

## A study of *in situ* immobilization of lipase by using an LC column with aldehyde-silica stationary phase

서우용, 홍선희, 이기세  
명지대학교 환경생명공학과

### Abstract

The *in situ* immobilization of lipase in an LC column with aldehyde-silica stationary phase was optimized. The effects of feed composition, temperature, mobile phase pH and flow rate on immobilization efficiency were investigated. Lipase activity after *in situ* immobilization was compared with free enzyme and batch immobilized enzyme.

### 서론

효소를 이용한 생합성이나 분해반응을 연속적으로 수행하기 위해서는 일반적으로 고정화 반응기를 사용하게 된다. 효소가 고정화된 컬럼을 장기적으로 반복 사용하게 되면 효소의 leaking이나 deactivation 등에 의해 효소의 활성이 감소하게 된다. 활성이 저하된 고정화 칼럼을 복구하기 위해서는 새로 batch 고정화된 효소를 재충진 시키는 것이 일반적이나, 사용하는 컬럼상에서 *in situ* 공정화 시킬 수 있다면 공정의 연속성 확보나 시간 절약 측면에서 장점이 된다. 본 연구에서는 lipase를 aldehyde silica 충전 칼럼에 *in situ* 고정화 시키는 방법을 연구하였다. 반응물인 lipase와 sodium cyanoborohydride의 조성비와 양, buffer pH와 농도, 온도, 유속이 *in situ* 고정화 효율에 미치는 영향을 고찰하여 최적의 *in situ* 고정화 방법을 도출하였다. *In situ* 고정화된 lipase의 tributyrin 가수분해 활성을 free enzyme과 batch 고정화 효소의 활성과 비교하였다.

### 재료 및 방법

본 연구에서는 Sigma사 *Porcine pancrease* lipase를 사용하였으며, 나머지 시약으로는 HPLC grade의 시약을 사용하였다. I.D 15cm 크기의 LC column에 aldehyde-silica를 4g 충전시킨후 lipase-sodium cyanoborohydride 혼합 peristaltic pump를 이용하여 column내로 주입하여 고정화 반응을 수행하였다. 기준 시간 동안에 immobilization된 양을 Shimadzu UV-2401PC Spectrophotometer로 측정하였다. 이 때 feeding 용액의 조성비율, feed 양, pH, buffer 농도, 온도 그리고 실험상의 유속을 각각 변화시키면서 최적조건을 도출하였다. 고정화된 컬럼을 이용하여 lipase

의 활성을 측정 할 때에는 tributyrin이 fatty acid로 가수분해되는 활성을 정량화 하였다.

### 결과 및 고찰

Fig. 1은 시간에 대한 lipase immobilization이 이루어진 양을 측정한 것이다. 일반적인 경향을 보여주는 것으로서 lipase:sodium cyanoborohydride의 비율이 2.5 g/L:0.75 g/L로 pH 7.0, PBS buffer concentration 0.1M 일때의 결과이다. 유속은 1.2 BV/min으로 유지시켰다. 최종적인 lipase의 adsorption된 양은 0.08 g/g silica이었으며, 대략 23시간 이후에 평형에 도달하였다. Fig. 2는 lipase와 sodium cyanoborohydride의 비율에 따른 최적 조건을 찾기 위해 수행되었다. 200mL 용액 중 500-150(mg-mg)의 비율에서 silica에 immobilization된 lipase의 양이 가장 높게 나타났다. Lipase나 sodium cyanoborohydride의 양이 충분치 않거나 필요이상의 양이 들어간 경우에는 오히려 immobilization이 저하되는 것으로 나타났다. Fig. 3에서는 혼합 용액의 pH의 변화에 따른 immobilization된 양을 비교한 것이다. pH 7.0에서 가장 높은 양의 lipase가 immobilization되었다. 온도와 유속의 영향도 최적화하였으며 이렇게 *in situ* immobilization된 lipase의 활성을 free enzyme 과 batch immobilization 경우와 비교하였을 때 batch 조건과 비슷한 활성을 나타내었다.

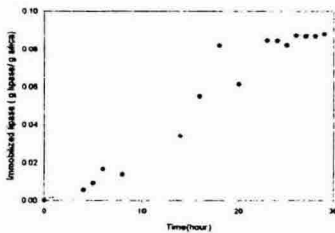


Figure. 1 Time course of in situ lipase immobilization

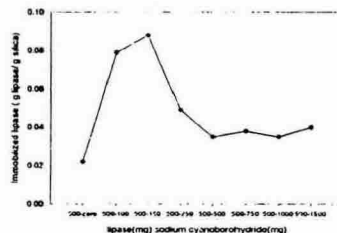


Figure. 2 Effect of feeding reactant composition of 200mL.

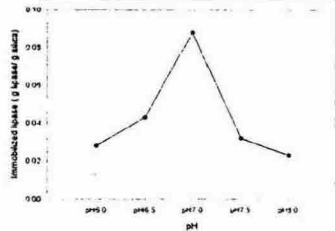


Figure. 3 Effect of feed reactant pH

### 요약

*Porcine pancrease* lipase를 aldehyde-silica에 *in situ* 상태에서 immobilization 할 때의 최적 조건에 대하여 연구하였다. Feed 용액의 조성비율, 양, pH, 온도, 농도, 유속에 대하여 최적화하였으며 lipase의 activity를 측정 비교하였다.