

## 에탄올 내에서 $\alpha$ -Chymotrypsin에 의한 Acetyltirosine의 에스테르화 반응

전 유 진 · 김 세 권  
부산수산대학교 자연과학대학 화학과

### The Esterification of Acetyltirosine by $\alpha$ -Chymotrypsin in EtOH/Water Mixture

You-Jin Jeon and Se-Kwon Kim

Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

#### ABSTRACT

The esterification of Ac-Tyr-OH was carried out in one-phase system containing ethanol by  $\alpha$ -chymotrypsin. The results of the esterification reaction are as follows. Chitin- $\alpha$ -chymotrypsin complex was found to be an effective catalyst for the esterification of Ac-Tyr-OH in ethanol organic solvent. The optimal conditions for the esterification were chitin/ $\alpha$ -chymotrypsin ratio, 20(w/w); reaction temp., 35°C; reaction pH, 8.0; reaction time, 24 hrs. Also, addition of chitin in water/water-miscible organic solvent was effective for the stability of the enzyme. The esterification yield, Km and Vmax under optimal conditions were 93%, 3.093mM and 1.088mM/mg/hr, respectively.

#### 서 론

최근 효소를 이용한 유기용매 내에서 아미노산의 에스테르화 반응이나 펩티드 합성에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이와 같이 반응에서 유기용매를 반응조건으로 사용할 경우 첫째, 열역학적 평형을 가수분해반응에서 합성반응으로 이동시킬 수 있고 둘째, 물이 존재할 때 일어나는 부반응을 억제시킬 수 있으며 셋째, 효소의 열안정성이 향상되고 넷째, 미생물 오염이 없다는 등 많은 장점을 가지고 있다(1). 이러한 이점에도 불구하고 과거에는 유기용매의 농도가 물보다 10~20% 더 높으면, 효소활성이 감소하거나 변성되는 것으로 알려져 있었다. 그러나 1977년 Klivanov 등(2)은 water/water-immiscible organic solvent인 이상계(two-phase

system)을 사용하여 새로운 연구분야를 개척하였다. Klivanov 등은  $\alpha$ -chymotrypsin 촉매작용에 의한 acetyltryptophan의 에스테르화를 water/chloroform system에서 시도하였다. 또한 Zaks와 Klivanov(3)는 pan-creatic lipase를 이용하여 서로 다른 알코올로 tributylglycerol의 transesterification 반응을 연구하였는데, 0.02% 이하의 물을 함유한 유기용매에서 수시간 동안 100°C로 가열하여도 그 효소의 활성은 유지되었다는 놀라운 결과를 얻었다.

한편, water-miscible organic solvent(혹은 hydrophilic organic solvent)를 이용한 단일상계(one-phase system)에서도 아미노산 에스테르화 합성 혹은 펩티드 결합을 시도하는 연구가 많이 행해지고 있다(4-7). 이러한 단일상계에서의 효소적 합성의 이점은 반응물의 용해도를 높이고, 물의 활성을 조

절함으로써 반응평형을 이동시킬 수 있다는 점이다(8-10). 그러므로 에스테르화 반응에서는 water-miscible organic solvent가 존재함으로써 물의 양을 줄일 수 있다. 따라서 효소의 가수분해 작용을 불리하게 하여 반응계에 존재하는 또 다른 친핵체에 의해 합성반응으로 전환시킬 수 있다. 하지만 효소를 공업적으로 이용할 때 값이 너무 비싸고, 합성물과의 분리 정제에 어려움이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 효소의 고정화법(immobilized enzyme)이 널리 이용되고 있다(11-13).

본 연구에서는 water-miscible organic solvent 존재 하에서  $\alpha$ -chymotrypsin 촉매작용으로 acetyltirosine의 에스테르화 반응을 시도하였으며, 아울러 이러한 반응을 효소의 고정화법을 이용하여 효소의 안정성을 증대시키고 합성수율을 높이고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

Bovine pancrease로부터 추출된  $\alpha$ -chymotrypsin (활성: 40 units/mg protein; 분자량: 25KDa) [EC 3.4.21.1]은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였다. 에스테르화 반응의 기질인 carboxyl 성분 acetyltirosine(Ac-Tyr-OH) 및 표준시약 acetyltirosine ethyl ester(Ac-Tyr-OEt)는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였다.

효소의 흡착제로 사용된 chitin은 금호화성(주)으로부터 공급받았으며, chitosan은 변 등(14)에 의해 제조되어진 제품을 사용하였다. 그리고 Sephadex G-25 및 50, CM- 및 DEAE-Sephadex 그리고 CM- 및 DEAE-cellulose 등은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. 그의 모든 실험에서 사용된 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

### $\alpha$ -Chymotrypsin에 의한 에스테르화 반응에서 흡착제의 효과

$\alpha$ -Chymotrypsin의 촉매작용에 의한 Ac-Tyr-OH의 에스테르화 반응은 수용성 유기용매인 에탄올을 이용하여 단일상계(one-phase system) 조건 하에서 실시하였다. 즉, Ac-Tyr-OH(10mM)이 함유된 에탄올 10ml[4%(V/V) buffer 함유] 용액에  $\alpha$ -chymotrypsin(10mg) 및 흡착제(100mg)를 첨가하여 30°C에서 24시간 동안 항온조에서 천천히 교반하면서 반응시켰다. 사용된 완충용액으로는 20mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.8)를

사용하였다. 흡착제로는 chitin, chitosan, Sephadex G-25 및 50, CM- 및 DEAE-Sephadex 그리고 CM- 및 DEAE-cellulose 등을 사용하였으며, 어떤 흡착제도 첨가하지 않은 에스테르화 반응을 대조구로 하여 합성 수율을 비교하였다. 에스테르화 반응의 합성 수율은 Ingalls 등(4)에 의한 hydroxamate 분석법에 따라 측정하였다. 즉, 1.75N NaOH와 1M hydroxyamine HCl 혼합용액 1ml에 시료 0.5ml를 첨가하고 3분 동안 방치한 후, 4N HCl 0.5ml와 0.36M FeCl<sub>3</sub>(0.1N HCl에 녹인 용액) 0.5ml를 각각 넣고 완전히 혼합시켰다. 이 용액을 540nm에서 흡광도를 측정하여 표준시약 Ac-Tyr-OEt로 작성된 검량선과 비교하여 수율을 결정하였다.

### 에스테르화 반응에서 Chitin/ $\alpha$ -Chymotrypsin 비의 영향

Ac-Tyr-OH(10mM)이 함유된 에탄올 10ml[4%(v/v) buffer 함유] 용액에  $\alpha$ -chymotrypsin(10mg)을 가하고 흡착제인 chitin의 양을 변화시켜 chitin/ $\alpha$ -chymotrypsin(w/w) 비가 5, 10, 20, 40, 60 및 80이 되도록 chitin을 첨가한 후 30°C에서 24시간 동안 반응시켜 수율을 측정하였다.

### 에스테르화 반응에서 온도 및 pH의 영향

Ac-Tyr-OH(10mM)의 에탄올 용액(10ml)[buffer 4%(v/v) 함유]에  $\alpha$ -chymotrypsin(10mg) 및 chitin(200mg)을 가한 후, 반응온도 및 pH를 변화시켜 수율을 측정하여, 에스테르화에서의 온도 및 pH의 영향을 검토하였다. 온도는 20°C에서 50°C까지, 그리고 pH는 6.0에서 10.0까지 변화시켰으며, 이때 완충용액은 각 pH에 따라 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.0), 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.0-9.0) 및 sodium carbonate buffer(pH 9.5-10.0)를 사용하였다.

### 에스테르화 반응에서 에탄올에 첨가된 수용액 농도의 영향

각기 다른 농도의 완충용액이 함유된 Ac-Tyr-OH(10mM)의 에탄올 용액(10ml)에  $\alpha$ -chymotrypsin(10mg) 및 chitin(200mg)을 첨가시켜 35°C에서 24시간 반응하여 합성 수율을 측정하였다. 이때 에탄올 용액에 함유되어 있는 완충용액의 농도는 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 1, 2, 4, 6, 8, 20, 30, 40, 50 및 60%(v/v)가 되도록 첨가시켰다. 그리고 반응시간 1시간일 때의 수율을 측정하여 초

기속도로 결정하였다. 또한 흡착제인 chitin이 물침 가량에 따라 수율에 미치는 영향을 알아보기 위해 chitin을 첨가하지 않은 반응의 수율을 측정하여 서로 비교하였다.

#### 반응조건 내에서 $\alpha$ -Chymotrypsin의 안정성 측정

0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)가 2%(v/v) 함유되어 있는 에탄올 용액(10ml)에  $\alpha$ -chymotrypsin(10mg) 및 chitin(200mg)을 첨가한 후 35°C 항온조에서 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일간 방치한 후, Ac-Tyr-OH(10mM)을 각각 첨가하여 24시간 동안 반응시켜 수율을 측정하고, 이것을 방치시간 0일차일 때의 수율을 기준으로 하여 상대적인 효소활성으로 효소의 안정성을 나타내었다. 이때 chitin을 첨가하지 않은 경우의 반응을 대조구로 하여 안정성을 비교하였다.

#### 에스테르화 반응에서의 Km 및 Vmax 값 측정

0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0)가 2%(v/v) 함유되어 있는 에탄올 용액 10ml에  $\alpha$ -chymotrypsin 10mg과 chitin 200mg을 첨가시키고 기질인 Ac-Tyr-OH의 농도를 변화시켜 35°C에서 1, 24 및 48시간에 대한 수율을 측정하였다. 이때 Km 및 Vmax 값은 반응시간 1시간일 때의 수율을 측정하여 Lineweaver-Burk plot에 의하여 결정하였다.

### 결과 및 고찰

#### $\alpha$ -Chymotrypsin에 의한 에스테르화 반응에서 흡착제의 효과

유기용매에서 효소의 작용 기구에 관한 연구를 하기 전에는 효소가 높은 농도의 유기용매 존재 하에서 변성이 일어나 활성이 상실된다고 생각하였지만, lipase(15)와 papain(16)을 이용한 에스테르화 반응이 성공적으로 이루어짐으로서 이러한 관념은 바뀌게 되었다. 그후 Fastrez와 Fersht(17)에 의해 단백질 분해효소인  $\alpha$ -chymotrypsin의 촉매작용에 의한 에스테르화 반응이 이루어진다는 사실이 밝혀짐으로서 모든 효소는 유기용매에서 활성을 어느 정도는 유지할 수 있다는 가능성이 제시되었다. 이러한 사실을 근거로 하여 본 실험에서는  $\alpha$ -chymotrypsin의 촉매작용에 의하여 Ac-Tyr-OH이 에탄올 내에서 에스테르화 반응 중 효소의 활성에 미치는 흡착제의 효과를 검토하였으며, 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Chitin과 DEAE-cellulose를 첨가

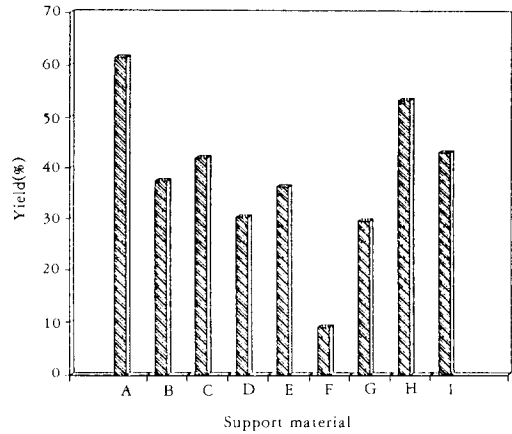


Fig. 1. The effect of support materials on the esterification of Ac-Tyr-OH. A reaction mixture containing  $\alpha$ -chymotrypsin(10mg), support materia(100mg), Ac-Tyr-OH(100mM) and ethanol(10ml)[containing 4%(v/v) of 0.1M Tris-HCl buffer, pH 7.8] was incubated for 24hr at 30°C.

A : Chitin, B : Chitosan, C : Sephadex G-25, D : Sephadex G-50, E : CM-Sephadex, F : DEAE-Sephadex, G : CM-Cellulose, H : DEAE-Cellulose, I : Control.

하였을 때 에스테르화 수율은 각각 62% 및 55%로 상당히 높았으나 DEAE-Sephadex는 수율이 8%로 매우 낮았다. 그리고 어떤 흡착제도 첨가되지 않은 반응에서는 수율이 44%로 비교적 높았으며 이와 같은 결과로 보아  $\alpha$ -chymotrypsin은 높은 농도의 유기용매 내에서도 매우 높은 활성을 유지하는 것으로 판단된다. 이러한 흡착제의 첨가가 효소의 활성에 미치는 영향은 당 혹은 무기 흡착물이 대부분 친수성을 가지고 있기 때문에 효소와 흡착물질과의 복합체가 형성된 그 복합체 주위에 물이 존재하게 됨으로써 효소의 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다(6).

본 실험에서의 에스테르화 반응은 낮은 농도(4%, v/v)의 수용액(0.1M Tris-HCl buffer)이 함유된 에탄올 용매를 사용하면 에스테르화된 Ac-Tyr-OEt이 다시 역으로 가수분해되는 것을 억제할 수 있으며, chitin과 같은 흡착물질을 사용하여 낮은 농도의 수용액에서 에스테르화 반응의 수율을 증가시킬 수 있었다. Tai 등(18)은 chitin과 chitosan을 흡착물질로 하여 papain 촉매에 의한 carbobenzoxyala-

nine의 에스테르화 수율은 각각 54%와 40%이었고 보고하였으며, Cantacuzene 등(19)은 완충용액, 에탄올 및 methylene chloride(3/5/1, v/v/v)의 혼합용매 속에서 'butyloxycarbonyltyrosine의 에스테르화 반응에서 papain을 촉매로 하여 수율이 90%로 합성되었다고 보고하였다. 또한 Mori 등(5)은 여러 가지 흡착물질에  $\alpha$ -chymotrypsin을 고정화시킨 효소의 활성을 비교한 결과, Sephadex LH-60에 흡착시켰을 때 활성이  $0.3\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 가장 높았다고 보고한 바 있다.

**에스테르화 반응에서 Chitin/ $\alpha$ -Chymotrypsin 비의 영향**

흡착물질을 chitin으로 하여  $\alpha$ -chymotrypsin의 활성에 영향을 미치는 chitin과  $\alpha$ -chymotrypsin의 비(w/w)에 대한 결과는 Fig. 2와 같다. Chitin/ $\alpha$ -chymotrypsin의 비가 20일 때까지 에스테르화 수율은 급격히 증가하였으나, 그 이후 비가 80이 될 때까지는 수율이 거의 일정하였다. 이것은 에탄올 10ml 속에 존재하는 0.4ml의 수용액이 chitin 200mg과 효소 10mg에 의한 chitin-효소 복합체의 주위에 존재하여 효소를 보호함으로써 효소 활성을 유지시키는 것으로 판단된다. Noritomi 등(20)은 polyvinyl alcohol에  $\alpha$ -chymotrypsin을 고정화시켰을 때, 그 비가 20(w/w)까지는 수율이 급격하게 증가하였고, 그 이상의 비가 증가하여도 수율의 변화는 없었다고 보고한 바 있다.

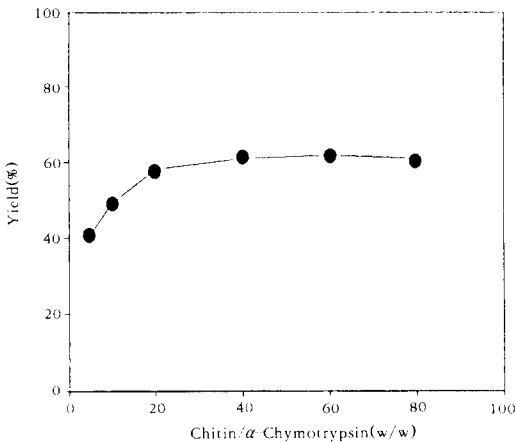


Fig. 2. The effect of chitin/ $\alpha$ -chymotryps(w/w) ratio on the esterification of Ac-Tyr-OH. Other reaction conditions and methods are the same as those in Fig. 1.

**에스테르화 반응에서 온도 및 pH의 영향**

Ac-Tyr-OH의 에스테르화 반응에서 온도의 영향은 Fig. 3에서와 같이 반응온도가 35~40°C에서 수율이 90% 정도로 매우 높았으며, 온도가 20°C에서 35°C로 증가됨에 따라 에스테르화 수율은 상당한 폭으로 증가되었으나 온도가 40°C에서 50°C로 증가됨에 따라 수율은 상당히 감소되었다. 이러한 결과는 일반적으로 알려진  $\alpha$ -chymotrypsin의 최적 온도와

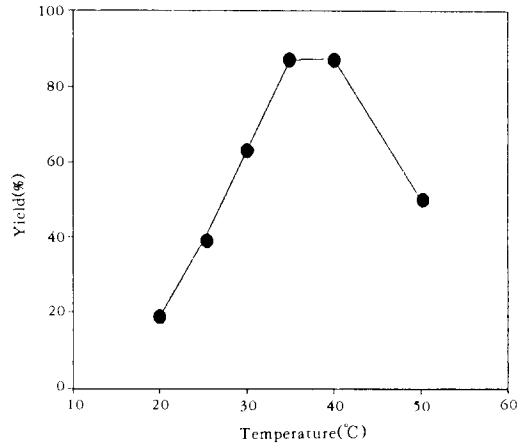


Fig. 3. The effect of reaction temperature on the esterification of Ac-Tyr-OH. Chitin/ $\alpha$ -chymotrypsin ratio 20(w/w), other reaction conditions and methods are the same as those in Fig. 1.

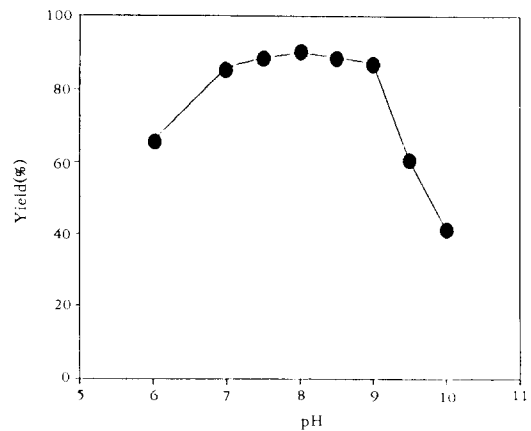


Fig. 4. The effect of reaction pH on the esterification of Ac-Tyr-OH. Other reaction conditions, except temperature 35°C, are the same as those in Fig. 1.

유사하였는데, 이것으로 보아 chitin의 첨가가 효소의 열안정성에 크게 영향을 미치지 못하는 것임을 알 수 있었다. 이 결과는 Kise 등(6)에 의한 acetyltryptophan의 에스테르화 수율에서 chitin을 흡착물질로 사용하였을 경우, 40°C에서 급격하게 수율이 감소한다는 결과 및 Noritomi 등(20)의 polyvinyl alcohol에  $\alpha$ -chymotrypsin을 고정화시킨 효소를 이용하여 acetyltyrosyl glycineamide의 합성 반응에서 온도가 35°C일 때 수율이 약 65% 정도로 가장 높았으며 40°C 이상으로 온도가 증가하게 되면 수율은 급격하게 감소한다는 결과와 일치하였다.

에스테르화 반응에서의 pH의 영향은 Fig. 4와 같이, pH 7.0~9.0 범위 내에서는 수율에 큰 차이가 없이 비교적 높았으나 0.1M sodium carbonate buffer를 사용한 pH 9.5와 10.0에서는 수율이 상당히 감소하였다. 이와 같은 결과는  $\alpha$ -chymotrypsin에 의한 가수분해에서의 최적 pH 조건과 유기용매에서 에스테르화 반응의 최적 pH 조건이 서로 비슷하다는 것을 보여 주었다. 그러나 Kise와 Shirato(21)는 acetyltryptophan의 에스테르화 반응에서 pH 6.0에서 약 90%의 가장 높은 수율을 얻었다고 보고하였다. 또한 Noritomi 등(20)은 친수성 유기용매인 acetonitrile이 함유된 단일상계 용매조건 하에서  $\alpha$ -chymotrypsin에 의한 acetyltyrosyl glycineamide의 합성 반응의 pH 효과를 검토한 결과, pH 7~10까지는 수율이 거의 일정한 것으로 보고한 바 있다.

#### 에스테르화 반응에서 에탄올에 첨가된 수용액 농도의 영향

에스테르화 반응에서 유기용매에 첨가된 수용액의 농도에 따른 수율을 측정된 결과는 Table 1과 같다. Chitin을 첨가하였을 경우, 첨가된 수용액의 농도가 8%일 때까지는 초기반응속도가 급격하게 증가하였으나, 첨가된 수용액의 농도가 그 이상일 때는 오히려 초기반응속도가 상당히 감소하였다. Chitin을 첨가하지 않았을 경우도 경향은 chitin을 첨가하였을 경우와 같았으나, 첨가된 수용액의 농도가 0~4%의 에탄올 용매에서 에스테르화의 초기반응속도는 chitin을 첨가하였을 경우가 훨씬 더 빨랐다. 이와 같은 결과는 높은 농도의 유기용매 내에서 효소의 활성에 흡착제가 미치는 효과가 상당히 크다는 것을 보여준 것이다. Kise 등(22)은 chitin에 흡착시킨  $\alpha$ -chymotrypsin의 촉매에 의한 acetyltryptophan의 에스테르화 반응에서 에탄올 용매 속에 첨가된 수용

Table 1. The effect of water content contained in ethanol solvent system on the esterification of Ac-Tyr-OH.<sup>a)</sup>

Water content (%)	With chitin		Without chitin	
	Yield(%) <sup>b)</sup>	K( $\mu$ mol/mg/hr) <sup>c)</sup>	Yield(%)	K( $\mu$ mol/mg/hr)
0	4.05	0.21	0.00	0.00
1	82.33	1.18	26.97	0.03
2	92.32	3.08	82.51	0.48
4	87.40	4.99	85.55	3.03
8	69.11	6.38	76.74	6.73
20	37.19	3.40	49.42	4.07
30	25.03	2.73	43.84	3.49
40	15.33	1.97	37.67	3.05
50	5.11	1.02	30.32	2.67
60	0.00	0.99	5.63	0.74

a) The esterification reactions of Ac-Tyr-OH(10mM) were carried out in the systems of ethanol(10ml) containing various water contents(0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.0),  $\alpha$ -chymotrypsin(10mg) with chitin(200mg) or without chitin at 35°C.

b) Yield after 24hrs

c) Initial reaction rate(reaction time of 1hr)

액의 농도가 5%일 때 반응속도가 가장 빠르다고 보고하였으며, Kise와 Shirato(23)는 10% 에탄올이 함유된 acetone 용매에서 에스테르화 반응속도는 2.4%의 수용액 농도가 첨가되었을 때가 가장 빠르다고 보고한 바 있다.

또한 같은 방법으로 24시간 동안 반응시켜 에스테르화 수율을 측정된 결과(Table 1), chitin을 첨가할 경우에 에탄올 용매에 첨가된 수용액의 농도가 2%일 때 수율이 가장 높았으며, chitin을 첨가하지 않았을 경우는 첨가된 수용액의 농도가 4%일 때 수율이 가장 높았다. Ingalls 등(4)은 첨가된 수용액의 농도가 40% 이하의 에탄올 용액 속에서 고정화되어 있지 않은  $\alpha$ -chymotrypsin의 촉매작용에 의한 에스테르화 수율은 10% 이하로 거의 반응이 진행되지 않았으나 polyacrylamide bead에 효소를 고정화시켰을 경우에는 첨가된 수용액의 농도가 30%에서 에스테르화 수율이 약 40% 정도로 비교적 높았다고 보고하였다. Mori 등(5)은 첨가된 수용액의 농도가 20%인 에탄올 용액에서 Sephadex LH-20에 흡착된  $\alpha$ -chymotrypsin에 의한 에스테르화 수율은 약 80% 정도였으며, 첨가된 수용액의 농도 30% 이상

일 경우 수율이 20% 이하로 급격하게 감소하였다고 보고하였다. Kise 등(6)은 acetyltryptophan의 에스테르화 반응 중, 2.4%의 수용액이 함유된 에탄올 용액에서 chitosan에 흡착된  $\alpha$ -chymotrypsin을 이용한 에스테르화 반응의 수율은 83%였다고 보고하였다. 또한 Noritomi 등(20)은 polyvinyl alcohol에 고정화시킨  $\alpha$ -chymotrypsin에 의한 acetyltyrosine의 에스테르화 반응 결과, 2.4%의 수용액이 함유된 에탄올 용액에서 80% 이상의 높은 수율을 얻었다고 보고한 바 있다.

**반응조건 내에서  $\alpha$ -Chymotrypsin의 안정성**

효소의 안정성을 검토하기 위하여 에스테르화 반응의 최적 조건 하의 에탄올 용매(2% buffer 함유) 내에서 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7일간 방치한 후 기질을 각각 첨가하였을 때의 에스테르화 수율을 측정하여 효소의 안정성을 상대적 효소의 활성으로 나타낸 결과는 Fig. 5와 같다. 7일 경과 후 효소의 활성은 chitin을 첨가하였을 경우 약 70%로서, chitin을 첨가하지 않은 경우보다 효소의 안정성이 10% 정도 높았다. Mori 등(5)은 에탄올 용액, cyclohexane 용액 및 완충용액(66/33/1; v/v/v)을 섞은 혼합 용매 속에서 Sephadex LH-20에 흡착된  $\alpha$ -chymotrypsin에 의한 acetyltyrosine(16mM)의 에스테르화 반응에서 효소의 안정성은 6일 경과 후 그 상대적 활성이 50%로 감소하였고, Sepharose 4B에

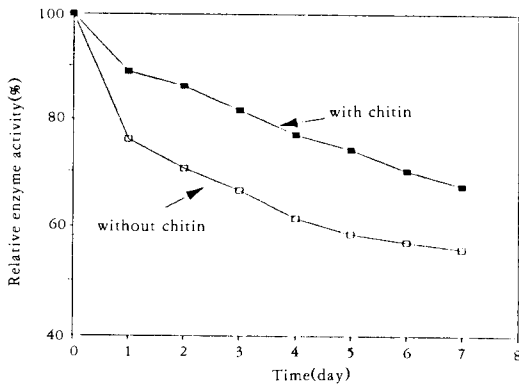


Fig. 5. The stability of  $\alpha$ -chymotrypsin in esterification reaction condition. The esterification reactions for Ac-Tyr-OH were carried out with  $\alpha$ -chymotrypsin(10mg) and chitin(200mg) in 10ml ethanol containing 2% water content after specific time.

공유결합된  $\alpha$ -chymotrypsin은 7일 경과 후 활성은 60% 이상까지 유지하였다고 보고하였다.

**에스테르화 반응에서 Km 및 Vmax 값  
Ac-Tyr-OH 기질의 농도 변화에 따른 Km 및**

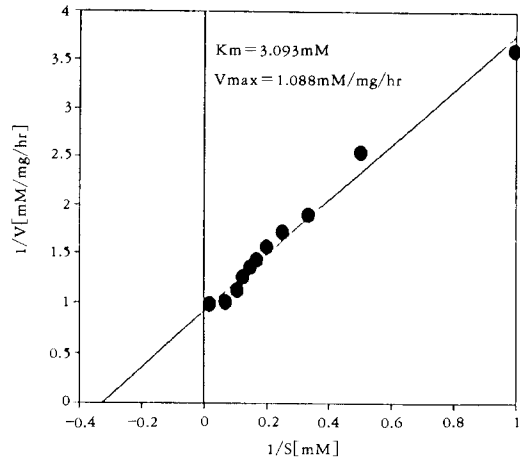


Fig. 6. Km and Vmax value for the esterification of Ac-Tyr-OH. The esterifications of Ac-Tyr-OH(1mM~20mM) in ethanol(10ml) [containing 2%(v/v) of 0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.0],  $\alpha$ -chymotrypsin(10mg) and chitin(200mg) were carried out at 35°C for 1hr.

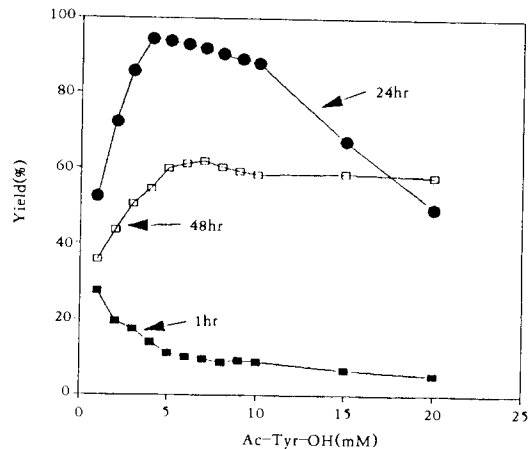


Fig. 7. The esterification yield on various substrate(Ac-Tyr-OH) concentrations. The experiment conditions are the same as conditions in Fig. 6.

Vmax 값과 수율은 Fig. 6 및 Fig. 7과 같다. Km 값은 3.093mM이며, Vmax 값은 1.088mM/mg/hr 이었다. 반응시간 24시간에서의 에스테르화 수율은 Ac-Tyr-OH의 농도가 4mM일 때 가장 높았다. 또한 48시간 동안 반응시켰을 경우 24시간보다 오히려 수율이 감소하는 것으로 보아 반응시간이 길어질수록 합성된 에스테르가 첨가된 수용액에 의해 그 역방향인 가수분해 반응으로 진행된다는 것을 알 수 있다. Kise와 Shirato(21)도 에스테르화 반응에서 일정 시간 이상 경과할 경우, 수율이 감소한다고 보고한 바 있다.

## 요 약

Ac-Tyr-OH의 에스테르화 반응은 water/water-miscible organic solvent를 이용하여 단일상계(one-phase system) 조건 하에서  $\alpha$ -chymotrypsin의 촉매작용으로 진행하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

Ac-Tyr-OH(10mM)이 함유된 에탄올(10ml)[4% (v/v) buffer 함유] 용액에서  $\alpha$ -chymotrypsin의 촉매작용에 의한 에스테르화 반응에 영향을 미치는 흡착물질 chitin, chitosan, Sephadex G-25 및 G-50, CM- 및 DEAE-Sephadex, CM- 및 DEAE-cellulose 중 chitin을 첨가하였을 경우, 에스테르화 수율이 62%로 가장 높았다. 그리고 에스테르화 수율에 미치는 최적반응조건은 chitin/ $\alpha$ -chymotrypsin의 비가 20(w/w), 온도 35°C, pH 8.0 및 유기용매에 첨가된 수용액의 농도는 2% (v/v)였다. 또한, water/water-miscible organic solvent system에서 chitin의 첨가는 효소의 안정성에 기여하는 것으로 나타났다. 최적반응조건 하에서 에스테르화 반응의 수율, Km 및 Vmax 값은 각각 93%, 3.093mM 및 1.088mM/mg/hr이었다.

## 참고문헌

1. J. S. Dordick(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 194.
2. A. M. Klibanov, G. P. Samokhin, K. Martinek and I. V. Berezin(1977), *Biotech. Bioeng.*, **19**, 1351.
3. A. Zaks and A. M. Klibanov(1984), *Science*, **224**, 1249.
4. R. G. Ingalls, R. G. Squires and L. G. Butler (1975), *Biotech. Bioeng.*, **17**, 1627.
5. T. Mori, K. Nilsson, P. O. Larsson and K. Mosbach(1987), *Biotech. Lett.*, **9**, 455.
6. H. Kise, A. Hayakawa and H. Noritomi (1990), *J. Biotech.*, **14**, 239.
7. P. Lozano, J. L. Iborra, A. Manjon and D. Combes(1992), *Biotech. Lett.*, **14**, 933.
8. R. S. Phillips, M. S. Matthews, E. Olson and R. L. von Tersch(1990), *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 731.
9. H. Kise and A. Hayakawa(1991), *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 584.
10. P. Lozano and D. Combes(1992), *J. Biotech.*, **14**, 239.
11. Y. Kawamura, K. Nakanishi, N. Matsuno and T. Kamikubo(1981), *Biotech. Bioeng.*, **33**, 1219.
12. K. Ichimura(1984), *Polymer Chemistry Edition*, **22**, 2817.
13. K. Imai, T. Shiomi, K. Uchida and M. Miya (1986), *Biotech. Bioeng.*, **38**, 1721.
14. 변희국, 강옥주, 김세권(1992), *한국농화학회지*, **35**, 265.
15. G. Bell, J. A. Blain, J. D. E. Paterson, C. E. L. Shaw and R. J. Todd(1978), *FEMS Microbiol. Lett.*, **1**, 211.
16. J. R. Whitaker and M. L. Bender(1965), *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2728.
17. J. Fastrez and A. R. Fersht(1973), *Biochemistry*, **12**, 2025.
18. D. F. Tai, S. L. Fu, S. F. Chuang and H. Tasi (1989), *Biotech. Lett.*, **11**, 173.
19. D. Cantacuzene, F. Pascal and C. Guerreiro (1987), *Tetrahedron*, **43**, 1823.
20. H. Noritomi, A. Watanabe and H. Kise (1989), *Polymer J.*, **21**, 147.
21. H. Kise and H. Shirato(1985), *Tetra. Lett.*, **26**, 6081.
22. H. Kise, A. Hayakawa and H. Noritomi (1987), *Biotech. Lett.*, **9**, 543.
23. H. Kise and H. Shirato(1988), *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 582.