



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#) 

농학석사 학위논문

리파제 고정화를 위한
세리신/실리카 나노입자의 제조

Preparation of Sericin/Silica Nanoparticles
for Lipase Immobilization

2015 년 2 월

서울대학교 대학원
바이오시스템 · 소재학부
바이오소재공학전공
양 예 솔

리파제 고정화를 위한
세리신/실리카 나노입자의 제조

지도교수 이 기 훈

이 논문을 농학석사 학위논문으로 제출함
2014 년 12 월

서울대학교 대학원
바이오시스템·소재학부
바이오소재공학전공
양 예 술

양예술의 석사 학위논문을 인준함
2015 년 2 월

위 원 장 김 태 일 (인)

부위원장 이 기 훈 (인)

위 원 기 창 석 (인)

초 록

본 연구에서는 리파제 고정화를 위한 지지체로서 세리신과 실리카를 이용한 나노입자를 합성하였고, 고정화한 리파제의 활성과 안정성을 높게 유지시킬 수 있는 나노입자의 제조조건을 확립하였다. 먼저 세리신/실리카 나노입자의 합성은 두 가지 실리카 전구체 (TEOS와 APTES)와 세리신을 혼합하여 제조하였으며, 실리카 전구체 중 (3-아미노프로필)트리에톡시실란 (APTES)의 함량이 증가할수록 나노입자의 수율과 크기가 증가함을 확인할 수 있었다. 세리신이 포함되는 경우에는 나노입자 수율은 증가하였으나, 합성되는 실리카의 양은 변화가 없었다. 또한 세리신이 포함되는 경우 나노입자의 크기가 감소하여 표면적은 증가하였으나 세리신의 농도가 0.5 wt% 이상인 경우에는 응집이 발생하여 균제도가 감소하였다. 글루타알데히드 (GA)를 이용하여 효소를 나노입자 표면에 화학적으로 결합시키기 위해 필요한 아민기의 개수는 실리카 전구체 중 APTES의 농도가 높아질수록 증가했다. 세리신이 포함된 경우 나노입자의 크기 감소로 인한 표면적 증가로 표면에 존재하는 아민기가 증가하였으나, 세리신에 의한 응집이 발생하는 경우에는 표면의 아민기의 개수가 감소하였다. 리파제의 고정화량은 세리신이 포함된 경우 감소하였으나, 세리신이 포함된 경우 세리신 농도 0.25 wt%에서 최대를 나타내었고, 고정화한 리파제의 활성 역시 세리신 농도 0.25 wt%에서 최대를 나타내었다. 고정화 효소의 메탄올에 대한 안정성을 살펴본 결과, 고정화되지 않은 리파제에 비해 높은 활성을 유지할 수 있었고, 반복 사용에도 효율

이 급격히 감소하지 않고 7회 반복 사용 이후에도 초기 대비 60% 이상의 활성을 유지함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과 제조한 세리신/실리카 나노입자 지지체가 리파제 고정화에 이용될 수 있을 가능성을 확인할 수 있었다.

주요어 : 리파제, 효소 고정화, 세리신, 실리카

학 번 : 2013-21136

목 차

초 록	i
목 차	iii
List of Tables	vi
List of Figures	vii
제 1 장 서론	11
제 2 장 문헌 연구	15
2.1 효소의 화학적 고정화	15
2.1.1 고정화 리파제의 응용	16
2.2 효소 고정 지지체로서의 실리카의 이용	18
2.2.1 바이오실리카의 합성	19
2.3 효소 고정 지지체로서의 세리신의 이용	20
제 3 장 실험재료 및 방법	22
3.1 재료 및 시약	22
3.2 실리카와 세리신으로 구성된 리파제 고정화 지지체의 제조	22
3.3 제조된 세리신/실리카 나노입자의 수율 측정	24
3.4 세리신/실리카 나노입자 표면의 아민기 정량 방법	27

3.5 세리신/실리카 나노입자 가교 및 활성화 방법	29
3.6 리파제 고정화 방법	29
3.7 고정화한 리파제의 양 측정 및 활성 측정	29
3.8 고정화한 리파제의 재사용성 평가	31
3.9 고정화한 리파제의 바이오디젤 생산 가능성 평가	31
3.9.1 메탄올에 대한 안정성 평가	31
3.9.2 고정화한 리파제를 이용한 바이오디젤 생산	31
제 4 장 결과 및 고찰	33
4.1 실리카 전구체 농도비와 세리신 농도에 따른 수율 비교	33
4.1.1 실리카 전구체 농도비가 실리카 합성에 미치는 영향	33
4.1.2 세리신 농도가 실리카 합성에 미치는 영향	38
4.2 세리신 농도에 따른 세리신/실리카 복합체의 확인	44
4.3 전구체 농도비와 세리신 농도에 따른 아민기 정량	47
4.3.1 실리카 전구체 농도에 따른 아민기 정량	47
4.3.2 세리신 함량에 따른 아민기 정량	50
4.4 복합체 내 세리신의 함량에 따른 리파제 고정화 효율	54
4.5 고정화한 리파제의 재사용성	60
4.6 고정화한 리파제의 바이오디젤 생산 가능성	60
4.6.1 메탄올에 대한 안정성	60
4.6.2 고정화 리파제를 이용한 바이오디젤 생산	63

제 5 장 결론	66
참고문헌	68
Abstract	78

List of Tables

Table 1. Composition of amino acid composition of sericin obtained by hot-water extracted method	23
Table 2. Sample identification for silica or sericin/silica nanoparticles	26
Table 3. Particle size of silica nanoparticles prepared from different silica precursor composition	37

List of Figures

Figure 1. Covalent enzyme immobilization, surface amine groups of supports reacts with GA and N-terminus of the enzyme.	17
Figure 2. Overall synthesis procedure of silica or sericin/silica nanoparticles.	25
Figure 3. Reaction scheme of 4-NBA with the surface amine on the supports	28
Figure 4. Effect of silica precursor composition on the yield of silica nanoparticles prepared after 3 days of synthesis. The total molar concentration of silica precursor was 45 mM. The sericin concentration was 0 wt%.	35
Figure 5. FE-SEM images of silica nanoparticles prepared from different silica precursor composition. The molar concentrations of APTES in the mixture of silica precursor was (a) 1.5, (b) 3.0 and (c) 9.0 mM. Scale bar of 100 nm.	36
Figure 6. Effect of sericin concentration on the yield of silica or sericin/silica nanoparticles prepared after 3 days of synthesis. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM.	39
Figure 7. Effect of reaction time on the yield of sericin/silica nanoparticles. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM. The concentration of sericin was 1.00 wt%.	40
Figure 8. TEM images of silica or sericin/silica nanoparticles	

prepared from different sericin concentration. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM, and the concentrations of sericin was (a) 0, (b) 0.25, (c) 0.50 and (d) 1.00 wt%. Scale bar of 200 nm.

..... 42

Figure 9. FE-SEM images of silica or sericin/silica nanoparticles prepared from different sericin concentration. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM, and the concentrations of sericin was (a) 0, (b) 0.25, (c) 0.50 and (d) 1.00 wt%. Scale bar of 100 nm.

..... 43

Figure 10. TGA curves of silica or sericin/silica nanoparticles prepared from different sericin concentration. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM, and the concentrations of sericin was (a) 0, (b) 0.25, (c) 0.50 and (d) 1.00 wt%.

..... 45

Figure 11. FT-IR spectra of silica (S0_A90) and sericin/silica (S100_A90) nanoparticles before and after sintering. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM.

..... 46

Figure 12. UV absorbance spectra (a) and calibration curve (b) of 4-nitrobenzaldehyde. The calibration curve was deduced from the absorbances at 264 nm.

..... 48

Figure 13. Effect of silica precursor composition on the free amino groups concentration on the sericin/silica nanoparticles. The sericin concentration was 1.00 wt%.

..... 49

Figure 14. Effect of sericin concentration on the silica and sericin composition in the sericin/silica nanoparticles determined from incineration at 600°C. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM. 51

Figure 15. Effect of sericin concentration on the surface silicon content in the sericin/silica nanoparticles determined from EDS analysis. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM. 52

Figure 16. Effect of sericin/silica composition on the free amino groups concentration in the sericin/silica nanoparticles. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM. 53

Figure 17. Photographs of synthesized sericin/silica composites with different sericin concentration before GA treatment (top), and after GA treatment for 1hour at 25°C (bottom). From the left, S0_A90, S25_A90, S50_A90 and S100_A90. 55

Figure 18. FE-SEM images of synthesized sericin/silica nanoparticles (S25_A90) before GA treatment (top) and after GA treatment for 1hour at 25°C (bottom). 57

Figure 19. Bound lipase of synthesized silica or sericin/silica nanoparticles after GA treatment for 1hour at 25°C. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM. 58

Figure 20. Relative activity of bound lipase on the sericin/silica nanoparticles with different sericin concentration. The

	total molar concentration of silica precursor was 45 mM and the molar concentrations of APTES in the mixture of silica precursor was fixed to 9.0 mM.	59
Figure 21.	Reusability of the immobilized lipase on the sericin/silica nanoparticles (S25_A90).	61
Figure 22.	Relative activity of bound lipase on the sericin/silica nanoparticles (S25_A90) and free lipase before and after treatment of methanol for 1hour.	62
Figure 23.	Conversion yield of olive oil using the immobilized <i>Candida rugosa</i> lipase on the sericin/silica nanoparticles (S25_A90).	64

제 1 장 서 론

효소는 자연계에 존재하는 촉매로, 기질에 대한 높은 선택성과 온화한 조건에서도 빠르게 기질과 반응할 수 있다는 장점을 갖는다 [1, 2]. 뿐만 아니라 효소는 물에 용해된다는 특성과 독성이 없고, 반응 부산물을 거의 생성하지 않아 산업적 측면에서도 매우 주목을 받고 있는 촉매이다 [3]. 실제로 바이오디젤을 생산하는 데 사용되고 있는 화학적 촉매의 경우 반응에 높은 온도와 압력이 필요하여 에너지 측면에서 좋지 않고, 부반응의 가능성이 높아 고순도의 생성물을 얻기 힘들다는 단점을 갖고 있어, 이를 극복할 수 있는 촉매로서 리파제와 같은 효소에 주목하고 있다 [4-6]. 그러나 자연에 존재하는 효소 자체를 공정에 사용하기에는 효소의 가격이 비싸고, 공정에 대한 안정성이 떨어진다는 단점이 있다. 또한 반응 용액이나 생성물에 함께 존재하므로 회수하여 재사용하는 것이 불가능하기 때문에 산업적인 한계를 지니고 있다 [7].

효소의 이러한 문제점을 극복하기 위해 효소를 적합한 지지체에 고정화시키는 효소 고정화 기술이 연구되고 있다 [8]. 효소를 지지체에 고정화하게 되면 재사용이 가능해지고, 공정에 대한 안정성 또한 증대되어 효소의 산업적 응용에 대한 가능성을 높일 수 있기 때문이다 [9]. 지금까지 효소를 지지체에 고정화시키는 다양한 기술에 대한 연구가 진행되었다. 잘 알려진 효소 고정화 기술로는 효소를 지지체에 물리적으로 흡착시키는 방법, 다공성 지지체 혹은 겔 내부에 담지시키는 방법, 그리고 지지체에 화학적으로 결합시키는 방법 등이 있다 [2, 10].

먼저 효소는 단백질로서 소수성 부분과 친수성 부분이 모두 존재하게 되는데, 소수성 부분은 소수성 지지체와 소수성 상호작용을 할 수 있고,

친수성 부분은 친수성 지지체와 수소결합등의 물리적 상호작용이 가능하다 [11]. 이와 같이 효소 고정화에 효소와 지지체간의 물리적인 상호작용을 이용하는 경우, 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 산업적으로 이용하기에는 한계가 있다 [12].

다른 효소 고정화 방법으로, 다공성 지지체 혹은 겔에 효소를 담지시키는 방법은 효소의 구조에 거의 영향을 미치지 않아 효소의 활성에 거의 영향을 미치지 않으며, 기공의 크기를 조절함으로써 효소가 지지체로부터 빠져나가는 것을 막을 수 있다는 장점이 있다 [11]. 하지만 담지시킬 효소의 종류에 따라 기공의 크기를 조절해야하며, 기질이 지지체의 기공의 크기보다 큰 경우 기질의 확산이 제한될 수 있다는 단점을 갖고 있다 [7].

마지막 고정화 방법은 효소를 화학적으로 지지체에 고정시키는 방법이다. 이 경우 지지체 표면의 작용기와 효소가 갖는 작용기가 매우 단단하게 고정되어 있어 외부 환경이 변화하더라도 효소가 떨어져 나올 가능성이 거의 없어 재사용성이 높고, 순수한 생성물을 얻을 수 있으며, 외부 환경에 효소의 활성이 가장 영향을 받지 않는 방법으로 알려져 있다 [13]. 하지만 강하게 결합되는 만큼 결합 이후의 효소 유동성이 제한되어 활성을 감소시킬 수 있고, 지지체 표면을 효소와 결합할 수 있는 형태로 개질시켜야 한다는 단점을 갖고 있다. 이러한 단점에도 불구하고 산업적 측면에서 가장 중요하게 여겨지는 높은 안정성과 재사용성을 갖고 있기 때문에 앞서 언급한 단점을 극복할 수 있는 적합한 지지체를 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다 [14].

이처럼 효소의 화학적 고정화에 있어서는 지지체의 역할이 매우 중요하다. 효소를 고정화할 수 있는 지지체로 연구 되고 있는 물질은 주로 상업적으로 사용되고 있는 물질인 Euperigit® C [15]와 같은 합성 유기고분자와 셀룰로오스 [16]나 키토산 [17], 세리신 [18]과 같은 천연 고분자, 그리고 실리카 [19-22]와 같은 다양한 형태의 무기 고분자가 있다. 그 중에서 실리카는 열적, 기계적 안정성을 가지고 있으며 독성이 없고 표면에 다양한 작용기를 갖도록 개질하기에 용이하다는 특성을 갖고 있어 효소를 화학적으로 고정화하기 위한 지지체로서 적합하여 많은 연구진에 의해 연구되었다 [7, 14].

한편, 세리신은 실크를 구성하는 단백질 중의 하나로 세린과 아스파르트산과 같은 극성 아미노산의 함량이 높아 친수성을 띠는 고분자 물질이며, 우수한 실리카 합성 능력을 갖는다는 연구 결과가 있다 [23, 24]. 뿐만 아니라 세리신을 직접 효소 고정화 지지체로 사용 된 연구도 존재한다. Oh *et al.* [18]에 의하면 세리신이 갖는 높은 친수성으로 효소와의 소수성 상호작용을 최소화시킴으로써 고정화 시킨 효소의 활성을 높게 유지시킬 수 있다고 하였다.

본 연구에서는 다양한 효소 중에서도 산업적으로 주목을 받고 있는 촉매인 리파제를 고정화시킬 수 있는 지지체로서 실리카와 세리신을 응용하고자 하였다. 이때 세리신을 이용한 실리카의 합성법을 이용하여 세리신/실리카 복합체를 합성하고자 하였고, 화학적 고정화 효율을 증대시키기 위하여 아민기를 갖는 실리카 전구체를 함께 사용으로써 리파제 고정용 지지체로 사용하고자 하였다. 최종적으로 복합체를 이루고 있는 세리신과 실리카의 장점을 살려 실리카가 갖는 형태 안정성과 세리신이 갖는 효소 활성 유지 능력을 효과적으로 활용할 수 있는 조건을 확립하였고, 실제 응용 가능성을 확인하기 위하여 고정화 효소의 안정성 및 재사용성

을 평가하여 향후 식물성 기름으로부터 바이오디젤의 합성 능력을 확인해 보고자 하였다.

제 2 장 문헌 연구

2.1 효소의 화학적 고정화

효소의 화학적 고정화에 주로 이용되는 작용기는 효소의 아민기이다. 아민기는 친핵체로서 에폭시기가나 알데히드기와 반응할 수 있기 때문에, 이러한 작용기를 표면에 갖는 지지체와 화학적으로 결합할 수 있다 [11].

먼저 에폭시기를 갖는 지지체를 이용하여 효소를 화학적으로 고정화하는 방법은 매우 오랜 시간 안정성을 가질 수 있다고 알려져 있다 [25, 26]. 실제로 Euperigit® C [27], Euperigit® 250 [28], Sepabeads [29] 등 에폭시기로 활성화된 상업적인 지지체도 찾아볼 수 있다. 에폭시기로 활성화된 지지체에 효소를 고정화시키는 방법은 일반적으로 두 단계를 거치게 된다. 첫 번째 단계는 중성 pH 반응 조건에서 효소가 지지체 표면에 빠른 속도로 흡착하는 단계이다. 두 번째 단계에서는 흡착된 효소와 지지체 표면에 존재하는 에폭시기가 공유결합을 하게 되고, 이로써 효소를 지지체에 화학적으로 고정화시킬 수 있다 [30, 31]. 하지만 이 경우, 효소가 지지체 표면에 흡착해야 하는 단계가 동반되어 있어, 주로 효소와 강한 소수성 상호작용이 가능한 소수성 지지체에 이용되는 방법이기 때문에 친수성 지지체에 선호되는 방법은 아니라는 한계가 있다 [29].

표면이 알데히드기로 활성화되어 있는 지지체를 효소고정화에 이용하는 경우, 효소의 아민기와 빠르게 반응하여 알데히드기가 환원되어 비가역적인 이민 결합을 형성하여 안정하게 화학적인 결합을 형성할 수 있다 [29]. 이민 결합을 형성하는 반응에는 에폭시기와는 달리 흡

착하는 단계가 필요 없어 친수성 지지체와 소수성 지지체 모두에 이용이 가능한 방법이기 때문에 에폭시기의 한계를 극복할 수 있다. 특히 아민기를 갖는 지지체를 사용할 경우, 지지체의 표면을 알데히드기로 활성화시키기 위해 사용되는 대표적인 물질로 glutaraldehyde (GA)가 있다. GA는 분자 양 끝에 알데히드기를 갖는 물질로, 반응조건이 까다롭지 않아 효소 고정화 기술에서 널리 사용되는 분자간의 가교제이다 [31]. 표면에 아민기를 갖는 지지체가 GA와 반응하게 되면, 표면의 아민기가 알데히드기로 활성화 되어 효소의 아민기와 결합할 수 있게 된다 (그림 1). 즉, GA는 지지체의 아민기와 효소의 아민기를 화학적으로 결합시킬 수 있는 가교역할을 할 수 있다 [17, 32].

2.1.1 고정화 리파제의 응용

리파제는 유지나 지방의 가수분해 반응, 알코올분해 반응, 에스터화 반응, 에스터 교환반응을 촉매 할 수 있는 효소이다 [33]. 리파제가 촉진할 수 있는 반응들은 계면활성제 형성, 지방 혹은 유지의 분해, 약품 합성, 바이오디젤 및 화장품 생산 등의 응용분야에 사용될 수 있어서 산업적으로 큰 관심을 받고 있다 [2, 10, 34]. 실제로 고순도의 바이오디젤을 복잡하지 않는 공정으로 얻고자 촉매로 고정화 리파제를 이용하려고 하고 있다 [6]. 고정화 리파제를 이용하려는 이유는 고정화하지 않은 리파제를 직접 공정에 이용할 경우, 가격이 비싸고, 안정성이 떨어져 산업적인 이용이 어렵기 때문이다 [35]. Salis *et al.* [36] 은 다공성 폴리프로필렌을 지지체로 제조하여 리파제를 흡착시키는 방법으로 고정화시켰으며, 고정화 리파제가 높은 효율을 갖는다는 것을 확인하였다. 또한 이를 이용하여 다양한 식물성 기름을 바이오디젤로 전환시킬 수 있음

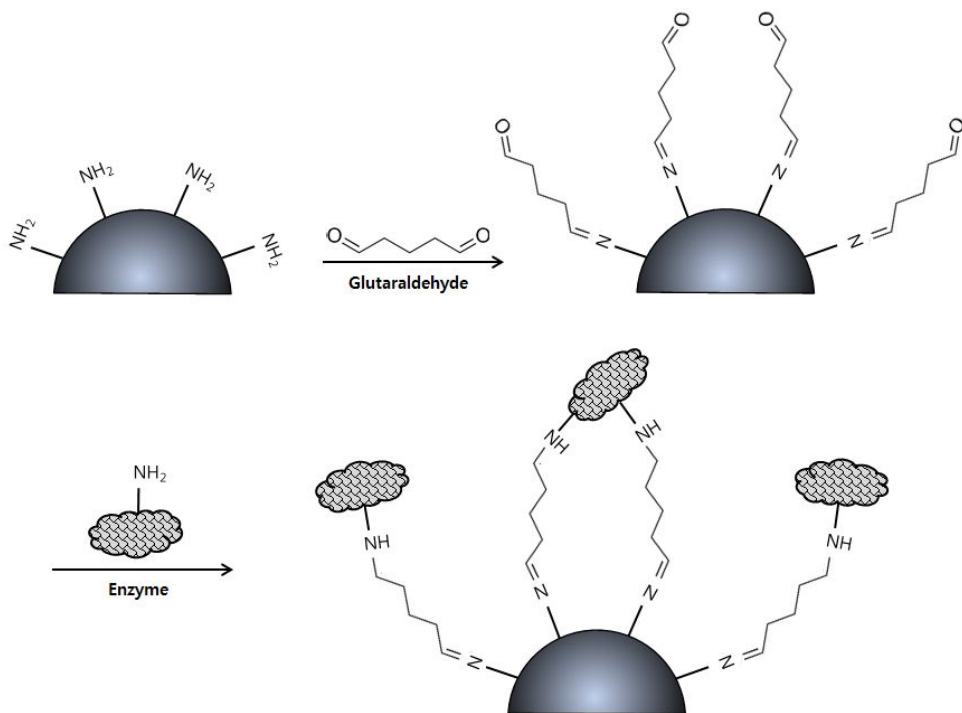


Figure 1. Covalent enzyme immobilization, surface amine groups of supports reacts with GA and N-terminus of the enzyme.

을 확인하였다. 하지만 흡착의 방법을 이용하였기 때문에 한 번의 응용 이후, 재사용에 대한 연구는 진행하지 않았다. 고정화한 리파제의 재사용에 관한 연구는 대부분 지지체에 화학적으로 고정화한 리파제를 이용한 연구에서 이루어졌다. Xie *et al.* [37]은 철로 이루어진 자성 나노입자에 아민기를 부여한 뒤, 이 입자에 spacer를 이용하여 리파제를 공유 결합으로 고정화시켜 대두유로부터 바이오디젤을 생산할 수 있다는 사실을 확인하였고, 동일한 반응을 4번 까지 진행시킨 이후에도 활성이 약 89%로 높게 유지된 다는 것을 확인하였다. 바이오디젤 뿐만 아니라 고정화 리파제를 이용하여 식물성 기름을 가수분해하여 지방산을 생산하는 연구도 진행되고 있다 [38, 39].

2.2 효소 고정 지지체로서의 실리카의 이용

실리카는 리파제를 고정화하기 위한 지지체로서 실리카 겔 [20], 실리카 입자 [19, 21, 22]등의 다양한 형태로 사용되고 있다. Salis *et al.* [40]은 알데히드기 혹은 에폭시 작용기로 표면을 활성화시킨 다공성 실리카 입자 제조하여 최종적으로는 해바라기씨유를 이용하여 바이오디젤을 생산하는 연구를 하였다. 또한 de Lima *et al.* [41]은 표면에 아민기를 갖도록 개질시킨 다공성 실리카입자를 이용하여 대두유로부터 바이오디젤을 생산하는 효율에 대해 연구하였다. Moreira *et al.* [42]은 실리카와 poly(vinyl alcohol) 복합체에 리파제를 고정화시켜 팜유로부터 바이오디젤을 생산하고, 이를 정제하는 연구를 하였다.

화학적 방법으로 합성한 실리카 지지체 외에도 생체물질을 기반으로 합성되는 바이오실리카 또한 효소 고정용 지지체로서 응용하고자 하는 연구가 진행되고 있다 [9, 43, 44]. Kuan *et al.* [43]은 polyallylamine

을 이용하여 실리카를 생합성하고, 합성된 실리카 내부에 리파제를 담지시켜 대두유와 폐기물 식용유로부터 바이오디젤을 생산하였다. 하지만 아직까지 바이오실리카를 효소의 화학적 고정화를 위한 지지체로 응용한 연구가 없을 뿐만 아니라, 바이오실리카 합성의 템플릿으로 사용된 물질을 템플릿의 역할을 넘어 실리카와 함께 효소 고정화에 효과를 보고자 하는 연구 또한 현재 거의 진행되고 있지 않다.

2.2.1 바이오실리카의 합성

생규화작용 (biosilicification)이란 살아있는 유기물에 의해 무기물인 실리콘이 실리카의 형태로 합성되는 과정을 말하며, 0~37°C 정도의 낮은 온도, 상압, 그리고 중성 pH라는 온화한 조건에서 매우 빠른 속도로 실리카가 합성되는 특성을 갖고 있다 [45]. 이렇게 합성된 실리카를 바이오실리카라 일컬으며, 이러한 작용을 하는 대표적인 생체고분자로는 규조류로부터 얻은 실라핀 (silaffin)과 해면체로부터 얻은 실리카틴 (silicatein)이 알려져 있다 [46]. 이러한 생체물질들이 낮은 전구체의 농도에도 불구하고 온화한 조건에서 실리카를 합성할 수 있는 이유는 분자 내에 위치하는 특정 부분이 실리카 중합의 활성화 에너지를 낮출 수 있는 촉매의 역할을 하기 때문이다 [47, 48]. 이를 모방하여 다당류 [49], 단백질 [24, 50]과 같은 천연 고분자나 합성 펩타이드 [51]등으로 실리카를 합성하는 연구들이 지속적으로 진행되고 있다.

기존의 연구에 따르면 세리신도 실리카 전구체로부터 실리카를 합성할 수 있는 능력을 갖는다는 사실이 밝혀져 있다 [24]. 세리신은 실크 단백질 중의 하나로, 실리카 합성 시, 실리카 전구체의 가수분해 반응이 따로 필요하지 않고, 상온상압의 온화한 조건에서 실리카 전구체로부터

직접 실리카를 효율적으로 합성할 수 있다. 또한 합성 후에 세리신은 실리카와 복합체의 형태로 존재한다고 알려져 있다 [24].

2.3 효소 고정 지지체로서의 세리신의 이용

세리신을 효소 고정화에 응용된 연구들도 존재한다. 직접 지지체로 이용한 사례는 아니지만 Lee *et al.* [52]의 연구결과에 의하면 실크 피브로인 섬유에 트립신을 고정화 했을 때, 세리신을 spacer로 사용하면 효소의 안정성과 기질에 대한 활성이 향상되는 것을 확인하였다. Miyairi *at al.* [53]는 가장 먼저 세리신을 지지체로 이용하여 효소를 고정화시키는 연구를 하였다. 이 연구에서는 세리신으로 필름을 제조하고, GA로 가교 및 표면의 아민기를 활성화 시켜 베타-글루코시다제를 화학적으로 고정화시켜 재사용성과 저장성이 매우 좋음을 확인하였다. 최근의 연구에서는 세리신을 이용하여 비드를 만들고, 표면을 GA로 활성화 시켜 트립신과 리파제를 성공적으로 고정화 하였고, 리파제의 경우 고정화 이후에도 70% 이상의 비교적 높은 활성을 유지한다는 것을 확인하였다. 이 연구진은 고정화 한 이후에도 효소의 활성을 높게 유지시킬 수 있는 것을 세리신의 친수성 때문이라고 해석하였다 [18].

리파제 또한 단백질이기 때문에 소수성 부분과 친수성 부분을 모두 갖게 된다. 대부분의 효소는 표면에 친수성 잔기를 갖고 있는 반면, 리파제의 경우는 표면에 소수성 잔기를 갖는 대표적인 효소로 알려져 있다. 따라서 물리적인 흡착의 방법으로 고정화시키는 경우, 강하게 소수성 상호작용을 할 수 있는 소수성을 띠는 지지체가 선호된다. 하지만 화학적으로 리파제를 고정시키는 경우 지지체가 소수성을 띠게 되면 이미 표면에 결합되어 있는 리파제와 인력이 작용하게 되어 효소의 구조를 변화시

켜 활성을 저하시킬 수 있다. 반면, 친수성을 띠는 지지체를 사용하게 되면 리파제와의 상호작용이 적어 효소의 구조 변화 및 활성 저하를 줄일 수 있다고 알려져 있다 [11, 54] 따라서 친수성인 세리신을 리파제 고정 지지체로서 사용한다면 리파제의 활성 저하를 줄일 수 있는 기능을 부여할 것으로 기대할 수 있다.

제 3 장 실험재료 및 방법

3.1 재료 및 시약

누에(*Bombyx mori*) 고치는 국립농업과학기술원에서 받아 사용하였다. 실리카 전구체로 사용한 tetraethyl orthosilicate (TEOS)와 (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), 4-nitrobenzaldehyde (4-NBA), 4-nitrophenyl decanoate (4-NPD), 4-nitrophenol (4-NP), 에탄올, 메탄올, glutaraldehyde (GA), *Candida rugosa* lipase (CRL), olive oil 는 모두 SIGMA-ALDRICH 제품을 사용하였다.

3.2 실리카와 세리신으로 구성된 리파제 고정화 지지체의 제조

누에고치를 1:25의 욱비로 120℃에서 60분간 고압멸균기 (50-ATC-60, 국제싸이엔, Korea)에서 열수 추출하여 실크 세리신 수용액을 얻었다. 위 방법으로 추출된 세리신은 분자량이 약 17 kDa에서 250 kDa으로 알려져 있으며, 아미노산 조성은 표 1과 같다 [55]. 약 1 wt%의 농도로 추출된 실크 세리신 수용액을 상온에서 식힌 뒤 실험에 이용하였다.

실리카 전구체인 TEOS와 APTES는 에탄올을 사용하여 분산시켰으며, 최종 실리카 전구체의 농도를 45 mM로 고정하였다. 전체 실리카 전구체에 대한 APTES의 농도를 0, 1.5, 3.0, 그리고 9.0 mM로 다르게 하여 총 4가지 실리카 전구체 분산 용액을 제조하였다. 또한 추출한

Table 1. Composition of amino acid composition of sericin obtained by hot-water extracted method

(%)	HS
Asp	13.3
Glu	4.54
Ser	34.68
His	0.89
Gly	18.5
Thr	7.2
Arg	5.26
Ala	4.48
Tyr	2.97
Val	2.54
Phe	0.47
Ile	0.47
Leu	1.09
Lys	3.6

세리신 수용액을 희석하여 0, 0.25, 0.50, 1.00 wt% 용액을 제조하였다.

세리신 수용액 혹은 증류수를 마이크로 튜브에 0.5 ml씩 넣고, 제조해 놓은 실리카 전구체 분산 용액을 1 ml씩 첨가한 후, 용액이 잘 섞일 수 있도록 교반하였다. 이후에 상온에서 3일간 반응시켰으며, 에탄올을 이용한 세척 과정을 거쳐 미반응 전구체를 제거했다 (그림 2). 세리신 수용액의 농도와 반응한 실리카 전구체의 비율에 따라 표 2와 같이 명명했다.

제조한 지지체의 형태와 표면에 존재하는 원소를 분석하기 위해 field emission scanning electron microscope (FE-SEM) (JSM-7600F, JEOL, Japan)과 transmission electron microscope (TEM) (JEM1010, JEOL, Japan), energy dispersive spectroscopy (EDS) (JSM-7600F, JEOL, Japan)를 사용하였다. 또한 제조한 지지체가 복합체를 형성하고 있음을 확인하기 위하여 thermal gravimetric analysis (TGA, Q-5000 IR, TA-Instrument, USA)와 Fourier transformed-infrared spectrometer (Nicolet 6700, MIDAC, Japan)을 사용하였다.

3.3 제조된 세리신/실리카 나노입자의 수율 측정

제조된 시료의 수율을 측정하기 위하여 에탄올과 물로 각각 3회씩 수세하고, 50°C 오븐에서 완전히 건조시킨 후 무게를 측정하였다. 또한 각각의 시료에서 실리카가 이루고 있는 비율을 알기 위해 소결로 (LEF215P, Daihan LabTech, Korea)를 이용하여 600°C에서 6시간 동안 처리한 후, 무게를 측정하였다.

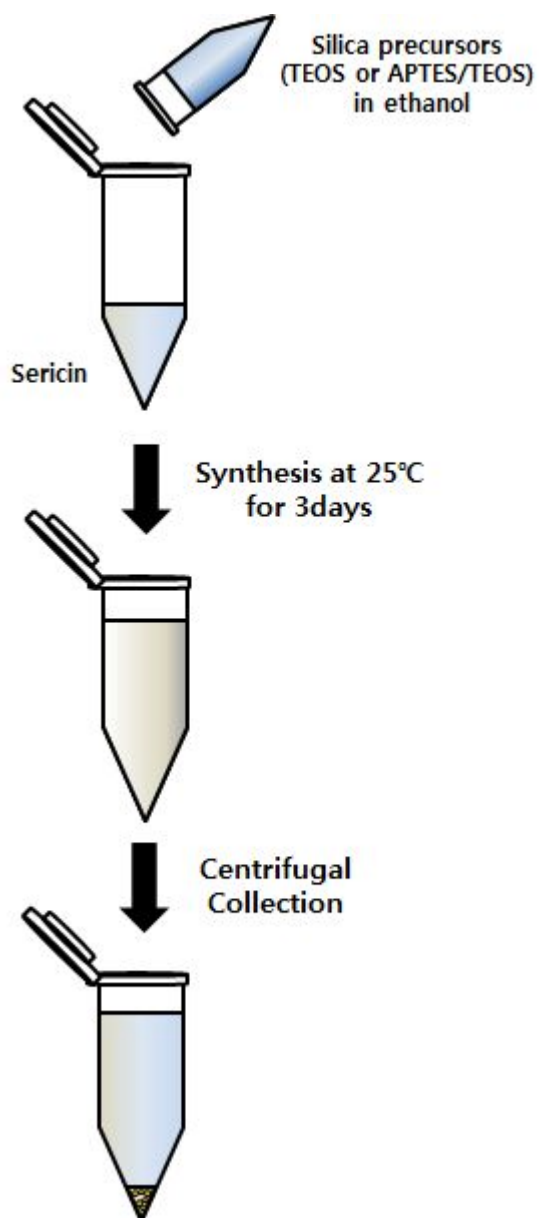


Figure 2. Overall synthesis procedure of silica or sericin/silica nanoparticles.

Table 2. Sample identification for silica or sericin/silica nanoparticles

TEOS (mM)	APTES (mM)	Total (mM)	Sericin solution (wt%)			
			0	0.25	0.5	1
45.0	0	45	S0_A0	S25_A0	S50_A0	S100_A0
43.5	1.5	45	S0_A15	S25_A15	S50_A15	S100_A15
42.0	3.0	45	S0_A30	S25_A30	S50_A30	S100_A30
36.0	9.0	45	S0_A90	S25_A90	S50_A90	S100_A90

3.4 세리신/실리카 나노입자 표면의 아민기 정량 방법

GA와 반응 가능한 나노입자 표면의 아민기를 정량하기 위하여 4-NBA test를 진행하였다. 이 반응은 그림 3과 같은 반응식으로 진행되어 최종적으로 가수분해 되어 나온 4-NBA의 흡광도를 측정함으로써 시료 표면의 반응가능한 아민기를 정량할 수 있는 방법이다. 먼저 4-NBA 10 mg을 에탄올 25 ml에 녹이고, 아세트산을 20 μ l 첨가하여 반응용액을 제조하였다. 합성한 시료를 마이크로 튜브에 넣고, 제조한 4-NBA 용액을 2 ml 첨가하여 50 $^{\circ}$ C 오븐에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 10000 G에서 10분 간 원심분리 하여 반응 용액으로부터 나노입자를 분리한 후, 이를 3회 수세했다. 이후 물과 에탄올의 비가 1:1인 가수분해 용액을 15 ml 만들고, 아세트산 20 μ l를 첨가한 후, 수세한 시료에 2 ml씩 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 10000 G에서 5분 간 원심분리 하여 시료의 상등액을 채취하고, 이를 분광광도계 (UV/Vis Spectrophotometer, Optizen pop, MECASYS, Korea)를 이용해 264 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 4-NBA 검량선을 통해 시료 표면의 아민기의 수를 정량할 수 있었다.

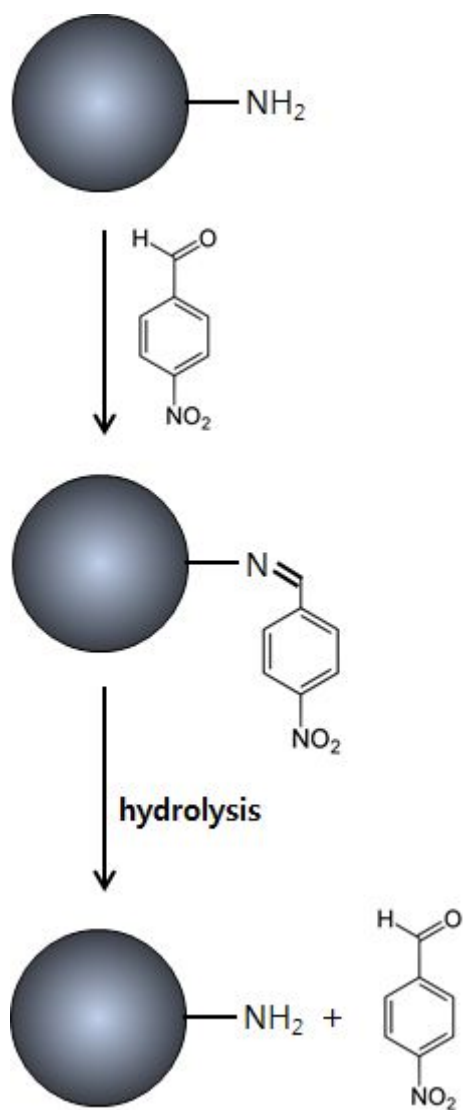


Figure 3. Reaction scheme of 4-NBA with the surface amine on the supports.

3.5 세리신/실리카 나노입자 가교 및 표면 활성화 방법

에탄올에 분산되어 있는 나노입자는 진공상태에서 건조시켜 파우더 형태로 시료를 얻었다. 파우더 형태의 시료 10 mg을 측정하여 튜브에 넣고, 에탄올과 0.1 M sodium bicarbonate buffer (pH 9.2) 상에서 10 % (v/v) GA로 상온에서 1시간 동안 처리하여 나노입자를 구성하고 있는 세리신과 실리카 표면에 존재하는 아민기를 활성화 시켰다. 반응이 끝나고 난 후에는 미반응 GA를 제거하기 위하여 에탄올 2회, 증류수 2회, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 3회 수세하고 진공 건조하였다.

3.6 리파제 고정화 방법

표면이 GA에 의해 알데히드기로 활성화 된 시료에 먼저 리파제를 1 mg/ml의 농도로 0.1 M sodium phosphate cold buffer (pH 7.4) 에 녹였다. 제조된 리파제 용액을 활성화 된 실리카/세리신 나노입자 10 mg 에 1 ml씩 첨가하여 4°C에서 16시간 동안 반응시켜 리파제를 표면에 고정화 시켰다. 반응 후, 화학적으로 결합하고 있지 않은 리파제를 제거하기 위하여 0.5 M NaCl이 포함된 sodium phosphate cold buffer (pH 7.4)로 2회 수세하였다. 또한 이후 기질과의 반응을 위하여 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 수세하였다.

3.7 고정화한 리파제의 양 측정 및 활성 측정

결합된 리파제의 양은 고정화 반응 후의 상등액의 흡광도를 측정하는 분광광도법을 사용하였고, 다음과 같은 식으로 결합된 리파제의 양을 계

산하였다.

$$\text{Bound Lipase(mg/mg)} = \frac{(C_i - C_f)V}{W}$$

여기서 리파제 결합량은 합성된 실리카/세리신 나노입자에 결합한 양을 말하며, C_i 와 C_f 는 반응 용액에 존재하는 초기 농도와 최종 농도 (mg/ml)를 각각 의미한다. V 는 반응 용액의 부피 (ml)를 의미하며, W 는 효소가 결합되어있는 지지체의 무게 (mg)를 의미한다.

고정화한 리파제의 효소활성을 측정하기 위해 합성기질인 4-NPD 용액을 제조하였다. 이 용액은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 리파제의 활성을 돕는 Triton-X와 아세톤을 첨가하여 50°C로 온도 높인 후, 기질인 4-NPD를 10분 간 녹여 제조하였다. 이 용액 1ml 를 리파제를 고정화 한 지지체에 첨가하여 10분간 반응시킨 후, 분광광도계로 효소-기질 반응 산물인 4-NP을 검출하기 위해 348nm에서 흡광도를 측정하였다.

또한 고정화하기 전에 대한 고정화 후의 상대적인 활성을 비교하기 위하여 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Relative activity (\%)} = \frac{A_{IL}}{A_{FL}} \times 100$$

여기서 A_{IL} 은 실제 지지체에 고정화시킨 리파제의 활성을 의미하고, A_{FL} 은 고정화하지 않은 리파제의 활성으로서, 비교하고자 하는 고정화한 효소의 양과 동일한 양을 같은 기질 반응 조건에서 얻은 값을 의미한다.

3.8 고정화한 리파제의 재사용성 평가

산업적인 응용 가능성을 보기 위하여 고정화한 리파제의 반복 활성 측정을 통해 재사용성에 대한 평가를 진행하였다. 고정화한 리파제의 반복적으로 사용하여도 활성이 유지되는지 확인하기 위하여 기질에 대한 활성을 7회 반복하여 측정해 보았다. 1회의 기질 반응 후, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 수세한 뒤, 진공에서 건조시켜 처음 반응했던 상태와 동일한 상태에서 4-NPD와 동일한 조건으로 반응시켜 4-NP의 흡광도를 측정하여 활성을 평가하였고, 가장 처음 나왔던 값을 100%로 설정하여 이후 값을 산출하였다.

3.9 고정화한 리파제의 바이오디젤 생산 가능성 평가

바이오디젤을 생산하기에 앞서 바이오디젤 생산 시 이용되는 메탄올에 대한 고정화 리파제의 안정성을 평가하였고, 이후 실제 식물성 기름인 올리브유를 이용하여 바이오디젤을 생산해봄으로써 응용 가능성을 살펴 보았다.

3.9.1 메탄올에 대한 안정성 평가

메탄올에 대한 고정화 리파제의 안정성을 평가하기 위하여 고정화한 리파제에 메탄올을 1시간 동안 처리한 후, 동일하게 기질 반응을 진행시켜 처리하기 전의 활성과 비교해 보았다. 대조군으로는 고정화하지 않은 리파제를 이용하였고, 동일한 양의 리파제를 메탄올에 동일한 시간 동안 반응시켜 비교하였다.

3.9.2 고정화한 리파제를 이용한 바이오디젤 생산

제조한 세리신/실리카 나노입자에 고정화한 리파제가 실제로 바이오디젤 생산에 응용될 수 있는지 평가하기 위해 올리브유와 메탄올을 이용하여 바이오디젤 생산 실험을 진행하였다. 실제 바이오디젤 생산에 있어서 기름과 메탄올의 이론적인 반응 몰비는 1:3이지만 과량의 메탄올은 리파제의 활성을 저하시킬 수 있기 때문에 초기 몰비를 2:5로 설정하여 6시간을 반응시킨 뒤, 동일한 양의 메탄올을 첨가하여 최종 몰비 1:5가 되도록 하여 24시간 까지 반응을 진행시켰다. 3시간, 6시간, 24시간 반응 후, 시료를 100 μ l 채취하여 이를 heptane에 2배 희석시킨 뒤, 가스 크로마토그래피 (Agilent 7890A, agilent, USA)를 이용하여 생성물을 분석하였다. 이 때, 리파제의 활성을 유지시키기 위해 반응에 증류수를 기질의 0.4 wt% 첨가한 후 반응시켰다.

바이오디젤로의 전환율을 계산하기 위해서 먼저 기질이 되는 올리브유를 정량을 위한 표준물질과 함께 전처리하여, 올리브유에 가장 많이 존재하는 oleic methyl ester의 양을 GC 분석을 통해 정량화하였다. 이후, 실제 본 연구에서 고정화한 리파제를 이용하여 동일한 양의 올리브유와 반응시킨 뒤 생성된 oleic methyl ester를 동일하게 GC로 분석하여 올리브유에 포함된 전체 oleic methyl ester 양과의 비교를 통해 전환율을 계산할 수 있었다.

제 4 장 결과 및 고찰

4.1 실리카 전구체 농도비와 세리신 농도에 따른 수율 비교

동일한 반응 조건에서 실리카 전구체의 농도와 세리신의 농도가 합성되는 실리카에 미치는 영향을 알아보기 위하여 전구체로 사용된 TEOS와 APTES의 농도 비율에 따라, 혹은 세리신 수용액의 농도에 따라 생성되는 실리카의 수율을 비교해 보았다.

4.1.1 실리카 전구체 농도비가 실리카 합성에 미치는 영향

그림 4는 세리신이 존재하지 않는 상태에서 APTES의 농도에 따른 실리카 합성 수율을 나타낸 것이다. 이를 통해 가장 먼저 알 수 있었던 사실은 APTES가 존재하지 않는 상태, 즉 동일한 반응 조건에서 TEOS만 45 mM의 농도로 존재할 때에는 실리카가 합성되지 않았음을 확인할 수 있었다. 이는 전체 반응 용액에 물이 0.5 ml 포함되어 있어 TEOS의 가수분해 산물이면서 실제 중합이 가능한 형태인 실라놀(SiOH)이 생성될 수는 있으나, 실라놀의 성장에 필요한 활성화 에너지를 낮출 수 있는 촉매가 존재하지 않았고, 농도 또한 매우 낮아 실리카가 합성되지 않은 것으로 보인다 [56, 57]. 하지만 특별한 촉매 없이도 APTES가 전구체 내에 존재하게 되면 실리카가 합성되기 시작하고, APTES의 농도가 높아질수록 합성되는 실리카의 수율이 높아지는 경향을 확인할 수 있었다. 이는 TEOS가 4개의 동일한 alkoxy silane 작용기를 갖는 반면, APTES는 3개의 alkoxy silane 작용기 외에 1개의

aminopropyl 작용기를 갖고 있기 때문이다. 즉, aminopropyl 작용기에 존재하는 아민기 ($pK_a \sim 10.6$)는 반응 조건인 pH 7의 환경에서 양전하를 띠게 되고, 실라놀의 음전하와의 정전기적 상호작용 ($-\text{NH}_3^+ \cdots ^-\text{OSi}\equiv$)을 통해 양성자 이동이 일어나게 되어 중합을 개시할 수 있게 된다. 뿐만 아니라 APTES는 3개의 alkoxy silane을 가져 TEOS와 함께 중합에 참여할 수 있어 합성되는 실리카 표면에 지속적으로 아민기를 부여하게 되어 용액 내에 중합 가능한 TEOS가 존재한다면 지속적으로 중합을 유도 할 수 있다고 알려져 있다 [58, 59]. 실제로 본 연구의 반응 조건에서도 합성되는 실리카 나노입자의 크기가 APTES의 첨가량이 증가함에 따라 커짐을 FE-SEM을 통해 확인하였다 (그림 5). 합성된 나노입자의 실제 평균 크기는 APTES의 농도가 1.5 mM일 때 약 39.8 nm, 농도가 3.0 mM일 때 약 48.6 nm, 그리고 농도가 가장 높은 9.0 mM일 때 약 70.5nm로 이를 표 3에 정리하였다.

이상의 결과에서 APTES는 실리카 표면의 아민기를 도입시키기 위해 사용한 전구체지만, 합성되는 실리카 나노입자의 수율과 크기에도 큰 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

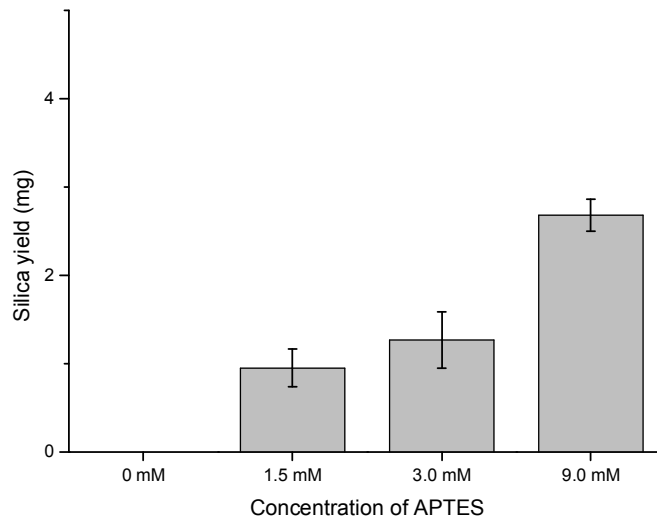
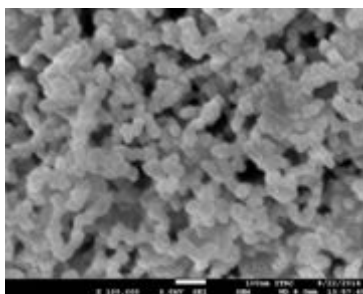
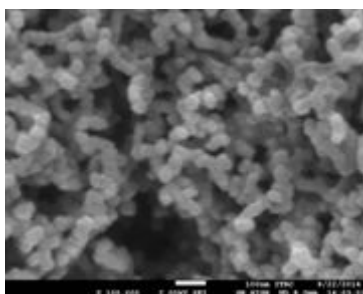


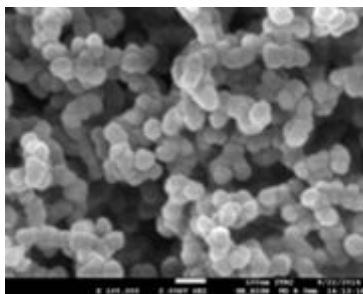
Figure 4. Effect of silica precursor composition on the yield of silica nanoparticles prepared after 3 days of synthesis. The total molar concentration of silica precursor was 45 mM. The sericin concentration was 0 wt%.



(a)



(b)



(c)

Figure 5. FE-SEM images of silica nanoparticles prepared from different silica precursor composition. The molar concentrations of APTES in the mixture of silica precursor was (a) 1.5, (b) 3.0 and (c) 9.0 mM. Scale bar of 100 nm.

Table 3. Particle size of silica nanoparticles prepared from different silica precursor composition

Sample	S0_A0	S0_A15	S0_A30	S0_A90
Particle Size (nm)	Not synthesized	39.8±4.8	48.6±4.3	70.5±5.8

4.1.2 세리신 농도가 실리카 합성에 미치는 영향

이번에는 실리카 합성 과정에서 세리신의 역할을 알아보기 위해 전체 전구체의 농도 중 APTES의 농도를 9.0 mM로 고정시킨 뒤 합성에 사용한 세리신 수용액의 농도에 따른 수율을 측정해 보았다. 여기서 실리카 합성에 영향을 미치는 APTES를 세리신의 영향을 보는 과정에 첨가한 이유는 다음과 같다. 에탄올이 포함되어 있는 본 연구의 반응 조건에서 APTES를 첨가하지 않게 되면 세리신에 의한 TEOS의 중합 속도보다 에탄올에 의한 세리신의 응집 및 침전이 더 빠른 속도로 일어나 결과적으로 실리카는 매우 적은 양이 생성되게 때문이다. 하지만 APTES가 존재하게 되면 세리신이 침전하지 않고, 용액 내에 고르게 분산되어있을 수 있다는 것을 확인하였기 때문에 이러한 반응 조건을 설정하였다. 본 반응조건에서 세리신의 농도에 따른 실리카의 수율을 확인했을 때, 세리신의 농도가 0.25%일 때 약간의 수율 증가가 일어나긴 했지만 실리카 수율에는 세리신이 큰 영향을 미치지 않았다 (그림 6). 기존의 Oh *et al.* [23]의 세리신을 이용한 실리카 합성에 대한 연구에서 세리신의 농도가 실리카 합성 수율에 영향을 미친다고 하였지만 본 연구의 결과 세리신의 농도가 실리카의 합성 수율에는 거의 영향을 미치지 않았다. 그 이유는 본 연구의 경우, 세리신 대비 실리카 전구체의 함량이 기존 연구에 비해 극히 미량이어서 세리신을 첨가한 경우 반응 용액 내의 모든 전구체가 이미 중합에 소진되어 수율이 더 이상 증가하지 않은 것으로 보인다. 이를 확인하기 위하여 4일간 복합체의 수율을 측정해 본 결과 3일까지는 수율이 지속적으로 증가하는데 반해 이후부터는 더 이상 증가하지 않은 것으로 보아 반응이 완료된 것으로 판단할 수 있었다 (그림 7). 본 반응 조건에서 세리신의 농도가 실리카의 수율에 미치는 영향은

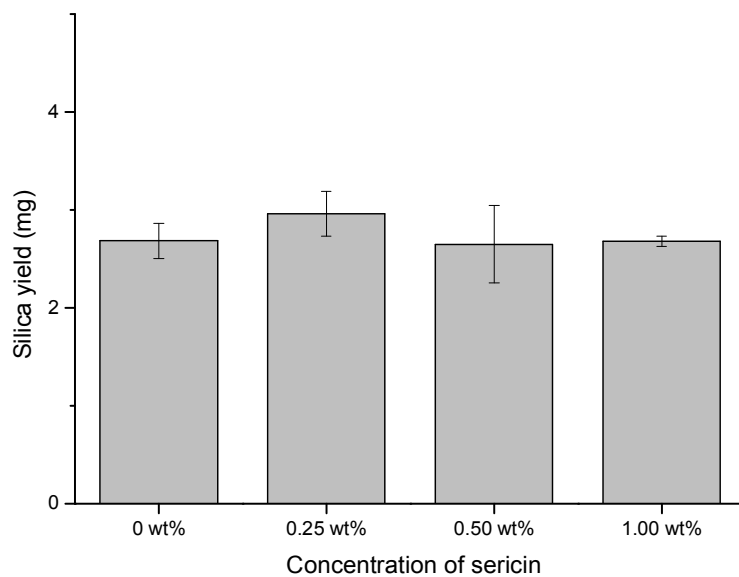


Figure 6. Effect of sericin concentration on the yield of silica or sericin/silica nanoparticles prepared after 3 days of synthesis. The total molar concentration of silica precursor was 45 mM. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM.

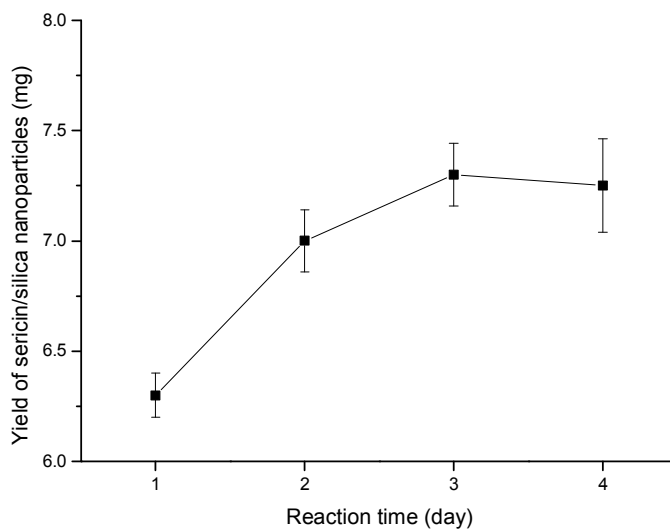


Figure 7. Effect of reaction time on the yield of sericin/silica nanoparticles. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM. The concentration of sericin was 1.00 wt%.

확인할 수 없었지만, 세리신의 농도에 따라 합성된 나노입자를 TEM을 통해 형태를 확인해 본 결과, 세리신이 실리카 합성에 영향을 주고 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 특히 합성된 나노입자의 크기에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 8). 세리신이 존재할 경우, 균일성은 떨어지지만 세리신이 포함되지 않은 SO_A90의 경우보다 훨씬 작은 입자들이 존재함을 확인할 수 있었다. 이 형태가 건조한 상태에서도 유지되는지 살펴보기 위하여, 건조 후, FE-SEM을 통하여 형태를 확인해 보았다 (그림 9). 역시 건조 후에도 세리신이 존재하는 시료의 경우 그렇지 않은 경우보다 훨씬 작은 입자들이 응집되어 있다는 것을 재확인할 수 있었다. 또한 이를 통해 반응 조건에서 세리신의 농도가 높아질수록 합성되는 나노입자의 응집 정도가 높아진다는 사실을 확인할 수 있었다.

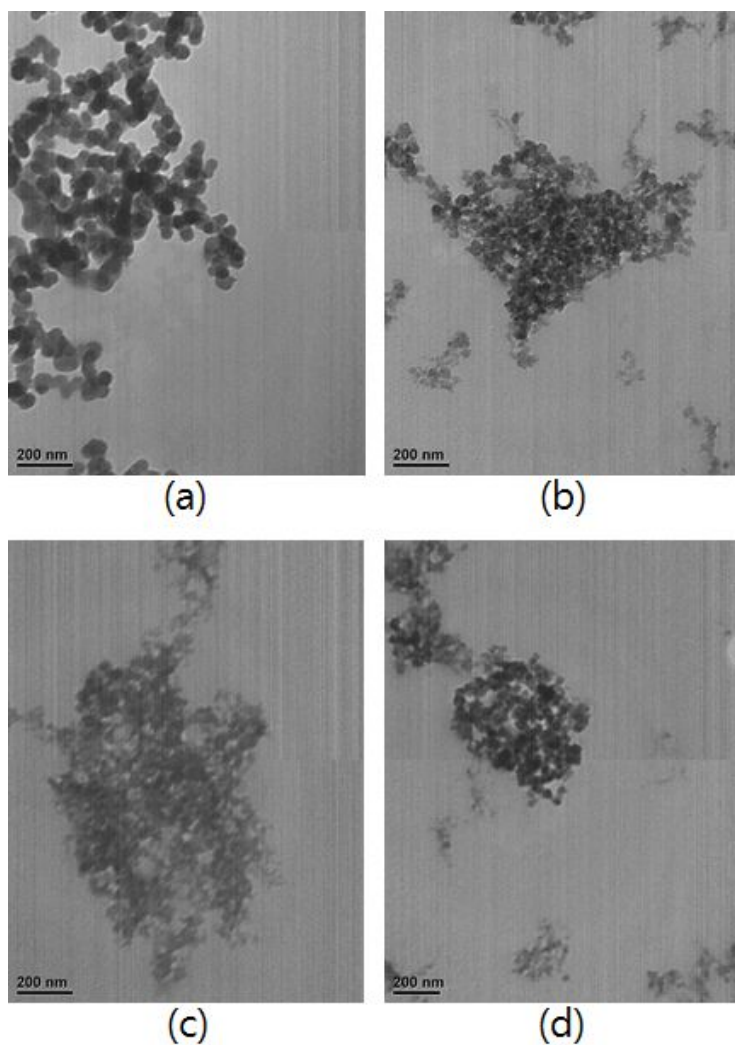


Figure 8. TEM images of silica or sericin/silica nanoparticles prepared from different sericin concentration. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM, and the concentrations of sericin was (a) 0, (b) 0.25, (c) 0.50 and (d) 1.00 wt%. Scale bar of 200 nm.

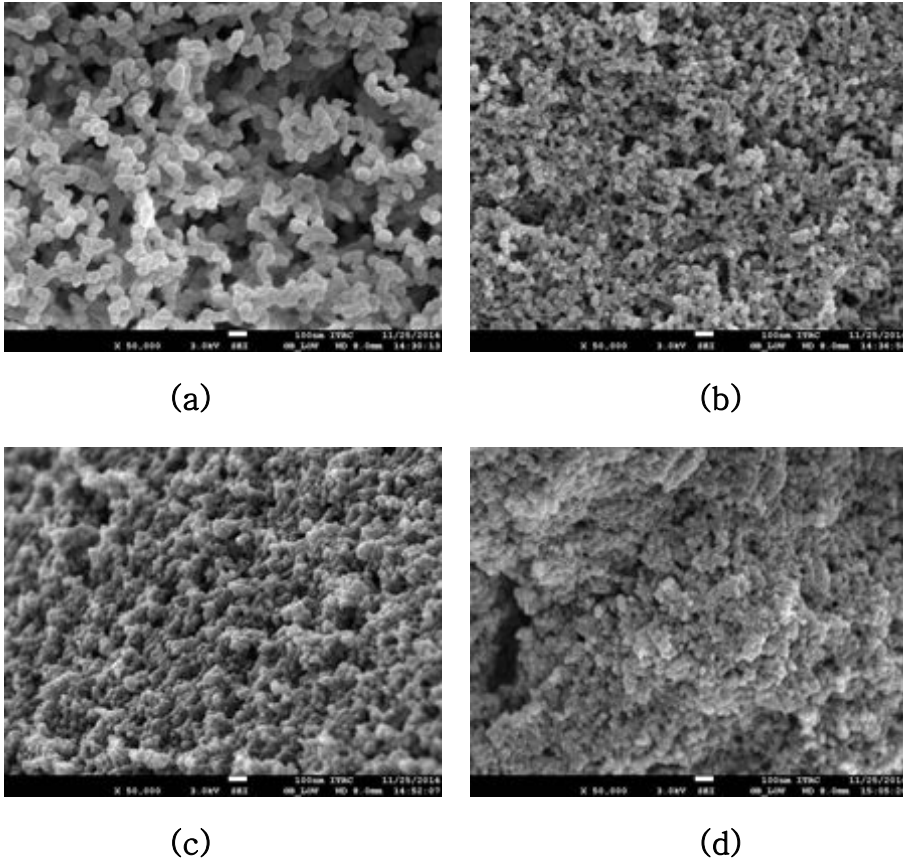


Figure 9. FE-SEM images of silica or sericin/silica nanoparticles prepared from different sericin concentration. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM, and the concentrations of sericin was (a) 0, (b) 0.25, (c) 0.50 and (d) 1.00 wt%. Scale bar of 100 nm.

4.2 세리신 농도에 따른 세리신/실리카 복합체의 확인

실제로 합성된 시료가 이전의 연구에서처럼 복합체의 형태로 존재하는지 알아보기 위하여 전체 전구체의 농도 중 APTES의 농도를 9.0 mM로 고정시킨 뒤, 세리신의 농도에 따라 열분해 중량 분석을 실시하였다. 그림 10에서 열분해 중량곡선을 살펴보면 세리신이 포함되어 있지 않은 S0_A90 외에 세리신이 포함되어 있는 S25_A90, S50_A90, 그리고 S100_A90에서 모두, 약 250°C 전후에서 질량의 감소가 일어났음을 통해 세리신의 존재를 확인할 수 있었다. Oh *et al.* [24]은 세리신 단독 시료의 경우 600°C에서는 질량의 약 30%정도만 남게 된다고 하였는데, S25_A90, S50_A90, 그리고 S100_A90 시료에서 모두 600°C에서도 약 50~70%가 남아있음을 통해 실리카와 세리신이 복합체로 존재한다는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 이를 재확인하기 위하여 FT-IR을 이용하였다 (그림 11). 실리카의 존재를 확인할 수 있는 주요 피크인 Si-O-Si의 asymmetric stretch vibration에 의해 나타나는 1100 cm^{-1} , symmetric stretch에 의해 나타나는 800 cm^{-1} , 그리고 bending vibration에 의해 나타나는 450 cm^{-1} 에서의 피크가 세리신이 포함되지 않은 S0_A90 시료와 세리신이 포함된 S100_A90 시료에서 모두 발견 되었다. 반면, 단백질의 특징인 아마이드 I을 나타내는 1650 cm^{-1} 피크와 아마이드 II를 나타내는 1520 cm^{-1} 피크는 S100_A90시료에서만 확인되었고, 이를 600°C에서 6시간동안 소결 한 후에는 이 피크가 사라진 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 세리신이 첨가된 시료에는 실리카와 세리신이 동시에 존재함을 재확인할 수 있었고, 열처리 후에는 세리신이 완전히 분해되고 실리카만 순수하게 남게 된다는 것을 확인할 수 있었다.

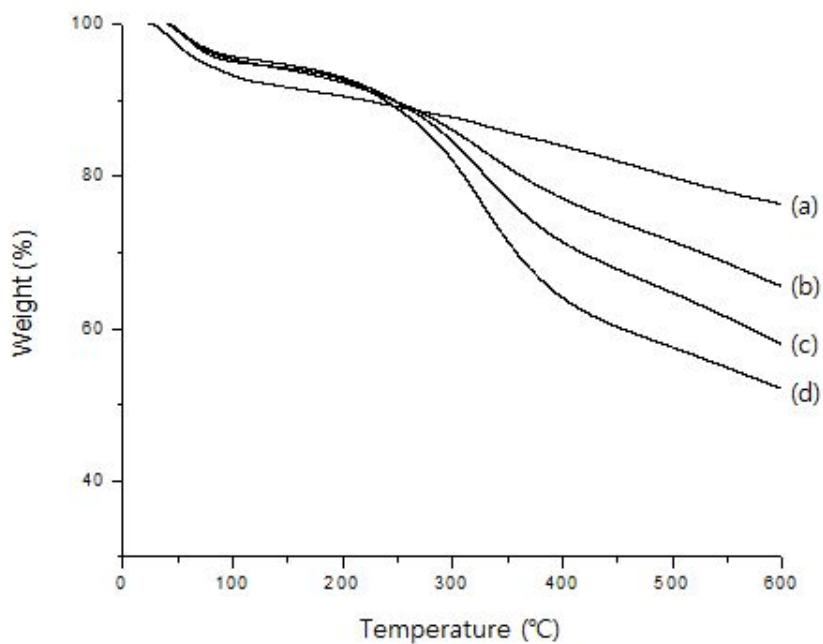


Figure 10. TGA curves of silica or sericin/silica nanoparticles prepared from different sericin concentration. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM, and the concentrations of sericin was (a) 0, (b) 0.25, (c) 0.50 and (d) 1.00 wt%.

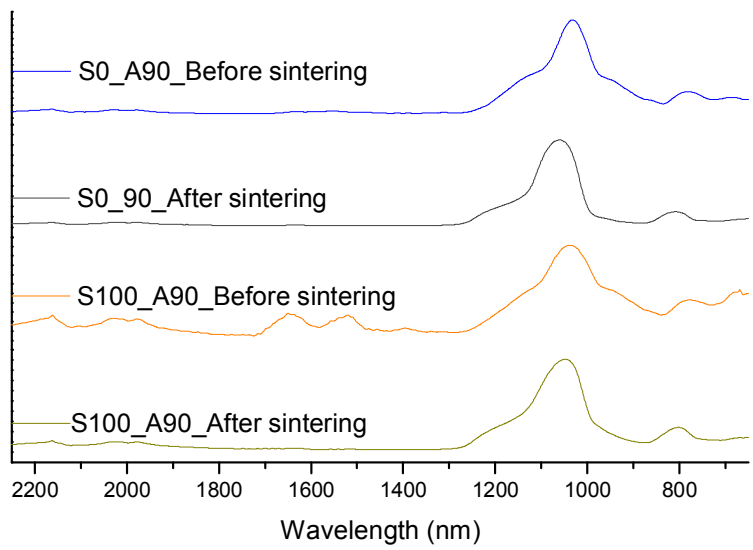


Figure 11. FT-IR spectra of silica (S0_A90) and sericin/silica (S100_A90) nanoparticles before and after sintering. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM.

4.3 전구체 농도비와 세리신 농도에 따른 아민기 정량

리파제의 고정화량을 예측하기 위해서는 GA와 반응 가능한 지지체 표면의 아민기의 양이 매우 중요하다. 따라서 반응 가능한 아민기를 정량하기 위해 4-NBA의 농도별 흡광도를 분광광도계를 이용하여 측정하였고, 가장 강한 흡광도를 나타낸 264 nm의 파장에서 검량곡선을 구하였다 (그림 12). 이 검량선을 이용하여 제조 조건에 따른 시료의 아민기를 정량하였다.

4.3.1 실리카 전구체 농도에 따른 아민기 정량

APTES는 TEOS의 중합을 직접 개시할 수 있는 기능을 부여한다는 사실을 앞서 확인했지만, 본 연구에서 APTES가 사용된 주된 목적은 실리카 표면에 아민기를 부여하기 위함이었다. 따라서 세리신의 농도를 1 wt%로 고정시키고, APTES의 농도를 다르게 합성한 시료에 대해 4-NBA test를 진행한 결과가 그림 13에 나타나 있다. 전체 전구체 내의 APTES의 비율이 높아질수록 반응 가능한 아민기의 수가 많아지는 것을 알 수 있었다. 이는 APTES의 농도가 9.0 mM이 될 때까지는 TEOS의 중합에 APTES가 중합에 참여하는 비율도 증가하여 표면에 아민기를 더 많이 도입시켰다는 사실을 확인할 수 있었다. 더 많은 리파제 고정을 위해서는 표면에 많은 아민기가 요구되기 때문에 이후 실험에서는 전체 전구체에 대한 APTES의 농도를 9.0 mM로 고정하였다.

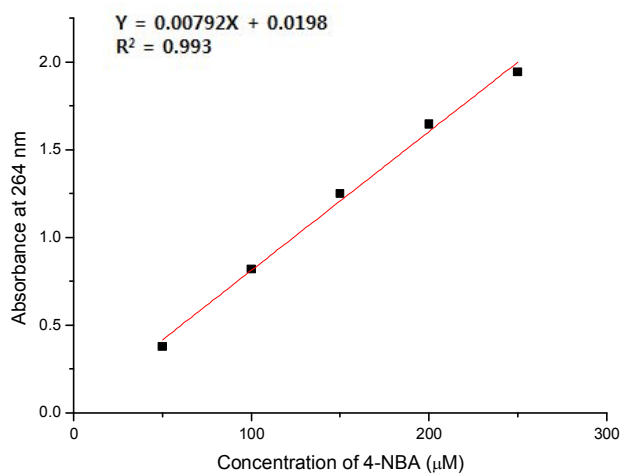
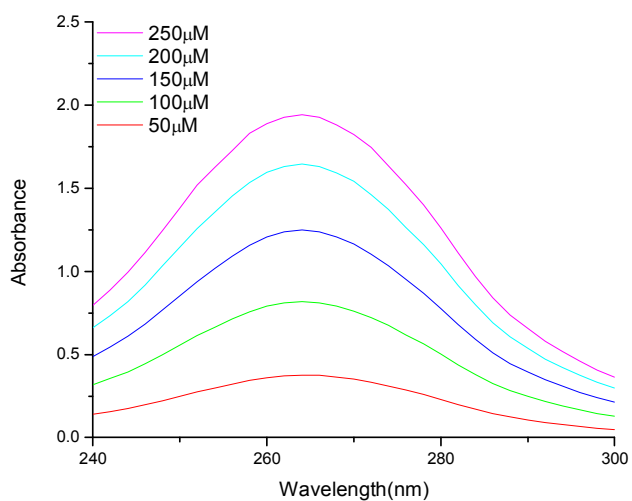


Figure 12. UV absorbance spectra (a) and calibration curve (b) of 4-nitrobenzaldehyde. The calibration curve was deduced from the absorbances at 264 nm.

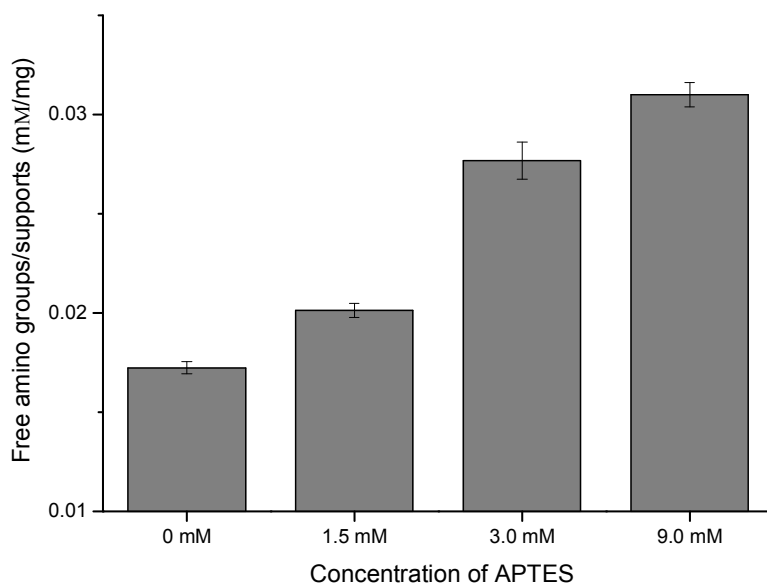


Figure 13. Effect of silica precursor composition on the free amino groups concentration on the sericin/silica nanoparticles. The total molar concentration of silica precursor was 45 mM. The sericin concentration was 1.00 wt%.

4.3.2 세리신 함량에 따른 아민기 정량

세리신/실리카 나노입자에 존재하는 아민기의 양에 대한 세리신의 영향을 알아보기 위하여 전체 전구체의 농도 중 APTES의 비율을 9.0 mM로 고정시킨 S0_A90, S25_A90, S50_A90 그리고 S100_A90 시료에 대한 4-NBA test를 통하여 표면의 아민기를 정량하였다. 이에 앞서 세리신의 영향을 비교하기 위함이기 때문에 먼저, 각 시료를 동일한 무게로 측정된 뒤, 소결을 통해 동일 나노입자 내의 세리신과 실리카의 구성비를 알아보았다 (그림 14). 세리신이 포함되지 않은 시료의 실리카 비율을 100%라고 보고 세리신의 농도에 따라 합성된 실리카의 비율을 계산해 보면, S25_A90이 약 84%, S50_A90 63%, 그리고 가장 높은 세리신의 농도가 반응에 이용된 S100_A90의 경우가 약 43%로 계산되었다. 즉, 높은 농도의 세리신에서 반응할수록 동일무게의 나노입자 내의 실리카의 비율은 낮아지고, 세리신의 비율이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 세리신/실리카 나노입자의 표면에 존재하는 Si의 함량을 EDS를 통해 확인함으로써, 표면에도 세리신의 비율이 높아짐에 따라 실리카의 비율이 낮아짐을 확인할 수 있었다 (그림 15).

합성된 실리카/세리신 나노입자의 구성비가 다른, 동일 무게의 시료에 대한 4-NBA test 결과가 그림 16에 나타나 있다. 여기서 주목할 것은 복합체 내에 세리신이 약 16%로 소량 존재하는 S25_A90 시료의 경우가 가장 많은 아민기를 갖는다는 점이다. 이는 복합체의 형태로 설명할 수 있는데, 그림 9의 FE-SEM image에서도 확인 했듯, 세리신이 반응에 참여함으로써 복합체를 구성하는 입자의 크기가 확연히 작아짐으로 인한 표면적 증가에 기인한 결과임을 예측할 수 있다. 하지만 높은 농도의 세리신과 반응할수록, 즉 복합체 내의 세리신 함량이 높아질수록 다

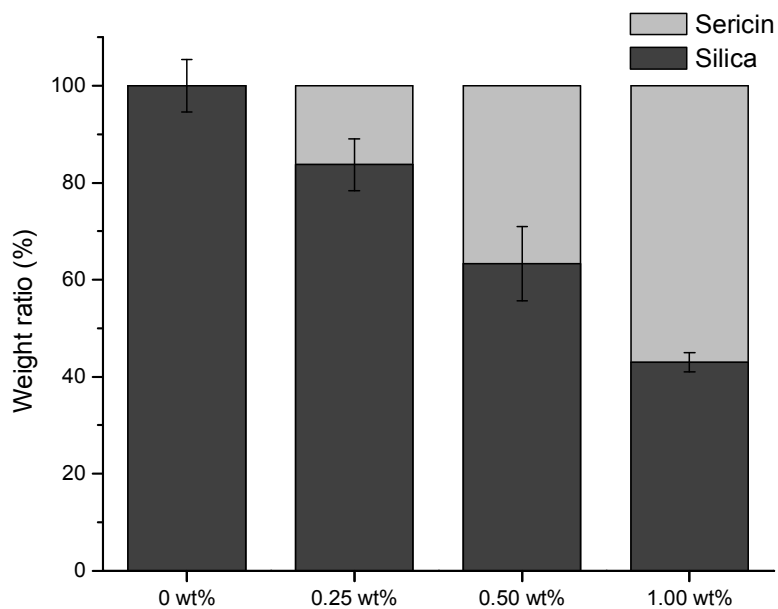


Figure 14. Effect of sericin concentration on the silica and sericin composition in the sericin/silica nanoparticles determined from incineration at 600°C. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM.

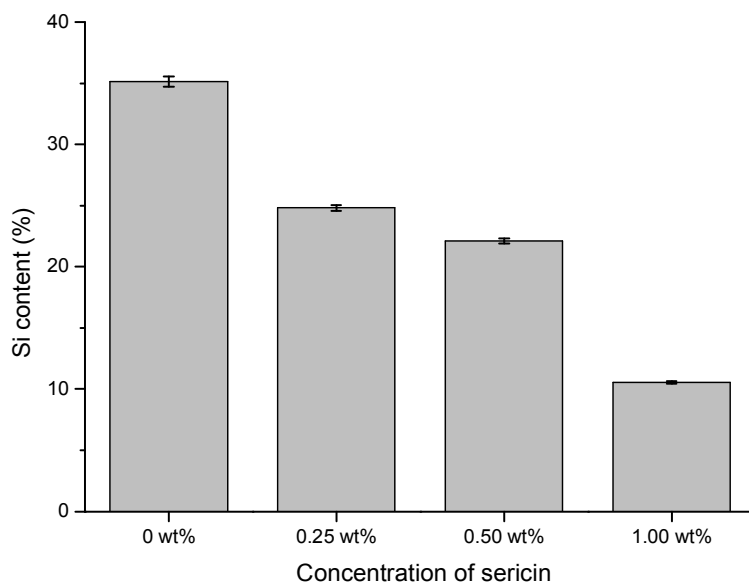


Figure 15. Effect of sericin concentration on the surface silicon content in the sericin/silica nanoparticles determined from EDS analysis. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM.

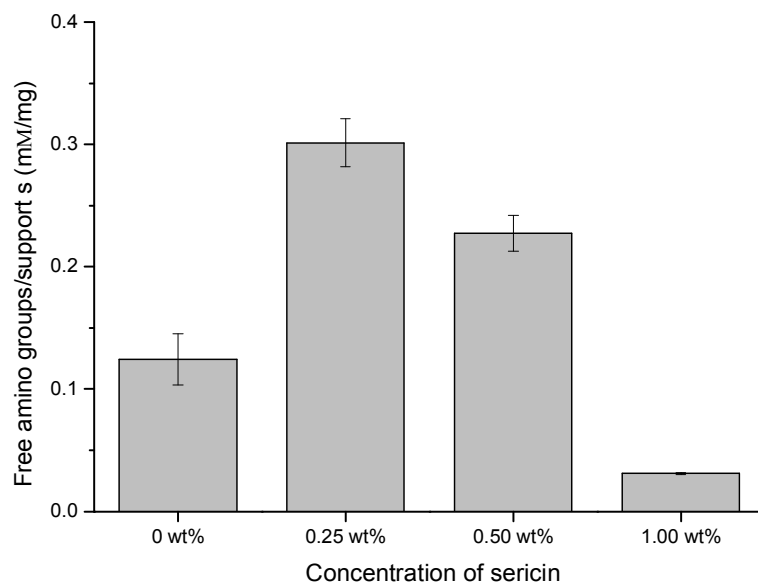


Figure 16. Effect of sericin/silica composition on the free amino groups concentration in the sericin/silica nanoparticles. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM.

시 아민기의 개수가 줄어드는 이유는 세리신에 의한 응집 정도가 높아졌기 때문으로 보인다. S50_A90의 경우는 표면적의 증가 효과가 응집으로 인한 표면적 감소 효과보다 크기 때문에 여전히 아민기의 개수가 세리신이 포함되지 않은 시료인 S0_A90의 경우보다 많지만 약 57%의 가장 많은 세리신을 포함하고 있는 S100_A90의 경우 입자의 크기 감소로 인한 표면적 증가 효과보다 세리신에 의한 과도한 응집으로 인한 표면적 감소 효과가 크게 나타난 것으로 판단할 수 있었다.

4.4 복합체 내 세리신 함량에 따른 리파제 고정화 효율

세리신의 농도에 따른 복합체의 아민기를 정량한 이후 GA와의 반응을 통해 복합체 내의 아민기를 알데히드기로 활성화시키는 반응을 진행하였다. 이때 GA는 효소고정화를 위해 아민기를 활성화시키는 물질로 사용하였지만, 아민기간의 가교 반응도 유도할 수도 있다. 실제로 GA는 단백질을 가교시킬 수 있는 물질로도 잘 알려져 있다 [60]. 제조된 복합체에 존재하는 세리신의 안정성을 높이기 위해서는 일정 부분 세리신간의 가교도 필요하지만, 복합체 내의 가교가 많이 일어날수록 반응 가능한 아민기의 개수는 줄어들게 되어 있기 때문에 리파제와의 결합 능력에 있어서 가교 전 존재했던 아민기의 양과 더불어 세리신간의 가교 정도 또한 중요한 인자로 여겨진다. 단백질 분자내의 가교가 일어나면 Schiff base ($RCH=NR'$) 결합이 형성되어 색의 변화가 일어난다고 알려져 있다 [61]. 본 실험에서 세리신의 농도에 따라 합성한 지지체 표면의 활성화를 위해 GA를 처리했을 때, 실제로 Schiff base 형성으로 인한 색변화가 육안으로 관찰되었다 (그림 17). 세리신이 존재하지 않는 S0_A90의 경우에도 약간의 색 변화가 일어났지만 세리신의 농도가

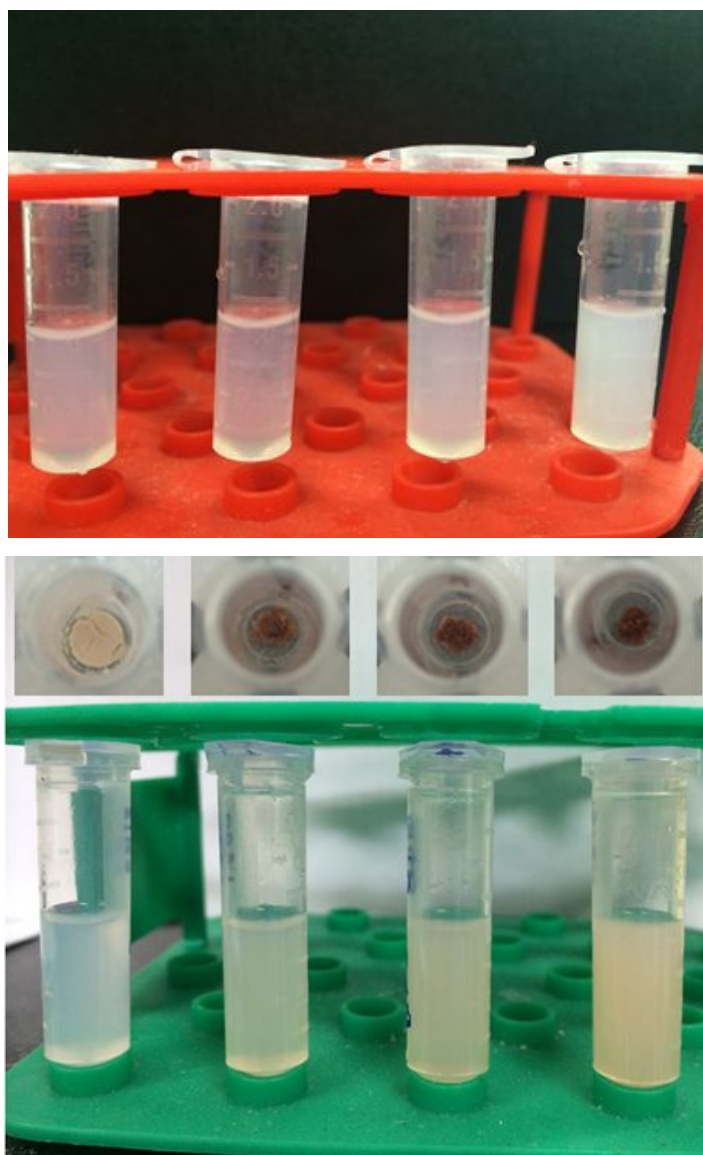


Figure 17. Photographs of synthesized silica or sericin/silica nanoparticles with different sericin concentration before GA treatment (top), and after GA treatment for 1hour at 25°C (bottom). From the left, S0_A90, S25_A90, S50_A90 and S100_A90.

높아질수록 색이 눈에 띠게 변화 했음을 확인할 수 있었다. 이 때 가교로 인한 나노입자 간의 응집도 일어날 수 있지만 FE-SEM을 이용하여 가교 전 후의 형태를 관찰하였을 때, 가교로 인해 나노입자들 간의 응집은 일어나지 않았음을 확인할 수 있었다 (그림 18). 이를 통해 지지체 내의 세리신의 함량이 높을수록 나노입자 내에 존재하는 세리신 분자간의 가교증가로 인한 아민기의 감소 정도가 클 것으로 예측을 할 수 있었다. 실제로 동일한 양의 지지체를 GA와 반응시킨 후, 결합한 리파제의 양을 측정해보면 세리신의 함량이 높을수록 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 19). 이는 가교로 인한 세리신의 아민기 감소로 인한 것으로 여겨진다. 즉 이로써 리파제를 고정시킴에 있어서 세리신의 아민기 보다는 실리카에 존재하는 아민기가 주로 역할을 할 것이라고 생각할 수 있었다.

효소 고정화에 있어서 결합되는 효소의 양도 물론 중요하지만 고정화 이후의 효소의 활성 유지가 이후 응용에 있어서 더욱 중요한 요소가 된다. 따라서 효소를 고정화시킨 후, 동일한 양의 고정화시키지 않은 효소의 활성을 기준으로 상대적 활성을 측정해보았다 (그림 20). 비록 동일한 지지체의 양에 붙어 있는 리파제의 결합 양은 세리신의 함량이 증가할수록 감소했지만, 고정화 리파제의 활성은 세리신이 약 16%, 37%정도 포함되어 있는 S25_A90, S50_A90 시료의 경우가 세리신이 포함되어 있지 않은 S0_A90 시료보다 더 높은 활성을 나타내었다. 이를 통해 세리신의 친수성이 소수성 상호작용으로 인한 효소 활성 저해를 최소화하는 데 도움을 주고 있다고 판단할 수 있었다 [11, 54]. S25_A90의 경우 고정화 되어있지 않은 리파제 활성의 90% 이상으로 매우 높게 유지되고 있음을 통하여 세리신이 합성한 지지체의 약 16% 정도를 구성하고 있을 때, 가장 높은 리파제 활성 효율을 보임을 확인할 수 있었다.

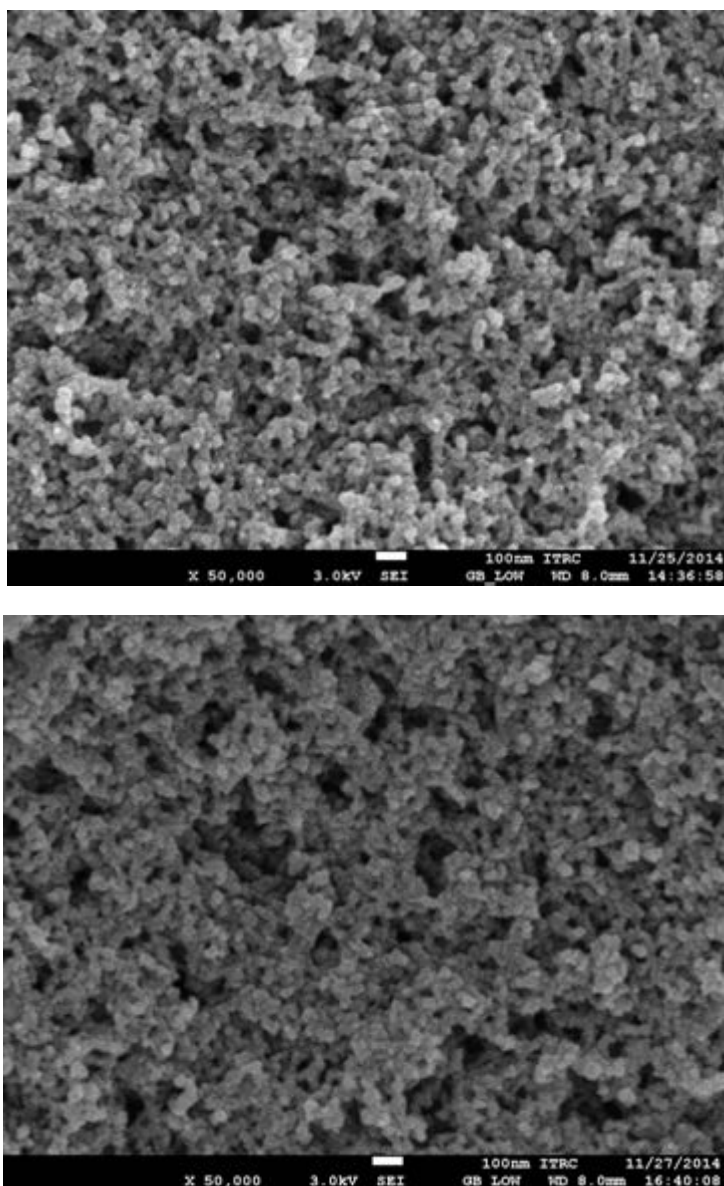


Figure 18. FE-SEM images of synthesized sericin/silica nanoparticles (S25_A90) before GA treatment (top) and after GA treatment for 1hour at 25°C (bottom).

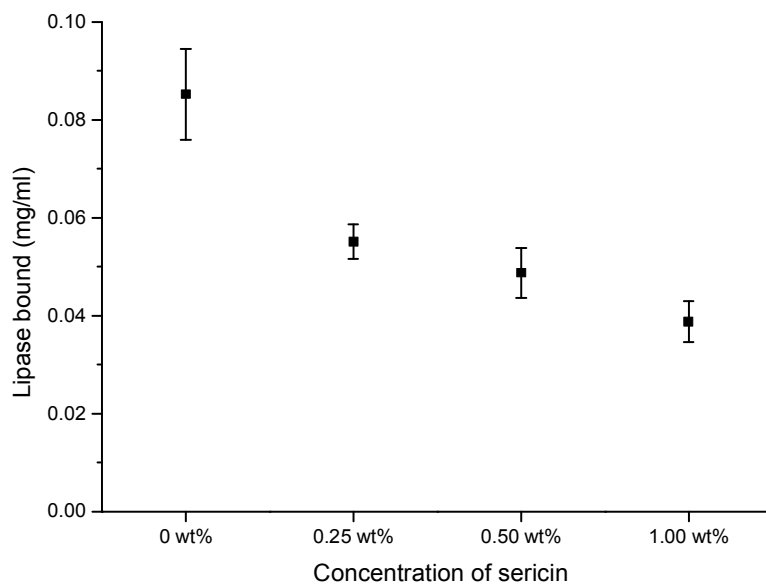


Figure 19. Bound lipase of synthesized silica or sericin/silica nanoparticles after GA treatment for 1hour at 25°C. The content of APTES in the mixture of silica precursor was 9.0 mM.

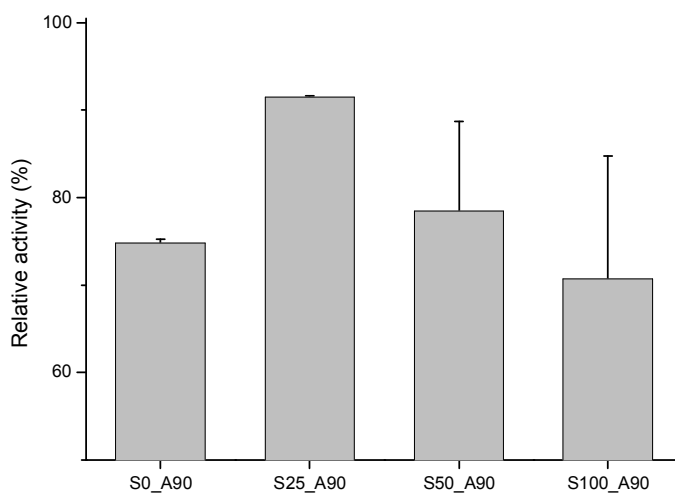


Figure 20. Relative activity of bound lipase on the silica or sericin/silica nanoparticles with different sericin concentration. The total molar concentration of silica precursor was 45 mM and the molar concentrations of APTES in the mixture of silica precursor was fixed to 9.0 mM.

따라서 이후 합성한 세리신/실리카 나노입자의 응용가능성을 확인해 보기 위한 바이오디젤 실험에 있어서는 전구체의 농도 중 APTES의 농도를 9.0 mM, 세리신 의 농도를 0.25%로 고정시킨 S25_A90 시료로 실험을 진행하였다.

4.5 고정화한 리파제의 재사용성

합성한 S25_A90시료에 고정화 시킨 리파제의 재사용성에 대해 평가 하였다. 동일한 무게의 동일한 시료를 7회 기질과 반복 반응시켰음에도 리파제의 활성 감소가 매우 천천히 일어나는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 21). 7회 반복 사용 후, 상대적인 활성이 60%정도까지 감소했지만 감소폭이 크지 않다는 것으로부터 제조한 세리신/실리카 복합체인 S25_A90이 반복되는 공정에서도 비교적 안정성을 지니고 있다는 것을 밝힐 수 있었다.

4.6 고정화한 리파제의 바이오디젤 생산 가능성

4.6.1 메탄올에 대한 안정성

세리신/실리카 복합체인 S25_A90에 고정화한 리파제를 이용하여 바이오디젤 생산 가능성을 보기에 앞서, 바이오디젤 생산 시 사용되는 알코올인 메탄올에 대한 안정성을 확인하였다. 고정화 되어있지 않은 리파제와 동한 양의 고정화 리파제를 1시간 동안 메탄올로 처리한 후의 활성을 측정한 결과가 그림 22에 나타나 있다. 메탄올을 처리하기 전의 활성을 100%로 놓고, 처리 후의 상대적인 활성을 비교해 본 결과 고정

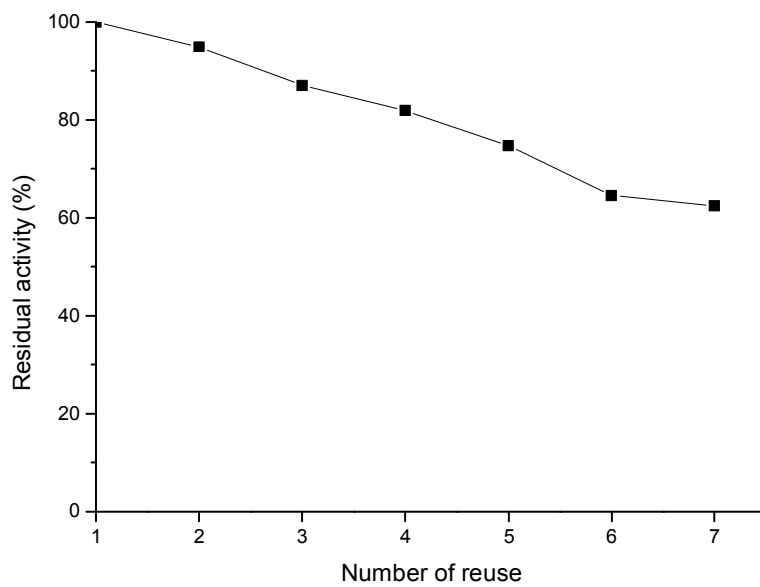


Figure 21. Reusability of the immobilized lipase on the sericin/silica nanoparticles (S25_A90).

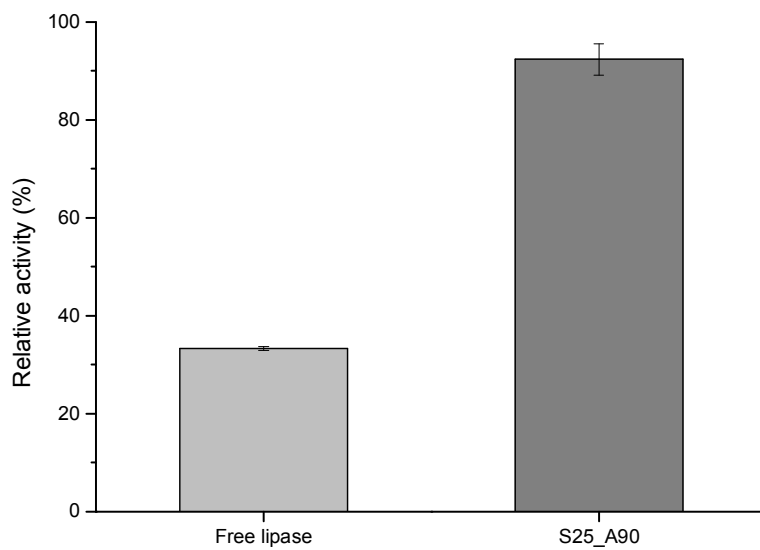


Figure 22. Relative activity of bound lipase on the sericin/silica nanoparticles (S25_A90) and free lipase before and after treatment of methanol for 1hour.

화 되어있지 않은 리파제의 경우 메탄올에 의한 변성이 일어나 활성이 약 30%정도 까지 떨어지는 반면, S25_A90에 고정화 시킨 리파제의 경우 메탄올 처리 후에도 90% 이상의 활성을 유지하는 것으로 보아 바이오디젤 생산에 있어서 메탄올을 알코올로 사용하여도 충분히 에스터 교환반응을 촉매 할 수 있을 것이라고 예측할 수 있었다.

4.6.2 고정화 리파제를 이용한 바이오디젤 생산

S25_A90에 고정화한 리파제를 이용하여 바이오디젤 생산에 이용한 결과가 그림 23에 나타나있다. 먼저 알 수 있었던 사실은 6시간 동안 반응 이후, 메탄올을 첨가하자 다시 반응속도가 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 올리브유와 메탄올의 비가 2:5일 때, 6시간 동안 리파제가 메탄올과 반응했음에도 활성을 잃지 않고 있어 메탄올 추가 첨가로 반응물의 농도가 높아져 다시 반응속도가 빨라졌음을 의미한다. 하지만 최종적으로 24시간 동안 반응을 시켰음에도, 약 15% 정도의 올리브유만이 바이오디젤로 전환되었다. 이는 고정화한 리파제를 이용한 다른 연구에 비하여 매우 낮은 수치인데, 이 결과는 사용한 리파제의 차이에서 비롯된 것으로 보인다. 먼저 본 연구에서 사용한 리파제는 박테리아인 *Candida rugosa*로부터 얻은 리파제로, 물의 존재 하에 기름을 가수분해하여 일부의 유리지방산과 글리세리드 (glyceride)를 만들어 내는 데 효과적인 리파제로 알려져 있다 [20, 62, 63]. 하지만 이 효소만을 이용해 바이오디젤을 생산하게 되면 30시간 동안의 반응 후에도 유리지방산이 메틸에스터로 약 20 %밖에 전환을 못한다고 알려져 있다 [20]. 따라서 본 반응에서의 15% 정도의 전환율이 아주 낮은 수치는 아니라는 것을 알 수 있었다. 하지만 유리지방산을 메틸에스터로 전환시키는

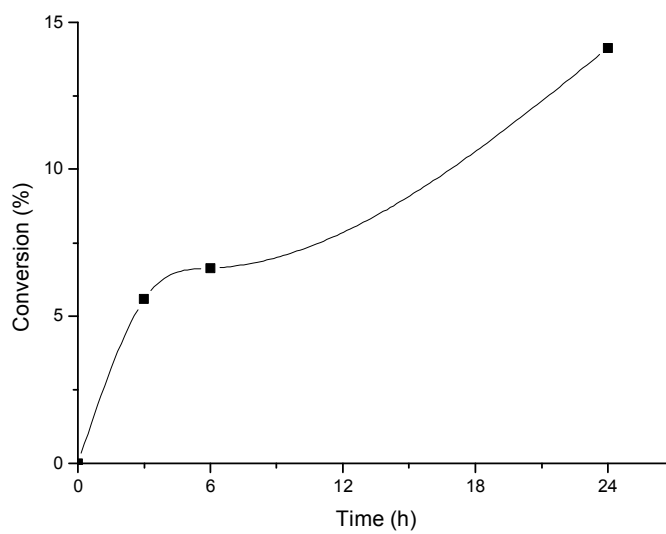


Figure 23. Conversion yield of olive oil using the immobilized *Candida rugosa* lipase on the sericin/silica nanoparticles (S25_A90).

반응을 촉매 할 수 있다고 알려진 *Rhizopus oryzae* 리파제를 함께 고정화하거나, *Pseudomonas cepacia*로부터 얻은 리파제와 같이 바이오디젤을 효율적으로 생산할 수 있다고 알려진 리파제를 고정화한다면 충분히 더 높은 전환율을 보일 수 있을 것이라고 예측할 수 있다 [63, 64].

제 5 장 결 론

본 연구에서는 세리신과 실리카를 이용하여 가장 효율적이고 안정적인 리파제 고정용 지지체를 제조하고자 하였다. APTES의 농도와 세리신의 농도 조건을 다르게 하여 합성되는 나노입자에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 고정화한 리파제의 반복 사용에 대한 안정성을 측정하였고, 실제 바이오디젤로의 응용가능성을 확인하기 위해 고정화한 리파제의 메탄올에 대한 안정성을 측정해 보았고 실제 바이오디젤을 합성하였다. 본 연구에 대한 결론은 다음과 같다.

1. APTES는 실리카의 중합반응에 참여하여 표면에 아민기를 부여할 수 있을 뿐만 아니라 스스로가 실리카 중합을 개시할 수 있는 능력을 가지고 있어, APTES의 농도가 9.0 mM이 될 때까지 실리카의 합성량이 증가하였다.

2. 세리신/실리카 나노입자 합성에 있어서 세리신이 존재하게 되면, 합성된 입자의 크기가 감소하고, 이로 인하여 표면적의 증가를 유도할 수 있었다. 하지만 세리신의 농도가 높아질수록 입자간의 응집 정도가 심해져 오히려 표면적이 감소하고, 표면 아민기의 수가 감소하는 결과를 확인할 수 있었다.

3. 리파제 결합 양과 고정화시킨 리파제의 활성을 고려했을 때, APTES의 농도가 9.0 mM, 세리신의 농도가 0.25 wt%일 때가 가장 최적 합성 조건임을 확립할 수 있었다.

4. 최적 합성 조건에서 제조된 세리신/실리카 복합체에 고정화시킨 리파제의 경우 반복 사용을 하여도 활성이 크게 감소하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

5. 합성한 세리신/실리카 복합체에 고정화한 리파제는 메탄올에 대한 높은 안정성을 갖고 있어 바이오디젤 생산으로의 응용가능성을 확인할 수 있었고, 실제로 올리브유로부터 바이오디젤을 생산해 낼 수 있음을 확인하였다.

본 논문을 통해 세리신과 실리카를 이용해 리파제를 효율적이면서 안정적으로 고정화 할 수 있는 지지체를 제조하였으며, 올리브유로부터 바이오디젤을 합성할 수 있음을 통해 실제 바이오디젤 생산으로의 응용 가능성을 확인할 수 있었다. 하지만 대량으로 합성할 때에 같은 효과를 가질 수 있을지에 대한 추가 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- [1] Kurt Faber, Biotransformations in organic chemistry, Springer-Verlag, Berlin, 5th edn, (2011)
- [2] Sheldon RA, van Pelt S, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chemical Society Reviews*, **42**, 6223-6235 (2013)
- [3] Taylor RF, Protein immobilization: Fundamentals and applications, New York: Marcel Dekker, Inc., (1991)
- [4] Nigam S, Mehrotra S, Vani B, Mehrotra R, Lipase immobilization techniques for biodiesel production: an overview, *International Journal of Renewable Energy & Biofuels*, 2014, **16** (2014)
- [5] Murty VR, Bhat J, Muniswaran PKA, Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **7**, 57-66 (2002)
- [6] Shimada Y, Watanabe Y, Samukawa T, Sugihara A, Noda H, Fukuda H, Tominaga Y, Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76**, 789-793 (1999)
- [7] Hartmann M, Kostrov X, Immobilization of Enzymes on Porous Silicas - Benefits and Challenges, *Chemical Society Reviews*, **42**, 6277-6289 (2013)
- [8] Brady D, Jordaan J, Advances in Enzyme Immobilisation, *Biotechnology letters*, **31**, 1639-1650 (2009)

- [9] Forsyth C, Patwardhan SV, Controlling performance of lipase immobilised on bioinspired silica, *Journal of Materials Chemistry B*, **1**, 1164–1174 (2013)
- [10] Narwal SK, Gupta R, Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase, *Biotechnology Letters*, **35**, 479–490 (2013)
- [11] Hanefeld U, Gardossi L, Magner E, Understanding enzyme immobilisation, *Chemical Society Reviews*, **38**, 453–468 (2009)
- [12] Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B, Enzyme Immobilization by Adsorption: A Review, *Adsorption–Journal of the International Adsorption Society*, **20**, 801–821 (2014)
- [13] Yemul O, Imae T, Covalent–bonded immobilization of lipase on poly(phenylene sulfide) dendrimers and their hydrolysis ability, *Biomacromolecules*, **6**, 2809–2814 (2005)
- [14] Zucca P, Sanjust E, Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms, *Molecules*, **19**, 14139–14194 (2014)
- [15] Katchalski–Katzir E, Kraemer DM, Eupergit (R) C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B–Enzymatic*, **10**, 157–176 (2000)
- [16] Wang YH, Hsieh YL, Enzyme immobilization to ultra–fine cellulose fibers via amphiphilic polyethylene glycol spacers, *Journal of Polymer Science Part a–Polymer Chemistry*, **42**, 4289–4299 (2004)

- [17] Silva JA, Macedo GP, Rodrigues DS, Giordano RLC, Goncalves LRB, Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies, *Biochemical Engineering Journal*, **60**, 16–24 (2012)
- [18] Oh H, Lee KH, Activity and stability of immobilized enzyme on silk sericin bead, *International Journal of Industrial Entomology*, **27**, 329–333 (2013)
- [19] Diaz JF, Balkus KJ, Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **2**, 115–126 (1996)
- [20] Lee DH, Park CH, Yeo JM, Kim SW, Lipase immobilization on silica gel using a cross-linking method, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry-Seoul-*, **12**, 777 (2006)
- [21] Wang YJ, Caruso F, Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation, *Chemistry of Materials*, **17**, 953–961 (2005)
- [22] Xu YQ, Zhou GW, Wu CC, Li TD, Song HB, Improving adsorption and activation of the lipase immobilized in amino-functionalized ordered mesoporous SBA-15, *Solid State Sciences*, **13**, 867–874 (2011)
- [23] Aramwit P, Siritientong T, Srichana T, Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products, *Waste Management & Research*, **30**, 217–224 (2012)

- [24] Oh H, The Effect of Physiochemical properties of silk sericin on the silica synthesis [dissertation]. Seoul: Seoul National University, (2014)
- [25] Mateo C, Grazú V, Pessela B, Montes T, Palomo J, Torres R, López-Gallego F, Fernández-Lafuente R, Guisán J, Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. *Biochemical society transactions*, **35**, 1593-1601, (2007)
- [26] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1451-1463 (2007)
- [27] Hernaiz MJ, Crout DH, Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *Enzyme and microbial technology*, **27**, 26-32 (2000)
- [28] Asraf SS, Gunasekaran P, Current trends of β -galactosidase research and application, *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 880-890 (2010)
- [29] Mateo C, Abian O, Fernández-Lorente G, Pedroche J, Fernández-Lafuente R, Guisan JM, Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment, *Biotechnology Progress*, **18**, 629-634 (2002)

- [30] Wheatley JB, Schmidt Jr. DE, Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports, *Journal of Chromatography A*, **849**, 1–12 (1999)
- [31] Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Biotechniques*, **37**, 790 (2004)
- [32] Gunda NSK, Singh M, Norman L, Kaur K, Mitra SK, Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker, *Applied Surface Science*, **305**, 522–530 (2014)
- [33] Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ, Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **9**, 113–148 (2000)
- [34] Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ, Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, **9**, 113–148 (2000)
- [35] Cao L, Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*, **9**, 217–226 (2005)
- [36] Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas V, Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*,

54, 19–26 (2008)

[37] Xie W, Ma N, Immobilized lipase on Fe₃O₄ nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production, *Energy & Fuels*, **23**, 1347–1353 (2009)

[38] Kimura Y, Tanaka A, Sonomoto K, Nihira T, Fukui S, Application of immobilized lipase to hydrolysis of triacylglyceride, *European journal of applied microbiology and biotechnology*, **17**, 107–112 (1983)

[39] Jeganathan J, Nakhla G, Bassi A, Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase, *Journal of hazardous materials*, **145**, 127–135 (2007)

[40] Salis A, Bhattacharyya MS, Monduzzi M, Solinas V, Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **57**, 262–269 (2009)

[41] de Lima AL, Mbengue A, San Gil RA, Ronconi CM, Mota CJ, Synthesis of amine–functionalized mesoporous silica basic catalysts for biodiesel production, *Catalysis Today*, **226**, 210–216 (2014)

[42] Moreira AB, Perez VH, Zanin GM, de Castro HF, Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica–PVA composite, *Energy & Fuels*, **21**, 3689–3694 (2007)
(2006)

- [43] Kuan IC, Lee CC, Tsai BH, Lee SL, Lee WT, Yu CY, Optimizing the production of biodiesel using lipase entrapped in biomimetic silica, *Energies*, **6**, 2052–2064 (2013)
- [44] Betancor L, Luckarift HR, Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in biotechnology*, 26, 566–572 (2008)
- [45] Otzen D, The role of proteins in biosilicification, *Scientifica*, **2012**, 22 (2012)
- [46] Patwardhan SV, Clarkson SJ, Silicification and biosilicification – Part 4. Effect of template size on the formation of silica, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers*, **12**, 109–116 (2002)
- [47] Mueller WEG, Schlossacher U, Wang X, Boreiko A, Brandt D, Wolf SE, Tremel W, Schroeder HC, Poly(silicate)–metabolizing silicatein in siliceous spicules and silicasomes of demosponges comprises dual enzymatic activities (silica polymerase and silica esterase), *Febs Journal*, **275**, 362–370 (2008)
- [48] Fuchs I, Aluma Y, Ilan M, Mastai Y, Induced crystallization of amorphous biosilica to cristobalite by silicatein, *Journal of Physical Chemistry B*, **118**, 2104–2111 (2014)
- [49] Shchipunov YA, Karpenko TY, Hybrid polysaccharide–silica nanocomposites prepared by the sol–gel technique, *Langmuir*, **20**, 3882–3887 (2004)
- [50] Patwardhan SV, Clarkson SJ, Silicification and biosilicification, *Silicon Chemistry*, **1**, 207–214 (2002)

- [51] Wang S, Xue J, Zhao Y, Du M, Deng L, Xu H, Lu JR, Controlled silica deposition on self-assembled peptide nanostructures via varying molecular structures of short amphiphilic peptides, *Soft matter*, **10**, 7623–7629 (2014)
- [52] Lee KH, Shin BS, Nahm JH, Immobilization of trypsin onto silk fibroin fiber via spacer arms, *International Journal of Industrial Entomology*, **8**, 195–200 (2007)
- [53] Miyairi S, Sugiura M, Properties of β -glucosidase immobilized in sericin membrane, *Journal of fermentation technology*, **56**, 303–308 (1978)
- [54] Secundo F, Conformational changes of enzymes upon immobilisation, *Chemical Society Reviews*, **42**, 6250–6261 (2013)
- [55] Oh H, Lee JY, Kim MK, Um IC, Lee KH, Refining hot-water extracted silk sericin by ethanol-induced precipitation, *International Journal of Biological Macromolecules*, **48**, 32–37 (2011)
- [56] Brinker C, Hydrolysis and condensation of silicates: effects on structure, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **100**, 31–50 (1988)
- [57] Ibrahim IA, Zikry A, Sharaf MA, Preparation of spherical silica nanoparticles: Stober silica, *The Journal of American Science*, **6**, 985–989 (2010)
- [58] Khatib IS, Parish RV, Insoluble Ligands and Their Applications. 1. A Comparison of silica-immobilized ligands and

functionalized polysiloxanes, *Journal of Organometallic Chemistry*, **369**, 9–16 (1989)

[59] Wang S, Xue J, Ge X, Fan H, Xu H, Lu JR, Biomimetic synthesis of silica nanostructures with controllable morphologies and sizes through tuning interfacial interactions, *Chemical Communications*, **48**, 9415–9417 (2012)

[60] Damink LO, Dijkstra P, Van Luyn M, Van Wachem P, Nieuwenhuis P, Feijen J, Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **6**, 460–472, (1995)

[61] Chatterji PR, Gelatin with hydrophilic hydrophobic grafts and glutaraldehyde crosslinkings, *Journal of Applied Polymer Science*, **37**, 2203–2212 (1989)

[62] Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, Fukuda H, Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**, 12–15 (2001)

[63] Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T, Shrestha S, Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **16**, 53–58 (2001)

[64] Lee JH, Lee DH, Lim JS, Um BH, Park C, Kang SW, Kim SW, Optimization of the process for biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases, *Journal of microbiology and biotechnology*, **18**,

1927–1931 (2008)

Abstract

Preparation of Sericin/Silica Nanoparticles for Lipase Immobilization

Yesol Yang
Biomaterials Engineering
The Graduate School
Seoul National University

Lipase has been used as a biocatalyst in various reactions such as hydrolysis, transesterification, and alcoholysis of fatty acid. In this study, sericin/silica nanoparticles were prepared for lipase immobilization supports. The sericin/silica nanoparticles were synthesized using two silica precursors, (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and tetraethoxy-orthosilicate (TEOS). The increase in APTES concentration resulted in an increase of nanoparticles' yield and particle size. In presence of sericin, the product yield was not changed, but the particle size was reduced and the particle uniformity was decreased. In addition, aggregation of particles was occurred when the concentration of the sericin solution was over 0.5 wt%.

The quantity of amino groups was increased when the concentration of sericin was increased up to 0.5 wt% due to the reduced particle size. Although the bound lipase quantity on the sericin/silica nanoparticles was lower than that on the silica nanoparticle, the activity of lipase was higher when the concentration of sericin was 0.25 wt%. Reusability of the immobilized lipase on the sericin/silica nanoparticles were tested. The activity of immobilized lipase was retained even after seven recyclings. Finally, the immobilized lipase on the prepared sericin/silica nanoparticles showed higher stability against methanol than free lipase. Therefore, it can be concluded that the immobilized lipase on the sericin/silica nanoparticles could potentially be utilized in the biodiesel synthesis process.

keywords : lipase, enzyme immobilization, sericin, silica