

미생물 계면활성제에 관한 연구(제3보) 유기용매에서 효소를 촉매로 한 에스테르교환반응

김 상 춘 · 남 기 대

충북대학교 공과대학 화학공학과

Enzyme-Catalyzed Transesterification Processes in Organic Solvents

Kim, Sang-Chun · Nam, Ki-Dae

Ind. & Eng. Chemistry, Chungbuk National University

(Received May, 20, 1992)

ABSTRACT

Lipases catalyzed the transesterification reaction between esters and various primary and secondary alcohols in a 99% organic medium, porcine pancreatic, yeast, mold lipases can vigorously act as catalysts in a number of nearly anhydrous organic solvents. Various transesterification reactions catalyzed by porcine pancreatic lipase in hexane obey Michaelis-Menten kinetics. The dependence of the catalytic activity of the enzyme in organic media on the pH of the aqueous solution from which it was recovered is bell-shaped, with the maximum coinciding with the pH optimum of the enzymatic activity in water. The catalytic power exhibited by the lipases in organic solvents is comparable to that displayed in water. In addition to transesterification, lipases can catalyze several other processes in organic media.

I. 서 론

물은 효소계에서 이중적 효과를 갖는데, 그것은 효소의 촉매활성 형태를 습득하고 유지하는데 필수적이다.¹⁾ 여러가지 효소들은 물이 몇 % 존재하는 지방분해 유기매체에서 작용하는 것으로 나타났다.²⁾ 효소는 수용액에서 작용하는 성질이 있으나, 생물공학적 관점에서 물에 대응하는 것으로 유기용매에서 효소전환을 유도하는 것은 많은 다음과 같은 장점이 있다.

- ① 비수용성 매체에서 대부분 유기화합물은 높은 용해도를 갖는다.
- ② 속도론적이나 열역학적 제어로 인하여 물에서 불가능한 새로운 반응으로 수행할 수 있다.
- ③ 일반적으로 효소의 안정도가 커진다.

④ 물과 비교해서 유기용매에서의 생성물 회수가 비교적 용이하다.

⑤ 유기용매내에서 효소의 불용성은, 효소를 쉽게 회수 및 재사용할 수 있고 고정화의 필요성을 제거시킨다.

일반적으로 물은 효소작용을 위하여 필요하다. 이는 물이 촉매적인 활성효소 형태의 성질을 유지하는 모든 비공유 상호작용에 직·간접적으로 참여한다는 사실에서 비롯되었다.³⁻⁵⁾ 따라서 물의 제거는 형태를 급격히 변화시키고 효소를 비활성화 한다. 그러나 실제 문제는 물의 필요 여부가 아니라, 어느 정도의 물이 필요한가이다. 효소분자 주변의 물이 단분자층 이상이라고 보기는 어렵고 이는 물이 효소분자 주변에 위치하는 한, bulk한 여분의 물은 효소에 반대 영향을 주는 일없이 유기용매와 바뀔 수 있을 것이다. 이들

단분자층에 함유된 절대 수분량은 매우 적기 때문에, 이 상태는 거의 무수 유기용매에서 효소가 작용하는 것과 동등하다.

이상의 이론에 대한 몇가지 실험적 확증으로, Price 연구진은 chymotrypsin⁶⁾과 xanthine oxidase^{7, 8)}가 유기용매에 현탁되었을 때 촉매활성을 갖음을 입증하였다.

최근 99.98% 유기매체에서 porcine pancreatic lipase는 촉매로서 우수한 작용을 나타내었고, 더우기 탈수반응에서 효소는 몇가지 현저하게 새로운 물성을 나타내는데, 예를 들면 매우 높은 열안정성과 보다 더 선택적이 됨⁹⁾ 알 수 있었다.

본 연구에서는 유기용매에서 효소의 촉매적 거동을 검토하였다. 수분함량에 따른 효소활성 의존에 관한 문제는 효소 sample의 발단과 용매의 성질, 유기매체에서 효소반응 속도론, 유기용매에서 효소를 촉매로 한 특별한 반응들과 유기매체에서 촉매능 대 물에서의 효소 촉매능을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

Lipase(EC 3. 1. 1. 3)은 porcine pancreatic lipase와 *Candida cylindracea* lipase는 Sigma제이며, *Mucor* lipase와 *Pseudomonas* lipoprotein lipase는 Amano International Enzyme(Troy, Va)을 사용하였다. lipases의 비활성도는 각각 13, 595, 20, 827 international units/mg을 갖는다.

본 연구에서 모든 시약은 상업용 특급 시약을 사용하였다. Trichloroethyl butyrate는 Allen과 Spangler¹⁰⁾의 방법에 의하여 알콜과 산으로 부터 합성하였다. 다른 esters는 Morris와 Green¹¹⁾의 방법으로 상응하는 acid chlorides와 알콜로부터 합성하였다.

용매내의 수분은 3A molecular sieves(Linde, South Plainfield, NJ)를 유기용매에 넣고 진탕하여 제거한 후, 흡착제 존재하에 보관하였다. 유기매체와 효소 둘다의 수분 함량은 Fischer법으로 측정하였다¹²⁾. 상업적으로 제조된 lipase들은 다음과 같이, porcine pancreatic lipase 3.6%, *Candida cylindracea* lipase 6.1%, *Mucor* lipase 4.8%의 수분을 포함하고 있다.

유기용매에서 효소반응은 기질혼합용액에 lipase분말을 첨가함으로써 개시된다. suspension은 마개 달

린 flask 안에서 20℃, 250rpm으로 orbit shaker에서 진탕하였다. 주기적으로 0.5μl 액적을 회수하여 530 μm fused silica capillary column(Hewlett-Packard)을 사용하여 GC로 분석하였다. 물에서 tributyrin의 lipase를 촉매로한 가수분해는 Radiometer pH-stat로 전위차적으로 진행하였다.

Porcine pancreatic lipase는 다음과 같이 전처리하였다. 효소의 상업용 sample을 0.05M glycine buffer(pH 8.4)에 용해하여 4℃로 냉각하였다. 그 후 동부피의 냉각된 acetone(-20℃)이 첨가되고, 그 혼합물을 4℃에서 30분간 교반하였다. 침전된 효소를 원심분리로 회수하여 냉각 acetone으로 세척하고, 우선 공기중에서 건조한 후, 실온에서 진공건조한다. 그 결과로 생성된 효소분말은 0.5% 수분을 함유한다.

Lipase를 완전히 비가역적으로 할 필요가 있을 때에는, diethyl *p*-nitrophenyl phosphate를 사용하였다¹³⁾.

III. 결과 및 고찰

Lipase(EC 3. 1. 1. 3)은 유기용매에서 효소반응 연구의 조건들을 충족시킬 수 있다. 자연의 지방분해 반응은 carboxylic esters의 가수분해 반응이지만^{14, 15)}, lipase는 또한 기질로서 수분이 포함되지 않은 transesterification반응의 촉매로 작용할 수 있다.^{9, 16)} 따라서 본 실험은 세 종류의 lipases-porcine pancreatic, yeast(*Candida cylindracea*), mold(*Mucor* sp.)를 촉매로한 유기용매에서 transesterification을 연구하였다.

Tributyrin(glyceryl tributyrate)과 heptanol은 2-pentanone에 용해되며, 혼합물의 탈수반응이 진행되고 일정량의 수분이 부가된다. 그 후 lipase분말을 넣고, 혼합물의 suspension은 20℃에서 진탕하였다(단 백질은 다른 유기 용매에서와 같이 이 용매에서도 용해하지 않는다)¹⁷⁾.

Fig. 1은 유기매체에서 수분함량에 따라서 세가지 lipases가 촉매작용을 한 tributyrin과 heptanol 사이의 transesterification의 속도의존을 보여준다. Fig. 1에서 porcine pancreatic과 mold lipase의 효소활성도는 단지 수분함량 0.02%에서 1%까지의 범위에서 약간 의존하는 것을 볼 수 있는데 반하여, yeast li-

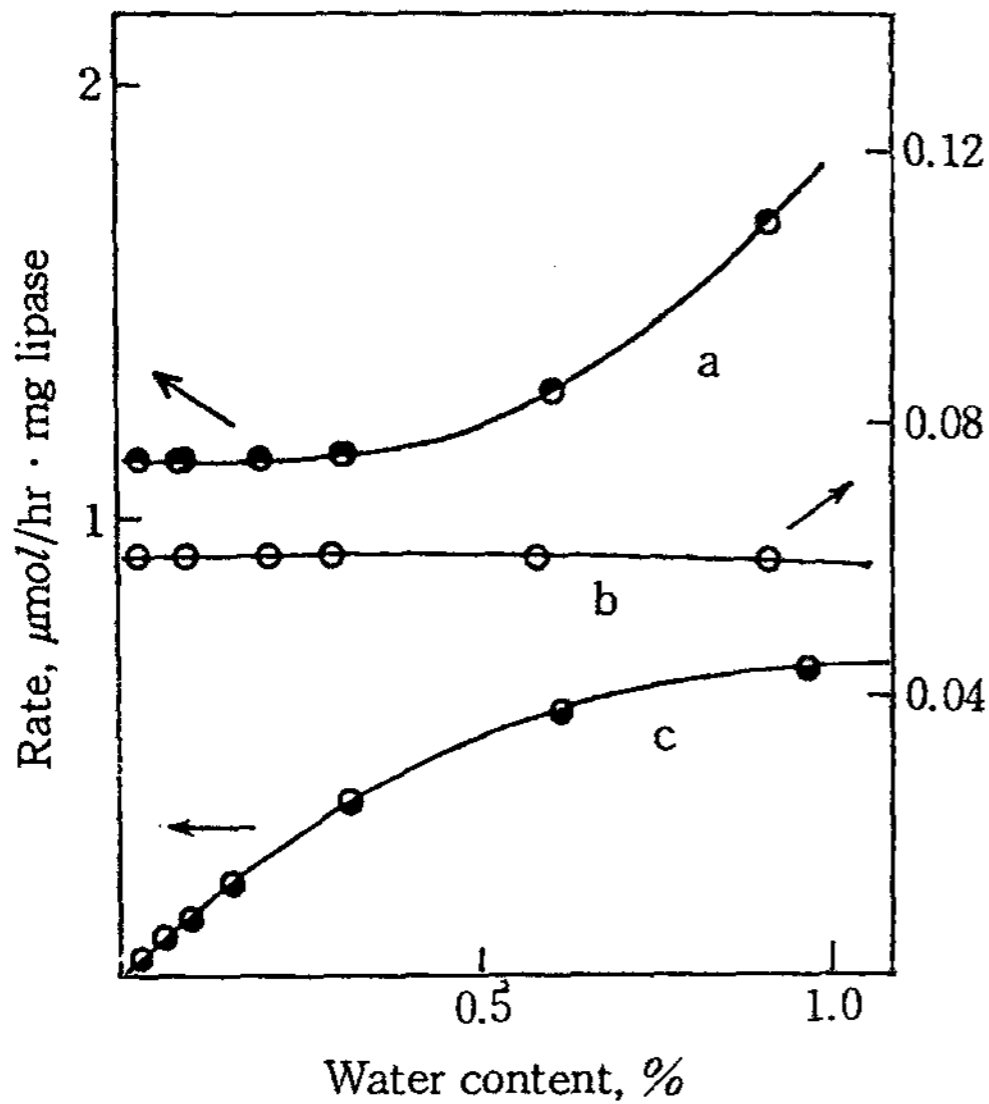


Fig. 1. The dependence of the lipase-catalyzed transesterification reaction between tributyrin and heptanol in 2-pentanone on the percentage of water in the solvent. Curves a: porcine pancreatic lipase, b: mold lipase, c: yeast lipase. Lipase powder 10mg was added to 1ml of 2-pentanone containing 0.3M tributyrin and heptanol and a given amount of water. The suspension was shaken at 20°C and 250rpm. In the absence of lipases, no appreciable reaction was observed.

pase는 수분량이 그 범위에서 감소함에 따라 효소활성이 점차 낮아진다. 그러한 양적인 차이에도 불구하고 세가지 모든 lipases는 0.02% 만큼 낮은 - 즉, 99.98% 유기매체 - 수분함량에서 보다 강한 촉매활성을 나타낸다. 이 효소활성은 일정 시간 이상 유지되며, 거의 반응을 완결하는데 충분한데, 예를 들면 Fig. 1과 같은 조건하에서 porcine pancreatic lipase를 촉매로한 transesterification 전환율은 3일 후 약 95%를 초과한다. lipase를 촉매로한 2-pentanone에서의 transesterification은 단순히 단백질 때문에 일어나는 것이 아니라, lipase가 활성중심 특수시약 diethyl *p*-nitrophenyl phosphate로 비활성화될 때¹³⁾ 세가지 lipase 모두 유기매체에서 촉매활성을 나타내지 않기 때문이다.

수용액에서의 모든 효소반응은 pH에 강하게 의존하기 때문에, Fig. 2에서 설명된 현상의 가장 흥미있

는 점은 거의 무수 유기매체에서의 pH이다. 이것을 입증하기 위하여 다음 실험을 하였다. Porcine pancreatic lipase를 완충액에 용해하고, pH 값을 조절하였다. 그 후 효소를 냉각 acetone(-20°C)에 침전하여 재생시키고 진공 건조한다. 이 결과로 재생된 lipase의 활성도는 효소가 침전된 것으로부터 수용액의 pH 함수로서 물(pH 8.4) 및 heptanol과 tributyrin(단지 0.02% 수분포함) 혼합물에서 측정한다. Fig. 2(곡선 a)는 물에서 lipase의 가수분해 활성도가 효소표본의 "pH history"에 의존하지 않음을 보이며, 이것은 평가분석 용액이 항상 pH 8.4(최적 가수분해 활성도)로 유지되었기 때문에 당연한 것이다. 동시에 유기매체에서 lipase의 촉매 활성도는 효소가 침전될 때의 pH와, 물에서 효소 활성의 최적pH의 값과 대략

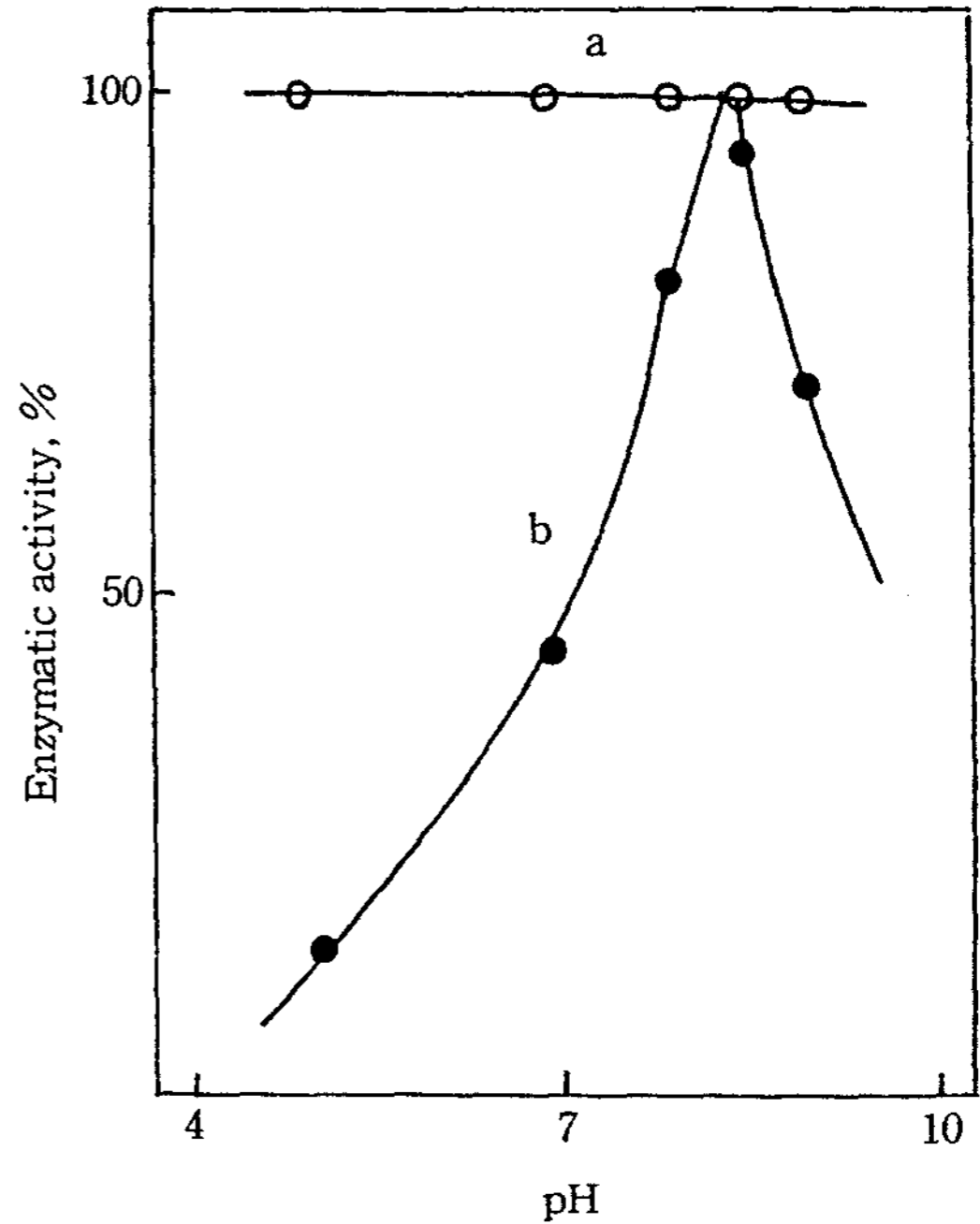


Fig. 2. The dependence of the porcine pancreatic lipase activity on the pH of the aqueous solution from which the enzyme was recovered. Curves a: lipase-catalyzed hydrolysis of tributyrin in water. (100% corresponds to the rate of 1.4mmol/hr · mg of enzyme) b: lipase-catalyzed transesterification between tributyrin and heptanol in their mixture containing 0.02% water(100% correspond to the rate of 5.6μmol/hr · mg of enzyme).

적으로 일치한다. 따라서 효소는 접하였던 마지막 수용액의 pH를 기억한다. 유기매체에서 평가 분석할 때 porcine pancreatic lipase의 상업용 sample의 비활성도는 pH 8.4에서 침전된 효소의 비활성도와 비교하여 1/3이며, 모든 실험에서 pH 8.4에서 침전된 porcine pancreatic lipase가 이용되었다.

비수용성매체에서 lipase의 효소 활성도가 용매의 성질에 어느정도 의존하는지에 대하여 조사하였다. Table 1에 3종류의 lipase가 여러가지 유기용매에서 나타내는 촉매활성을 제시하였다. 모든 효소가 완전히 비활성인 용매는 dimethyl sulfoxide와 formamide이다. 표에서 단지 두 용매만이 단백질을 용해하기 때문에¹⁷⁾(다른 용매에서 lipase들은 suspension으로만 존재한다), 두 용매에서 효소들은 그 형태가 변화되어 결과적으로 비활성된다고 예측할 수 있다. Lipase는 유기용매의 성질에 따라 감도가 변화한다 (Table 1). 예를 들면 porcine pancreatic lipase의 촉매활성을 다른 용매에서 비교할 때, yeast lipase의 촉매활성은 거의 3차의 크기로 변화하는데 물과 혼합할 수 없는 용매(paraffins, butyl ether, toluene, carbon tetrachloride)에서 높고, 물과 혼합되는 용매(acetonitrile, tetrahydrofuran, dioxane, pyridine, acetone)에서 낮다. *Mucor* lipase는 용매 성질에 대한 감도에서 중간 위치를 차지한다.

Table 1의 data는 일정량의 물분자가 효소 활성에 필요하다는 것을 설명해 준다. Porcine pancreatic lipase의 경우에 물은 효소에 단단히 결합되어 있고, 친수성 용매에서도 물이 이탈하지 않는다. 반면에 이 필수적인 물은 yeast lipase에서 외견상 훨씬 더 느슨하게 결합되어 있고, 따라서 그 물은 물과 혼합되는 용매에 분배된다. 따라서 유기용매 효과에서 주요인자는 효소분자 자체와 유기용매와의 상호작용이 아니라 효소에 결합된 물과 유기용매의 상호작용으로 볼 수 있다.

효소가 거의 무수상태인 유기용매와 같은 비자연적인 조건에 놓일때, 종래의 Michaelis-Menten kinetics가 적용될 것인지는 의문이다. 고전적인 지방분해 가수분해 반응을 기초로하여^{14, 15)} lipase를 촉매로한 transesterification의 kinetic scheme은 비공유 효소-ester착체를 형성하며, 그 후 acyl-효소 중간체로 전이되고 alcohol 생성물이 방출된다. 이것은 또다른

Table 1. Initial rates of the lipase-catalyzed transesterification reaction between tributyrin and heptanol in different organic solvents

Solvent	Reaction rate, $\mu\text{mol/hr} \cdot \text{mg}$ of lipase		
	Porcine pancreatic	Yeast	Mold
Hexane	5.2	4.0	0.31
Dodecane	4.0	5.5	0.34
Hexadecane	2.9	6.3	0.32
Ethyl ether	5.1	0.10	0.12
Isopropyl ether	5.1	0.55	0.20
Butyl ether	4.7	2.5	0.20
Acetonitrile	2.2	0.04	0.04
Tetrahydrofuran	2.0	0.02	0.05
Dioxane	1.4	0.01	0.04
Toluene	2.1	0.95	0.08
Pyridine	1.3	0.01	0.02
Dimethyl sulfoxide	0	0	0
Formamide	0	0	0
Carbon tetrachloride	1.5	0.60	0.12
Acetone	1.2	0.02	0.06
2-Pentanone	1.1	0.03	0.06
2-Heptanone	1.2	0.08	0.10

A lipase powder 10mg was added to 1ml of an organic solvent containing 0.3M tributyrin and heptanol. The mixture was shaken at 20°C, and the time course of the reaction was followed by gas chromatography.

The water content of the lipases was 0.5%, 6.1%, 4.8% for porcine pancreatic, yeast, mold, respectively. The lipases inactivated with diethyl *p*-nitrophenyl phosphate exhibited no enzymatic activity in all organic solvents.

이중착체를 형성하기 위한 친핵체와 acyl 효소의 상호작용에 의하여 진행되고, 그 후 새로운 ester와 free enzyme이 얻어진다. 이 mechanism은 (compulsory order with no ternary complexes¹⁸⁾) 주어진 alcohol 농도에서 초기속도의 역수와 ester 농도의 역수에 대하여 plot할 때 평행직선을 나타낸다. 이 방법으로 결정된 최대속도는 alcohol기질 농도의 역수로 다시 plot하면, 다시 직선이 얻어진다.¹⁸⁾

Fig. 3은 위에서 설명한 kinetic 분석에 의하여 hexane에서 tributyrin과 heptanol 사이의 porcine

pancreatic lipase의 촉매반응을 나타내었다. Kinetic

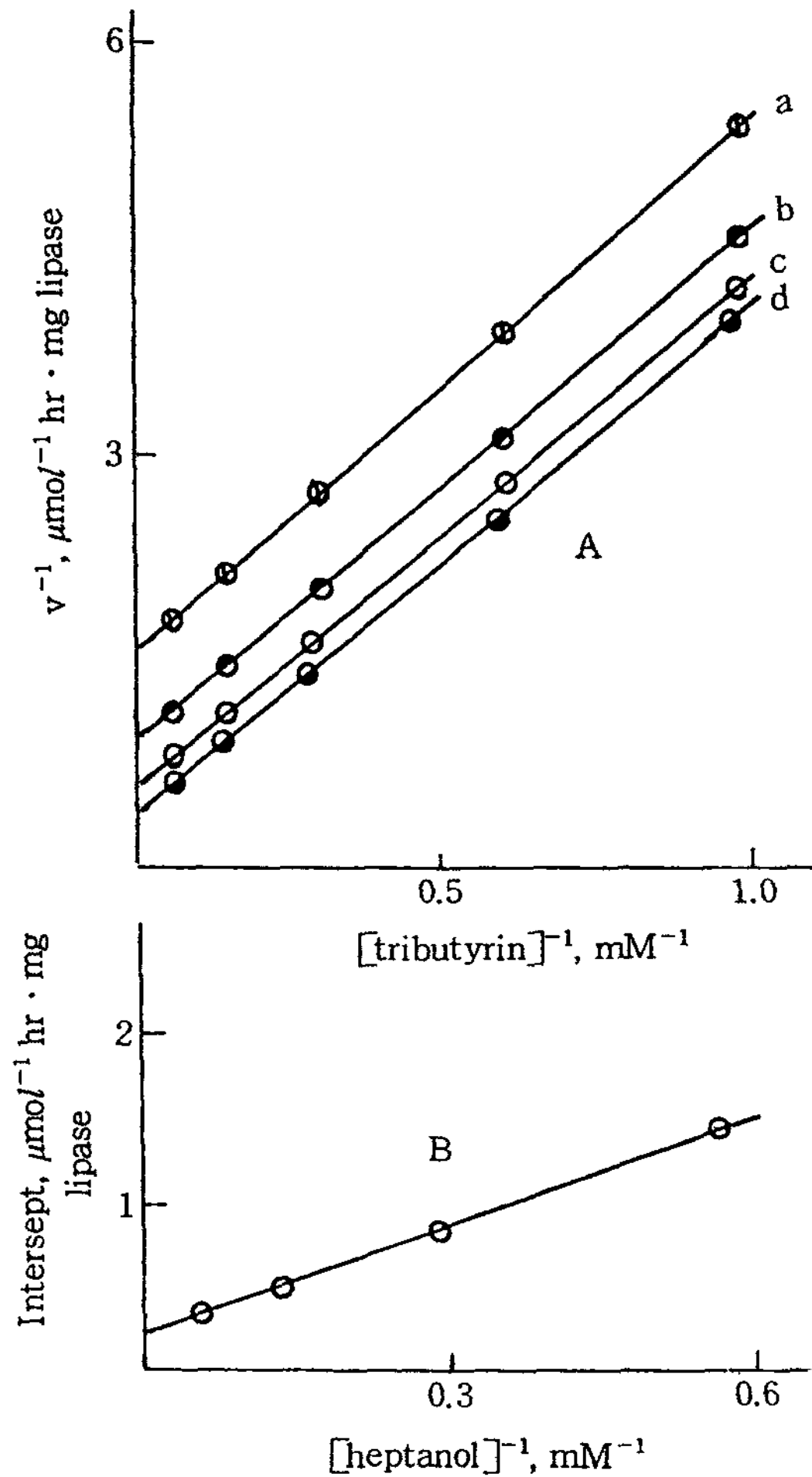


Fig. 3. Initial rate kinetics of the transesterification reaction between tributyrin and heptanol in hexane catalyzed by porcine pancreatic lipase. A: Reciprocal rates(v) vs. reciprocal tributyrin conc. at different conc. of heptanol. Concentrations of tributyrin were varied at the following fixed concentrations of heptanol. Curve a) 1.77mM, b) 3.5mM, c) 7.07mM, d) 16.6mM B: Intercepts of the straight lines in the primary plot in A vs. the reciprocal heptanol concentrations. Porcine pancreatic lipase was added to 1ml of hexane containing given concentrations of tributyrin and heptanol. The suspensions were shaken at 20°C and 250 rpm. The initial rates were determined on the basis of at least five independent measurements.

거동은 Michaelis-Menten kinetics에서 예상했던 것과 잘 일치함을 볼 수 있다. 다른 ester와 다른 alcohol류를 사용하여 hexane에서 다른 lipase를 촉매로한 transesterification에 대하여도 같은 형태가 관찰되었다. Plot에 따라 결정된 Michaelis 상수와 최대속도는 Table 2에 기록되어 있다. 주어진 ester에 대한 $K_m(\text{ester})/V$ 의 비는 주어진 alcohol에 대한 $K_m(\text{alcohol})/V$ 의 비와 다른 ester(세제, 네제줄)에서 처럼, 다른 alcohol(처음 세줄)에 대하여 대략적으로 같음을 볼 수 있다. 이는 가정한 "ping-pong" mechanism¹⁹⁾과 일치한다. 따라서 hexane에서 lipase를 촉매로한 transesterification이 Michaelis-Menten kinetics에 따른다는 사실을 더욱 확실하게 해준다.

Table 2. Kinetic parameters of different transesterification reactions catalyzed by porcine pancreatic lipase in hexane

Ester	Alcohol	K_m (ester) $\times 10^{-3}M$	K_m (alcohol) $\times 10^{-3}M$	V , $\mu\text{mol}/\text{hr} \cdot \text{mg}$ of enzyme
Tributyrin	Methanol	42	33	10
Tributyrin	Dodecanol	83	5.2	17
Tributyrin	Heptanol	20	13	4.8
Trichloroethyl butyrate	Heptanol	39	4.5	1.7
Methyl butyrate	Heptanol	>2000	ND	2

Conditions were as in the legend to Fig. 3; ND not determined.

Lipase가 거의 무수상태의 유기매체에서 촉매로 작용한다고 설정하고, 그후 비자연적인 환경에서 그들의 촉매 활성도가 어느 정도인지 알아보려고 하였다. 끝으로 hexadecane에서 tributyrin과 heptanol 사이의 반응에서 lipase에 의하여 제공되는 가속 효과를 결정하였다. 가속효과는 효소를 사용하지 않은 반응과 lipase를 촉매로한 transesterification(효소 10 mg/ml)의 속도비로써 Table 3에 나타내었다. 또 비교를 목적으로 물에서 tributyrin 가수분해 반응에서 lipase에 의해 제공된 가속효과를 결정하여, Table 3의 맨 끝열에 나타내었다. Hexadecane에서 transesterification 반응에서 각 lipase의 촉매능과 물에서

가수분해반응의 촉매능을 비교한 것은 같은 차수를 보인다. 즉, 효소는 유기용매에서 고유한 촉매능을 충분히 나타내는 것으로 보인다. 이것은 유기용매 및 물에서 효소 형태는 거의 동일하다는 것을 강하게 암시한다.

Table 3. Acceleration effects afforded by lipases in the transesterification reaction between tributyrin and heptanol in hexadecane and in the hydrolysis of tributyrin in water

Lipase	Acceleration effect * $\times 10^6$	
	Transesterification in hexadecane	Hydrolysis in Water
Porcine pancreatic	1.4	3.5
Yeast	2.8	0.7
Mold	0.14	0.17

In the transesterification reaction, 0.01M tributyrin and heptanol in hexadecane were used. In the hydrolysis reaction in aqueous solution(0.1M KCl, pH 7.5), 0.01M tributyrin was used. Lipases were used at 10mg/ml, and other conditions were the same as shown in Table 1.

* Defined as the ratio of the rate of the lipase-catalyzed reaction(enzyme concentration at 10mg/ml) to that of the nonenzymatic one.

IV. 결 론

유기용매에서 lipase의 촉매적 거동을 알아본 결과는 다음과 같다.

1) 세가지 lipase는 모두 거의 무수상태인 99.8% 유기용매에서 우수한 촉매활성을 보였다.

2) 가수분해와 에스테르교환반응에서 효소의 pH 의존을 검토한 결과 가수분해는 거의 pH에 영향을 받지 않으나 에스테르교환반응은 pH 8.4에서 최적의 활성을 나타내었다.

3) 세가지 lipase와 여러가지 유기용매에서의 에스테르 교환반응을 비교한 결과 물과 혼합되지 않는 용매에서는 효소의 활성이 높고, 물과 혼합되는 용매에서는 활성이 낮았다.

4) Michaelis-Menten kinetic 분석 결과는 직선으로 나타났다.

문 헌

1. W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* 14, 1(1959)
2. R. E. Feeney, in *Chemical Deterioration of proteins*, J. R. Whitaker and M. Fujimaki, Eds.(American Chemical Society, Washington, D. C., 1980), p. 1; A. M. Klibanov, *Adv. Appl. Microbiol.* 29, 1 (1983).
3. W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* 14, 1~63 (1959).
4. C. Tanford, *Physical Chemistry of Macromolecules*(Wiley, New York) (1961).
5. G. E. Schulz, R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*(Springer, New York) (1979).
6. C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*(Freeman, San Francisco), Part I (1980).
7. T. E. Creighton, *Proteins*(Freeman New York) (1983).
8. F. R. Dastoli, N. A. Musto, S. Price, *Arch. Biochem. Biophys.* 115, 44~47 (1966).
9. F. R. Dastoli, S. Price, *Arch. Biochem. Biophys.* 118, 163~165 (1967).
10. F. R. Dastoli, S. Price, *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 289~291 (1967).
11. A. Zaks, A.M.Klibanov, *Science*, 224, 1249~1251 (1984).
12. C. F. H. Allen, F. W. Spangler, *Organic Syntheses Collective*(Wiley, New York), 3, 203~204(1955).
13. J. F. Morris, E. H. Green, *J. Am. Chem., Soc.*, 26, 293~318 (1969).
14. H. A. Laitinen, W. E. Harris, *Chemical Analysis*(McGraw-Hill, New York), 2nd Ed., 361~363 (1975).
15. M. F. Maylie, M. Charles, L. Sarda, P. Desnuelle, *Biochem. Biophys. Acta.*, 178, 196~198 (1969).
16. P. Dsnuelle, in *The Enzymes*, ed. P. D. Boyer, *Biochem Biophys.*(Academic, New York), 7,

- 3rd Ed., 575~616 (1972).
17. H. Brockerhoff, R. G. Jensen, *Lipolytic Enzymes*(Academic, New York) (1974).
18. B. Cambou, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*,
106, 2687~2692 (1984).
19. S. J. Singer, *Adv. Protein Chem.*, 17, 1~68 (1962).