 따른 L-DOPA의 생산을 관찰하기 위해 50시간동안 생성되는 L-DOPA의 양을 모니터링 하였다. Figure 25는 0.02 mg/mL 농도의 free tyrosinase를 사용하여 시간에 따른 L-DOPA의 생성을 나타냈다. L-DOPA의 최대 생성 농도는 22시간 후에 0.046 mM이며, 27시간 이후에 L-DOPA의 농도가 약간 감소하였다. 문헌에서 보고된 바와 같이 반응 혼합물에 환원제인 L-ascorbic acid를 첨가하게 되면 L-DOPA가 dopaquinone으로 산화되는 것을 감소시키게 되는데, 시간이 지남에 따라 반응용액에서 촉매과정 중에 L-ascorbic acid가 소모되기 때문에 L-DOPA의 산화를 피할 수 없어 농도가 감소한 것이라고 할 수 있다. 또한, L-ascorbic acid의 농도 증가가 cresolase activity를 저해할 뿐만 아니라, 동시에 효소를 비가역적으로 불활성화 시키기 때문이라고 생각된다 [2, 25, 71]. Figure 26는 TA-Fe^{III}/AAO membrane에 0.2 mg/mL 농도의 tyrosinase를 고정화하여 시간에 따른 L-DOPA 생성을 관찰한 결과이다. TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane을 사용하여 50시간 반응 하였을 때 생성된 L-DOPA 농도는 0.035 mM로 free tyrosinase와 비교하였을 때 더 낮은 전환율을 보였다. 이는 효소가 담체에 고정화 되면서 물질전달저항으로 인한 결과라고 판단된다.

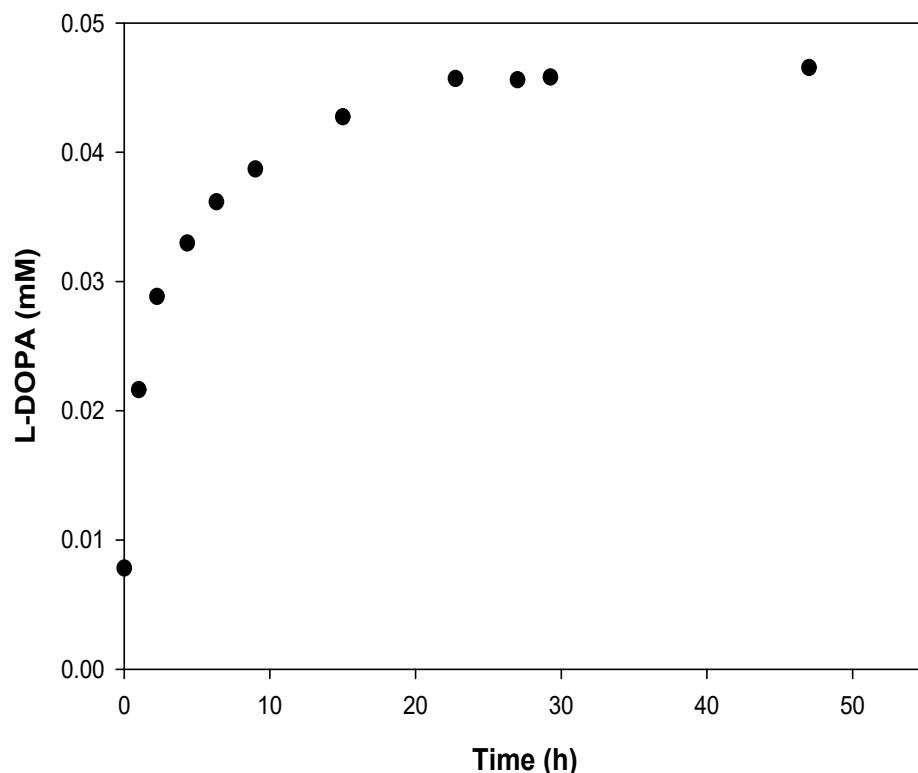


Figure 25. Production of L-DOPA with free tyrosinase (operational condition: 0.02 mg of enzyme, V=3 mL, T=25°C).

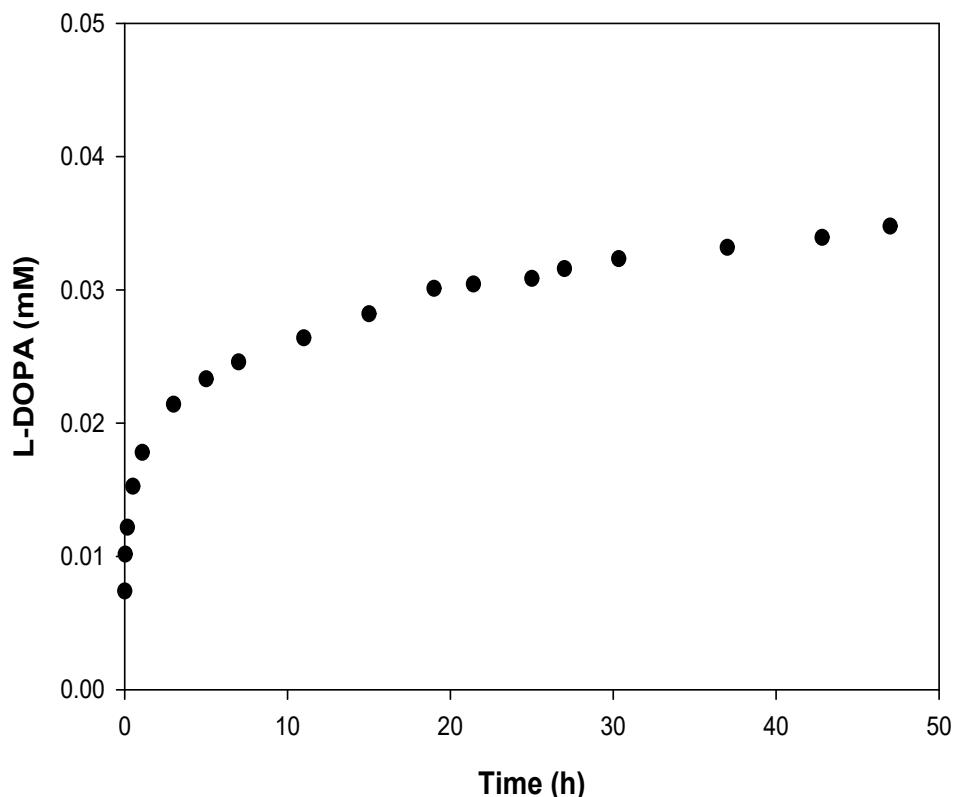


Figure 26. Production of L-DOPA using immobilized tyrosinase on TA-Fe^{III}/AAO membrane (operational condition: 0.2 mg of enzyme, V=3 mL, T=25°C).

3. 고정화 tyrosinase의 저장 안정성과 재사용성

일반적으로 free 효소는 저장하는 동안 불안정하고, 시간이 지남에 따라 효소의 활성을 잃어 반응 후 재사용이 불가능하기 때문에 free 효소의 적용이 제한된다. 이러한 단점은 고체지지체에 효소를 고정화함으로써 극복할 수 있다 [28, 72]. 저장안정성은 고정화 된 tyrosinase의 성능을 평가하는데 중요한 요소이다. Figure 27은 free tyrosinase와 TA-Fe^{III}/AAO membrane에 고정화된 tyrosinase를 4°C에서 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 30일간 보관하였을 때의 저장 안정성을 보여준다. 그 결과 효소의 활성은 저장시간 증가와 함께 감소하였다. 그러나 free tyrosinase의 경우 고정화 tyrosinase 보다 활성이 크게 감소하였다. Figure 27에서 볼 수 있듯이, TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane의 경우 30일 이후에 초기 활성의 70%를 유지하였고 TYR/AAO membrane는 48%, free tyrosinase의 경우 36%를 유지하였다. 이 결과는 TA-Fe^{III}/AAO membrane에 tyrosinase를 고정화함으로써 효소의 형태 변화가 효과적으로 제한되기 때문에 효소의 안정성을 증가시킨 것으로 생각된다 [73]. 또한, AAO membrane의 표면에 TA-Fe^{III}의 기능화로 인해 담체와 효소간의 강한 결합으로 효소의 누출이 감소되어 TA-Fe^{III}를 코팅한 담체가 코팅하지 않은 담체보다 더 높은 활성을 유지한 것으로 판단된다.

고정화 된 tyrosinase의 재사용성을 확인하기 위해 TA-Fe^{III}가 코팅된 담체와 코팅되지 않은 담체에 tyrosinase를 고정화하여 실험을 진행하였다. 처음 활성 값을 100%로 하여 잔류 활성을 계산하여 Figure 28에 나타냈다. 담체에 고정화 된 tyrosinase의 활성은 둘 다 재사용 횟수에 따라 감소하였지만, TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane가 TYR/AAO membrane보다 더 높은 재사용성을 보였다. 6번의 재사용 후 TA-Fe^{III}가 코팅된 TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane의 경우 약 65%의 잔여 활성을 보였고, 코팅되지 않은 TYR/AAO membrane의 경우 약 40%의 잔여 활성을 보였다. 이는 TA-Fe^{III}가 코팅된 담체가 효소와 더 강하게 결합하여 효소의 누출을 막기 때문이라고 생각된다. 따라서 TA-Fe^{III}가 코팅된 AAO membrane의 tyrosinase 고정화 담체로 적합하다고 생각 된다.

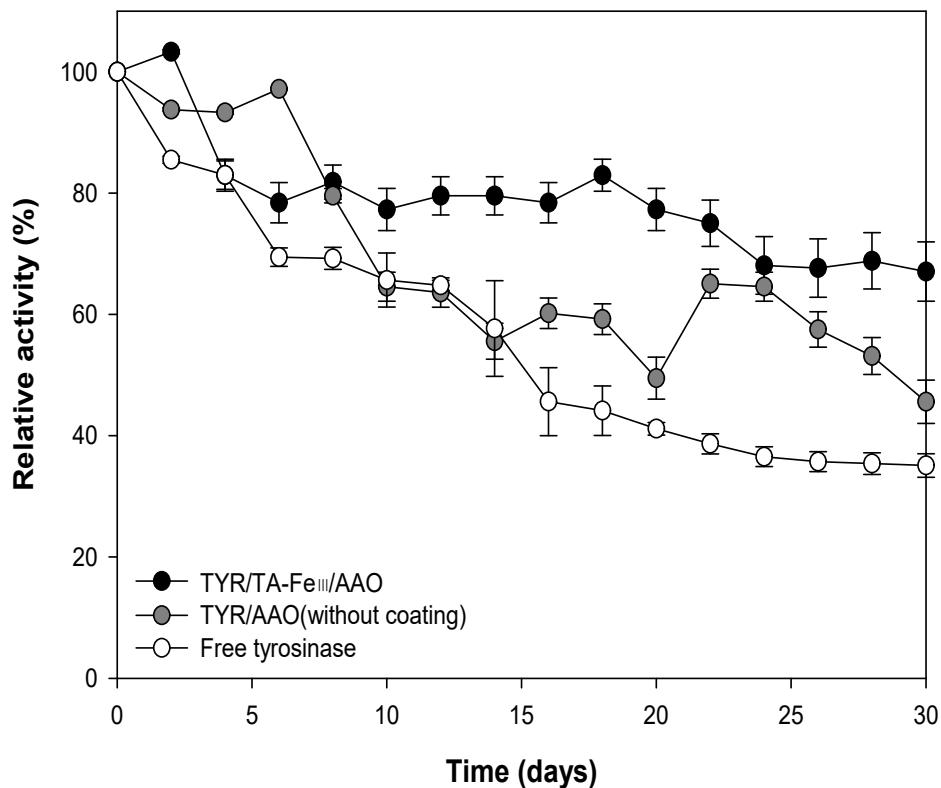


Figure 27. Storage stability of free and immobilized tyrosinase with time (storage condition: pH 7.0, T=4°C).

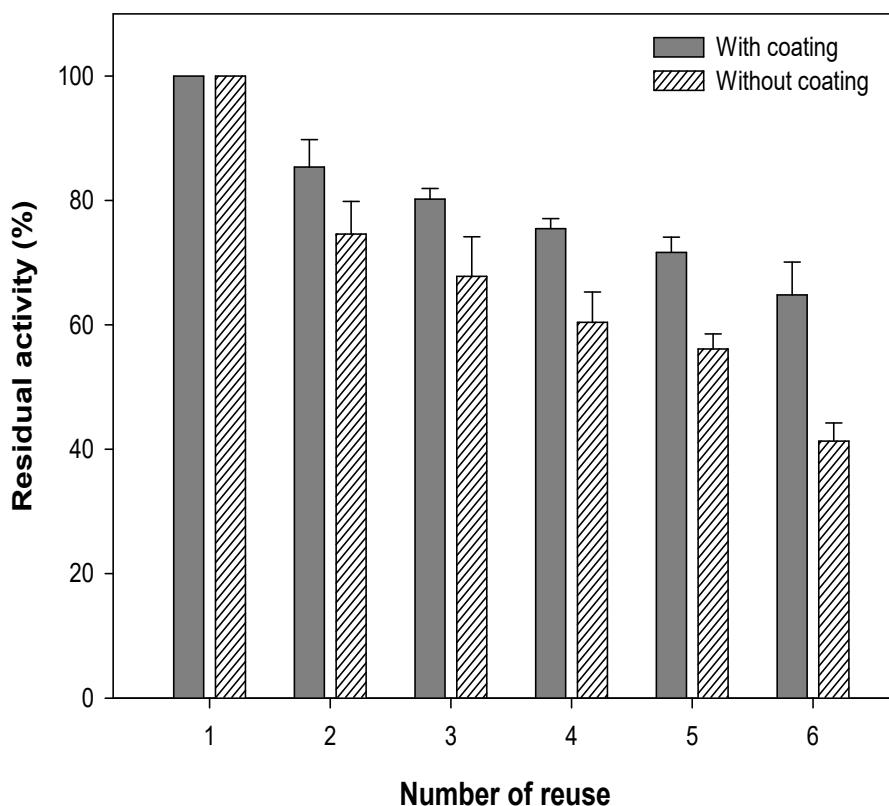


Figure 28. Residual activity of immobilized tyrosinase after enzyme recycle.

4. TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane 기반 Micro-PFR

가. 최적 체류시간 선정

Tyrosinase가 고정화 된 TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane을 이용하여 lipase와 동일하게 부피가 700 uL인 micro-reactor를 제작하였다. TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane 기반 micro-reactor는 LC-6AD pump를 이용하여 유속을 제어하며 체류시간을 조절하였다. 기질용액은 2.5 mM L-tyrosine과 2.5 mM L-ascorbic acid가 혼합된 용액을 사용하여 입구에서 연속적으로 흘려주면서 TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane을 통과하며 나오는 L-DOPA의 양을 측정하여 효소의 활성을 측정하였다.

Figure 29은 TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane 기반 micro-reactor에서 L-tyrosine의 전환율과 생산성에 대한 체류시간의 영향을 보여준다. Flow rate 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mL/min의 체류시간은 각각 35, 17.5, 11.67, 8.75, 7 min이며, 전환율은 각각 0.57%, 0.50%, 0.46%, 0.42%, 0.38%이다. 유속에 따라서 전환율이 감소하는 이유는 앞에서 언급한 것과 같이 유속이 빨라짐에 따라 반응용액이 반응기 내부에 체류하는 시간이 짧아 효소가 기질과 반응하는 시간이 짧아지기 때문이다. 생성물의 농도와 유속을 고려하였을 때 생산성은 유속이 증가함에 따라 증가하여 0.1 mL/min일 때 0.0862 mol/h·L로 가장 높았다. 따라서 TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane 기반 micro-reactor를 0.1 mL/min (RT=7 min)의 유속으로 연속 운전하였다.

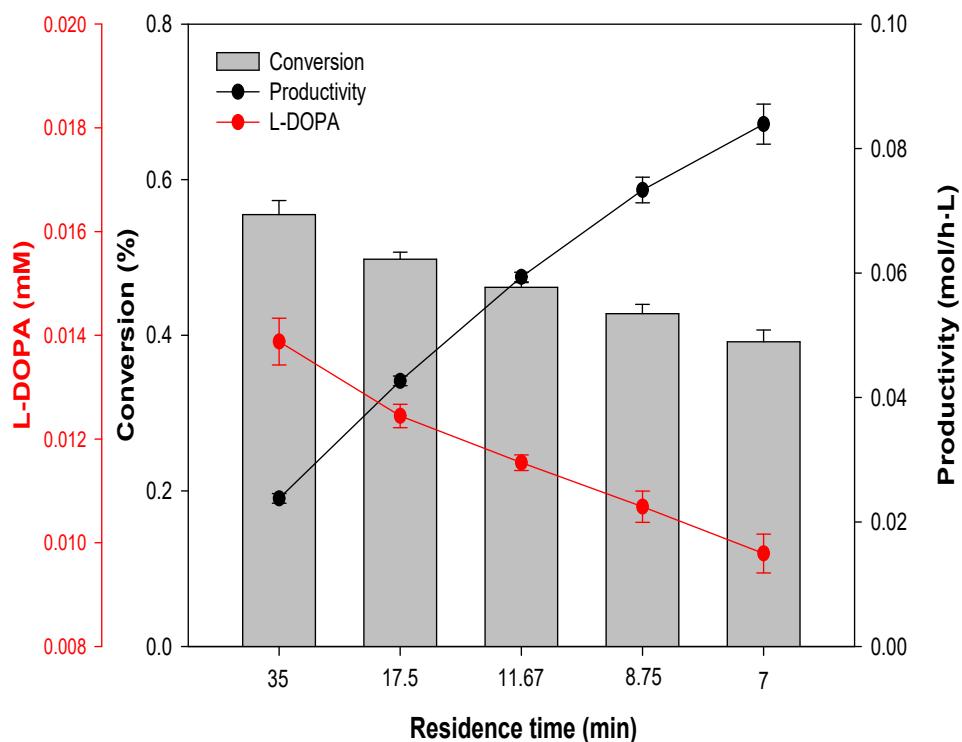


Figure 29. The effect of residence time on the conversion using TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane micro-reactor.

나. TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane 기반 Micro-PFR 작동 안정성

TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane를 micro-reactor에 적용하여 연속적으로 반응용액을 흘려주면서 micro-PFR의 작동안정성을 평가하였다. 반응기의 작동은 20°C에서 2.5 mM L-tyrosine과 2.5 mM L-ascorbic acid 용액이 함유된 반응용액을 사용하여 0.1 mL/min (RT=7 min)의 유속으로 흘려보내면서 반응기 출구에서 나오는 L-DOPA의 양을 모니터링 하였다. Figure 30는 TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane기반 micro-reactor를 30일간 연속 운전한 후 결과를 나타냈다. 30일 연속 작동에도 TA-Fe^{III}/AAO membrane에 고정화된 tyrosinase는 70%의 상대 활성을 유지하여 30일간의 연속 작동에도 우수한 작동 안정성을 보였다. 이는 현재 화학적으로 합성되는 L-DOPA를 tyrosinase가 고정화된 TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane기반 micro-reactor를 이용하여 생산하는 생물 공정의 가능성을 보여준다.

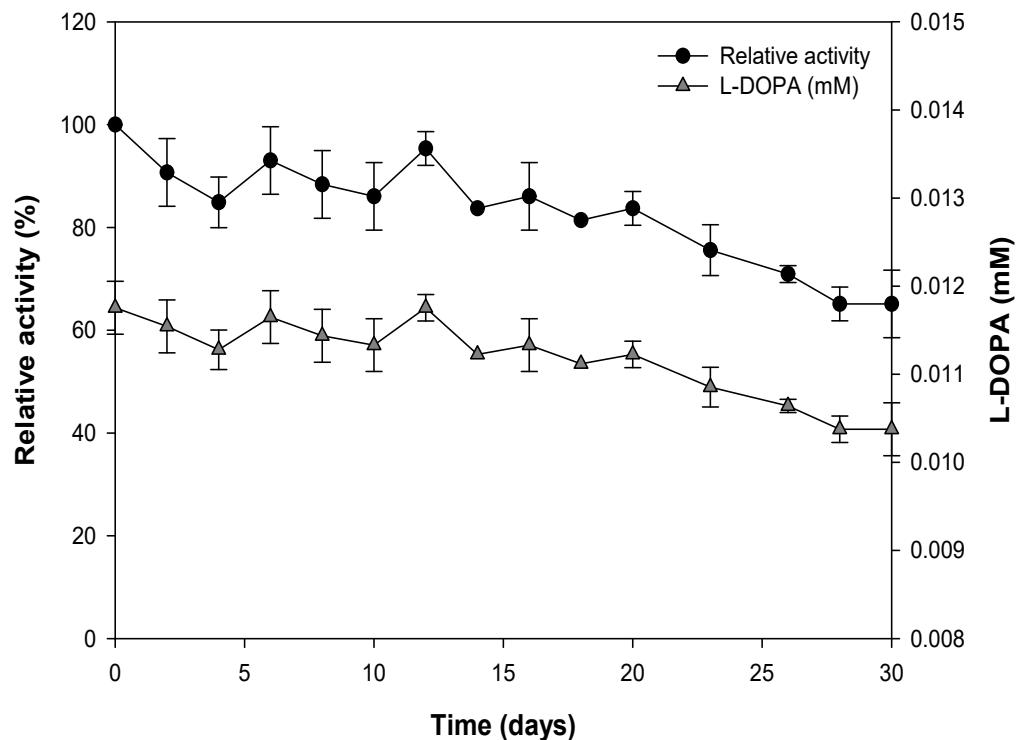


Figure 30. Operational stability of TYR/TA- Fe^{III} /AAO membrane micro-reactor (operational condition: flow rate 0.1 mL/min, pH 7.0, T=20°C).

Table 6. Effect of reactor types on substrate conversion and product concentration

Reactor	Enzyme	Enzyme concentration (mg/mL)	Substrate (mM)	Reaction time (min)	Conversion (%)	Product concentration (mM)
Micro-PFR	Lipase (from <i>Asp</i>)	1	0.1	RT: 0.175 (flow rate: 4 mL/min)	55.13	0.056
Batch	Lipase (from <i>Asp</i>)	1	0.1	15	50.14	0.051
Micro-PFR	Tyrosinase (from <i>Mushroom</i>)	0.2	2.5	RT: 7 (flow rate: 0.1 mL/min)	0.4	0.010
Batch	Tyrosinase (from <i>Mushroom</i>)	0.2	2.5	30	0.48	0.012

제4장 결론

Anodic aluminum oxide (AAO) membrane의 효소 고정화 지지체로서의 가능성을 확인하기 위해 고정화를 진행하였다. 이때 AAO membrane 표면에 작용기를 도입하기 위해 tannic acid와 FeCl_3 를 사용하여 AAO membrane의 표면에 TA- Fe^{III} 복합체로 표면개질 한 후 lipase와 tyrosinase 효소를 이용하여 고정화를 진행하였다. 담체에 고정화된 효소는 여러 가지 반응 조건에서의 활성변화를 free효소와 비교해 보았으며, 제조한 담체를 이용하여 micro 크기의 Plug flow reactor (PFR)에 사용하여 공학성능을 확인하였다.

1. AAO membrane의 표면에 작용기를 도입할 때 tannic acid와 FeCl_3 의 농도비율을 효소 고정화율이 72.04%로 가장 높은 2:1로 선택하였다. 선택된 농도로 담체의 표면을 개질한 후 SEM과 FT-IR를 통해 담체의 표면과 cross section에 TA- Fe^{III} 복합체 코팅이 잘 되었음을 확인하였고, 고정화 후 SEM image를 통해 고정화 전과 비교하였을 때 표면이 더 smooth해진 것을 확인 할 수 있었다.
2. Lipase가 고정화 된 LIP/TA- Fe^{III} /AAO membrane의 경우 free lipase와 비교하였을 때 최적 pH가 염기성 쪽으로 이동한 것을 확인하였으며, 온도의 경우 40-70°C 범위에서 free lipase 보다 넓은 작동 온도 범위를 가지는 것을 확인하였다. 30일간의 저장안정성은 25°C에서 LIP/TA- Fe^{III} /AAO membrane의 경우 80% 활성을 유지하였고, free의 경우 28%의 활성을 유지하였다. 또한 45°C에서는 고정화 효소의 경우 49.4% free의 경우 19.4%의 활성을 보였다. 재사용 측면에서는 TA- Fe^{III} 복합체 코팅이 된 담체의 경우 9번의 재사용에도 85.7%의 잔여활성을 보였고, 코팅이 되지 않은 담체의 경우 60.10%의 잔여활성을 보였다.
3. Lipase 고정화의 성공을 기반으로 tyrosinase의 고정화를 진행하였다. Tyrosinase가 고정화된 TYR/TA- Fe^{III} /AAO membrane의 경우 EAPC법으로 고정화 하였을 때 TYR/TA- Fe^{III} /AAO membrane의 단위 중량당 $\Delta A_{460}/\text{min}$ 값이 0.691로 가장 높았으며, 4°C에서 30일간의 저장 안정성은 free의 경우 36%, EAPC법으로 고정화 된 담체의 경우 70%의 잔여활성을 보였다. 또한 6번의 재사용에서 TYR/TA- Fe^{III} /AAO membrane의 경우 약 65%이상의 잔여활성을 보였고, TYR/AAO membrane의 경우 약 40% 정도의 잔여활성을 보였다.

4. 제조한 담체에 효소를 고정화 하여 Micro-PFR로 제작하였으며, 반응기의 부피는 700 μL 이다. LIP/TA-Fe^{III}/AAO membrane기반 micro-PFR의 경우 유속이 4 mL/min ($RT=10.5 \text{ sec}$)일 때 생산성이 13.57 mol/h·L로 가장 높았으며, 20°C에서 80일간의 연속작동에도 90%이상 잔여활성이 유지되었다. Tyrosinase가 고정화된 TYR/TA-Fe^{III}/AAO membrane를 micro-PFR에 적용하였을 때, 유속이 0.1 mL/min ($RT=7 \text{ min}$) 일 때 생산성이 0.0862 mol/h·L로 가장 높았으며, 30일간의 연속 작동에서 70%의 잔여 활성을 유지 하였다.

결과적으로 lipase의 경우 LIP/TA-Fe^{III}/AAO membrane○ Batch반응기에 적용되었을 때보다 micro-PFR에 적용 되었을 때 반응이 약 134배 더 빠른 것을 확인 하였고, tyrosinase의 경우 Batch반응기보다 micro-PFR에 적용 되었을 때 약 15배 빠른 것을 확인 하였다. 이 결과로 lipase뿐만 아니라 다른 종류의 효소 고정화의 가능성을 보았으며, 막 형태의 연속흐름 반응기의 적용가능성을 확인 하였다. 또한 이러한 막 반응기의 반응공정이 매우 효과적임을 알 수 있다. 따라서 이러한 막 반응기는 기존의 화학적 방법을 보완하거나 대체 할 수 있는 친환경적인 산업공정의 새로운 구성 요소가 될 것으로 전망 된다.

References

- [1] Krieg, E., et al., *Separation, immobilization, and biocatalytic utilization of proteins by a supramolecular membrane*. PloS one, 2013. **8**.
- [2] Donato, L., et al., *Biocatalytic zeolite membrane for the production of L-DOPA*. Journal of Membrane Science, 2012. **407**: p. 86-92.
- [3] Asmat, S. and Q. Husain, *Exquisite stability and catalytic performance of immobilized lipase on novel fabricated nanocellulose fused polypyrrole/graphene oxide nanocomposite: characterization and application*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **117**: p. 331-341.
- [4] Li, D., et al., *Polydopamine-mediated synthesis of core-shell gold@ calcium phosphate nanoparticles for enzyme immobilization*. Biomaterials Science, 2019. **7**: p. 2841-2849.
- [5] Misson, M., et al., *Interfacial Biocatalytic performance of nanofiber-supported β -galactosidase for production of galacto-oligosaccharides*. Catalysts, 2020. **10**: p. 81.
- [6] Thangaraj, B., et al., *Effect of silica coating on Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for lipase immobilization and their application for biodiesel production*. Arabian Journal of Chemistry, 2019. **12**: p. 4694-4706.
- [7] van den Biggelaar, L., P. Soumillion, and D.P. Debecker, *Biocatalytic transamination in a monolithic flow reactor: improving enzyme grafting for enhanced performance*. RSC advances, 2019. **9**: p. 18538-18546.
- [8] Misson, M., H. Zhang, and B. Jin, *Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications*. Journal of the Royal Society Interface, 2015. **12**: p.

20140891.

- [9] Darder, M., et al., *Encapsulation of enzymes in alumina membranes of controlled pore size*. Thin Solid Films, 2006. **495**: p. 321-326.
- [10] Chen, Z., et al., *Functionalized anodic aluminum oxide membrane-electrode system for enzyme immobilization*. ACS nano, 2014. **8**: p. 8104-8112.
- [11] Jani, A.M.M., D. Losic, and N.H. Voelcker, *Nanoporous anodic aluminium oxide: Advances in surface engineering and emerging applications*. Progress in Materials Science, 2013. **58**: p. 636-704.
- [12] Zhu, Y., et al., *Microfluidic immobilized enzyme reactors for continuous biocatalysis*. Reaction Chemistry & Engineering, 2020. **5**: p. 9-32.
- [13] Anuar, S.T., et al., *The development of a capillary microreactor for transesterification reactions using lipase immobilized onto a silica monolith*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013. **92**: p. 62-70.
- [14] Hicke, H.-G., et al., *Covalent enzyme immobilization in different porous polymer membranes*, in *Progress in Biotechnology*. 1998, Elsevier. p. 661-666.
- [15] Chen, P.-C., et al., *Fabrication and optimization of a lipase immobilized enzymatic membrane bioreactor based on polysulfone gradient-pore hollow fiber membrane*. Catalysts, 2019. **9**: p. 495.
- [16] Singh, R.S., R. Dhaliwal, and M. Puri, *Development of a stable continuous flow immobilized enzyme reactor for the hydrolysis of inulin*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008. **35**: p. 777-782.
- [17] Van der Borght, J., et al., *Enzymatic properties and substrate specificity of the*

trehalose phosphorylase from Caldanaerobacter subterraneus. Applied and Environmental Microbiology, 2011. **77**: p. 6939-6944.

- [18] Cooper, G.M., *The central role of enzymes as biological catalysts*. 2000, Sinauer Associates.
- [19] Gonçalves Filho, D., A.G. Silva, and C.Z. Guidini, *Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019. **103**: p. 7399-7423.
- [20] Sri Kaja, B., et al., *Investigating enzyme activity of immobilized candida rugosa lipase*. Journal of Food Quality, 2018. **2018**.
- [21] Shuai, W., et al., *A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2017. **64**: p. 496-508.
- [22] Tan, D., et al., *Highly efficient biocatalytic synthesis of L-DOPA using in situ immobilized verrucomicrobium spinosum tyrosinase on polyhydroxyalkanoate nano-granules*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019. **103**: p. 5663-5678.
- [23] Seetharam, G. and B.A. Saville, *L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **31**: p. 747-753.
- [24] Inamdar, S.A., et al., *Statistically optimized biotransformation protocol for continuous production of L-DOPA using Mucuna monosperma callus culture*. SpringerPlus, 2013. **2**: p. 570.
- [25] Algieri, C., et al., *Tyrosinase immobilised on polyamide tubular membrane for the l-DOPA production: total recycle and continuous reactor study*. Biochemical Engineering Journal, 2012. **66**: p. 14-19

- [26] 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.
- [27] Alotaibi, M., et al., *Lipase immobilised on silica monoliths as continuous-flow microreactors for triglyceride transesterification*. *Reaction Chemistry & Engineering*, 2018. **3**: p. 68-74.
- [28] Guo, J., et al., *Immobilized lignin peroxidase on $Fe_3O_4@SiO_2@polydopamine$ nanoparticles for degradation of organic pollutants*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019. **138**: p. 433-440.
- [29] Sharifi, M., et al., *Strategies of enzyme immobilization on nanomatrix supports and their intracellular delivery*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2020. **38**: p. 2746-2762.
- [30] Jesionowski, T., J. Zdarta, and B. Krajewska, *Enzyme immobilization by adsorption: A review*. *Adsorption*, 2014. **20**: p. 801-821.
- [31] Boudrant, J., J.M. Woodley, and R. Fernandez-Lafuente, *Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation*. *Process Biochemistry*, 2020. **90**: p. 66-80.
- [32] 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.
- [33] Homaei, A.A., et al., *Enzyme immobilization: an update*. *Journal of Chemical Biology*, 2013. **6**: p. 185-205.
- [34] Mohamad, N.R., et al., *An overview of technologies for immobilization of enzymes*

and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015. **29**: p. 205-220.

- [35] Verma, M.L., et al., *Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: application in cellobiose hydrolysis*. *Bioresource Technology*, 2013. **135**: p. 2-6.
- [36] Wei, L., et al., *Immobilization of enzyme on detonation nanodiamond for highly efficient proteolysis*. *Talanta*, 2010. **80**: p. 1298-1304.
- [37] Yang, H.-H., et al., *Magnetite-containing spherical silica nanoparticles for biocatalysis and bioseparations*. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**: p. 1316-1321.
- [38] Kouassi, G.K., J. Irudayaraj, and G. McCarty, *Examination of cholesterol oxidase attachment to magnetic nanoparticles*. *Journal of Nanobiotechnology*, 2005. **3**: p. 1.
- [39] Huang, S.H., M.H. Liao, and D.H. Chen, *Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles*. *Biotechnology Progress*, 2003. **19**: p. 1095-1100.
- [40] Pandey, P., et al., *Application of thiolated gold nanoparticles for the enhancement of glucose oxidase activity*. *Langmuir*, 2007. **23**: p. 3333-3337.
- [41] Miletić, N., et al., *Immobilization of candida antarctica lipase B on polystyrene nanoparticles*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2010. **31**: p. 71-74.
- [42] Ahmad, R. and M. Sardar, *Immobilization of cellulase on TiO₂ nanoparticles by physical and covalent methods: a comparative study*. 2014.
- [43] Prakasham, R., et al., *Novel synthesis of ferric impregnated silica nanoparticles and their evaluation as a matrix for enzyme immobilization*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007. **111**: p. 3842-3847.

- [44] Park, J.-M., et al., *Immobilization of lysozyme-CLEA onto electrospun chitosan nanofiber for effective antibacterial applications*. International Journal of Biological Macromolecules, 2013. **54**: p. 37-43.
- [45] Ansari, S.A., et al., *Designing and surface modification of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications*. Food and Chemical Toxicology, 2011. **49**: p. 2107-2115.
- [46] Brüggemann, D., *Nanoporous aluminium oxide membranes as cell interfaces*. Journal of Nanomaterials, 2013. **2013**.
- [47] Milka, P., I. Krest, and M. Keusgen, *Immobilization of alliinase on porous aluminum oxide*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. **69**: p. 344-348.
- [48] Oliveira, G.B., et al., *Enzyme immobilization on anodic aluminum oxide/polyethyleneimine or polyaniline composites*. Reactive and Functional Polymers, 2008. **68**: p. 27-32.
- [49] Lee, S.B., et al., *Antibody-based bio-nanotube membranes for enantiomeric drug separations*. Science, 2002. **296**: p. 2198-2200.
- [50] Arsalan, A., et al., *Immobilization of β -galactosidase on tannic acid stabilized silver nanoparticles: A safer way towards its industrial application*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020. **226**: p. 117637.
- [51] Rahim, M.A., et al., *Coordination-driven multistep assembly of metal-polyphenol films and capsules*. Chemistry of Materials, 2014. **26**: p. 1645-1653.
- [52] Guo, H., et al., *Non-polyamide based nanofiltration membranes using green metal-organic coordination complexes: implications for the removal of trace organic contaminants*. Environmental Science & Technology, 2019. **53**: p. 2688-2694.

- [53] Guo, J., et al., *Engineering multifunctional capsules through the assembly of metal-phenolic networks.* Angewandte Chemie International Edition, 2014. **53**: p. 5546-5551.
- [54] Guo, H., et al., *A one-step rapid assembly of thin film coating using green coordination complexes for enhanced removal of trace organic contaminants by membranes.* Environmental Science & Technology, 2017. **51**: p. 12638-12643.
- [55] Watts, P. and C. Wiles, *Micro-reactors, flow reactors and continuous flow synthesis.* Journal of Chemical Research, 2012. **36**: p. 181-193.
- [56] Yang, S.T. and M.R. Okos, *Effects of temperature on lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase in plug-flow reactor.* Biotechnology and Bioengineering, 1989. **33**: p. 873-885.
- [57] Macaskie, L.E., et al., *Enzymatically-mediated uranium accumulation and uranium recovery using a *Citrobacter* sp. immobilised as a biofilm within a plug-flow reactor.* Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology, 1995. **63**: p. 1-16.
- [58] Ros, J., J. Rodríguez-López, and F. García-Cánovas, *Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1994. **1204**: p. 33-42.
- [59] Xu, D.-Y., J.-Y. Chen, and Z. Yang, *Use of cross-linked tyrosinase aggregates as catalyst for synthesis of L-DOPA.* Biochemical Engineering Journal, 2012. **63**: p. 88-94.
- [60] Fan, L., et al., *Green coating by coordination of tannic acid and iron ions for antioxidant nanofiltration membranes.* RSC Advances, 2015. **5**: p. 107777-107784.

- [61] Li, Y., et al., *Iron-tannic acid nanocomplexes: facile synthesis and application for removal of methylene blue from aqueous solution.* Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB), 2016. **11**.
- [62] Wang, S., et al., *Applications of HRP-immobilized catalytic beads to the removal of 2, 4-dichlorophenol from wastewater.* RSC advances, 2015. **5**: p. 57286-57292.
- [63] Verma, N., et al., *Novel approach using activated cellulose film for efficient immobilization of purified diamine oxidase to enhance enzyme performance and stability.* Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2020. **50**: p. 468-476.
- [64] Xia, G.H., et al., *Preparation of a nanobiocatalyst by efficiently immobilizing Aspergillus niger lipase onto magnetic metal-biomolecule frameworks (BioMOF).* ChemCatChem, 2017. **9**: p. 1794-1800.
- [65] Kim, H., et al., *Immobilization of glucose oxidase into polyaniline nanofiber matrix for biofuel cell applications.* Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**: p. 3908-3913.
- [66] Wang, H., et al., *Immobilization of glucose oxidase using CoFe₂O₄/SiO₂ nanoparticles as carrier.* Applied Surface Science, 2011. **257**: p. 5739-5745.
- [67] Sureshkumar, M. and C.-K. Lee, *Polydopamine coated magnetic-chitin (MCT) particles as a new matrix for enzyme immobilization.* Carbohydrate Polymers, 2011. **84**: p. 775-780.
- [68] Luo, J., et al., *Functionalization of a membrane sublayer using reverse filtration of enzymes and dopamine coating.* ACS Applied Materials & Interfaces, 2014. **6**: p. 22894-22904.
- [69] Anwar, M.Z., et al., *SnO₂ hollow nanotubes: a novel and efficient support matrix for enzyme immobilization.* Scientific Reports, 2017. **7**: p. 1-11.

- [70] Wee, Y., et al., *Tyrosinase-immobilized CNT based biosensor for highly-sensitive detection of phenolic compounds.* Biosensors and Bioelectronics, 2019. **132**: p. 279-285.
- [71] de Faria, R.O., et al., *The biotechnological potential of mushroom tyrosinases.* Food Technology and Biotechnology, 2007. **45**: p. 287-294.
- [72] Guzik, U., K. Hupert-Kocurek, and D. Wojcieszyska, *Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases.* Molecules, 2014. **19**: p. 8995-9018.
- [73] Zhou, L., et al., *Immobilization of glucose oxidase on polydopamine-functionalized graphene oxide.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015. **175**: p. 1007-1017.