

효소공정에 의한 트립토판 생산

이인영¹ · 안경섭¹ · 김익환¹ · 이선복^{2*}

¹한국과학기술연구원 유전공학연구소 효소공학연구실

²포항공과대학 화학공학과

Production of L-Tryptophan by Enzymatic Processes

Lee, In-Young¹, Kyung-Seop Ahn¹, Ik-Hwan Kim¹ and Sun-Bok Lee^{2*}

¹Enzyme Technology Lab., Genetic Engineering Research Institute, KIST, Daejeon 305-606, Korea

²Department of Chemical Engineering, Pohang Institute of Science and Technology, Pohang 790-600, Korea

Abstract — Enzymatic synthesis of L-tryptophan(Trp) using *E. coli* tryptophanase has been investigated. In order to reduce the substrate inhibition by indole and to increase the product yield of L-tryptophan three different approaches have been made in this work. First, indole was intermittently fed to the reaction mixture in order to control the indole concentration at lower level. When 15 mM of indole was used as a total amount of substrate, conversion yield of 80% has been obtained with intermittent feeding while only 20% of indole was converted into L-tryptophan by conventional batch operation. The second method employed in this work was the use of cyclohexane-phosphate buffer organic two-phase system. In this system, indole was mainly partitioned into the organic-solvent phase and therefore substrate inhibition was expected to be reduced. L-Tryptophan production in organic two-phase system was, however, unexpectedly lower than that obtained in aqueous buffer solution. As a third method cyclodextrins have been added to the aqueous reaction mixture. It was found that the addition of β -cyclodextrin enhanced the tryptophan synthesis noticeably while α -cyclodextrin showed little effect on tryptophan production.

필수 아미노산의 하나인 트립토판은 의약품 및 사료첨가제로 용도가 매우 넓은데 반하여 고가이기 때문에 경제적인 트립토판 생산공정이 요구되고 있다. 트립토판 합성방법은 크게 화학합성법, 미생물 발효법, 그리고 효소 합성법으로 나눌 수 있다. 현재까지 트립토판 합성은 주로 화학합성법에 의존하고 있는데 기질이 다소 비싸고 D,L-isomer가 함께 생성되어 다단계의 분리공정이 필요하며, 미생물 발효법의 경우에는 많은 연구가 진행되어 왔으나(1-4) 트립토판 생산수율이 낮아 아직 공정화되지 않은 것으로 알려지고 있다. 한편 효소 합성법은 tryptophan synthe-

tase와 tryptophanase(5-8)를 사용하는 두 가지 방법이 있는데 합성수율이 높고 공정이 간단한 이점이 있으나 기질의 가격이 비싸고 두 경우 모두 기질로 사용되는 인돌에 의해 효소활성이 저해되는 단점이 있다.

이와 같이 효소를 이용한 합성반응의 경우 기질에 의한 활성 저해는 목적산물의 다량생산에 큰 장애요인이 되는 바, 본 연구에서는 tryptophanase를 이용한 트립토판 합성시 인돌의 저해 정도를 억제할 수 있는 여러 방법을 적용하여 그 효과를 관찰하였다. 기질의 효소활성 저해를 억제하는 방법으로는 일반적으로 저해기질의 유가식 첨가방법이 사용되고 있는데 본 연구에서도 저농도의 인돌을 간헐적으로 첨가하는 유가식 조업을 하였다. 한편 유기용매 이상계를 이용하는 효소 반응에 대하여 널리 연구가 진행되고

Key words: L-Tryptophan, enzymatic process, indole inhibition, organic two-phase reaction, cyclodextrin effect

*Corresponding author

있는데(9-13) 본 연구에서도 인돌의 저해를 억제하고 그리고 반응평형이 트립토판 합성쪽으로 유도되도록 유기용매 이상계를 사용하는 방법을 모색하였다. 또한 인돌의 저해작용을 억제하여 트립토판 생성속도를 증가시키기 위한 또 다른 방법으로 cyclodextrin 첨가효과를 연구하였다. Cyclodextrin은 hydrophobic cavity와 hydrophilic shell을 갖는 oligosaccharide로서 여러 가지 물질들과 inclusion complex를 형성하고 평형에 의해 complex로 형성된 물질을 방출하는 기능을 갖고 있다고 알려져 있으며, 그 외에도 효소의 열 안정성을 증가시키면 guest compound의 용해도를 증진시키는 보고가 있다(14). 이와 같이 본 연구에서는 tryptophanase를 이용한 tryptophan(Trp) 합성시 생산성 향상을 위한 여러 방법을 다각적으로 검토하였는 바 본 연구결과에서 사용된 방법들은 tryptophan 뿐 아니라 가수분해 반응의 평형이동을 이용한 유사 생물공학 제품의 생산에도 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

재료

트립토판 합성에 사용한 효소는 *Escherichia coli*가 생산하는 tryptophanase(EC 4.1.99.1)로서 Sigma사 제품을 사용하였다. 기질인 indole, pyruvate, 조효소인 pyridoxal-5-phosphate, 그리고 첨가제로 사용한 α - 및 β -cyclodextrin도 Sigma로부터 구입하였으며 계면활성제인 Aliquat 336은 Aldrich에서 구입하였고 그 외의 시약은 특급시약을 사용하였다. 한편 HPLC 이동상으로 사용한 water와 acetonitrile은 HPLC grade로 Baxter사 제품을 사용하였다.

수용액에서 트립토판 합성 및 분해반응

트립토판 합성방법은 200 mM의 NH_4Cl , 200 mM의 pyruvate와 조효소인 pyridoxal-5-phosphate가 80 μM 함유된 기질용액에 정해진 양의 효소와 indole을 potassium phosphate 완충용액(pH 8.0)에 용해시킨 다음 40°C에서 반응시킨 후 80°C에서 5분간 끓여 반응을 종료하였다. 반응종료 시료는 10,000 rpm에서 5분 원심분리한 다음 상등액을 이동상 용액으로 적절히 희석하여 HPLC로 분석하였다. Tryptophanase에 의한 트립토판 분해 정도를 살펴보기 위하여 트립토판 농

도를 5~40 mM로 하고 효소 농도를 2 mg/ml 되도록 완충용액에 녹인 다음 40°C에서 반응하였다.

유기용매 이상계에서의 트립토판 합성

트립토판 합성에 적합한 유기용매를 선정하기 위하여 water miscible 유기용매로는 acetone, DMSO, ethanol, methanol을 사용하였으며 water immiscible 유기용매로 butanol, ethylacetate, chloroform, benzene, toluene 그리고 cyclohexane을 사용하였다. 각 유기용매와 인산염 완충용액(0.1 M, pH 8.0)을 동일 부피로 섞은 후 기질 및 효소를 녹인 다음, 40°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 합성된 트립토판을 측정하여 최적 유기용매를 선정하였다. 유기용매 이상계에서의 기질인 indole, pyruvate 그리고 산물인 트립토판의 pH에 따른 분배계수를 조사하기 위하여 pH가 다른 완충용액에 각각 기질 및 트립토판을 첨가한 후 cyclohexane을 동량 첨가하여 overnight stirring한 후, 각 상에서 기질 및 트립토판 농도를 측정하였다. 분배계수는 수용액층에서의 농도에 대한 유기용매층에서의 농도비로 정의하였다. 유기용매 이상계에서의 트립토판 합성은 100 mM 인산염 완충용액에 효소 및 인돌을 제외한 기질을 녹인 후 cyclohexane 동량 부가하여 incubation시킨 후 효소와 인돌을 첨가하여 40°C에서 합성반응을 수행하였다.

분석방법

반응기질 및 산물은 reverse phase column인 μ -Bondapak C18(30 cm \times 3.9 mm)을 사용한 HPLC(Hitachi L-6000) 방법으로 분석하였으며 220 nm에서 UV 흡광도를 측정하여 정량분석하였다. 이동상으로는 acetonitrile과 물을 60:40으로 섞은 후 phosphoric acid를 가하여 pH를 3.0으로 보정한 용매를 사용하였다.

결과 및 고찰

최적 pH 및 반응온도

트립토판의 분해 또는 합성반응의 최적 pH를 구하기 위하여 pH 5.5~8.5 사이의 0.1 M potassium phosphate 완충용액을 사용하였다. Fig. 1에 도시하였듯이 tryptophanase를 이용하여 NH_4Cl , pyruvate, indole로부터 L-tryptophan 합성의 최적 pH는 8.3이었

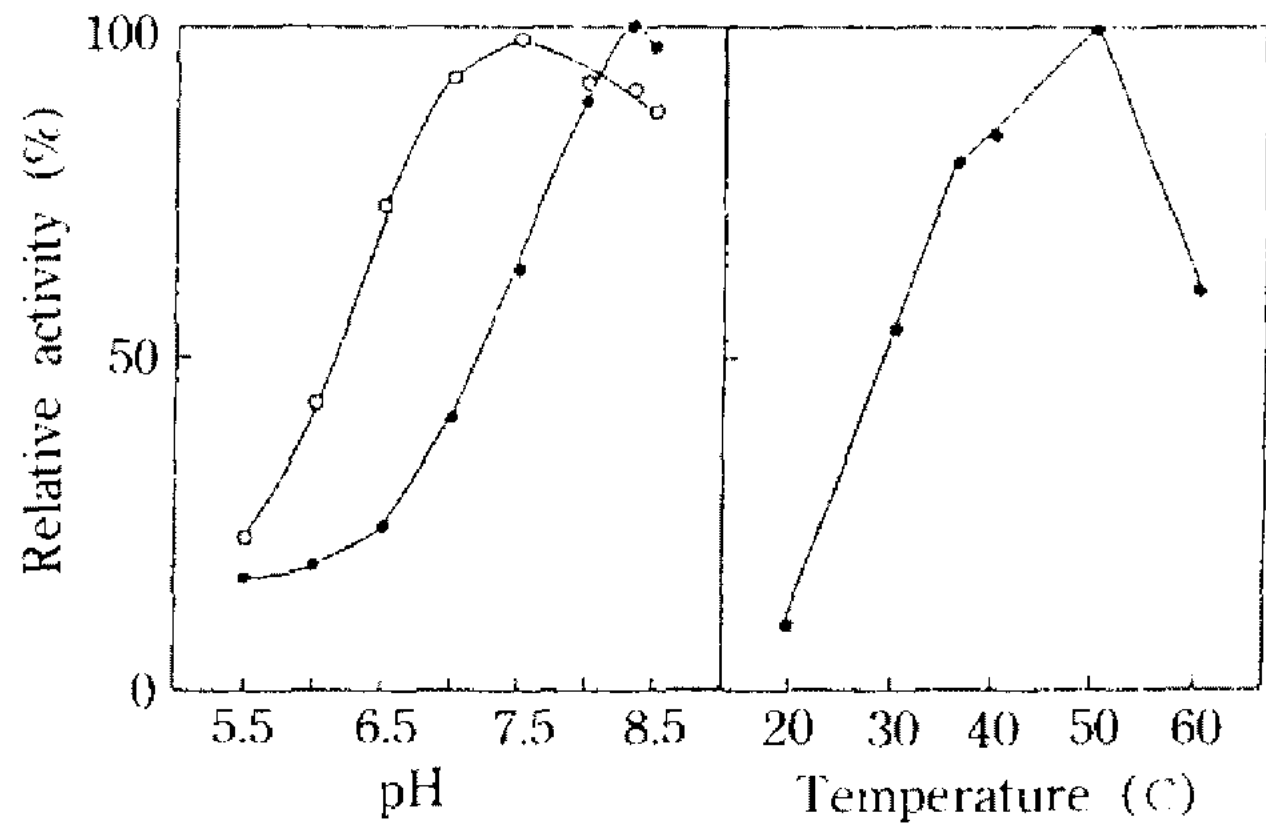


Fig. 1. Effect of pH and temperature on tryptophanase activity.
 (○), Tryptophan hydrolysis reaction; (●), Tryptophan synthesis reaction.

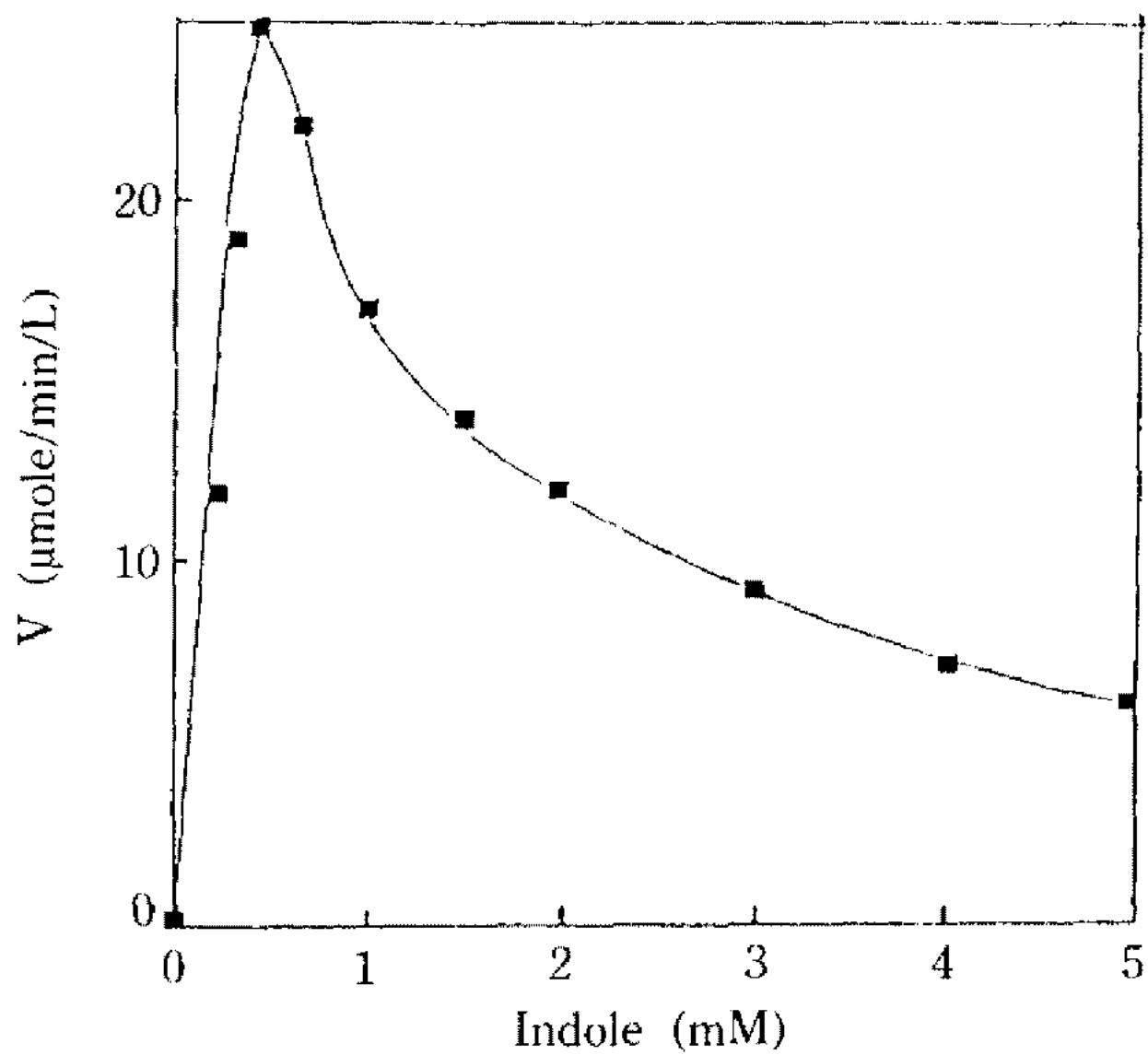


Fig. 2. Effect of indole concentration on tryptophanase activity.
 (Pyruvate, 200 mM; NH₄Cl, 200 mM; Enzyme loading, 0.5 mg/ml; Temperature, 40°C; pH, 8.0).

으며 tryptophan 분해 반응의 최적 pH는 7.5로서 합성반응과 최적 pH와 상이함을 알 수 있었다. 한편 트립토판 합성은 50°C에서 가장 우수하였으나 40°C에서도 트립토판이 원활히 합성되었으므로 효소의 안정성을 고려하여 40°C에서 조업하였다.

인돌의 효소활성 저해

인돌의 효소활성 저해 영향을 조사하기 위하여 인돌의 농도를 0.2~5.0 mM로 변화시키면서 트립토판 합성 속도를 관찰하였다. Fig. 2에 나타내었듯이 인돌 농도가 0.4 mM 이하에서는 인돌 농도에 따라 초기 반응속도가 직선적으로 증가하나 0.4 mM 이상에서는

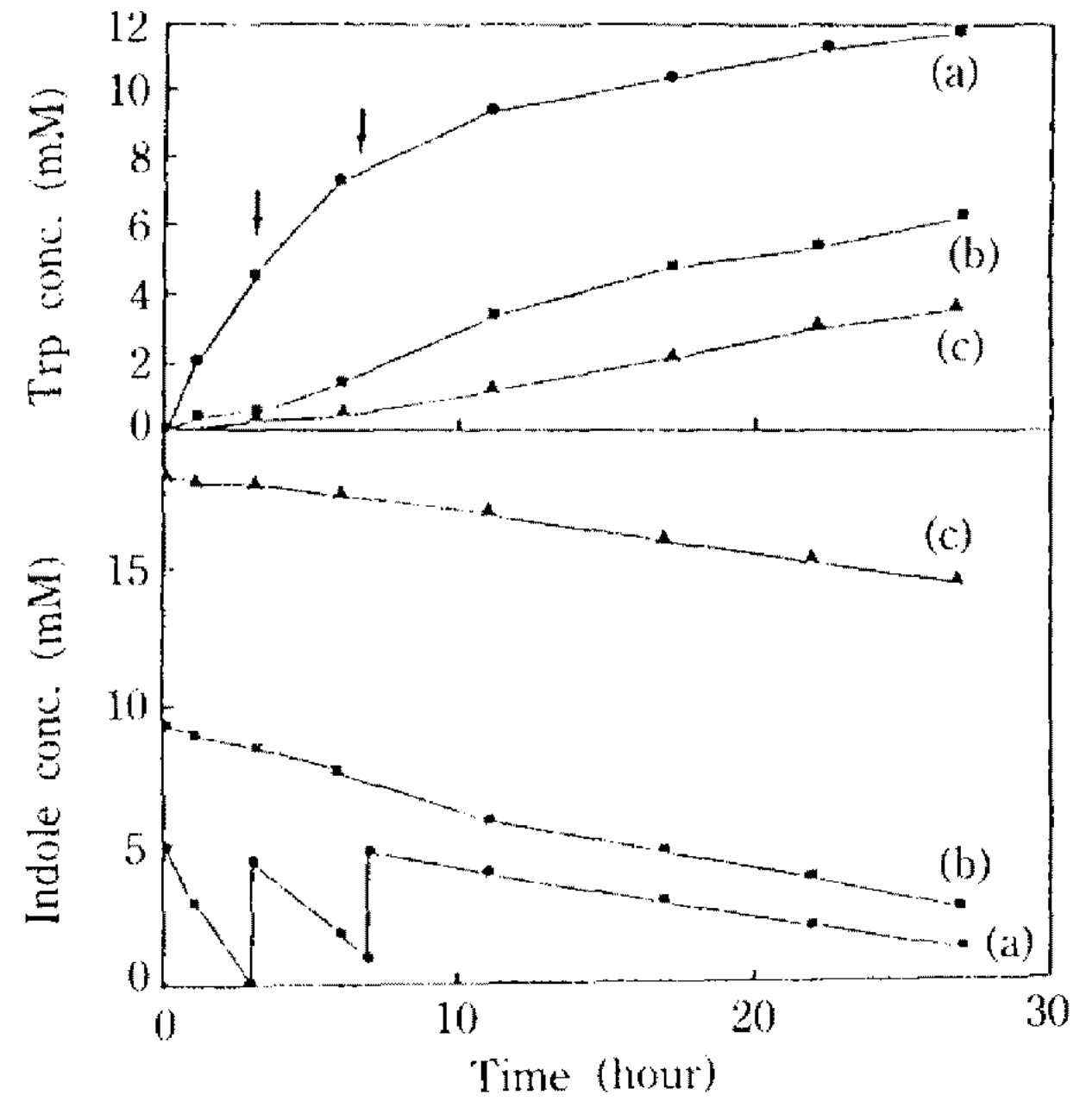


Fig. 3. Enhancement of tryptophan synthesis by intermittent feeding of substrate.
 (Temperature, 40°C; pH, 8.0; Enzyme loading, 2 mg/ml) (a), Case for intermittent feeding of indole; (b), Case for constant indole concentration=9.5 mM; (c), Constant indole concentration=18.4 mM.

초기 반응속도가 인돌 농도가 증가함에 따라 급격히 저하됨을 알 수 있다. 이와 같이 기질에 의한 효소 활성이 저해 정도를 알아보기 위해 substrate inhibition model에 따른 속도식(15)을 이용하여 Michaelis 상수 Km과 저해상수 Kis를 실험결과로부터 계산한 결과 각각 0.61 mM, 0.99 mM로 나타나 매우 낮은 인돌 농도에서도 기질에 의한 저해가 큼을 알 수 있었다.

인돌의 유가식 첨가

인돌의 효소활성 저해를 억제하기 위하여 초기 인돌 농도를 5 mM로 가하고 반응시 인돌 농도가 1 mM 이하로 떨어졌을 때 5 mM의 인돌을 첨가하는 유가식 조업을 하였으며, 초기 농도가 각각 9.5 mM 그리고 18.4 mM인 경우의 트립토판 합성과 비교하였다. Fig. 3에 그 결과를 도시하였듯이 인돌 농도가 낮은 경우에 초기 트립토판 합성속도가 높음을 알 수 있는데, 초기 인돌 농도를 5 mM로 한 경우에는 3시간 이내에 초기 인돌이 거의 모두 트립토판으로 전환되었는데 비하여 초기 인돌 농도가 18.4 mM인 경우에는 10시간 후에 불과 1 mM의 인돌이 트립토판으로 전환되었다. 한편 5 mM씩 첨가하는 유가식 조업에서도 생성된 트립토판

Table 1. Effect of solvent on enzymatic synthesis of tryptophan*

Solvent	Relative activity(%)**	log P _{oct} ***
Water miscible	DMSO	~0
	Methanol	~0
	Ethanol	~0
	Acetone	~0
Water immiscible	Ethyl acetate	~0
	Butanol	~0
	Chloroform	4.0
	Benzene	14.5
	Toluene	15.6
	Cyclohexane	65.5

*Reactions were carried out at 40°C and pH 8.0 for 24 hours in the presence of equal volume of organic solvent and buffer. **Enzyme activities are expressed as percentages of the activity measured in the absence of organic solvent. ***Data source: Leo *et al.* (16).

판 농도가 8 mM 이상일 때 합성속도가 현저히 감소하였는데, 이는 효소 반응이 평형에 도달하기 때문으로 추정된다. 약 20 mM의 인돌을 기질로 27시간 반응시켰을 때 유기식 반응에서는 80%의 수율을 그리고 회분식에서는 20%의 수율을 얻을 수 있었다. 따라서 유기식 조업 방식이 훨씬 더 효과적임을 알 수 있었다.

유기용매 이상계에서의 트립토판 합성

일반적으로 효소 반응시 유기용매를 사용할 때 발생하는 가장 큰 문제점은 사용되는 유기용매에 의한 효소활성 저해를 들 수 있다. 트립토판 합성에 적절한 유기용매를 선정하기 위하여 water miscible한 유기용매로 acetone, DMSO, ethanol, methanol을 사용하였고, water immiscible 유기용매로는 butanol, ethylacetate, chloroform, benzene, toluene, cyclohexane을 사용하였다. 수용액에서의 효소 반응에 비하여 유기용매를 사용하였을 경우에 대한 상대적인 트립토판 생성을 Table 1에 정리하였는데, 유기용매 특성과의 관계를 알아보기 위하여 log P_{oct}값을 함께 나타내었다. 유기용매의 hydrophobicity를 나타내는 log P_{oct}는 n-octanol/water 이상계에서의 분배계수의 대수값으로서 log P_{oct}값이 클수록 소수성이 높다(16).

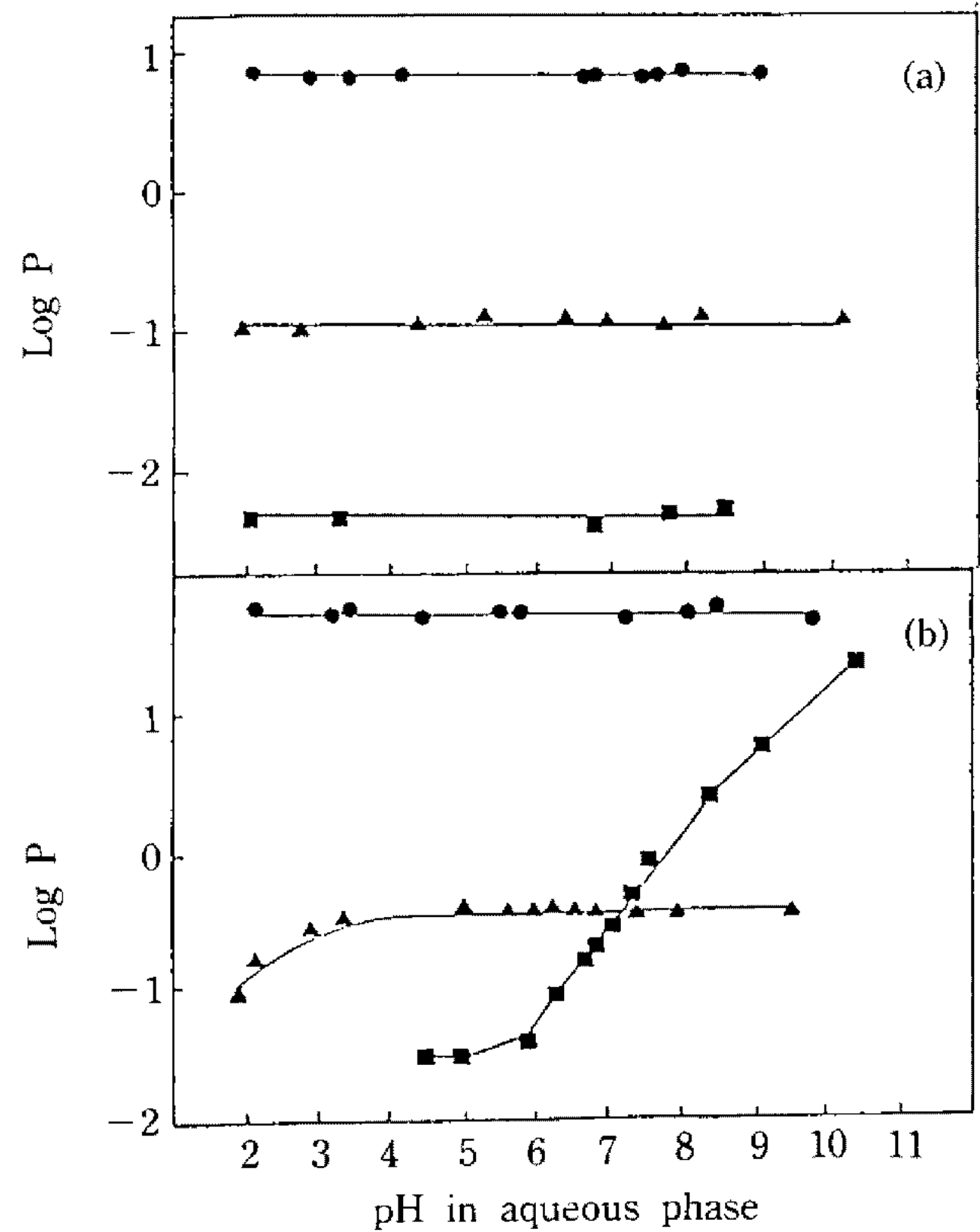


Fig. 4. Partitioning of substrates and product of cyclohexane/water system.

(a), Without surfactant; (b), With 7.5 mM of Aliquat 336 (●), Indole; (▲), Pyruvate; (■), Tryptophan.

Water miscible 용매에서는 트립토판 생성을 거의 감지할 수 없었는데 비하여 water immiscible 용매 중에서 hydrophobicity(log P_{oct})가 가장 높은 cyclohexane을 사용하였을 때 트립토판 합성에 비교적 적합하였으며, 일반적으로 log P_{oct}값이 클수록 효소 활성이 높음을 알 수 있었다.

유기용매 이상계에서 기질 및 산물의 분배는 반응 평형 및 기질의 활성저해 등을 좌우하는 바, 물-cyclohexane 이상계에서의 기질인 인돌, pyruvate 그리고 산물인 트립토판의 분배를 살펴보았다. Fig. 4a에 그 결과를 나타내었는데 인돌은 pH에 관계없이 분배계수의 대수값인 log P값이 0.8으로 대부분 cyclohexane 층에 존재하는 반면 pyruvate 및 트립토판은 pH에 따른 큰 변화없이 각각 log P값이 -0.9, -2.7으로 주로 수용액층에 분배되었다. 한편 트립토판 tryptophanase에 의하여 가역적으로 분해 또는 합성됨을 상기해 볼 때 트립토판이 유기용매 층에 존재하는 것이 반응평형에 유리함을 알 수 있다. 이러한 이유로 트립토판이 유기용매쪽에 보다 많이 분배되도록 하기

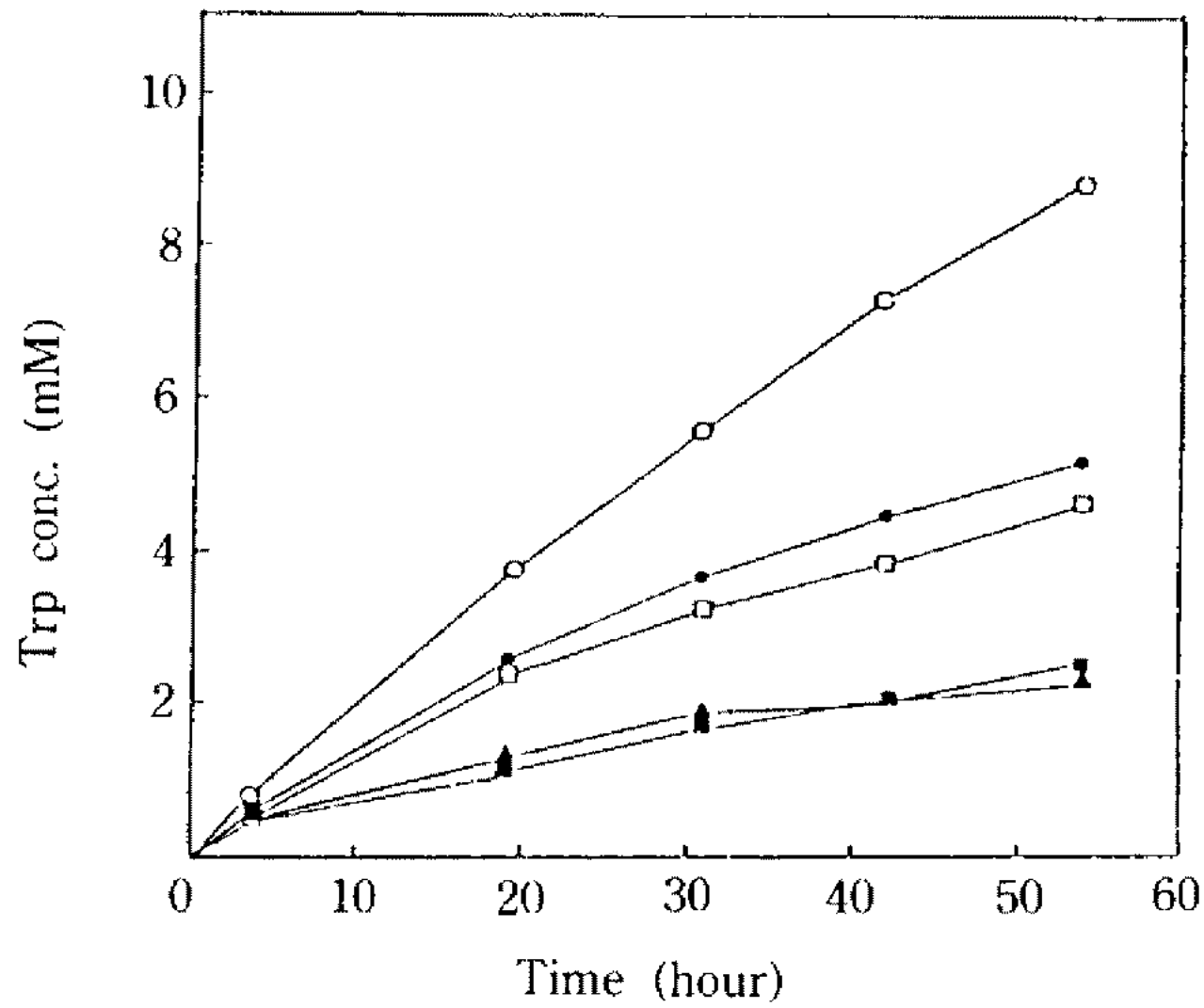


Fig. 5. Tryptophan production in two-phase system (volume ratio of cyclohexane to water is 1.0). (Temperature, 40°C; pH, 8.0; Enzyme loading, 2 mg/ml) (●), Aqueous phase, indole 20 mM; (▲), Organic two phase, indole 20 mM; (■), Organic two phase containing Aliquat 336, indole 20 mM; (○), Aqueous phase, indole 100 mM; (□), Organic two phase containing Aliquat 336, indole 100 mM.

위하여 유기용매 이상계에 계면활성제를 첨가한 후 각 기질 및 산물의 분배계수를 측정하였다. 사용한 계면활성제 Aliquat 336은 tertiary amine으로 수용액내서 양성을 띤다. Fig. 4b에 그 결과를 나타내었듯이 Aliquat 336을 첨가한 경우에는 첨가하지 않았을 때에 비하여 전체적으로 기질 및 산물이 유기용매 층에 많이 분배되었음을 알 수 있었다. 특히 Aliquat 336을 첨가하였을 때 트립토판의 분배는 pH가 증가함에 따라 분배계수가 현저히 증가하였는데 이는 염기성 용액에서 음전하를 갖는 트립토판이 양성의 Aliquat 336과 결합하여 ion-pair를 형성함으로써 결과적으로 cyclohexane으로의 분배가 용이함을 알 수 있었다.

위의 결과로부터 이상계에서 고농도의 인돌을 사용하더라도 활성저해를 억제하고 또한 합성된 트립토판이 유기용매상으로 분배되어 반응평형의 전이에 의한 합성수율을 증가시킬 수 있을 것으로 생각되어 고농도의 인돌(20 mM, 100 mM)을 사용하여 트립토판 합성을 관찰하였다. Fig. 5에 그 결과를 도시하였는데 예상과는 달리 유기용매 이상계에서 트립토판 합성은 수성계에서 보다 낮았으며 Aliquat 336을 첨가하였을 경우에도 트립토판 합성에 특별한 효과가

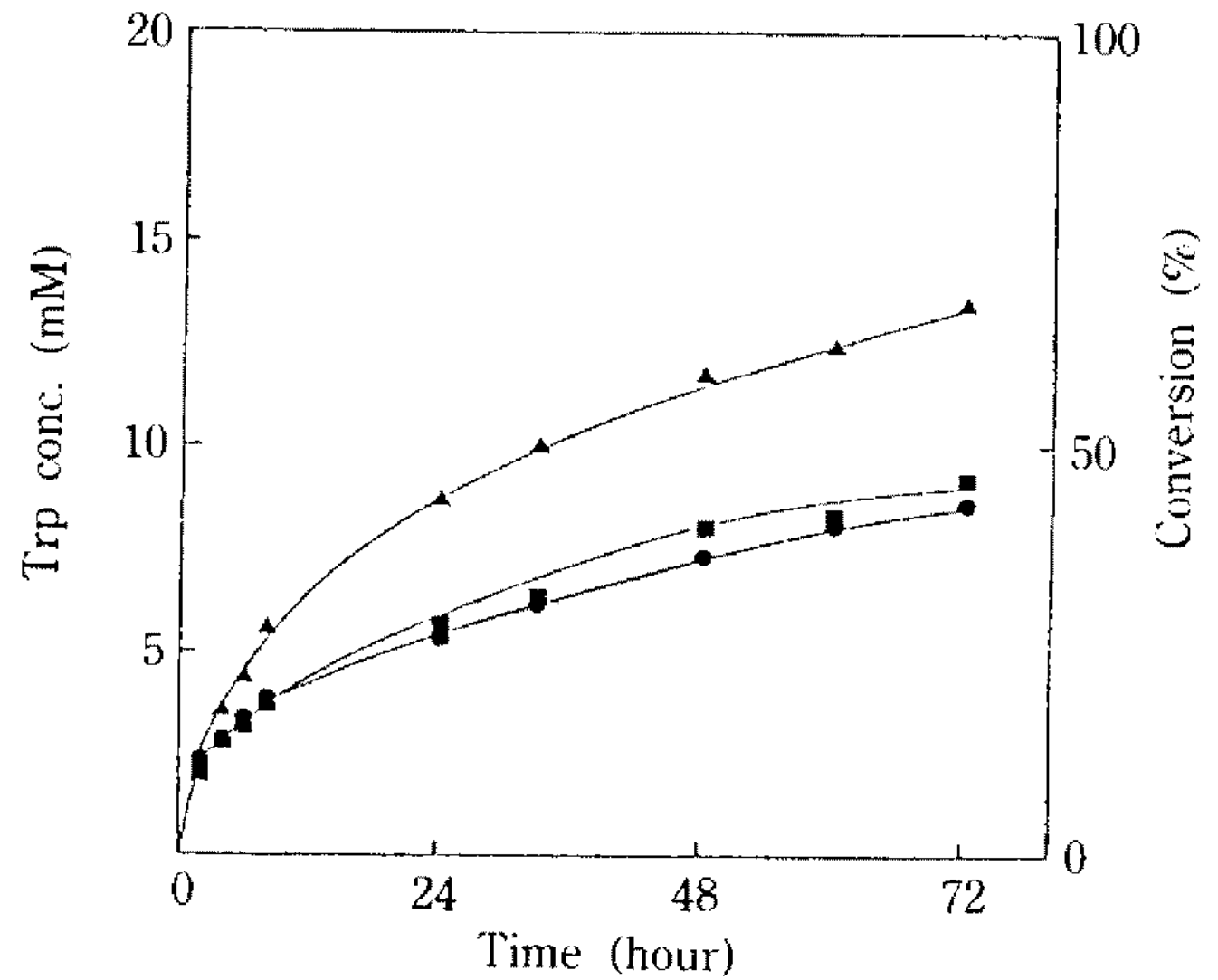


Fig. 6. Effect of cyclodextrin on tryptophan synthesis. (20 mM indole; 200 mM pyruvate; 200 mM NH₄Cl; Enzyme loading, 2 mg/ml; Temperature, 40°C; pH, 8.0) (●), Control; (■), 20 mM α-cyclodextrin; (▲), 20 mM β-cyclodextrin.

없음을 알 수 있었다. 그러나 유기용매 이상계를 사용함으로써 효소활성 저해의 방지, 반응평형의 전이 등 몇 가지 가능성을 시사하였는 바, 앞으로 유기용매 이상계를 사용할 때 수용액 층에 대한 유기용매 층의 부피비를 달리하거나 또는 제 3의 물질을 첨가하는 등 여러 가지 방법을 시도하여 효소를 사용한 트립토판 합성공정에 대하여 좀 더 연구할 필요가 있겠다.

Cyclodextrin의 효과

인돌의 효소활성 저해를 줄이고 결과적으로 트립토판 합성을 원활히 하기 위하여 트립토판 합성에 대한 cyclodextrin의 효과를 관찰하였다. 합성반응에서의 cyclodextrin 효과를 관찰하기 위하여 초기 인돌 농도가 각각 0.2 mM 그리고 2.0 mM로 하여 40°C에서 반응시켰다. 인돌 농도가 0.2 mM인 경우에는 cyclodextrin에 의한 영향이 거의 없었으나 인돌 농도가 2.0 mM인 경우에는 cyclodextrin을 넣지 않았을 때에 비하여 β-cyclodextrin을 첨가하였을 때 트립토판 합성속도는 월등히 향상되었다(data not shown). 즉, 인돌 농도가 아주 작을 때는 효소활성 저해가 문제 되지 않기 때문에 cyclodextrin의 효과가 없으나 인돌 농도가 높을 때는 cyclodextrin이 인돌의 담체로 사용되어 효소 활성 저해를 억제하고 그로 인해 트립토판 합성속도도 증가함을 알 수 있었다.

이러한 기초 실험결과를 토대로 인돌 농도가 20

mM로 비교적 높은 경우에 대해 α - 및 β -cyclodextrin의 영향을 살펴보았다. β -cyclodextrin을 20 mM로 첨가하였을 때 트립토판 합성은 control에 비하여 50% 이상 향상되었으나 α -cyclodextrin의 경우는 트립토판 합성에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 6).

요 약

Tryptophanase를 이용하여 트립토판 합성시 인돌의 효소활성 저해를 억제하기 위하여 유기상 조업, 유기용매 이상계의 사용, 그리고 cyclodextrin의 첨가 등에 대하여 연구하였다. 효소 농도가 0.5 mg/ml일 때 인돌 농도 0.4 mM 부근에서 트립토판 생성이 가장 빨랐으며 그 이상에서는 효소활성이 심한 저해를 받았다. 초기 인돌 농도가 20 mM일 때는 27시간 반응 후 인돌의 전환율이 20%인데 비하여 반응기내 인돌 농도를 5 mM 이하로 유기상 조업을 하였을 때 전환율이 80%로 향상되었다. 트립토판 합성에 적합한 유기용매로 cyclohexane을 선정하였다. Cyclohexane/water 이상계에서 인돌은 주로 유기용매 층에 분배되었으며 계면활성제 Aliquat 336을 첨가하였을 때 트립토판은 pH가 올라감에 따라 cyclohexane 층으로 보다 많이 분배되었다. 그러나 유기용매 이상계에서 트립토판 합성은 원활하지 않았는데, 인돌이 대부분 유기용매 층에 존재함으로 인하여 그 속도가 늦어지는 것으로 생각된다. 한편 수용액에서 cyclodextrin을 첨가하여 트립토판 생성을 관찰한 결과 α -cyclodextrin은 트립토판 합성에 큰 영향을 미치지 않은 반면 β -cyclodextrin을 첨가하였을 때는 트립토판 합성속도가 현저히 증가하였다.

참고문헌

1. Aiba, S., H. Tsunekawa and T. Imanaka. 1982. New approach to tryptophan production by *Escherichia coli*: Genetic manipulation of composite plasmids *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 289-297.
2. Hagino, H. and K. Nakayama. 1975. The biosynthetic control in aromatic amino acid producing mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 351-361.
3. Shio, I., S. Sugimoto and K. Kawamura. 1982. Production of L-tryptophan by azaserine resistant mutants of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1849-1854.
4. Lee, I.Y., J.-H. Kim, M.-Y. Kwak, H. Lee and S.B. Lee. 1988. Production of L-tryptophan by auxotrophs derived from analogue-resistant mutants of *E. coli*. *Kor. J. Appl. Microb. Bioeng.* **16**: 407-412.
5. Newton, W., Y. Morino and E.E. Snell. 1965. Properties of crystalline tryptophanase. *J. Biol. Chem.* **240**: 1211-1218.
6. Yoshida, H., H. Kunagai and H. Yamada. 1974. Catalytic properties of tryptophanase from *Proteus rettgeri*. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 463-464.
7. Bang, W.-G., U. Behrendt, S. Lang and F. Wagner. 1983. Continuous production of L-tryptophan from indole and L-serine by immobilized *E. coli* cells. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 1013-1025.
8. Watanabe, T. and E.E. Snell. 1972. Reversibility of the tryptophanase reaction: synthesis of tryptophan from indole, pyruvate and ammonia. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**: 1086-1090.
9. Morihara, K. 1987. Using proteases in peptide synthesis. *Trends in Biotechnol.* **5**: 164-170.
10. Antonini, E., G. Carrea and P. Cremonesi. 1981. Enzyme catalyzed reactions in water-organic solvent two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 291-296.
11. Kuhl, P., A. Konnecke, G. Doring, H. Daumer and H.D. Jakubke. 1980. Enzyme-catalyzed peptide synthesis in biphasic aqueous-organic system. *Tetrahedron Lett.* **21**: 893-896.
12. Brink, E.S. and J. Tramper. 1985. Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 1258-1269.
13. 이인영, 안경섭, 이선복. 1992. 유기용매 이상계에서의 thermolysin에 의한 아스파탐 전구체 생산. 산업미생물학회지 **20**: 61-67.
14. Ezure, Y., S. Maruo, M. Kojima, H. Yamashita and M. Sugiyama. 1988. Effect of α -cyclodextrin on thermstability of glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1073-1074.
15. Laidler, K.J. and P.S. Bunting. 1973. *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*. pp. 84-89. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
16. Leo, A., C. Hansch and D. Elkins. 1971. Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* **71**: 525-616.

(Received December 26, 1991)