

아크릴산과 메타크릴산의 효소적 배당화

†박 돈 희 · 김 해 성
전남대학교 생물화학공학과, 명지대학교 화학공학과
(접수 : 2001. 2. 1., 게재승인 : 2001. 2. 20.)

Enzymatic Glycosylation of Acrylic Acid and Methacrylic Acid

Don-Hee Park† and Hae-Sung Kim

†Department of Biochem. Eng., Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

Department of Chem. Eng., Myongji University, Yongin 449-728, Korea

(Received : 2001. 2. 1., Accepted : 2001. 2. 20.)

Glyco-acrylate and methacrylate were synthesized by lipase-catalyzed glycosylation of acrylic acid, methacrylic acid and their vinyl esters with β -methyl fructoside and glycerol in *t*-butanol as a reaction medium. At the optimum conditions for enzymatic glycosylation of acrylic acid and vinyl methacrylate, we attained up to 80% conversion for glyco-acrylate from acrylic acid and 90% conversion for glyco-methacrylate from vinyl methacrylate. The polymerizable glyco-acrylates and methacrylate have biomedical application as hydrophilic monomers and hydration modifiers to be used for hydrogel contact lens formulation.

Key Words : glyco-acrylate/methacrylate, glycosylation, hydrogel contact lens

서 론

기능성 관능기를 당분자의 다양한 입체구조적 결합방식에 배당화하면 기능성 관능기의 종류와 배당화체의 결합방식에 따라서 광학활성, 입체구조특성, 생분해성, 생체적합성을 복합적으로 나타내는 기능성 당 화합물을 합성할 수 있는데 (1), 고기능성 복합소재를 필요로 하는 의용공학 분야의 광학재료와 생체재료분야에서는 당고분자(sugar polymer)를 중심으로 새로운 연구가 이루어지고 있다. 광학활성 생체재료는 재료공학적 특성뿐만 아니라 광학특성, 투과선택성, 흡수율, 생체적합성, 생체안정성 등의 기능이 중요시되며(2), 입체선택성이 우수한 당분자로서 중합될 수 있는 관능기를 가진 단량체를 배당화하면 광학특성 뿐만이 아니라 투과선택성, 흡수율, 생체안정성과 생체친화성 등의 생체공학적 특성이 조절되고, 중합조건에 따라서 재료공학적 특성이 복합적으로 나타나는 광학활성 생체고분자를 제조할 수 있다.

광학활성 생체재료로서 바람직한 생체공학적 특성을 나타내기 위해서는 고분자 골격의 구조단위가 광학적 특성뿐만 아니라 친수성을 공유하여야 하며, 그 구조 내에 수산기, 카르복실기와 같은 친수성 그룹으로 고분자 골격을 이루는 단

소의 소수성을 제어하여야 이상적인 생체재료가 되는 것으로 알려져 있다(3). 친수성을 공유한 광학재료로 이용할 수 있는 단량체로는 아크릴 계열의 모노머가 많이 이용되고 있는데, 최근 당분자의 수산기로 아크릴 관능기를 배당화한 당고분자가 의용공학적 특성이 우수하여 인공수정체와 콘택트렌즈용 소재로서 활용하기 위한 연구가 시도되고 있다(4-5). 특히, 안구와 같이 민감한 부위에 착용되는 콘택트렌즈용 생체재료의 경우에는 광학적 안정성과 함께 높은 흡수율과 산소투과도, 생체친화성과 안전성이 요구되는데, 폴리히드록시에틸 메타아크릴레이트(poly-HEMA, hydroxyethyl methacrylate)와 같은 기존소재는 광학특성은 우수하지만 착용시의 이질감과 단백질 흡착 및 안구질환과 관계되는 상당한 문제점이 지적되고 있다(6-8). 히드록시에틸 메타아크릴레이트와 같은 아크릴단량체는 탄소수가 작은 단순구조로서 수산기와 카르복실기를 공유하면서 중합성 비닐기를 내재하고 있으므로 광학활성 생체고분자의 제조에 가장 많이 이용되고 있지만 연속착용이 가능한 수준의 생체공학적 특성은 구비하고 있지 못하다. 분자구조내에 1급수산기가 2개 존재하는 메틸프루토시드(methyl fructoside)와 글리세롤로 아크릴기를 배당화하면 수산기의 입체적 결합방식과 치환도에 따라서 히드록시에틸 메타아크릴레이트보다도 의용공학적 생체특성이 강화된 글리코아크릴레이트(glycoacrylate)와 글리코메타아크릴레이트(glycomethacrylate)를 얻을 수 있고 연속착용이 가능한 콘택트렌즈용 아크릴단량체를 합성할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 아크릴산(acrylic acid)과 메타크릴산(methacrylic acid) 및 비닐에스테르

†Corresponding Author : Department of Biochemical Engineering,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1841, Fax : +82-62-530-1849
E-mail : dhpark@chonnam.ac.kr

(vinyl ester)를 배당화한 아크릴단량체로부터 중합한 배당화 고분자는 높은 친수성과 생체친화성을 나타내며 광학활성 재료로서 활용가치가 높을 것으로 예상된다.

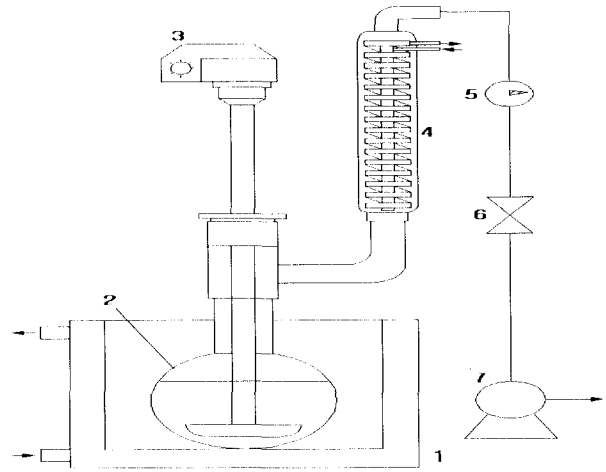
의용공학적 생체재료의 생산공정은 생체친화성과 생체안전성이 우선시 되어야 하는데 유전자조작기법에 근거한 효소반응기술의 발전과 함께 효소촉매의 위치특이성과 입체특이성을 이용하면 인체에 유해한 아노머의 생성반응을 방지할 수 있고 생체재료의 변성과 열화가 일어나지 않도록 재료안정성이 보장되는 온화한 반응조건을 설정할 수 있다는 점에서 효소촉매반응이 유망하다고 판단된다(9-11). Klibanov(12)는 유기상 효소반응을 이용하여 다양한 sugar acrylate에 대한 연구를 하였으며, 가장 큰 문제점인 당의 용해도를 증가시키기 위하여 페닐보로닉 산(phenylboronic acid)과 함께 3급 부탄올을 용매로 사용하고 리파제를 이용해 비닐 아크릴레이트를 당의 수산기로 에스테르화하여 24시간만에 80%의 전환율을 얻었다. Martin(13) 등의 연구자들은 당을 용해시키기 위하여 피리딘을 반응매질로 하여 alkaline protease 촉매로 당 비닐 에스테르를 합성하고 콘택트 렌즈용 당고분자의 생산기술에 관하여 특허 출원하였다. 유기상 효소적 합성반응은 기질의 용해도, 용매의 독성 및 효소의 활성도 등이 문제점으로 지적되고 있으나 유기상에서도 우수한 활성을 나타내는 효소가 개발되고 유기상 효소반응기술에 관한 지속적인 공정개선이 이루어지고 있다. 화학적인 합성법과 비교하여 효소가 가지는 기질특이성, 위치선택성 및 입체선택성에 의한 반응 선택성의 조절이 용이할 뿐만 아니라 반응조건이 온화하고 생체 적합성과 환경 친화성이 우수하며, 반응단계를 단순화할 수 있어서 분리정제 비용을 절감할 수 있으므로 앞으로 유망한 차세대 반응공정으로 발전될 것으로 기대된다.

본 연구에서는 메틸프루кто시드와 글리세롤을 배당화제로 하여 아크릴산과 메타크릴산 및 비닐에스테르를 효소적으로 에스테르화하여 콘택트렌즈와 인공수정체용 재료로서 의용공학적 및 생체공학적 응용성이 기대되는 glyco-acrylate/methacrylate의 효소적 합성공정을 개발하고 최적화하고자 하였다.

실험재료 및 방법

재 료

배당화제로 사용되는 메틸프루кто시드(β -methyl fructoside : MF)는 자당의 30% 메탄올 수용액에서 전화당효소로 과당의 수산기를 메톡시기로 치환하고 크로마토그래피법으로 분리정제하였고(14), 글리세롤은 Sigma제를 사용하였다. 글리코아크릴레이트(glycoacrylate)와 글리코메타크릴레이트(glycomethacrylate)를 합성하기 위한 효소촉매로는 Novozym 435(EC 3.1.1.3, *Candida antarctica*, 7000 proryl laurate units/g, Novo Nordisk) 고정화 리파제를 사용하였다. 아크릴산(acrylic acid : AA)과 메타크릴산(methacrylic acid : MA)은 Junsei제, 비닐아크릴레이트(vinyl acrylate)와 비닐메타크릴레이트(vinyl methacrylate)는 TCI제를 사용하였고 수분제거제로는 제올라이트(molecular sieves, 3Å, powder form, Sigma)를 사용하였다. 반응매질로 사용된 3급 부틸 알콜(t-butyl alcohol)은 제올라이트로 수분을 제거한 후 사용하였고, 기타 시약들은 HPLC급을 사용하였다.

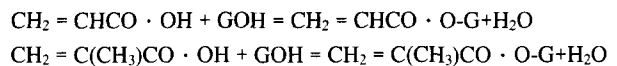


1. Water bath 2. Reactor 3. Stirrer 4. Condenser
5. Vacuum gauge 6. Needle valve 7. Vacuum pump

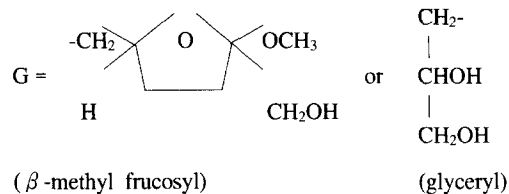
Figure 1. Experimental reactor set-up for enzymatic synthesis of methyl fructoside acrylate and methacrylate.

실험방법

반응매질에 배당화제와 아크릴공여체를 용해시키고, 중합 방지제로 하이드로퀴논(hydroquinone)을 0.05%(w/v) 첨가한 후에 효소함량, 배당화제 초기농도와 몰비, 아크릴공여체 등을 변화시키면서 반응온도 40~50℃로 유지된 Figure 1의 회전식 반응기에서 아크릴공여체를 리파제 촉매로 다음과 같이 배당화하였다.



여기에서



채취한 시료는 HPLC(600E pump & controller, M746 integrator, Waters)법으로 분석하였다. 메틸프루кто시드의 농도는 탄수화물 칼럼(carbohydrate column, 4.6×250 mm, Waters)에 20 μ L의 시료를 주입하고 아세트오니트릴/초순수(75:25, 1.4 mL/min)를 이동상으로 하여 RI검출기(R401 RI detector, Waters)로 측정하였고, 글리코아크릴레이트는 아미노-실리카 칼럼(RCM 100, 8×100 mm, Waters)을 고정상으로 하고 아세트오니트릴/메탄올/초순수(55:45:5, 1 mL/min)를 이동상으로 하여 UV검출기(205 mm, 486 UV spectrophotometer, Waters)로 분석하였다. 배당화 전환율은 반응 전후의 배당화제 농도차로서 계산하였다.

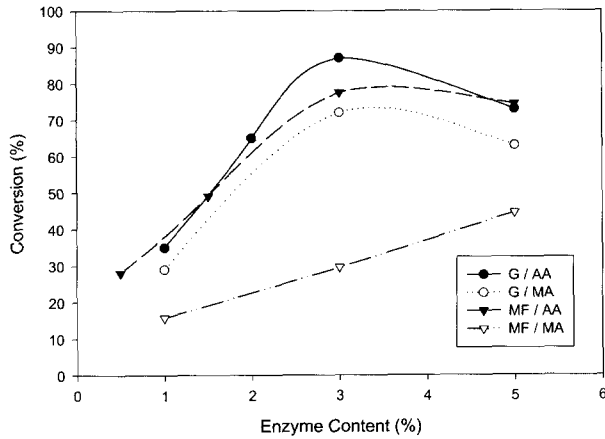


Figure 2. Effect of enzyme content on equilibrium conversion in lipase-catalyzed glycosylation of acrylic acid and methacrylic acid.

결과 및 고찰

반응매질과 효소 첨가량

글리코 아크릴레이트 합성을 위한 반응매질은 배당화 반응 속도와 수율, 효소활성도 및 생성물의 분리정제의 관점에서 선정되어야 한다. 이와 같은 관점에서 3급 알콜류가 바람직한 물성을 구비한 것으로 알려져 있으므로 3급 아밀알콜과 3급 부틸알콜의 타당성을 검토한 결과 3급 아밀알콜(*t*-amyl alcohol)보다 3급 부틸알콜(*t*-butyl alcohol)이 기질용해도가 더 높고 효소안정성이 우수할 뿐만 아니라 비점이 낮아서 재순환 비용이 절감되었으므로 3급 부틸알콜을 반응매질로 사용하였다. 또한, 배당화제에 대하여 강한 친화력을 나타내는 3급 부틸알콜은 위치선택효과(regioselective effect)를 나타내는데 이점이 있다(9).

효소적 합성공정이 화학적 합성공정에 대하여 경제성을 확보하기 위해서는 가능한 한 효소첨가량이 최소화되어야 한다. Figure 2는 고정화 리파제(Novozym 435)의 첨가량에 대하여 배당화전환율을 비교분석한 연구결과로서 반응체적에 대한 중량백분율로 0.5%에서 5%까지 첨가하고 50℃에서 12~60 시간 동안 반응시킨 평형 전환율을 도시하였다. 글리코아크릴레이트 합성반응에서는 효소첨가량 3%일 때 최대 배당화 전환율을 나타내었고 3%이상에서는 오히려 전환율이 감소하므로 글리코아크릴레이트 합성반응계의 최적 효소첨가량은 3%임을 알 수 있었다. 효소첨가량이 최적첨가량이상이 되면 효소가 기질인 아크릴산과 착화합물을 형성하여 아크릴산을 배당화할 뿐만 아니라 생성물인 글리코아크릴레이트도 착화합물을 형성하면서 해리반응이 진행되고 오히려 평형전환율이 감소한 것으로 판단된다.

배당화제가 글리세롤인 글리세롤메타크릴레이트 합성반응의 경우에는 효소첨가량 3%에서 최대전환율을 나타내므로 최적 효소 첨가량이 3%임을 알 수 있었으나, 메틸프록토시드 메타크릴레이트인 경우에는 효소 첨가량에 대하여 전환율이 선형적으로 증가하였으며 비교적 효소함량이 높음에도 불구하고 전환율이 50%에도 미치지 못하였다. 메타크릴산의 α 탄소에 치환되어 있는 메틸기는 메타크릴산이 리파제의 활성점에 계면흡착하는데 방해될 뿐 만 아니라 글리세롤 분자보

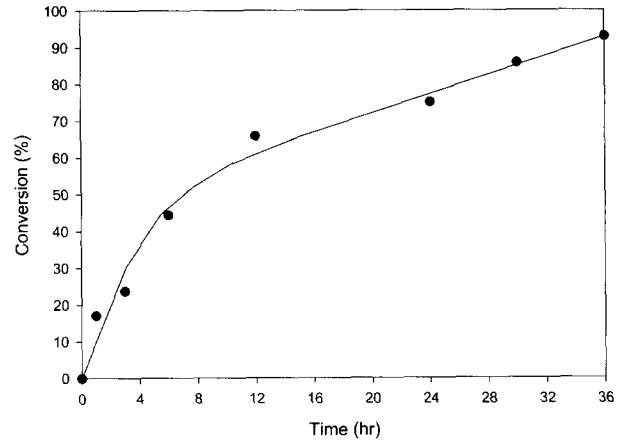


Figure 3. Transient conversion in lipase-catalyzed glycosylation of vinyl methacrylate with methyl fructoside.

다도 상대적으로 더 큰 메틸프록토시드 분자가 효소의 활성점에 접근하면 입체장애(steric hindrance)를 나타내기 때문이다(9). 메틸프록토시드 메타크릴레이트 합성공정에서 효소첨가량이 많으면 효소적 합성공정의 경제성이 의문시됨으로 효소첨가량을 낮추기 위하여 메타크릴공여체로서 메타크릴산보다는 비닐메타크릴레이트를 사용하였다. Figure 3은 비닐메타크릴레이트를 메타크릴공여체로 사용하여 초기농도 150 g/ℓ, 효소첨가량 1%, 물비 1 : 2, 반응온도 40℃에서 배당화 전환율을 도시한 것으로 효소첨가량이 1%임에도 불구하고 90% 이상의 높은 전환율을 얻었다. 비닐 메타크릴레이트를 사용할 경우에는 배당화반응이 진행됨에 따라서 비닐 알코올이 생성되는데, 생성과 동시에 아세트알데히드로 호변이성화(tautomeric isomerization) 되므로 배당화 반응의 비가역성이 촉진되기 때문에 높은 전환율에 도달하였다

배당화제의 초기농도와 물비의 영향

효소적 합성공정은 화학적 합성공정에 비하여 온화한 조건 하에서 반응이 이루어지므로 재료안정성이 높고 에너지비용이 적으며 기질특이성과 위치특이성을 활용하면 입체광학적으로 순수한 생성물만이 합성되므로 분리정제비용을 절감할 수 있어서 유망한 합성반응기술로 평가되고 있다. 그러나 효소촉매의 활성도는 화학촉매보다도 낮기 때문에 비교적 반응시간이 길고 전환율이 낮으므로 배당화제 초기농도를 높게 유지하여야 하지만 초기농도가 높으면 원료비의 비중이 증가하고 생성물의 분리정제비용이 상승함으로 배당화 전환율에 미치는 초기농도의 영향은 체계적으로 최적화되어야 한다.

효소적 배당화 반응공정에서 생산성에 미치는 영향이 가장 큰 조업인자는 배당화제의 초기농도이며 50℃에서 초기농도를 50~200 g/ℓ로 변화시켜 초기농도가 전환율에 미치는 영향을 Figure 4에 도시하였다. 메틸프록토시드와 글리세롤에 의한 아크릴산의 배당화반응에서 초기농도가 각각 150 g/ℓ, 50 g/ℓ일 때 최대 전환율이 약 80%에 도달하였고 그 이상의 농도에서는 평형전환율 혹은 배당화 속도가 현저히 감소하였다. 배당화제의 농도가 한계농도 이상이 되면 점도효과가 나타나서 고정화 리파제의 세공에서 아크릴산의 세공확산 저항이 증대하므로 효소의 활성점과 착화합물을 형성하는 것

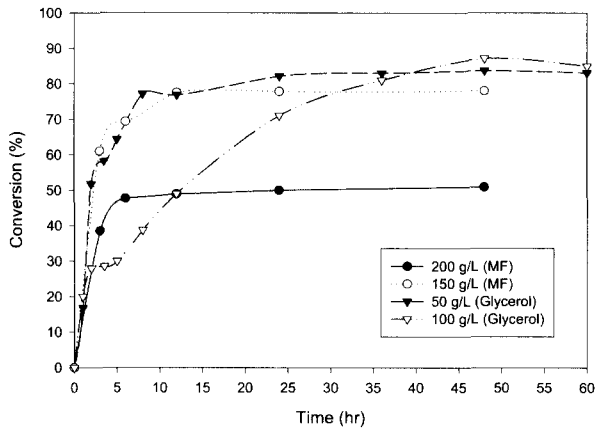


Figure 4. Effect of initial concentration of glycosylation agent on conversion in lipase-catalyzed glycosylation of acrylic acid.

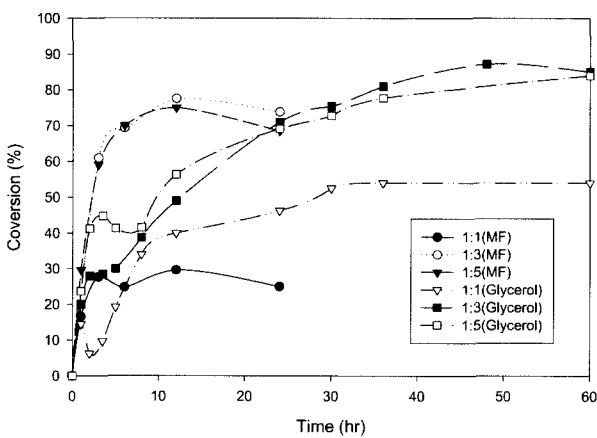


Figure 5. Effect of molar ratio of acrylic acid to glycosylation agent on conversion in lipase-catalyzed glycosylation of acrylic acid.

을 방해하는 것으로 판단된다. 아크릴산의 배당화반응에서 메틸프록토시드와 글리세롤의 최대 초기농도는 각각 150 g/l, 50 g/l 임을 알 수 있었다.

메틸프록토시드에 의한 배당화반응은 1급 수산기인 1번 탄소와 6번 탄소의 수산기에서 이루어지는데 2번 탄소에 결합된 메톡시기로 인하여 1번 수산기보다는 6번 수산기의 배당화 반응성이 더 높아서 1-아크릴레이트보다는 6-아크릴레이트가 생성되며 친수성이 강한 3급 부탄올은 6-모노아크릴레이트의 1번 수산기를 리파제의 활성점이 아니라 용매쪽으로 배향되도록 위치선택효과를 나타내기 때문에 1,6-디아크릴레이트는 생성되지 않는다(9). 또한, 1급 수산기가 2개인 글리세롤에 의한 배당화 반응에서도 용매의 위치선택효과에 의하여 α -모노아크릴레이트만이 합성된다. 따라서 메틸프록토시드와 글리세롤에 대한 아크릴산의 이론적인 몰비는 1 : 1이어야 하지만 배당화 전환율과 반응속도를 높게 유지하고 배당화반응이 가역반응임을 고려할 때에 이론몰비보다도 더 높은 몰비를 사용하여야 한다. Figure 5는 50℃에서 배당화제와 아크릴산의 몰비가 배당화반응의 전환율과 반응속도에 미치는 영향을 비교 분석한 것으로 몰비가 1 : 1에서 1 : 3으로 증가하면서 반응속도와 전환율이 증가하였으나 몰비 1 : 3 이상에서는 더 이상 증가하지 않았으므로 아크릴산 배당화 반

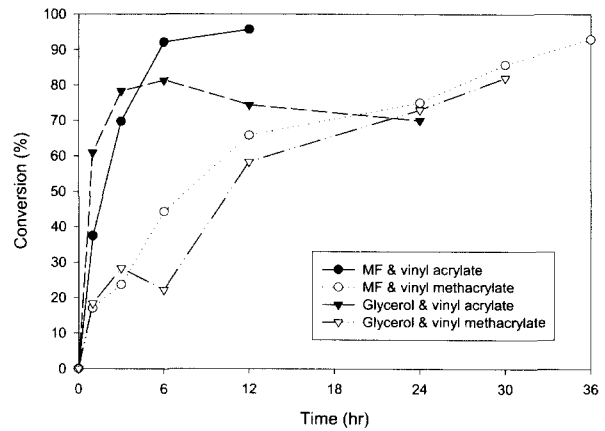


Figure 6. Transient conversion in lipase-catalyzed glycosylation of vinyl acrylate and vinyl methacrylate.

응의 최적 몰비는 1 : 3임을 알 수 있었다.

그러나, 메타크릴산의 배당화 반응에서는 아크릴산의 배당화 반응과는 달리 배당화제의 초기농도와 몰비 및 효소농도가 높다하여도 만족할 만한 반응속도와 전환율을 얻을 수 없었다. 메타크릴산이 배당화되기 위해서는 먼저 메타크릴산이 리파제의 활성점에서 계면흡착이 이루어져야 하는데 탄소사슬길이가 짧은 메타크릴산의 α 탄소에 결합된 메틸기는 메타크릴산의 계면흡착에 입체장애가 되므로 아크릴산의 배당화 속도와 전환율보다도 현저히 감소하였다. 따라서 글리코메타크릴레이트를 효과적으로 합성하기 위해서는 메타크릴공여체로서 메타크릴산보다는 비닐메타크릴레이트(vinyl methacrylate)가 바람직하다고 판단되었다.

비닐메타크릴레이트는 메타크릴산보다도 탄소사슬길이가 길어서 메틸기에 기인한 입체장애에 효과가 감소되고 비닐기의 이중결합이 비닐메타크릴레이트의 계면흡착에 관한 활성화에너지를 감소시키며 배당화 반응시 생성된 비닐알콜은 아세트알데히드로 호변이성화 되면서 배당화 반응을 비가역적으로 진행시킨다. Figure 6은 글리세롤 50 g/l 와 MF 150 g/l, 반응온도 40℃, 효소농도 1%일 때 몰비 2인 비닐메타크릴레이트와 몰비 1인 비닐아크릴레이트의 배당화 전환율을 도시한 것으로 비닐메타크릴레이트의 배당화 전환율은 90% 이상, 비닐아크릴레이트의 배당화 전환율은 80% 이상에 도달하였다. 아크릴산과 메타크릴산의 배당화 반응의 경우보다도 몰비와 효소농도가 낮음에도 불구하고 배당화 속도와 최종전환율은 더 높게 유지되었으며 비닐메타크릴레이트와 비닐아크릴레이트가 효과적인 메타크릴/아크릴 공여체임을 알 수 있었다.

요 약

의용공학적 특성과 생체공학적 특성이 요구되는 연성콘택트렌즈를 제조하기 위하여 아크릴산과 비닐메타크릴레이트를 메틸프록토시드와 글리세롤로 배당화하여 글리코아크릴레이트와 글리코메타크릴레이트를 효소적으로 합성한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 아크릴산을 배당화하는 경우에는 메틸프록토시드와 글리세롤의 초기농도가 각각 150 g/l 와 50 g/l, 몰비 1 : 3, 효소첨가량 3%(w/v), 반응온도 50℃에서 약 80%의 배당화 전환율을 얻었고, 비닐 메타아크릴레이

트를 배당화하는 경우에는 메틸프록토시드와 글리세롤의 초기농도가 각각 150 g/l 와 50 g/l, 효소첨가량 1%(w/v), 물비 1:2, 반응온도 40°C에서 90% 이상의 배당화 전환율에 도달하였으며 hydrogel contact lens의 흡수율을 조절하기 위한 단량체와 수분조절제로서 활용될 것으로 기대된다.

REFERENCES

1. Chen, X., B.D. Martin, T.K. Neubauer, R.J. Linhardt, J.S. Dordick, and D.G. Rethwisch (1995), Enzymatic and Chemoenzymatic Approaches to Synthesis of Sugar-based Polymer and Hydrogel, *Carbohydrate Polymers*, **28**, 15-21.
2. Novick, S. J. and J. S. Dordick (1998), Preparation of Active and Stable Biocatalytic Hydrogel for Use in Selective Transformations, *Chem. Matr.*, **10**, 955-958.
3. Patil, N. S., J. S. Dordick, and D. G. Rethwisch (1996), Macroporous Poly (sucrose acrylate) Hydrogel for Controlled Release of Macromolecules, *Biomaterials*, **17**, 2343-2350.
4. Martin, B. D., S.A. Ampofo, R.J. Linhardt, and J.S. Dordick (1992), Biocatalytic Synthesis of Sugar-Containing Poly(acrylate)-Based Hydrogels, *Macromolecules*, **25**, 7081-7085.
5. Chen, X., J. S. Dordick, and D. G. Rethwisch (1995), Chemoenzymatic Synthesis and Characterization of Poly (α -methyl galactoside 6-acrylate) Hydrogels, *Macromolecules*, **28**, 6014-6019.
6. Refojo, M. F. (1996), Contact Lenses, Hydrogels, *Polymeric Materials encyclopedia*, Vol. 2, pp1504-1509, CRC Press, New York.
7. Ruben, M. and M. Guillon (1994), *Contact Lens Practice*, Chapman & Hall Medical, London.
8. Lai, Y. C., A. C. Wilson, and S. G. Zantos (1993), Contact Lenses, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th ed., Vol. 7, pp192-218, John Wiley, New York.
9. Rich, J. O., B. A. Bedell, and J. S. Dordick (1995), Controlling Enzyme-Catalyzed Regioselectivity in Sugar Ester Synthesis, *Biotechnol. & Bioengng.*, **45**, 426-434.
10. Kitagawa, M. and Y. Tokiwa (1998), Synthesis of a Polymerizable Glucose Ester in Hydrophilic Organic Solvents Catalyzed by Alkaline Protease, *J. Carbohydrate Chemistry*, **17**(6), 893-899.
11. Dorick, J. S. (1992), Enzymatic and Chemoenzymatic Approaches to Polymer Synthesis, *Trends Biotechnol.*, **10**, 287-293.
12. Ikeda, I. and M. Klibanov (1993), Lipase-Catalyzed Acrylation of Sugars Solubilized in Hydrophobic Solvents by Complexation, *Biotechnol. & Bioengng.*, **42**, 788-791
13. Martin, B. D., J.S. Dordick, D.G. Rethwisch, D.R. Patil, and R.J. Linhardt (1998), *US Patent No. 5,854,030*.
14. J.H. Heo., I.S. Yoo, and H.S. Kim (1996), A Study on the Purification Process of Methyl Fructoside by Liquid Chromatography, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **11**(5), 529-535.