

특 집

Bioconversion 기술의 최근 연구동향 및 산업적 응용

Bioconversion 기술 연구동향	김학주
생물전기화학적 기술을 이용한 물질 전환	김병홍
분쇄마찰매체 함유 효소 반응계에서의 생전분의 Maltose로의 직접전환	이용현
Bioconversion process를 이용한 Aspartame 생산연구	최홍규
미생물을 이용한 L-Lycine 생산	정갑택

최근까지 정밀화학분야에서 물질의 합성은 주로 유기합성 방법에 의해 이루어져 왔다. 효소를 촉매로 한 생체반응시스템에서는 주로 식품, 피혁, 의약품, 섬유산업 등에서 응용되어 왔지만 주로 분해반응을 이용한 것이 대부분이었으나, 최근 효소에 의한 합성반응, 전이반응을 이용한 정밀화학제품 생산에 관심이 집중되고 있다. 그 특징으로서는 첫째, 온화한 조건에서 반응이 진행되며 부작용이 없고, 유기용매 또는 유해물질을 사용하지 않는 것이며, 둘째, 높은 기질 특이성으로 유기합성에서는 불가능한 반응 특이성이 있어 입체 특이성 등에서 최대의 장점이 있다. 셋째, 고정화 효소나 미생물을 이용하여 반복 사용이 가능하며 생산성이 높다는 점 등이다. 70년대부터 개화하기 시작한 유전자 조작기술과 상대적으로 생명현상에 대한 규명속도 및 이해가 전보다 깊어지면서 현대과학 전반에 걸친 눈부신 발전이 상호영향을 주고 받으면서 효소반응의 응용기술도 폭과 깊이를 더해가고 있으며 산업적인 응용면도 정밀화학분야 깊숙히 점차로 확장되어 가고 있다. 이번 특집에서는 Bioconversion 기술이 어떠한 방향으로 발전해 가고 있는지 그리고 어떻게 산업적으로 활용되고 있는지 조명하여 보기로하고, 국내 산업체에서의 Bioconversion 기술이 발전 가능성에 대한 재조명의 길목으로 본 특집을 마련하였다.

Bioconversion 기술 연구동향



현대약품연구소 김 학 주

미생물학적 물질변환에 대해서는 인류 초기에서부터 효모를 이용하여 빵, 유제품, 알코올, 음료 등의 생산에 이용하여 왔으며, 주로 농업분야 또는 식품 분야에 국한되어왔다. 1862년 Pasteur에 의해 *Bacterium xylinum*의 순수 배양균주를 사용하여 알코올로부터 초산을 만드는데 응용한 것이 본격적인 시발점으로 보아 무방하겠다. 그 후 *Acetobacter aceti*에 의한 포도당으로부터의 gluconic acid 생산과 *Acetobacter* sp.에서의 sorbitol로부터 sorbose 생산 등이 이루어졌고 정통적인 유기합성 방법에 의해 쉽게 만들 수 없는 반응들에 응용되기 시작하였다. 인류 초기의 혼합배양에 의한 물질변환에의 응용과는 달리 순수배양으로 미생물, 식물세포, 혹은 정제된 효소들에 의해 반응이 이루어지게 되었고 순수한 특정 물질에 대한 새로운 순수물질로의 선별적인 수식도 가능해지게 되었다. 특히 발효와 bioconversion의 차이는 racemates의 분리, 비슷한 반응성을 갖는 여러 기질로부터 특정기능을 갖는 기만의 선별적인 수식, 입체 이성체(chiral center)의 제작, 특정 비활성화된 탄소의 기능 등이 bioconversion에서만 수행할 수 있는 독특한 영역으로서 정밀화학분야, energy 분야, 환경오염분야에서의 특히 미래의 관심 기술로 대두되고 있다.¹⁾

Bioconversion 반응계에서는 whole cell을 사용하는 방법과 분리정제된 효소를 사용하는 두 가지 방법으로 나눌 수 있다. whole cell을 사용하는 방법에서의 단점은 세포의 순수배양이 필요하고 작업 시 반응시간이 오래 걸리며 매우 많은 cell mass로부터 반응 생산물의 분리 문제가 있고 부반응이 일어나는 점 등이다. 효소를 사용하는 방법에서는 특이적이고 선택적인 방법이 가능하며 작은 규모의 설비와 간단한 작업공정과 짧은 시간이 소요되는 장점이 있으나²⁾ 효소 값이 비싸고 보 효소(enzyme

cofactor)의 첨가 또는 재순환이 필요한 점 등이 단점으로 지적될 수 있다.³⁾

효소와 기질 사이의 이상적인 반응계로서는 그림 1과 같이 첫째, 높은 반응속도를 가지며 둘째, 높은 입체 특이성과 셋째, 기질이 수용성이고 넷째, 기질이 세포막을 용이하게 통과할 수 있고 다섯째, 반응속도가 기질이나 반응 생성물에 의해 저해되지 않는 조건이라야만 하나 현실적으로는 여러가지 문제에 접하게 되어 이를 해결하기 위해 그림 2와 같은 해결방법이 요구된다 하겠다.⁴⁻⁶⁾

첫째, 기질이 반응용액에 난용성일 때 유화제를 사용하거나 비교적 수용성 용매(ethanol, acetone, propylene glycol, DMSO, ethylene glycol monomethyl ether etc)에 미리 용해시켜 반응용액에 첨가시키는 방법과 결정성 기질일 때 미세분말화하여 사용하는 방법들이 고려될 수 있고 둘째, 기질이 세포막을 통과하지 못할 때 세포안으로 기질이 통과할 수 있도록 물리화학적 처리(세포의 미세분말화 건조, 아세톤처리, 동결건조, 자가분해, lysozyme 처리, 세정제처리, 삼투압 충격요법, 냉동 및 용해, 초음파 파괴 등)에 의한 세포막 파괴로 기질의 투과성을 증가시키거나 정제효소를 사용하는 방법이 이용될 수 있을 것이다.

셋째, 낮은 반응속도나 기질 특이성 및 입체 특이성을 보여줄 때 효소 유발제를 사용하거나 돌연변이법이나 유전자 조작 기술에 의한 유전 정보의 개량이나 미생물을 새로 선별하는 방법을 도입해야 할 경우도 있다. 넷째, 미생물의 생존율이나 재생산에 기질이 영향을 줄 때 성장억제효과를 주지않도록 2상 용매나 그 이상의 반응용매를 고려하거나 기질 농도를 낮추고 유해한 농도 이전에 반응이 진행되도록 기질 농도를 선정하도록 하고 마지막으로 기질을 수식하여 무해한 형태에서 반응이 완료된 후

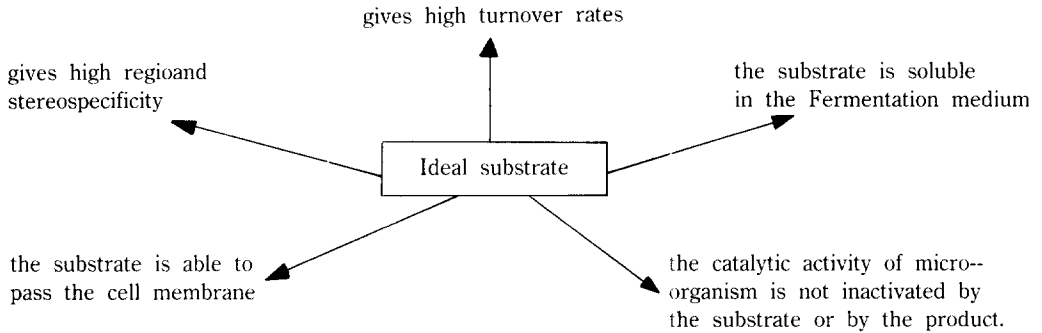


Fig. 1. The ideal interactions between the substrate and the microorganism.

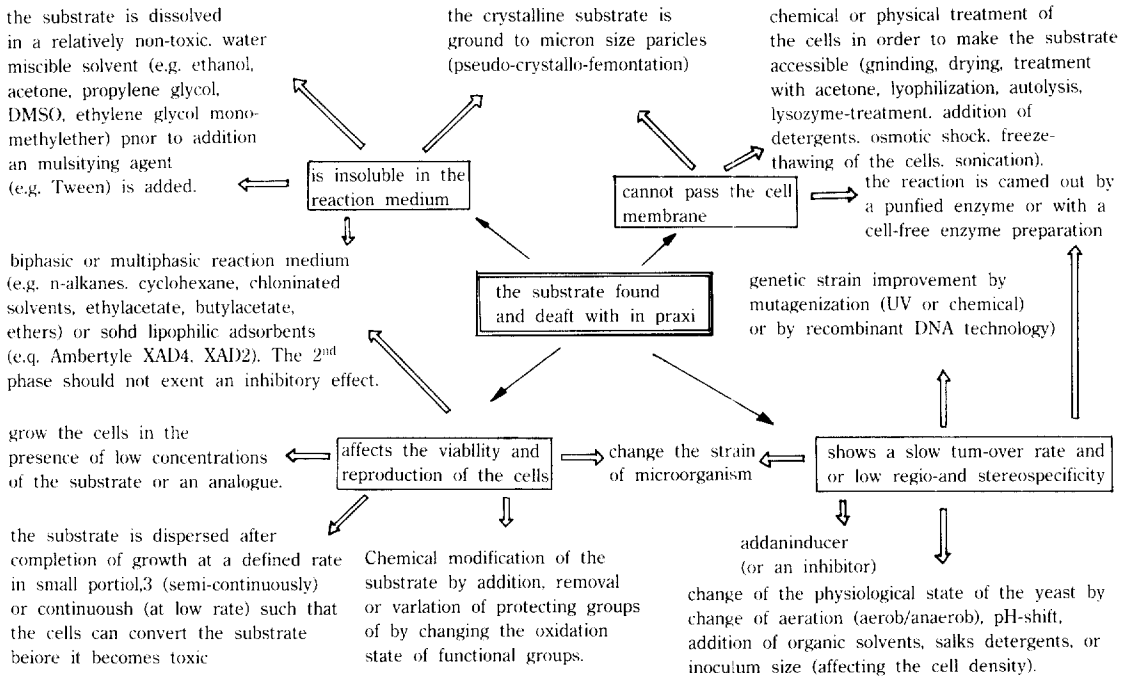


Fig. 2. Advice how to deal with basic problems often encountered in bioconversion.

수식기를 제거하는 방법이 고려되어야 할 것이다. 의약품 산업에서는 최근까지 생체 유해물질과 약효를 나타내는 모핵으로부터의 반합성이나 전합성에 의한 신약개발이 이루어져왔으나 점차로 합성에서의 입체 이성체의 선별적인 합성 또는 분리방법이 어려운 반응과정들이 많이 대두되게 되어 경제성에 문제를 갖게 되었다. 이러한 어려움을 해결하기 위하여 bioconversion 기술이 활발하게 연구되고 실용화되어지고 있다.

예를 들면 항 고혈압 치료제인 captopril의 합성 공정에서 핵심 중간체인 광학 활성이 있는 3-chloro-

2-d-methyl propanoyl chloride를 미생물 효소에 의해 만든 광학 활성인 3-hydroxy-2-d-methyl propanoic acid로부터 만드는 방법이 개발되었으며(그림 3)⁷⁻⁹⁾ carbapenem 및 captopril 합성의 중요 전구체인 광학 활성을 가진 β -hydroxy carboxylic acid를 carboxylic acid로부터 bioconversion 기술에 의해 만드는 방법을 Kanegafuchi Co.가 개발하여 carbapenem의¹⁰⁻¹²⁾ 중요 중간체인 acetoxy azetidinone의 합성에 사용하고 있으며 이를 바탕으로 carbapenem 연구집단들에게 중요 중간체들의 공급자로 인정받고 있는 실정이다.

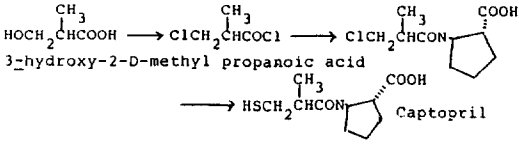


Fig. 3. Captopril synthesis from 3-hydroxy-2-d-methyl propanoic acid.

당뇨병 치료제인 인슐린의 경우 돼지 췌장으로부터 추출 정제한 인슐린을 사용하여 왔지만 장기간 사용함으로써 항체가 생성되고 인슐린 저항성 당뇨병으로 진행되는 경우가 발견되고 있어 인체 유래 인슐린을 사용해야 하는 문제가 제기되었고 이를 생산하기 위해 전합성, 효소 변환법, 유전자 조작기술에 의한 생산방법이 개발되었고 bioconversion 기술인 효소 변환에 의한 인체 유래 인슐린 변환은 표 4와 같은 방법을 사용하고 있다.^{13 16)}

돼지 유래 인슐린은 사슬 말단이 인체 유래 인슐린의 트레오닌 대신 알라닌으로 되어 있어 carboxypeptidase나 protease로 잘라낸 후 트레오닌을 합성법으로 연결하는 공정으로 만들 수 있으며 효소의 반응 부위 특이성이 높아 전 공정 생산성이 52%에 달하는 결과를 보여주고 있다.¹⁵⁾

유전자 조작에 의해 효모로부터 생산된 single chain B(1-29)-A(1-21) insulin(SCI)을 *Achromobacter lyticus* protease I(lysyl endopeptidase) 효소를 사용한 1단계 반응으로 인체 유래 인슐린의 효율적인 생산방법도 소개되고 있다.¹⁷⁾

β -lactam계 항생물질의 반합성 중간체인 6-APA, 7-ACA의 제조에서도 penicillin acylase 또는 cephalosporin acylase를 사용하여 경쟁력을 갖춘 제조 공정으로 자리를 잡았고^{18 21)} ampicillin, amoxicillin, cephaloglycine, cephalothin, cefacetrile 등도 효소를 이용하여 6-APA, 7-ACA로부터 bioconversion 시키는 기술이 개발되어 생산 공정으로의 연구가 이루어지고 있다.^{22 24)}

Aminoglycoside 계열의 항생물질 중에는 kanamycin B로부터 3'-phosphorylated kanamycin B를 만들고 합성방법으로 3'-탄소 위치의 OH기를 수소로 치환시켜 tobramycin으로 만드는 공정이 국내에서도 개발되고 있다. 이외에도 steroid 화합물의 미생물 변환은 40년 이상의 오랜 역사를 갖고 있으며 류마치스성 관절염에 유효한 corticoid를 대두유로부터

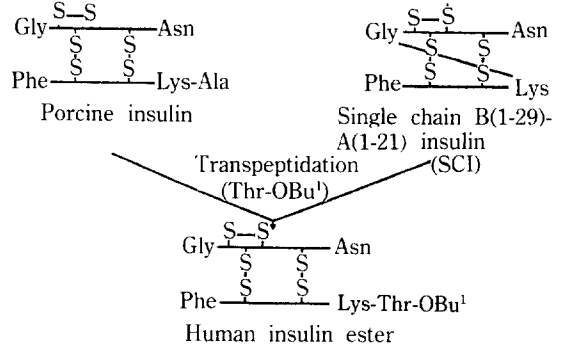


Fig. 4. Conversion of porcine insulin or SCI into human insulin ester by transpeptidation with trypsin.

추출한 stigmasterol 또는 diosgenin으로부터 화학합성 및 미생물 변환반응에 의해 hydrocortisone을 만들고 활성이 강한 prednisolone으로 변환시키는 biotransformation 공정이 개발되어 생산 공정에 이용되고 있으며 요약된 내용이 그림 5에 잘 나타나 있다.

해산계 의약품으로는 뇌수술에 따른 의식장애, 뇌출혈에 의한 부분마비현상 회복 등에 널리 쓰이는 CDP-choline을 5'-CMP와 choline으로부터 효소 합성하는 방법이 개발되었다.²⁵⁾

이는 효소원으로 효모 균체를 사용하며 반응공정은 그림 6과 같다.

이 반응은 3단계로 나뉘어 반응이 이루어지며 에너지 생성제와의 조화가 반응을 효율 높게 진행시키는 요인이 되며 현시 55-65% 생산성을 보여주고 있다. 의약품 중간체로서의 d-para hydroxy phenyl glycine, L-DOPA, d-phenyl glycine, yeast를 이용한 ATP, NAD, FAD, CoA 등의 생산, 항바이러스제로서 Uridine으로부터 합성으로 ara -A가 90% 수율로 만들어지고 있다.

할로겐화지방족 또는 방향족 탄화수소화합물의 Bioconversion 기술은 통상의 합성방법으로는 값이 비싸거나 얻기 힘든 입체특이적인 중간체와 최종 화합물을 얻을 수 있고, 얻은 화합물들이 자연 생태계에서 쉽게 분해될 수 있는 특징을 가지고 있어 난분해성 할로겐화합물의 생분해로 환경보호에 기여할 수 있는 장점이 있다.

1982년에서 1984년에 공업적으로 생산되어 자연계에 방출된 염화탄화수소 화합물 또는 불화탄화수

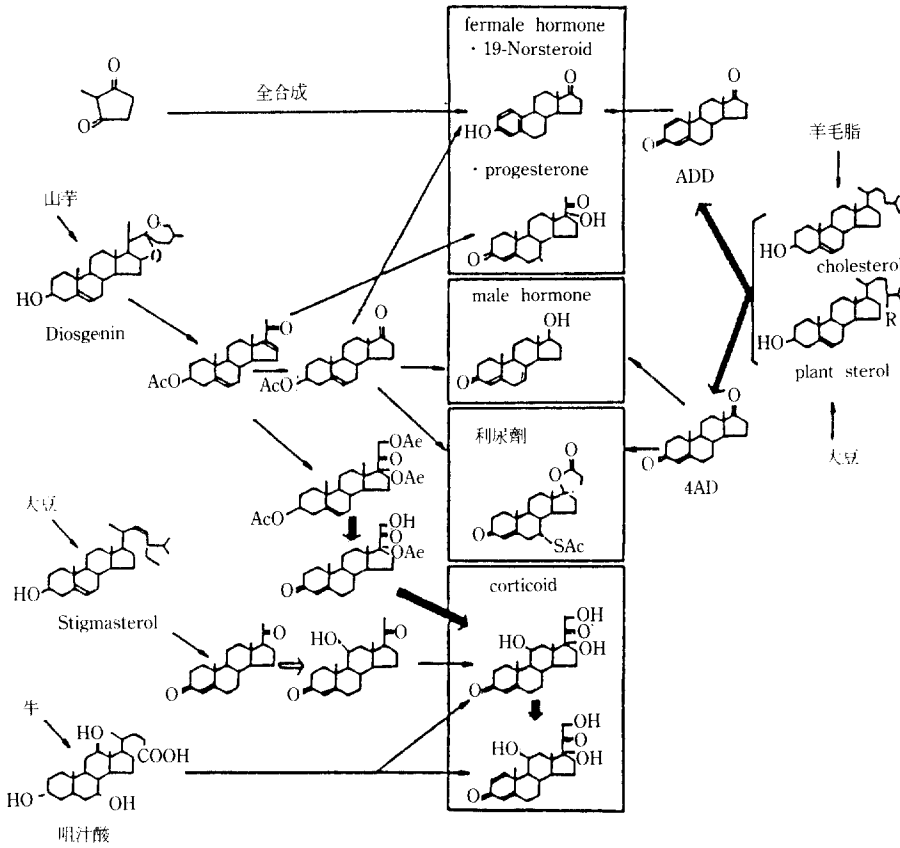


Fig. 5. Process diagram for steroid pharmaceuticals.

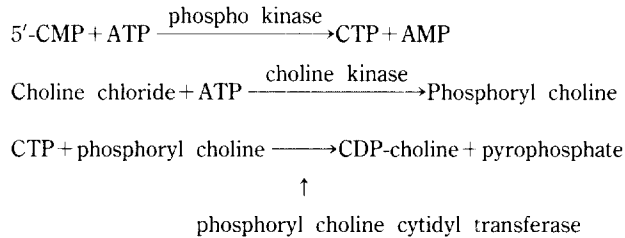


Fig. 6. CDP-choline production by bioconversion.

소 화합물은 각각 230만톤과 27만톤으로 대부분이 합성된 물질로 독성이 크고 잘 분해되지 않는 특징이 있다. 예를 들면 살충제인 2,4-dichloro phenoxy acetic acid(2,4-D)는 쉽게 생분해되지만 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid(2,4,5-T)는 반분해성으로 보다 강력한 살충력을 갖고 있다. 일반적으로 탄소와 할로젠 결합에서 electro-negativity가 클수록 난분해성으로 알려져 있다.

자연계에서의 탄소와 할로젠 결합을 분해하는 기

전은 효소반응이 아닌 산화효소에 의한 환구조의 분해시 일어나는 할로겐의 이탈과 특정효소(dehalogenase)에 의해 할로겐이 분리되는 과정을 거치게 된다. Dehalogenase는 작용기전에 따라 세 그룹으로 나눌 수 있으며 hydrolytic dehalogenation-(RCH₂X → RCH₂OH), reductive dehalogenation-(RCH₂X → RCH₃), dehydrohalogenation(RCHXCH₃ → RCHCH₂)으로 구분될 수 있다.

할로젠 화합물의 경제적인 또는 환경학적인 중요

성 때문에 공업적인 합성 공정에서 미생물학적 Bioconversion 기술의 응용연구가 활발하게 진행되고 있으며 할로겐화 합성 중간체의 경제적인 생합성 연구분야와 합성된 할로겐 화합물의 무독화 내지는 생분해 연구분야로 나뉘어지고 있다. Dehalogenase의 공업적 합성공정에서의 사용으로는 2-monochloropropionate(2-MCPA)라는 중간체가 제조제나 의약품 원료 중간체로 사용되고 있으나 합성법으로는 좌·우선성 입체 이성체의 혼합물로 만들어져 그 다음 단계 반응에서 낮은 생산성으로 가격이 높아지고, 때로는 독성만을 증가시키는 결과를 초래하게 된다. 해결방법으로는 이성체 혼합물에서 필요없는 이성체를 효소를 사용한 입체 특이적 에스테르화 과정으로 제거하는 방법과 효소의 입체 특이성을 이용한 2-halo acid dehalogenase로 선별적 dehalogenation시켜 제거하는 방법이 사용되고 있다.²⁸⁾

환경보호 측면에서는 표피수나 지하수에 오염된 살충제의 제거에 사용될 수 있으나 법적 규제 정도와 처리비용의 경제성 등에 의해 미래 주목받는 환경보호 기술로 등장할 것이다.

이외에도 산업적으로 응용되고 있는 bioconversion 공정은 다양하게 뿌리내리고 있으며 lysine, alanine, cystein, D-phenylglycine, Asparatic acid, Tyrosine, tryptophan, Serine 등의 아미노산 생산에도 발효법이나 합성법에 대신하여 산업화 공정으로 사용되고 있고, 최근에는 생물자원의 고도활용 측면에서 신규 에너지원의 개발이 부각되고 있으며 cellulose의 알코올 변환, 알코올로부터 ethylene, ethylene으로부터 peroxidase에 의한 ethylene oxide의 생산 또는 propylene에서 propylene oxide의 생산 등이 cetusa에 의해 개발되었다. 식품공업에서도 aspartame, fructooligo당 등 설탕 대체용 감미료 생산에 bioconversion 기술을 사용하고 있고 비타민 C 생산에도 합성과 bioconversion 공정을 함께 사용해야 생산성을 극대화할 수 있어 경쟁력 있는 기술로 개발되고 있다.

미래에는 새로운 효소의 발견 및 개발에 힘입어 고정화효소, 고정화미생물에 의한 Bioconversion 기술의 응용영역이 합성 및 의약품 생산에 본격적으로 도입될 것으로 사료되며 단순히 경제적인 입장에서만이 아닌 신규 화학반응의 개발과 자원절약, 환경

정화를 염두에 둔 연구분야가 비중을 높여갈 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Chakrabarty, A.M. *Pure Appl. Chem.* 1988, **60**, 837.
2. Whitesides, G.M. In *Applications of Biological systems in Organic chemistry.*; Jones, J.B., Sih, C.J., Perlman, D., Eds; Wiley; New York, 1976; pp.901-927.
3. Mosbach, K. In *Applications of Biological systems in organic chemistry.*; Jones, J.B., Sih, C.J., Perlman, D., Eds.; Wiley; New York, 1976; pp.969-994.
4. Leuenberger, H.G.W., In *Biotransformations*; Kieslich, K., Ed.; Verlag Chemie.; Weinheim, 1984; Vol. 6a, pp.5-29.
5. Yamada, H., Shimizu, S. *Angew. Chem.* 1988, **100**, 640.
6. Ohlson, S., Larson, P.O., Mosbach, K. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1979, **7**, 103.
7. Shimazaki, M., Hasegawa, J., Kan, K., Nomura, k., Nose, Y., Kondo, H., Ohashi, T., Watanabe, K. *Chem. Pharm. Bull.* 1982, **30**, 3139-3146.
8. Hasegawa, J., Ogura, M., Hamaguchi, S., Shimazaki, M., Kawaharada, H., Watanabe, K. *J. Ferment. Technol.*, 1981, **59**, 203.
9. Cohen, N., Eichel, W.F., Lopresti, R.J., Neucum, C., Saucy, G. *J. Org. Chem.*, 1976, **41**, 3505.
10. Ohashi, T. *et al.* Jpn Kokai Tokkyo JP 61-18791 (1986).
11. Ohashi, T. *et al.* Jpn Kokai Tokkyo JP 61-18758 (1986).
12. Hasegawa, J., Orura, M., Hamaguchi, S., Shimazaki, M., Kawaharada, H., Watanabe, K. *J. Ferment. Technol.*, 1981, **59**, 203-208.
13. Masaki, T., Nakamura, K., Isono, M., Soejima, M. *Agr. Biol. Chem.* 1978, **42**, 1443.
14. Schmitt, E.W., Gattner, H.G. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1978, **359**, 799.
15. Morihara, K., Oka, T., Tsuzuki, H. *Nature* 1979, **280**, 412.
16. Jonczyk, A., Gattner, H.G. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1981, **362**, 1591.

17. Morihara, K., Ueno, Y. *Biotech. Bioeng.* 1991, **37**, 693.
18. Abbott, B.J. *Avd. Appl. Microbiol.* 1976, **20**, 203.
19. Japan Kokai Tokkgo JP 50-101584.
20. Shibuya, Y. *et al. Agr. Biol. Chem.* 1981, **45**, 1561.
21. Japan Kokai Tokkgo JP 53-59095.
22. Marconi, W. *et al. Agr. Biol. Chem.* 1975, **39**, 277.
23. Okachi, R. *et al. Agr. Biol. Chem.* 1973, **37**, 1953.
24. Matsumoto, Y. *Hakko To Kogyo* 1980, **38**, 216.
25. Tochikura, T. *et al. J. Ferment. Technol.* 1970, **48**, 763.
26. Kariya, T. *et al. Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.* 1975, **53**, 546.
27. Yamanaka, *et al. Hakko To Kogyo* 1980, **38**, 920.
28. Hardman, D.J. *Critical Rev. Biotech.* 1991, **11**, 1.