

## 담체의 첨가에 의한 유기용매내에서의 효소반응성 증진

김민곤, 이선복  
포항공과대학교 화학공학과

### Improvement of the Enzymatic Esterification in Organic Solvent by Support

M. G. Kim, S. B. Lee  
Department of Chemical Engineering, POSTECH

#### 서론

유기용매내에서의 생촉매의 사용은 소수성의 반응기질을 사용할 수 있고 화학평형을 합성쪽으로 유도할 수 있다는 점 등 기존의 수용액상의 효소반응이 보유하지 못한 특성에 의해 최근 10년동안 폭넓게 연구되어 왔다<sup>1, 2</sup>. 그러나 유기용매내 효소반응에 있어서 가장 큰 문제점은 반응속도가 떨어지는 경우가 많다는 점이다. 유기용매내에서 효소를 사용할 경우 수용액에서와 같이 용해상태가 아닌 powder 상태로 촉매작용을 하기 때문에 external diffusion limitation에 의해 반응속도가 수용액에서 반응하는 경우에 비해 크게 떨어지는 문제점이 있다. 특히 유기용매내에서 반응하는 효소에 필요한 미량의 수분이 효소의 응집 (aggregation)을 유도하여 효소 사용효율을 낮추는 현상이 나타나고 있다. 이러한 낮은 반응속도를 해결하기 위해 기질특이성 연구, 유기용매 및 수분양의 최적화, 효소의 화학적 변형 및 고정화, 단백질 공학(protein engineering), molecular imprinting 등과 같은 방법들이 연구되고 있다. 유기용매내에서의 효소반응은 광학활성 의약품의 합성과 같은 고부가가치 생산에 응용될 수 있으므로<sup>3</sup> 효소의 반응성 증가에 대한 공학적 연구를 필요로 하게 된다. 본 연구에서는 유기용매내에서 효소의 반응성을 높이기 위한 방법으로 담체첨가의 영향을 조사하였다.

#### 실험

실험에 사용한 효소인 *Candida rugosa* lipase(CRL)와 porcine pancreatic lipase (PPL)는 Sigma 의 제품을 사용하였다. 담체는 Sigma 제품을 사용하였다. 반응기질로 사용된 octanoic acid, methanol과 같은 유기용매류는 Aldrich Chemical Co.에서 구입한 것으로 HPLC 등급 이상의 고순도의 제품을 사용하였다.

300 mM의 octanoic acid, 300 mM의 methanol을 혼합한 cyclohexane 15 ml의 반응용액을 담은 50ml vial에 효소를 첨가한 후 incubator shaker내에서 30 °C, 150 rpm의 조건에서 반응하였다. 이 반응조건에서 다양한 양의 수분의 첨가에 의해 에스테르화 반응속도에 미치는 영향을 조사하였다. 첨가된 수분을 유기용매와 효소 및 담체에 분포시키기 위하여 초음파 시치를 이용하여 30 초 정도 혼합하였다.

Octanoic acid와 octanoic methyl ester의 분석은 C<sub>18</sub> 칼럼을 이용한 HPLC 방법을 사용하였다. 이동상은 deionized water와 아세토나이트릴을 20 : 80 (v/v)의 비율로 혼합한 용액에 phosphoric acid를 첨가하여 pH 3.1로 조정하는 것을 사용하였다. 이동상의 흐름속도는 1 ml/min 으로 하였고 225 nm에서 peak를 측정하였다.

### 결과 및 토론

본 연구에서는 octanoic acid의 에스테르화 반응에서 사용한 효소 및 담체에 대하여 수분량의 영향을 조사하였다. 일반적으로 유기용매내에서의 효소에 의한 에스테르화 반응은 수분량이 증가함에 따라 초기에는 증가하다가 더 첨가할 경우 감소하는 경향성을 보이고 있다. 이는 유기용매내에서 효소가 반응할때 수분이 그 활성을 위하여 필수적인 반면 에스테르화 반응과 같은 가수분해반응의 역반응은 수분이 기질로도 작용할 수 있기 때문에 반응속도를 감소시킬 수 있기 때문이다. 본 실험에서도 PPL을 촉매로 사용하여 에스테르화 반응을 한 경우 그림 1과 같이 최적 수분첨가량이 존재하는 것으로 나타났다.

효소의 수분량이 증가함에 따라 유기용매내에서의 에스테르화 반응속도가 최적점을 지나 감소하는 이유는 수분에 의한 역반응이 작용하기 때문인 것으로 알려져 있다. 그러나 유기용매내 효소반응에 미치는 수분의 영향을 고려할때 역반응 기질로 작용하는 것 외에 효소의 응집을 유도할 수 있음을 감안하여야 한다. 보통 효소가 반응매질로 사용하는 유기용매는 소수성이 강한 경우가 많으므로 수분의 용해도는 매우 낮은 편에 속한다. 가령 본 실험에서 사용하고 있는 cyclohexane의 수분용해도는 0.01 % (w/w)정도 밖에 되지 않는다. 그러므로 유기용매내에서 기질이 존재할 경우 수분용해도가 증가하게 될 것을 감안하더라도 대부분의 수분은 효소표면으로 모이게 될 것이다. 이러한 작용에 의해 유기용매내에서 수분량의 증가에 의해 효소의 응집(aggregation)이 일어나며 촉매효율이 크게 떨어질 수 있다. 본 연구에서는 이러한 가능성을 고려하여 효소의 응집을 방지하면서 촉매활성을 높이기 위한 한 방법으로 담체(support)를 첨가하는 방법을 고안하였다. 결과적으로 PPL을 촉매로 사용하였을때 담체를 첨가한 경우 최적 수분첨가량은 효소만 사용할 경우에 비해 많은 양의 수분을 필요로 하면서 1.6배 정도의 높은 반응속도를 보여주었다(그림 1). 이는 앞에서 예상한 바와 같이 수화

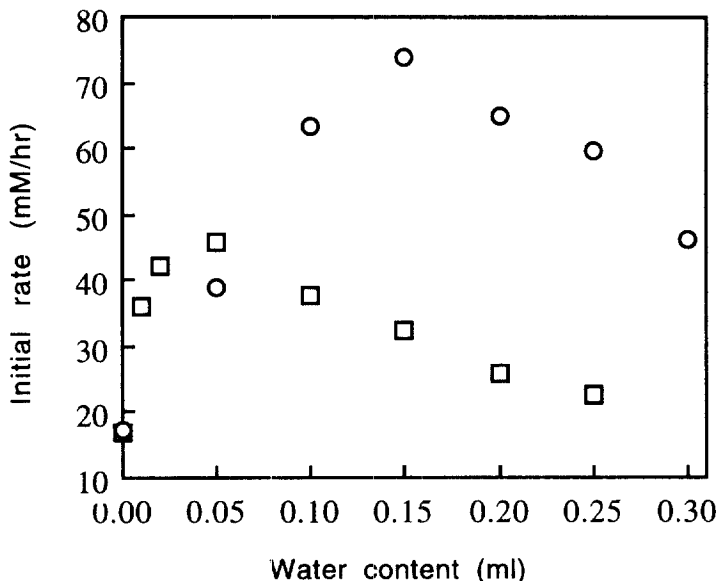


Fig. 1. Effect of water content on the PPL-catalyzed esterification of octanoic acid in cyclohexane. Symbols: (□) in absence of support, (○) in presence of support.

담체의 첨가에 의해 효소의 응집을 분산하여 반응에 참여하는 효소의 표면적이 넓어짐에 따라 효소의 반응성이 증가한 것으로 추정된다. 수화 sodium sulfate를 첨가하여 에스테르화 반응속도를 증가시킨 예는 Halling 등의 연구에서도 나타난다<sup>4, 5</sup>. 또한 Hogberg 등은 *C. rugosa* lipase에 의한 에스테르화 반응에서 첨가한 수화 염의 수분활성도가 입체선택성에 영향을 미침을 보고하고 있다<sup>6</sup>. 그러나 염은 유기용매내에서 수화됨에 따라 응집현상을 일으켜 효과적으로 효소를 분산시키지 못하여 효소의 활성증가에 기여하는 정도를 낮추는 것으로 나타났다.

CRL을 촉매로 사용한 경우 PPL과 마찬가지로 최적 수분량이 존재하였으며 담체의 첨가에 의해 1.4배의 반응속도 증가가 나타났다(그림2). 사용한 효소의 종류에 따라 담체 첨가의 영향이 차이가 나는 것은 유기용매내에서 수분에 의한 각 효소의 응집정도가 다르기 때문인 것으로 추정된다. 그러나 유기용매내에서의 효소의 응집정도를 측정하는 것은 용이하지가 않다. Martins 등은 유기용매내에서의 PPL 반응에 있어서 수분량이나 유기용매 종류에 따라 효소의 응집을 현미경 관찰에 의해 설명한 바 있다<sup>7</sup>.

유기용매내에서 효소의 응집에 의해 촉매효율이 떨어질 뿐만 아니라 사용 안정성도 떨어진다. 교반속도에 따라 효소의 응집이 영향을 받을 수 있는데 담체를 첨가할 경우 이러한 문제점을 어느정도 해결할 수 있다. 지금까지 유기용매내에서 효소를 사용하고자 할 때 반응속도 및 사용안정성을 높이기 위한 방법중 가장 유력한 것은 효소의 고정화와 화학적 변형인 것으로 평가된다. 고정화 방법은 효소의 안정성을 높이는 장점이 있는 반면 종종 효소의 활성을 오히려 저하시키는 문제점을 안고 있다. 효소가 수용액에서와 녹은 상태에서 유기용매에서 반응하면 물질이동과 응집과 같은 문제점이 생기지 않으므로 화학적 변형에 의해 효소를 유기용매에 녹이는 방법에 대해서도 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 이 방법에

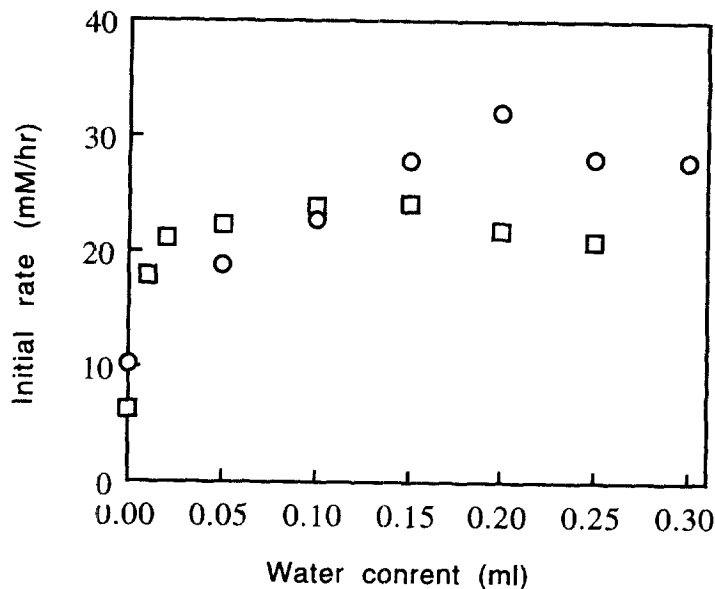


Fig. 2. Effect of water content on the CCL-catalyzed esterification of octanoic acid in cyclohexane. Symbols: (□) in absence of support, (○) in presence of support.

의해서도 효소의 구조적 변화가 일어나 활성이 떨어진다는 단점이 보고되고 있다. 본 연구에서 도입한 담체 첨가에 의해 활성 증가시키는 기술은 그 방법이 매우 간단하며 효소고정화와 같은 효과도 있으므로 앞으로 그 응용성이 크게 기대되고 있다.

#### 참고문헌

1. Dordick, J. S.: *Biotechnol. Prog.* **8**, 259(1992).
2. Klivanov, A. M.: *Acc. Chem. Res.* **23**, 114(1990).
3. Margolin, A. L.: *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 266(1993).
4. Kuhl, P. and Halling, P. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 326(1991).
5. Kvittingen, L., Sjursners, B., Anthonsen, T. and Halling, P. J.: *Tetrahedron*, **48**, 2793(1992).
6. Hogberg, H. -E., Edlund, H., Berglund, P. and Hedstrom, E.: *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 2123(1993).
7. Martins, J. F., Sampaio, T. C., Carvalho, I. B. and Barreiros, S.: *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 119(1994).