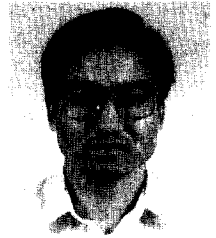


D-p-Hydroxyphenylglycine의 합성 및 생산



한국과학기술원 생물공학과 김 학 성

1. 서 론

아미노산은 식품이나 사료의 첨가물로, 의약품으로 그리고 화학합성에 있어서의 단위 구조체(building block)로써 널리 이용되어 왔는데, 위에서 광학적으로 순수한 single enantiomer로서 D- 혹은 L-form의 α -아미노산은 의약품의 합성에 있어서 그 산업적 중요성이 날로 증대되고 있다. 이중 D-form의 아미노산은 β -lactam계 항생제, peptide hormone, 살충제 등의 합성에서 중간 물질로 사용되고 있는데, 특히 D-p-hydroxyphenylglycine(이하 D-HPG)의 경우 amoxicillin, cefadroxil, cefatrizine, cefapazole, cefaperazone 등의 penicillin이나 cephalosporin계의 반합성항생제의 전구체로서 전 세계적으로 널리 사용되고 있다.

2. D-HPG의 생산기술

산업적으로 D-HPG는, 유기화학적으로 혼합이성질체 형태인 DL-HPG를 합성한 후 입체특이적 결정화 등의 방법으로 분리(resolution)하여 제조하는 공정이 개발되어 현재 몇개의 회사에서는 아직도 화학적으로 생산하고 있다. 한편, 1980년대에 들어, 일본 Kyoto 대학의 Yamada 등이 미생물 D-hydantoinase (E.C.3.5.2.2. Dihydropyrimidinase)를 이용하여 기질인 D,L-5-monosubstituted hydantoin을 입체특이적으로 가수분해시켜 N-carbamoyl-D-amino acid로 전환한 다음 여기에 아질산을 처리

하여 D-HPG를 비롯한 여러가지 D-form의 아미노산을 생산하는 생물학적 공정을 개발하였다. (Fig. 1). 이 효소-화학적 방법은 기술적으로나 비용면에 있어서 기존 방법의 단점을 극복하여, 1983년 일본의 Kanegafuchi 사에 의해 산업화 되었으며, 현재는 세계의 여러 회사에서 같은 방법으로 D-HPG를 생산하고 있다.

위에 언급된 효소화학적인 공정을 개괄적으로 설명하면 다음과 같다. 먼저 기질로 이용되는 DL-5-p-hydroxyphenyl hydantoin은 Bucherer-Berg와 Ohashi 방법에 의해 합성되는데 전자는 p-hydroxybenzal dehyde, KCN과 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 로부터 약 65~70% 정도의 수율로 얻어지며 반응온도에 따라 ortho 이성체의 함량이 변하게 된다. 현재는 p-hydroxybenzaldehyde의 생산이 중단되었기 때문에 사용되지 않고 있다.

후자는 urea, phenol, 그리고 glyoxylic acid로부터 condensation에 의해 합성되는데 반응조건이 온화하고 수율이 높은 장점이 있으나 glyoxylic acid의 가격이 비싸서 전체공정의 비용에서 차지하는 비중이 크다. 기질이 합성되면 D-hydantoinase를 이용하여 asymmetric하게 D형태의 HPH만을 가수분해시켜서 N-carbamoyl-D-p-hydroxyphenylglycine을 얻게되는데 이때 L형태의 HPH는 알카리 조건에서 D형태로 바뀌게 되므로 이론상 100%의 전환수율을 얻을 수 있다.

DL-5-p-Hydroxyphenylhydantoin을 가수분해하여 N-carbamoyl-D-p-hydroxyphenylglycine으로 전환시

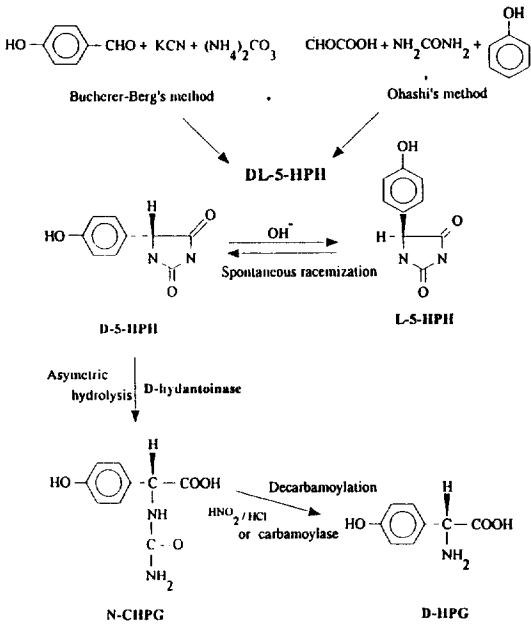


Fig. 1. Synthetic scheme of D-HPG.

키는 D-hydantoinase는 주로 *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Actinomycetes* 등의 많은 미생물에 분포하는 것으로 알려져 있다. 이 효소는 E.C. 3.5.2.2. group에 속하며 미생물내에서 pyrimidine nucleotide의 분해반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 이 효소는 각 hydantoin 유도체들에 대한 기질 특이성이 약하여 D,L-5-(p-hydroxyphenyl)hydantoin을 비롯한 다양한 5-substituted hydantoin을 가수분해할 수 있으나, 5-치환기가 전하를 가진 것들에는 활성이 떨어진다.

이 효소는 pH 8~10에서 높은 활성을 보이고, Fe²⁺, Co²⁺ 등 금속이온을 필요로 하는 경우도 있으며, 활성 부위에 -SH기를 가진 것으로 알려져 있다. 산물에 의한 저해는 미미하다.

마지막 단계는, 생성된 N-CHPG를 최종산물인 D-HPG로 전환하는 것인데 산성조건하에서 같은 몰수의 HNO₃로 처리하거나, N-carbamoylase라는 효소를 이용할 수 있다. 현재는 화학적인 방법이 산업적으로 이용되고 있는데 이때 발생하는 폐수의 처리와 공정상의 복잡성 때문에 효소적인 방법으로 대체하고자 하는 연구가 계속되고 있다. 대부분의 N-carbamoylase는 D-hydantoinase와 동시에 하나의

같은 미생물내에 존재하기 때문에 연속적으로 두 반응이 진행되어 여러가지 장점을 갖는다. 현재까지 N-carbamoylase는 *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* 등에서 발견되었는데 D-hydantoinase에 비하여 역가가 낮고 열안정성이 낮아서 산업적으로 활용되지는 않고 있다.

효소공정에서 가장 중요한 요소는 효소의 조업안정성인데 대부분 조업안정성을 증대시키고 공정의 단순화를 위하여 고정화 효소를 사용하게 된다. 효소의 고정화는 전술한대로 미생물균체를 직접 이용할 수 있고, 효소를 부분 정제한 후 고정화시킬 수 있다. 전자의 경우 고정화 방법이 쉽고 간단한 반면 후자는 고정화 방법에 따라 수율이 많이 변할 수 있다. 효소를 고정화 시키는 경우 주로 흡착 혹은 공유결합 방법이 많이 사용되는데 흡착은 방법이 단순하고 수율이 높은 반면 사용중 효소가 떨어져 나가는 문제점이 있으며 공유결합을 시키는 경우 방법이 다소 복잡하고 수율이 낮은 반면 효소는 단단하게 붙어 있어서 조업중 떨어져 나가는 것을 극대화 할 수 있다. 효소반응의 종류 및 효소의 특성, 그리고 효소반응기 형태에 따라 적당한 방법을 선택하여야 한다. 최근에는 유전공학기술을 이용하여 효소의 대량생산이 가능해 짐에 따라 흡착이나 공유결합 방법을 사용하는 경우가 많아지고 있다.

위의 효소반응공정에서 가장 문제시 되는 것 중의 하나도 기질인 DL-5-HPH의 낮은 용해도와 phenyl기의 산화에 의한 기질의 변성이다. 기질의 낮은 용해도는 효소반응속도를 크게 저하시킬 뿐만 아니라 효소반응기 및 조업방식을 결정짓는데 중요한 요소로 작용하고 있다. 기질의 용해도를 증가시키기 위해 유기용매를 첨가하는 경우도 보고되어 있으나 효소의 불활성화에 미치는 영향이 큰 것으로 알려져 있다. 기질의 변성을 막기위해 질소와 같은 inert gas로 flushing 시키면서 반응시키는 방법이 이용될 수 있다.

마지막으로 산물의 회수는 결정화 방법을 통하여 이루어지는데 용액의 pH를 낮추고온도를 낮추게 되면 결정으로 석출되게 된다.

3. 기술의 발전전망 및 개발동향

D-HPG는 주로 amoxycillin, cefadroxil, cefatri-

zine 등의 반합성 항생제 원료로 많이 이용되고 있으며, 앞으로 aspoxicillin, cefbuperazone, cefpyramide 등이 발매될 것으로 기대되기 때문에 수요는 점차 증가할 것으로 기대된다. Kaneka Singapore, 일본화약, 스페인 peretil, 이태리 레고르디티, 홀란드의 안데노를 비롯한 몇개의 회사에서 생산하고 있는데 앞으로 독일의 Degussa 회사도 참여할 것으로 생각된다.

현재 D-HPG의 생산공정은 위에서 언급한대로 D-hydantoinase 효소만을 이용하고 있지만 환경오염 문제와 가격 경쟁력 때문에 N-carbamoylase를 도입하여 기질인 DL-5-HPH로부터 one step으로 직접 D-HPG를 생산하려는 연구가 수행되고 있다. 먼저 D-hydantoinase와 N-carbamoylase를 동시에 함유하고 있는 미생물의 screening에 많은 연구가 진행되어 *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* 등이 분리되었으며 이를 이용한 D-HPG의 생산연구가 진행되고 있다. 현재로는 D-hydantoinase에 비하여 N-carbamoylase의 역가가 낮고 열안정성이 낮고 또한 최적조건이 서로 달라서 산업적으로 이용되기까지는 좀더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. D-Hydantoinase의 최적 pH는 약 8.5~9.0 인 반면 N-carbamoylase는 pH 6.5~7.0 근처에서 최대 반응속도를 나타내기 때문에 공정을 설계하는데 중요한 요소로 되어있다.

지금까지 기질인 DL-5-HPH 중반응이 되지않은 L-5-HPH는 알칼리 조건에서 매우 빠르게 D-5-HPH로 racemization되는 것으로 알려져 왔는데 D-hydantoinase의 역가가 높아짐에 따라서 racemization 단계가 전체 효소반응의 율속 단계인 것으로 증명되어 이의 해결을 위한 연구가 진행되고 있다. 즉, racemization에 관계하는 racemase 효소를 분리하고 유전공학 기술을 이용하여 효소의 활성을 높이는 연구가 수행되고 있다. 이 경우 반응에 참가하는 효소는 racemase, D-hydantoinase, N-carbamoylase 세가지로 각 효소의 반응속도가 전체 반응속도에 미치는 영향을 고려하여 전체공정을 최적화 하는것이 필요하며 이미 독일 등에서는 세 효소를 모두 포함하고 있는 미생물을 분리하여 pilot-plant 수준에서 연구를 수행하고 있다.

국내의 경우 D-HPG의 수입단가는 kg당 \$23 정

도인 것으로 추정되며 1992년 수입량은 약 180톤에 수입액이 440만불에 이르렀으며 1993년도에는 800만불 수준으로 크게 증가한 것으로 알려졌는데 앞으로도 계속 증가추세를 나타낼 것으로 판단된다. 이에따라 몇개의 회사와 대학에서 이에대한 연구를 수행중에 있다. 국내기업의 경우 D-hydantoinase 활성을 갖는 미생물을 토양으로부터 분리하여 DL-5-HPH로부터 D-HPG를 생산하는 연구와 D-hydantoinase gene을 cloning하여 대량생산한 후 담체에 고정화하여 DL-5-HPH로부터 D-HPG의 생산에 관한 연구를 수행중인 것으로 알려져 있다. 한편, 대학의 경우 토양으로부터 높은 D-hydantoinase 활성을 갖는 *Pseudomonas*를 분리하여 이를 이용 DL-5-HPH로부터 D-HPG를 생산하는 연구를 수행하였는데 효소를 재사용하고 안정성을 증대시키기 위해 고정화를 하였으며 이때 효소의 활성이 한달 이상 안정하게 유지된 것으로 보고되었다. 기질인 DL-5-HPH의 용해도를 증대시키기 위해 water-miscible한 유기용매를 조사하였는데 DMSO의 경우 10% 이하에서는 효소의 활성에 별로 영향이 없었다. 그러나 장시간 조업시 효소의 안정성에 미치는 영향이 심각한 것으로 보고되었다.

국내의 기술수준은 현재 선진외국에 비해 많이 뒤떨어진 것으로 판단되는데 특히 미생물의 screening에 대한 연구는 실험실 수준을 벗어나지 못하였고 산업적 응용 가능성이 높은 미생물을 분리할 수 있도록 체계적이고 지속적인 연구가 부족한 것으로 생각된다. 한편 효소의 고정화 기술은 산업화 수준까지 이른 효소공정이 없고 대부분 실험실 수준의 결과이기 때문에 large scale에서의 고정화 기술 수준은 매우 낮은 실정이다. 효소반응기의 설계 및 운영기술은 대부분 외국으로 수입된 기술에 의존하고 있으므로 국내에서 자체적으로 개발된 기술은 매우 극소수에 불과한 형편이다. 결론적으로 D-HPG 생산을 위한 전체공정의 경제성을 분석해 볼 때 D-HPG의 생산원가 중기질인 DL-5-HPH가 차지하는 비중이 약 35% 정도인 것으로 계산되고 있기 때문에 외국과의 국제경쟁력을 극복하기 위해서는 효소를 이용한 생물학적 전환단계의 효율성이 강하게 요구된다.

4. 결 언

축매로서의 효소반응은 유기화학반응과 달리 상온, 상압의 온화한 반응조건과 함께 높은 기질특이성, 특히 입체특이성이 높은 장점이 있다. 그리하여, 기존에 유기합성법으로 제조되던 많은 정밀화학 제품들을 생물축매를 이용한 생물공정으로 대체하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다. 최근에는 의약품 분야에 있어서 racemates 대신에 single enantiomer 형태의 chiral drug 생산에 많은 연구가 집중되고 있다. 반합성 항생제의 전구물질로 이용되고 있는 D-HPG의 경우도 chiral resolution 기술을 응용한 예로 생각할 수 있기 때문에 D-HPG의 생산에 적용된 요소기술을 발전시킬 경우 새로운 정밀화학 제품의 생물학적 생산 뿐만 아니라 chiral drug의 생산기술 및 전반적인 생물전환 기술 발전에 기여하는 바가 클 것이다.

참고문헌

- Kim, D. -M. and Kim, H. -S. (1993) Enzymatic synthesis of D-p-hydroxyphenylglycine from DL-p-hydroxyphenylhydantoin in the presence of organic solvent. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 530-534.
- Kristijansson, J. K. and Stetter, K. O. (1992) Thermophilic bacteria. In: Kristijansson JK (eds) Thermophilic bacteria. CRC Press, Inc., Boca Raton Ann Arbor London, p1.
- Runser S, Chinski N, Ohleyer E (1990) D-p-Hydroxyphenylglycine production from DL-5-p-hydroxyphenylhydantoin by *Agrobacterium* sp. *Appl Microb. Biotechnol.* **33**: 382-388.
- Syldatk, C., Cotoras, D., Dombach, G., Grob, C., Kallwab, H., Wagner, F. (1987) Substrate and stereospecificity, induction and metallo-dependence of a microbial hydantoinase. *Biotechnol letters* **9**: 25-30.
- Syldatk, C., Cotoras, D., Dombach, G., Grob, C., Kallwab, H. and Wagner, F. (1987) Substrate and stereospecificity, induction and metallo-dependence of a microbial hydantoinase. *Biotechnol letters* **9**: 25-30.
- Syldatk, C., Laufer, A., Muller, R., Hoke, H. (1990) Production of optically pure D- and L- α -amino acids by bioconversion of D,L-5-monosubstituted hydantoin derivatives. In: Fiechter A (des) Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol 41. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p 29.
- Takahashi, S., Ohashi, T., Kii, Y., Kumagai, H. and Yamada, H. (1979) Microbial transformation of hydantoins to N-carbamyl-D-amino acids. *J. Ferment Technol* **57**: 328-332.
- Yamada, H., Takahashi, S., Kii, Y. and Kumagai, H. (1978) Distribution of hydantoin hydrolyzing activity in microorganisms. *J. Ferment Technol* **56**: 484-491.
- Yokozeiki, K., Nakamori, S., Yamanaka, S., Eguchi, C., Mitsugi, K. and Yoshinaga, F. (1987) Optimal conditions for the enzymatic production of D-amino acids from the corresponding 5-substituted hydantoins. *Agri Biol Chem* **51**: 715-719.
- Bioindustry (1985) **2**, No. 10, 832-835.
- 국제공개특허 92-703834.