

양친매상 효소반응에 의한 알킬글루코시드의 합성연구

허 주 형 · *임 교 빈 · †김 해 성

명지대학교 공과대학 화학공학과, *수원대학교 공과대학 화학공학과

A Study on Alkyl Glucoside Synthesis by Amphiphilic Phase Enzyme Reaction

Joo Hyung Heo, Gio-Bin Lim*, and Hae Sung Kim †

Department of Chemical Engineering, College of Engineering,
Myong Ji University, Yongin, Kyonggi 449-728, Korea

* Department. of Chemical Engineering, College of Engineering,
The University of Suwon, Suwon, Kyonggi 445-743, Korea

ABSTRACT

An amphiphilic phase enzyme reaction was used to synthesize alkyl glucosides from glucose and alkyl alcohol with immobilized β -glucosidase using four glycol ether cosolvents(monoglyme, diglyme, 2-methoxyethanol, and 1,4-dioxane). Monoglyme was shown to be the best cosolvent for the amphiphilic phase medium composed of water/cosolvent/alkyl alcohol admixture. To obtain high yield of alkyl glucoside by amphiphilic phase enzyme reaction, hydrophilicity-hydrophobicity of amphiphilic media and enzyme microenvironment was optimized from the viewpoints of substrate solubility, enzyme activity, water activity, and dynamic equilibrium between glucose alcoholysis and glucoside hydrolysis. Under optimum reaction conditions, the highest concentrations of hexyl, octyl, decyl, and dodecyl glucosides were 18.2, 9.68, 7.27, and 6.03g/L, respectively.

서 론

기능성 당화합물을 합성하기 위해서는 단순한 결합구조를 가진 알킬글루코시드(alkyl glucoside)로부터 출발하여 필요로 하는 결합구조를 형성시키거나 그 배열구조를 조절하는 것이 경제적이므로 기능성 당화합물을 생산하고자 하는 정밀화학공업, 식품과 화장품 공업 및 약리학과 의학 등의 연구 분야에서는 최근 많은 관심과 함께 알킬글루코시드에 관한

연구(1-4)가 계속되고 있으며 장래에는 상업적으로 다양한 알킬글루코시드를 생산해야 할 것으로 기대된다. 최근에는 식물체에 존재하는 알킬글루코시드가 독성물질을 중화할 수 있고 불안정한 생리물질과 방향성분을 안정화시키며(1) 막단백질을 가용화할 수 있다(5, 6)는 기능이 밝혀지면서 범용성 생체계면활성제로 쓰이는 alkyl polyglucoside보다는 분자구조가 간단하고 투석으로 완전 제거되며 생리활성물질의 입체구조를 안정화시키면서 입체광학적 관점에서 순수한 알킬글루코시드를 생체적합성공정(biocompatible process)으로 생산하기 위한 연구에

† Corresponding Author

관심이 집중되고 있다(2, 3).

알킬글루코시드는 Fisher(7), Noller와 Rockwell(8)에 의하여 화학적으로 합성된 이래 neighbouring group assisted procedure, in situ anomerization procedure 및 heterogeneous catalyst procedure 등의 화학적인 방법(9)으로 발전되어 왔으나 관능기의 보호, 활성화, 탈보호 단계로 이루어지는 다단계 반응과정을 거쳐야 함으로 수율과 생산성이 낮고 필요한 아노머를 얻기 위해서는 입체선택성을 조절하여야 하지만 근본적으로는 해결할 수 없었다. 한편 생체적합성 반응공정은 효소반응기술의 발전과 함께 위치특이성과 입체특이성을 활용하여 입체광학적 관점에서 순수한 알킬글루코시드를 얻을 수 있고 각 단계마다 문제가 되는 분리 및 정제비용을 절감할 수 있으므로 기능성 알킬글루코시드의 유망한 생산공정으로 평가되고 있다. 알킬글루코시드의 효소적 합성법은 Chaid 등(10), Laroute와 Willemot(11), Vic 등(12), Vulfson 등(13), Trincone 등(14)의 많은 연구자에 의하여 발전되어 왔으나, 높은 효소농도를 사용함에도 불구하고 반응속도와 수율이 낮고 여전히 상용화 수준과는 거리가 멀 뿐만 아니라 체계적인 연구결과도 제시되어 있지 못한 실정이다. 지금까지 보고된 연구결과를 종합적으로 검토해 보면 알킬글루코시드의 반응매질은 친수성매질과 소수성매질로 구분되는데, 친수성 반응계의 경우에는 효소 활성도와 안정성 및 당의 용해도는 소수성 반응계에 비하여 바람직하지만 알코올 분해반응(alcoholysis)보다는 가수분해반응(hydrolysis)이 우세하여 알킬글루코시드의 수율과 농도가 낮은 반면에, 소수성 반응계의 경우에는 효소의 활성도와 안정성 및 당의 용해도가 낮으며 생체적합성이 없고 수용성반응물과 알킬알코올이 균일상으로 존재할 수 없다는 문제점이 지적되고 있다.

본 연구에서는 친수성기질과 소수성기질을 함께 수용하는 수용성 상용매를 사용하여 반응매질의 친수성과 소수성이 알킬글루코시드의 합성반응에 적합하도록 조절된 양친매질을 개발하고 hydrophilicity control이 이루어진 효소반응기술을 이용하여 효소의 활성도와 안정성, 기질의 가용화, 알킬글루코시드의 수율과 농도의 관점에서 가장 바람직한 양친매상 효소반응공정(amphiphilic phase enzyme reaction process)을 제시하였다. 양친매질은 염화나트륨과 같은 염을 첨가하여 수용상과 유기상으로 상분리시킬 수 있고, 수용성 미반응물과 알킬글루코시드를 크로마토그래피법으로 분리·정제할 수 있으

므로 반응공정과 분리공정을 integrated production process로 통합하면 기능성 알킬글루코시드의 창의적인 생산공정이 될 것으로 전망된다.

재료 및 방법

실험재료

알킬글루코시드를 합성하기 위한 효소로는 글루코시다제(β -glucosidase, E.C. 3.2.1.21, from Almonds, 14 units/mg, Sigma)를 사용하였으며 글루코시드 공여체로는 포도당(glucose, Sigma)을 사용하였고 글루코시드 수용체로는 헥사놀(hexanol, Junsei), 옥타놀(octanol, Junsei), 데카놀(decanol, Sigma) 및 도데카놀(dodecanol, Sigma) 등의 특급 시약을 사용하였다. 양친매질을 구성하기 위한 상용매로는 HPLC 급의 monoglyme(1,2-dimethoxyethane, Sigma), diglyme(1,1'-oxybis[2-methoxyethane], Sigma), 2-methoxyethanol(Osaka Hayashi Pure Chemical Industries, Ltd.), 및 1,4-dioxane(Sigma) 등을 사용하였으며, 글루코시다제의 활성도를 측정하기 위한 기질로는 PNPG(p-nitrophenylglucoside, Sigma)를 사용하였다. 효소고정화에 사용한 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, TCI), 글루타르알데히드(glutaraldehyde, Merck), 트리에틸아민(triethylamine, TCI), 솔비톨(sorbitol, Sigma) 및 알긴산나트륨(sodium alginate, Junsei) 등은 특급시약을 사용하였으며, 기타 시약들도 특급 혹은 HPLC급을 사용하였다.

Biocatalyst제조

라텍스 폴리머(입경 0.3 μ m, 고형분 45wt%, pH 4~5, styrene/acryl ratio 55/45, acrylamide 함량 0.3wt%) 현탁액 1mL에 pH 8.0 붕산염 완충액 8mL와 1%의 폴리에틸렌이민 수용액 1mL를 첨가하고 상온에서 1시간 동안 교반하여 microspheres 표면에 친수성 피막을 형성시키고, pH7.0 인산염 완충액으로 제조한 2.5%의 글루타르알데히드 수용액 36mL와 트리에틸아민 40 μ L를 가하고 2시간 동안 교반시켜 알데히드가 도입되도록 한 후 여과 세정하였다. 글루타르알데히드가 결합된 microspheres를 솔비톨(2%(w/v))이 첨가된 글루코시다제수용액(2mg/mL, pH 5.0 초산염 완충액) 20mL에 분산시키고 4 $^{\circ}$ C로 3시간 동안 고정화한 후 pH5.0 초산염 완충액으로 여과 세정하였으며, 여과 전 후의 흡광도를 280nm에서 측정하여 고정화 함량을 산출

하였다. 0.9% (w/v)의 알긴산나트륨수용액에 글루코시다제가 고정화된 microspheres를 고르게 분산시키고 0.1M 염화칼슘수용액으로 겔화하여 완전구형의 alginate-enclosed microspheres 효소캡슐을 얻었다.

Alginate-enclosed microspheres의 활성도는 40°C에서 1.25mM의 PNPG용액에 효소농도가 1.5/μg/mL가 되도록 alginate-enclosed microspheres를 첨가하고 전환율이 1~2%가 되었을 때 0.2M의 Na₂CO₃ 수용액으로 반응을 정지시킨 후 생성된 니트로페놀(p-nitrophenol)의 농도를 400nm에서 분광광도법으로 측정하여 결정하였다.

알킬글루코시드의 합성 반응

반응온도 40°C, pH 5.0으로 유지된 30mL의 시험관 반응기에서 HPLC 급의 모노글라이머(mono-lyme), 디글라이머(diglyme), 2-메톡시에탄올(2-methoxyethanol) 및 디옥산(1,4-dioxane)을 상용용매로 하는 양친매상 효소반응계를 구성하고 최적 상용용매를 결정한 후에 자연효소의 경우에는 1mg/mL, 고정화 효소의 경우에는 0.5mg/mL의 효소를 첨가한 후 알킬글루코시드를 합성하였다. 매시간마다 시료 0.5mL씩을 취하여 0.2M의 Na₂CO₃수용액 0.5mL를 가하여 반응을 정지시킨 후 진공건조시켜 용매 1mL에 녹여서 HPLC로 분석하였다. 포도당과 알킬글루코시드는 탄수화물 칼럼(carbohydrate column, 4.6×250mm, Waters)에 20 μL의 시료를 주입하고 아세토니트릴/메탄올/초순수(80:17:3(v/v), 1.4mL/min)를 이동상으로 하여 RI 검출기로 측정하는 HPLC(600E pump & controller, R401 RI detector, M746 integrator, Waters)법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

최적 상용용매

양친매상을 구성하기 위한 상용용매는 물과 알킬알코올을 함께 혼합시키고 효소의 활성도를 높게 유지하며 물의 활동도를 낮추어 알킬글루코시드의 합성반응에 유리하게 작용하여야 한다. 이와 같은 관점에서 바람직한 물성을 구비한 것으로 알려진 글리콜 에테르(glycol ether)를 검토한 결과 모노글라이머, 디글라이머, 2-메톡시에탄올 및 디옥산이 우수함을 알 수 있었고(15, 16) 헥실글루코시드의 합성반응속도와 최대농도를 기준으로 최적 상용용매를 결

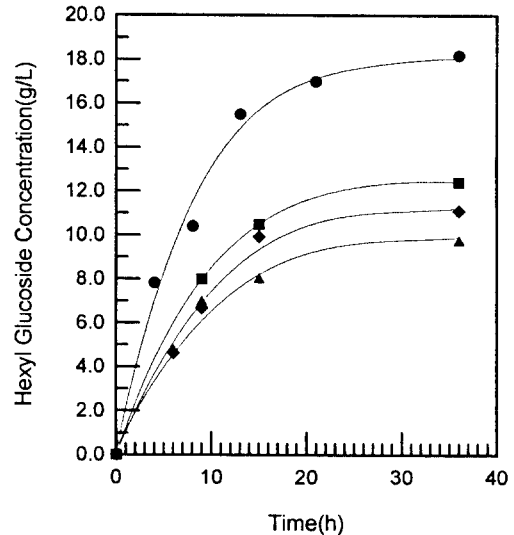


Fig. 1. Effect of different cosolvents on hexyl glucoside synthesis by β glucosidase. (●) monoglyme, (■) diglyme, (◆) 2-methoxyethanol, (▲) 1,4-dioxane.

정하였다. 반응온도 40°C로 유지된 30mL의 시험관 반응기에서 상용용매/초산염 완충액/헥사놀의 함량이 각각 60, 30 및 10% (v/v)가 되도록 양친매질을 구성하여 포도당농도 45g/L, 고정화 효소농도 0.5mg/mL, pH 5.0으로 하여 헥실글루코시드를 합성하고 그 전이농도를 Fig. 1에 나타내었다. 4가지의 양친매질에서 헥실글루코시드의 합성반응속도와 최대농도를 비교 검토한 결과 모노글라이머를 상용용매로 사용한 경우가 가장 빠르고 18.2g/L로 가장 높았으며, 디글라이머, 2-메톡시에탄올, 디옥산 순으로 나타났다. 모노글라이머는 물과 임의의 비율로 혼합시킬 수 있고 비교적 안전한 생체적합성 용매이며 바람직한 물리화학적 특성(비중:0.8629, 비점:82~83°C)을 구비하였을 뿐만 아니라, 글루코시다제의 활성도는 높게 유지하면서 물의 활동도를 낮게 유지한 것으로 판단되므로 최적상용용매임을 알 수 있었다.

양친매질의 조성 and 최적 pH

일반적으로 친수성 반응매질에서는 효소의 활성도와 당의 용해도는 높으나 알킬알코올의 농도가 낮고 가수분해반응이 우세한 반면에, 소수성 반응매질에서는 알코올분해반응이 우세하지만 효소의 활성도와 당의 용해도가 감소하므로, 양친매질의 조성은 친수성과 소수성이 알킬글루코시드의 합성반응에 적합하

Table 1. Amphiphilic media composition for alkyl glucoside synthesis

Components	Alkyl Glucosides			
	Hexyl Glucoside	Octyl Glucoside	Decyl Glucoside	Dodecyl Glucoside
Monoglyme (%,v/v)	60	70	72	72
Acetate Buffer (%,v/v)	30	20	20	20
Alkyl Alcohol (%,v/v)	10	10	8	8
Glucose Solubility (%,w/w)	6.68	3.05	2.23	1.58
Added Glucose Concentration (mol/L)	0.250	0.139	0.111	0.067
Added Alkyl Alcohol Concentration (mol/L)	0.798	0.635	0.419	0.357

도록 최적화 되어야 한다. 모노글라임을 최적상용용매로 한 양친매질의 조성은 합성하고자 하는 알킬글루코시드의 수율이 높도록 기질인 포도당과 알킬알코올의 농도뿐 만 아니라 효소의 활성도도 높게 유지되도록 최적화 하였다. 포도당농도를 높게 유지하기 위해서는 수분함량은 높고 상용용매의 함량은 낮아야 하지만 임계함량 이하로 되면 알킬알코올이 상분리되므로 알킬알코올의 함량도 함께 고려되어야 하는데 균일상을 이루면서 가능한 한 포도당과 알킬알코올의 농도가 높게 유지되는 양친매질의 조성은 수분함량 20~30%, 알킬알코올함량 8~10%, 모노글라임함량이 60~72%임을 용해도실험으로 알 수 있었다. 25℃에서 최적화된 양친매질의 조성을 Table 1에 나타내었으며 포도당 용해도는 알킬알코올의 함량에 따라서 최고 6.68% (w/w)에서 최저 1.58% (w/w)이며 알킬글루코시드를 합성하기에 충분한 포도당농도와 알킬알코올농도를 유지할 수 있었다. 포도당과 알킬알코올의 몰비는 포도당농도가 너무 높고 알킬알코올의 농도가 낮으면 알킬글루코시드의 수율은 감소하고 이당류의 수율이 증가하므로 포도당농도 0.250~0.067M에 대하여 3~5가 되도록 하였다. 고정화 글루코시다제의 활성도를 높게 유지하기 위해서는 모노글라임/초산염 완충액의 pH를 4.6~5.4로 변화시키면서 반응온도 40℃, PNPG 농도 1.25mM, 효소농도 1.5 µg/mL이 되도록 한 후에 전하율이 1~2%가 되도록 반응시키고 생성된 니트로페놀의 농도를 400nm에서 분광광도법으로 측정하여 상대 활성도(relative activity)를 구해서 pH를 최적화 하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이

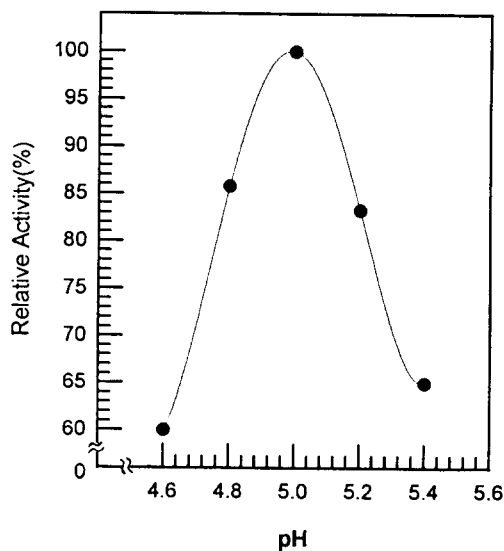


Fig. 2. Effect of pH on relative activity.

5.0이 최적 pH였다.

알킬글루코시드의 합성

알킬글루코시드의 합성반응은 당공여체 (glycosyl donor)인 포도당이 당수용체 (glycosyl acceptor)인 알킬알코올과 글루코시다제에 의해서 글리코시드 결합을 이루는 알코올분해반응 (alcoholysis)과 알킬글루코시드가 다시 기질로 작용하는 가수분해반응 (hydrolysis)에 의하여 지배되는데

Table 2. Comparison of different results for hexyl glucoside synthesis

Study Group	Added Enzyme (mg/mL)	Added Glucose (g/L)	Reaction Temperature (°C)	Equilibrium Conversion (%)	Maximum Product Concentration (g/L)
Vulfson et al.(13)	0.75(immobilized)	36	38	20	10.6
Laroute & Willemot(11)	3(native)	5	40	6	0.44
Vic et al.(12)	5(native)	35	40	5	2.57
Kim et al. Present Study	1.0(native)	45	40	21.3	13.2
Kim et al. Present Study	0.5(immobilized)	45	40	29.4	18.2

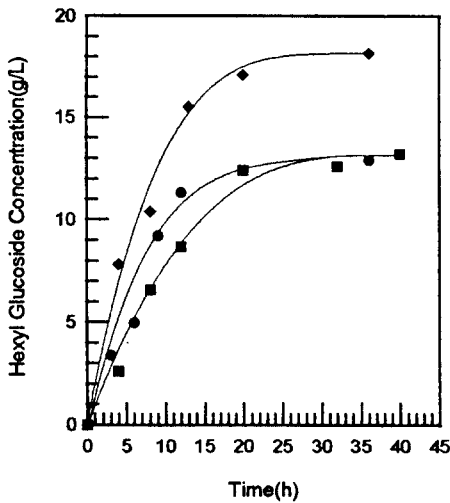
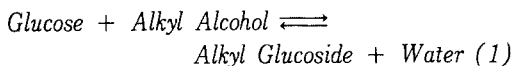


Fig. 3. Kinetics of hexyl glucoside synthesis by β -glucosidase. (■) 1 mg/mL, native; (●) 1.5 mg/mL, native; (◆) 0.5 mg/mL, immobilized β -glucosidase.



포도당농도가 비교적 높고 알킬알코올과의 물비가 상대적으로 낮으면 포도당과 포도당이 결합하여 젠티오비오스(gentiobiose), 셀로비오스(cellobiose) 등의 이당류를 생성하는 축합반응이 동시에 진행되거나 포도당농도가 낮고 알킬알코올의 물비가 큰 경우에는 HPLC로 확인한 결과 이당류의 생성반응은 무

시할 수 있었다.

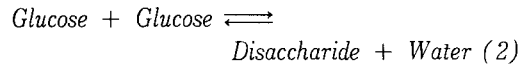


Fig. 3에는 반응온도 40°C, pH 5.0일 때 모노글라임, 초산염 완충액, 핵사놀이 60, 30 및 10%인 양친매질에서 포도당농도 0.250M, 핵사놀농도 0.798M로부터 핵실글루코시드를 합성하여 그 전이농도를 도시하였고, Table 2에는 Laroute와 Willemot (11), Vic 등(12), Vulfson 등(13)의 연구결과와 비교 검토하였다. 본 연구에서 제시한 양친매상 효소반응계는 반응매질의 친수성과 소수성이 알킬글루코시드의 합성반응에 유리하도록 수분과 상용용매의 함량을 최적화 하였고 효소의 활성도와 기질의 용해도는 높게 유지하면서 물의 활동도를 약화시켜 가수분해반응을 효과적으로 억제하였으므로 고정화효소의 경우에는 18.2g/L, 자연효소의 경우에는 13.2g/L라는 높은 핵실글루코시드농도와 29.4%, 21.3%의 평형전환율을 얻었다. 고정화 효소의 반응특성이 반응속도와 평형전환율의 관점에서 자연효소보다 우수하였으며, microspheres표면에 균일하게 단분자층으로 배열된 고정화 효소는 양친매질에 분산된 자연효소보다도 입체장애(steric hindrance)가 작으므로 그 활성점이 효율적으로 활용되었으며(17), microspheres의 표면화학적 특성이 알킬글루코시드보다는 포도당과 효소가 활성화합물을 형성하도록 선택적으로 작용한 것으로 판단된다. 스티렌/아크릴 microspheres의 표면처리제인 폴리에틸렌이민은 다가양이온성 아민류로 음이온성 아크릴아마이드를 함유한 라텍스 입자의 표면과 정전기적으로 결합하여 강력한 친수성 피막을 형성시키며, 이 친수성 표면 위에

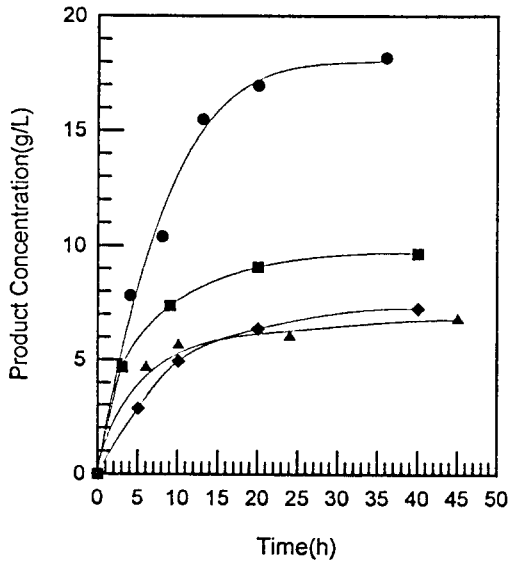


Fig. 4. Kinetics of alkyl glucoside synthesis. (●) hexyl glucoside, (■) octyl glucoside, (◆) decyl glucoside, (▲) dodecyl glucoside.

수많은 활성점을 수용하면서 친수성 기질이 활성점에 접근하는 것은 쉽게 하지만 소수성 기질은 배척함(18)으로서 알킬글루코시드보다 상대적으로 친수성이 강한 포도당이 글루코시다제와 활성화합물을 형성하도록 hydrophilicity control이 이루어진 것으로 판단된다. 이와 같은 분위기에서는 알킬글루코시드가 글루코시다제의 기질로 작용하기가 어렵고 상용용매가 물의 활성도를 낮추기 때문에 가수분해반응이 억제되었으며 hydrophilicity control이 헥실글루코시드의 합성반응에 유리하게 작용하였다.

Fig. 4에는 고정효소농도 0.5mg/mL, 반응온도 40°C, pH5.0인 양친매상 효소반응계에서 Table 1에 나타난 기질농도로부터 헥실글루코시드, 옥틸글루코시드, 데실글루코시드 및 도데실글루코시드를 합성하고 그 전이농도를 도시하였으며 약 20시간이 경과한 후 거의 평형에 도달하였고 최대농도는 각각 18.2, 9.68, 7.27, 6.03g/L로 지금까지 보고된 연구결과중 가장 높은 농도를 얻었다. 헥실글루코시드를 합성한 경우에는 반응한 포도당 중 약 6%가 이당류로 전환되었으나 포도당농도가 낮고 알킬알코올의 물비가 큰 경우에는 이당류의 생성량은 무시할 수 있었다. 주로 탄소수가 6~8이하인 저급알코올과 포도당을 중심으로 연구된 효소적 합성반응기술은 친

수성 당분자와 소수성 알킬알코올을 높은 농도로 혼합시키는 반응매질을 개발하지 못하여 기능이 다양한 고급알킬글루코시드를 합성할 수 없었으며, 효소비용의 비중이 크고 알킬글루코시드의 수율과 농도가 낮아서 대규모생산기술로 발전되지 못하고 연구수준에 머물러 있었으나, 생체적합성 양친매질과 hydrophilicity control이라는 새로운 효소반응기술을 바탕으로 하여 경제적이고 실용성 있는 연속생산기술로 발전될 수 있을 것으로 기대된다. 장래에는 상용용매를 이용한 양친매상 반응기술과 hydrophilicity control이 이루어진 효소촉매기술을 기반기술로 하여 염침가에 의한 상분리법과 소수성담체를 이용한 크로마토그래피법을 결합시키면 기능이 다양한 알킬글루코시드를 integrated production process로 연속생산할 수 있을 것으로 전망된다.

요 약

본 연구에서는 친수성기질과 소수성기질을 함께 수용하는 수용성 상용용매를 사용하여 반응매질의 친수성과 소수성이 알킬글루코시드의 합성반응에 적합하도록 조절된 양친매질을 개발하고 hydrophilicity control이 이루어진 효소반응기술을 이용하여 효소의 활성도와 안정성, 기질의 가용화, 알킬글루코시드의 수율과 농도의 관점에서 가장 바람직한 양친매상 효소반응공정(amphiphilic phase enzyme reaction process)을 제시하였으며, 헥실글루코시드, 옥틸글루코시드, 데실글루코시드 및 도데실글루코시드를 합성한 결과 생성물 농도는 각각 18.2, 9.68, 7.27, 6.03g/L을 얻었다.

감 사

본 연구는 에너지자원기술개발 지원센터의 연구비로 수행되었으며 관계기관에 감사드립니다.

참고문헌

1. 榑原敏之(1990), *油化學*, **39**, 451.
2. L. Mutua and C. C. Akoh(1993), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 43.
3. P. Rosenvear, T. VanAken, J. Baxter, and S. Ferguson-Miller(1980), *Biochemistry*, **19**, 4108.
4. C. F. Goochee and T. Monica(1990), *Bio/*

- Technol.*, **8**, 421.
5. P. L. Felgner, J. L. Messer, and J. E. Wilson (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4946.
 6. W. A. Perti, Jr. and R. R. Wagner(1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4313.
 7. E. Fisher(1893), *Ber.*, **26**, 2400.
 8. C. R. Noller and W. C. Rockwell(1983), *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 2076.
 9. H. Paulsen(1986), *New Synthetic Methodology and Functionally Interesting Compounds*, (Z. -I. Yoshida, ed.), p. 243, Elsevier, New York.
 10. I. Chahid, D. Montet, M. Pina, J. Graille, and Irao-Cirad(1992), *Biotechnol. Lett.*, **14**, 281.
 11. V. Laroute and R. -M. Willemot(1992), *Biotechnol. Lett.*, **14**, 169.
 12. G. Vic, J. Biton, D. L. Beller, J. -M. Michel, and D. Thomas(1995), *Biotechnol. Bioeng.*, **46**, 109.
 13. E. N. Vulfson, R. Patel, and B. A. Law (1990), *Biotechnol. Lett.*, **12**, 397.
 14. A. Trincone, B. Nicolaus, L. Lama, P. Morzillo, M. D. Rosa, and A. Gambacorta (1991), *Biotechnol. Lett.*, **13**, 235.
 15. V. Laroute and R. -M. Willemot(1992), *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 528.
 16. R. A. Kazandjian, J. S. Dordick, and A. M. Klivanov(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 417.
 17. J. S. Dordick(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 194.
 18. 허주형, 김해성(1993), *한국생물공학회지*, **8**, 313.