

유기용매에서 Lipase에 의한 지방족 폴리에스터의 합성

박현규·장호남

한국과학기술원 화학공학과, 생물공정연구센터

Preparation of Aliphatic Polyester by Lipase Catalyzed Transesterification in Anhydrous Organic Solvents

Hyun Gyu Park and Ho Nam Chang

Bioprocess Engineering Research Center and Department of Chemical Engineering,
Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

Enzyme-catalyzed polycondensation reaction of aliphatic polyesters with several repeating units was studied using the biocatalytic activities of lipases from different sources. Porcine pancreatic lipase (PPL) was found to be best in utilizing bis(2,2,2-trichloroethyl) glutarate and 1,4-butanediol as substrates. The reaction was also catalyzed to some extent by the lipases from *Humicola lanuginos* and *Pseudomonas sp.* In the series of short-chain diols (C_2-C_4), bis(2,2,2-trichloroethyl) glutarate was transesterified fastest with 1,4-butanediol and for the long-chain diols (PEG-300-PEG-1000), the reaction was fastest with PEG-400. With PEGs, only monoesterification product was obtained. PPL functioned well in relatively hydrophilic organic solvents such as tetrahydrofuran (THF), ether and acetonitrile. The reaction rate was accelerated as the reaction temperature was raised from 20°C to 60°C while M_n values of the reaction products were not affected by the reaction temperature. End group analysis by NMR showed that M_n values of the polymer were in the range of 1500-4000 daltons.

서론

지금까지 산업적으로 응용된 효소들은 거의 수용액하에서 사용되어 왔다. 그러나 많은 유기화합물(지방, 오일, 지방산, 알코올, 방향족화합물, steroids 등)들의 물에서의 낮은 용해도, 원치 않는 부반응(가수분해, acyl migration, 수산화 이온의 nucleophilic addition 등), 그리고 열역학적 평형관계 등으로 인해 대부분의 화학적 변환에 있어서, 물은 그다지 좋지 못한 반응 매체이다. 이러한 난점을 극복하기 위해 무수 유기용매하에서의 효소반응에 대한 연

구가(1, 2) 시작되어 현재 매우 활발히 진행되고 있다.

유기용매에서의 효소반응으로 가장 많이 연구되는 효소들 중의 하나인 lipase는 여러 가지 유기합성 분야에서 이용되고 있으며(3-5) 최근에는 lipase를 이용하여 고분자물질들을 합성하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(6-9). 효소에 의해서 합성된 고분자의 분자량이, 아직까지는 산업적으로 이용될 만큼 크지 않은 oligomer 정도의 수준이고 공정 비용도 기존의 화학적인 방법에 비해 아직은 높지만 효소를 촉매로 이용한 고분자중합은 다음과 같은 많은 장점들을 내

포하고 있다.

1) 중합온도가 일반적인 화학적 중합과는 달리 상온, 또는 그보다 약간 높은 온도이기 때문에 기존의 화학공정에 의해서는 파괴되는 epoxide와 같은 반응성 있는 functional group 등을 함유하는 고분자를 합성할 수 있다.

2) 효소 특유의 stereoselectivity를 이용하여 높은 광활성을 가지는 고분자 물질을 합성할 수 있다. 또한 효소의 resioselectivity를 이용하여 원하는 특정구조의 고분자를 합성할 수 있다(10, 11).

3) 지금까지 보고된 효소를 이용한 중합결과들에 의하면(4, 5) 생성된 고분자가 어느 정도의 크기에 이르면 더 이상 효소가 중합을 계속시키지 못하는 것으로 나타났다. 이것은 효소를 이용하여 높은 분자량의 고분자를 만드는데 있어서 가장 큰 문제이다. 하지만 이러한 현상이 원하는 크기의 매우 좁은 분자량 분포를 가지는 고분자를 합성하는데 이용될 수 있다.

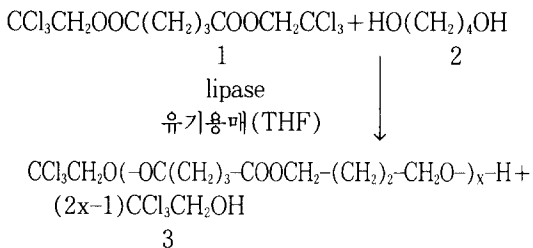
4) 환경문제에 있어서 촉매 자체가 독성이 없으며 고분자가 생물학적으로 합성되었기 때문에 생분해된다.

위와 같은 많은 장점들 때문에, 효소를 이용한 고분자의 합성은 많은 연구와 노력이 요구된다. 본 연구 또한 그러한 노력의 일환으로, 유기용매하에서 lipase를 이용한 transesterification 반응을 통해, diester와 diol을 polyester로 축중합시키는 반응(Scheme 1)에서 여러 가지 lipase들의 반응성, 반응온도와 유기용매의 영향 등에 대한 기초실험과, Scheme 1에서 여러 가지 서로 다른 diol들의 반응성을 비교하는 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

사용한 효소들 중에 PPL은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서, 그리고 그밖의 모든 lipase들은 Amano International Enzyme Co.(Troy, VA)



Scheme 1

에서 구입하였으며, 전처리 없이 바로 사용하였다. 2,2,2-trichloroethanol, pyridine, glutaryl dichloride, 그리고 모든 aliphatic diol들은 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI)에서 구입하여 사용하였으며, 그밖에 명시되지 않은 시약은 모두 시약급 이상의 것을 사용하였다.

Bis(2, 2, 2-Trichloroethyl) Glutarate, 1의 합성

합성은 Sonntag(12)에 의한 일반적인 방법을 따랐다. 반응용기에 2,2,2-trichloroethanol 0.186mol과 anhydrous pyridine 0.186mol, 그리고 용매로 CH₂Cl₂ 100ml를 넣는다. 이 혼합용액을 0°C로 냉각한 후 glutaryl dichloride 0.088mol을 30분에 걸쳐 천천히 반응용기에 떨어뜨리며 반응시킨다. 반응용기를 다시 상온으로 천천히 가열한 후 두 시간 동안 더 반응시키면 pyridine hydrochloride 침전물이 형성된다. 50ml의 물을 넣어 이 침전물을 녹인 후 separatory funnel을 사용하여 유기용매층을 물층으로부터 분리한다. 유기용매층을 50ml의 CH₂Cl₂로 희석한 후 5% HCl 수용액 60ml로 3번, 포화된 NaHCO₃ 수용액 50ml로 3번, 50ml의 물로 2번 계속 씻어준다. Anhydrous MgSO₄를 이용하여 수분을 제거한 후 rotary evaporator에서 용매를 증발시키면 diester, 1이 얻어진다. 이것을 메탄올과 물을 2.5:1(v/v)로 섞은 용매로 재결정시켜 powder 형태의 diester, 1을 얻은 후 상온에서 vacuum oven으로 말린다.

Diester, 1과 Diol의 중합반응

반응은, 달리 언급이 없으면 50ml round bottom flask에서 magnetic stirrer로 교반해 주면서 상온에서 수행되었다. 반응은, 각각 0.005mol의 diol과 diester, 1을 포함한 10ml의 THF용액에 1.5g(0.3g/mmol of diester)의 PPL을 넣어줌으로써 시작되었고, CH₂Cl₂ 15ml를 반응용기에 넣어줌으로써 중지시켰다. 반응온도의 영향에 대한 실험에서는 반응기에 condensor를 달고 냉각수로 수돗물을(17°C) 흘려주었다.

여러 가지 Diol 및 CCl₃CH₂OH 농도의 분석

여러 가지 diol들과 CCl₃CH₂OH의 농도는 gas chromatography(GC)를 이용하여 분석하였다. 반응중 원하는 시간에 micropipet을 이용하여 반응액 0.5ml를 재빨리 뽑아내어 1.5ml eppendorf tube에 넣고 원심분리한 후 상등액을 취하여 flame ioniza-

tion detector를 갖춘 GC(Varian 3300)를 이용하여 분석하였다. 사용된 column의 고체상은 Chromosorb W 80-100이었고, 이동상은 10% Carbowax 20M 이었다. Carrier gas로는 helium을 사용하였고 detector와 injector 온도는 250℃였다.

NMR 분석

용매로 $CDCl_3$ 사용하여 Proton NMR(Bruker AMX 500) 분석을 하였는데 합성된 diester, 1을 NMR peak 위치와(8) absorption area에 의해 확인했다. CH_2Cl_2 의 첨가로 반응이 끝나면 medium porosity fritted glass funnel로 filtration하여 효소를 제거한 후 상온에서 rotary evaporating하여 용매를 날리고 남은 polymeric product를 NMR 분석하였다.

Degree of polymerization(DP)은 end group analysis 방법을 사용했는데, Fig. 1에서 $\delta 2.38$ 에서의 absorption area의 반을 $\delta 2.55$ 에서의 absorption area로 나누어 구했다(8). 이 방법으로 DP를 결정하는 것은 생성된 고분자 분자의 end group이 trichloroethyl ester와 hydroxymethyl group으로 반반씩 나누어진다는 가정이 필요하다.

결과 및 고찰

여러 가지 Lipase들의 반응성

여러 가지 lipase들의 반응성을 알아 보기 위하여 Scheme 1 반응을 수행하였다. 72시간 동안의 반응 후 diol, 2의 conversion을 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 알 수 있듯이 *Rhizopus*의 lipase들은 Scheme 1의 반응에 전혀 촉매 역할을 하지 못함을 알 수 있었다. 최근 여러 가지 chloroethyl ester와 n-butanol을, THF에서 여러 가지 lipase들을 이용해서 transesterification 반응을 시킨 결과가 보고되었는데(13) 그 보고에서도 *Rhizopus*의 lipase는 전혀 반응을 시키지 못했던 것으로 보아 *Rhizopus*의 lipase들은 유기용매하에서 유기합성을 위한 este-

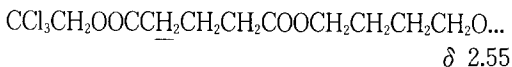


Fig. 1. Main absorption peaks in 1H -NMR spectra of reaction mixtures.

Table 1. Effect of the type of lipase on the transesterification between bis(2,2,2-trichloroethyl) glutarate with 1,4-butane-diol in THF.

Lipase	Supplier	Conversion of diol, 2 after 72h
<i>Rhizopus javanicus</i>	Amano	0
<i>Rhizopus delema</i>	Amano	0
<i>Rhizopus niveus</i>	Amano	0
<i>Humicola lanuginos</i>	Amano	7.5
<i>Pseudomonas</i> sp.	Amano	5.0
Porcine pancreatic	Sigma	100
*Lypozyme IM20	Amano	90

*Immobilized

rification이나 transesterification 반응에는 적합하지 못한 것 같다. *Humicola lanuginos*와 *Pseudomonas* sp.의 lipase들은 반응 시작 20시간 후까지도 거의 반응을 시키지 못하다가 반응 시작 40시간 후부터 천천히 반응을 시키기 시작했으며 그 반응 속도는 매우 느렸다. PPL과 lyozyme을 이용하여 반응을 시켰을 때는 초기부터 diol, 2가 반응을 하여 소모되었다. 시간이 경과함에 따라 반응속도는 초기보다는 감소하지만 어느 정도 지속적으로 반응이 진행되어 처음 넣어준 diol이 모두 소모될 때까지 반응되었다. 효소를 넣지 않은 경우에는 반응이 일어나지 않았다.

Polymerization Process

PPL을 촉매로 하여 Scheme 1 반응을 시키면서 반응시간에 따라 condensate, 3이 생성되는 것과 diol이 소모되는 양상을 Fig. 2에 나타내었다. 반응 시간 초기에는 diol이 매우 빠르게 반응하여, 반응 시작 5시간 안에 처음 넣어준 diol의 80% 이상이 반응되었다. 시간이 지나면서 반응속도가 느려졌고 반응 시작 후 15시간 안에 diol이 모두 반응하였다. 반응물인 diol이 모두 소모된 후에도 condensate는 계속 증가되는 것으로 보아, 이 시간 이후의 반응은 이미 한번 이상 반응한 화합물(dimer나 trimer 등)의 hydroxy group과 $-OOCCH_2CCl_3$ group이 반응하는 oligomerization임을 알 수 있다.

여러 가지 Alcohol들의 Scheme 1 반응에 대한 반응성

Scheme 1 반응에서 효소로 PPL을 사용하여 여러 가지 alcohol들의 반응성을 알아 보았다.

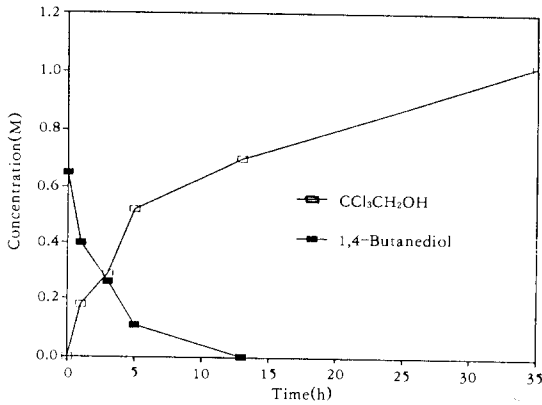


Fig. 2. Time course of lipase-catalyzed polytransesterification of bis(2,2,2-trichloroethyl) glutarate with 1,4-butanediol in THF.

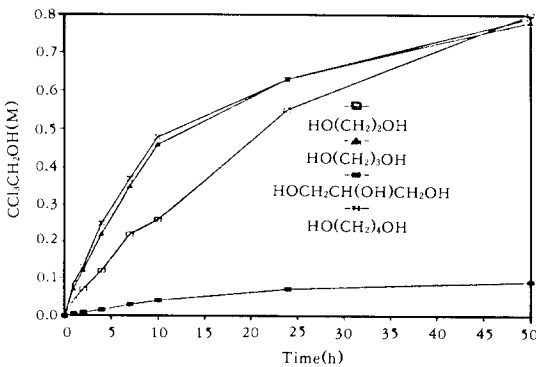


Fig. 3. Time course of transesterification of bis(2,2,2-trichloroethyl) glutarate with various diols.

먼저 ethyleneglycol, 1,3-propanediol, glycerol, 그리고 1,4-butanediol 등 비교적 chain 길이가 작은(C₂-C₄) diol들의 반응성을 비교, 분석하였다. 이들의 반응성을, transesterification 반응을 할 때 condensate로 나오는 CCl₃CH₂OH의 농도로 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 알 수 있듯이 ethyleneglycol, 1,3-propanediol, 1,4-butanediol 세 가지 diol들은 모두 반응이 잘 되는 반면 glycerol은 극히 적은 양만이 반응됨을 알 수 있다. 50시간 반응시킨 후에도 glycerol의 hydroxyl group 중에 transesterification 반응을 한 것은 처음 반응기에 넣어준 양의 약 7% 정도밖에 되지 않았다. 위에서 사용된 다른 diol들과 달리 glycerol은

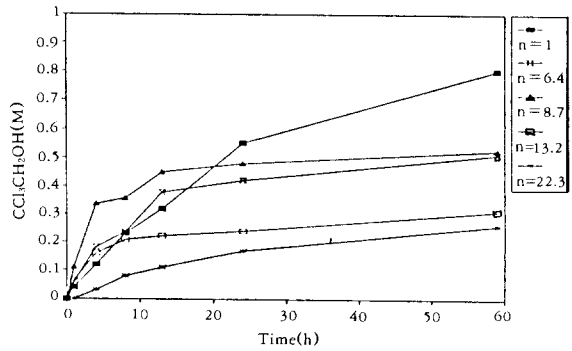


Fig. 4. Time course of transesterification of bis(2,2,2-trichloroethyl) glutarate with various PEGs having different molecular weights.

한 분자 안에 hydroxyl group이 세 개인데도 이렇게 반응이 잘 되지 않는 것은 glycerol의 경우 secondary alcohol을 포함하고 있어 다른 diol에 비해 bulky한 구조를 갖고, 이로 인해 glycerol이 효소의 active site에 가서 반응하는데 steric hindrance를 받기 때문인 것으로 고려된다. 나머지 세 가지 diol들 중에 1,3-propanediol과 1,4-butanediol은 거의 비슷한 속도로 반응했으며 ethyleneglycol은 이들보다는 반응속도가 약간 느리지만 시간이 지남에 따라 위의 두 diol과 거의 대등한 정도까지 반응하는 것으로 나타났다. 또한 반응을 어느 정도 지속시키면 이 세 가지 diol들의 hydroxyl group은 거의 모두 반응하는 것으로 나타났다. 따라서 Scheme 1과 같은 system의 transesterification 반응을 위한 diol로는 steric hindrance가 적은 primary alcohol이 적합하며 위의 실험에서 사용된 것 중에는 1,3-propanediol이나 1,4-butanediol이 적합하다.

비교적 chain 길이에 긴 diol들의 반응성을 비교하여 chain 길이가 반응에 미치는 영향을 알아보기 위해서 여러 가지 분자량의 polyethyleneglycol (PEG)을 diol로 사용하여 실험한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서 n은, PEG의 분자식을 H(OCH₂CH₂)_nOH로 표시할 때, 각각의 분자량에 해당하는 repeating unit의 개수이다. 참고로 ethylene glycol(n=1)을 반응시킨 결과도 나타냈다. Fig. 4에서 알 수 있듯이 실험된 PEG 중에서 n=8.7 PEG가 가장 잘 반응했으며, 다음으로 n=6.4인 PEG가 잘 반응했다. n=8.7 이상의 PEG들 세 개만 비교해 본다면 chain의 길이가 길수록 반응이 잘 되지 않았다. 이는, PPL이 transesterification 반응

을 위해 alcohol을 기질로 받아들일 때 chain 길이가 어느 정도 이상인 것 중에서는 chain의 길이가 길수록 PPL이 기질로 받아들이기 힘들다는 것을 말해준다. 이 현상 역시 steric hindrance로 설명될 수 있다. Fig. 4에서 $n=1$ 에서 $n=22.3$ 까지의 전체적인 반응 경향을 볼 때, $n=6.4$ 이상의 PEG들은 모두 초기에는 어느 정도 반응이 잘되다가 어느 정도의 반응이 일어난 후에는 그 반응속도가 급격히 감소한다는 공통점을 발견할 수 있다. $n=1$ 인 ethylene glycol만이 지속적으로 계속 반응을 하여 넣어준 ethylene glycol내의 hydroxyl group이 거의 다 transesterification 반응을 하는 것으로 나타났다. $n=6.4$ 와 $n=8.7$ 인 PEG의 반응속도가 급속히 감소하는 시점을 살펴 보면 반응 초기에 넣어준 PEG (0.37M)내의 hydroxyl group의 약 반 정도가 반응한 후인 것을 알 수 있다. 이 사실은 $n=6.4$ 와 $n=8.7$ 의 PEG들은 초기에는 반응속도가 빠르다 하더라도 한쪽 끝의 hydroxyl group이 반응한 후에는 남은 다른쪽 끝의 hydroxyl group이 반응하는 속도는 매우 느리다는 사실을 말해준다. 이 결과로 PEG들은 monotransesterification 반응에 대한 기질로는 적합하나 polytransesterification 반응을 위한 기질로는 적합하지 않음을 알 수 있다.

유기용매의 영향

유기용매에서 수행되는 효소반응에 있어서, 어떤 유기용매를 사용하는가 하는 것은 매우 중요한 요소이다(14-16). 따라서 본 연구에서도 여러 가지 유기용매에서 scheme 1 반응을 수행함으로써 유기용매의 영향을 알아보았다. 유기용매에서의 효소반응에서 소수성 용매로 흔히 쓰이는 alcohol류의 용매에는 diester, 1이 녹지 않았기 때문에 실험에서 제외되었다. Diester, 1을 녹이는 용매들 중에서 scheme 1 반응을 시킨 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에서 알 수 있듯이 실험된 것 중에 가장 반응을 잘 시키는 용매는 diethyl ether로 나타났고, THF와 acetonitrile에서도 반응이 어느 정도 잘 진행되었으며 benzene과 toluene에서는 반응속도가 매우 느렸다. 모든 경우에 효소를 넣지 않았을 때는 반응이 일어나지 않았다.

효소반응에서 유기용매의 영향을 연구하는데 유기용매의 극성을 판단하는 기준으로 log P값이 현재 가장 많이 이용되는 척도이다(14). 따라서 유기용매의 log P와 반응시작 7시간 후에 반응이 진행된 정도를 Fig. 6에 나타냈다. 보통 유기용매에서의 효소

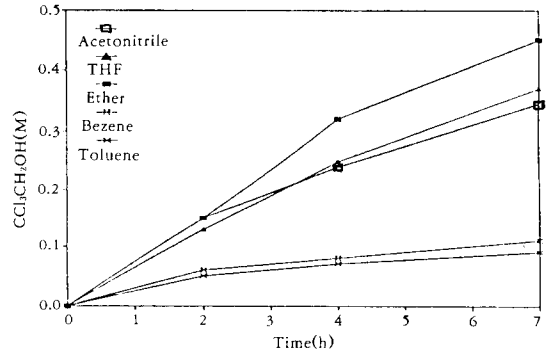


Fig. 5. Time course of transesterification of bis(2, 2-trichloroethyl) glutarate with 1,4-butanediol in various organic solvents.

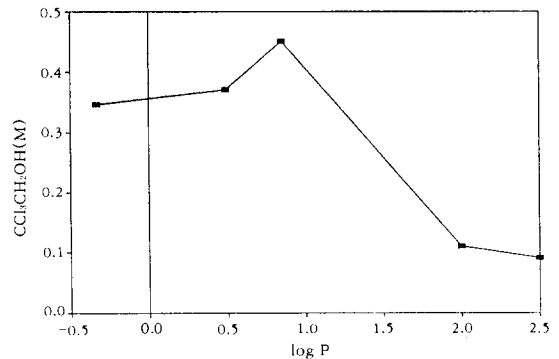


Fig. 6. Plot between transesterification activity and log P of organic solvents.

반응은, log P값이 큰 소수성 용매에서 반응이 잘 진행되는 것으로 알려져 있다. 이는 효소 주위의 필수적으로 필요한 물층이 소수성 용매에서보다 친수성 용매에서 더 많이 파괴되기 때문이다. 하지만 효소 PPL로 Scheme 1의 반응을 시키는 본 연구의 경우에는 Fig. 6에서 알 수 있듯이 그러한 일반적인 rule에 따르지 않음을 알 수 있었다. 이는 본 연구의 반응이 아닌 다른 반응에 대해서도 여러 번 보고된 바 있는데(14), Zaks와 Klivanov(17)에 따르면 PPL의 경우는 비교적 친수성 용매라 하더라도 효소 주변의 필수적인 물층을 파괴하지 못하여 효소의 활성이 친수성 용매에서도 유지된다고 한다.

온도의 영향

일반적으로 화학반응의 주된 변수중의 하나가 온도이다. 본 연구와 같이 효소를 촉매로 이용하여

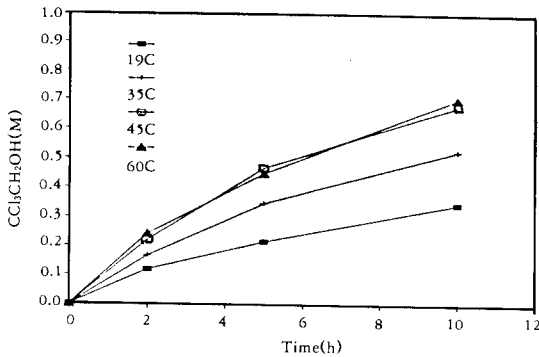


Fig. 7. Course of transesterification of bis(2,2,2-trichloroethyl) glutarate with 1,4-butanediol at various temperatures.

transesterification 반응을 통해 고분자 물질을 합성하는 반응에 있어서 온도의 영향이 어떠한지 알아보기 위하여 여러 가지 온도에서 Scheme 1 반응을 수행하여 반응성을 비교하였다(Fig. 7). Fig. 7에서 알 수 있듯이, 20°C에서 60°C까지는 반응온도가 높을수록 반응속도가 빨랐다. 반응온도가 반응생성물의 분자량에는 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해서 각각 위의 온도에서 184시간 반응시킨 반응생성물을 NMR을 통해서 평균분자량을 구한 결과 모두 2200-2300 daltons 사이의 값으로 나타났고 온도에 의한 어떤 경향은 없었다. 즉, 반응온도는 최종생성물의 평균분자량에는 영향을 주지 않고 단지 반응속도에만 영향을 주었다.

요 약

유기용매 THF에서 bis(2,2,2-trichloroethyl) glutarate와 diol을 기질로 하여 PPL에 의한 transesterification 반응을 통해 polyester를 합성하였다.

1. 서로 다른 source의 lipase로 이 반응을 시켜본 결과 PPL이 가장 반응을 잘 진행시켰으며 *Humicola lanuginosa*와 *Pseudomonas* sp.의 lipase들도 어느 정도 반응을 진행시켰으며 *Rhizopus*의 lipase들은 반응을 전혀 진행시키지 못했다.

2. Diol로 ethyleneglycol, 1,3-propanediol, 1,4-butanediol은 모두 거의 비슷한 정도로 반응이 진행되었으며 secondary alcohol인 glycerol의 경우 이들에 비해 반응이 매우 느리게 진행되었다. 이는 glycerol에 의해 효소가 steric hinderance를 받기

때문인 것으로 추정된다.

3. Diol로 여러 가지 분자량의 PEG(M=300-1000)를 사용한 결과 PEG-400이 가장 잘 반응되었으며 이를 제외하고는 분자량이 클수록, 즉 chain의 길이가 길수록 반응속도가 느렸다. 그리고 이렇게 chain의 길이가 비교적 긴(C₁₂-C₄₅) PEG를 diol로 사용했을 때는 monotransesterification 반응이 끝난 이후에는 반응이 거의 더 이상 진행되지 않았다.

4. 유기용매로는 비교적 hydrophilic한 THF, ether, acetonitrile 등에서 잘 반응되었다.

5. 20°C에서 60°C의 온도범위에서 반응온도가 높을수록 반응속도가 빨랐으며 184시간 반응된 반응생성물의 평균분자량은 모두 2200-2300 daltons로 반응온도의 영향을 받지 않는 것으로 관찰되었다.

8. NMR에 의한 end group analysis를 이용하여 반응 생성물을 분석한 결과 수평균분자량은 1500-4000 daltons이었다.

참고문헌

1. A. M. Klivanov(1986), *Chemtech*, **16**, 354.
2. A. Zaks and A. J. Russell(1988), *J. Biotechnol.*, **8**, 259.
3. A. P. Ison, P. Dunnill and M. D. Lilly(1988), *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 47.
4. G. Langrand, J. Baratti, G. Buono and C. Triantaphylides(1986), *Tetrahedr. Lett.*, **27**, 29.
5. G. Gil, E. Ferre, A. Meou, J. Le Petit and C. Triantaphylides(1987), *Tetrahedr. Lett.*, **28**, 1647.
6. A. L. Margolin, J.-Y. Crenne and A. M. Klivanov(1987), *Tetrahedr. Lett.*, **28**, 1607.
7. J. S. Wallace and J. C. Morrow(1989), *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **27**, 2553.
8. J. S. Wallace and J. C. Morrow(1989), *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **27**, 3271.
9. S. Geresh and Y. Gilboa(1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 883.
10. M. Therisod and A. M. Klivanov(1986), *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5638.
11. S. Riva and A. M. Klivanov(1988), *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3291.
12. N. O. Y. Sonntag(1953), *Chem. Rev.*, **52**, 237.
13. S. Geresh and Y. Gilboa(1990), *Biotechnol.*

- Bioeng.*, **37**, 883.
14. C. Laane, S. Boeren, K. Vos and C. Veeger (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 81.
15. A. Zaks and A. M. Klivanov(1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 3194.
16. L. E. S. Brink and J. Tramper(1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1258.
17. A. Zaks and A. M. Klivanov(1985), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 3192.