

토양미생물로부터 얻어진 ω -transaminase와 탈수소효소를 이용한 (R,S)- α -methylbenzylamine의 광학적 분리

신 종식, 김 병기
서울대학교 유전공학연구소 및 공업화학과

Chiral Resolution of (R,S)- α -methylbenzylamine Using ω -Transaminase and Dehydrogenase Screened from Soil Microorganisms

Jong-Shik Shin, Byung-Gee Kim
Institute for Molecular Biology and Genetics and
Department of Chemical Technology
Seoul National University

1. 서론

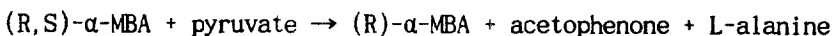
광학이성질체의 광학적 분리는 제약산업뿐만 아니라 농약, 식품산업에서도 점점 더 그 중요성이 부각되고 있다. 보통 세포내의 물질대사과정에서는 어느 한 형태의 광학이성질체만이 사용되며 그 반대의 광학이성질체는 아무 효과가 없거나 오히려 부작용을 보인다.¹⁾ 또한 앞으로는 효과를 보이는 광학이성질체만을 순수하게 라세메이트로부터 분리해야만 제약으로써 FDA의 허가를 받을 수 있기 때문에 광학이성질체의 분리는 이제 제약관련산업의 사활이 걸린 문제라 할 수 있을 것이다.

본 논문에서는 토양으로부터 enrichment 방법에 의해 ω -transaminase와 탈수소효소를 보유한 균주를 각각 얻어 α -methylbenzylamine(α -MBA)의 광학적 분리를 시도하였으며 두 효소의 특성 및 반응조건의 최적화를 수행하였다.

2. 이론

α -MBA의 각 입체이성질체는 chiral acid의 광학적 분리를 위한 resolving agent나 다른 chiral amine의 비대칭합성을 위한 chiral auxiliary로 사용된다. 광학적 선택성을 가진 효소를 사용하여 광학적 분할을 수행할 경우, racemate에서 어느 한 이성질체만을 산화적 탈아민화반응에 의해 acetophenone으로 전환시킴으로써 미반응의 순수한 이성질체를 얻을 수 있다. 이 때 (S)-specificity를 갖는 ω -transaminase를 사용하여 (R)- α -MBA만을 회수하거나, (R)-specificity를 갖는 탈수소효소를 사용하여 (S)- α -MBA만을 얻을 수 있다.

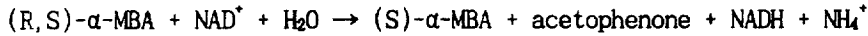
ω -Transaminase는 PLP를 cofactor로 필요로 하며 2차아민에 대해 매우 입체특이적인 transamination반응을 수행한다. (S)-specificity를 가진 경우는 다음과 같이 (S)- α -MBA만을 acetophenone으로 전환시킨다.



대부분의 α -transaminase의 경우 평형상수가 1에 가까운 반면, ω -transaminase의 경우는 높은 평형상수값을 갖는 특성이 있다. Amino acceptor로는 α -keto acid이외에도 카보닐기를 갖는 ketone이나 aldehyde가 사용될 수 있다.²⁾

탈수소효소는 NAD(P)⁺/NAD(P)H를 보조인자로 사용하며 아미노산 탈수소효소의

경우 산화적 탈아민화반응 또는 환원적 아민화반응을 수행한다. 현재까지 보고된 아미노산 탈수소효소는 모두 (S)-specificity를 갖는데 반해 본 연구에서는 (R)-specificity를 갖는 탈수소효소를 screening하여 사용하였다. 이 경우에는 다음과 같이 (R)- α -MBA만을 acetophenone으로 전환시킨다.³⁾



3. 실험

3-1. 균주선별

경기도와 울산의 화학공장부근에서 채취한 흙을 LB media에서 3시간 배양한 후 상등액(0.1ml)을 (R)- α -MBA 또는 (S)- α -MBA만을 유일한 질소원(30mM)으로 첨가한 최소배지(10ml)에 접종하였다. 마찬가지로 이를 간격으로 5번 enrichment시켰다. Enrichment때와 동일한 조성의 minimal agar plate에 배양액을 전개한 후 콜로니를 동정하여 30mM의 (R)- α -MBA만 들어있는 최소배지와 30mM의 (S)- α -MBA만 들어있는 최소배지에 각각 키워 O.D. ratio를 비교하여 균주선별을 했다.

3-2. Transaminase 활성분석

선별된 균주를 최소배지(10ml)에서 배양한 후 회수하여 cell pellet에 반응액(15mM (R,S)- α -MBA, 50mM sodium pyruvate, 200mM phosphate buffer, pH 9) 1ml을 첨가한 후 37°C, 150rpm의 shaking incubator에서 하루 반응시킨 후 생성된 acetophenone을 GC(Thermon 1000으로 packing, Japan, Shimatzu Co.)로 분석하였다. 기질에 대한 입체특이성은 반응액의 α -MBA를 HPLC(Crownpak, Japan, Daicel Co.)로 분석하였다.

Lactate 탈수소효소를 이용하여 GC나 HPLC를 쓰지않고 transaminase의 활성을 분석하기도 했다. α -MBA의 각 입체이성질체가 따로 들어있는 반응액에 crude extract를 첨가하여 2시간 반응시킨 후 반응액에 LDH와 NADH를 첨가하여 남아있는 pyruvate의 양을 360nm에서 NADH의 흡광도변화를 측정하여 활성 및 α -MBA에 대한 입체특이성을 분석하였다.

3-3. 탈수소효소 활성분석

탈수소효소의 활성은 cofactor인 NADH의 흡광도 변화를 통해 분석했다. 환원적 아민화반응의 경우 100mM의 ammonium chloride와 10mM의 acetophenone을 기질로 사용하였고 enzyme source로써 crude extract를 사용하여 NADH의 흡광도 감소량을 측정하였다. 산화적 탈아민화반응의 경우에는 α -MBA만을 기질로 첨가하여 시간에 따른 NADH의 흡광도증가량을 측정하였다. 기질에 대한 입체특이성은 3-2와 같이 HPLC로 분석하였다.

4. 결과 및 토론

4-1. 균주선별

(S)- α -MBA만을 질소원으로 첨가한 최소배지에서는 1차 및 2차 균주선별에서 각각 최대의 활성을 보인 (S)-specific transaminase을 보유한 2개의 균주

(TA2F, NES6-4)를 선발했다. 이 두 균주는 모두 (R)- α -MBA만을 질소원으로 첨가한 최소배지에서보다 (S)- α -MBA만 들어있는 배지에서 4배 이상의 O.D. 값을 보였다. 또한 두 균주 모두 99%이상의 ee(R)값을 보였다. (R)- α -MBA만을 질소원으로 첨가한 배지에서는 (S)-specific transaminase와 (R)-specific 탈수소효소를 보유한 두 개의 균주(NER6-1, NER6-16)를 선발했다. 이 균주들은 (R)- α -MBA만을 질소원으로 사용한 최소배지에서, (S)- α -MBA만을 질소원으로 사용한 최소배지에서보다 20~50% 더 높은 O.D. 값을 보였다.

4-2. (S)-specific transaminase를 이용한 광학분리

NES6-4와 TA2F는 (S)-specific transaminase를 이용하여 (S)- α -MBA를 질소원으로 사용하며 NES6-4는 (S)- α -MBA 이외에 β -alanine이, TA2F의 경우는 isopropylamine이 specific activity 측면에서 좋은 질소원이었다. 탄소원으로는 NES6-4는 glycerol이, TA2F는 fructose가 가장 좋았다. NES6-4의 경우는 pyruvate와 같은 keto acid 이외에 aldehyde나 ketone계열화합물도 amino acceptor로서 사용될 수 있었다. NES6-4와 TA2F는 각각 100mM 및 30mM까지의 α -MBA를 포함한 최소배지에서 좋은 성장을 보였다. 전반적으로 NES6-4가 TA2F보다는 높은 specific activity와 유기용매를 포함한 이상계에서의 높은 반응성을 보였다. NES6-4는 (Aminoxy)acetic acid나 gabaculine에 의해 효소활성이 저해되었으며 이는 다른 ω -aminotransferase에 대해 보고된 바와 같다. TA2F의 경우는 위의 활성저해제에 대해 NES6-4보다 낮은 활성저해를 받았다.

두 균주 모두 기질과 생성물의 농도에 따른 반응속도의 저해를 심하게 받았으며, 기질보다는 생성물인 acetophenone에 대한 반응속도의 저해가 더 심했다. 이는 고농도의 α -MBA를 광학적으로 분할할 때 문제점으로 대두되었다. 따라서 whole cell이나 crude extract와 같은 enzyme source는 수용액상에 존재하고 α -MBA나 acetophenone은 유기용매상에 존재하는 이상계에서의 광학적 분할반응이 현재 연구되고 있다. 이 경우 유기용매상은 기질인 α -MBA의 고농도저장소역할을 함과 동시에, acetophenone을 생성되는 즉시 추출시킴으로써 기질의 낮은 용해도와 기질과 생성물에 의한 효소의 반응성저해로 인한 문제점을 피할 수 있었다.

NES6-4는 octane이나 dioctyl phthalate와 같이 logP가 큰 유기용매에 대해 상대적으로 높은 세포생존도를 보인 반면, ethyl acetate나 cyclohexanone과 같이 acetophenone과 비슷한 logP값을 갖은 유기용매를 포함한 이상계에서 높은 반응성을 보였다. 유기용매에 대한 반응성은 whole cell과 crude extract가 서로 비슷한 경향성을 보였다. 즉 이상계에서 고농도 α -MBA의 광학적 분리를 수행할 경우 cell의 viability는 반응성에 별 영향을 미치지 못하며, 이는 cell이 lysis되더라도 NES6-4가 보유한 transaminase의 유기용매에 대한 안정성이 우수하다는 사실을 암시한다. 용매를 스크리닝한 결과, cyclohexanone이 가장 적합한 유기용매상임을 알 수 있었으며, 20%(v/v)의 cyclohexanone을 포함한 이상계에서 500mM의 α -MBA를 ee(R) 95%이상으로 광학분리할 수 있었다.

본 연구에서의 이상계반응에서는 α -MBA가 유기용매상인 cyclohexanone과 Schiff base를 형성하기 때문에 수용액상에서의 기질 추출력이 우수하다. 유기용매상에서의 α -MBA와 imine간의 조성비는 초기에 넣어준 α -MBA의 농도에 따라 변한다. 반응이 진행됨에 따라 유기용매상의 α -MBA가 직접 diffusion되거나, imine이 diffusion되어 수용액상에서 가수분해됨으로써 수용액상에 α -MBA를 공급한다. 생성물인 acetophenone은 cyclohexanone과 비슷한 logP값을 가지며, 같은 케톤계 화합물이기 때문에 수용액상에서 생성된 acetophenone을 유기용매상으로 효과적으로 추출할 수 있다. α -MBA는 전하를 띠지 않는 그룹을 가지고 있으므로 수용액상과 유기용매상에서의 partition이 pH에 매우 민감하게 변한다.

반면 acetophenone은 pH에 관계없이 일정한 partition 경향을 갖는다. 이와 같이 cyclohexanone을 유기용매층으로 사용함으로써, 수용액상에서 기질과 생성물의 농도를 활성저해농도이하로 유지시킬 수 있기 때문에 고농도의 α -MBA를 광학 분리 할 경우는 이상계반응시스템의 채택이 필수불가결하다.

역반응의 경우 이론적으로는 acetophenone으로부터 (S)- α -MBA를 비대칭합성 할 수 있다. 정반응의 경우는 반응이 진행되는 동안의 부반응과 미약하지만 (R)- α -MBA도 반응에 참여하기 때문에 광학적 분리를 통해서는 50%의 (R)- α -MBA를 얻을 수 없는 반면, 비대칭합성을 통해서는 더 높은 순도의 이성질체를 얻을 수 있으며 이론적으로는 100%의 수율을 얻을 수 있는 장점이 있다. 또한 값싼 화합물로부터 출발하기 때문에 경제적인 측면에서도 바람직하다. 그러나, 본 연구에서는 acetophenone이 amino acceptor로써 낮은 활성을 갖기 때문에 매우 낮은 반응속도를 보였다.

4-3. (R)-specific 탈수소효소를 이용한 광학분할

(R)- α -MBA최소배지에서 선별된 균주는 (R)- α -MBA최소배지뿐만 아니라 (S)- α -MBA최소배지에서도 비슷한 성장속도를 보였으며 이는 서로 다른 입체적 기질특이성을 갖는 효소가 미생물내에 공존하기 때문이라 생각된다. Lactate 탈수소효소를 이용하여 transaminase 활성 및 입체적 기질특이성을 조사한 결과 대부분의 미생물이 (S)-specific transaminase활성을 띠었으며, (R)-specificity를 갖는 미지의 효소 중에서 탈수소효소를 목적효소로 하여 그 활성도를 조사한 결과 NER6-1과 NER6-16을 선별할 수 있었다. 이 두 균주는 배양시 질소원으로 α -MBA의 어느 한 form의 이성질체를 썼느냐에 따라 whole cell로 산화적 탈아민화반응을 수행할 시 정반대의 기질특이성을 보였다. 그러나 이와 같은 NER6-1 및 NER6-16의 (S)-specific transaminase의 활성은 상기한 NES6-4에 비해 훨씬 낮았다. 따라서 (S)-specific transaminase활성을 억제하면서 (R)-specific 탈수소효소만이 작용하도록 하는 것과 보조인자인 NAD/NADH의 재생등이 문제점으로 대두되었다. 이에 대한 해결책으로는 hydroxylamine, gabaculine, aminoxyacetic acid와 같은 적절한 transaminase억제제의 사용, 다른 탈수소효소를 이용한 coupled enzymatic NAD/NADH regeneration이나 전기화학적 방법에 의한 보조인자의 재생 등이 있다. 현재는 탈수소효소의 분리, 정제 및 (S)-specific transaminase가 발현되지 않는 mutant를 만드는 방향으로 연구가 진행중에 있다.

5. 참고문헌

1. John Caldwell, Andrew J. Hutt and Sylvie Fournel-Gleux: Biochem. Pharmacol., 37, 105(1988)
2. Seou Lee: KICHe Symposium, p109(1994)
3. Werner Hummel and Maria-Regina Kula: Eur. J. Biochem., 184, 1(1989)