

# 초임계 이산화탄소에서 리파아제-효소를 이용한 부탄올 구조이성질체의 에스테르화 반응의 분자 동역학 연구

권정훈 · 정정영 · 송광호 · 김선욱\* · 강정원†

고려대학교 화공생명공학과, \*고려대학교 전기전자전공공학부  
(2007년 11월 14일 접수, 2007년 11월 27일 채택)

## Molecular Dynamics Simulation Study of Lipase-catalyzed Esterification of Structural Butanol Isomers in Supercritical Carbon Dioxide

Cheong-Hoon Kwon, Jeong-Yeong Jeong, Kwang Ho Song, Seon Wook Kim\*, and Jeong-Won Kang†

Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, Seoul 136-701 Korea

\*The School of Electrical Engineering, Korea University, Seoul 136-701 Korea

(Received November 14, 2007; accepted November 27, 2007)

부탄올의 구조이성질체(n-, iso-, sec-, tert-butanol)와 n-부티르산에 대한 리파아제 효소-촉매 에스테르화 반응이 초임계 이산화탄소 조건 하에서 수행되었다. 본 실험은 교반속도 150 rpm, 반응 온도 323.15 K, 반응 압력 150 bar의 조건으로 고압 반응기에서 5 h 동안 수행하였다. 실험에 사용된 리파아제는 *Candida Antarctica* lipase B (CALB)이다. 실험 결과는 HP-INNOWax 컬럼을 이용하여 FID (Flame Ionization detector)가 장착된 기체 크로마토그래피(Gas Chromatography, GC)를 이용하여 분석하였다. 반응 후 생성물의 전환률과 반응의 경향성을 분자동역학 시뮬레이션을 이용하여 예측된 결과와 정성적으로 비교하였다. 경쟁적인 저해반응이 포함된 Ping-Pong Bi-Bi 메커니즘을 기초로 하여, 반응의 각 단계를 적용하여 구조 최적화를 하였고 이를 이용해 전이상태의 에너지를 구하여 반응의 경향성을 예측하였다. 생성되는 에스테르 이성질체의 구조적 선호도는 분자동역학 시뮬레이션을 통하여 분석하였다. 이러한 방법의 개발은 앞으로 컴퓨터를 이용한 효소 반응의 설계에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

Lipase-catalyzed esterification of structural butanol isomers and n-butyric acid was investigated in supercritical carbon dioxide. The experiments were performed in a high pressure cell for 5 hrs with a stirring rate of 150 rpm at 323.15 K and 130 bar. The *Candida Antarctica* lipase B (CALB) was used in whole system as a catalyst. The experimental results were analyzed by GC-FID using a INNOWax capillary column. The conversion yield and the tendency of the esterification in supercritical carbon dioxide were compared with estimated results by molecular dynamics simulation. Based on the Ping-Pong Bi-Bi mechanism with competitive inhibition, each step of the reaction was optimized; using this result the transition state was predicted. Conformational preference of isomers was also analyzed using molecular dynamics simulations. This kind of approach will be further extended to the prediction of enzyme-catalyzed reactions using computers.

**Keywords:** structural butanol isomers, esterification, supercritical carbon dioxide, CALB, molecular simulation

### 1. 서 론

최근 리파아제 촉매를 활용한 에스테르화 반응과 가수분해 반응의 연구가 꾸준히 진행되고 있다[1-3]. 효소 촉매 반응을 통해 얻을 수 있는 에스테르는 높은 광학적 이성질체 선택도 때문에 의약품, 미용산업과 식품 산업 분야에서 관심을 받고 있다[4-6]. 본 연구에서는 미용 및 식품 산업에서 유용하게 쓰이는 에스테르인 부티르산부틸의 합성 반응을 초임계 이산화탄소 내에서 수행하였다.

리파아제 촉매를 이용한 상온 상압의 에스테르화 반응으로 n-부티르산부틸, iso-부티르산부틸, sec-부티르산부틸은 합성이 가능한 반면 tert-부티르산부틸의 합성은 어려운 것으로 알려져 있다. 그래서 도입

한 방법이 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxide)를 용매로 사용하여 tert-부티르산부틸을 합성하는 것이다. 초임계 상태는 어떤 물질이 그 물질의 고유한 임계온도와 임계압력 이상의 조건일 때의 상태를 말한다. 이 상태에서 물질은 액체와 기체의 중간상태로 존재하며 밀도는 액체에 가깝지만 점도는 기체와 비슷한 값을 가지며 확산이 빠르며 열전도성이 높아 화학반응에 유용하다. 또한 이산화탄소는 친 환경적인 용매로 최근 사용이 증가하고 있다.

리파아제의 활용도가 증가하면서 적합한 반응기와 반응조건에 대한 연구와 반응 동역학에 대한 연구도 꾸준히 발전해왔다[7]. 또한 컴퓨터기술의 발전에 따라 분자동역학에 대한 연구방법도 발전하였다[8-11]. Sainz-Diaz[12]는 알코올이성질체에 대한 분자구조를 ab-initio 방법을 이용하여 계산하는 방법을 제안한 바 있다. Ab-initio 방법의

† 교신저자 (e-mail: jwkang@korea.ac.kr)

복잡함으로 인해 다른 연구자들은 반응의 경로에 대한 연구를 양자역학과 분자역학을 복합시킨 QM/MM (양자역학/분자역학 결합) 방법을 제안하였다[13,14].

본 연구에서는 부탄올의 구조 이성질체와 n-부티르산의 효소-촉매 반응을 양자 역학을 이용한 포텐셜 에너지의 변화를 이용하여 분석하였고, 전이상태의 에너지 값을 예측하였다. 그리고 사면체의 중간 생성물질의 구조번호를 알아보기 위해 분자역학적인 계산을 이용한 시뮬레이션을 수행하였다. 실행된 시뮬레이션 결과는 실험의 결과와 정성적으로 비교하여 전산 모델링의 유용성을 검증하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 물 질

n-, iso-, sec-, tert-부탄올과 n-부티르산은 Aldrich 사에서 공급된 시약을 사용하였다. 순도는 각각 99.9, 99.5, 99.5, 99.5, 99+%이었다. 촉매의 활성을 방해하지 않는 n-헥산을 용매로 사용하였고 이 역시 Aldrich 사의 99+% 시약을 사용하였다. 효소는 국내 엔자임텍사를 통해 수입된 NOVOZYME 사의 고정화 효소인 *Candida Antartica* lipase B (CALB)를 사용하였다.

### 2.2. 실험 장치

본 실험에서 사용된 실험 장치의 간략한 그림을 Figure 1에 수록하였다. 실험은 고압 셀(11)에서 수행되었고 반응기 내부의 총 부피는 150 mL이며, 시료는(10)에서 매 시간마다 채취되었다.

### 2.3. 실험 절차

각각의 부탄올 이성질체 0.1 mol과 n-부티르산 0.1 mol을 반응기에 넣고 30 mL의 n-헥산을 함께 넣은 후 5 g의 CALB 효소를 첨가하였다. 반응이 시작됨과 동시에 이산화탄소를 130 bar의 압력으로 주입하였고, 반응기의 온도는 323.15 K, 교반 속도는 150 rpm으로 일정하게 유지시켰다. 효소를 넣은 순간을 반응의 시작으로 간주하였고, 매 시간마다 일정량의 시료를 채취하였다.

### 2.4. 실험 분석

반응 시료는 매 시간마다 일정량을 취하여 Flame Ionization detector (FID)가 장착된 Gas Chromatography (GC)로 분석하였다. 이때 사용된 컬럼은 HP-INNOWax capillary 컬럼(30 m × 0.32 mm ID × 0.25 μm film thickness)이고 GC (7890A)와 컬럼 모두 Agilent사의 제품을 사용하였다. 분석은 다음과 같은 조건에서 수행하였다. 인젝터(injector)는 250 °C, 5.8 psi로 유지하고 오븐은 최초 3 min간 70 °C로 유지하고 그 후 5 min은 40 °C/min으로 200 °C까지 상승시켰으며 200 °C에서는 5 min간 유지하였다. FID는 250 °C 조건에서 사용하였고, 인젝션 부피는 1.0 μL로 하였고, 운반기체는 헬륨(He)을 사용하였다. 컬럼은 5.8 psi, 유속은 1 mL/min으로 하고 평균 유속은 20 cm/sec로 적용하였다. 수소의 유속은 35 mL/min, 공기의 유속은 250 mL/min, 헬륨의 유속은 30 mL/min을 설정하였다.

### 2.5. 분자시뮬레이션

#### 2.5.1. 물 질

효소의 구조는 Protein Data Bank (PDB)를 통하여 얻었으며 본 연구에서 사용한 CALB의 PDB code는 1TCA이다[16]. 효소는 단백질이기 때문에 그 구조가 매우 복잡하고 원자의 수 또한 매우 방대하다.

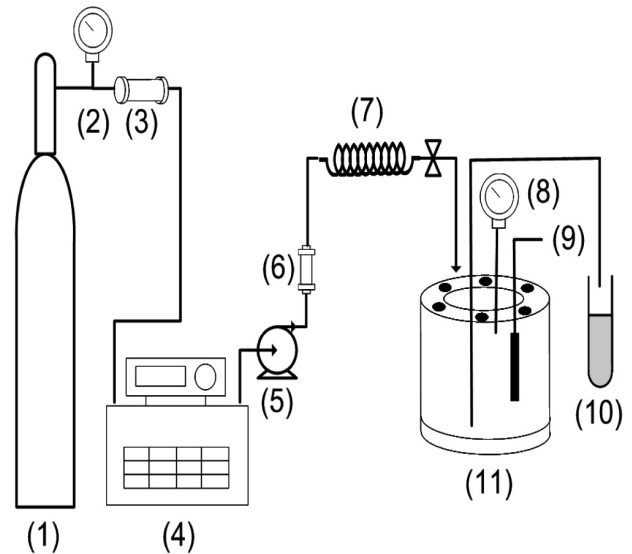


Figure 1. The experimental apparatus of enzyme-catalyzed esterification reaction by CALB: (1) CO<sub>2</sub> gas cylinder (2) Pressure gauge (3) Filter (4) Chiller (5) High-pressure pump (6) Check valve (7) Pre-heater (8) Pressure transducer (9) Temperature indicator (10) Sampling part (11) High-pressure cell with impeller.

복잡한 양자역학계산의 편이를 위해 효소의 구조 가운데 에스테르화 반응에서의 활성부분만(catalytic triad; Ser 105, Asp 187, His 224, anion hole; Thr 40, Gln 106)을 선택하여 단순화된 모델로 사용하였다. 본 연구에 사용된 CALB 효소의 활성부분을 Figure 2에 나타내었다. CALB는 고정화 효소이기 때문에 구조 최적화 시 수소원자를 제외한 나머지 부분은 모두 고정된 상태로 시뮬레이션을 수행하였다. 기질인 부탄올 이성질체와 부티르산의 구조는 Figure 3에 나타내었고 이 물질들은 HyperChem 프로그램[17]을 이용하여 semi-empirical MM2 방법으로 초기 구조 최적화를 실행하여 계산 시간을 단축하고자 하였다.

#### 2.5.2. 효소에 의한 반응경로

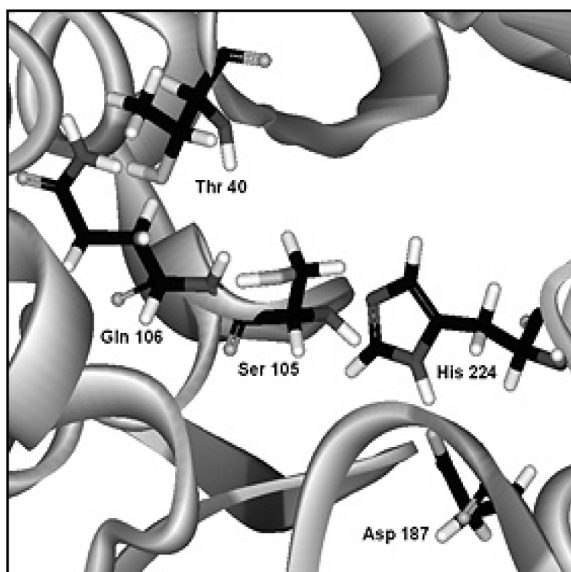
리피아제를 이용한 에스테르화 반응의 전체 반응 경로에 대한 에너지도표를 양자역학 계산을 통하여 얻을 수 있었다. 반응 메커니즘은 Anderson Magnusson[18]에 의해 제안된 이론을 참조하여 각 반응의 단계를 9단계로 나누어 진행하였다. 계산은 CAChe 6.1 소프트웨어 패키지[19]를 이용하였고 PM3 방법[20]으로 MOFAC 계산을 통해 구조 최적화 및 전이상태의 에너지를 구할 수 있었다. 계산된 에너지 값은 Table 1에, 에너지 도표는 Figure 4에 나타내었다.

#### 2.5.3. MD를 이용한 반응 선택도

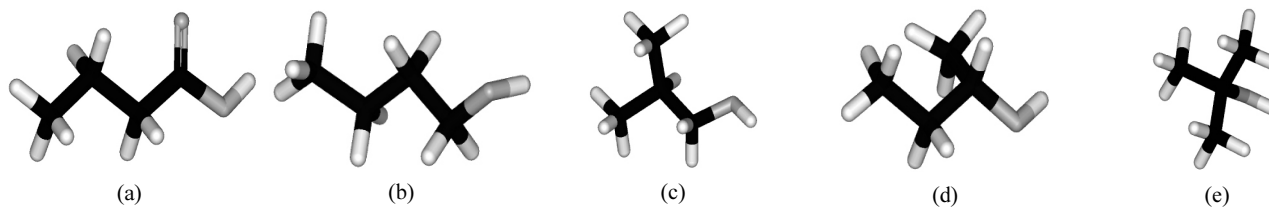
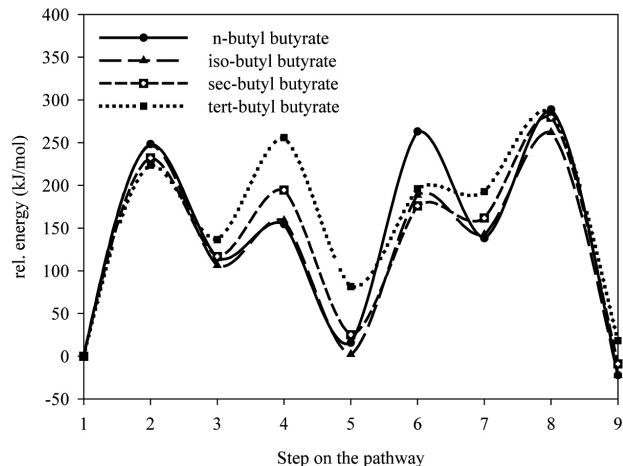
최종생성물질인 부티르산부틸의 광학이성질체 선택도는 주요 반응 부분의 수소결합 길이의 비교를 통해 안정성을 분석하였다. 각각의 수소결합은 주요한 7개의 결합을 선택하였고, 이를 Figure 5에 나타내었다. 이는 Raza *et al.*[8]에 의해 제안된 function-based subset에 기초하여 정하였다. 이때 사용된 소프트웨어는 Accelrys 사의 DS Modeling 1.7[21]이었고, 사용된 force field는 CHARMM이다. 이 MD 시뮬레이션을 위한 standard dynamic cascade는 다음의 5단계로 구성되었다. 첫 번째 최적화 단계에서는 steepest descent 방법을 이용하여 500 회의 계산을 수행하였고, 두 번째 단계는 adopted basis Newton

**Table 1. Conformational Energy of Butyric Acid and Butanols by CALB**

Pathway	Relative energy (kJ/mol)			
	n-butyl butyrate	iso-butyl butyrate	sec-butyl butyrate	tert-butyl butyrate
1	0	0	0	0
2	248.3	247.1	232.0	223.6
3	115.2	106.3	116.8	136.5
4	154.5	158.8	194.6	255.8
5	15.7	2.2	25.3	81.5
6	263.0	188.6	176.0	196.1
7	138.1	1742.6	161.8	192.6
8	228.7	262.0	279.7	285.7
9	-22.1	-22.5	-8.9	18.2

**Figure 2. Close-up of active sites of *Candida Antarctica* Lipase B structure; color code: C: black, H: white, O: gray, N: dark gray.**

Raphson 방법을 적용하여 최적화를 하였다. 그 다음 단계는 승온 단계로 0.001 ps의 시간 간격으로 2000회 계산을 하였고, 네 번째 평형 단계에서는 0.001 ps의 시간간격으로 1000회 계산을 하였다. 마지막으로 MD-NVT 시뮬레이션은 같은 시간 간격으로 3000회 계산을 수행하였다. 시뮬레이션 계산 과정 중에 온도는 50 K에서 323 K로 증가하였고, 최종적으로 303.15 K로 일정하게 유지되었다. MD 시뮬레이션을 위해 Leap-frog Verlet 알고리즘이 적용되었으며 non-bonded cut-

**Figure 3. Substrate structures: (a) butyric acid,  $C_3H_7COOH$ ; (b) n-butanol,  $C_3H_7CH_2OH$ ; (c) iso-butanol,  $CH_3CH(CH_3)CH_2OH$ ; (d) sec-butanol,  $C_2H_5CH(CH_3)OH$ ; (e) tert-butanol,  $C(CH_3)_3OH$ .****Figure 4. Complete reaction pathway by the proposed reaction mechanism for Ping-Pong Bi-Bi kinetic system.****Table 2. Maximum Yield of Butyl Butyrate Isomers**

	n-butyl butyrate	iso-butyl butyrate	sec-butyl butyrate	tert-butyl butyrate
Max. conversion yield (%)	98.7	83.4	31.3	1.0

off는 1350 pm이었다. 전체 시스템이 최저 포텐셜 에너지를 나타내고 평형이 유지되면 analyze trajectory에 의해 매 10 스텝마다 구조 및 에너지가 저장되었다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 실험 결과

생성되는 에스테르의 전환률과 반응의 경향을 GC분석을 통해 알 수 있었다. 각각의 부탄올 이성질체를 사용한 에스테르화 반응의 수율을 Table 2와 Figure 6에 나타내었다. n-, iso-부탄올의 반응에서 최대 수율은 반응 4 h 정도에 나타났으나 sec-, tert-부탄올에 대한 반응은 4 h에서 비교적 적은 양의 수율을 나타냈다. 하지만 상온, 상압 조건하의 반응에서 tert-부티르산부틸의 반응이 전혀 일어나지 않는 결과[22]에 비교하였을 때, 미미한 양이지만 tert-부티르산부틸의 합성이 일어난다는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험에서의 4성분계 혼합물(부탄올 이성질체, 부티르산, hexan, 이산화탄소) 중 이산화탄소와 부탄올, 이산화탄소와 hexan의 2성분계 혼합물은 실험조건인 323.15 K, 130 bar에서 단일상을 이루는 것으로 알려져 있다. 그러나 부티르산과 나머지 반응물질들 사이의 4성분계가 단일상을 이루는지는 고압 반응기의 내부를 볼 수 없기 때문에 직

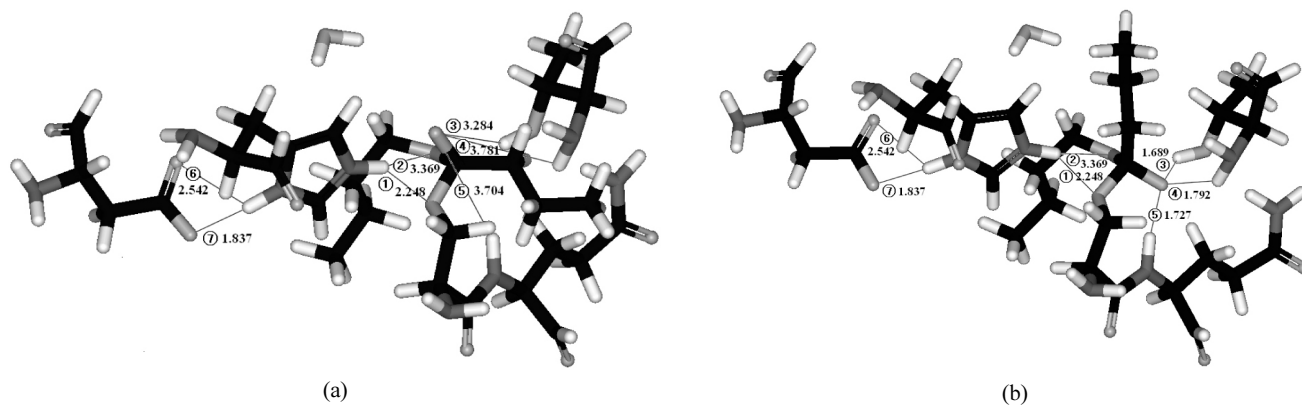


Figure 5. Structures of (a) the sites of significant hydrogen bonding by function-based subset in the CALB-(R)-form of *n*-butyl butyrate complex; (b) the sites of significant hydrogen bonding by function-based subset in the CALB-(S)-form of *n*-butyl butyrate complex.

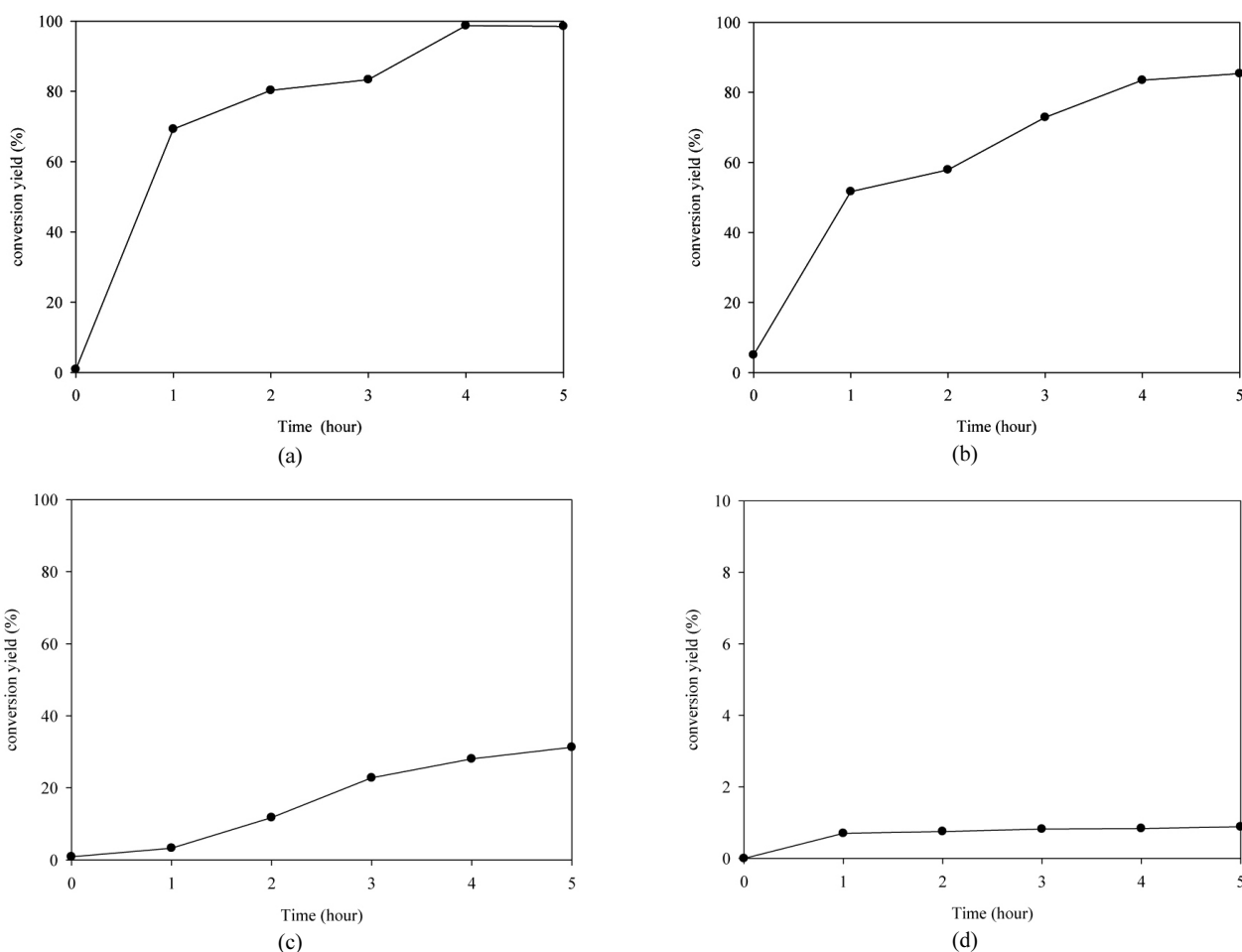


Figure 6. The conversion yields of the enzymatic reaction of *n*-(a), *iso*-(b), *sec*-(c), and *tert*-butyl butyrate (d) by CALB enzyme.

접 확인할 수는 없었다.

### 3.2. 시뮬레이션 분석

QM 계산을 통해 얻은 전체 반응의 세부적인 9단계의 최적화된 그림을 Figure 7에 나타내었다. (1)단계에서는 *n*-부티르산이 효소의 활성화 부분으로 접근하고, (3)단계와 (7)단계에서는 tetrahedral 중간체

가 형성되며 acyl-enzyme과 물 분자의 형성은 (5)단계에서 이루어진다. 최종 생성물은 (9)단계에서 만들어지며 (2), (4), (6), (8)단계는 각각의 단계에서 다음 단계로의 전이상태를 나타낸다. Table 1과 Figure 4의 결과를 보면 *n*-, *iso*-, *sec*-부탄올에 대한 반응은 발열 반응으로 정반응을 나타냈고 그에 반해 *tert*-부탄올의 반응은 생성물의 에너지가 반응물의 에너지보다 낮아 흡열반응으로 역반응을 나타냈다.

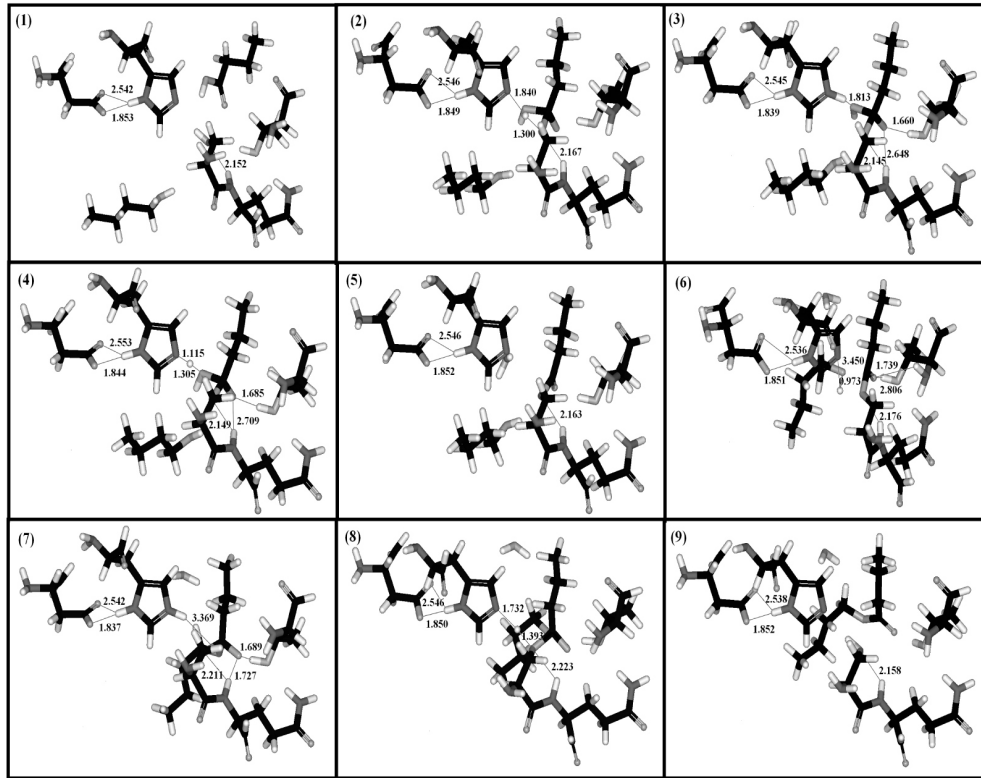


Figure 7. Minimization structures for 9 detailed steps and transition states.

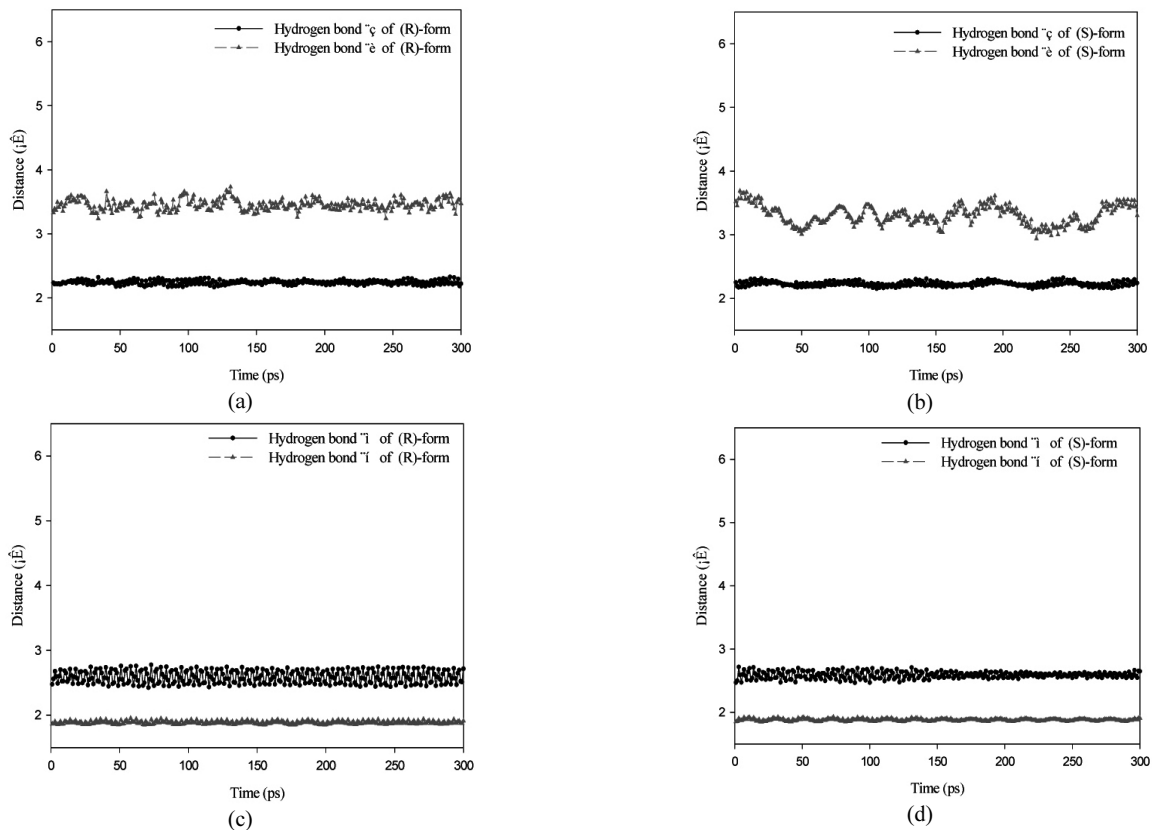


Figure 8. Trajectories and histograms of hydrogen bonds in CALB-(R, S)-n-butyl butyrate complex; (a) and (b) represent the hydrogen bond lengths of ① and ②, (c) and (d) represent the hydrogen bond lengths of ⑥ and ⑦.

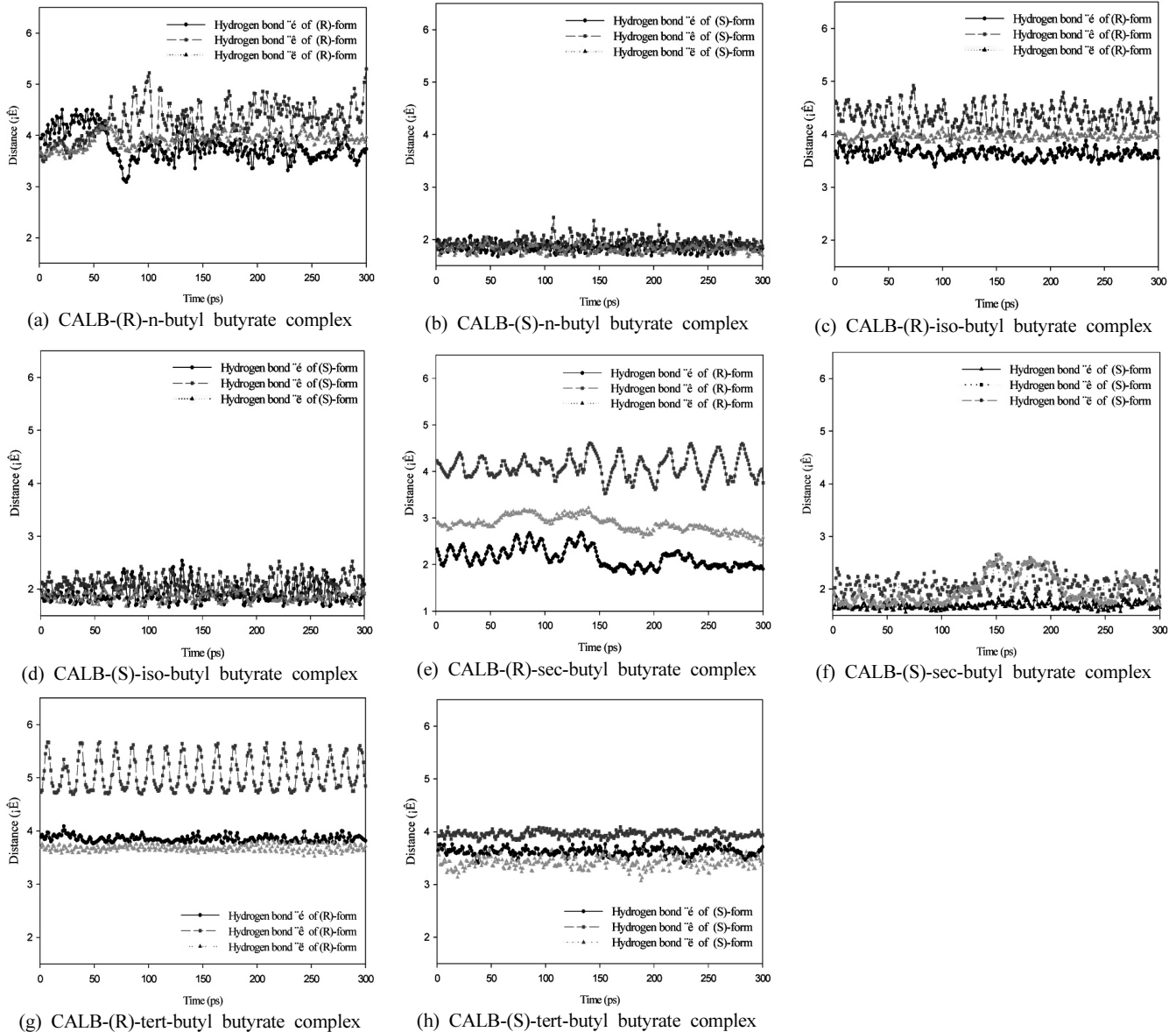


Figure 9. Trajectories and histograms of significant hydrogen bonds of ③, ④ and ⑤ from n- to tert-butyl butyrate complexes.

알코올과 산 기질이 모두 효소에 결합하여 광학이성질체가 나타날 수 있는 단계인 (7)단계에서의 tetrahedral 중간체에서 ①에서 ⑦까지의 결합 길이를 지정하였으며 MD 시뮬레이션을 하면서 이들 결합 길이의 변화의 경향을 통해 수소결합여부와 안정성 및 그 정도를 비교할 수 있었다. 일반적으로 수소결합을 하는 원자와 원자 사이의 거리는 2~3 Å으로 알려져 있다. 결과적으로 ①, ②, ⑥, ⑦의 거리는 거의 2 Å으로 일정하여 변화가 없다는 것을 알 수 있었고 대표적으로 n-부탄올에 대한 반응에 대한결과를 Figure 8에 나타내었고 이는 ①, ②, ⑥, ⑦에서는 tetrahedral 중간체의 광학이성질체나 부탄올 이성질체와 관계 없이 에스테르화 반응에서 비슷한 수소결합을 하는 부분이라는 것을 확인할 수 있었다. 이외는 다르게 Figure 9에 나타난 것처럼 ③, ④, ⑤에서는 tetrahedral 중간체가 S-form일 때의 결합 길이는 tert-부탄올일 때의 결과를 제외하고 2.5 Å 이내였고 R-form은 3 Å 이상을 나타내었으며 그 편차 또한 S-form에 비하였을 때 안정적이지 못한 결과를 얻었다. Tert-부탄올일 때의 반응에서는 S-form의 ③, ④, ⑤

또한 3~4 Å으로 수소결합을 하지 않는 것으로 나타났다. 결과적으로 부탄올과 부티르산을 이용한 에스테르화 반응에서 생성되는 에스테르는 구조적으로 S-form이 R-form보다 안정하다는 것을 확인할 수 있었다.

### 3.3. 비교 분석

부티르산과 각각의 부탄올 이성질체를 기질로 한 리파아제 촉매화 반응의 결과 에스테르 생성물의 수율은 n-부탄올에서 tert-부탄올로, 기질의 구조가 변할수록 생성물의 수율은 낮아지는 결과를 얻었다. 이는 시뮬레이션을 통해 얻은 결과와 비교하여 그 이유를 설명할 수 있다. 시뮬레이션을 통한 결과를 보면 각 반응의 에너지도표에서 tert-부티르산부틸의 생성반응은 역반응으로 나머지 반응들에 비해 에스테르의 합성이 어려울 것이라는 것을 예측할 수 있다.

MD 시뮬레이션을 통하여 얻은 수소결합 길이의 변화 그래프에서 보면 S-form에서의 ③, ④, ⑤의 길이 변화만 비교했을 때, n-, iso-,

sec-부탄올을 적용한 반응에서는 ③, ④, ⑤에서 수소결합을 하여 안정적인 구조를 갖는 반면에 tert-부탄올을 기질로 한 반응에서는 수소결합을 하지 않는 결과를 얻었는데 이로 인해 결합력이 약해서 반응이 어려울 것이라는 것을 예상할 수 있다. 결과적으로 부탄올의 구조가 변하면서 물질의 결합을 저해하는 작용을 하는데 tert-부탄올로 갈수록 그 정도가 커진다는 것을 알 수 있다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 효소-촉매 에스테르화 반응을 초임계 이산화탄소 내에서의 실험과 QM/MM방법을 적용시킨 분자 시뮬레이션을 통해 실험 결과와 비교 하였으며 컴퓨터를 이용한 기술을 통해서 실제 실험으로 확인할 수 없는 전이상태와 전체 반응의 경로에 대한 결과를 예측 할 수 있었다. 기질인 부탄올의 구조가 변함에 따라 생성물의 수율이 낮아짐을 확인할 수 있었고, 시뮬레이션을 통한 9단계의 반응 메커니즘의 에너지도표와 MD시뮬레이션을 이용하여 얻은 수소결합 길이의 변화 결과로 반응의 방향과 생성물의 구조적 선호도 및 안정성을 예측할 수 있었다.

#### 감 사

이 논문은 2004년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구(KRF-2004-042-D00042)임.

#### 참 고 문 헌

1. J. F. Cramer, M. S. Dueholm, S. B. Nielsen, D. S. Pedersen, R. Wimmer, and L. H. Pedersen, *Enzyme Microb. Technol.*, **41**, 346 (2001).
2. M. M. Shamel, K. B. Ramachandran, M. Hasan, and S. Al-Zuhair, *Biochem. Eng. J.*, **34**, 228 (2007).
3. A. Chojnacka, R. Obara, and C. Wawrzęńczyk, *Tetrahedron: Asymmetry*, **18**, 101 (2007).
4. A. J. Mulholland, *Drug Discov. Today*, **10**, 1393 (2005).
5. D. F. Taber, M. Xu, and J. C. Hartnett, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 13121 (2002).
6. I. Vallikivi, Ü. Lille, A. Lookene, A. Metsala, P. Sikk, V. Tõugu, H. Vija, L. Villo, and O. Parve, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **22**, 279 (2003).
7. S. H. Krishna and N. G. Karanth, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1547**, 262 (2001).
8. S. Raza, L. Fransson, and K. Hult, *Protein Science*, **10**, 329 (2001).
9. J. Gao, S. Ma, D. T. Major, K. Nam, J. Pu, and D. G. Truhlar, 2006. *Chem. Rev.*, **106**, 3188 (2006).
10. I. Vallikivi, L. Fransson, K. Hult, I. Järving, T. Pehk, N. Samel, V. Tugu, L. Villo, and O. Parve, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **35**, 62 (2005).
11. M. J. Field, *J. Comput. Chem.*, **23**, 48 (2002).
12. C. I. Sainz-Diaz, G. Wohlfahrt, E. Nogoceke, A. Hernandez-Laguna, Y. G. Smeyers, and U. Menge, *Theochem-J. Mol. Struct.*, **390**, 225 (1997).
13. G. Monard, X. Prat-Resina, A. González-Lafont, and J. M. Lluch, *Inter. J. Quantum Chemistry*, **93**, 229 (2003).
14. M. Garcia-Viloca, D. G. Truhlar, and J. Gao, *Biochemistry*, **42**, 13558 (2003).
15. C. H. Kwon, D. Y. Shin, J. H. Lee, S. W. Kim, and J. W. Kang, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 1098 (2007).
16. J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, and T. A. Jones, *Structure*, **2**, 293 (1994).
17. HyperChem Release 7.0 for windows. Hypercube Inc. (2002).
18. A. Magnusson, Thesis, School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Sweden (2005).
19. CAChe Workspace Ver. 6.1. Fujitsu, (2003).
20. J. J. P. Stewart, *J. Comput. Chem.*, **10**, 209 (1989).
21. Discovery Studio Modeling version 1.7. Accelrys Inc. (2007).
22. S. K. Son, Master Thesis, Korea University, Seoul, Korea (2006).