

# 이온성 액체에서의 효소반응

인하대학교 초정밀생물분리기술연구소

이상현, 하성호, 구윤모

## 1. 서론

지난 20년간 물이 아닌 비수(nonaqueous) 용매에서의 효소반응에 대한 연구는 광범위한 분야에서 진행되었고, 그 중요성과 응용성은 학문적으로나 산업적으로 엄청난 파급효과를 불러일으켰다. 가장 많은 연구가 진행된 유기용매에서의 효소반응은 물에서의 효소 반응에 비하여 산업적으로 다양한 장점을 지닌다. 유기용매에서 효소는 (1) 화학평형에 의해서 물에서는 불가능한 다양한 반응을 수행할 수 있고, (2) 물에 녹지 않는 소수성(hydrophobic) 물질로 반응을 진행할 수 있고, (3) 기질에 대한 선택성이 높고, (4) 장시간 고온에서 사용시에도 안정성이 높고, (5) 부반응을 억제하면서 반응을 진행할 수 있고, (6) 미생물에 의한 오염의 걱정이 없다. 하지만, 이러한 장점에도 불구하고 유기용매는 휘발성이 높고, 환경적으로 유해하여 이를 대체할 수 있는 용매를 찾고자 하는 노력이 진행되었다. 2000년 들어서 본격적으로 연구되기 시작한 것이 이온성 액체(ionic liquid)를 용매로 이용하는 비수계 효소반응인데, 이온성 액체를 이용하면 유기용매를 이용했을 때의 다양한 장점을 지님과 동시에 더욱 우수한 효소의 반응성, 선택성, 안정성을 나타낸다. 여기서는 이온성 액체에서의 효소반응의 보고된 예를 통해서 이온성 액체의 용매로서의 장점과 단점에 대하여 알아보고, 이러한 반응의 앞으로의 전망에 대하여 간단히 소개하고자 한다.

## 2. 이온성 액체의 특성

그림1은 효소반응에 주로 이용되는 이온성 액체를 나타낸 것으로, 일반적으로  $[BF_4]$ ,  $[PF_6]$ ,  $[Tf_2N]$  음이온을 가지는 1,3-dialkylimidazolium 계열이 가장 많이 이용되고 있다.

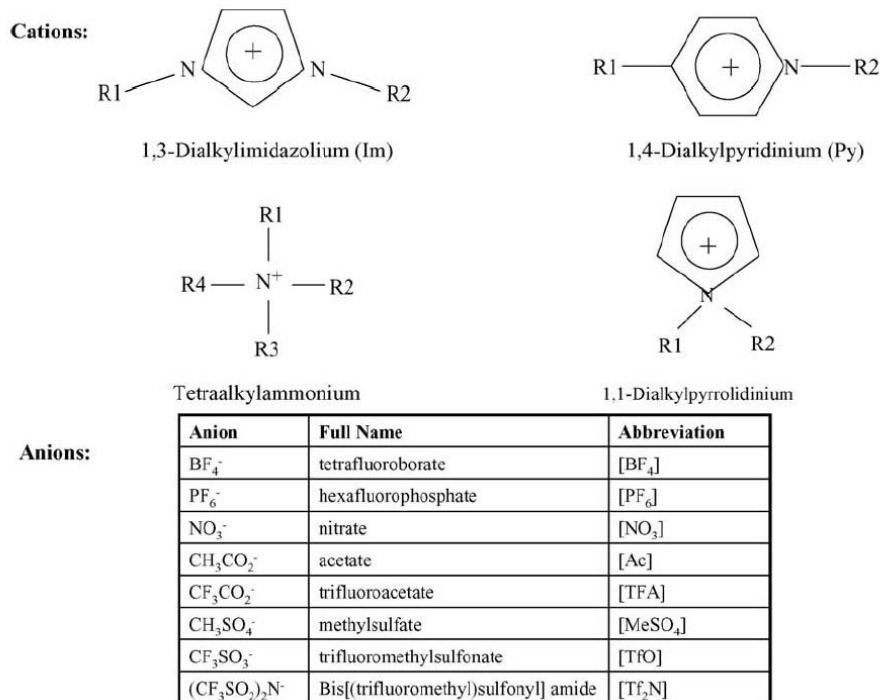


그림 1. 효소반응에 주로 이용되는 이온성 액체

이온성 액체의 가장 특별한 성질 중의 하나는 높은 극성(polarity)이다. Reichardt's dye에 의해서 측정된 이온성 액체의 polarity scale ( $E_T^N$ )은 보통 0.6-0.7 정도의 범위이며, 짧은 체인의 알코올이나 포름아마이드의 극성과 비슷하다. 일반적으로 이러한 범위의 극성을 가지는 무수(anhydrous) 유기용매에서 효소는 불활성화(inactivation) 되어 반응을 수행할 수 없는 문제점이 있으나, 이온성 액체에서는 효소의 불활성화가 거의 없으며 오히려 더 안정적이라는 것이 보고되었다. 이는 친수성(hydrophilic)의 기질로 반응을 수행하기 위해서 극성이 높은 유기용매를 쓰면 효소가 불활성화되는 현재까지 해결하지 못한 문제를 쉽게 극복할 수 있는 이온성 액체의 우수한 특성이다. 예를 들어, 포도당, 과당과 같은 당류, 펩타이드와 같은 친수성 기질을 이용하는 효소반응을 수행하기 위해서 극성이 높은 유기용매를 사용하면 효소가 불활성화 되어 수율이 낮은 반면에 이온성 액체는 친수성 기질을 과량으로 녹이면서도 효소의 활성을 그대로 유지하는 장점을 지닌다. 또한, 이온성 액체는 높은 극성을 지님에도 불구하고, 다양한 친수성 뿐 아니라 소수성의 유기물, 무기물,

고분자를 녹일 수 있는 특성을 나타낸다. 대부분의 이온성 액체가 높은 극성을 나타냄에도 불구하고, 이온성 액체의 물에 대한 용해도는 다양하게 존재한다. 이온성 액체와 물의 상호 용해도는 주로 음이온에 따라서 결정이 되는데, 일반적으로 [Ac], [NO<sub>3</sub>], [TFA], [MeSO<sub>4</sub>] 음이온을 지니는 이온성 액체는 물에 잘 용해된다. 이러한 물에 잘 녹는 이온성 액체는 주로 물에서의 효소반응에서 부반응을 억제하여 수율을 향상시키고 효소의 선택성을 높이기 위한 cosolvent로 이용될 수 있다. [BF<sub>4</sub>], [TfO] 음이온을 지니는 이온성 액체는 양이온의 체인 길이에 따라서 물에 대한 용해도가 결정이 되며, 양이온이 짧은 이온성 액체는 cosolvent로 이용될 수 있고, 무수 이온성 액체로 효소반응을 진행하는데에도 이용된다. [Tf<sub>2</sub>N], [PF<sub>6</sub>] 음이온을 지니는 이온성 액체는 물에 거의 녹지 않고, 물에 대한 용해도가 대략 1% 미만이기 때문에 물과의 이상계를 형성하여 반응을 진행하는 경우에 이용될 수 있고, 무수 이온성 액체에서의 효소반응에 가장 많이 이용되고 있다. 대부분의 이온성 액체는 소수성의 유기용매에 거의 녹지 않는데, 이러한 특성을 이용하여 이상계(two-phase)나 다상계(multi-phase)를 이용한 효소반응에 대한 연구도 보고되어 있다.

### 3. 이온성 액체에서의 효소반응

이온성 액체를 이용한 효소반응은 순수한 무수의 이온성 액체를 반응 매질로 이용하는 방법, 수용액 시스템에서 cosolvent로 이용하는 방법, 이온성 액체와 물 또는 유기용매의 이상계를 이용하는 3가지 방법으로 분류할 수 있다. 약 20년 전 ethylammonium nitrate와 물의 혼합물에서 alkaline phosphatase의 반응을 수행한 것이 거의 최초의 시도였으나, 순수한 이온성 액체에서의 효소반응에 대한 보고는 비교적 최근인 2000년 Erbedinger에 의해서 이루어졌다. 그 이후 유기용매를 대체하기 위한 이온성 액체의 이용에 대한 연구가 본격적으로 시작되었으며, 현재까지도 다양한 효소반응에 대한 결과가 보고되고 있다. 표1은 현재까지 보고된 이온성 액체에서의 효소반응의 예를 나타낸 것이다.

표 1. 이온성 액체에서 효소반응의 예

Biocatalyst	Reaction	Ionic liquid
Lipase	Transesterification	[BMIm]PF <sub>6</sub>
	Alcoholysis, ammoniolysis, perhydrolysis	[BMIm][PF <sub>6</sub> ], [BMIm][BF <sub>4</sub> ]
	Kinetic resolution of chiral alcohols	[BMIm][Tf <sub>2</sub> N]
	Resolution of amino acid ester	[EPy][BF <sub>4</sub> ], [EMIm][BF <sub>4</sub> ]
	Kinetic resolution of <i>P</i> -chiral hydroxymethanephosphinates	[BMIm][PF <sub>6</sub> ]
	Esterification of carbohydrates	[MOEMIm][BF <sub>4</sub> ]
	Synthesis of polyesters	[BMIm][PF <sub>6</sub> ]
Alcohol dehydrogenase	Enantioselective reduction of 2-octanone	[BMIm][Tf <sub>2</sub> N]
Thermolysin	Synthesis of <i>Z</i> -aspartame	[BMIm][PF <sub>6</sub> ]
$\alpha$ -Chymotrypsin	Transesterification	[EMIm][Tf <sub>2</sub> N], [MTOA][Tf <sub>2</sub> N]
Esterase	Transesterification	[BMIm][PF <sub>6</sub> ]
Subtilisin	Resolution of amino acid ester	[EPy][TFA]-H <sub>2</sub> O (15:85, v/v)
$\beta$ -Galactosidase	Synthesis of <i>N</i> -acetylglucosamine	[MMIm][MeSO <sub>4</sub> ]-H <sub>2</sub> O (25:75, v/v)
Peroxidase	Oxidation of guaiacol	[BMIm][PF <sub>6</sub> ]
Laccase	Oxidation of anthracene	[BMIm][PF <sub>6</sub> ]
Formate dehydrogenase	Regeneration of NADH	[MMIm][MeSO <sub>4</sub> ]-H <sub>2</sub> O (25:75, v/v)
Baker's yeast	Enantioselective reduction of ketones	[BMIm][PF <sub>6</sub> ]-H <sub>2</sub> O (10:1)
Lactobacillus kefir cells	Asymmetric reduction of 4-chloroacetophenone to ( <i>R</i> )-1-(4-chlorophenyl)ethanol	[BMIm][PF <sub>6</sub> ], [BMIm][Tf <sub>2</sub> N], [OMA][Tf <sub>2</sub> N]

### 3.1 Lipase

현재까지 보고된 이온성 액체에서의 효소반응은 대부분은 lipase를 이용하였다. Lipase는 유기용매에서 효소반응을 진행하는 대표적인 효소로서, 본래의 기작은 물과 oil의 계면에서 oil을 가수분해하여 영양분으로 이용되도록 하는 것이다. 무수의 유기용매에서 lipase는 매우 안정적으로 존재하며 가수분해의 역반응인 esterification을 촉매화하는 산업적으로 매우 유용한 효소이다. Sheldon은 무수의 이온성 액체에서 lipase 반응을 처음으로 수행하여 [Bmim][PF<sub>6</sub>]와 [Bmim][BF<sub>4</sub>]에서 *Candida antarctica* 유래 lipase의 반응성이 일반적인 유기용매와 비슷하다는 것을 보고하였다. Lipase를 이용하는 산업적으로 가장 유용한 반응은 라세믹 화합물 (racemate)의 광학분할이다. 대표적으로 1-phenylethanol 유도체의 광학분할이 여러 그룹에 의해서 보고되었는데, 다양한 이온성 액체에서 반응을 수행한 결과 기존의 유기용매에서 보다 선택성과 반응성이 향상되고, 효소의 안정성이 높게 유지되었다.

### 3.2 Protease

Erbeldinger는 thermolysin을 이용하여 이온성 액체에서 dipeptide *Z*-aspartame를

생산하였는데, 일반적으로 이용되는 유기용매인 ethylacetate에서의 반응과 비교하여 반응성이 비슷하고, 효소의 안정성이 매우 우수하다는 것을 보고하였다.  $\alpha$ -Chymotrypsin을 이용한 이온성 액체에서의 반응으로는 *N*-acetyl-L-amino acids ethyl ester의 transesterification이 수행되었는데, 반응성은 유기용매에서와 비슷한 정도로 측정되었고 생산물의 안정성이 유기용매에서 보다 향상되어 수율이 증대되었다.

### 3.3 Oxidoreductases

이온성 액체에서의 반응은 주로 가수분해 효소에 대한 것이 많이 보고되어 있는 반면, 산화환원 효소의 활성화에 대한 연구는 상대적으로 적다. 이온성 액체에서 산화환원효소인 peroxidase와 laccase가 활성을 지닌다는 것은 보고되어 있으나, 반응성이 매우 낮은 것으로 알려져 있고, 주로 이온성 액체와 물 또는 buffer의 혼합물을 이용한 반응이 보고되고 있다. *Candida boidinii* 유래의 formate dehydrogenase가 [Mmim][MeSO<sub>4</sub>]와 buffer의 혼합물에서 매우 안정적으로 활성을 나타낸다는 것이 보고되었다.

### 3.4 이온성 액체의 불순물

이온성 액체에 포함되는 주된 불순물은 물과 halide 이온이다. 대부분의 이온성 액체는 흡습성이 강하여 포함되어 있는 물의 양이 쉽게 변할 수 있다. 물의 양이 이온성 액체에서 중요한 이유는 순수한 이온성 액체가 지니는 극성, 점도, conductivity 등이 매우 적은 양의 물에 의해서도 쉽게 변할 수 있기 때문이다. 또한, 무수 용매에서 효소반응을 진행함에 있어서 물은 효소의 구조를 안정적으로 활성을 띄도록 유지시킬 수도 있고, 불활성화시킬 수도 있는 매우 중요한 인자이다. 무수의 이온성 액체에서의 효소반응에서도 물은 매우 중요한 역할을 하며, 포함된 물의 양에 의해서 효소의 활성은 크게 변한다. 한편, 이온성 액체에는 합성과정에 중간체로 이용한 halide 이온을 포함하는 이온성 액체가 완전히 제거되지 않고 존재할 수 있으며, halide 이온의 함량은 효소의 활성에 많은 영향을 미친다.

이러한 두가지의 불순물에 대한 영향을 이해하지 못하여 매우 상반되는 효소반응 결과가 다른 연구 그룹에 의해서 자주 보고되고 있는데, 이는 이온성 액체의 순도가 효소반응에 있어서 얼마나 중요한지를 인지하지 못하였기 때문이다.

#### 4. 전망

이온성 액체를 효소반응을 위한 반응매질로 이용하면 유기용매가 지니는 위험성과 유독성을 극복할 수 있다는 근본적인 장점 외에 효소의 활성, 선택성, 안정성 증대라는 부가적인 효과를 얻을 수 있다. 그러나, 이온성 액체를 반응매질로 이용한 시스템을 산업화하기 위해서는 극복해야할 점들이 몇가지 있다. 첫째, 일반적으로 이온성 액체는 유기용매에 비하여 점도가 높다. 보통의 이온성 액체가 25°C에서 35-500cp의 점도를 지니는데, 톨루엔이 0.6cp, 물이 0.9cp인 점을 비교할 때 매우 높은 값을 알 수 있다. 높은 점도는 작동환경을 어렵게 하고 물질전달의 한계를 극복해야하는 문제를 유발한다. 하지만, 점도가 낮은 이온성 액체가 계속 보고되고 있기 때문에 이러한 문제는 조만간 쉽게 해결될 것으로 보인다. 둘째, 이온성 액체의 합성 과정에서 포함되는 불순물은 효소반응을 진행함에 있어서 많은 영향을 미쳐서 재현성이 떨어지게 만든다. 주로 포함되는 halide 계열의 불순물은 특히 효소의 활성을 많이 감소시키므로 순수한 이온성 액체를 합성할 수 있는 기술이 중요하다. 현재는 halide 계열의 불순물이 포함되지 않도록 합성하는 방법과 크로마토그래피를 이용한 정제방법이 보고되어 있으므로 해결하기 어려운 문제는 아니라고 생각한다. 셋째, 이온성 액체에서 효소반응을 진행한 후 남아있는 반응물과 생성물을 추출하기 위한 방법의 개발이다. 이러한 목적으로 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용하는 친환경적인 방법이 최근 개발되었지만, 이온성 액체를 반응매질로 하는 효소공정이 완전히 친환경적인 시스템이 되기 위해서는 추출공정을 위해 다시 사용하게 되는 유기용매의 양을 감소시키는 더 많은 연구가 필요하다.

## 참고문헌

- Kragl U., Eckstein M., and Kaftzik N. (2002) Enzyme catalysis in ionic liquids. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 565–571.
- Park S. and Kazlauska R. J. (2003) Biocatalysis in ionic liquids—advantages beyond green technology. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 432–437.
- Yang Z. and Pan W. (2005) Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 19–28.