

3,4-Dihydroxyphenyl-L-alanine의 효소적 생산에 대한 반응첨가물의 영향

이승구 · 노현수 · 홍승표 · 성문희*
생명공학연구소 응용미생물연구부

Effects of Reaction Additives on Enzymatic Synthesis of 3,4-Dihydroxyphenyl-L-alanine. Seung-Goo Lee, Hyeon-Su Ro, Seung-Pyo Hong, and Moon-Hee Sung*. *Microbial Conversion Research Unit, Applied Microbiology Research Division, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea* — The enzymatic synthesis of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) was examined for the effects of the reaction additives such as sodium borate, alcohol, and organic solvents. The enzyme used was tyrosine phenol-lyase of *Citrobacter freundii* KCTC 2006 produced in *Escherichia coli*. The amounts of tyrosine phenol-lyase and pyridoxal-5-phosphate were optimized to 2.0 units/ml and 0.1 mM, respectively, for the synthetic reaction. Sodium borate, a substance that forms a complex with pyrocatechol, reduced the enzyme deactivation by pyrocatechol although it seriously inhibited the enzyme activity. Among the organic solvents tested, dimethylsulfoxide, dimethylformamide, and alcohol increased the productivity of the L-DOPA synthesis. In a reaction system with 5% methanol, L-DOPA concentration increased up to 210 mM after 24 hours, and 77.1% of which was separated as precipitates. The L-DOPA was purified to 99.96% by solubilizing and recrystallizing the precipitates.

노인성 치매의 일종인 파킨슨병에 대하여 치료효과가 있는 의약품 아미노산인 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA)은 주로 화학합성방법에 의하여 생산되어 왔으나, 최근에는 미생물효소 tyrosine phenol-lyase(E.C. 4.1.99.2)를 이용하여 효소적 방법으로 생산하기 위한 연구가 집중적으로 수행되고 있다(1-4). 효소적 방법에 의한 L-DOPA의 생산방법은 pyrocatechol과 과량의 pyruvate 및 ammonia를 포함한 반응액에 tyrosine phenol-lyase를 작용시켜서 α,β -elimination reaction의 역반응이 일어나도록 함으로써 수행된다.

효소적 L-DOPA 생산은 생물전환(bioconversion)을 이용한 유용물질생산의 잘 알려진 예이지만, 이 반응은, 반응계의 불안정성으로 인한 많은 문제점들을 내포하고 있는 것으로 보고되고 있다(2-4). 지금까지 알려진 문제점들을 요약하면 다음과 같다. 첫째, 효소반응의 기질인 pyrocatechol과 산물인 L-DOPA가 공기에 의하여 쉽게 산화되는 특성이 있고, pyruvate도 반응액 중에서 매우 불안정하다. 둘째, pyrocatechol이 강력한 단백질 변성제로 작용하여 반응액 중에서 효소의 불활성화를 유발한다. 셋째, 반응산물인 L-DOPA와 과량으로 사용된 pyruvate가 비효소적으로 결합하여 L-DOPA 합성 반응을 저해하는 부산물을 생성한다.

이러한 문제점들을 해결하기 위한 방편으로는 pyrocatechol과 pyruvate의 농도를 낮게 조절하여 효소의

불활성화 및 부산물의 생성을 줄이는 방법, pyrocatechol과 안정한 복합체를 형성하는 성질이 있어서 pyrocatechol에 의한 단백질 변성을 줄일 수 있는 sodium borate를 반응액에 첨가하는 방법, sodium sulfite를 첨가하고 질소가스환경에서 반응시켜서 반응물질의 산화를 막는 방법, EDTA 등의 metal chelator를 반응액에 가하는 방법, 부산물의 생성을 줄이기 위하여 pH 및 온도를 낮추어서 L-DOPA 합성반응을 수행하는 방법 등이 보고되었다(1, 5, 6). 그러나, 상기의 조건에서, 담체에 고정화한 미생물세포를 이용하여 L-DOPA 합성을 수행한 경우에서도, 여전히 효소불활성화가 관찰되었으며, 10여 시간 이내에 반응생산성이 급격히 감소하였다(3, 4). 따라서, 효소적 L-DOPA 합성반응을 안정적으로 수행하기 위해서는 효소 안정성의 개선을 통한 생산성의 증대를 위한 지속적인 연구가 필요하다고 판단된다.

따라서, 본 연구에서는 L-DOPA 합성반응의 안정성과 생산성에 대한 새로운 반응첨가물, 특히 알콜 및 유기용매의 첨가에 따른 영향을 비교연구하였다. 또한, 효소 및 pyridoxal-5-phosphate 농도에 따른 영향과 sodium borate가 반응에 미치는 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

재료

L-DOPA 합성반응에 기질로 사용된 pyrocatechol은 Wako Chemicals(Japan), sodium pyruvate는 Musa-

*Corresponding author.

Key words: L-DOPA, tyrosine phenol-lyase, pyridoxal-5-phosphate, sodium borate, organic solvent

shino Chemical Lab(Japan)로부터 구입하였다. Sodium borate, pyridoxal-5-phosphate(PLP) 등은 Sigma(MO, USA) 제품이었고, ethanol 및 methanol은 Merck(Germany)에서 구입하였다. HPLC 분석을 위한 solvent는 Merck(Germany) 또는 Burdick & Jackson(MI, USA) 제품을 사용하였다.

사용균주와 및 tyrosine phenol-lyase 조효소액의 제조방법

Citrobacter freundii KCTC 2006 유래의 tyrosine phenol-lyase gene을 expression vector pTrc99A(Pharmacia, Sweden)에 결합시켜서 제조한 재조합 plasmid pHR1001을 *E. coli* JM105에 도입하여 tyrosine phenol-lyase를 생산하기 위한 미생물균주로 사용하였으며, 조효소액의 제조방법은 이 등(7)이 이미 보고한 방법과 같다. 조효소액의 단백질 농도는 9.4 mg/ml였으며, 비활성은 L-DOPA 합성 활성으로 약 1.0 unit/mg protein이었다.

효소활성정량

효소활성은 0.65M ammonium acetate(pH 8.5), 50 mM pyrocatechol, 50 mM pyruvate, 0.1 mM PLP, 0.1% sodium sulfite를 포함한 반응액 1.0 ml에 조효소액 50 μ l를 가하고, 18°C에서 30분간 정지 반응시킨 뒤, 반응액 100 μ l에 2N HCl 100 μ l를 가하여 반응을 중지시키고, 생성된 L-DOPA의 양을 HPLC를 사용하여 분석 함으로써 결정되었다. 본 연구에서 효소활성 1 unit은 1분 동안에 1 μ mole의 L-DOPA를 생성하는 효소의 양으로 정의되었다.

L-DOPA 생산 반응기 및 반응조건

효소적 방법에 의한 L-DOPA의 생산을 위하여 0.65M ammonium acetate(pH 8.5), 50 mM sodium pyruvate, 25 mM pyrocatechol, 0.1 mM PLP, 0.1% sodium sulfite, 5% methanol과 tyrosine phenol-lyase 조효소액을 1.9 unit/ml 농도가 되도록 가한 반응액을 제조하였다. 이 반응액을 고무마개로 gas-tight 하게 밀봉하고 질소가스로 충분히 flushing 한 후, 온도를 18°C로 조절된 water bath에 넣고, magnetic stirrer로 반응액을 서서히 교반하면서 L-DOPA 합성반응을 수행하였다. 상기의 효소반응을 통하여 L-DOPA를 고농도로 생산하기 위하여, 2.0M 농도의 pyrocatechol 및 sodium pyruvate 용액을 제조하여 두 기질을 동일한 량씩 간헐적으로 반응액에 첨가하여 기질을 공급하였다. 이 때, 반응액을 1시간 간격으로 sampling 하여 HPLC로 분석함으로써, 반응액 중의 pyrocatechol과 pyruvate가 고갈되거나 50 mM을 넘지 않도록 주의하였다.

분석

반응액 중의 pyrocatechol 및 L-DOPA의 양은 HPLC (영인과학, 한국)를 이용하여 분석하였다. Column은 μ ondapak C18(Waters, MA)를 사용하였고, eluent는 methanol과 acetic acid를 각각 5%와 2% 농도로 가한 0.1M sodium dihydrogen phosphate 용액을 사용하였다. Flow rate는 1 ml/min이었고, pyrocatechol 및 L-DOPA는 UV 280 nm에서 detection 되었다.

결과 및 고찰

L-DOPA 합성에 미치는 효소농도의 영향

효소농도가 반응기의 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 효소첨가량을 달리하면서 30분 동안 L-DOPA 합성반응을 수행한 후에 생성된 L-DOPA 농도를 분석하였다(Fig. 1). 그 결과, 반응액 중의 효소농도가 2 units/ml를 넘는 경우에는 반응산물인 L-DOPA의 농도가 거의 증가하지 않아서, 반응액 중의 효소농도를 2 units/ml 이하로 하는 것이 적합한 것으로 판단되었다.

Pyridoxal-5-phosphate 농도의 영향

Tyrosine phenol-lyase의 cofactor인 pyridoxal-5-phosphate(PLP)는 효소에 대한 친화도가 매우 강해서 수 μ M의 정도의 매우 낮은 농도에서도 L-tyrosine을 페놀, pyruvate, ammonia로 분해하는 α,β -elimination 반응에는 충분한 것으로 알려져 있다(8). 그러나, 그 역반응인 L-DOPA 합성반응의 경우에는, 반응액 중의 PLP 농도를 변화시키면서 조사한 결과, Fig. 2에 나타난 바와같이 100 μ M 이상의 PLP 농도에서도 계속하여 반응성이 증가하였다. 이것은 L-DOPA 합성반응이 α,β -elimination 반응과는 달리 상대적으로 높은 PLP 농도를 필요로 하는 반응임을 보여주고 있다.

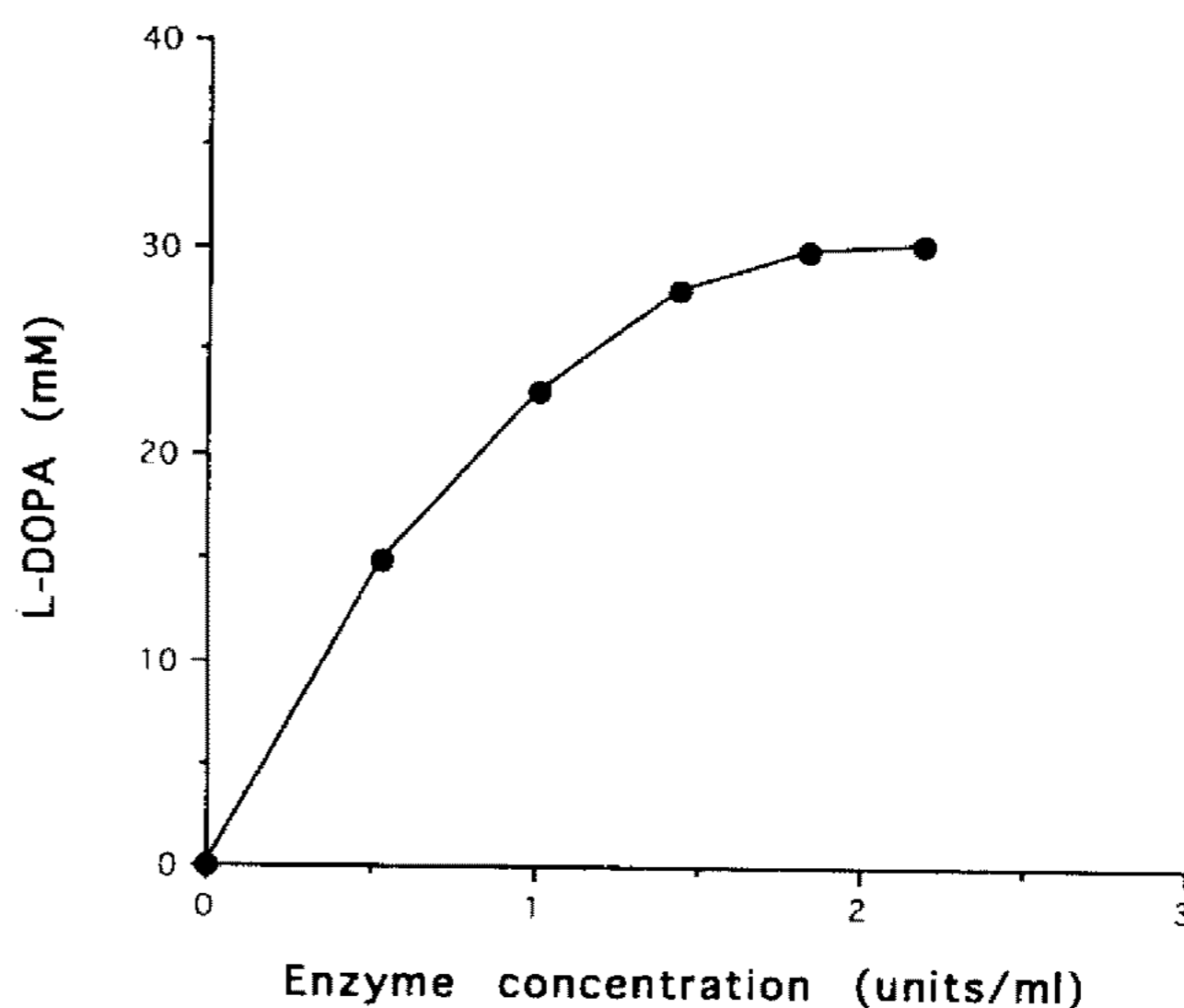


Fig. 1. Effect of enzyme concentration on the L-DOPA synthetic activity.

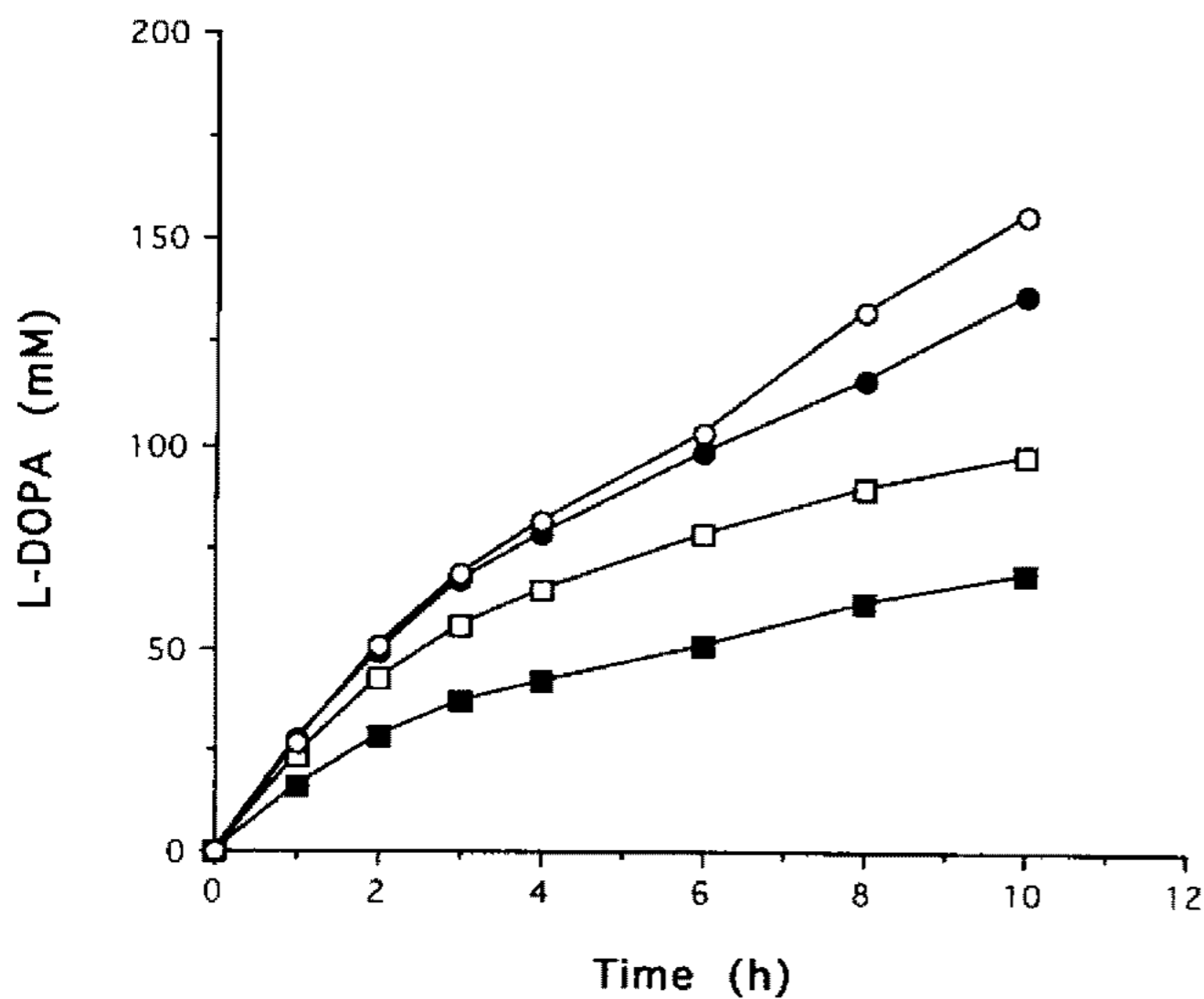


Fig. 2. Effect of pyridoxal-5-phosphate on the production of L-DOPA.

The reaction mixtures contained 5% (v/v) methanol and different concentrations of pyridoxal-5-phosphate; ■, 10 μ M; □, 60 μ M; ●, 110 μ M; ○, 210 μ M.

이와같이 L-DOPA 합성반응과 L-tyrosine 분해반응에 필요한 PLP의 양이 다른 것은 반응액 중에 포함된 고농도의 ammonium acetate와 sodium pyruvate 등이 효소와 PLP의 결합에 영향을 미치기 때문이거나, L-DOPA 합성반응에 사용되는 반응조건에서 PLP가 불안정하기 때문인 것으로 추정된다. Demidkina 등(9)은 tyrosine phenol-lyase가 L-아미노산의 아미노기를 PLP에 전이하여 pyridoxamine-5-phosphate(PMP)를 생성하는 아미노기전이반응을 부수적으로 수행하기 때문에 반응액 중의 PLP가 점차 감소하게 되는 반응기작에 관하여 보고한 바 있다.

Sodium borate의 영향

Borate는 구조적으로 동일 평면에 존재하는 cis-diol 구조를 가진 물질들, 예를 들면 sugar, pyrocatechol 등과 안정한 복합체를 형성하는 특징이 있다(10). Enei 등은 pyrocatechol과 sodium borate를 같은 mole 비로 혼합한 후 L-DOPA 합성반응을 위한 기질로 사용함으로써 pyrocatechol에 의한 효소불활성을 줄일 수 있었고, 이 혼합기질이 200 mM 이상의 고농도로 존재하는 조건에서도 효소반응이 잘 진행된다고 보고하였다(1). 그러나, sodium borate는 강력한 환원제이기 때문에 PLP의 schiff base 형성을 억제하여, tyrosine phenol-lyase의 효소반응을 저해하는 성질이 있다(8).

본 연구에서 pyrocatechol과 sodium borate의 혼합 비율을 달리하면서 조사한 결과, pyrocatechol과 sodium borate의 mole 비가 2 : 1인 경우에는 효소활성이 거의 유지되었으나, 두 물질이 같은 농도로 가해진 조건에서는 효소활성이 크게 감소하는 것으로 밝혀졌다. 이

Table 1. Effect of sodium borate on the production of L-DOPA by tyrosine phenol-lyase

Catechol : Sodium borate (mM : mM)	L-DOPA Concentration (mM)	
	after 30 min	after 12 h
50 : 0	17.1	43.4
50 : 25	15.9	—
25 : 25	6.9	—
50 : 50	6.3	40.4
100 : 100	5.0	43.4
150 : 150	4.1	42.4
200 : 200	3.6	42.0

러한 효소활성의 감소는 동일한 농도로 혼합된 두 물질의 농도가 높을수록 더욱 심하여 200 mM에서는 sodium borate를 가하지 않은 조건에서의 활성의 약 21%만이 잔여하였다(Table 1). Sodium borate를 가한 상기의 반응액의 L-DOPA 합성반응을 12시간 동안 지속한 후에는 Table 1에 나타낸 바와같이 200 mM 농도의 pyrocatechol을 포함한 용액의 경우에도 40 mM 이상의 L-DOPA가 생성되었다. 그러나 sodium borate를 첨가하지 않고 200 mM pyrocatechol을 기질로 가한 반응액에서는 효소가 즉시 변성되어서 효소활성이 전혀 나타나지 않았다.

이상의 결과로, sodium borate는 효소반응을 저해하지만 pyrocatechol에 의한 효소의 불활성화를 줄이는 효과가 있어서 높은 pyrocatechol 농도에서도 반응이 지속되게 하는 효과가 있는 것을 규명하였다. 현재까지 보고된 바로는 고농도의 pyrocatechol 존재하에서 효소 불활성화를 피하여 L-DOPA 합성반응을 수행하는 방법은 sodium borate를 이용하는 것 뿐이다.

한편, 200 mM pyrocatechol-sodium borate, 200 mM sodium pyruvate 및 0.65M ammonium acetate를 포함한 반응액에, *Citrobacter freundii* KCTC 2006 유래의 재조합 tyrosine phenol-lyase를 가하고 L-DOPA 합성반응을 수행하였을 때, 효소의 초기반응속도는 크게 감소하였지만 L-DOPA 생산은 약 100 mM 농도까지 진행되었다(Fig. 3).

유기용매의 효과

효소적 방법에 의한 L-DOPA 합성반응의 생산성을 개선하기 위하여, 알콜 또는 친수성 유기용매들인 ethanol, methanol, isopropanol, dimethylsulfoxide, dimethylformamide, tetrahydrofuran를 반응액에 5% 농도로 가하고, 기질이 고갈되지 않도록 적절히 공급하면서 L-DOPA 생산반응을 수행하였다.

지금까지 L-DOPA 합성반응에 대한 유기용매의 영향에 관한 보고는 거의 없었으며, 최근에 이 등(7)이 L-DOPA가 ethanol에 전혀 녹지않는 성질에 기초하여,

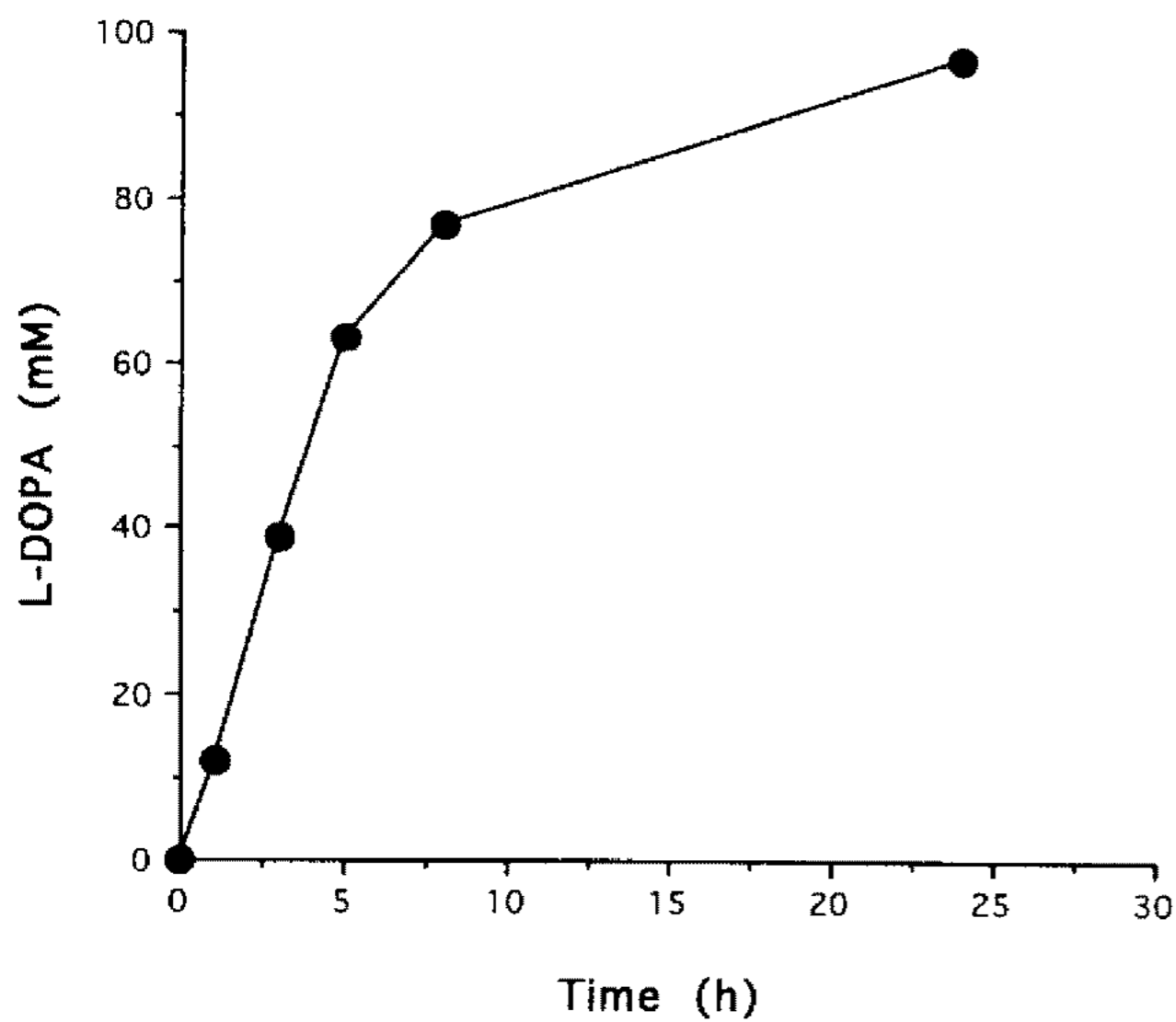


Fig. 3. Production of L-DOPA in the presence of sodium borate.

The reaction was performed using pyrocatechol-borate complex as a source of pyrocatechol.

L-DOPA 합성반응액에 5% ethanol을 가하고 반응을 수행하였을 때 효소활성이 증가한다고 보고하였다.

본 연구에서는 dimethylsulfoxide, dimethylformamide, alcohol을 반응액에 첨가한 경우에 L-DOPA 생산량이 control의 경우보다 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 5% methanol인 경우에는 가장 많은 양의 L-DOPA가 합성되었다(Table 2). 그러나, tetrahydrofuran 또는 10% methanol을 사용한 조건에서는 오히려 L-DOPA 생산량이 control에 비하여 줄어드는 결과를 보였다.

이 등(7)은 ethanol을 반응액에 첨가하였을 때 L-DOPA 생성량이 증가하는 것은 반응생성물인 L-DOPA가 ethanol 존재하에서 보다 쉽게 침전되기 때문이라고 보고한 바 있다. 그러나, methanol은 ethanol에 비하여 L-DOPA를 잘 녹이기 때문에 생성된 L-DOPA의 침전형성을 촉진하는 효과가 적음에도 불구하고 Table 2에 나타낸 바와 같이 반응성을 가장 크게 촉진시키는 것으로 밝혀졌다. 더구나, 5% methanol을 첨가한 조건에서는 반응시간이 4시간 이상 경과하여 다른 조건에서는 반응이 잘 진행되지 않는 동안에도 높은 반응성이 유지되어서 반응을 진행 할수록 L-DOPA 합성반응을 촉진하는 효과가 더욱 두드러졌다. 이와같은 결과로 볼 때, 반응액에 methanol을 가하였을 때 반응생산성이 증가하는 것은 L-DOPA의 침전형성을 촉진시키는 효과에 의한 것이라기보다는 효소 자체 또는 반응액에 포함되어 있는 pyruvate, PLP 등의 불안정한 물질들을 안정화하기 때문인 것으로 생각된다. 이러한 methanol 효과의 자세한 기작은 현재 연구 중에 있다.

생성된 L-DOPA의 회수 및 재결정화

Table 2. Effects of organic solvents on the production of L-DOPA by tyrosine phenol-lyase

Organic solvents	L-DOPA Concentration (mM)		
	4 h	6 h	10 h
control	103.2	111.1	—
ethanol	114.2	116.7	119.5
methanol 5%	124.8	131.9	147.1
methanol 10%	79.4	87.4	104.9
isopropanol	113.3	111.3	110.8
dimethylsulfoxide	111.3	120.0	—
dimethylformamide	112.3	115.8	—
tetrahydrofuran	88.8	86.8	—

Reactions were carried out at room temperature of about 25°C.

Control is the reaction without any organic solvent.

Table 3. Purification of the produced L-DOPA

Steps	L-DOPA (mg)	Purity (%)	Yield (%)
Produced	414.2	—	100
Harvested	319.5	95.6	77.1
Ethanol washed	298.0	—	71.9
Recrystallized	288.1	99.96	69.6

L-DOPA의 효소적 생산에 있어서 산물이 반응중에 불용성 침전을 형성하는 것은 산물의 회수 및 정제를 용이하게 하는 중요한 성질이다. 특히, 침전이 형성된 후에도 약 50 mM의 L-DOPA는 반응액 중에 녹아있게 되므로(7) 단순한 filtration이나 원심분리 방법만으로 산물을 회수하려면 가능한 높은 농도의 산물을 축적하도록 반응을 수행해야 함을 알 수 있다.

본 연구에서는 약 24시간 동안 L-DOPA 합성반응을 수행하여 약 210 mM(41.4 g/l) 농도의 산물을 생산한 후, 생성된 흰색의 비결정성 침전물을 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 회수하였다(Table 3). 회수한 침전물은 순수한 ethanol로 1회 세척하고 1N HCl에 녹였다. 이 때, 단백질 등의 불용성 물질들을 원심분리하여 제거하고, 상등액을 적절한 농도로 희석한 후, HPLC로 분석하였다. 그 결과, 이 산 용액에는 미량의 pyrocatechol과 부산물을 포함하고 있는 순도 약 95.6%의 L-DOPA가 들어 있는 것을 알 수 있었다.

L-DOPA의 정제를 위하여 1N HCl에 녹인 L-DOPA에 10배 부피의 ethanol을 가하고 잘 섞은 후, ammonia 수로 적정하여 pH를 약 6.5로 조절하였다. 이 용액을 4°C 냉장고에서 여러 시간 동안 방치하여 L-DOPA가 완전히 침전되도록 한 후, 원심분리하고 상온에서 건조하여 깨끗한 흰색 분말로 제조하였다.

이 분말을 다시 1N HCl에 녹이고 HPLC로 분석한 결과, 순도 약 99.96%인 L-DOPA를 얻을 수 있었다(Ta-

ble 3). 이와같은 분말로 제조하기까지의 회수율은 약 70%였고, 이러한 회수율은 L-DOPA 생성농도를 높일 수록 더욱 증가할 것으로 판단된다.

요 약

재조합 대장균에서 과발현된 *Citrobacter freundii* KCTC2006 유래의 tyrosine phenol-lyase(E.C.4.1.99.2) 이용 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine(L-DOPA)의 생산에 대한 반응첨가물의 영향을 조사하였다. 반응액 중 효소 및 조효소 농도의 영향을 조사한 결과, 효소농도는 약 2 units/ml이 적합하였으며, 조효소인 pyridoxal-5-phosphate는 0.1 mM 이상이 필요하였다. Pyrocatechol과 결합하여 안정한 복합체를 형성하는 sodium borate는 pyrocatechol에 의한 효소의 불활성화를 감소시키는 효과가 있었으나, 효소의 반응성을 현저히 저하시켜 L-DOPA 생산의 관점에서는 불리한 단점도 있었다. 한편, 알콜류 등의 유기용매가 L-DOPA 합성반응에 미치는 영향을 조사한 결과 methanol을 5% 농도로 반응액에 첨가하였을 때, 효소의 반응성과 안정성이 크게 증가하여 L-DOPA 합성반응이 지속적으로 수행됨으로써 고농도의 L-DOPA를 효율적으로 생산할 수 있게 되었다. 생산된 L-DOPA의 약 77%가 불용성 상태로 침전되어 쉽게 회수할 수 있었으며, 침전된 L-DOPA를 1N HCl에 용해한 후 재결정화 함으로써 최종적으로 99.96%의 고순도 L-DOPA를 생산할 수 있었다.

참고문헌

1. Enei, H., Nakazawa, H., Okumura, S. and Yamada,

- H. 1973. Synthesis of L-tyrosine or 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine from pyruvic acid, ammonia and phenol or pyrocatechol. *Agri. Biol. Chem.* **37**: 725-735.
2. Voivodov, K.I., Tsyachnaya, I.V., Gubnitskii, L.S., Yakovleva, V.I. and Berezin, I.V. 1985. Enzymatic synthesis of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine by free and immobilized cells of *Citrobacter freundii*. *Appl. Biochem. Microbiol.* **21**: 127-131.
3. Para, G. and Baratti, J. 1988. Synthesis of L-DOPA by immobilized cells of *Erwinia herbicola*. *Biocatalysis* **2**: 39-50.
4. Para, G. and Baratti, J. 1988. Synthesis of L-dopa by *Escherichia intermedia* cells immobilized in a polyacrylamide gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 222-228.
5. Kupletskaya, M.B. 1979. Synthesis of tyrosine and 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine by the bacterium *Citrobacter freundii*. *Prinkl. Biokhim. i Microbiol.* **15**: 827-831.
6. Kupletskaya, M.B. 1981. Investigation of the conditions for the synthesis of tyrosine and 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine by the bacteria *Citrobacter freundii* strain 62. *Prinkl. Biokhim. i Microbiol.* **17**: 278-283.
7. 이승구, 노현수, 홍승표, 이규종, 왕지원, 태동년, 엄기남, 방상구, 김영준, 성문희. 1996. 재조합 대장균에서 과발현된 *Citrobacter freundii* KCTC 2006 유래의 β -tyrosinase를 이용한 3,4-Dihydroxyphenyl-L-alanine의 생산. *한국산업미생물학회지* **24**(1): 44-49.
8. Kumagai, H., Yamada, H., Masui, H., Ohkishi, H. and Ogata K. 1970. Tyrosine phenol lyase II. cofactor requirements. *J. Biol. Chem.* **245**: 1773-1777.
9. Demidkina, T.V., Myagkikh, I.V. and Azhayev, A.V. 1987. Transamination catalyzed by tyrosine phenol-lyase from *Citrobacter intermedius*. *Eur. J. Biochem.* **170**: 311-316.
10. Boeskin, J. 1949. *Advances in Carbohydrate Chem.* **4**: 189-195.

(Received 4 November 1995)