

미소 수용 Cyclohexane 중에서 분말 Lipase에 의한 분자내 에스테르화반응

이민규[†] · 감상규*

부산수산대학교 화학공학과
제주대학교 해양환경공학과*

Intramolecular Esterification by Lipase Powder in Microaqueous Cyclohexane

Min-Gyu Lee[†] and Sang-Kyu Kam*

Dept. of Chemical Eng., National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea
Dept. of Marine Environmental Eng., Cheju National University, Cheju 690-756, Korea*

Abstract

The effects of substrate concentration, enzyme concentration, reaction temperature, and water content were investigated in intramolecular esterification. This study used cyclohexane as organic solvent, powder lipase as enzyme, and benzyl alcohol and octanoic acid as substrate.

The initial reaction rate was found to be proportional to enzyme concentration; followed Michaelis-Menten equation for octanoic acid; and was inhibited by benzyl alcohol. The observed initial reaction rate first increased, then decreased with increasing reaction temperature, giving rise to the maximum rate at 20°C. The drop in the reaction rate at higher temperature was due to partition equilibrium change of substrate between organic solvent and hydration layer of enzyme molecule in addition to the deactivation by enzyme denaturation. Water layer surrounding enzyme molecule seemed to activate in organic solvent and the realistic reaction was done in the water layer.

In the enzymatic reaction in organic solvent, the initial reaction rate was influenced by partition equilibrium of substrate, so the optimum condition of substrate concentration, enzyme concentration, reaction temperature, and water content would give a good design tool.

Key words : enzyme reaction, lipase, esterification, emulsion

서 론

효소는 생체촉매로서 촉매능이나 반응 특이성이 크기 때문에 효소를 이용함으로써 유용한 물질을 선택적으로 합성

하는 것이 가능한 것으로 알려져 있다. 後藤 등¹⁾은 효소기능을 떨어뜨리지 않고서 유기 용매상에서 반응을 행할 수 있다면 소수성 기질의 이용이 가능하며, 평형을 가수분해

[†] Corresponding author

방향에서 합성방향쪽으로 이동시켜 에스테르합성, 펩티드의 합성, 스테로이드의 수식(modification), 유지의 개질 등에 이용할 수 있다고 하였다. 그러나 일반적으로 효소는 수용성이기 때문에 유기 용매 중에서 사용하는 것은 일반적으로 어려움이 따른다.

종래의 유기 용매를 사용한 효소 촉매반응에서는 유기 용매에 의해 효소의 고차원 구조가 파괴됨으로써 빠르게 활성을 잃어 버리기 때문에 생화학 반응에서 유기 용매를 사용할 경우에는 저 농도의 유기 용매 수용액 또는 물-수불용성 유기 용매의 2상계가 사용되고 있다. 그러나 공업적인 응용에 있어서는 반응계의 연속화, 생성물의 수득률 향상 및 반응기의 소형화 등이 중요하기 때문에 균일 반응계가 바람직하다. 그러기 위해서는 유기 용매를 그냥 그대로 사용하거나 혹은 고농도의 유기 용매 수용액을 사용할 필요가 있다²⁾. 효소반응계에 있어서 유기 용매를 이용하는 이점으로는 지용성 기질이나 물에 불용성 또는 난용성인 기질 및 생성물의 용해도를 높일 수가 있으며, 반응의 평형을 이동시킬 수 있을 뿐만 아니라, 효소는 유기 용매에 대한 불용성이기 때문에 효소를 여과에 의해서 간단하게 회수할 수 있어 재사용 가능하다는 것이다³⁾.

유기상중에서 효소를 유용하게 이용하는 방법으로는 분말상 효소를 직접 사용하는 분말효소법^{4,5)}, 유기 용매에 불용인 담체에 효소를 고정화하여 사용하는 고정화 효소법⁶⁻⁹⁾, 역상 미셀의 water pool에 효소를 이용하여 유지의 가수분해에 의해 고급지방산의 생산, 에스테르 교환 및 에스테르합성법에 의한 유지의 개질, 또는 모노-, 디-글리세리드 등의 식품공업에 있어서 유용한 물질의 생산에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 유기상중에서의 효소반응에 미치는 인자들의 영향을 살펴보기 위하여 유기 용매를 그냥 그대로 사용하고 현탁시킨 효소를 촉매로한 에스테르 합성 반응에 있어서 온도, 효소 농도, 기질의 종류, 기질 농도 및 수분량의 영향에 대하여 검토하고자 하였다.

재료 및 실험 방법

본 실험에서 사용한 효소는 Sigma사의 *Candida cylindracea* 기원의 분말상의 lipase이며, 기질로는 벤질 알콜(benzyl alcohol)과 옥탄산(octanoic acid)을, 유기 용매로는 시크로헥산(cyclohexane)을 사용하였다. 사용한 시약은 전부

Wako 시약 특급이었다.

실험장치는 Fig. 1에 보여지는 것처럼 300ml 분리형 플라스크에 직경 50mm의 표준날개가 6개 달린 turbine과 4개의 스테인레스 방해판(baffle)을 부착한 교반반응기로써 항온조내에서 조작하였다.

실험에서 반응액 중의 수분량이 크게 영향을 미칠수 있게 때문에 실온에서 하루 동안 물로 포화시킨 시크로헥산을 용매로 사용하였다. 벤질 알콜과 옥탄산 2개의 기질을 완전히 용해시킨 유기 용매 용액 200ml를 항온조내에 들어 있는 반응기내에 채운 다음, 250rpm으로 충분히 교반하면서 반응액에 효소를 넣는 순간을 반응 시작 시간으로 하였으며, 일정 시간 간격마다 약 2ml의 시료를 채취하여 여과에 의해 효소를 분리함으로써 반응을 정지시켰다. 이 시료를 L.C로 분석하여 미반응 벤질 알콜의 량을 구하고 이로부터 전화를 및 초기 반응속도를 구하였으며, 시료의 일부는 미량 수분 측정 장치(Karl-Fischer 수분계)로 시료 중의 수분량을 측정하였다. 기본 실험조건은 25°C, 효소농도 2.0 kg/m³, 교반회전수 250rpm, 벤질 알콜농도 0.01M, 옥탄산 농도는 0.04M로 하였다.

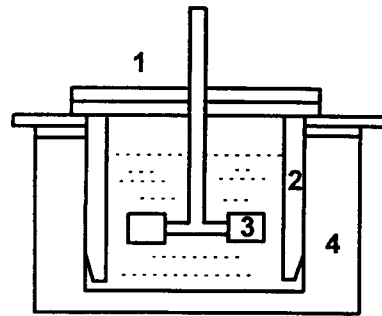


Fig. 1. Schematic of enzyme reaction reactor.

(1. separable flask, 2. baffle, 3. bladed disk turbine, 4. constant temperature water bath)

1. 초기 반응속도에 대한 옥탄산의 영향

벤질 알콜과 옥탄산을 사용한 2 기질계 효소 반응에 있어서 효소 반응속도에 미치는 기질인 옥탄산의 영향을 살펴보기 위하여 온도 25°C의 항온조에서 벤질 알콜농도를 0.01M로 일정하게 하고서 옥탄산 농도를 변화시킬 경우 초기 반응속도를 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 2에서 보여지는 바와 같이 옥탄산 농도가 증가함에

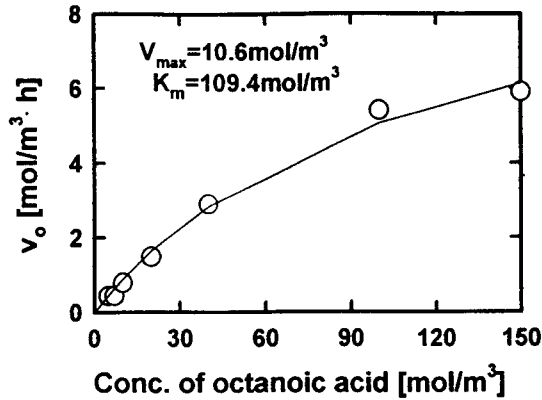


Fig. 2. Effect of octanoic acid concentration on the initial reaction rate.

따라서 초기 반응속도는 증가하며, 농도가 더욱 증가하면 초기 반응속도는 포화상태에 가까워짐을 알 수 있었다.

이로부터 옥탄산 농도만을 고려한 초기 반응속도는 Michaelis-Menten식의 형태를 따르는 것으로 생각되어졌다. Michaelis-Menten 반응속도식은 다음과 같이 나타내어진다.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

이를 변형하면 다음과 같이 된다.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

이 식을 이용하여 초기 기질 농도의 역수에 대해 초기 반응속도의 역수를 Fig.3에 도시한 결과 직선관계가 얻어졌으며, 최소자승법에 의해 K_m 은 109.4 mol/m³, V_{\max} 는 10.6 mol/m³·h로 얻어졌다. 이 값을 사용하여 이론적으로 구한 계산치를 Fig.2에 실선으로 나타내었으며, 이는 실험치와 잘 일치하였다.

2. 초기 반응속도에 대한 벤질 알콜농도의 영향

초기 반응속도에 미치는 벤질 알콜농도의 영향을 살펴보기 위하여 옥탄산 농도를 0.04M으로 일정하게 하고서 벤질 알콜농도를 변화시킬 경우 초기 반응속도는 감소하는 결과를 나타냄으로써 Michaelis-Menten형의 속도식으로 표현될 수 없음을 알 수 있었다. 이 결과로부터 벤질 알콜농

도만을 고려한 초기 반응속도는 기질 저해를 받는 것으로 보여지는데, 이는 벤질 알콜이 효소에 대해 물리적 혹은 화학적 변성을 줌에 의해 효소의 활성을 잃게 되기 때문으로 생각된다. 기질 저해 반응은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

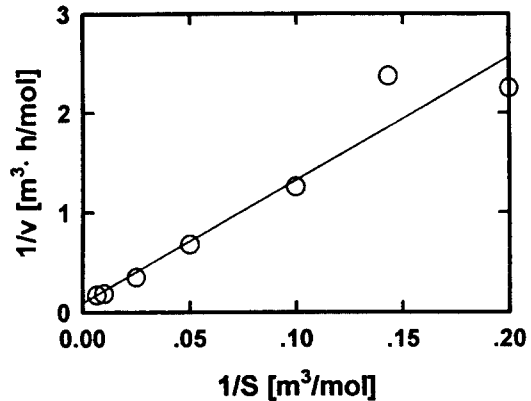


Fig. 3. Relation between 1/v and the reciprocal of the concentration of octanoic acid.



이와 같이 기질 저해를 고려한 반응속도식은 다음과 같이 나타내어진다.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S] + [S]^2/K_i}$$

이 식을 이용하여 비선형회귀법에 의하여 각 정수를 구한 결과 V_{\max} = 113 mol/m³·h, K_m = 238 mol/m³, K_i = 1.3 mol/m³로 얻어졌다. 이들 값을 사용하여 이론적으로 구한 계산치를 Fig. 4에 실선으로 나타내었으며, 그림에서 보여지는 바와같이 실험치와 잘 일치하였다.

이상에서 이상계 2기질 반응의 경우 초기 반응속도는 Michaelis-Menten식 및 기질 저해 속도식에 비례하는 것으로 생각되지만 정확한 kinetics에 대해서는 재검토할 필요가 있는 것으로 생각되어진다.

3. 초기 반응속도에 대한 효소 농도의 영향

효소 농도가 초기 반응속도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응온도를 25℃로 일정하게 하고서 효소 농도를 1.

0~6.0kg/m³로 변환시켰을 경우 초기 반응속도의 변화를 Fig.5에 나타내었다. 이때 기질 농도는 벤질 알콜 0.01M, 옥탄산 0.04M로 일정하게 하였다.

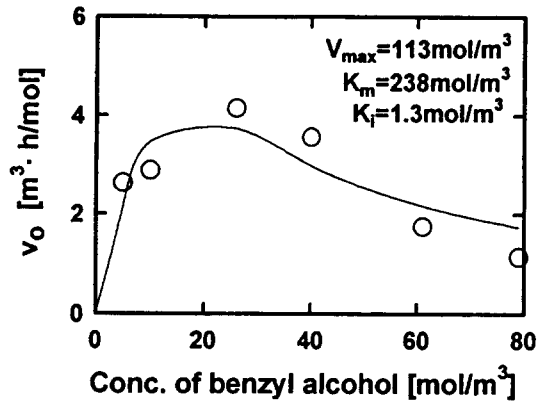


Fig. 4. Effect of benzyl alcohol concentration on the initial reaction rate.

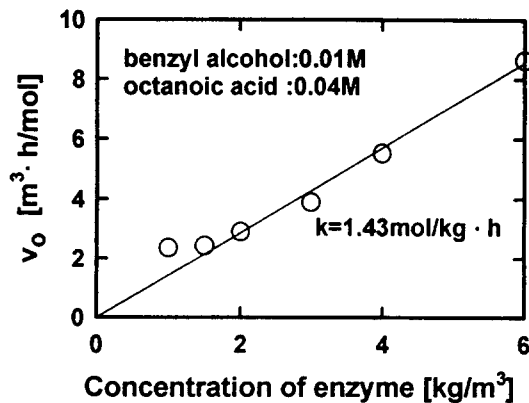


Fig. 5. Effect of enzyme concentration on the initial reaction rate.

그림에서 보여지는 바와같이 효소 농도의 상승에 따라 반응속도는 선형적으로 증가함으로써 반응속도는 효소 농도에 1차로 비례하므로, $v = k[E]_0$ 와 같이 나타낼수 있으며, 실험치로부터 구한 반응 속도상수 k 는 1.43mol/kg · h였다. 또한 초기 반응속도가 효소 농도에 1차로 비례하므로 유기 용매 중에서의 효소는 분말 상태의 분산된 상태에서 존재하고 있는 것으로 사료된다.

4. 초기 반응속도에 대한 온도의 영향

효소 농도를 2.0kg/m³으로 일정하게 하고 반응 온도를 10℃~35℃로 변환시킬 경우 반응 온도가 초기 반응속도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 6과 같았다. 이때 기질 농도는 벤질 알콜 0.01M, 옥탄산 0.04M로 일정하게 하였다.

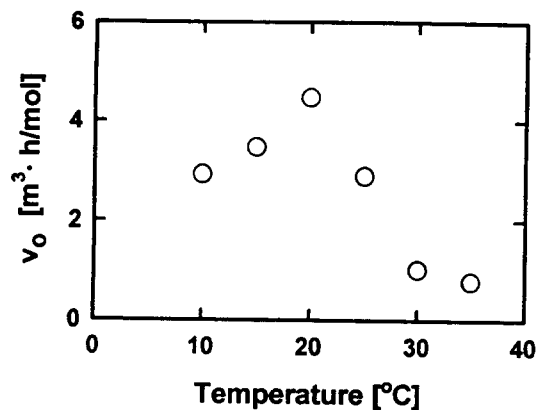


Fig. 6. Effect of temperature on the initial reaction rate.

그림에서 보여지는 바와같이 초기 반응속도는 반응 온도 20℃에서 최대였으며, 이 보다 온도가 상승함에 따라서는 현저하게 감소하였다. 이에 대한 원인을 검토해보기 위하여 효소를 15, 20 및 35℃에서 사용할 경우와 각 온도에서 사용한 효소를 15℃에서 재사용하였을 경우의 시간에 따른 전환율의 변화를 살펴보았다. Fig. 7에서 보여지는 바와같이 35℃에서 사용한 효소를 15℃에서 재사용하였을 경우는 새로운 효소를 15℃에서 사용하였을 경우와 비교할때 평형에 도달하는데는 약 2배의 시간이 필요함을 알수 있었으며, 이로부터 효소의 열변성이 온도상승에 따른 반응속도의 감소원인중의 하나임을 알 수 있었다.

만약 효소가 열변성에 의해서만 활성이 떨어진다면 15℃에서 사용한 효소를 15℃에서 재사용할 경우는 15℃에서 새로운 효소를 사용할 경우와 동일한 결과가 얻어질 것으로 생각된다. 그러나 실험결과는 20℃ 또는 15℃에서 재사용하였을 경우도 새로운 효소를 15℃에서 사용하였을 경우에 비해 평형에 도달하기까지는 매우 많은 시간이 필요함을 알 수 있는데, 이로부터 효소가 온도이외의 요인에 의해 영향을 받는 것으로 사료되었다.

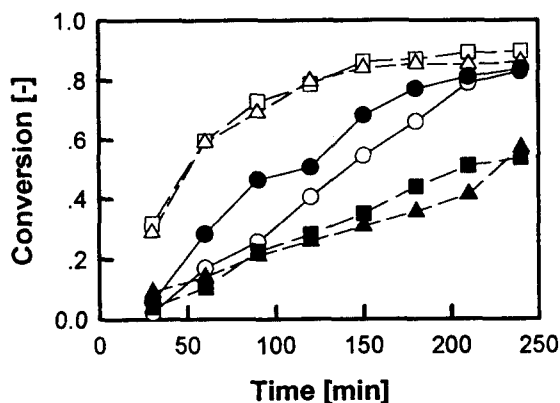


Fig. 7. Comparison of conversion rate with reaction temperature (Fresh enzyme : Δ ; 15°C, \square ; 20°C, \circ ; 35°C, Reused enzyme : \blacktriangle ; 15°C, \blacksquare ; 20°C, \bullet ; 35°C).

5. 기질의 분배 평형 정수

유기용매중에서의 효소 반응에 있어서 효소는 그 자신의 주위에 물층이 존재함으로써 기질은 먼저 유기 용매 중에서 그 물층에 들어가서 효소의 활성 중심에서 반응하게 된다. 이때 기질의 물층으로의 분배가 온도에 따라서 영향을 받고 반응속도가 변화하는 것으로 사료되어 시크로hexan-물 계로의 기질의 분배를 조사한 결과를 Fig. 8에 나타내었다.

그림에서 보여지는 바와같이 각 기질 모두 온도가 상승함에 따라서 분배 평형 정수($K_D = [S]_{oil} / [S]_{aq}$)가 증가함으로써 물로의 분배가 감소함을 알 수 있었다. 특히 벤질 알콜의 분배계수는 어떤 온도에서도 1보다 작기때문에 벤질 알콜은 유기용매보다 물층에 분배하기가 쉬움을 알 수 있었으며, 온도가 높을 경우보다 낮을 경우에 효소주위의 물층쪽으로 보다 많이 분배하는 경향이 있음을 알 수 있었다. 즉 기질의 분배 평형이 온도 상승에 의해 증가하여 물에서 분배가 감소하고 효소 주변에 물층내에서의 기질 농도가 변화하여 초기 반응속도에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 결국 온도의 상승에 의해서 효소의 활성이 증대하고 있어도 효소를 둘러싸고 있는 물 층에서의 기질 농도가 온도의 상승에 의해 감소하기 때문에 Fig. 6과 같은 결과가 되는 것이라고 사료되며, 이로부터 온도에 따라 초기 반응속도가 감소하는 것은 열변성이외에 기질인 벤질 알콜의 분배계수

에 의해서도 영향을 받는 것으로 생각되었다.

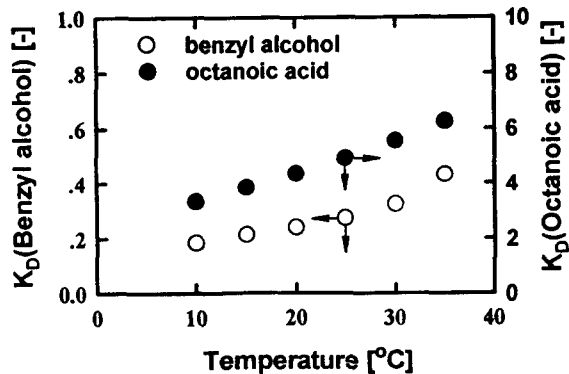
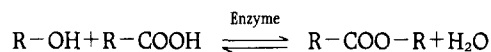


Fig. 8. Temperature dependence of partition coefficient of substrate.

6. 초기 반응속도에 대한 수분량의 영향

본 연구에서 검토하고 있는 가수분해 효소를 사용한 에스테르합성 반응의 반응식은 다음과 같다.



유기 용매 중의 효소는 그 자신을 둘러싼 물의 층을 형성하여 활성의 안정화에 기여하는 것으로 사료되므로 반응 원료 중의 수분량이 안정화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 반응 원료중의 수분량을 0.004-0.007w/w%로 변화시키기에 따른 초기 반응속도의 변화를 조사하였다. 벤질 알콜 농도는 0.01M, 옥탄산 농도는 0.04M, 효소 농도는 2.0kg/m³으로 하였다. Fig. 9에서 보여지는 바와 같이 원료 중의 수분량이 증가함에 따라 초기 반응속도는 증가하는 결과를 나타내었다.

또한 에스테르합성에 있어서 생성물의 하나로써 물이 생성되기 때문에 물의 거동을 검토하기 위하여 시간에 따른 수분량의 변화를 조사하였다. Fig. 10에서 보여지는 바와 같이 효소를 포함한 유기 용매 중의 수분량은 시간에 따라 변하지만 여과에 의해 효소가 제거된 유기 용매 중의 수분량은 반응이 진행됨에 따라 물이 생성됨에도 불구하고 시간 변화에 대해 거의 일정하였다.

이로부터 효소를 함유한 유기 용매와 효소를 제거한 유

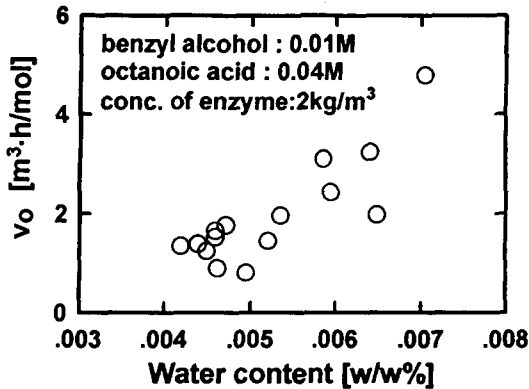


Fig. 9. Effect of water content on the initial reaction rate.

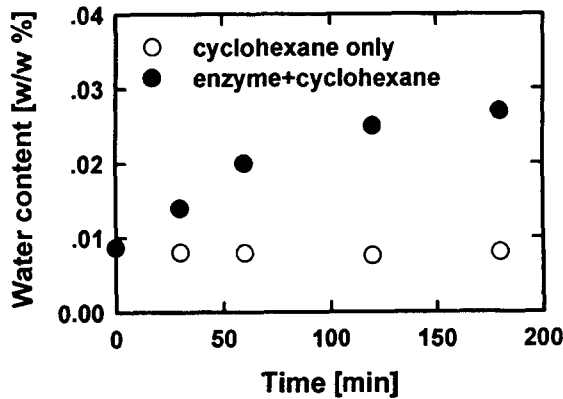


Fig. 10. Time courses of water content with and without filtration.

기 용매만의 시료중의 수분량에 차이를 보이고 있는데, 이 차이를 해당하는 양이 효소와 결합한 수분량으로 생각되어 진다. 또한 반응에 의해 생성된 물은 효소의 수화수로 취급 되어 단순한 안정화에 기여함으로써 반응의 평형에는 영향을 주지 않는 것으로 생각되어졌다. 그러나 효소를 가하기 전의 원료의 수분량이 포화수분량보다 낮으면 초기 반응속도가 감소하였는데, 이는 효소 주변의 수화수와 용매에 녹아 있는 물이 평형 상태에 있어서 용해된 물의 양이 감소하면 그만큼 효소 주변의 수화수의 양도 감소하여 효소의 활성의 안정화가 해를 입기 때문으로 생각되었다.

결론

본 연구에서는 분말 효소인 lipase에 의해 에스테르합성 반응을 유기 용매인 시크로헥산 중에서 벤질 알콜과 옥탄산의 조합을 기질로 하여 기질 농도, 효소 농도, 반응속도 및 수분량의 변화에 따른 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

초기 반응속도는 효소 농도에 비례하였으며, 옥탄산 농도에 대해서는 Michaelis-Menten 속도식을 따랐으나 벤질 알콜 농도에 대해서는 기질저해를 받았다. 유기 용매 중에 있어서 효소 분자 표면의 미시적 환경에서는 효소의 주위에 수화층(효소와의 결합수)이 존재하는 것으로 생각되었다. 이 수화층이 존재함에 의해 효소는 유기 용매 내에 있어서도 활성을 나타내며, 유기 용매중에 용해된 기질이 수화층에 이동하여 거기서 효소의 촉매반응에 의해 생성물이 생기고 다시 유기상으로 이동하는 기구인 것으로 생각되기 때문에 본질적인 반응상은 수화층내에 있는 것으로 사료되었다.

초기 반응속도는 20°C의 반응온도에서 최대에 달하였으며, 반응온도가 더욱 증가함에 따라서는 감소하였다. 이로 부터 반응온도가 증가함에 따라 효소분자의 열변성에 의한 활성 감소뿐만 아니라 효소분자 주위의 수화층과 유기 용매의 기질의 분배 평형 변화에 기인됨을 알 수 있었다. 유기층내에서 효소반응에 있어서 초기 반응속도가 기질의 분배 평형에 의해 영향을 받으므로 기질 농도, 효소 농도, 온도, 수분량 등의 인자를 변화시킴으로서 최적조건에서 조 작이 가능할 것으로 생각되었다.

사 용 기 호

- [E] : enzyme concentration [kg/m³]
- [E]₀ : initial enzyme concentration [kg/m³]
- [ES] : enzyme-substrate complex [kg/m³]
- [S] : substrate concentration [mol/m³]
- K_D : partition coefficient [-]
- K_i : substrate inhibition constant [mol/m³]
- K_m : Michaelis constant [mol/m³]
- V : reaction rate [mol/m³ · h]
- V_{max} : maximum reaction rate [mol/m³ · h]

참 고 문 헌

1. 後藤宗治, 後藤雅宏, 中塩文行: 界面活性劑被覆リパーゼを用いたグリセリドのエステル合成反應. 化學工學論文集, 19(6), 1195(1993).
2. Goto, M., Kameyama, H., Miyata, M. and Nakashio, F.: Design of surfactants suitable for surfactant-coated enzymes as catalysts in organic media. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 26, 109(1993).
3. Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger, C.: Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotech. and Bioeng.*, 30, 81(1987).
4. Dordick, J.S.: Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 194(1989).
5. Zaks, A. and Klivanov, A.M.: Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.*, 263(7), 3194(1988).
6. Goto, M., Goto, M., Kamiya, N. and Nakashio, F.: Enzymatic inesterification of triglyceride with surfactant-coated lipase in organic media. *Biotech. and Bioeng.*, 45, 27(1995).
7. Okataha, Y. and Ijio, K.: A lipid-coated lipase as a new catalyst for triglyceride synthesis in organic solvents. *J. Chem. Soc. Commun.*, 1392(1988).
8. Okataha, Y. and Ijio, K.: Preparation of a lipid-coated lipase and catalysis of glyceride ester in homogeneous organic solvents. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 65, 2411(1992).
9. Tsuzuki, W. and Sasaki, T.: Effect of detergent attached to enzyme molecules on the activity of organic-solvent-soluble lipases. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 1851(1991).
10. Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P. and Robinson, B.H.: Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules. *Biochem. Biophys. Acta*, 947, 209(1988).
11. Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Khmenitsky, Y.L. and Berezin, I.V.: Micellar enzymology. *Eur. J. Biochem.*, 155, 453(1986).
12. Martinek, K., Klyachko, N.L., Kabanov, A.V., Khmenitsky, Y.L., and Berezin, I.V.: Micellar enzymology: its relation to membranology. *Biochem. Biophys. Acta*, 981, 161(1989).
13. Shield, J.W., Ferguson, H.d., Bommarius, A.S. and Hatton, T.A.: Enzymes in reverse micelles as catalysts for organic-phase synthesis reaction. *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 25, 603(1986).