

NADH 재생계로서의 전해환원반응의 최적화에 관한 연구

강영완, 강찬*, 윤세억

전북대학교 농과대학 식품공학과, 자연대학 화학과*

Tel. (0652)270-2568, Fax (0652)270-2572

서론

NADH 재생형 bioreactor system의 효율은 NADH 재생계의 효율에 의해 좌우되므로 NADH 재생계로서의 NAD^+ 전해환원반응의 효율을 증대키 위한 연구는 매우 중요하다. 전해환원반응은 NAD^+ , MV^{2+} 및 diaphorase를 반응물로 하여 행해지는데 반응물의 농도 최적화는 반드시 필요한 과정이다. 그럼에도 불구하고 농도 최적화에 관한 연구가 보고 되어 있지 않은데, 최적농도의 결정을 위하여는 NAD^+ , MV^{2+} 및 diaphorase의 여러가지 농도 조합에 대하여 반복적 실험을 해야하는 어려움 때문이 아닌가 여겨진다. 한편 cyclic voltammetry(CV)가 지금까지 농도 최적화에 적용된 예는 없으나 voltammogram의 pattern으로부터 최적농도의 결정이 가능할 것으로 여겨졌다. 따라서 본 연구는 새로운 시도로서 CV를 농도 최적화를 위한 실험에 적용하고, 결정된 최적농도하에서의 전해환원반응을 효소반응에 공역하여 CV에 의한 최적화의 타당성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

(1) 반응 최적화를 위한 CV

① 주사속도(scan rate)의 결정 : NAD^+ (16 mM), MV^{2+} (0.2 mM) 및 DPase(2.3 U/ml)를 phosphate buffer(0.5 M, pH 7.0)에 녹여 gold amalgam을 작업전극으로 하여 여러가지의 scan rate에서 CV를 행하여 reduction wave가 plateau를 만드는, 즉 충분한 반응을 행할 수 있는 주사속도(scan rate)를 결정하였다(Fig. 1).

② NAD^+ 농도의 결정 : MV^{2+} 과 DPase의 농도를 각각 0.2 mM과 2.3 U/ml로 고정하고 ①에서 결정된 주사속도로 여러가지 농도의 NAD^+ 에서 CV를 행하여 reduction wave가 plateau를 만드는 NAD^+ 의 농도를 결정하였다(Fig. 2).

③ MV^{2+} 농도의 결정 : DPase를 2.3 U/ml로, NAD^+ 를 앞의 실험(②)에서 결정된 농도로 고정하고 앞의 실험(①)에서 결정된 주사속도로 여러가지 농도의 MV^{2+} 에서 CV를 행하여 MV^{2+} 의 농도를 결정하였다(Fig. 3).

④ Diaphorase 농도의 결정 : NAD^+ 와 MV^{2+} 의 농도를 앞의 실험(②와 ③)에서 결정된 농도로 고정하고 앞의 실험(①)에서 결정된 주사속도로 여러가지 농도의 DPase에서 CV를 행하였으며, 한편 주사속도를 바꾸어 보거나 NAD^+ 의 농도를 변화시키면서 상기와 동일한 실험을 행하여 DPase의 농도를 결정하였다.

(2) 전해환원반응과 효소반응을 공역한 bioreactor system의 구축

앞의 실험(1)에서 결정된 최적농도하에서의 전해환원반응의 효율을 검토하기 위하여 이 반응을 효소반응에 공역한 bioreactor system을 구축하였다. 전해조를 음이온교환막으로 분리시키고, reference로서 Ag/AgCl electrode를, anode로서 platinum plate를 사용하며 cathode로서 gold amalgam을 적용하였다. Anode compartment에는 0.5 M phosphate buffer(pH 7.0)를 넣고 cathode compartment에는 NAD^+ (0.3 mM), MV^{2+} (0.2 mM),

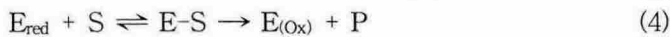
DPase(1.5 U/ml), pyruvate(25.3 mM) 및 D-LDH(3 U/ml)를 녹인 0.5 M phosphate buffer(pH 7.0)를 넣어 25°C에서 -0.7V전위에서 potentiostat을 행하였다.

결과 및 고찰

1. CV를 이용한 전해환원반응의 최적화

전기촉매적 환원의 반응물인 NAD^+ , MV^{2+} 및 DPase의 농도최적화를 위하여 gold amalgam을 작업전극으로 하여 CV법을 시도하였다. CV는 비교적 간편하고 시간과 비용절약적인 방법으로서 반응속도 결정을 위하여 쓰여진 김 등의 실험방법을 응용할 경우 전해환원반응물의 최적농도결정이 가능할 것으로 여겨지어 검토하였다.

NAD^+ 의 전기촉매적 환원반응은 아래와같은 기작에의해 진행되는 것으로 추정된다.



한분자의 NAD^+ 를 환원하는데 전자 두개가 요구되므로 환원된 두분자의 MV^+ 이 한분자의 DPase를 환원하는데 사용된다. 전자 한개로 환원된 DPase는 E' 로 표시하였다. MV^{2+} , NAD^+ 및 DPase의 농도를 각각 0.2 mM, 16 mM 및 2.3 U/ml 되도록 하여 여러가지의 속도에서 cyclic voltammogram을 얻었다. Fig. 1 에서와 같이 주사속도가 감소함에 따라 cyclic voltammogram은 정상상태 한계전류를 보였다. 주사속도 2 mV/s 이하에서 전류변화가 관찰되지 않았는데, 이 반응은 식(2)의 반응단계로 조절되는 전기화학적 촉매반응을 따를 것으로 추정된다. 따라서 반응이 충분히 진행될 수 있도록 주사속도는 2 mV/s로 하여야 할 것으로 여겨졌다. 2 mV/s의 주사속도에서 중간매개체인 MV^{2+} 과 전자전달효소(DPase)의 농도를 각각 0.2 mM과 2.3 U/ml로 일정하게 하였을 때 NAD^+ 의 농도를 달리하여 얻은 cyclic voltammogram은 Fig. 2와 같다. NAD^+ 가 존재하지 않을 때는 가장 낮은 환원곡선을 보였으며, 환원곡선은 NAD^+ 의 농도가 증가됨에 따라 높아졌다. NAD^+ 의 농도가 0.3 mM이상에서는 환원전류가 더 이상 증가하지 않았으므로 NAD^+ 는 0.3 mM에서 충분한 것으로 여겨졌다.

Fig. 3은 DPase와 NAD^+ 가 각각 2.3 U/ml와 0.3 mM로 존재할 때 MV^{2+} 의 농도를 증가시키면서 얻은 cyclic voltammogram이다. MV^{2+} 이 낮은 농도에서는 정상상태 곡선을 보이지만, 농도가 0.15 mM 이상으로 증가함에 따라 peak를 나타내는데 이는 환원된 MV^+ 가 모두 효소에 의해 소비되지 못하였기 때문으로써 결국 MV^{2+} 이 과잉의 상태로 존재하는 것으로 추정된다. Fig. 3에서 중간매개체(MV^{2+})의 농도와 전류량의 높이 사이에 비례적인 관계가 관찰되었다. 낮은 MV^{2+} 농도 범위에서는 비례관계가 성립하였으나 MV^{2+} 의 농도가 증가하면서 직선으로부터 벗어남을 알 수 있었다. 따라서 MV^{2+} 적정농도는 0.2 mM인 것으로 여겨졌다.

DPase의 최적농도를 결정하기 위하여 MV^{2+} 과 NAD^+ 를 이상의 실험에서 결정된 농도인 0.2 mM과 0.3 mM로 하고 여기에 가하는 DPase의 농도를 0.0 U/ml에서 2.5 U/ml까지 변화시키면서 CV를 실행한 결과 Fig. 4가 얻어졌다. 그러나 예상했던 바와는 달리 DPase를 첨가하더라도 전류의 증가는 없었는데, 이는 반응식(2)의 단계가 매우 느리게 진행되어 2 mV/s의 주사속도에서는 반응이 미처 행하여지지 않았기 때문이 아닌가 여겨

지어 주사속도 1 mV/s로 하여 CV를 행하였다. 그 결과 Fig. 5가 얻어졌으며 1 mV/s의 주사속도에서도 효소의 양이 증가하여도 current가 크게 증가되지 않았는데 이는 반응식(2)의 단계가 매우 느리기 때문에 CV로써는 DPase의 농도차에 따른 반응속도의 차이가 충분히 감지될 수 없었던 것이 아닌가 여겨졌다.

그러나 기질로써 작용하는 NAD^+ 의 농도가 높아지면 전자전달이 빠르게 진행되어 DPase의 농도에 따른 전류량의 차를 관찰할 수 있을 것으로 여겨지어, NAD^+ 의 가하는 양을 늘리기로 하고 우선 가하는 NAD^+ 의 적정량을 결정하기 위하여 MV^{2+} 과 DPase를 각각 0.2 mM과 1.5 U/ml로 고정하고 NAD^+ 를 증가시키면서 CV를 행하였다. 그 결과 Fig. 6에서와 같이 4.8 mM NAD^+ 의 농도에서 전류량이 최대이었으므로, NAD^+ 와 MV^{2+} 을 각각 4.8 mM과 0.2 mM로 고정하고 DPase를 증가시키며 CV를 행하였다.

그 결과 Fig. 7에서 볼 수 있듯이 과량의 NAD^+ 를 첨가하였을 때 효소의 증가에 따라 current도 크게 증가함이 관찰되었다. DPase의 농도별 voltammogram들로부터 측정된 음극상의 정상상태 전류나 peak 전류를 DPase농도에 대하여 도시하면 DPase의 농도가 1.5 U/ml 까지는 current가 직선적으로 증가하나 그 이상의 농도에서는 current 증가폭이 매우 작은 것으로 보아 DPase의 농도는 1.5 U/ml에서 최적일 것으로 여겨졌다. 따라서 NAD^+ , MV^{2+} 및 DPase의 최적농도는 각각 0.3 mM, 0.2 mM 및 1.5 U/ml이었다.

DPase와 NAD^+ 를 최적인 것으로 추정되는 농도인 1.5 U/ml와 0.3 mM이 되도록 녹이고, 이 액에 MV^{2+} 의 농도를 증가시키며 CV를 행하여 Fig. 8을 얻었다. Voltammogram들로부터 측정된 음극상의 정상상태 전류나 peak 전류를 MV^{2+} 의 농도에 대하여 plot한 결과 MV^{2+} 의 농도가 증가함에 따라 음극상의 정상상태 전류나 peak 전류는 거의 직선적으로 증가하였으며, 앞의 실험에서 최적농도인 것으로 추정되는 0.2 mM MV^{2+} 에서 peak 전류는 약 $-9 \mu\text{A}$ 로서 MV^{2+} 의 농도변화에 따른 current의 증가속도는 매우 컸다. 이는 MV^{2+} 과 DPase간의 전자전달반응이 용이하기 때문인 것으로 여겨진다.

한편 DPase와 MV^{2+} 을 각각 앞의 실험에서 최적인 것으로 추정되는 농도인 1.5 U/ml와 0.2 mM로 고정하고, 이 액에 NAD^+ 를 여러 가지 농도로 가하여 얻은 Fig. 6의 voltammogram들로부터 측정된 음극상의 정상상태 전류나 peak 전류를 NAD^+ 의 농도에 대하여 plot하였다. NAD^+ 의 농도가 증가함에 따라 음극상의 정상상태 전류나 peak 전류는 NAD^+ 의 농도가 0.3 mM에서 급증한 후 그 이상의 농도에서는 서서히 증가하여 약 4.8 mM에서 최대치를 나타내고 더 이상의 증가는 없었으며, 앞의 실험에서 최적농도인 것으로 추정되는 0.3 mM NAD^+ 에서의 peak 전류는 0 mM NAD^+ 에서의 peak 전류에 비하여 $3 \mu\text{A}$ 정도의 증가만이 관찰되므로써, NAD^+ 의 농도변화에 따른 current의 증가속도는 매우 낮았음을 알 수 있었다. 이는 NAD^+ 와 DPase간의 전자전달반응이 용이하지 않기 때문인 것으로 추정된다. 즉 MV^{2+} 의 경우 MV^{2+} 의 농도가 증가함에 따라 반응속도는 크게 증가하는 데에 비하여 NAD^+ 의 경우 NAD^+ 의 농도가 크게 증가하여도 반응속도의 증가가 미약하였는데, 이는 NAD^+ 와 DPase간의 전자전달반응이 MV^{2+} 과 DPase간의 전자전달반응보다 느리기 때문이 아닌가 여겨지며, 따라서 NAD^+ 와 DPase간의 전자전달반응(반응식4)은 rate-limiting step일 것으로 추정되어진다.

2. 전해환원반응의 최적농도에서의 D-lactate 생산

전해반응물 NAD^+ , MV^{2+} 및 diaphorase가, CV를 이용하여 구한 최적농도인 0.3 mM, 0.2 mM 및 1.5 U/ml로 존재할 경우의 전해환원반응이 NADH regenerator로서 효율적

인지를 검정하기 위하여, D-lactate dehydrogenase(D-LDH)에 의한 pyruvate로부터 D-lactate에로의 전환반응과 공역한 bioreactor system을 구축하였다. 25.3 mM pyruvate, 3 U/ml D-LDH로 하여 25 °C에서 - 0.7 V(vs. Ag/AgCl)의 전위를 가하였다. 반응시간 72시간만에 반응이 거의 완결되었으며 24 mM D-lactate가 생성되므로써 약 95 %의 전환율을 달성하였다.

R. DiCosimo등은 tungsten을 작업전극으로 하여 0.15 mM NAD^+ , 2 mM MV^{2+} , 2.3 U/ml lipoamide dehydrogenase 및 25.3 mM pyruvate 용액에 - 0.7 V(vs. Ag/AgCl)를 가하면서 반응시킨 결과 9일 동안의 반응에서 81 %의 yield를 얻었으며, S. B. Sobolov 등은 탄소전극표면에 lipoamide dehydrogenase와 MV^{2+} 을 고정화하고 2 mM NAD^+ 를 사용하여 25일 동안 반응시켜 79 %의 전환율을 얻었다. 이와 같이 전해환원반응의 최적화에 의해 공역반응계에서의 전환율이 크게 증가되었는데, 이는 최적화시킨 전해환원반응이 NADH 재생계로서 효율적으로 작용하였기 때문인 것으로 추정된다.

결론적으로, cyclic voltammetry는 전해환원반응의 최적화에의 유용한 방법임을 알 수 있었으며, 이 방법은 매우 정밀한 방법으로서 소량의 반응액으로 단시간에 실험이 가능하므로 시간과 비용절약적 장점이 있다.

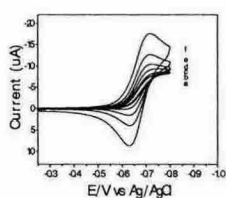


Fig. 1

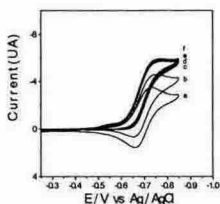


Fig. 2

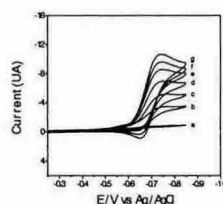


Fig. 3

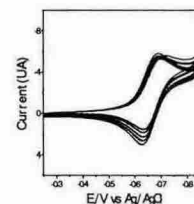


Fig. 4

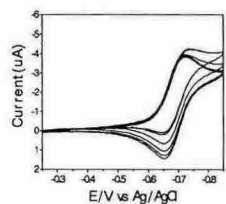


Fig. 5

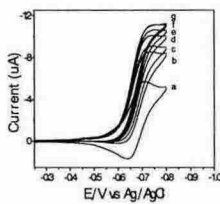


Fig. 6

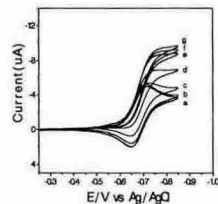


Fig. 7

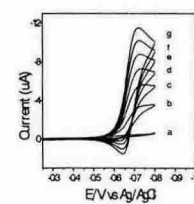


Fig. 8

Fig. 1. Cyclic voltammograms at various scan rates.

Fig. 2. Cyclic voltammograms at various NAD^+ concentrations.

Fig. 3. Cyclic voltammograms at various MV^{2+} concentrations.

Fig. 4. Cyclic voltammograms at various DPase concentrations. scan rate 2mV/s.

Fig. 5. Cyclic voltammograms at various DPase concentrations. scan rate 1mV/s.

Fig. 6. Cyclic voltammograms at various NAD^+ concentrations (0.2 mM MV^{2+} , 1.5 U/ml DPase).

Fig. 7. Cyclic voltammograms at various DPase concentrations (4.8 mM NAD^+ , 0.2 mM MV^{2+}).

Fig. 8. Cyclic voltammograms at various MV^{2+} concentrations (0.3 mM NAD^+ , 1.5 U/ml DPase).