

# 생물공학에서 이온성 액체의 응용

인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터  
하 성호, 이 상현, 이 상목, 구 윤모

## 서론

이온성 액체 (Ionic Liquids)는 두 개의 이온으로 결합된 간단한 용액이다. 소금과 같은 양이온과 음이온이 결합된 화합물은 일반적으로 180°C 이상에서 녹는 것과 달리 이온성 액체는 100°C 이하에서 액체로 존재하며, 상온에서 존재하는 이온성 액체를 특히 상온 이온성 액체 (Room Temperature Ionic Liquids)라 한다. 이온성 액체가 상온에서 안정한 상태로 유지하는 바는 용매, 화학적 전환에서의 유도 물질 등 다양한 화학적 적용을 유도할 수 있다. 이온성 액체는 다음과 같은 특성을 가지고 있다. 우리는 이온성 액체를 상압에서 아주 낮은 증기압으로 존재하여 휘발하지 않아 독성을 줄일 수 있기에 green solvent라 부른다. 그리고, 이온성 액체의 녹는점, 점도, 밀도, 친수/소수성 등 물리적 성질을, 수많은 양이온과 음이온의 결합을 쉽게 조절하여 합성할 수 있으므로 designer solvents라 부른다. 이온성 액체는 용매력이 우수하여 organic, inorganic, polymer 등을 다양하게 녹일 수 있다. 또한, 이온성 액체는 수소, 이산화탄소, 산소 등을 이용한 반응 및 분리 등에 유용한 용매로서 사용될 수 있으며, 현재 초임계 유체에서 이산화탄소, 산소 등을 이용한 반응 및 분리 등에 유용한 용매로서 사용될 수 있으며, 현재 초임계 유체에서 이산화탄소의 유기용매로 사용되고 있다. 마지막으로, 이온성 액체가 아주 낮은 증기압을 가지는 특성을 이용하여 재사용 및 재활용을 쉽게 할 수 있다. 이러한 화학적 특성은 실험실에서 다양한 연구를 진행할 수 있는 장점을 지니고 있다. 이러한 이온성 액체의 특성을 이용하여 최근 몇 년간 이온성 액체를 이용한 다양한 적용과 연구가 이뤄지고 있다. 특히, 이온성 액체의 합성, 분석화학, 전기화학, 화학공정 등에서 다양하게 연구되고 있다.

전 세계적으로 화학 및 석유화학 공정에서 광범위하게 사용되고 있는 휘발성 유기화합물의 사용에 대한 규제가 점차 강화되고 있다. 친환경 시대를 맞아 휘발성 유기화합물을 대체할 수 있는 방안으로는 물, 불소화합물, 초임계 이산화탄소를 사용하는 방법 등으로, 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 물을 용매로 사용하는 경우, 유기기질의 용해도가 매우 낮아 반응속도에 제한적이다. 불소화 용매는 이상계 반응에 응용되고 있으나, 높은 반응온도에서 여러 가지 불소 화합물이 부가적으로 생성되어 독성을 지니는 경우가 있다. 그리고, 초임계 유체인 경우에도 장치비용이 많이 드는 단점이 있다. 이러한 친환경적 요구와 Sustainable Technology 개념에 부합하는 에너지 절약용 용매 개발이 절실하다.

이에 따라 원유가 상승을 대비한 석유화학제품의 대체 생산공정 개발과 전지 및 연료전지 용 비수용 차세대 전해질 소재의 개발에 이온성 액체가 각광을 받고 있다. 석유화학에서 는

이온성 액체를 이용하여 유해물질인 황과 인을 원유로부터 제거하는데 응용이 가능할 것 이다. 제약 산업에서는 이온성 액체를 이용하여 신약을 제조하고 분리하는 시도가 진행 중 이다. 정밀화학 산업에서는 화합물 합성에서 이온성 액체를 용매로써 다양하게 사용할 수 있 다. 화학촉매인 경우는 높은 가격과 독성으로 인하여 사용이 제한적이거나, 이온성 액체는 폐 수 및 촉매의 제거 없이 분리할 수 있으며, 낮은 가격과 낮은 독성을 지니는 장점이 있다.

이상적인 청정용매는 화학적/물리적으로 안정하고, 독성과 휘발성이 없어야 한다. 또한, 여 러 가지 물질에 대한 용해력이 우수하고, 회수 및 재활용이 용이해야 한다. 이런 조건에 부 합되는 청정용매는 이온성 액체라 할 수 있을 것이다.

이온성 액체는 생촉매 반응, 분리, 효소 고정화 등 생물공학 분야의 응용에서도 이상적인 용매이다. 일반적으로, 이온성 액체를 이용한 생물반응공정은 세 종류로 분류할 수 있다. 이 는 이온성 액체 자체를 이용한 방법, 그리고 수용액상에서 보조 또는 공유 용매로서 이온성 액체, 마지막으로 수용액과 이상계 또는 다상계 시스템을 이용하는 방법이다. 이와 같은 이 온성 액체의 성질을 이용하여 생물공학에서 응용과 분리공정에 대한 응용에 대해 알아보고 자 한다.

## 생물공학 분야에서 이온성 액체의 적용

### 이온성 액체를 이용한 단백질 folding/refolding

유전자 재조합 기술의 발달과 더불어 산업적으로 유용한 단백질을 대량으로 생산하기 위한 목적으로 미생물을 이용한 재조합 단백질 형태의 유용 유전자 산물을 대량 생산하는 시도가 많이 이루어지고 있다. 이러한 이유로 대장균을 이용하여 단백질 생산을 위한 고농도의 세 포 배양 기술이 개발되고 있고, 이러한 기술은 재조합 단백질 생산에 가장 많이 이용되고 있다. 그러나, 이와 같이 미생물을 이용하여 재조합 단백질을 대량 생산하는 경우 단백질의 3차 구조와 관련된 문제가 있다. 즉, 대장균에서 생산된 상당수의 재조합 단백질들이 활성 이 없는 형태로 응집된 내포체(inclusion body)로 존재하는 경우가 흔히 발생한다. 현재, 재 조합 단백질의 생산에 있어서, 상기의 내포체 형태로 발현되는 재조합 단백질을 활성을 가 진 단백질로 회수하는 재접힘(refolding) 기술이 많이 개발되었다. 이러한 재접힘 공정은 변 성제(denaturant)를 이용한 내포체의 풀림(unfolding) 단계와 단백질의 올바른 접힘 유도를 위한 변성제 제거 공정으로 구성된다.

상기 변성제의 제거 방법에 따라 단순 희석, 단계적 희석, 유가식 희석, 투석, 겔 여과 크 로마토그래피 등의 방법이 사용되고 있다. 종래 보고된 연구결과에 의하면 단백질 재접힘을 위한 재접힘 버퍼로서 상기 요소가 포함된 재접힘을 위한 재접힘 버퍼 중에 이온성 액체로 서 0.54M의 질산 에틸암모늄(ethylammonium nitrate)을 첨가제로 사용하여 라이소자임의 재접힘 효율을 90%까지 향상시킨 보고가 있다.

## 이온성 액체의 독성

환경적 측면에서 이온성 액체는 청정 용매로서 흥미로운 물질이다. 청정용매로서 흥미로운 물질이다. 청정 용매라 불리는 이유는 아주 낮은 증기압 때문인데, 실질적으로 미생물, 동물, 사람이 섭취 또는 접촉했을 때 독성을 갖는가에 대한 연구도 이뤄져야 한다. 특히 생물공학 분야에서 이온성 액체는 이상계 내 생전환 기술에의 적용이 먼저 이뤄지고 있다. 이는 유기 용매를 대체하고, 이온성 액체를 이용함으로써, 환경친화적인 공정으로 대체해 나가는 방향에 맞춘 연구들이 활발히 진행되고 있기 때문이다. 이는 추후 미생물 배양에서 생산과 분리를 동시에 적용 가능할 것으로 판단하고 있다. 그러므로, 미생물 및 식물, 동물 세포에 이온성 액체가 미치는 독성에 대한 분석이 필요한 실정이다.

Lactic acid 생산에 있어, *Lactobacillus rhamnosus*를 이용하여 배양하고, 여기에 약간의 이미다졸륨 계열의 이온성 액체를 첨가하여 유기 용매와 독성 테스트를 비교 분석하였다. 이러한 공정들의 목적은 연속적으로 수용액 내에서 비수용성 생산물질을 분리해 내는 데 있다. 이온성 액체 중 메틸 과 에틸 이미다졸륨 계열을 이용하여 쥐의 백혈병 세포와 *Caenorhabditis elegans*에서 독성 분석을 실시하였다. 그리고, 이를 전통적인 유기 용매인 아세톤, acetonitrile, 메탄올, methyl t-butyl ether의 독성과 비교하였다. 이 중 이온성 액체 음이온 종류에 따른 독성의 영향은 없는 것으로 나타났으며, 양이온의 알킬사슬 길이에 따라 독성 영향이 나타나고 있음을 밝혀냈다. 현재, 이온성 액체의 독성에 대한 연구는 많지 않고, 모든 이온성 액체를 대상으로 분석한 결과도 없다. 가장 많이 사용되고 있는 이미다졸륨 계열중 일부만이 독성 분석이 되어있는 실정이다. 이온성 액체가 미생물 또는 세포를 포함한 배양액 내에 존재하면서 산물을 분리해 내고자 한다면, 보다 더 체계적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단한다.

## 생물반응에서 이온성 액체

이온성 액체를 이용하여 많은 연구가 이뤄져 왔으나, 대부분 화학공정 분야에 국한되어 있다. 특히, 전기화학, 석유화학, 촉매반응 등에 많은 연구가 진행되고 있다. 생물화학공학 및 생물공정에 이온성 액체를 응용한 예는 많지 않다. 그 중 생물공학에 이온성 액체를 사용해서 가장 많이 연구된 분야는 효소반응에 용매로서 이용한 연구이다. 이는 이온성 액체의 높은 용매력에 기인하는 것이다. 이온성 액체를 이용한 효소 반응에 대한 연구를 Table 3에 나타내었다. 특히, 효소 중 lipase를 이용한 효소반응에 가장 많은 연구가 이뤄지고 있다 (Table 3). Lipase의 기질은 일반적으로 지방이며 소수성인 물질들이다. 단백질인 lipase는 수용액 상에 존재하는 친수성이기 때문에 전통적인 효소반응 방법들도 유기용매를 첨가하는 방식으로 연구가 진행되어 왔다. 이러한 효소반응에서 사용되는 유기용매의 대체물질로서 이온성 액체를 이용한 연구가 진행되고 있다.

한예로 lipase를 이용하여 거울상 이성질체를 선택적으로 합성하였으며, trans-에스테르화 반응, 에스테르화 반응 등이 주를 이루고 있다. 이온성 액체 내에서 효소 *Candida antarctica* lipase B를 이용하여 1-Phenyethanol을 비닐 아세테이트와 함께 trans-에스테르

화 반응시켰다. 이미다졸륨 계열의 이온성 액체를 이용하였으며, 3회 재사용시 활성도가 10% 낮아지는 것을 관찰하였으며 거울상 이성질체 활성은 떨어지지 않았다. 포항공대의 김만주 교수팀은 *Candida rugosa* lipase를 이용하여 methyl glucosides와 비닐 아세테이트의 선택적 acylation을 실시하여 반응의 효율성을 증대시켰다. Chiappe에 의하면 에폭사이드 가수분해효소를 이용하여 에폭사이드들의 이성질체를 선택적으로 가수분해하는 것을 발견했다. 이온성 액체 내에  $\beta$ -galactosidase를 포함하는 이온성 액체를 이용하여 효소의 활성 및 안전성을 높였으며, 이를 이용하여 N-acetyllactosamine을 합성하였다.

## 생물물질 분리에서 이온성 액체

생물분리는 생물체의 배양에서 얻어지는 발효액, 또는 천연 생물체부터 얻어지는 목적산물을 분리, 정제하는 기술을 통틀어 말한다. 대부분의 목적산물들은 생체에서 전형적으로 볼 수 있는 유사한 물질들과 오염물질을 포함하는 용액상태로 존재한다. 생물공학제품은 고순도 및 생물학적 활성을 갖기 위한 정확한 3차 및 4차 구조를 유지해야 하기 때문에 분리정제 과정에서 기존의 화학공업에서 사용하지 않았던 새로운 기술들이 필요하게 된다. 근래 들어 단백질 회수를 위한 folding/refolding, 효율적인 분리를 위한 분자생물학적인 one-step 분리 공정 및 키랄 분리 등의 연구가 진행되고 있다. 이에 새로운 대체 용매로서 이온성 액체를 이용하고자 하는 시도들도 미약하게나마 이뤄지고 있다.

## 생물물질 분리에서 크로마토그래피와 이온성 액체

화학공학에서 이뤄지는 분리에서부터 착안하여 생물물질 분리 연구들이 선행되고 있다. 일반적으로 생물물질 분리에서 후반 공정에서 사용되는 것이 크로마토그래피 기술이다. 크로마토그래피 내에서 이온성 액체를 이용한 생물공학적인 연구도 다양하게 진행되고 있다. 중국인들이 즐겨먹는 Shiitake 버섯에는 포름알데하이드가 아주 소량 포함되어 있다. 유독성인 포름알데하이드 제거를 위한 분석에서 이온성 액체를 크로마토그래피에 이동상에 첨가하였고, 포름알데하이드가 효율적으로 분리되는 것을 확인하였다.

Capillary zone electrophoresis에 이온성 액체와  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD)을 이용하여 중국산 허브에 있는 anthraquinone 류를 분리하는 연구를 진행하였다. Capillary 벽면에 이미다졸륨을 코팅하면 컬럼 벽면은 양극성을 띄게 된다. 그 예로 capillary 벽면에 이미다졸륨을 코팅하여,  $\beta$ -CD 안으로 anthraquinone이 들어갈 수 있게 하고,  $\beta$ -CD와 함께 분리해 내었다. 이를 이용하여 라이소자임, 사이토크롬 등을 효율적으로 분리하였다. 또한 Qin에 의하면 디알킬이미다졸륨을 capillary 벽면에 코팅하여, 인간 혈청에서 UK-103, 320과 sildenafil을 분리하였다.

Thin-layer 크로마토그래피(TLC) 시스템에서 이동상에 이온성 액체를 첨가로 사용하여, 여러 단백질 분리에 응용하였으며, 이온성 액체를 첨가하지 않았을 때보다 많게는 2배, 적게는 0.5배의 분리 효율을 보였다.

## 생물분리에서 이상계와 이온성 액체

생물공학에서 일반적으로 이상계를 이용하여 많은 물질들을 분리하고 있다. 이온성 액체의 경우에도 물과 이온성 액체의 이상계 시스템을 이용하여 생물물질을 분리하고 있다. [Bmim][PF6]를 이용하여 이상계 내에서 flavylum salt의 특성을 규명했다. 그리고, 두 항생제(amoxicillin, ampicillin)를 분리하는 연구도 상온에서 [Omim][BF4]와 물의 이상계를 이용하여 생물반응기 내에서 이상계를 구축하였으며, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas aromticivorans* 등의 미생물을 이용하여, 페놀 400mg/l을 효과적으로 분리하는 데 성공하였다. 이온성 액체를 이용한 다상계 시스템에서 항생제인 erythromycin-A를 분리해내기도 하였다.

## 기타 생물분리방법과 이온성 액체

생물공정에서도 초임계 유체 CO<sub>2</sub>를 이용한 생물물질 분리 연구가 이뤄지고 있다. 초임계 유체에 효소인 lipase를 넣어 이성질체를 선택적으로 생전환하는 연구를 진행하여, laury ester와 (S)-2-octanol을 효과적으로 분리하였다.

일반적으로 이온성 액체를 이용하여 액-액 추출이 가장 많이 연구되어 왔다. 이에 추가적으로 이온성 액체를 액체 막여과에서 매체로서 사용하는 연구를 진행했으며, 여러 유기 용매 및 아미노산들이 효율적으로 분리됨을 알게 되었다. 막여과시스템에 효소인 lipase를 포함하여 생물반응기로 응용 하였으며, 기질도 효율적으로 산물로 생전환시키면서 동시 반응, 분리를 구현하였다.

이온성 액체는 낮은 증기압으로 인해 다른 물질과 분리가 쉽다. 즉, 증류를 통하여 다른 물질들을 분리해 낼 수 있다. 그러나, 물질들 중에는 이온성 액체와 비슷한 낮은 증기압을 가지고 있는 물질들이 있다. 이런 물질들을 분리하기 위한 연구로서 나노막을 이용하여 이온성 액체와 락토오스, Bromophenol blue의 분리 시도하였으며, 효율적으로 이온성 액체를 포함한 물질들을 분리해냈다.

## 나노생물공학에서 이온성 액체의 응용

생물공학에서 이온성 액체의 응용을 위해서는 해당 조건에 대한 보다 많은 정보가 필요하다. 나노 환경에서 미생물 및 세포에 이온성 액체가 미치는 영향과 세포와의 작용 등을 파악해야 한다. [Bmim][Cl]를 *Bacillus subtilis*의 표면에 부착하는 연구가 진행되었다. 이온성 액체의 독성은 이온세기, pH 등의 변화에 따른 부착효과를 검토하여, 이온 세기에 따라 영향을 받으며, pH에는 영향을 받지 않는다고 발표했다.

또한, Trewyn는 이온성 액체와 실리카를 이용하여 나노 분자를 제작하였다. 나노 분자는 이미다졸륨의 알킬 체인을 변형시킴으로써 구형, 원통형, 튜브형 등 다양하게 만들어낼 수 있었다. 이 나노분자에서 이온성 액체를 분비해 *Escherichia coli* K12의 antibacterial agent로서 효율적으로 작용하는 것으로 판명됐다. 나노분자 속에 있는 이온성 액체의 분비를 효과적으로 조절함으로써, 향균 물질로서 작용하도록 유도한 시스템이다.

효소반응도 나노 규모의 효소와 기질들이 반응하는 것이다. 효소와 섬유소 막에 이온성 액체를 이용하여 안전성을 높이는 연구가 진행되었다. 섬유소 막에 효소인 laccase를 고정화하고, 이온성 액체를 첨가하여 효소활성을 1.6배 높였다. 그리고, 이온성 액체를 첨가한 활성막은 높은 안전성을 보이는 것으로 확인되었다.

## 요약

현재 석유화학 및 화학분야에서 이온성 액체를 이용한 많은 연구가 이뤄지고 있다. 휘발성 유기용매의 대체 물질로서 각광을 받고 있는 이온성 액체는 최대 250억불 이상의 시장을 형성할 것으로 기대된다. 위에서 말한 바와 같이 생물공학 분야에서도 이온성 액체를 이용한 연구가 시작되어 용매로 사용하는 방법, 분리매개체로서 사용하는 방법 등 다양하게 이용되고 있다. 이러한 이온성 액체는 효소의 활성, 안전성을 증대시킬 뿐 아니라, 분리 과정도 손쉽게 실현할 수 있다. 또한, 환경적 측면과, 경제적인 측면을 고려하여 청정용매로 널리 사용할 수 있을 것이다. 앞에서 말한 바와 같이 생물공학에서 이온성 액체의 응용 가능성은 무한하다 볼 수 있다. 또한, 나노공학과 생명공학을 접목시키는 분야에서도 널리 이온성 액체가 쓰일 수 있을 것이다. 유럽과 미국에서는 주로 청정용매로서의 응용에 대한 연구를 활발히 하고 있다. 이러한 전 세계적인 연구의 활성화에 비하여 국내 상황은 대학 및 연구소에서 산발적으로 연구가 진행되고 있는 수준이다. 이에 국내에서도 이에 대한 관심과 더불어 정부 및 기업체, 대학 및 연구소에 의한 컨소시엄을 형성하여 보다 체계적인 연구지원이 이뤄져야 할 것이다.