

## 히스티딜기등을 포함하는 미셀성 계면활성제를 촉매로 사용한 파라니트로페닐 에스테르의 가수분해반응에 관한 연구

具原會 · 洪春杓<sup>†</sup>

한남대학교 이공대학 화학과

\*공주사범대학 화학교육과

(1988. 3. 14 접수)

## A Study on the Hydrolysis of p-Nitrophenyl Carboxylates by Micellar Surfactants Catalysts Involving Histidyl Residue

Won Fae Koo and Choon Pyo Hong\*<sup>†</sup>

Department of Chemistry, Hannam University, Daejeon 300-090, Korea

\*Department of Chemical Education, Kongju National Teacher's

University, Kongju 314-110, Korea

(Received March 14, 1988)

**요 약.** 파파인효소의 가수분해반응을 이해하기 위하여 파파인의 활성점에 모여 있는 히스티딘, 시스테인, 및 히스티딘-시스테인을 포함하는 양이온성 펩티드-계면활성제를 합성하였다. 이것을 촉매로 사용하여 PNPL를 가수분해 시킬때 pH 7.40에서 촉매의 효율성은  $\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$ 과 비교하여  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}$ ,  $\text{NC}_2\text{HisCysC}_{12}$ ,  $\text{NC}_2\text{HisCysC}_{12}$  순으로 현저한 증가를 나타내고 그 이유는  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}$ 는 이미다졸기,  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}$ 는 티올기 영향이며, 가장 좋은 촉매효율을 나타내는  $\text{NC}_2\text{HisCysC}_{12}$ 은 이미다졸기와 티올기의 상호작용 때문이다. 가수분해반응을 촉진시키는 펩티드-계면활성제의 이미다졸기와 티올기들의 활동성을 나타내는 해리상수, pKa는 각각 6.49, 10.50 이고, 기능기에 의한 속도상수,  $k_m^*$ 는 각각  $7.91 \times 10^{-4} \text{S}^{-1}$ ,  $6.00 \times 10^{-4} \text{S}^{-1}$ 이었다. 가수분해에대한 혼합미 셀계의 촉매효과는 파라니트로페닐 에스테르의 알킬기의 탄소수가 증가함에 따라 증가하므로 기능기의 작용외에 미셀의 소수성 부분과 기질사이의 상호작용에 의하여도 증가됨을 알았다.

**ABSTRACT.** In order to obtain a clue in understanding enzymatic hydrolysis in which the His-Cys moieties of papain protease is involved, we prepared cationic peptide-surfactants bearing histidyl, cysteinyl, and both histidyl and cysteinyl residues. Their catalytic efficiency toward the hydrolysis of PNPL were investigated in micellar phases formed with  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}$ ,  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}$ ,  $\text{NC}_2\text{HisCysC}_{12}$  increased markedly in the same order compared with that of  $\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$ . The markedly increased catalytic effects are attributed to the imidazole groups of  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}$  and the thiol groups of  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}$ , and the large catalytic efficiency of  $\text{NC}_2\text{HisCysC}_{12}$  is considered due to the interaction of the imidazole and the thiol groups. In order to investigate catalytic activities, rate constants for the functional groups,  $k_m^*$  and dissociation constants, pKa have been determined. The results showed that  $k_m^*$  and pKa of the imidazole groups were  $7.91 \times 10^{-4} \text{S}^{-1}$  and 6.49, and those of the thiol groups were  $6.00 \times 10^{-4} \text{S}^{-1}$  and 10.50. The catalytic effects of micellar systems on the hydrolysis of p-nitrophenyl esters has increased according to the increasing size of the alkyl carbon number. Therefore, the catalytic effects have been increasing by the interaction of micellar hydrophobic parts and substrates as well as action of the functional groups.

## 서 론

용액에서 미셀을 형성하는 계면활성제의 특징은 극성부분과 비극성부분이 존재하는 친양쪽성(amphiphilicity)이나 양극성(amphiphaticity)를 갖는 것이다. 이러한 계면활성제는 자연적으로 얻어지는 것과 합성하여 얻을 수 있는 것이 있으며 생리학, 일상생활 및 여러산업에 널리 이용된다<sup>1</sup>. 최근에 고분자에 천연효소를 도입시킨 고분자-촉매에 의한 가수분해반응 연구는 Overberger 등에 의하여 시작되었으며<sup>2</sup>, 여러 연구자들은 가수분해 효소인 키모트립신을 모방하여 히스티딘, 세린, 및 아스파르트산등을 도입시킨 고분자-촉매를 주로 연구하였고, 그 후 다른 보조 효소의 기능기를 도입시킨 고분자-촉매에 관한 연구도 활발하다<sup>3-14</sup>. 효소들은 대부분 구상 단백질로서 펩티드 사슬로 적당히 접히고 꼬여져 전체적인 형태는 달걀 모양과 같으며, 극성기는 표면에 노출되어 물과 접해있고, 소수성 결사슬 들은 내부에 위치하여 미셀과 유사하다. 그러므로 본 연구에서는 효소, 파파인을 모방하여 알라닌, 히스티딘, 시스테인, 및 히스티딘-시스테인을 포함하는 펩티드-계면활성제를 합성하여, 이것을 촉매로 사용하여 PNPL의 가수분해에 대한 촉매의 효율성 및 활동성등을 조사하고, 미셀의 소수성 그룹과 파라니트로페닐 에스테르의 알킬기의 상호작용등을 조사하였다.

## 실 험

실험에 사용한 기기는 Pye Unicam SP 8-400 UV/visible spectrophotometer, Varian EM-360A NMR spectrometer, JASCO IRA-1 spectrophotometer, PERKIN ELMER PE 240A 원소분석기, 및 IBM-PC컴퓨터등을 사용하였다.

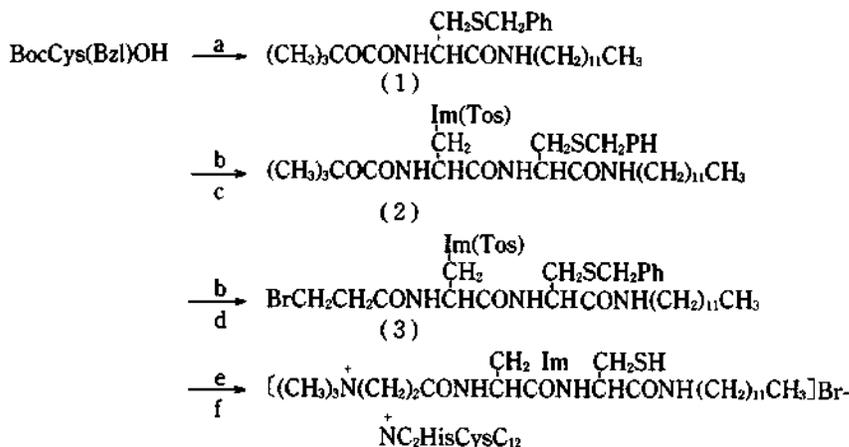
히스티딘, 시스테인 및 알라닌 등은 Fluka사 제품, 아미노산의 이미노기를 보호하기 위한 2-(t-butoxycarbonyl thio)-4,6-dimethylpyrimidine은 TCI사 제품을 사용하였고, 파라니트로페닐 에스테르들은 파라니트로페놀과 합당한 아

실 클로라이드로 합성하여 분광화학적 방법과 녹는점으로 확인하였다<sup>15</sup>.  $\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$ ,  $\text{N}^+\text{C}_2\text{HisC}_{12}$  및  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}$ 은 Murakami 등의 합성방법과 유사하게 합성하였다.<sup>16-18</sup>

**N-Dodecyl-N<sup>+</sup>-(3-(trimethylammonio)propionyl)-L-histidinamide Bromide,  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}$ .** 클로로포름-디클로로메탄으로부터 재결정하여 갈색가루를 얻었다. 녹는점 125-130°C. IR(KBr); 3360(NH, str.), 2980, 2900(CH, str.), 1670, 1560(C=O, str.). NMR(chloroform-d<sub>1</sub>); 0.90(3H, t,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$ -), 1.30(20H, s,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$ -), 2.40(2H, broad,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 2.85-3.35(17H, broad,  $-\text{CO}-\text{NHCH}_2^-$ ,  $\text{NCH}_2^-$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2^-$ ,  $\text{CH}_2\text{Im}$ ), 4.50(H, m,  $-\text{CHCO}-$ ), 7.28, 8.32(2H, s,  $-\text{Im}$ ). 원소분석: 계산값,  $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{BrN}_5\text{O}_2$ , C: 53.93, H: 7.78, N: 16.45, 이론값, C: 53.89, H: 7.75, N: 16.44.

**N-Dodecyl-N<sup>+</sup>-(3-(trimethylammonio)propionyl)-L-cysteinamide Bromide,  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}$ .** 에틸아세테이트-석유 에테르으로 재결정하여 최종산물을 얻었다. 녹는점 133-143°C. IR(KBr); 3340(NH, str.), 2920, 2850(CH, str.), 1650, 1560(C=O, str.). NMR(methanol-d<sub>4</sub>); 0.90(3H, t,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$ -), 1.30(20H, s,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$ -), 2.40(2H, broad,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 2.65-4.35(6H, m,  $-\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9-$ ), 3.18(11H, m,  $(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2^-$ ), 4.35(1H, m,  $-\text{CH}-$ ). 원소분석: 계산값,  $\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{BrN}_3\text{O}_3\text{S}$ , c: 52.28, H: 9.13, N: 8.71, 이론값, C: 52.39, H: 9.10, N: 8.65.

**N-Dodecyl-N<sup>+</sup>-(3-(trimethylammonio)propionyl)-L-alaninamide Bromide,  $\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$ .** 에틸아세테이트로부터 재결정하여 흰색가루를 얻었다. 녹는점 90-94°C. IR(KBr); 3420(NH, str.), 2970, 2900(CH, str.), 1700, 1670(C=O, str.). NMR(chloroform-d<sub>1</sub>); 0.88 (3H, t,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$ -), 3.00-3.40 (4H, m,  $-\text{NHCH}_2^-$ ,  $-\text{NCH}_2^-$ ), 3.30 (9 H, s,  $(\text{CH}_3)_3\text{N}-$ ), 4.45 (1H, m,  $-\text{CH}-$ ). 원소분석: 계산값,  $\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{BrN}_3\text{O}_2$ , C: 54.90, H: 9.80, N: 9.15, 이론값, C: 54.98, N: 9.05.  $\text{N}^+\text{cys}-(\text{NN}^+\text{his}-3-(\text{trimethylammonio})\text{-propionyl})\text{-L-histidyl-L-dodecyl-L-cysteinamide bromide}$ ,  $\text{N}^+\text{C}_2\text{HisCysC}_{12}$ 의 합성방법을 Scheme 1에 나타내었다.



Scheme 1<sup>a,b</sup>. Reagents : a,  $\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_2$  and DCC ; b,  $\text{CF}_3\text{COOH}$  ; c,  $\text{BosHis(Tos)OH}$  and DCC ; d,  $\text{Br}(\text{CH}_2)\text{COCl}$  ; e,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$  ; f,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3/\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , and HF. <sup>a</sup>Abbreviation : Abbreviation : Boc, t-butoxycarbonyl ; Bzl, benzyl ; Ph, phenyl ; Im, imidazol ; Tos, tosyl.

**N-Dodecyl-N<sup>t</sup>-butoxycarbonyl-S-benzyl-L-cysteinamide (1).** 디클로로메탄 40ml를 100ml 둥근바닥 플라스크에 넣고 dicyclohexylcarbodiimide (6.4g, 0.03mol)과 N-(t-butoxycarbonyl)-S-benzyl-L-cysteine (8.91g, 0.03mol)을 가하여 녹인 후 0°C로 냉각하고 잘 저으면서 1-아미노 도데칸(5.4g, 0.03mol)을 가하고 0°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 완전히 진행 된 후 용액중의 흰색 고체를 여과하여 버리고 여과액을 감압건조하였다. 위에서 얻은 물질은 hexan-에틸아세테이트로 재결정하여 흰색고체를 얻었다. 녹는점 86-87°C. IR ; 3310(NH, str.), 2920, 2880(CH, str.), 1680, 1530(C=O, str.). NMR : 0.88(3H, t,  $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 1.27(20H, s,  $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 1.45(9H, s,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}-$ ), 2.82(2H, d,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ), 3.23(2H, broad,  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ), 3.75(2H, s,  $-\text{SCH}_2\text{Ph}$ ), 4.57(H, broad,  $-\text{CH}-$ ), 7.31(5H, s,  $-\text{Ph}$ ).

**N<sup>t</sup>-(t-butoxycarbonyl)-N<sup>im</sup>-tosyl-L-histidyl-dodecyl-S-benzyl-L-cysteinamide (2).** 트리플루오르 아세트산 25g을 100ml 둥근바닥 플라스크에 넣고 6.06g (1)을 17ml의 디클로로메탄에 녹인 용액을 가한 후 실온에서 1시간 동안 저어준 후 여분의 트리플루오르 아세트산을 40°C 이하에서 제거하였다. 디클로로메탄 20ml에 t-

butoxycarbonyl-N<sup>im</sup>-tosyl-L-histidine 5.01g 녹인 용액을 넣고 dicyclohexylcarbodiimide 2.98g을 가하고 0°C에서 3시간, 실온에서 24시간 동안 저어주었다. 반응이 종결된 후 포화소금물 50ml로 2번, 10% 시트르산수용액 50ml로 2번, 포화소금물 50ml로 2번 닦고, 무수황산 나트륨으로 수분을 제거하고 건조하였다. hexan과 에틸아세테이트로부터 재결정하여 순수 물질을 얻었다. IR : 3320(NH, str.), 2960, 2900(CH, str.), 1700, 1540(C=O, str.). NMR : 0.90(3H, t,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}-$ ), 1.30(20H, s,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}-$ ), 1.37(9H, s,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$ ), 2.45(3H, s,  $-\text{PhCH}_3$ ), 2.65-3.15(6H, broad,  $-\text{NHCH}_2-$ ,  $-\text{CHCH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CHCH}_2-$ ), 3.75(2H, s,  $-\text{SCH}_2\text{Ph}$ ), 4.53(2H, broad,  $-\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}-$ ), 7.18-8.30(11H, broad,  $-\text{Im}$ ,  $-\text{PhCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ).

**N<sup>cys</sup>-(N<sup>his</sup>-(3-Bromopropionyl)-N<sup>im</sup>-tosyl-L-histidyl)-N-dodecyl-S-benzyl-L-cysteinamide (3).** (2)화합물의 t-butoxycarbonyl 기를 위와 같은 방법으로 제거하여 얻은 아민화합물을 디클로로 메탄에 녹여 0°C로 냉각하였다. 위 용액에 트리메틸 아민(0.82g, 8.1mmol)과 3-bromopropionyl chloride (1.87g, 9.7mmol)을 가하고 0°C에서 3시간, 실온에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 후 용매를 감압 건조하고 에틸아

세테이트를 가하여 침전물을 제거하고 여과액을 위와 같은 방법으로 잘 닦고 감압 건조하여 점성이 큰 노란액체를 얻었다.

$N^{\oplus}_{cys}(N^{\oplus}_{his}(3-(\text{trimethylammonio})\text{-propionyl})\text{-L-histidyl})\text{-N-dodecyl-L-cysteinamide Bromide}$ ,  $NC_2\text{HisCysC}_{12}$ . 위에서 얻은 (3)의 물질 30 ml를 가하여 녹인 후 트리메틸 아민기체를 6시간 동안 기포로 반응시킨 후, 토실기와 벤질기를 제거하기 위하여 40% 트리메틸 아민 수용액 10ml와 아세톤 10ml를 가하고 6시간 동안 반응시킨 후 감압 건조하였다. 이 물질 900mg을 작은 플라스틱 용기에 넣고 hydrogen fluoride 10 ml를 가한 후 1°C에서 1시간, 15°C에서 30분 동안 반응시킨 후 hydrogen fluoride를 제거하고 메탄올 30ml를 가하여 녹이지 않는 흰색 침전물을 여과하여 버리고 여과액을 감압 건조하였다. 그리고 2-mercapto ethanol 5ml를 가하여 실온에서 14시간 동안 저어준 후 메탄올 10ml에 녹여 Sphades LH20-100으로 겔 여과(메탄올)하여 최종산물을 얻었다. 녹는점 155-159°C. IR; 3350 (NH, str.), 2980, 2880(CH, str.), 1640, 1570(C=O, str.). NMR; 0.88(3H, t,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}^-$ ) 1.30(20H, s,  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{10}^-$ ), 2.40(2H, broad,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 2.75-3.15(17H, broad,  $-\text{CH}_2\text{SH}$ ,  $-\text{NHCH}_2^-$ ,  $-\text{NCH}_2^-$ ,  $-\text{CH}_2\text{Im}$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 4.50(2H, broad,  $-\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}-$ ), 7.30, 8.30(2H, s,  $-\text{Im}$ ). 원소분석: 계산값,  $C_{27}H_{51}BrN_6O_4S_2H_2O$ , C: 47.58, ) : 7.78, N: 16.45, 실험값, C: 47.56, H: 7.80, N: 16.37.

**반응속도의 측정.** 에스테르의 가수분해 반응속도를 관찰하기 위한 미셀용액은 계면활성제를 0.1M에탄올용액으로, 기질은 디옥산에 0.1M을 만들어 해당된 농도로 묽혀서 사용하였다. 완충용액은 pH4-6은 potassium succinate와 0.05M sodium borate 수용액으로, pH6-9는 0.1M potassium dihydrogen phosphate와 0.05M sodium borate 수용액으로 pH9-11은 0.05M sodium borate와 0.05M sodium carbonate 수용액으로 만들어 사용하였다. pH6이하에서는 317nm, pH6이상에서는 400nm에서 파라니트로페놀의 생성되는 양을 측정하였고, 모든 반응속도와 속도론적 데이터는 컴퓨터로 계산하였다.

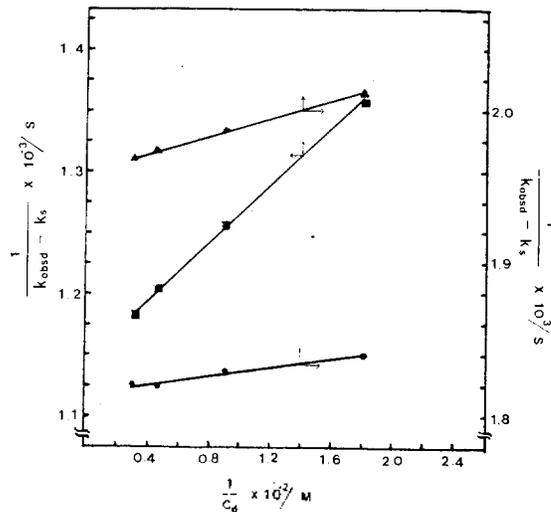
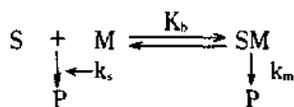


Fig. 1. Lineweaver-Burke plots for the hydrolysis of PNPL as catalyzed by comicelles of  $NC_2\text{HisC}_{12}/NC_2\text{HisC}_{12}$  ( $\blacktriangle$ ),  $NC_2\text{CysC}_{12}/NC_2\text{AlaC}_{12}$  ( $\blacksquare$ ), and  $NC_2\text{HisCysC}_{12}/NC_2\text{AlaC}_{12}$  ( $\bullet$ ) in ethanol-dioxane-water (10:1:89, v/v) at pH 7.40,  $\mu=0.80(\text{KCL})$ , and  $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ;  $C_d = [\text{surfactant}] + [NC_2\text{AlaC}_{12}]$ ;  $[\text{surfactant}]/[NC_2\text{AlaC}_{12}] = 1/10$ ; initial concentration of PNPL =  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ .

## 결과 및 고찰

**미셀계의 촉매효과.** 촉매로서  $NC_2\text{HisC}_{12}$ ,  $NC_2\text{CysC}_{12}$  및  $NC_2\text{HisCysC}_{12}$ 와  $NC_2\text{AlaC}_{12}$  혼합미셀 (comicelle)용액에서 파라니트로페놀 도데칸노에이트(PNPL)의 가수분해를 에탄올-디옥산-물 (11:1:88, v/v), pH=7.30,  $\mu=0.80(\text{KCL})$ , 및  $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 에서 연구하였다. 1차 속도상수,  $k_{obs}$ 는 파라니트로페놀의 생성되는 양으로 얻었고 E>S인 조건에서  $k_{obs}$ 는 에스테르가 85% 가수분해가 진행될 때까지 명백한 1차 속도법칙을 따랐다. 여기서 E는 촉매이고, S는 기질이다.  $NC_2\text{AlaC}_{12}$ 와 다른 펩티드-계면활성제의 혼합미셀계에서 PNPL의 가수분해에 대한 속도상수,  $k_{obs}$ 와 혼합미셀 농도와 관계를 Fig.1에 나타내었다. 혼합미셀계에서 에스테르의 가수분해에 대한 속도론적 데이터는 아래와 같은 경로에 따라 분석되어졌다.<sup>16,20</sup>



Scheme 2

여기서 S는 기질, M은 미셀, SM은 미셀-기질 복합체, P는 생성물,  $k_s$ 와  $k_m$ 은 벌크용매와 혼합미셀계에서 생성물의 생성속도상수, 및  $K_b$ 는 미셀-기질복합체의 결합상수이다.  $k_{obsd}$ 와 Scheme 2의 속도론적 파라미터의 관계는 등식(1)과 같다.

$$\frac{1}{(k_{obsd}-k_s)} = \frac{1}{(k_m-k_s)} + \frac{N}{(k_m-k_s)K_b C_d} \quad (1)$$

여기서  $C_d$ 는 펩티드-계면활성제의 전체농도이고, N은 미셀을 이루는 단량체의 수이다. 등식(1)으로부터 계산된 속도론적 데이터를 Table 1에 나타내었다.

Table 1에 나타난 것과 같이 촉매의 효율성을 나타내는 속도상수,  $k_m$ 과 미셀-기질복합체의 결합능력,  $K_b/N$  값이  $\dot{N}C_2CysC_{12}$ ,  $\dot{N}C_2HisC_{12}$ ,  $\dot{N}C_2HisCysC_{12}$  혼합미셀계의 순서로 증가하는 것을 알 수 있다. Tonellato 등은 트리스-완충용액

에서 cetyl(imidazole-4ylmethyl)dimethyl ammonium chloride가 없을 때 보다 존재할 때 에스테르의 가수분해 반응이 현저하게 증가한다고 보고하였다.<sup>8</sup> 이것은 이미다졸기의 영향으로 설명한 것과 같이  $\dot{N}C_2HisC_{12}$ 와  $\dot{N}C_2AlaC_{12}$ 의 혼합미셀계에서 가수분해 반응속도의 증가는 히스티딘의 이미다졸기의 영향으로 생각된다. 그리고 Murakami등은 CTAB와 N-hexadecyl-N<sup>9</sup>-glutaryl-L-cysteinamide를 촉매로 사용하여 에스테르를 가수분해시킬 때 티올기의 친핵성에 의하여 반응속도가 증가한다고 보고하였다.<sup>17</sup> 이와같이  $\dot{N}C_2CysC_{12}$ 와  $\dot{N}C_2AlaC_{12}$ 의 혼합미셀을 촉매로 사용할 때 반응속도의 증가는 시스테인의 친핵성인 티올기 영향이다. 또한 PNPL의 가수분해 반응이  $\dot{N}C_2HisCysC_{12}$ 와  $\dot{N}C_2AlaC_{12}$ 의 혼합미셀계에서 가장 좋은 촉매효율을 나타낸 것은 Murakami등이 에스테르의 가수분해반응에  $\dot{N}C_2HisAspC_{12}$ 를 촉매로 사용할 때 이미다졸기의 아실화 반응과 카르복실기의 탈아실화 반응의 상호작용으로 가수분해 반응이 촉진된다고 보고한 것<sup>16</sup>과 같이 이미다졸기의 아실화 반응과 티올기의 탈아실화 반응의 상호작용으로 생각된다.

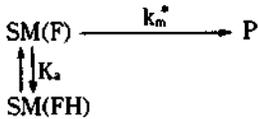
Table 1. Kinetic parameters for hydrolysis of p-Nitrophenyl dodecanoate as catalyzed by peptide-surfactant comicellar systems<sup>a</sup>

catalyst	$C_d(M)^b$	$k_{obsd}(s^{-1})$	$k_m(s^{-1})$	$k_b/N(M^{-1})$
none		$0.80 \times 10^{-5}$		
$\dot{N}C_2AlaC_{12}$	$1.00 \times 10^{-3}$	$0.84 \times 10^{-5}$		
$\dot{N}C_2HisC_{12} + \dot{N}C_2AlaC_{12}^c$	$5.50 \times 10^{-3}$ $\sim 3.30 \times 10^{-2}$		$7.74 \times 10^{-4}$	3930
$\dot{N}C_2CysC_{12} + \dot{N}C_2AlaC_{12}^c$	$5.50 \times 10^{-3}$ $\sim 3.30 \times 10^{-2}$		$5.51 \times 10^{-4}$	2000
$\dot{N}C_2HisCysC_{12} + \dot{N}C_2AlaC_{12}^c$	$5.50 \times 10^{-3}$ $\sim 3.30 \times 10^{-2}$		$5.51 \times 10^{-4}$	6510

<sup>a</sup> In ethanol-dioxane-water(11:1:88,v/v) at  $30.0 \pm 0.1^\circ C$ ,  $pH=7.40$ , and  $\mu=0.80$ . Initial concentration of PNPL,  $1.0 \times 10^{-4} M$ . <sup>b</sup> Concentration of comicellar systems  $C_d = [\dot{N}C_2HisC_{12}]$ ,  $[\dot{N}C_2CysC_{12}]$ , or  $[\dot{N}C_2HisCysC_{12}]$ . <sup>c</sup>  $[\dot{N}C_2AlaC_{12}]$ . <sup>d</sup>  $[\dot{N}C_2HisC_{12}]$ ,  $[\dot{N}C_2CysC_{12}]$ , or  $[\dot{N}C_2HisCysC_{12}]/[\dot{N}C_2AlaC_{12}] = 1/10$ . <sup>e</sup> CMC of  $\dot{N}C_2HisC_{12}$ ,  $\dot{N}C_2CysC_{12}$ , and  $\dot{N}C_2HisCysC_{12}$  by kinetic method(ref.17),  $2.30 \times 10^{-4} M$  at  $pH 7.40$ ,  $\mu=0.80$ , and  $T=30.0 \pm 0.1^\circ C$ .

미셀계에서 이미다졸기와 티올기의 촉매활동성.  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}$  혹은  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}$  과  $\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$  의 혼합미셀을 촉매로 사용할 때 PNPL의 가수분해에 대한 1차 속도상수,  $k_1$  과 pH관계를 Fig. 2에 나타내었다.

그림에서 보는 바와 같이 PNPL의 가수분해에 대한  $k_1$ 의 값들은  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}$  혼합미셀계와  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}$ 의 혼합미셀계에서 각각 pH 6-7 및 pH 8이상에서 현저한 변화를 나타낸다. 이것은 중성인 이미다졸기와 anionic sulfido기의 양성자주개-받개의 전환점이므로 아래와 같은 Scheme 3을 세웠다.



Scheme 3

여기서 F는 중성인 이미다졸기 또는 anionic sulfido기, FH는 양성자를 받은 이미다졸기 또는 티올기,  $K_a$ 는 평형상수,  $k_m^*$ 는 중성인 이미다졸기 또는 anionic sulfido기에 의한 PNPL의 가수분해에 대한 속도상수를 각각 나타낸다. 중

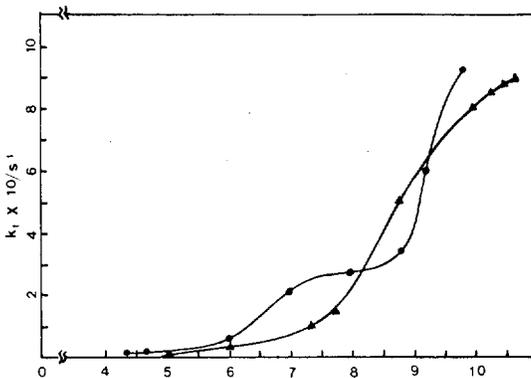


Fig. 2. pH-rate profiles for the hydrolysis of PNPL as catalyzed by comicelles of  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}/\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$  (●) and  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}/\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$  (▲) in ethanol-dioxane-water(11:1:88v/v) at  $\mu=0.80(\text{KCl})$  and  $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ;  $C_d=1.1 \times 10^{-2}\text{M}$ ; (surfactant)/ $(\text{NC}_2\text{AlaC}_{12})=1/10$ ; initial concentration of PNPL  $=1.00 \times 10^{-4}\text{M}$ ;  $k_1=k_{\text{obs}}-k(\text{NC}_2\text{AlaC}_{12})$ .  $k(\text{NC}_2\text{AlaC}_{12})$  is the rate constant for hydrolysis catalyzed by  $\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$  micelle alone.

성인 이미다졸기와 anionic sulfido기의 촉매활동성을 알아보기 위하여 Scheme 3의 평형식과 속도식으로부터 아래와 같은 관계를 얻을 수 있다.<sup>16,18</sup>

$$\frac{1}{k_m} = \frac{1}{k_m^*} + \frac{(\text{H}^+)}{k_m^* K_a} \quad (2)$$

등식(2)를 이용하여 펩티드-계면활성제의 작용기에 의한 PNPL의  $k_m^*$ 와  $pK_a$ 를 얻기 위하여, 여러 수소이온 농도에서  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}$ 이나  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}$ 와 과  $\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$ 의 혼합미셀계의 전체 농도를 변화시켜 얻은  $k_m$ 과 수소이온농도 변화를 Fig. 3에 나타내었다.

등식(2)와 Fig. 3으로부터 펩티드-계면활성제의 중성인 이미다졸기에 의한 PNPL의  $k_m^*$ 와  $pK_a$ 는  $7.91 \times 10^4$ , 6.49로 각각 계산되었다. Murakami등은  $\text{SM}(\text{ImH}) \xrightleftharpoons{K_a} \text{SM}(\text{Im}) \xrightarrow{k_m^*} \text{P}$ 와 같은 도식을 세워  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}$ 와  $\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$ 의 혼합미셀계에서 파라니트로페닐 헥사노에이트에 대한  $k_m^*$ 과  $pK_a$ 는  $1.78 \times 10^5\text{s}^{-1}$ 과 6.35로 보고하였다.<sup>16</sup> 본 실험값과 차이는 혼합미셀계의 미셀 환경과 기질이 다르기 때문이다. 그리고 anionic sulfido기에 의한 PNPL의  $k_m^*$ 과  $pK_a$ 는 6.00

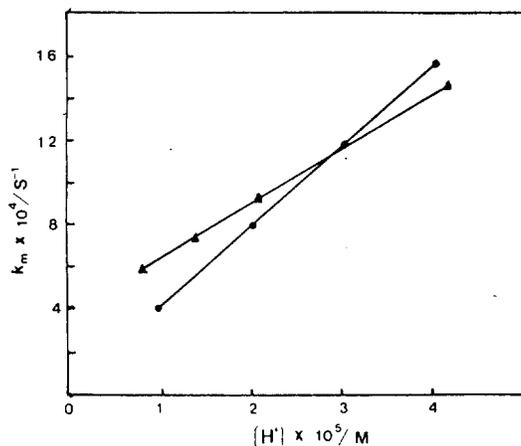


Fig. 3. Plots of  $1/k_m$  vs.  $[\text{H}^+]$  for the hydrolysis of PNPL as catalyzed by comicelles of  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}/\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$  (●) and  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}/\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$  and  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}/\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}$  (▲) in ethanol-dioxane-water(11:1:88 v/v) at  $\mu=0.80(\text{KCL})$  and  $30.0 \pm$   $^\circ\text{C}$ ; initial concentration of PNPL  $=1.00 \times 10^{-4}\text{M}$ ; (surfactant)/ $(\text{NC}_2\text{AlaC}_{12})=1/10$ .

$\times 10^{-4} \text{S}^{-1}$ , 10.50으로 각각 계산되었다. 그러나 Murakami등은 등식(2)로부터 얻은 pKa값은 10.4이고 광도법 적정(photometric titration)을 이용하여 측정된 값은 10.3으로<sup>17</sup> 본 연구와 유사한 값을 가지나, 그 차이는 티올기 주위의 미세환경과 합성된 펩티드-계면활성제가 다르기 때문이다.

가수분해에 대한 미셀의 소수성 부분의 효과, 미셀계의 촉매효과는 정전기적 상호작용과 소수성 부분의 상호작용으로 커진다.  $\text{NC}_2\text{HisC}_{12}$ 와  $\text{NC}_2\text{CysC}_{12}$ 의 혼합미셀계와 수용액에서 파라니트로페닐 아세테이트(PNPA), 파라니트로페닐 핵사노에이트(PNPH), PNPL와 같이 탄소수가 증가함에 따라 가수분해에 주는 영향을 알아보기 위하여 파라니트로페닐 에스테르의  $k_1$ 을 Table 2에 나타내었다.

Table 2에 나타난 것과 같이 수용액에서 에스테르의 가수분해 속도상수,  $k_{\text{hyd}}$ 는 에스테르의 알킬기의 탄소수가 1, 5, 11으로 증가함에 따라 PNPA에 비하여 0.82, 0.67배로 감소하였으나, 혼합미셀계에서의  $k_1$ 는 1.1, 1.3배로 각각 증가하였다. Kurz는 alkyl sulfate의 알킬기의 탄소수가 1, 2, 12으로 변화시켜 가수분해 반응속도상수를 측정하였는데, 탄소수가 12인 sodium alkyl sulfate의 속도상수가 현저하게 증가함을 알았다. 이것은 미셀을 형성하여 활성화 엔탈피

가 낮아지기 때문으로 설명하였다.<sup>21</sup> 본 실험의 혼합미셀계에서 에스테르의 알킬기의 탄소수가 증가함에 따라 반응속도가 증가한 것은 에스테르의 알킬기와 미셀의 소수성부분의 상호작용이 주된 요인으로 생각된다.

### 인 용 문 헌

1. J. H. Fendler and E. J. Flender, "Catalysis Micellar and Macromolecular System", Academic Press, New York, 1975, p.1.
2. C. G. Overberger and N. Vorchheimer, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 951 (1963).
3. C. G. Overberger and J. C. Salmone, *Acc. Chem. Res.*, **2**, 217 (1969).
4. J. A. Pavlisko and C. G. Overberger, *J. Poly. Sci.*, **19**, 1635 (1981).
5. T. E. Wagner, C. Hsu and C. S. Pratt, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 6366 (1967).
6. G. A. Rogers and T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 2473 (1974).
7. C. D. Hubbard and J. F. Kirsch, *Biochem.*, **11**, 2483 (1972).
8. U. Tonellato, *J. Chem. Soc. Perkin(II)*, 771(1976).
9. R. A. Moss, R. C. Nahas and S. Ramasnami, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 627 (1977).
10. W. Tagaki, S. Kobayashi, and D. Fukushima, *J. Chem. Soc. Comm.*, 29 (1977).
11. J. M. Brown, P. A. Chaloner, and A. Colens, *J. Chem. Soc. Perkin(II)*, 71 (1979).
12. A. Pillersdorf and J. Katzhendler, *J. Org. Chem.*, **44**, 934(1979).
13. Y. Ihara, *J. Chem. Soc. Perkin(V)*, 1483 (1980).
14. Y. Murakami, A. Nakano, A. Yoshimatsu, and K. Fukuya, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 728 (1981).
15. Y. Murakami, Y. Aoyama, M. Kida, and A. Nakano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 3365 (1977).
16. Y. Murakami, A. Nakano, A. Yoshimatsu, and K. Matsumoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2750 (1981).
17. Y. Murakami, A. Nakno and K. Matsumoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 2996 (1979).
18. Y. Murakami, et al., *bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 3573

Table 2. Relative catalytic effect of hydrolysis for p-nitrophenyl carboxylates

substrate	$k_{\text{hyd}}(\text{s}^{-1})^a$	$k_1(\text{s}^{-1})^b$
PNPA	$1.20 \times 10^{-5}$	$2.67 \times 10^{-4}$
PNPH	$9.80 \times 10^{-6}$	$3.02 \times 10^{-4}$
PNPL	$8.00 \times 10^{-6}$	$3.45 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup>In 1% (v/v) dioxane-water at  $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , pH=7.40, and  $\mu=0.80(\text{KCl})$ . Initial concentration of substrates:  $1.0 \times 10^{-4}\text{M}$ . <sup>b</sup>In 11% (v/v) dioxane-water at  $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , pH=7.40, and  $\mu=0.80(\text{KCl})$ . Initial concentration of substrate:  $1.00 \times 10^{-3}\text{M}$  and  $[\text{NC}_2\text{HisC}_{12}] = 1.0 \times 10^{-3}\text{M}$  and  $[\text{NC}_2\text{AlaC}_{12}] = 1.0 \times 10^{-2}\text{M}$ .

- (1979).
19. T. Fujii and S. Sakakibara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **47**, 3146 (1974).
20. J. H. Fendler and E. J. Fendler, *Katalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, New York, 1975, p.83.
21. J. L. Kurz, *J. Phys. Chem.*, **66**, 2239 (1962).