

환경미생물학에 Oxygenase를 이용한

# 유용물질의 생산

연방 생물공학 연구소, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich, CH-8093 Zurich, Switzerland (park@biotech.bio.ethz.ch)

Review

## 1. 서론

지난 한세기 동안 화학산업이 급속히 발전함에 따라 자연계는 신규 합성물질에 다량 노출되고 그중 일부는 분해속도가 느려 우리주변에 축적되고 있다. 이러한 난분해성 물질의 출현은 효소의 진화를 통한 다양성을 촉진시켜 새롭고 다양한 대사기능을 갖는 미생물, 즉 환경미생물의 탄생을 가져 왔다.

난분해성 물질의 대표적인 예는 석유화학 산업의 부산물 중 하나인 톨루엔, 스티렌, 자이렌과 같은 벤젠기를 가지고 있는 탄화수소인데 이들은 발암물질로 인간에게도 위험 할 뿐만 아니라 미생물에도 독성이 강하여 Pseudomonas 와 같이 소수성 유기물질에 대해 내성이 높고 다양한 분해효소를 가지고 있는 일부 미생물에 의해서만 분해될 수 있다. 보통 탄화수소가 미생물 내에서 동화될 때 첫번째 과정은 산화효소에 의한 산소첨가 반응이고, 연이어 생산된 알코올 또는 에폭사이드가 탈수소효소 (dehydrogenase)에 의해 알데하이드 산으로 산화되고 지방산 분해경로를 거쳐 이산화 탄소로 분해 된다.

탄화수소의 산소첨가 반응은 대부분 oxygenase나 peroxidase에 의해 이루어진다. Peroxidase는 반응 중 cofactor를 필요로하지 않으나 과산화수소가 산화제로

사용되어 반응 중 효소가 불활성화 될 수 있다. 또한 비반응 속도가 oxygenase에 비해 상당히 낮은 것으로 알려져 있다 (1). Oxygenase는 cofactor를 필요로하나 공기 중의 산소분자를 기질로 사용하여 산화제에 의한 효소 불활성화가 일어나지 않는다. 또한 기질 특이성이 다양하며 미생물에 광범위하게 존재하여 유전자 확보가 용이하다 (10).

석유화학 물질 (petrochemicals)을 비롯한 탄화수소들은 가격이 저렴하나 알콜, 에폭사이드, 알데하이드, 산, 아민, 할로젠과 같은 기능기가 없어 산업적 응용이 넓지 않다. 따라서 탄화수소에 위의 기능기를 지정학적 (regio-) 또는 광학적 (enantio-)으로 특이하게 도입하는 asymmetric catalysis가 산업적으로 많은 관심을 끌고 있다. Asymmetric catalysis는 화학촉매를 사용할 경우 반응수율이 낮고 반응이 고온, 고압에서 진행되어 많은 경우 경제성이 낮다. 이에 비해 효소와 같은 생물촉매는 반응 특이성이 높아 부산물 즉 산업폐기물 생산량이 적고 반응이 상온 상압하에서 이루어 지므로 생물촉매의 이용은 green chemistry로서 각광을 받고있다.

본 논문에서는 산화효소, 특히 oxygenase의 특성 및 촉매하는 반응, 그리고 산업적 이용과 연구개발 현황을 소개하고자 한다.



## 2. 본 론

### 2.1 산화효소의 특성

산화효소(oxygenase)는 탈수소 효소와 함께 반응 중 cofactor (NAD(P)H)를 필요로 하는 산화환원효소 그룹 (E.C. 1.-.-)에 속해 있지만 여러가지 면에서 독특한 특성을 보여주고 있다 (15). 첫째, 산화효소는 보통 반응 중 전자전달에 관여하는 별도의 단백질 (예를 들면 rubredoxin, rubredoxin reductase)을 필요로 한다. 이들의 역할은 NAD(P)H로 부터 전자를 산소첨가 반응을 촉매하는 단백질로 이동시켜 산소분자를 활성화하는데 이용할 수 있게 한다. 예를들어alkane hydroxylation과 terminal alkene을 epoxidation 시키는*Pseudomonas putida* GPo1 유래의alkane hydroxylase는 산화반응에 관여하는 AlkB와 전자전달에 관여하는 AlkGT의 세 개의 단백질로 구성되어 있다 (16). NADH가 산화되면서 AlkT (rubredoxin reductase)의 FAD가 환원되고 다시 FADH<sub>2</sub>가 산화되면서 전자가 AlkG (rubredoxin)의 철이온을 경유하여 AlkB로 전달되어 산화반응에 이용된다. 이들 전자전달에 관여하는 단백질들은 보통 유래된 미생물의 종류에 상관없이 비슷한 역할을 보이나 이들의 존재비가 cofactor coupling을 비롯한 반응 효율에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

둘째, 산화효소는 기질대신 산소분자를 환원시켜 물이나 과산화수소를 만들 수 있다. 이러한 반응을 cofactor uncoupling이라 하는데, 이는 생물전환 중 cofactor 와 용존산소 요구량을 증가시키며 생산된 과산화수소는 생촉매를 불활성화 시키므로 반응속도를 높이기 위해서는 이러한 부반응을 최대한 억제

해야 한다. Cofactor uncoupling은 기질이 존재하지 않을때나 기질이 효소의 활성부위 (active site)에 잘 맞지 않을때 발생되기 때문에 기질 공급을 최적화하거나 효소의 3차 구조를 변형하는 것에 의해 어느정도 조절이 가능한 것으로 알려져 있다.

세번째로 산화효소의 주요 기질들이 소수성 유기화합물이기 때문에 미생물에 존재하는 다른 효소에 비해 이들의 소수성이 높다. 따라서 산화효소는 membrane-associated 형태 또는 transmembrane protein으로 세포 내에 존재한다. 이러한 특성은 이들이 세포 밖에서 불안정하게 하여 효소 역가가 빠르게 저하된다. 또한 재조합 미생물에서 발현시 inclusion body나 microaggregation을 발생시켜 생산균주의 역가 높이는 것을 어렵게 한다.

표 1. 산화효소의 반응 종류

Enzyme type	Reaction	Example	
		Substrate	Product
Monooxygenase	Monohydroxylation	<chem>R-CH3</chem>	<chem>R-CH2OH</chem>
	Epoxidation of a C=C bond	<chem>C1=CC=CC=C1</chem>	<chem>O=C1C=CC(=O)C=C1</chem>
	Insertion of an oxygen	<chem>C1CCCCC1</chem>	<chem>C1CCC(O)CC1</chem>
Dioxygenase	Dihydroxylation of aromatic rings	<chem>C1=CC=CC=C1</chem>	<chem>O=C1C(O)C(O)C=C1</chem>
	Ring-cleaving dioxygenation	<chem>O=C1C(O)C(O)C=C1</chem>	<chem>OC(=O)C1=CC=CC=C1C(=O)O</chem>

종합적으로 산화효소는 반응중 NAD(P)H를 필요로 하고 전자전달에 관여하는 별도의 단백질을 요구하며 조건에 따라 cofactor uncoupling이 일어날 수 있고 세포외에서는 불안정하다.

## 2.2 산화효소의 반응과 산업적 응용

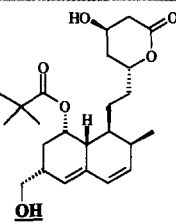
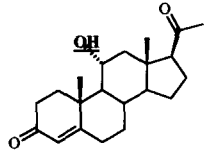
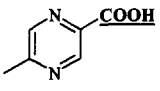
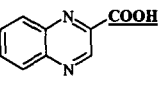
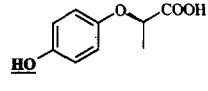
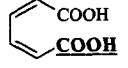
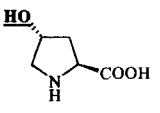
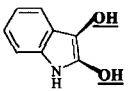
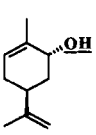
산화효소가 촉매하는 반응의 종류를 보면 monooxygenase의 경우 aliphatic, aromatic, cyclic compounds를 hydroxy-lation 또는 epoxidation 시킬수

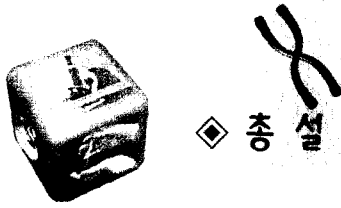
있다 (표 1, (15)). 가장 간단한 예로 n-octane을 1-octanol로, 1-octene을 1-epoxyoctane으로, toluene을 m-hydroxytoluene으로, styrene을 (S)-styrene oxide로 산화시킬 수 있다. 또한 Baeyer-Billiger monooxygenase로 불리는 그룹은 케톤에 산소를 첨가하여 락톤을 형성할 수 있다. *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871에서 분리된 cyclohexanone monooxygenase는 약 100개 이상의 케톤에 대해 지정학적, 광학적으로 특이하게 산소를 첨가할 수 있다. 반면 dioxygenase에 속하는 그룹은 주로 방향족 화합물을 cis-dihydroxylation 시켜 arene cis-dihydrodiols을 만든다. 또는 aromatic ring cleavage를 촉매하는 그룹이 있는데 이들은 유일하게 반응중 cofactor (NAD(P)H)를 필요로 하지 않는다.

산화효소는 산업적으로 크게 의약품 합성시 중간유도체의 산화반응에 이용되거나 (표 2의 1,2), 제약, 화학산업에서 building block이나 commodity를 만들때 이용된다 (표 2의 3~8). 또는 식품산업에서 terpene을 비롯한 방향성 유기 화합물을 만드는데 사용될 수 있다 (표 2의 9).

현재 대량 생산되고 있는 물질들의 특징을 보면, 이들은 생촉매에 대한 독성이 상대적으로 낮고, 광학적, 지정학적으로 특이성을 보이고있다. 이들은 또한

표 2. 산화효소의 산업적 응용 예. 밑줄로 표시된 부분은 산화효소에 의해 도입된 산소

No.	Product	Catalyst	Company	References
1		<i>Nocardia</i> sp.	Merck	(7)
2		<i>Aspergillus niger</i>	Schering	Private communication
3		<i>P. putida</i> mt-2	Lonza	(11)
4		<i>A. repens</i> <i>P. putida</i> mt-2	Pfizer	(17)
5		<i>Beauveria bassiana</i>	BASF	(4)
6		Mutant <i>Arthrobacter</i> sp.	Mitsubishi	(18)
7		Recombinant <i>E. coli</i>	Kyowa Hakko	(14)
8		Recombinant <i>E. coli</i>	Genencor	(3)
9		<i>Rhodococcus opacus</i>	ETH Zurich Enzyscreen	(6)



효소 공정보다는 미생물의 발효공정에 의해 생산되고 있다. 표 2의 각 사례를 자세히 보면, 첫번째는 *Nocardia* sp.를 생축매로 이용하여 기질을 hydroxylation 시키는 반응이다. 기질의 독성을 최소화하기 위해 기질 공급속도를 조절하였고 용존산소의 결핍을 막기 위해 배양액 내 용존산소가 50% 이상 되게 유지하였다.

두번째 예는 스테로이드를 광학적, 지정학적으로 특이하게 산화시키는 반응이다. 반응 특이성을 보이는 미생물을 분리하기 위해 1000 개 이상의 미생물들이 high throughput screening 방법을 통해 조사되었고 반응산물의 생산속도와 농도를 높이기 위해 유가식 배양 형태의 생물전환 공정이 이용 되었다. 기질의 독성은 첫번째 예에서와 같이 기질 공급속도를 통해 조절이 가능하였지만 반응산물이 배양액 내에 축적되어, 즉 생축매에 대한 반응산물의 독성이 증가하여 반응이 종료되었다. 현재 최종산물의 농도를 높이기 위해 생산 균주의 내성 증가와 반응산물의 독성을 완화시키기 위한 *in situ* product recovery (예를 들어 two-liquid phase 시스템)의 개발이 연구중에 있다.

세번째, 네번째 예는 톨루엔, 자이렌 분해에 관여하는 xylene monooxygenase, alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase에 의해 기질이 산화되어 알콜, 알데하이드를 거쳐 최종산물인 산이 생성되는 반응이다. 자이렌이나 benzyl alcohol이 생물전환 중 에너지원 및 효소 발현의 유도체로 이용되었다. 흥미로운 부분은 첫번째 산화반응은 NADH를 소비하고 연이은 산화반응에서는 NADH가 재생되어 첫번째, 두번째 예와는 반대로, 전체적으로 1몰의 반응산물당 1몰의 NADH가 재생된다. NADH의 산화도 미생물의 탄소대사 과정 중 이루어 지기 때문에 미생물의 대사활성이 높은 growing cell이 생축매로 사용되었다. 또한 반응산물의 독성이 낮기 때문에 최종농도가 첫번째, 두번째 경우보다 약 10 배 이상 높은 10~20g/L까지 증가하였다.

다섯번째 예는 *Beauveria bassiana*의 포도당을 탄소원으로 하는 유가식 배양을 통해 (R)-2-phenoxypropionic

acid를 (R)-2-(4-hydroxy)phenoxypropionic acid로 전환하는 반응이다. 반응산물의 독성에 대한 내성을 증가시키기 위해 UV를 이용한 돌연변이를 유도하였고, 또한 생산균주의 생산성을 높이기 위해 nitrosoguanidine을 이용한 2차 돌연변이를 유도하였다. 최종적으로 두 단계의 균주개량에 의해 생산성이 0.3에서 2.0을 거쳐 7.0g/L/day까지 증가하였다.

여섯번째 예는 benzoate 1,2-dioxygenase, benzoate cis-dihydrodiol dehydrogenase, catechol 1,2-dioxygenase에 의해 benzoic acid가 cis, cis-muconic acid로 전환되는 반응이다. cis, cis-Muconic acid를 분해하지 못하는 돌연변이 균주가 축매로 이용되었고 benzoate가 효소 발현의 유도체와 기질로 사용되었다.

일곱번째, 여덟번째 예는 산화효소에 의한 산화반응이 미생물 고유의 탄소대사 반응에 융합되어 최종산물이 생산되는 반응이다. 두가지 경우 모두 재조합 대장균이 이용되었고 반응산물의 독성이 낮아 최종산물 농도가 20~40g/L까지 증가하였다. 각각의 반응을 보면 다섯번째는 배양액에 첨가된 프롤린으로 부터 또는 포도당에서 세포에 의해 합성된 프롤린으로 부터 *Dactylosporangium* sp. 유래의 proline 4-hydroxylase에 의해 최종산물인 trans-4-hydroxy-proline이 생산되었다. 일곱번째 경우는 *P. putida* 유래의 naphthalene dioxygenase가 트립토판 생산균주로 개발된 대장균에 발현되어 트립토판 합성의 중간체인 indole을 지정학적, 광학적으로 선택적으로 산화시켜 indoxyl을 만드는 반응이다. 생산된 indoxyl은 다시 공기중의 산소에 의해 산화되어 인디고를 생성하게 된다.

아홉번째 예는 산업적으로 대량생산 공정이 아직 개발되지는 않았지만 식품 산업에서 각광을 받고 있는 반응이다. 기질인 Limonene은 오렌지와 레몬 껍질에 존재하는 오일의 주요 성분으로 가격이 1~2 US\$/kg 정도이지만 광학적, 지정학적으로 특이하게 산화된 (+) trans-carveol, (+) carvone, perillyl alcohol 등은 30~60US\$/kg 이다. 현재 이러한 반응에 사용될 수 있



는 생촉매로 세균, 효모, 곰팡이 등의 다양한 미생물이 분리 동정되었고 그중에서도 *Rhodococcus opacus*가 (+) trans-carveol 생산에 대해 높은 활성과 반응 특이성을 보이고 있다 (5). *R. opacus*는 톨루엔을 탄소원으로 하는 배지에서 배양되었을 때 limonene으로부터 (+) trans-carveol을 생산하지만 포도당에서 자랐을 때는 합성능력이 현저하게 떨어 졌다. 이는 톨루엔 분해 경로에 존재하는 산화효소가 (+) trans-carveol 생산에 관여함을 보여 주고 있다 (6).

종합적으로 볼 때, 의약품의 중간유도체로 이용되는 물질들은 미생물 고유의 기질, 즉 미생물이 대사할 수 있는 물질에서 생산되는 것이 아니고 미생물이 대사할 수 없는 물질로부터 미생물 고유의 효소에 의해 생산되고 있다 (표 2의 1,2). 따라서 대부분 야생균주가 생촉매로 이용된다. 또한 연구개발 기간이 보통 수개월 이내로 짧기 때문에 high throughput screening과 다양한 기질 특이성을 가지는 미생물의 library 구축이 의약품용 중간유도체 생산공정 개발에 가장 중요한 요소라고 생각한다. 반면 building block이나 commodity에 속하는 물질들은 많은 경우에 미생물의 대사과정에서 중간체로 존재하거나 중간 대사산물이 기질로 사용되어 최종제품이 생산되고 있다 (표 2의 6~8). 따라서 이들의 대량생산 공정개발을 위해서는 돌연변이 유도나 유전자 재조합, 대사공학기술이 중요하다고 생각된다. 흥미롭게도 이러한 요소 기술들은 이미 아미노산 생산시 상용화되었기 때문에 기존의 발효공정 최적화 기술을 활용하면 쉽게 산화반응물을 고농도로 생산 할 수 있을 것으로 생각한다.

### 2.3 연구 동향

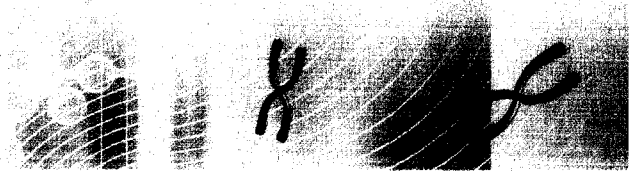
생촉매에 의한 탄화수소의 산화 반응은 여러가지 요인들에 의해 영향받는다 (15). 첫번째로 기질과 반응산물이 효소의 활성을 저해할 수 있고, 효소내 아미노산과 화학반응을 통해 효소를 불활성화 시킬수도 있다. 전세포가 촉매로 이용될 경우는 기질과 반응산물이 미생물

세포막의 투과성 (permeability)을 증가시켜 세포의 cofactor 재생을 방해할 수 있다. 또한 효소의 cofactor uncoupling에 의해 생산된 과산화수소에 의해 생촉매가 불활성화될 수 있다. 그 이외에 기질이 대부분 소수성이 강하고, 반응 중 cofactor가 요구되므로 산소를 포함한 기질의 이동과 cofactor 재생이 반응속도를 제한할 수 있다. 또한 산화효소는 세포 밖이나 재조합 미생물 내에서 불안정하여 반응중 비반응속도가 저하될 수 있다.

이러한 여러가지 인자 중 본 논문에서는 기질과 반응산물의 독성을 어떻게 피할 것인가와 반응중 cofactor를 어떻게 재생할 것인가를 살펴보겠다. 기질과 반응산물의 독성을 피하기 위해 가장 널리 이용되는 방법은 *in situ* product recovery와 기질의 제한적 공급이다. 반응액내의 기질농도는 반응속도를 계산하여 그보다 약간 낮게 유지함으로써 조절이 가능하고, *in situ* product recovery는 반응성이 낮고 독성이 없는 hexadecane과 같은 long chain hydrocarbon을 organic carrier solvent로 사용하는 two-liquid phase 시스템이나 반응산물을 수지흡착을 통해 제거하는 방법이 가장 널리 이용되고 있다 (12).

Two-liquid phase 시스템의 경우 대부분의 기질과 반응산물이 유기용매층으로 분배되어 촉매가 존재하는 수용액 상에는 저농도로 유지된다. 반응이 진행됨에 따라 기질이 유기용매층에서 수용액상으로 연속적으로 이동되고 반응산물은 반대로 수용액상에서 유기용매층으로 이동하여 기질과 반응산물의 독성을 완화시킬 수 있다. 예를 들어 bis(2-ethylhexyl)phthalate (BEHP)를 유기용매층으로 사용하고 *P. putida* mt-2 유래의 xylene monooxygenase를 발현하는 재조합 대장균이 생촉매로 사용되었을 때 3, 4-dimethylbenzaldehyde가 300mM 농도로 반응액에 축적되었고 생산성은 210U/L까지 증가 하였다 (2).

Two-liquid phase 시스템의 문제점으로 organic/aqueous emulsion의 안정성을 예로 들 수 있다. 이는 반응후 반응산물이 존재하는 유기용매층을 수용액상으로 부터 분리할 때 분리효율을 떨어뜨릴 수 있다. 이러한 emulsion



의 안정성은 미생물이 반응중 만들어 내는 exopolysaccharides가 유화제로 작용하여 증가되는 것으로 알려져 있다. 따라서 미생물의 대사를 조정하거나 반응조건을 최적화하는 것에 의해 emulsion의 안정성 증가는 어느정도 방지할 수 있을 것으로 본다.

Two-liquid phase 시스템의 대체 방법으로 반응액으로부터 반응산물을 선택적으로 분리하는 수지의 이용을 들 수 있다. 예를 들어 catechol과 같이 수산화기가 두 개 이상일 때 XAD-4 와 같은 수지를 이용하여 반응 중 반응산물을 선택적으로 분리할 수 있다 (8). 하지만 보통의 경우 반응산물 뿐만 아니라 기질도 함께 분리가 되고 흡착효율이 낮기 때문에 반응액의 회전속도를 상당히 높게 유지시켜야 한다. 따라서 대량 생산 공정에서는 응용이 쉽지 않으리라 생각한다.

다음으로 산화효소의 산소첨가 반응 중 cofactor 재생 방법에 대해 알아보겠다. 효소 공정에서 가장 널리 이용되는 cofactor 재생 방법은 NADH를 재생할 경우 formate dehydrogenase (FDH)나 alcohol dehydrogenase를 이용하고, NADPH일 경우 glucose dehydrogenase나 유전자 조작된 FDH가 이용되고 있다. 특히 FDH가 이용될 경우 기질인 formate 가격이 저렴하고, cofactor 재생중 부산물로 이산화탄소가 생성되어 공기중으로 방출되어 반응산물의 분리에 영향을 주지 않으므로 가장 널리 이용되고 있다.

전세포가 촉매로 이용될 경우 즉 미생물 발효공정에서 사용하는 cofactor 가 탄소 대사 과정중 재생되므로 (예를 들어 1 mol 포도당에서 12 mol 의 reduction equivalents 재생) cofactor 재생 면에서 효율적이고 경제적인 방법으로 평가 되고 있다.

마지막으로 in situ product recovery와 cofactor 재생이 실제 생물전환 공정에서 어떻게 적용되는 가를 두 가지 예를 통해 알아 보겠다.

### (1) 효소 공정

그림 1A는 FDH에 의해 재생된 NADH를 이용하여

styrene monooxygenase가 styrene을 (S)-styrene oxide로 산화시키는 과정을 보여주고 있다 (9). 반응산물인 styrene oxide가 StyAB를 불활성화 시키고 또한 산화반응을 저해할 수 있으므로 dodecane을 product sink로 하는 two-liquid phase 시스템이 이용되었다. 기질과 반응산물은 대부분 유기용매 층 (반응기내에서 지름 10 $\mu$ m 정도의 구로 존재)에 존재하고 소량의 기질이 수용액상으로 분배되어 효소에 의해 반응산물로 전환된 후 유기용매 층으로 이동한다.

Styrene monooxygenase는 StyA와 StyB로 구성되어 있는데 StyB는 NADH를 이용하여 FAD를 FADH<sub>2</sub>로 환원시키고, StyA가 이것을 이용하여 styrene을 산화시킨다. 반응 중 StyB에 의해 재생된 FADH<sub>2</sub>가 산화되면서 과산화수소를 만들기 때문에 catalase가 첨가되었다. 또한 생물전환 중 산소 분자가 제 2 기질로 사용되므로 반응기의 교반과 공기공급 속도가 충분히 높아야 한다. 하지만 통기속도가 높을때는 기체-액체의 접촉면에서 StyA가 불활성화 되므로 반응기의 교반속도와 공기공

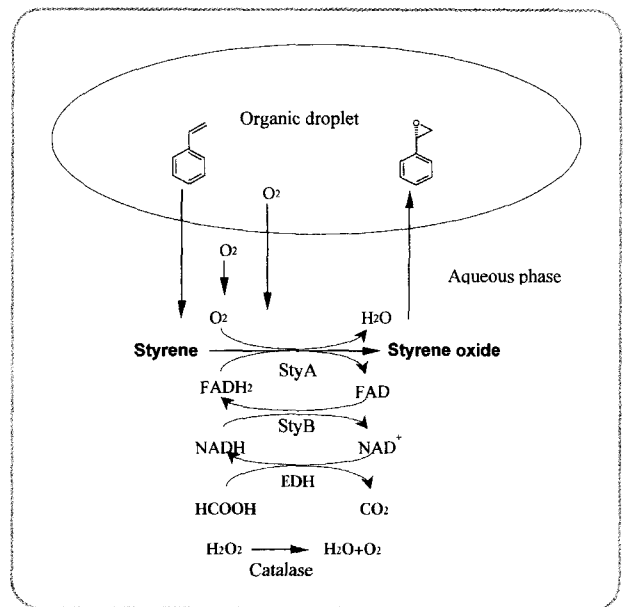


그림 1A. 효소 공정에 의한 styrene oxide 생산. StyAB: styrene monooxygenase, FDH: formate dehydrogenase

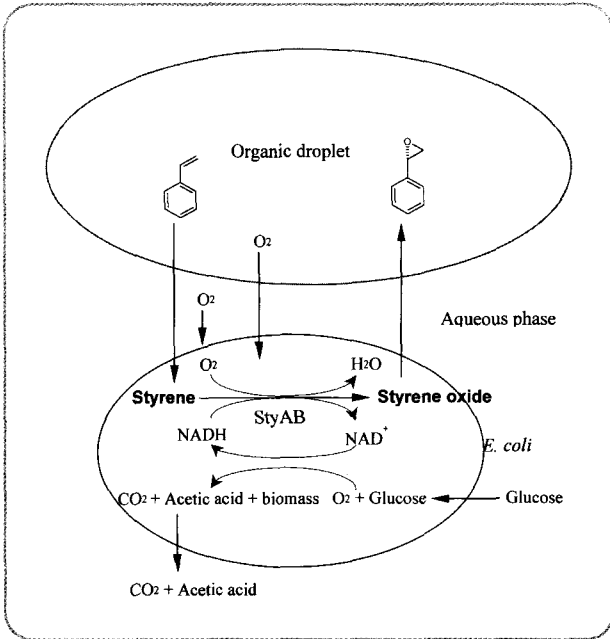


그림 1B. 미생물 발효 공정에 의한 styrene oxide 생산

급속도를 높이는데 한계가 있었다. 기체-액체의 접촉면에서 StyAB의 불활성화를 최소화하기 위해 bovine serum albumin (BSA)를 2g/L로 첨가하였다. StyA 농도가 2g/L, NAD 농도가 1mM일때 반응산물의 농도와 생산성은 60mM, 50U/L였다. 이 결과는 보고된 산화효소의 효소 공정 중 가장 높은 반응산물 농도와 생산성이다. 하지만 세포 밖에서 StyA가 안정하지 못하고 산소공급이 충분하지 못해 StyA의 평균 비반응속도는 최대치의 1% 미만에 머물렀다.

## (2) 미생물 발효 공정

그림 1B에서는 BEHP를 organic carrier solvent로 하고 styAB를 발현하는 재조합 대장균을 촉매로 하는 styrene oxide 생산공정을 보여주고 있다 (13). 기질과 반응산물의 99% 이상이 유기용매 층에 존재하고 그 이외의 생촉매 및 탄소원 등은 수용액상에 존재한다. 유기용매층(유기용매 방울)에 존재하는 기질은 수용액상으로 분배된 후 또는 생촉매와의 충돌이나 접촉을 통해

세포내로 이동된다. 산소분자는 유기용매에서 용해도가 물에 비해 7배 이상 높기 때문에 상당부분이 유기용매 층을 경유하여 세포에 공급될 것으로 생각된다.

NADH는 탄소원의 대사과정 중 재생되므로 생물 전환 중 세포의 대사활성을 유지시키기 위해 포도당을 충분히 공급하고 용존산소를 5% 이상으로 유지하였다. 또한 생물전환의 생산성을 높이기 위해 생산균주 농도가 18g dry mass/L일 때 styrene epoxidation을 유도하였다. 반응 중 반응산물의 평균생산성은 600U/L까지 증가하였고 최종농도는 300mM였다 (13). 또한 StyAB의 비생산속도를 효소공정과 비교하면 미생물 발효공정에서 10배 이상 높게 유지가 되었다. 결론적으로 StyAB의 활성과 안정성이 세포내에서 높게 유지되고 cofactor가 효율적으로 재생되었기 때문에 높은 생산성을 보인 것으로 생각한다. 생산성과 반응산물의 농도를 더 높이기 위해서는 반응산물에 대한 생촉매의 내성을 높이거나 반응산물의 독성작용을 보다 효과적으로 차단하여야 할 것으로 생각한다.

## 3. 전 망

산화효소를 이용한 building block이나 commodity의 고농도 생산은 주로 반응산물의 효소나 생산균주에 대한 강한 저해작용으로 제한받고 있다. 하지만 그림 2 (13)에서 보여주듯이 산화반응의 생산성은 반응산물의 화학구조에 큰 상관없이 2000년 이후 빠른 속도로 증가하고 있다. 예를들어 최근 보고된 two-liquid phase 시스템과 재조합 대장균을 이용한 styrene oxide 생산 공정은 기질과 반응산물의 강한 독성에도 불구하고 생산성과 최종 반응산물의 농도가 각각 600U/L, 310mM까지 증가하였다. 이와같은 비약적인 발전은 유전자 재조합 기술과 대사공학을 이용한 생촉매 개발뿐 만 아니라 in situ product recovery의 최적화에 의해 이루어졌다고 생각한다. 아직 two-liquid phase 시스템이 산업적으로 이용된 예는 보고되지 않았지만 pilot scale에서 안

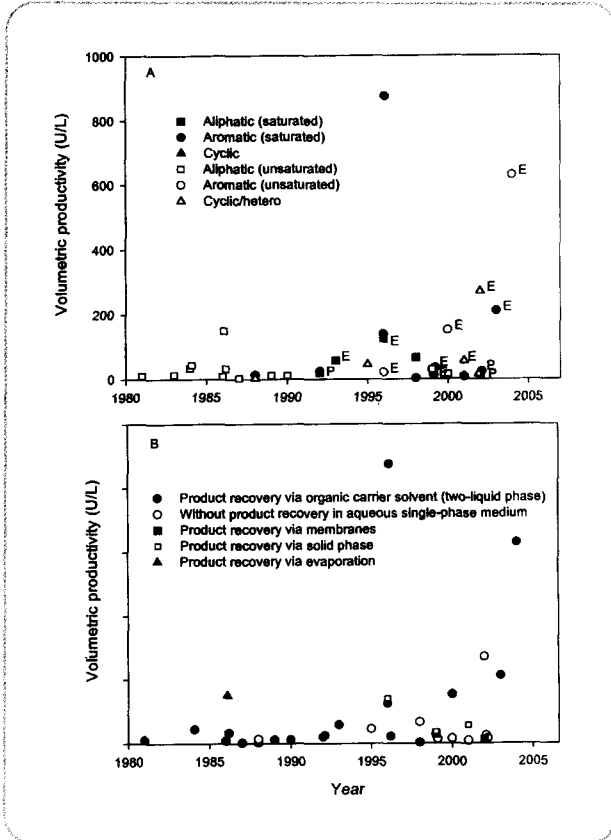
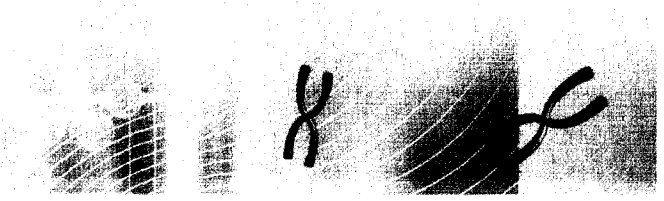
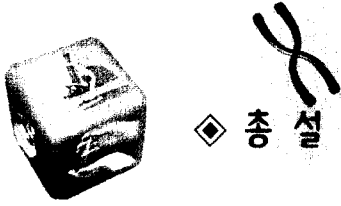


그림 2. 연도별 산화반응의 생산성 증가 추이. A, 반응산물의 화학 구조와 사용된 촉매의 종류. E는 재조합 대장균을, P는 재조합 *P. putida*를, 그 이외는 야생균주나 돌연변이 균주를 촉매로 이용한 공정을 나타내고 있다. B, A에 제시된 산화공정에서 사용된 in situ product recovery (adopted from (13))

정적인 조업이 가능하였고 현재 산업체에서 많은 연구를 진행하고 있기 때문에 곧 탄화수소와 같은 독성물질의 대량생산에서 중요한 역할을 하리라 생각한다. 또한 building block이나 commodity에 속하는 물질들은 물리화학적 특성이 유사하기 때문에 한가지 물질에 대한 공정이 개발되면 그 파급효과가 크리라 생각한다. 따라서 멀지 않은 장래에 수많은 유기화합물들이 산화효소에 의해 생산되리라 생각한다.

#### 4. 결 론

산화효소는 화학촉매와 달리 탄화수소를 비롯한 유기 화합물의 산소첨가 반응을 지정학적, 광학적으로 특이하게 촉매할 수 있어 산업적인 유용성이 크다. 하지만 반응산물의 생촉매에 대한 강한 독성과 효소의 불안정성, cofactor 의존성, 산소 요구성 등 여러가지 요인때문에 유기화합물의 고농도 생산이 제한되어 왔다. 이러한 문제점들은 현재 생물 공정 기술과 생촉매 조작 기술의 발전으로 서서히 해결되고 있다. 따라서 곧 산화효소를 이용한 제품 생산의 다양화가 이루어 지리라 생각한다.

#### 참고문헌

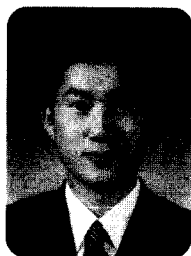
1. Adam, W., M. Lazarus, C. R. SahaMoller, O. Weichold, U. Hoch, D. Haring, and P. Schreier. 1999. Biotransformations with peroxides. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 63:73-108.
2. Buhler, B., I. Bollhalder, B. Hauer, B. Witholt, and A. Schmid. 2003. Chemical biotechnology for the specific oxyfunctionalization of hydrocarbons at a technical scale. *Biotechnol. Bioeng.* 82:833-842.
3. Berry, A., T. C. Dodge, M. Pepsin, and W. Weyler. 2002. Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. *J. ind. Microbiol. Biotechnol.* 28:127-133.
4. Dingler, C., W. Ladner, G. A. Krei, B. Cooper, and B. Hauer. 1996. Preparation of (R)-2-(4-hydroxyphenoxy)propionic acid by biotransformation. *Pesticide sci.* 46: 33-35.
5. Duetz, W. A., H. Bouwmeester, J. B. van Beilen, and B. Witholt. 2003. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:269-277.
6. Duetz, W. A., A. H. M. Fjallman, S. Y. Ren, C. Jourdat, and B. Witholt. 2001. Biotransformation of D-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2829-2832.
7. Gbewonyo, K., B. C. Buckland, and M. D. Lilly. 1991. Development of a large-scale continuous substrate feed process for the biotransformation of simvastatin by *Nocardia* sp. *Biotechnol. Bioeng.* 37:1101-1107.
8. Held, M., A. Schmid, H. P. E. Kohler, W. Suske, B. Witholt, and M. G. Wubbolts. 1999. An integrated process for the production of toxic catechols from toxic phenols based on a designer biocatalyst. *Biotechnol. Bioeng.* 62:641-648.
9. Hofstetter, K., J. Lutz, I. Lang, B. Witholt, and A. Schmid. 2004. Coupling biocatalytic asymmetric epoxidation and NADH regeneration in organic-aqueous emulsions. *Angew. Chem.*



Int. Ed. Engl. 43:2163-2166.

10. Jimenez, I. J., B. Minambres, J. L. Garcia, and E. Diaz. 2002. Genomic analysis of the aromatic catabolite pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4:824-841.
11. Kiener, A. 1995. Biosynthesis of functionalized aromatic N-heterocycles. *Chemtech* September:31-35.
12. Lye, G. J., and J. M. Woodley. 1999. Application of in situ product-removal techniques to biocatalytic processes. *Trends Biotechnol.* 17:395-402.
13. Park, J. B., T. Habicher, B. Hauer, S. Panke, B. Witholt, and A. Schmid. 2004. The efficiency of Recombinant *Escherichia coli* as biocatalyst for stereospecific epoxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* submitted.
14. Shibasaki, T., H. Mori, and A. Ozaki. 2000. Enzymatic production of trans-4-hydroxy-L-proline by regio- and stereospecific hydroxylation of L-proline. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64:746-750.
15. van Beilen, J. B., W. A. Deutz, A. Schmid, and B. Witholt. 2003. Practical applications of oxygenases: issues and accomplishments. *Trends Biotechnol.* 21:170-177.
16. van Beilen, J. B., D. Penninga, and B. Witholt. 1992. Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Biol. Chem.* 267:9149-9201.
17. Wong, J. W., J. H. A. Watson, J. F. Bouressa, M. P. Burns, J. J. Cawley, A. E. Doro, D. B. Guzek, M. A. Hintz, E. L. McCormick, D. A. Scully, J. M. Siderewicz, W. J. Taylor, S. J. Truesdell, and R. G. Wax. 2002. Biocatalytic oxidation of 2-methylquinoxaline to 2-quinoxalinecarboxylic acid. *Org. Proc. Res. Dev.* 6:477-481.
18. Yoshikawa, N., K. Ohta, S. Mizuno, and H. Ohkishi. 1993. Production of cis, cis-muconic acid from benzoic acid. *Bioproc. Technol.* 16:131-147.

약 력



박진병

- 1989. 3. - 1993. 2. 서울대학교 식품공학과 (농학사)
- 1993. 3. - 1995. 2. 서울대학교 식품공학과 (농학석사)
- 1995. 1. - 1999. 2. 두산기술원 (연구원)
- 1999. 3. - 2000. 6. 서울대학교 농업생명신소재 연구센터 (연구원)
- 2000. 7. - 2004. 8. Swiss Federal Institute of Technology (이학박사, 생물공학)
- 2004. 9. - 현재 University of California, Berkeley (Postdoctoral fellow)