

제 1996 년도  
기관고유사업  
보 고 서

BSKG1053-865-3

## 산업미생물 분자육종 및 전환기술 개발

### 바이오의약품 원료물질의 생산을 위한 복합 생물전환기술 개발

Developement of Multi-Enzyme System for the Synthesis  
and Production of Biopharmaceutical Intermediates

1997. 1. 25

생 명 공 학 연 구 소

## 제 출 문

생명공학연구소장 귀하

본 보고서를 □산업미생물 분자유종 및 전환기술 개발□ 과제 (세부과제 □바이오 의약품 원료물질의 생산을 위한 복합 생물전환기술 개발□)의 기관고유 사업보고서로 제출합니다.

1997. 1. 25

연구부서명 : 생명공학연구소 응용미생물부 미생물전환RU  
중과제책임자 : 이 상 기 (응용미생물연구부 책임연구원)  
세부과제책임자 : 성 문 희 (미생물전환 연구Unit 책임연구원)  
연 구 원 : 윤 기 홍 (미생물전환 연구Unit 선임연구원)  
이 승 구 (미생물전환 연구Unit 선임연구원)  
배 회 성 (미생물전환 연구Unit 연수연구원)  
백 대 헌 (미생물전환 연구Unit 연수연구원)  
최 윤 호 (미생물전환 연구Unit 연수연구원)  
박 진 서 (미생물전환 연구Unit 연수연구원)  
곽 미 선 (미생물전환 연구Unit 연 구 원)  
홍 승 표 (미생물전환 연구Unit 연 구 원)  
노 현 수 (미생물전환 연구Unit 연 수 생)  
서 화 정 (미생물전환 연구Unit 연 수 생)  
최 영 기 (미생물전환 연구Unit 연 수 생)

# 요 약 문

## I. 제 목

바이오의약품 원료물질의 생산을 위한 복합 생물전환기술 개발  
(Development of multi-enzyme system for the synthesis and production of Biopharmaceutical intermediates)

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

고부가가치 의약품 및 의약품합성 중간물질로 사용되는 방향족 D-amino acid 관련 생물전환생산기술로는 D-hydantoinase를 이용한 항생제 ampicilline의 합성중간물질인 D-phenylglycine (D-PG) 과 항생제 amoxicilline의 합성중간물질인 D-hydroxyphenylglycine (D-HPG)의 생산기술 개발연구(1-4)가 일본·유럽 및 국내에서도 활발하게 수행되고 있다. 그러나 최근 D-PG 및 D-HPG 이외의 다른 방향족 D-아미노산을 사용하여 고부가가치 의약품 및 의약품원료물질과 합성중간물질로의 개발연구(5-10)가 진행되고 있다. 이러한 기술개발의 추세에 있어 보다 더 다양한 방향족 D-아미노산을 고효율·낮은 원가로 생산할 수 있는 효율적이며 경제적인 생산공정기술의 개발필요성이 적극 대두되고 있다. 따라서 본 기술개발연구에서는 D-phenylalanine, D-tyrosine 및 D-tryptophan 등의 방향족 D-아미노산을 대량생산하기 위한 신생물전환공정의 개발을 목표로하여 복합생물전환기술연구를 수행하였다. 복합 생물전환공정계의 핵심이 되는 신규 생물촉매로써는 토양에서 분리된 신규 고온성 Bacillus 균주로부터 생산되는 내열성 D-amino acid aminotransferase(D-AAT)를 유전자조작을 통하여 재조합 대장균에서 대량생산된 D-AAT를 사용하였으며, 본 연구에 사용된 내열성 DAAT는 광범위한 기질특이성을 보유하고 있으며 열안정성에 따른 효소안정성과 유기용매에 대한 안정도도 보유하고 있어 (11-12) 각종 방향족 D-아미노산을 대량생산 하기 위한 신생물전환공정의 개발에 최적으로 판단되고있다(13). 이러한 내열성 D-AAT를 기본생물촉매로 사용하여 원료 즉 기질의 효율적 이용을 위한 regeneration system을 도입하여 그림 1과 같은 복합 생물전환공정계를 design 하였다. 이러한 복합 생물계를 이용하

여 방향족 D-아미노산인 D-phenylalanine, D-tyrosine 및 D-tryptophan을 높은 수율로 생산하기 위하여 복합 생물반응계의 검토와 생물전환반응의 최적화 연구를 수행하였다.

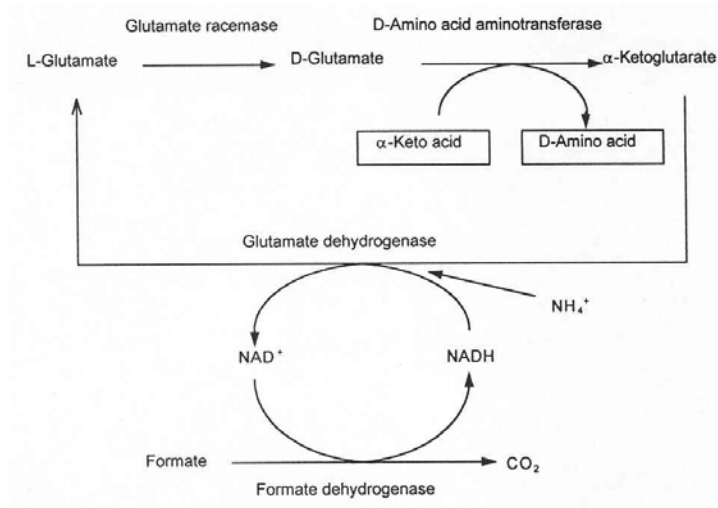


그림 1. 방향족 D-아미노산(D-phenylalanine, D-tyrosine, D-tryptophan)의 생산을 위한 복합 생물전환계의 design.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

고부가가치 의약품 및 의약품합성 중간원료물질로 사용되는 방향족 D-아미노산 (D-Phenylalanine, D-tyrosine, D-tryptophan)의 생산을 위하여 생물촉매를 복합적으로 사용한 복합 생물전환기술 개발을 목표로 다음과 같이 연구를 수행하였다.

#### 1. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 복합 생물전환계의 Design

고효율 및 고생산성 방향족 D-아미노산의 생산기술을 확립하기 위하여 원료 기질의 효율적 이용을 목표로 regeneration system을 도입한 복합 생물전환계를 design 하였다.

## 2. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 생물전환 반응계의 검토

- (i) 저가의 기질인 L-glutamate로부터 D-glutamate의 glutamate racemase 를 이용한 생물전환반응계의 검토
- (ii) D-glutamic acid로부터 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 D-amino acid amino-transferase 이용 생물전환 반응계의 검토
- (iii) 고효율 및 고생산성 방향족 D-아미노산 생산기술을 확립하기 위하여 regeneration system을 도입한 방향족 D-아미노산 생산 생물전환반응계의 검토

## 3. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 복합 생물전환반응계의 최적화

- (i) 복합 생물전환반응계에 의한 D-phenylalanine의 생산
- (ii) 복합 생물전환반응계에 의한 D-tyrosine의 생산
- (iii) 복합 생물전환반응계에 의한 D-tryptophan의 생산

## IV. 연구개발 결과

### 1. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 복합 생물전환계의 Design

고효율 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 복합 생물전환계를 확립하기 위하여 다음과 같은 생물촉매를 선정하여 복합 생물전환계를 design 하였다. 우선 국내에서 생산되는 저가의 기질(L-glutamate)로부터 고부가가치 방향족 D-아미노산을 생산하기 위하여 glutamate racemase(GluRA)의 유전자가 coding되어 있는 Plasmid pGR3가 포함되어있는 재조합균주 *E. Coli*/pGR3로부터 GluRA를 대량생산하여 L-glutamate로부터 방향족 D-아미노산의 기질로 사용되는 D-glutamate 생산 생물전환반응계를 도입하였다. 그리고 glutamate racemase에 의해 생산된 D-glutamic acid와 방향족 D-아미노산 생산을 위하여 기질인 각종의 방향족 keto acid (D-phenylalanine생산시 사용되는 keto산; phenylpyruvate, D-tyrosine생산시 사용되는 keto 산; hydroxyphenylpyruvate, D-tryptophan 생산시 사용되는 keto산; indolpyruvate)를 사용하여 방향족 D-아미노산(D-phenylalanine, D-tyrosine,

D-tryptophan)을 생산하는 D-amino acid aminotransferase(D-AAT) 이용 생물전환계를 도입하였다. 그리고 다시 D-AAT 생물전환반응후 생성되는 반응산물인  $\alpha$ -ketoglutaric acid를 glutamate dehydrogenase(GluDH)를 이용하여 다시 L-glutamate로 전환시키는 고효율의 생물전환반응계를 도입하였다. 이러한 각종 생물촉매의 생물전환 반응에 의해 소량의 L-glutamate와 keto acid만을 기질로하여 연속적으로 방향족 D-아미노산을 생산하는 고효율·고생산성 복합 생물전환반응계를 design 할 수 있었다. 그러나 GluDH는 NADH를 보조소로 하는 생물촉매이므로 생물전환반응후 생성되는 NAD<sup>+</sup>를 NADH로 전환시키기 위한 formate dehydrogenase(FDH, Boehringer Mannheim) 이용 regeneration system을 도입한 생물전환반응계를 구축하였다.

## 2. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 생물전환 반응계의 검토

### (i) Glutamate racemase(GluRA)를 이용한 생물전환반응계의 검토

D-glutamate는 D-AAT의 매우 좋은 아미노기의 공여물질이다. 저가의 L-glutamate로부터 D-glutamate를 연속적으로 전환하여 공급한다면 복합 생물반응계에서 DAAT는 고효율로  $\alpha$ -keto acid를 D-아미노산을 합성할 것이다. GluRA는 L-glutamate로부터 D-glutamate의 전환반응을 촉매하는 생물촉매이다. 본 연구팀에서는 일본 Soda 교수 연구팀으로부터 GluRA의 유전자가 code 되어있는 DNA단편을 포함하고 있는 plasmid pGR3가 들어있는 재조합균주 E. coli JM109/pGR3를 분양받아 본 연구실에서 재조합균주를 배양하여 GluRA의 조효소액을 제조하여 그 생물전환활성을 조사한 결과 GluRA는 높은 기질의 특이성을 가지고 있었으며, L-glutamate를 D-glutamate로 높은 수율로 전환함을 확인하였다.

### (ii) D-Amino acid aminotransferase(D-AAT) 이용 생물전환반응계의 검토

고온성 Bacillus 유래의 D--AAT의 유전자를 gene cloning하여 형질전환된 재조합 E. coli HB101/pDA100로부터 대량생산된 D-AAT는 광범위한 기질의 특이성을 가지고 있어 생물전환반응 기질인 다양한  $\alpha$ -keto acid로부터 다양한 종류의 방향족 D-아미노산을 합성하였다. 또한 본연구 과제에서 사용된

D-AAT는 내열성 생물촉매로서 열안정성을 보유함은 물론 유기용매 및 pH 등에 대해서 높은 안정성을 나타내었다. 내열성 D-AAT가 가지고 있는 다양한 기질에 대한 생물전환 특이성과 안정성을 고려할 때 D-AAT는 방향족 D-아미노산의 합성 및 생산에 매우 유효한 생물촉매로 판단되었다.

(iii) Regeneration system을 도입한 방향족 D-아미노산 생산 생물전환반응계의 검토

기질의 효율적 이용기술을 확립하기 위하여 도입된 regeneration system을 구축하기 위해서 2종류의 생물촉매 GluDH 및 FDH가 사용하였으며, 저가의 기질로부터 고부가가치 방향족 D-아미노산을 생산하기 위해서 GluRA와 D-AAT가 사용되었다. 이와 같이 4종류의 생물촉매가 복합 사용되는 복합생물전환계를 이용하여 방향족 D-아미노산, D-tyrosine과 D-phenylalanine의 생산에 적용하였다. 사용된 생물촉매들은 조효소액 상태로 제조하여 생물전환반응에 사용하였다. 이 복합 생물반응계를 사용하여 높은 수율의 생산성과 고효율로 D-tyrosine과 D-phenylalanine이 성공적으로 생산됨을 확인하였다. 또한 방향족 D-아미노산합성 생물전환반응이 진행되는 동안 D, L-glutamate의 농도가 일정한 농도를 유지되므로 GDH와 FDH에 의해 L-glutamate와 NADH가 연속적으로 재생되는 것도 확인하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 본 연구과제에서 개발된 복합효소 사용 생물전환 반응계는 효율적인 측면 뿐만 아니라 경제적인 면에서도 지금까지 개발된 방향족 D-아미노산 합성 및 생산기술보다 우수한 생물전환반응임을 확인하였다.

### 3. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 복합 생물전환반응계의 최적화

본 연구과제에서 개발한 복합 생물전환계의 최적화를 위한 방안으로 각 생물촉매들의 최적 반응조건들 조사한 결과, 반응 pH 8.5, 반응온도 37 °C가 복합생물전환반응계에 최적임을 확인하였으며, ammonium-formate의 농도는 0.2M에서 1 M까지 생물전환반응에 안정성을 확인하였다. 이러한 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 최적반응조건에서 원료 기질로 사용되는  $\alpha$ -keto acids의 최적농도를 구하고 최적농도에서 생산되는 방향족 D-아미노산의 합성 및 생산성을 조사하였다.

(i) 복합 생물전환반응계에 의한 D-phenylalanine의 생산

복합 생물반응계에서 D-phenylalanine의 생산은 D-phenylalanine의 일차기질인 D-phenylalanine의 농도가 50-70 mM 에서 최고수준의 생물전환 합성속도를 나타내었으며, 기질의 농도가 100 mM 이상으로 증가하면 높은 기질억제가 나타났다. ammonium--formate의 농도를 500 mM로 고정하고 phenylpyruvate의 농도를 70 mM 이하로하여 연속적으로 공급한 결과, 복합 생물전환반응계는 시간당 약 8 mM의 phenylalanine을 생산하였다. 최종적으로 약 150 mM의 D-phenylalanine이 생산됨을 확인하였다.

(ii) 복합 생물전환반응계에 의한 D-tyrosine의 생산

D-phenylalanine의 복합 생물전환반응계와 유사한 수준으로 D-tyrosine의 합성 및 생산기질인 hydroxyphenylalanine의 농도가 50-70 mM에서 최고의 합성속도를 나타내었으며, 그 이상의 농도에서는 기질억제현상이 나타났다. Hydroxyphenylalanine의 농도를 50-70 mM 이하로 유지되도록 생물전환반응을 수행하였을 때, 시간당 약 4-5 mM의 D-tyrosine이 합성을 확인하였으며 최종적으로 약 150 mM의 D-tyrosine 이 합성됨을 확인하였다.

(iii) 복합 생물전환반응계에 의한 D-tryptophan의 생산

D-phenylalanine 및 D-tyrosine와 동일한 합성조건에서 복합 생물반응계를 이용하여 D-tryptophan의 합성을 수행하였다. D-phenylalanine 및 D-tyrosine의 합성 생물전환 반응과정에서와 마찬가지로 D-tryptophan의 합성기질인 indolpyruvate가 시간당 약 4-5 mM수준으로 전환됨을 확인하였다. 그러나 생성되는 D-tryptophan의 양은 시간당 약 2 mM에 머물렀다. 이러한 현상은 D-tryptophan 합성 생물전환반응계내에서 사용된 기질인 indolpyruvate가 쉽게 산화되어 나타나는 것으로 판단된다. 따라서 D-tryptophan의 경우에는 복합생물전환반응계에 환원제가 부가적으로 첨가되어야 할 것으로 판단된다.



#### IV. 연구개발 결과의 활용계획

고부가가치 의약품 및 의약품합성 중간물질로 사용되는 고부가가치 방향족 D-아미노산(D-phenylalanine, D-tyrosine 및 D-tryptophan)의 생산을 위한 복합 생물전환기술을 개발하여 다음과 같이 연구결과를 활용하고자 한다.

- (i) Regeneration system을 도입한 고효율·고생산성 생물소재의 생산기술 확립
- (ii) 고부가가치 유용·의약품 방향족 D-아미노산의 생산기술의 기업화 및 상업적 생산을 추진하여 고부가가치 생물소재의 수입대체와 수출증진에 기여
- (iii) 의약품 및 의약품합성 중간물질로 사용되는 D-아미노산을 개발하여 국민 복지 및 건강증진에 기여

## 목 차

제 1 장 서론	10
제 2 장 국내 외 기술개발현황	11
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	13
제 1 절 실험재료 및 방법	13
1. 사용균주와 plasmid	13
2. 세포의 배양과 활성효소의 유도	13
3. 효소의 분리	13
4. ChemicalS	13
5. 분석방법	14
6. 효소활성 측정	14
제 2 절 결과 및 고찰	15
1. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 복합 생물전환계의 Design	15
2. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 생물전환 반응계의 검토	16
(i) L-Glutamate로부터 D-glutamate의 glutamate racernase를 이용한 생물 전환반응계	16
(ii) D-Glutamic acid로부터 D-아미노산 생산을 위한 D-AAT 이용 생물전환 반응계	17
(iii) Regeneration system을 도입한 D-아미노산생산 생물전환반응계	20
3. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 복합 생물전환반응계의 최적화	22
(i) 복합 생물전환반응계에 의한 D-phenylalanine의 생산	22
(ii) 복합 생물전환반응계에 의한 D-tyrosine의 생산	24
(iii) 복합 생물전환반응계에 의한 D-tryptophan의 생산	24
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	27
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	28
제 6 장 참고문헌	29

## 제 1 장 서 론

고부가가치 의약품 및 의약품원료물질로 사용되는 방향족 D-amino acid 관련 생물전환생산기술로는 D-hydantoinase를 이용한 항생제 ampicilline의 합성중간물질인 D-phenylglycine (D-PG) 과 항생제 amoxicilline의 합성중간물질인 D-hydroxyphenylglycine (D-HPG)의 생산기술 개발연구(1-4)가 일본·유럽 및 국내에서도 적극적으로 수행되고 있다. 그러나 최근 D-PG 및 D-HPG 이외의 다른 방향족 D-아미노산을 사용하여 고부가가치 의약품 및 의약품원료물질과 합성중간물질로의 개발연구(5-10)가 진행되고 있다. 이러한 기술개발의 추세에 있어 보다 더 다양한 방향족 D-아미노산을 고효율·낮은 원가로 생산할 수 있는 효율적이며 경제적인 생산공정기술의 개발필요성이 적극 대두되고 있다. 따라서 본 기술개발연구에서는 D-phenylalanine, D-tyrosine 및 D-tryptophan 등의 방향족 D-아미노산을 대량생산하기 위한 신생물전환공정의 개발을 목표로 하여 복합 생물전환기술연구를 수행하였다.

복합 생물전환공정계의 핵심이 되는 신규 생물촉매로써는 토양에서 분리된 신규 고온성 Bacillus 균주로부터 생산되는 내열성 D-amino acid aminotransferase(D-AAT)를 유전자조작을 통하여 재조합 대장균에서 대량생산된 D-AAT를 사용하였으며, 본 연구에 사용된 내열성 DAAT는 광범위한 기질특이성을 보유하고 있으며 열안정성에 따른 효소안정성과 유기용매에 대한 안정도도 보유하고 있어 (11-12) 각종 방향족 D-아미노산을 대량생산하기 위한 신생물전환공정의 개발에 최적으로 판단되고있다(13). 이러한 내열성 D-AAT를 기본생물촉매로 사용하여 원료 즉 기질의 효율적 이용을 위한 regeneration system을 도입하여 복합 생물전환공정계를 design 하였다. 이러한 복합 생물계를 이용하여 방향족 D-아미노산인 D-phenylalanine, D-tyrosine 및 D-tryptophane을 높은 수율로 생산하기 위하여 복합 생물반응계의 검토와 생물전환반응의 최적화연구를 수행하였다.

## 제 2 장 국내 ·외 기술개발현황

### 제 1 절 고부가가치 유용 ·의약품 의약품 및 의약품 중간물질의 생산을 위한 생물전환기술 전개

생물전환기술을 이용한 유용 생물소재의 합성 및 생산기술은 이러한 자원 및 지구환경문제를 적극적으로 고려한 첨단 생산방식이며, 최근 미국 ·일본등의 기술선진국에서 광범위하며 체계적으로 계획 ·추진되고 있는 청정산업기술 (clean technology)의 핵심개발분야로 관련 연구 및 기술개발이 집중적으로 추진되고 있다 (14-17).

생물전환기술(bioconversion technology)이란 생체(동물, 식물 및 미생물을 포함하는 생명체의 총체적인 의미)의 생리 ·대사기능을 세포의 level에서, 또는 생물촉매(biocatalyst) 인 효소의 level에서 활용하여 유용물질을 생산하는 기술을 뜻하며, 미래 첨단생물산업을 구성하는 가장 주요한 process이다.

### 제 2 절 생물전환기술에의한 방향족 D-아미노산의 국내 ·외 기술개발 동향

생체내에서 D-아미노산은 미생물의 세포벽이나 생리활성물질등의 구성성분으로 존재한다고 알려져 있다(18). 미생물의 세포벽을 이루는 peptidoglycan의 구성성분인 D-glutamic acid는 미생물의 종류에 따라 glutamate racemase (GluRA) 또는 D-amino acid aminotransferase(D-AAT), *E. coli*, *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.*등은 GluRA에 의하여 *Bacillus*균주는 D-AAT에 의하여 생합성되며, D-glutamate가 생합성된다(19). 최근 고온성 *Bacillus* YM-1에서 내열성 D-AAT가 탐색되어 효소의 반응특성에 대한 연구가 수행되어 탐색된 내열성 D-AAT는 다양한 여러종류의 D-아미노산을 생산할 수 있는 기질특이성이 넓은 효소로 판명되었다(20-22). 그리고 고부가가치 의약품 합성 중간물질로 사용되고 있는 방향족 D-아미노산의 용도와 최근 용도개발이 수행되어 수요가 증가할 것으로 예상되는 D-아미노산을 표 1와 2에 각각 나타내었다.

표 1. 고부가가치 의약품 및 의약품 합성 중간물질로 사용되고 있는 방향족 D-아미노산의 용도

방향족 D-아미노산	용도
D-Hydroxyphenylglycine	Amoxicillin, Cefadroxil의 합성중간체
D-Phenylglycine	페니실린계 ampicillin의 합성중간체
D-Homophenylalanine	Angiotensin 변환효소저해제 합성원료

표 2. 현재 개발중인 방향족 D-아미노산함유 D-펩타이드의 용도

D-펩타이드	펩타이드 배열	용도
Dipeptide Sweetener	L-Asp-D-PG esters	감미료
Achatin-I	Gly-D-Phe-Ala-Asp	신경펩타이드
Arg-Gly-Asp peptide	Cyclo(arg-Gly-Asp-D-phe-Val) · 5H <sub>2</sub> O	Angiogenesis inhibitor

이러한 방향족D-아미노산의 합성 및 생산생물전환기술을 개발하기 위하여 국내에서는 생명공학연구소 본 연구팀에서 국내 고온환경의 분리원(토양, 온천, 고온폐수, 퇴비등)에서 고온성 Bacillus 균주들을 분리하여 분리된 고온성 Bacillus균주로부터 D-AAT의 활성탐색을 수행하여 활성을 보유한 고온성 Bacillus균주로부터 D-AAT의 유전자를 E coli에 gene cloning하여 E coli에서 D-AAT를 대량생산하였다. 대량생산된 내열성 D-AAT를 사용하여 최근 용도 개발이 진행되어 수요가 대폭 증가될 것으로 예상되는 방향족 D-아미노산의 합성 및 생산연구를 집중적으로 수행하고 있다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 실험재료 및 방법

#### 1. 사용균주와 plasmid

D-AAT 활성을 가지고 있는 *Bacillus* sp. DA100의 DNA, cloning vector(pUC19)와 expression vector (pTrc99A)을 사용하여 재조합균주는 *E. coli* JM105를 만들었다. Glutamate racemase gene를 가진 재조합균주 *E. coli* 105을 일본 Yoshimura 연구팀으로부터 분양 받았다.

#### 2. 세포의 배양과 활성효소의 유도

D-AAT 또는 glutamate racemase 활성을 지닌 재조합균주를 LB medium(1% bacto-peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl), 37. C, 200 rpm의 교반속도에서 배양하였다. *E. coli* 재조합균주의 성장이 OD, 0.4-0.6(600 nm)이 되면 1mM IPTG를 배양액에 첨가하여 필요한 효소합성을 유도하였다.

#### 3. 효소의 분리

*E. coli* 재조합균주를 LB 배지에서 10시간 배양 후 원심분리로 회수하였다. 세포를 30mM Tris-HCl(pH7.3), 0.01% 2-mercaptoethanol, 20mM pyridoxal phosphate, 10% glycerol의 조성을 가진 buffer에 현탁시키고 초음파로 파괴시켰다. 원심분리 후 상등액을 취하여 정제과정을 거치지 않고 효소 용액으로 사용하였다.

#### 4. Chemicals

실험에 사용된 각종  $\alpha$ -keto acid 및 D-amino acid 들은 Sigma구입하였다. amino acid 의 분석을 위한 시약인 2,3,4,6-tetra-o-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl isothiocyanate(GITC)도 Sigma에서 구입하였다.

## 5. 분석방법

생물전환반응액에의 D,L-amino acid들은 OPA로 유도체를 만들어 fluorescence dectector와 C18 reverse phase column이 장착된 HPLC로 분석하였다. 방향족 D-아미노산과 그들의 합성에 이용되는 기질 (hydroxyphenylpyruvate, phenylpyruvate)의 농도는 UV detector와 및 C18 reverse phase column이 장착된 HPLC로 분석하였다. Methanol 5%가 포함된 50 mM acetate buffer를 HPLC eluent로 사용하였다.

## 6. 효소활성 측정

D-AAT의 활성은 Salicylaldehyde로 반응산물로 생성된 pyruvate를 발색하여 측정하였다. 이때 100mM Tris-HCl(pH 8.5), 10mM D-alanine, 10mM  $\alpha$ -ketoglutarate을 포함한 반응액은 1 ml 에 효소를 가하고 50°C 에서 반응시켰다. 약 30분 후에 200  $\mu$ l 의 60% KOH와 2% salicylaldehyde 를 100  $\mu$ l 가하여 37 . C 에서 1시간 발색 시켰다. 발색된 시료는 500  $\mu$ l 의 찬물을 가하여 480 nm 에서 흡광도를 측정하여 활성을 정량하였다. Glutamate racemase의 활성은 50 mM Tris/HCl(pH 8.5), 10 mM D-glutamate 가 포함된 반응액 1 ml에 효소를 첨가하고 37. C에서 생성되는 L-glutamate의 농도를 HPLC로 측정하였다. 효소활성 1 unit은 1 분 동안 반응산물 1  $\mu$ mol을 드는 효소량으로 정의하였고 단백질함량은 Bredford방법으로 측정하였다.

## 제 2 절 결과 및 고찰

### 1. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 복합 생물전환계의 design

고효율 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 복합 생물전환계를 확립하기 위하여 다음과 같은 4 종류의 생물촉매를 선정하여 복합 생물전환계 (그림 2)를 design 하였다.

(a) glutamate racemase: 국내에서 저가로 생산되는 L-glutamate를 고부가가치 방향족 D-아미노산을 생산기질로 이용하기 위하여 glutamate racemase 유전자가 coding되어있는 plasmid, pGR3가 포함되어있는 재조합 E. Coli로부터 대량생산하여 L-glutamate로부터 방향족 D-아미노산의 기질로 사용되는 D-glutamate 생산 생물전환반응계를 도입하였다.

(b) D-amino acid aminotransferase: glutamate racemase에 의해 생산된 D-glutamic acid 와 방향족 D-아미노산 생산을 위한 각종 기질 keto acid(D-phenylalanine, phenylpyruvate; D-tyrosine, hydroxyphenylpyruvate; D-tryptophan, indolpyruvate)를 사용하여 방향족 D-아미노산을 생산하는 D-amino acid aminotransferase를 이용한 생물전환계를 도입하였다.

(c) glutamate dehydrogenase: DAAT 생물전환반응 후 생성되는  $\alpha$ -ketoglutaric acid를 glutamate dehydrogenase(Boehringer Mannheim)를 이용하여 다시 L-glutamate로 전환시키는 생물전환반응계를 도입하였다. 이러한 각종 생물촉매의 생물전환반응에 의해 소량의 L-glutamate와 keto acid를 기질로 하여 계속적으로 D-아미노산을 생산하는 생물전환계를 도입하였다.

(d) formate dehydrogenase: glutamate dehydrogenase는 NADH를 보조소로 요구하는 생물촉매이므로 생물전환반응 후 생성되는 NAD를 NADH로 전환시키기 위한 formate dehydrogenase(Boehringer Mannheim)이용 regeneration system을 도입한 생물전환반응계를 구축하였다



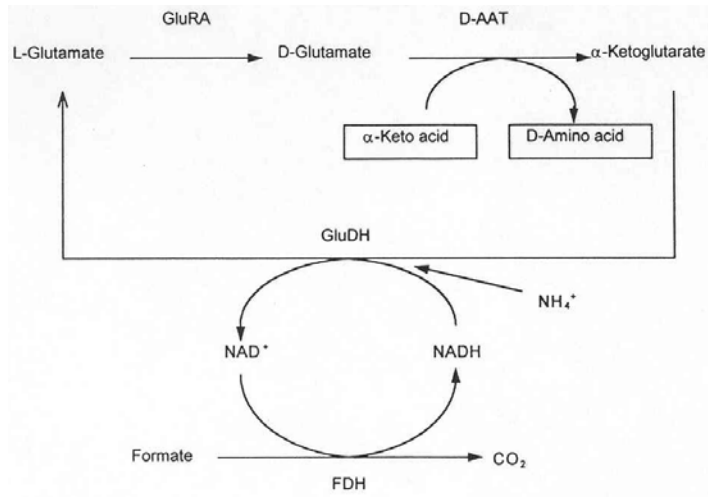


그림 2. 방향족 D-아미노산 (D-phenylalanine-D-tyrosine, D-tryptophan)의 생산을 위한 복합 생물전환계의 설계.

## 2. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 생물전환 반응계의 검토

### (i) L-glutamate로부터 D-glutamate의 glutamate racemase를 이용한 생물 전환반응계

국내에서 L-glutamate는 대량으로 생산되는 대표적인 아미노산이다. 일반적으로 D,L-glutamate형태로도 많이 생산되기도 하고 순수한 L-glutamate형태로 생산하기도 한다. 대량생산으로 인해 L-glutamate는 다른 아미노산에 비해 그 가격이 매우 저렴하다. 이러한 저가의 L-glutamate를 고부가가치 방향족 D-아미노산을 생산기질로 이용하기 위하여 glutamate racemase 유전자가 coding 되어있는 plasmid, pGR3가 포함되어 있는 재조합 E. Coli로부터 대량생산하여 L-glutamate로부터 방향족 D-아미노산의 기질로 사용되는 D-glutamate 생산 반응 활성을 조사하였다.

그림 3 에서 보여주듯이, glutamate racemase는 D-glutamate를 L-glutamate로 전환시켰다. 이 반응은 가역적 반응이기 때문에 L-glutamate가 기질로 사

용될 경우 본 연구과제에서 준비된 glutamate racemase는 D-glutamate를 합성할 수 있음을 보여준다. glutamate racemase를 이용하여 DAAT에게 친화력이 뛰어난 D-glutamate를 D-아미노기공여기질로 공급하는 것은 DAAT의 D-아미노산의 합성속도를 증가시킬 수 있다는 점에서 매우 중요한 의미를 갖는다.

## (ii) D-glutamic acid로부터 D-아미노산 생산을 위한 D-AAT 이용 생물전환 반응계

본 연구과제에서 준비된 D-AAT가 D-아미노기를 공여 기질로 이용할 수 있는 기질의 종류를 알아보기 위하여 다양한 D-아미노산이 첨가된 반응액에 DAAT와 glutamate (D-alanine가 기질로 이용된 경우)와 pyruvate(나머지 기질이 이용된 경우)를 넣고 기질로 사용된 D-아미노산의 소모속도를 비교하였다. 표 3 에서 보여진 것과 같이 DAAT는 D-alanine, D-glutamate, D-aminobutyrate 및 D-aspartate를 D-아미노기공여기질로 잘 이용했던 반면 D-valine, D-phenylalanine, D-tyrosine 과 D-phenylglycine에 대해서는 매우 낮은 친화력을 나타내었다.

한편 D-AAT가 방향족 D-아미노산(D-tyrosine, D-phenylalanine)을 합성할 수 있는지 조사하기 위하여 DAAT가 첨가된 반응액에 기질물질인  $\alpha$ -keto acids(hydroxyphenylpyruvate 와 phenylpyruvate)를 가하고 D-아미노산합성속도를 조사하였다. 표 4 에서 보여 주듯이, DAAT는 D-tyrosine, D-phenylalanine를 성공적으로 합성하였다. 그러나 합성속도는 방향족 D-아미노산이 아닌 D-glutamic acid나 D-valeric acid 에 비해 매우 낮은 값을 보였다. 따라서 DAAT를 이용하여 방향족 D-아미노산을 고농도 ·고효율로 생산하기 위해서는 최적 생산조건의 규명에 관한 연구가 심도있게 수행되어야 한다.

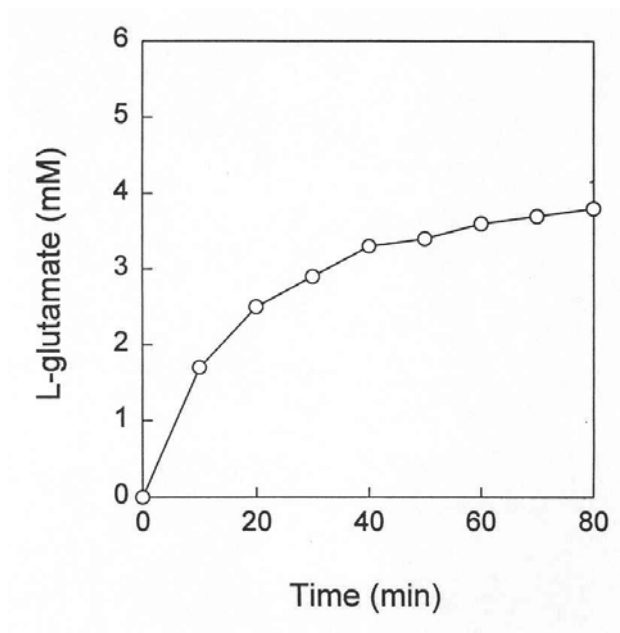


그림 3. glutamate racemase의 활성화에 의한 L-glutamate 의 생성. D-glutamate 1mM 과 Tris-HCl 50 mM이 함유된 반응액에 crude glutamate racemase 용액 (1 mg 의 단백질)을 첨가하여 반응

표 3. D-AAT의 D-아미노기 공여기질에 대한 친화력

D-Amino acids	Relative activity (%)
D-alanine	100.0
D-glutamate	91.8
D-aminobutyrate	126.8
D-aspartate	92.3
D-valine	2.6
D-phenylalanine	0.3
D-tyrosine	0.1
D-phenylglycine	<0.01

표 4 .D-AAT의 D-아미노기 수여기질에 대한 친화력

$\alpha$ -Keto acids	Relative activity (%)
$\alpha$ -ketoglutamate	100.0
$\alpha$ -ketoisovalerate	2.35
phenylpyruvate	0.60
hydroxyphenylpyruvate	0.46
bezonylformate	<0.01

### (iii) Regeneration system을 도입 한 방향족 D-아미노산 생산 생물전환 반응계

본 연구과제에서는 NADH와 L-glutamate가 연속적으로 재생되는 복합 생물 반응계에서 방향족 D-아미노산 (D-phenylalanine와 D-tyrosine)을 합성하기 위하여, 네가지 효소(DAAT, FDH, GDH, glutamate racemase)를 기질과 조효소(phenylpyruvate 혹은 hydroxyphenylpyruvate 20 mM, ammoniumformate 40 mM, NAD 1 mM, L-glutamate 10 mM, PLP 50  $\mu$ M)이 첨가된 반응용액에 반응 시켰다. 반응온도와 pH는 35-37  $^{\circ}$ C와 8-8.5로 하였다. 이 때 첨가된 효소량의 비는, glutamate racemase: DAAT: GDH: FDH=1:5:10:1 units로 고정하였다. 그림 4에 보여진 바와 같이 복합 생물반응계에 의해서 20 mM의 D-phenylalanine(그림 4A)과 D-tyrosine(그림 4B)이 합성되었다. 이 결과는 phenylpyruvate와 hydroxyphenylpyruvate가 DAAT에 의해 전부 D-phenylalanine과 D-tyrosine로 전환되었음을 보여 준다. 방향족 D-아미노산의 합성 반응이 진행되는 동안 glutamate racemase의 활성화에 의해 L-glutamate로부터 D-glutamate가 생성됨을 관찰하였고 총 glutamate의 농도는 초기 10 mM로 유지됨으로써 L-glutamate가 완벽하게 재생됨을 보여준다.

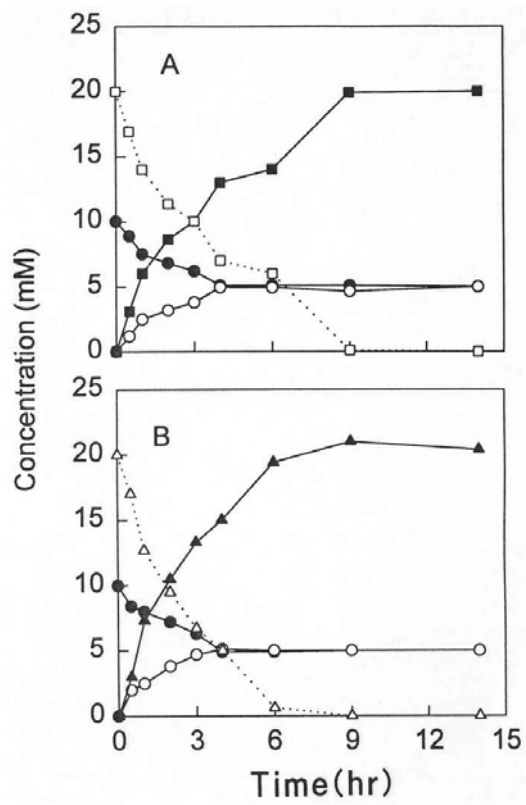


그림 4. 복합 생물반응계에 의한 D-tyrosine(A)와 D-phenylalanine의 합성.  
 기호: ●, L-glutamate; ○, D-glutamate; ■, D-tyrosine; □, hydroxyphenylpyruvate; ▲, D-phenylalanine; △, phenylpyruvate.

### 3. 방향족 D-아미노산의 생산을 위한 복합 생물전환반응계의 최적화

#### (i) 복합 생물전환반응계에 의한 D-phenylalanine의 생산

복합 생물반응계에서 D-phenylalanine의 생산은 D-phenylalanine의 일차기질인 D-phenylalanine의 농도가 50-70 mM의 범위에서 최고의 에서 합성속도를 나타내었고 기질의 농도가 100 mM 이상으로 증가함에 따라 심한 기질억제 현상을 보였다. 복합생물반응계에서 D-phenylalanine의 생산속도를 최적으로 유지하기 위해서 phenylpyruvate의 농도를 70 mM 이하로 유지하면서 연속적으로 기질을 공급하였다. 이때 ammoniumformate의 농도는 반응초기에 500 mM로 고정하였다.

그림 5 에서 보여주듯이, 초기 2회의 phenylpyruvate 50 mM이 첨가되었을 때 복합생물반응계는 일정한 속도로 D-phenylalanine을/합성을 합성하였다. 이 때 초기 평균 D-tyrosine을 합성속도 (volumetric production rate, mM/h)는 약 7 mM/h로 나타났다. 그러나 3 번째 기질이 첨가 되었을 때 (약 14 시간 이후)부터 반응속도는 약 30 %정도 감소하였고 22 시간 이후에는 50 %이상의 반응속도가 감소되었다. 시간에 따른 반응속도의 가장 큰 감소원인은 glutamate racemase 불안정성에서 찾을 수가 있다. DAAT는 매우 안정된 활성을 유지하였고 FDH와 GDH도 비교적 안정된 활성을 유지하는 효소로 알려져 있다. D-phenylalanine의 합성속도를 지속하기 위해서는 glutamate racemase를 주기적으로 첨가하는 방법이 모색되어야 할 것으로 생각된다. 약 150 mM 까지의 D-phenylalanine의 합성이 진행되는 동안 D-phenylalanine의 침전형상은 전혀 관찰되지 않았다.

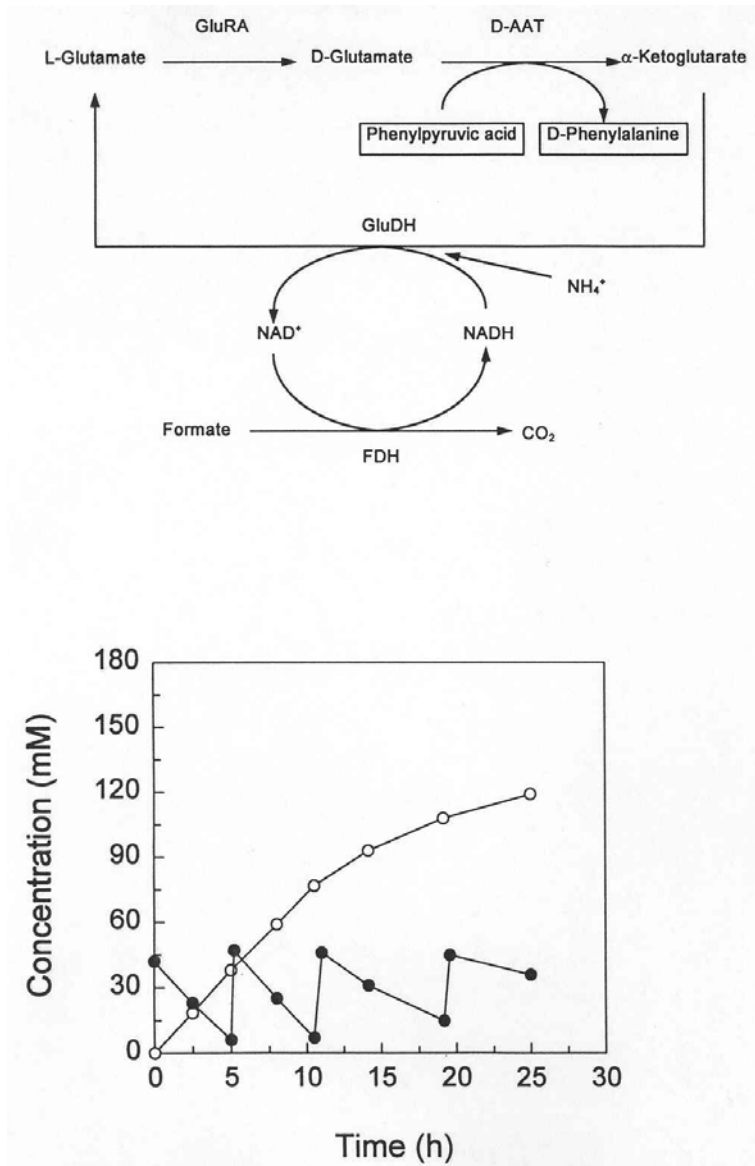


그림 5. 복합 생물반응계에 의한 D-phenylalanine의 생산.  
 기호: ● phenylpyruvate; ○, D-phenylalanine.



## (ii) 복합 생물전환반응계에 의한 D-tyrosine의 생산

D-phenylalanine의 합성때와 마찬가지로 복합 생물반응계에서 D-tyrosine의 생산은 D-tyrosine의 일차기질인 hydroxyphenylalanine의 농도가 50-70 mM의 범위에서 최고의 합성속도를 나타내었고 그 이상의 농도에서는 기질억제현상을 보였다. Hydroxyphenylalanine의 농도가 50-70 mM 이하로 유지 되도록 반응을 진행 시켰을 때 시간당 약 8-9 mM의 D-tyrosine이 합성되었고 합성속도를 나타냈으며 반응시간의 증가에 따라 D-tyrosine의 합성속도는 서서히 감소되었다(그림 6). 최종적으로 약 150 mM의 D-tyrosine이 합성되었을 때(반응시간이 약 60시간) 합성반응이 중단되었다.

반응계 내에서 합성된 D-tyrosine의 농도가 50 mM 이상으로 증가되면 D-tyrosine은 백색침전을 형성하였고 반응액에 녹아있는 D-tyrosine의 양은 20-30 mM 정도로 유지되었다. 이러한 D-tyrosine의 침전은 산업적인 측면에서 볼 때 분리정제 비용을 크게 절감할 수 있을 것으로 기대한다. 이러한 침전은 반응용액내의 D-tyrosine의 농도를 감소시킴으로써 작용하는 생물촉매의 product inhibition을 크게 줄일 수가 있다.

## (iii) 복합 생물전환반응계에 의한 D-tryptophan의 생산

D-phenylalanine 및 D-tyrosine와 동일한 합성조건에서 복합 생물반응계를 이용하여 D-tryptophan을 합성하였다. D-phenylalanine 및 D-tyrosine의 합성과정에서와 마찬가지로 D-tryptophan의 기질인 indolpyruvate가 시간당 약 8-9 mM로 복합반응계 내에서 전환됨을 확인하였다(그림 7). 그러나 기질인 indolpyruvate는 약 50%가 합성산물인 D-tryptophan로 전환되었고 나머지는 자동적으로 산화되어 D-tryptophan 이 아닌 다른 물질로 전환됨을 확인하였다. 이 것은 indolpyruvate가 산화작용에 매우 불안정된 물질이기 때문에 나타나는 현상으로 indolpyruvate가 산화작용을 방지하기 위해서는 반응용액에 적절한 환원제가 부가적으로 첨가되어야 할 것으로 생각한다.

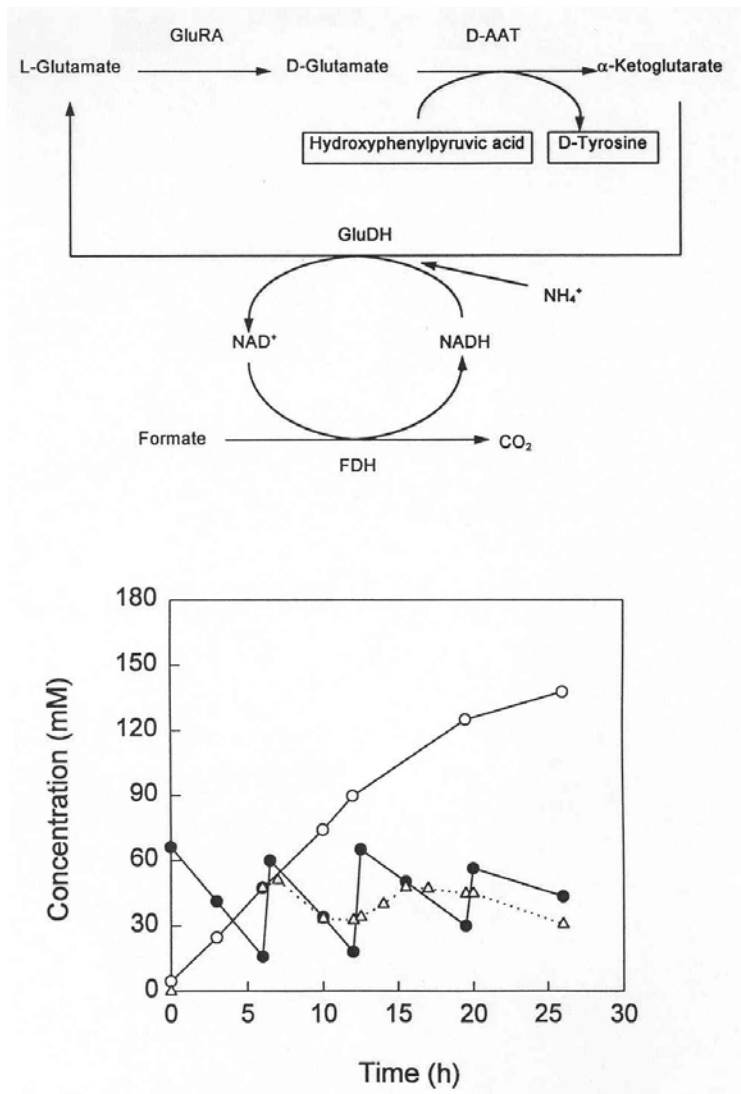


그림 6. 복합생물반응계에 의한 D-tyrosine의 생산.

기호: ●, hydroxyphenylpyruvate; ○, D-tyrosine; △, soluble hydroxyphenylpyruvate.

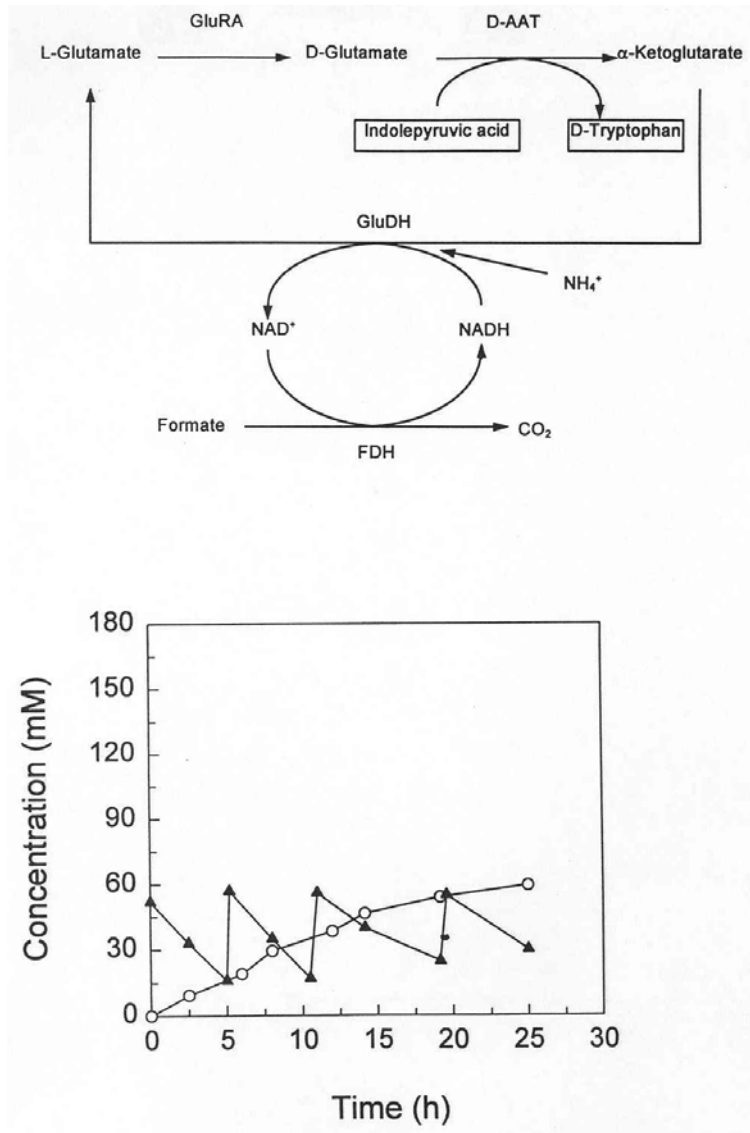


그림 7. 복합생물변환반응계에 의한 D-tryptophan의 생산.  
 기호: ○, D-tryptophan ; ▲, 3-indolepyruvate

## 제 4 장 사업 목표 달성도 및 대외 기여도

본 연구과제에서 우리는 방향족 D-아미노산의 합성을 위한 새로운 복합 생물 전환반응기를 성공적으로 개발하였고 다각적 면에서 반응기의 최적운영 조건을 규명하였다.

복합 생물반응기에서는 D-아미노기 공여물질인 D-glutamate가 복합 생물촉매체에 의하여 연속적으로 재생되어 지기 때문에 반응산물인  $\alpha$ -keto glutamate가 반응계내에 전혀 축적되지 않는다. 따라서, 반응산물에 의한 효소들의 불활성 현상들을 줄이고 반응속도를 증가시켜 고효율로 고부가가치 의약품 원료물질인 방향족 D-아미노산을 생산할 수가 있다. 특히, 복합 생물반응계에 사용된 DAAT는 광범위한 기질의 특이성을 가지고 있어 방향족 D-아미노산 외에도 다양한 D-아미노산들을 동일 반응계를 이용하여 생산 할 수가 있다. 본 연구과제에서 개발된 복합 생물전환기술은 고부가가치 ·유용의약품원료의 생산분야에 있어서 기존에 실행되지 않은 새로운 생산방법이다. 따라서 본 연구과제에서 수행된 연구결과는 앞으로 국내 생물전환기술의 개발이나 응용에 크게 기여할 것으로 생각된다.

본 과제에서 실행된 복합 생물전환기술은 경제성을 최대로 고려하였다. 복합 생물반응계에 기질로 사용된 L-glutamate는 국내에서 저가로 대량 생산되고 있다. 또한 crude 효소를 직접 이용하였기 때문에 효소의 정제과정에 소요되는 비용을 최대로 절감하였다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

고부가가치 의약품 및 의약품합성 중간물질로 사용되는 고부가가치 방향족 D-아미노산 (D-phenylalanine, D-tyrosine 및 D-tryptophan)의 생산을 위한 복합효소계를 이용한 복합 생물전환기술을 개발하여 다음과 같이 개발된 기술을 활용하고자 한다.

- i) Regeneration system을 도입한 고효율·고생산의 고부가가치 유용·의약품 생물소재의 생산기술의 확립
- ii) 고부가가치 의약품 방향족 D-아미노산의 생산기술의 기업화 및 상업적 생산추진
- iii) 의약품 및 의약품합성 중간물질로 사용되는 D-아미노산을 개발하여 국민복지 및 건강증진에 기여

## 참 고 문 헌

1. Pucci, M.J., Thanassi, J.A., Ho, H.T., Falk, P.J., and Dougherty, T.J. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 336–342.
2. Asano, Y. (1990) *Bioscience and Industry* 48, 131–137.
3. Cai, R.Z., Karashina, T., Guoth, J., Szoke, B., Olsen, D., and Schally, A.V. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2502–2506.
4. Akamatsu, K., Yamaguchi, H., Nishimura, K., Sawada, H., Nomoto, K., and Ueno, T. (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1123–1127.
5. Yamada, H. and Shimizu, S. (1988) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27, 622–642.
6. Yamada, H., Shimizu, S., Shimada, H., Tani, Y., Takahasi, S., and Ohashi, T. (1980) *Biochimie* 62, 395–399.
7. Yamada, H., Takahasi, K., Kil, Y., and Kumagai, H. (1978) *J. Ferment. Technol.* 56, 484–491.
8. Yamada, S., Hongo, C., and Chibata, I. (1978) *Agric. Biol. Chem.* 42, 1521–1526.
9. Takahashi, S., Ohashi, T., Kil, Y., Kumagai, H., and Yamada, H. (1979) *J. Ferment. Technol.*, 57, 328–332.
10. Kim, D-M., and Kim, H.S. (1993) *Enzyme Microb. Technol.* 15, 530–534.
11. Tanizawa, K., Asano, S., Masu, Y., Kuramitsu, S., Kagamiyama, S., Tanaka, H., and Soda, K. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 2450–2454.
12. Tanizawa, K., Masu, Y., Asano, S., Kuramitsu, S., Kagamiyama, S., Tanaka, H., and Soda, K. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 2445–2449.
13. Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., and Soda, K. (1988) *J. Biotechnol.* 8, 243–248.
14. Morgan, Dan. (1994) *Proceedings of International Conference of Biotechnology BIO-JAPAN □94*, 193–200.
15. Carlsen, Soren and T. Amachi. (1994) *Proceedings of International Conference of Biotechnology BIO-JAPAN □94*, 135–137.

16. Kumagi, Hidehiko. (1994) Proceedings of International Conference of Biotechnology BIO-JAPAN □94, 138-144.
17. Nakahara, Kunio. (1994) Proceedings of International Conference of Biotechnology BIO-JAPAN □94, 145-149.
18. Tanizawa, K., Asano, S., Masu, Y., Tanaka, H., and Soda, K. (1989) J. Biol. Chem. 264, 2445-2449.
19. Tanizawa, K., Asano, S., Masu, Y., Kuramitsu, S., Kagamiyama, T., Tanaka, H., and Soda, K. (1989) J. Biol. Chem. 264, 2450-2454.
20. Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., and Soda, K. (1988) J. Biotechnol. 8, 243-248.
21. Nishimura, K., Tanizawa, K., Yoshimura, T., Esaki, N., Futaki, S., Manning, J. M., and Soda, K. (1991) Biochemistry 30, 4072-4077.
22. Yoshimura, T., Bhatia, M.B., Manning, J.M., Ringe, D., and Soda, K. (1992) Biochemistry 31, 11748-11754.