

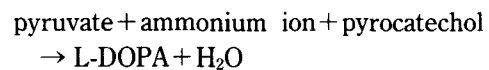
재조합 대장균에서 과발현된 *Citrobacter freundii* KCTC2006 유래의 β -Tyrosinase를 이용한 3,4-Dihydroxyphenyl-L-alanine의 생산

이승구 · 노현수 · 홍승표 · 이규종 · 왕지원 · 태동년
엄기남¹ · 방상구¹ · 김영준¹ · 성문희*
생명공학연구소 응용미생물연구그룹, ¹(주) 유공 대덕기술원 생물공학연구소

Production of 3,4-Dihydroxyphenyl-L-alanine by Using the β -Tyrosinase of *Citrobacter freundii* Overexpressed in Recombinant *Escherichia coli*. Seung-Goo Lee, Hyeon-Su Ro, Seung-Pyo Hong, Kyu-Jong Lee, Ji-Won Wang, Dong-Nyeon Tae, Ki-Nam Uhm¹, Sang-Gu Bang¹, Young-Jun Kim¹ and Moon-Hee Sung*. *Applied Microbiology Research Group, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusung, Taejeon 305-600, Korea, ¹Biotechnology Laboratory, Taeduk Institute of Technology, YUKONG, 140-1 Wonchon-Dong, Yusung, Taejeon 305-600, Korea* – By using the β -tyrosinase of *Citrobacter freundii* KCTC2006, which was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*, 3,4-dihydroxy phenyl-L-alanine (L-DOPA) was synthesized efficiently from pyrocatechol, sodium pyruvate, and ammonium acetate. Optimal temperature and pH for the reaction were determined to be about 18°C and 8.5, respectively. The effects of substrate concentrations were also examined at different concentrations of ammonium acetate, sodium pyruvate, and pyrocatechol. Ammonium acetate and sodium pyruvate increased the reaction rate until the concentrations reached to 300 mM and 50 mM, respectively. Although pyrocatechol showed the optimal concentration at 20 mM, it was controlled between 20 mM and 50 mM to avoid the depletion of substrate during the enzymatic synthesis. Meanwhile the synthetic rate was improved about 20% when ethanol was included in the reaction solution. Based on above results, a reaction medium for the production of L-DOPA was prepared and incubated with 1 unit/ml of β -tyrosinase. Pyrocatechol and sodium pyruvate was added to the reaction solution intermittently to avoid the substrate depletion during the enzymatic reaction. After 24 hour of reaction, 31.6 g/l of L-DOPA was accumulated in the reaction solution as soluble and precipitated ones and the conversion yield was about 85.2%.

파킨슨병(parkinson's disease) 등의 노인성 신경장애에 대하여 치료효과(1)가 있는 의약품 아미노산인 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine(L-DOPA)의 상업적 생산기술에는 화학합성법과 식물에서의 추출법이 이용되어 왔다. 그러나 화학합성법은 광학이성체분리 등으로 인하여 생산공정이 복잡하며(2), 추출법은 원료물질의 공급이 비교적 안정적이지 못한 단점을 가지고 있다. 미생물효소를 이용하는 방법은, 1970년대 초반에 일본에서 Enei 등이 *Escherichia intermedia*와 *Erwinia herbicola* 유래의 β -tyrosinase(tyrosine phenol-lyase, E.C.4.1.99.2)를 이용하여 pyrocatechol과 ammonium pyruvate로부터 L-DOPA를 합성하는 방법을 보고한 것이 최초이다(3, 4). β -Tyrosinase는 L-tyrosine을 inducer로 첨가한 배지에서 배양한 미생물에서 흔하게 발견되며, L-tyrosine을 phenol과 pyruvate로 가수분해하는 α , β -elimination 반응, 같은 기질로부터 phenol과 L-serine을 생성하는 β -replacement 반응 등 다양한 효소반응을 촉매한다(5). 미생물효소 β -tyrosinase를 이용한 L-DOPA의 합성은 phenol을 대신

하여 pyrocatechol을 가한 반응액에 높은 농도의 ammonium ion과 pyruvate를 가하여 반응의 평형을 물리적으로 조절한 조건에서 다음과 같은 α , β -elimination의 역반응인 L-DOPA 합성반응을 수행함으로써 이루어진다.



미생물효소인 β -tyrosinase를 이용한 DOPA의 합성은 효소의 기질에 대한 광학적 특이성으로 말미암아 L-이성질체 만을 직접적으로 생산하므로, 광학이성질체분리 등의 화학합성의 단점을 피할 수 있어서 L-DOPA의 합성 및 생산에 매우 유리한 방법으로 대두되고 있다. 그러나, β -tyrosinase를 이용한 L-DOPA의 합성은 기질인 pyrocatechol이 강력한 단백질 불활성화제로 작용하고, pyrocatechol과 pyruvate가 공기와 접촉하여 산화적분해 또는 고분자화 될 뿐만 아니라, 생성된 L-DOPA 역시 쉽게 산화되거나, 기질인 pyruvate와 결합하여 부산물을 생성하는 특성을 가지고 있어서 효소반응을 효율적으로 수행하기 매우 어렵다(4). 지금까지 β -tyrosinase를 이용하여 L-DOPA를 합성하는 방법에 관한 많은 연구가 보고되어 왔지만, L-DOPA를 고농도로 생산할 수 있었다는 보고는 Enei 등(3-5)과 Kupletskaya(6, 7)를 제외하고는

*Corresponding author.

Key words: β -tyrosinase, tyrosine phenol-lyase, *Citrobacter freundii* KCTC2006, 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine, L-DOPA

거의 없었다. 효소적 방법에 의한 L-DOPA의 생산은 그 연구가 70년대에 시작되어 비교적 오랫동안 진행되었으나, 90년대 초반에 와서야 일본의 Ajinomoto사가 β -tyrosinase를 함유한 *Erwinia herbicola*를 사용하여 산업화에 성공하였다. 그 요인을 요약하면 원료인 pyruvate의 가격이 최근에 cost-down 되었으며, 기질농도 조절법 및 돌연변이에 의한 고생산성 균주의 도입으로 생산성이 향상되었기 때문이다. 한편, down-stream 공정기술 개발에 의해 고순도 L-DOPA의 생산이 가능해져서 의약품으로 사용할 수 있게 되었고, 기존의 화학공정이 발생시키는 환경문제 등도 중요한 요인으로 지적된다.

본 연구자들은 β -tyrosinase 활성을 가진 미생물을 탐색한 결과 *Citrobacter freundii* KCTC 2006에서 β -tyrosinase 활성을 발견하였고, 이로부터 β -tyrosinase 유전자를 cloning 하여 재조합 *E. coli* system에서 대량생산하는 방법에 대한 연구를 수행하였다. 본 논문에서는 *Citrobacter freundii* KCTC2006 유래의 β -tyrosinase를 과발현하는 재조합 대장균으로부터 β -tyrosinase를 대량생산한 후, 이를 이용하여 L-DOPA를 고농도로 생산하는 효소반응방법에 관하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

L-DOPA 합성반응에 기질로 사용된 pyrocatechol은 Wako(Japan), sodium pyruvate는 Musashino(Japan)로부터 구입하였다. Ammonium acetate를 비롯한 ammonium 염들은 Kanto(Japan) 제품을 사용하였고, 기타 시약들은 Sigma(MO, USA) 제품이였다. HPLC 분석을 위한 Solvent는 Merck(Germany) 또는 Burdick & Jackson (MI, USA) 제품을 사용하였다.

사용균주와 plasmid

Citrobacter freundii KCTC 2006 유래의 β -tyrosinase gene을 expression vector pTrc99A(Pharmacia, Sweden)에 도입하여 제조한, 재조합 plasmid pHR1001(Fig. 1)을 *E. coli* JM105에 도입하여 β -tyrosinase를 생산하기 위한 미생물균주로 사용하였다.

배지 및 배양조건

재조합 plasmid pHR1001을 함유한 *E. coli* 균주의 배양은 ampicillin을 100 mg/l 농도로 첨가한 LB 배지(1% trypton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 200 ml에 접종하고, 37°C에서 200 rpm으로 shaking하면서 수행하였다. 균체농도가 약 $OD_{600}=0.8$ 에 이르렀을 때, isopropylthiogalactoside(IPTG)를 0.6 mM 농도로 가하여 β -tyrosinase 효소의 생산을 유도하고, 8시간 동안 계속 배양한 후, 5,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 균체를 회수하였다.

조효소액의 제조

원심분리한 재조합 *E. coli* 균체를 50 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0)에 혼탁시킨 후, β -tyrosinase의 cofactor로 알려진 pyridoxal-5'-phosphate(Sigma, MO)를 50 μ M 농도로 가하고, 단백질분해효소(protease)에 의한 효소활성 감소를 막기 위하여 p-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)를 10 μ M 농도로 첨가하였다. 세포혼탁액은 Branson sonifier 450(Ultrasonics Co. CT)를 이용하여 2분간 초음파처리하여 균체를 파쇄한 후, 15,000 rpm에서 60분 동안 원심분리하여 cell debris를 제거하고 상등액을 회수하였다. 회수한 효소액은 50 μ M pyridoxal-5'-phosphate를 포함한 20 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0)에서 충분히 dialysis 한 후, -20°C에서 냉동보관하면서 L-DOPA 합성 반응을 수행하기 위한 β -tyrosinase 조효소액으로 사용하였다.

β -Tyrosinase 활성정량

β -Tyrosinase의 효소활성은 0.65M ammonium acetate (pH 8.5), 50 mM pyrocatechol, 50 mM pyruvate, 100 μ M pyridoxal-5'-phosphate, 0.1% sodium sulfite를 포함한 반응액 1.0 ml에 β -tyrosinase 조효소액 50 μ l를 가하고, 18°C에서 30분간 정지 반응 시킨 뒤, 반응액 100 μ l에 2N HCl 100 μ l를 가하여 반응을 중지 시키고, 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. 한편, 상기의 β -tyrosinase 활성정량조건은 이하에서 β -tyrosinase를 이용한 L-DOPA 합성반응을 위한 표준조건으로 설정되었다.

분석

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

결과 및 고찰

β -Tyrosinase의 생산

재조합 plasmid pHR1001(Fig. 1)을 함유한 *E. coli* JM 105를 ampicillin 100 mg/l이 포함된 LB 배지에서 약 10 시간 동안 배양하여 β -tyrosinase의 대량 발현을 시도하였다. 생산된 *E. coli* 균체는 초음파처리를 이용하여 파쇄한 후, 전술한 바와같이 β -tyrosinase 조효소액으로 제조되었다. LB 배지에서 생산된 균체는 600 nm에서의

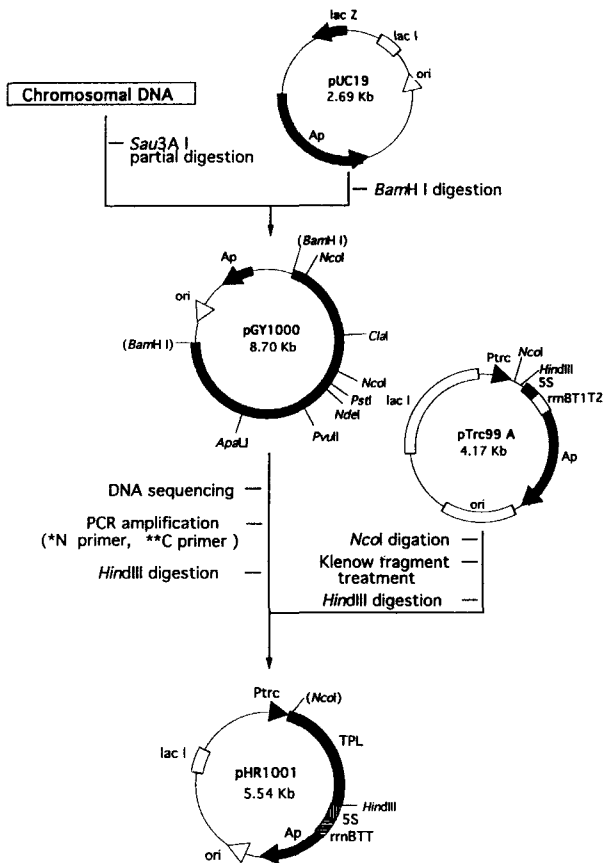


Fig. 1. Overall cloning and expression scheme of *Citrobacter freundii* KCTC 2006 β -tyrosinase gene (TPL). Expression plasmid pHR1001 was constructed by inserting the TPL gene into the *Hind*III and *Nco*I site of the vector DNA (*pTrc99A*). TPL gene fragment was obtained by polymerase chain reaction (PCR) and digestion with *Hind*III. The sequences of primers used for PCR were 5'-AATTATCCGGCAGAACCC-TTC-3' (N-primer) and 5'-CGGATCCAAGCTTATTAGATA-TAGTCAAAGCGTGCAGT-3' (C-primer). This was ligated to *pTrc99A* serially treated with *Nco*I, Klenow fragment of DNA polymerase I, and *Hind*III.

흡광도(OD₆₀₀)가 약 5.2 정도이었고, SDS-PAGE로 생산된 단백질을 분석한 결과 β -tyrosinase는 *E. coli* 균체의 총 단백질의 약 40%였고(Fig. 2), 전부 가용성인 상태로 생산되었다. 한편, β -tyrosinase 조효소액의 단백질 농도는 9.4 mg/ml였고, 비활성은 L-DOPA 합성 활성으로 약 1.01 unit/mg protein이었다.

L-DOPA·합성에 미치는 온도 및 pH의 영향

L-DOPA 합성반응에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여, 표준조건에서 온도를 18°C, 30°C, 37°C로 달리 하면서 반응을 수행하였다. 그 결과 초기 30분 동안의 반응은 30°C가 가장 좋았으나 4시간 동안 반응을 수행한 후의 결과는 18°C에서의 결과가 가장 유리한 것을 알 수 있었다(Table 1). 이와같은 결과는 30°C에서 L-DOPA 합

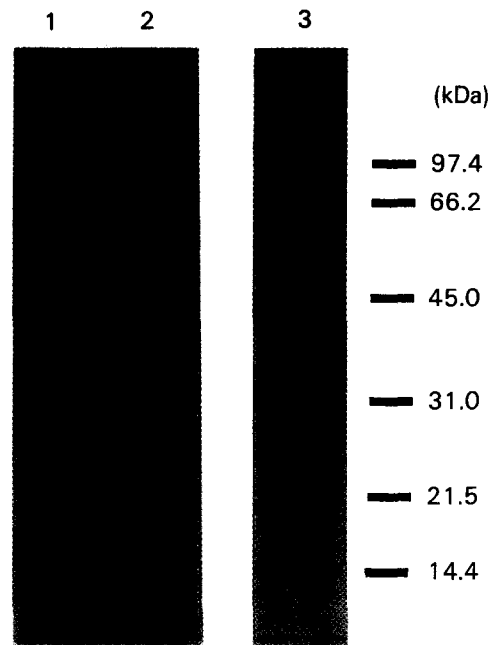


Fig. 2. Expression of recombinant β -tyrosinase of *E. coli* JM 105 harboring plasmid pHR1001. *E. coli* cells were grown at 37°C for 8 hours after induction of the *trc* promoter. Total proteins were separated by 12.5% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Lane 1, *E. coli* JM105/*pTrc99A* as a control; lane 2, *E. coli* JM105/*pHR1001*; lane 3, molecular weight standards

Table 1. Effect of temperature on L-DOPA synthetic activity of the β -tyrosinase originated from *Citrobacter freundii* KCTC 2006

Temperature	L-DOPA produced	
	after 30 min	after 4 h
18°C	11.5 mM	30.5 mM
30°C	13.9 mM	19.9 mM
37°C	9.20 mM	10.2 mM

성반응을 수행하는 경우, 효소 또는 반응액 중의 기질이 불안정하여 반응이 효율적으로 진행되기 어렵기 때문인 것으로 판단되며, 효소적 방법에 의한 기존의 L-DOPA 합성반응온도와 유사하였다(4). 이하에서는 반응온도를 18°C로 고정하고 연구를 수행하였다.

반응에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여, 1M ammonia water의 pH를 6N HCl로 적정하여 pH 10.2에서 pH 7.0까지 조절한 후, 이 ammonium chloride 용액을 0.65M ammonium ion 농도가 되도록 반응액에 첨가하고, 표준반응조건에서 L-DOPA 합성반응을 수행하였다. 이 때, 효소반응속도는 Fig. 3에 나타낸 바와같이 pH 8.5에서 pH 9.5 사이에서 일정하였으며, 그 이상 또는 이하의 pH에서는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 한편, 반응액 중의 pyrocatechol 또는 L-DOPA가 alkali

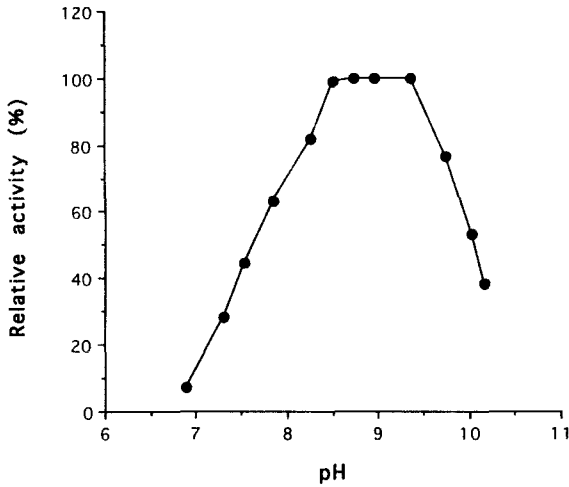


Fig. 3. Effect of pH on L-DOPA synthetic activity of the β -tyrosinase.

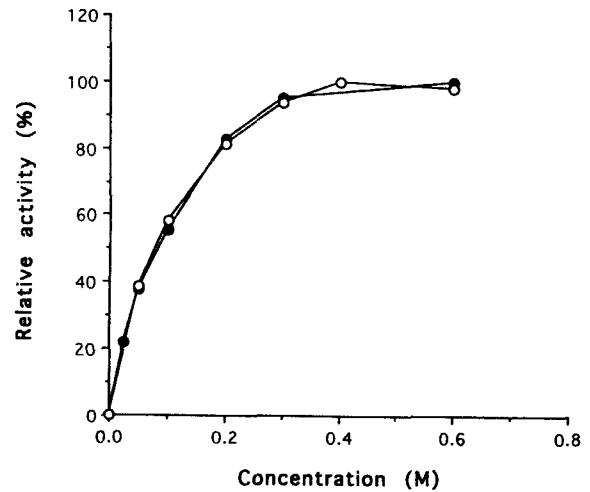


Fig. 4. Effect of concentrations of ammonium acetate (●) and ammonium chloride (○) on L-DOPA synthetic activity of the β -tyrosinase.

Table 2. Comparison of different ammonium salts as an ingredient of the reaction solution for the synthesis of L-DOPA with the β -tyrosinase

Ammonium salts	Relative activity (%)
ammonium acetate	100.0
ammonium chloride	93.1
ammonium nitrate	12.2
ammonium citrate	63.7
ammonium sulfate	17.3
ammonium oxalate	41.2
ammonium phosphate, dibasic	31.4

조건에서 쉽게 산화되는 특성이 있으므로, 본 연구에서는 반응액의 최적 pH를 8.5로 결정하였다.

L-DOPA 합성에 미치는 기질의 영향

Amino group donor의 선택 미생물효소 β -tyrosinase를 이용한 L-DOPA 합성반응에 있어서, ammonium ion은 효소반응에 기질로 이용되는 동시에, α , β -elimination의 역반응이 지속적으로 진행 될 수 있도록 반응평형을 물리적으로 조절하는 중요한 첨가물이다. 따라서, ammonium ion을 어떤 염의 형태로 반응액 중에 공급하는 것이 L-DOPA 합성에 가장 적합한가를 밝히기 위하여, β -tyrosinase의 L-DOPA 합성능을 정량하는 표준조건에서, 0.65M ammonium acetate을 대신하여 ammonium chloride, ammonium sulfate, ammonium nitrate 등을 첨가하고 상기효소반응을 수행되었다(Table 2). 그 결과, ammonium chloride와 ammonium acetate가 amino group donor로 비교적 좋은 결과를 보였으나, L-DOPA 합성에는 ammonium acetate가 가장 효율적인 것을 알 수 있었다. 이와같은 결과로부터 amino group

donor로는 ammonium acetate를 사용하여 실험을 진행하였다.

Ammonium ion 농도의 영향 L-DOPA 합성을 위한 표준반응조건에서 ammonium acetate와 ammonium chloride의 농도를 각각 0.025M에서 0.6M까지 변화시키며 L-DOPA의 합성도를 조사하였다. Fig. 4에 나타낸 바와 같이 반응액 중의 ammonium ion의 농도가 증가함에 따라 반응속도도 비례하여 증가하였으나 0.3M 이상에서는 더 이상 증가하지 않았다. 이 경향은 ammonium acetate와 ammonium chloride를 사용하는 두 경우에서 거의 일치하여 동일하게 나타났다. 본 연구에서는 상기반응이 L-DOPA의 생산방향으로 진행되게 하고 기질이 고갈되었을 때 다시 첨가하는 번거러움을 피하기 위하여 ammonium acetate를 0.65M 농도로 초기 반응액에 첨가하기로 하였다.

Pyrocatechol 및 sodium pyruvate 농도의 영향 반응액 중의 pyruvate는 불안정하여 단분자들끼리 중합하는 특성이 있으며, 생성된 L-DOPA와 비효소적인 화학반응에 의하여 부산물을 형성하는 것으로 알려져 있다(4). 또, pyrocatechol은 공기중에 노출되면 쉽게 산화하며, 효소를 불활성화 시키는 특성이 있어서 이들의 농도조절은 L-DOPA 생산의 가장 중요한 부분이라 할 수 있다.

먼저 L-DOPA 생산반응에 적합한 pyruvate 농도를 결정하기 위하여 반응액 중의 pyrocatechol 농도를 50 mM로 고정하고 sodium pyruvate의 농도를 20 mM에서 100 mM까지 증가시키면서 L-DOPA 생산을 조사하였다. 그 결과, pyruvate 농도 80 mM까지 L-DOPA 합성속도가 증가하였으나 40 mM 이상에서의 증가폭은 미미하였고, 80 mM 이상의 농도에서는 부산물의 생성 등으로 인하여 반응속도가 약간 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 따라서, 반응액 중의 sodium pyruvate의 농도는 50

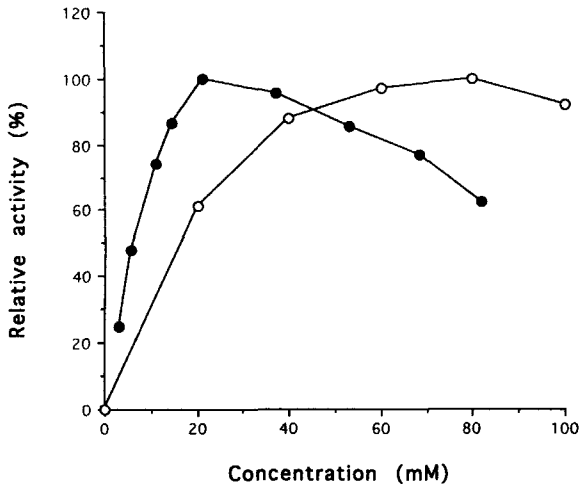


Fig. 5. Effect of concentrations of pyrocatechol (●) and sodium pyruvate (○) on L-DOPA synthetic activity of the β-tyrosinase.

mM이 적합한 것으로 결정하였다.

Pyrocatechol의 경우에는 sodium pyruvate의 농도를 50 mM로 고정하고 pyrocatechol 농도를 5 mM에서 80 mM까지 증가시키면서 L-DOPA 생산반응을 표준반응 조건에서 조사하였다. 이 경우, L-DOPA 합성반응속도는 pyrocatechol 농도가 20 mM이 될 때까지는 급격하게 증가하였으나, 그 이상의 pyrocatechol 농도에서는 지속적으로 감소하였다(Fig. 5). 이것은 효소 β-tyrosinase가 방향족 화합물인 pyrocatechol에 의해서 부분적으로 불활성화 되기 때문인 것으로 판단된다. 이상의 결과로, 반응액 중의 pyrocatechol 농도는 20 mM 이상으로 하되 가급적이면 50 mM을 넘지 않도록 하면서 반응을 수행하는 것이 바람직한 것을 알 수 있었다.

L-DOPA 합성반응에 미치는 ethanol의 영향

L-DOPA는 물에 대한 용해도가 매우 낮아서 효소반응이 진행됨에 따라서 수용액으로부터 쉽게 침전을 형성하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 실제 L-DOPA 합성 반응액에서는 ammonium, pyruvate 등 과량의 이온들을 포함하고 있어서, 침전이 쉽게 형성되지 않고 과포화 상태로 반응액 중에 녹아 있게 된다. 이와같이 L-DOPA가 과포화로 녹아 있는 상태는 상기합성반응이 효율적으로 수행되기 어렵게 만드는 원인 중의 하나인 것으로 생각되었다. 따라서, L-DOPA가 여러 알콜들 중 특히 ethanol에 전혀 녹지 않는 특성(8)을 가지는 것을 이용하여, L-DOPA 합성반응액에 ethanol을 첨가하는 것을 고려하였다. 반응액의 ethanol 함유량을 0%에서 40%까지 달리하면서 L-DOPA 합성 활성을 측정된 결과, Table 3과 같이 10% ethanol을 함유한 경우 반응성이 약 20% 정도 증가하는 것을 알 수 있었다. 그러나, 장시간 동안 L-DOPA 합성반응을 수행하는 경우에는 ethanol에 의한

Table 3. Effect of ethanol on L-DOPA synthetic activity of the β-tyrosinase

Ethanol content	Relative activity (%)
0%	100.0
5%	114.4
10%	120.4
20%	87.6
30%	33.5
40%	4.3

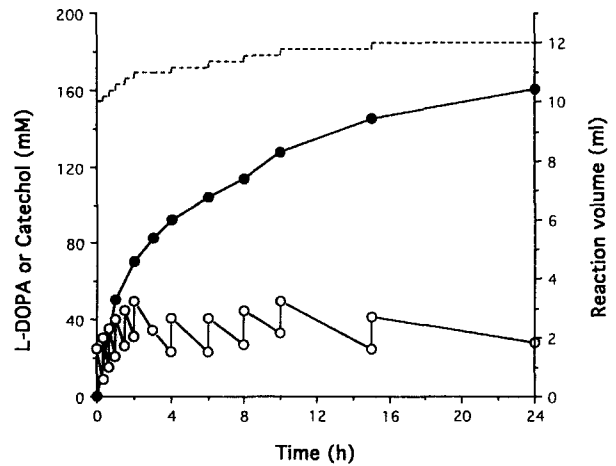


Fig. 6. Production of L-DOPA by using the β-tyrosinase originated from *Citrobacter freundii* KCTC 2006. Symbols are; (●), L-DOPA and (○), pyrocatechol. Dotted line exhibits the increase of reaction volume by the addition of substrate solutions.

β-tyrosinase의 불활성화가 일어날 수 있으므로 효소의 안정성을 고려하여 ethanol을 5% 농도로 첨가하였다.

β-Tyrosinase를 이용한 L-DOPA의 생산

L-DOPA를 효소적방법으로 생산하기 위하여 0.65M ammonium acetate(pH 8.5), 50 mM sodium pyruvate, 25 mM pyrocatechol, 0.1 mM 5'-pyridoxal phosphate, 0.1% sodium sulfite, 5% ethanol과 β-tyrosinase 조효소액을 1.9 unit/ml 농도가 되도록 가한 반응액을 제조하였다. 이 반응액을 rubber stopper로 밀봉하고 질소가스로 충분히 flushing 한 후, 온도를 18°C로 조절한 water bath에 넣고, magnetic stirrer로 반응액을 서서히 교반하면서 L-DOPA 합성반응을 수행하였다. 상기의 효소반응을 통하여 L-DOPA를 고농도로 생산하기 위하여, 본 연구에서는 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(Fig. 6).

상기의 효소적 L-DOPA 생산반응을 시작한 후, 약 2~3시간이 경과 하였을 때, 반응액 중에 흰색 침전이 관찰되기 시작하여 점차 반응액이 혼탁해졌으며 4~5시간이 경과한 후에는 반응액이 완전히 불투명한 용액으로 변하였다. 침전이 생기기 시작하였을 때 반응액 중의 L-DOPA 농도는 약 70~80 mM 수준이었으나, 반응액이 완전히 혼탁해진 후에 침전된 L-DOPA를 원심분리하여 제거한 상등액 중의 L-DOPA 농도는 약 40~50 mM 수준으로 감소되었고, 이후에는 일정하게 유지되었다. 이로 볼 때, 상기의 L-DOPA 합성반응은 생성된 L-DOPA가 침전으로 분리되기 때문에 역반응을 피하여 지속적으로 수행 가능하게 되는 것을 알 수 있었다.

이와같은 반응을 24시간 동안 수행한 결과, 생성된 총 L-DOPA 량은 약 160.4 mM(31.6 g/l)였고, 잔존 기질량은 pyrocatechol 량으로 약 27.8 mM이어서, 반응액에 투입된 총 pyrocatechol의 약 85.2%가 L-DOPA로 전환된 것을 알 수 있었다. 이상의 L-DOPA 생산결과는 반응 생산성은 높지만 최종산물농도는 *Erwinia herbicola* 유래의 β -tyrosinase를 이용한 *Enei* 등의 결과에 미치지 못하는데, 이것은 *C. freundii* 유래의 효소가 상대적으로 안정성이 떨어져서 반응이 진행되는 동안에 점차 불활성화 되기 때문인 것으로 판단된다. *C. freundii* 유래의 β -tyrosinase는 주로 러시아에서 반응기작 또는 분자구조에 관한 연구가 지속적으로 수행되어 왔으며, 최근에는 최초로 β -tyrosinase의 완전한 결정구조가 보고되었다(9). 효소구조에 관한 이 연구결과들은 *C. freundii* 유래의 β -tyrosinase를 이용한 효소반응기작의 명쾌한 이해와 이를 바탕으로 한 반응생산성의 개선에 큰 도움이 될 것이다.

요 약

재조합 대장균에서 대량발현 시킨 *Citrobacter freundii* KCTC 2006 유래의 효소 β -tyrosinase를 이용하여 pyrocatechol, sodium pyruvate, ammonium acetate로부터 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine을 생산하기 위한 연구를 수행하였다. 이 효소반응에 적합한 온도 및 pH 조건은 각각 18°C와 8.5로 결정되었고, 반응액 중의 ammonium acetate와 sodium pyruvate의 농도는 각각 300 mM, 50 mM 이상으로 조절하는 것이 적합하였다. Pyrocatechol의 경우는 20 mM에서 가장 높은 반응성을 나타냈으나, 기질을 반복적으로 첨가하며 장시간 동안 효소반응을 수행하는 경우에는 pyrocatechol의 고갈을 피하기

위하여, 20 mM에서 50 mM 사이로 조절하였다. 한편, 반응액 중에 ethanol을 10% 첨가한 경우에는 반응속도가 약 20% 증가하였다. 이상과 같은 효소반응특성에 기초하여 조제한 기질용액에 β -tyrosinase를 1 unit/ml 농도로 가하고, pyrocatechol과 pyruvate가 고갈되지 않도록 간헐적으로 첨가하면서 효소반응을 수행한 결과, 24시간 만에 85.2%의 수율로 31.6 g/l의 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine을 생산할 수 있었다.

참고문헌

1. Dougan, D., D. Wadw, and P. Mearrick. 1975. Effect of L-DOPA metabolites at a dopamine receptor suggest a basis for "on-off" effect in Parkinson's disease. *Nature*. **254**: 70-72.
2. Knowles, W.S. 1986. Application of organometallic catalysis to the commercial production of L-DOPA. *J. Chem. Edu.* **63**: 222-225.
3. Enei, H., H. Matsui, S. Okumura, and H. Yamada. 1971. Enzymatic preparation of L-tyrosine and 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **43**: 1345-1349.
4. Enei, H., H. Nakazawa, S. Okumura, and H. Yamada. 1973. Synthesis of L-tyrosine and 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine from pyruvic acid, ammonia, and phenol or pyrocatechol. *Agr. Biol. Chem.* **37**: 725-735.
5. Enei, H., H. Matsui, S. Okumura, and H. Yamada. 1972. Elimination, Replacement and isomerization reactions by intact cells containing tyrosine phenol-lyase. *Agr. Biol. Chem.* **36**: 1869-1876.
6. 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.
7. 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.
8. Budavari, S., M.J. O'Neil, A. Smith, and P.E. Heckelman. 1989. Levodopa, p. 860-861. *The Merck Index* 11th ed., Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA.
9. Antson, A.A., T.V. Demidkina, P. Gollnick, Z. Dauter, R.L. Von Tersch, J. Long, S.N. Berezhnoy, R.S. Phillips, E.H. Harutyunyan, and K.S. Wilson. 1993. Three-dimensional structure of tyrosine phenol-lyase. *Biochemistry* **32**: 4195-4206.

(Received 6 September 1995)