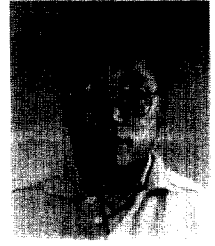


효소기술 개발동향



유전공학연구소 오 태 광

제 1 절 효소기술의 개요

가. 효소의 특성

효소는 생체내의 생화학 반응을 촉진시키는 촉매이다. 효소반응이 상온 상압에서 일어난다는 점과 자연계에 수 많은 종류의 유기물질이 존재함은 효소촉매 작용의 힘이 막대함을 대변한다.

효소가 유기화합물 합성에 촉매로서 사용될 수 있는 가능성은 효소의 여러 장점에 기인하고 있는데 효소의 촉매 효율성은 비슷한 반응조건 하에서의 비효소적(nonenzymatic) 화학반응에 비해 무려 $10^8 \sim 10^{14}$ 배나 되며 기질에 대한 특이성, 광학 활성에 대한 특이성, 화학구조상의 특정부위에 대한 특이성 등의 특성이 있어 화학 촉매반응에 비해 반응의 선택성이 매우 높다.

그러나 이러한 많은 장점에도 불구하고 효소촉매의 실제 산업적 응용범위가 제한적인 것은 효소를 유기합성 공정의 촉매로 사용할 경우 나타나는 문제점에 기인하고 있다. 즉, 단백질의 일종인 효소는 열이나 산, 알칼리에 매우 약하며 유기합성에 흔히 사용되고 있는 유기용매 등에 의해 쉽게 변성이나 불활성화가 일어나게 된다. 또한 반응기질이나 생성물에 의해 효소활성이 저해되는 경우가 많아 기질 또는 생성물의 농도를 증가시키는데 제한을 받음으로서 화학공정에 비해 상대적으로 dilute하게 되며, 효소를 이용한 합성반응에서는 많은 경우 ATP나 NAD와 같은 조효소를 필요로 하여 공정이 복잡하게 되고 경제성을 낮추는 한 요인이 되고 있다.

이외에도 효소의 기질 특이성이 경우에 따라서는 제한된 기질의 사용만을 허용하기 때문에 유사한 구조를 갖는 저렴한 반응기질의 사용 등에 제한적 요소가 되기도 한다.

그러나 최근 유전공학, 단백질공학 및 효소화학 등 기초 학문분야의 눈부신 발전과 생물공정 분야의 기술개발로 이러한 문제점들을 크게 개선시킬 수 있을 것으로 전망되고 있어 효소공학 분야의 응용 가능성이 새로운 각도에서 재조명 되고 있다. 특히 자연상태에 적합하도록 되어 있는 효소를 산업적 목적에 적합하도록 변형시키는 효소의 새로운 신기능 개발과 비수용성(non-aqueous) 효소반응기 기술개발 등 효소기능의 활용기술개발은 효소 촉매의 이용에 혁신적인 변혁을 가져올 것으로 기대되고 있어 주목되고 있다. 즉 최근까지의 효소반응은 상온 상압 등 온화한 조건하에 수용액 상태에서 생체내에 일어나는 자연반응을 이용하는 것이 거의 대부분이었으나 최근 1980년대에 들어서 기존의 효소반응의 개념을 벗어난 인위적, 비자연적 상태에서 효소반응에 대해 연구한 결과 새로운 효소반응의 특성이 밝혀지면서 종래의 효소 촉매반응과 구별되는 nontraditional biocatalysis의 개념이 형성되었다.

기존의 효소 촉매반응에 대한 nontraditional biocatalysis의 특성을 <표 2>에 정리하였는데 크게 네 범주에서 종래의 효소반응 개념과 다른점을 열거하였다. 먼저 효소촉매 자체가 종전의 천연형 효소 사용에서 최근에는 산업적 목적 등에 부합되게

표 1. 효소촉매의 장·단점 요약

장 점	단 점
<ul style="list-style-type: none"> • 광범위하고 다양한 유기 반응 촉매 • 기질에 따라 선택적임. • 광학활성(enantioselective) 보유 • 특정부위 반응성 (regiospecificity) • 상온, 상압조건 (mild conditions)하에서 효율적임. 	<ul style="list-style-type: none"> • 강산성, 고온 상태에 서 불활성화 • 대부분의 유기용매에서 제한된 활성 지님. • 소기의 활성을 위해 조효소(cofactors) 소요 • 제품 및 기질의 영향에 민감 • 효소의 가격이 비교적 고가임.

으며 특히 화학합성에 의해 만들어진 합성효소(synthetic enzyme)나 단일항체기술을 응용한 촉매 항체(catalytic antibody)는 기존의 천연효소의 변형이 아닌 인위적인 생체효소의 창출이라는 면에서 특기할만 하다. 이러한 변형 또는 인공합성된 효소를 xenozyme이라고 부르기도 하는데 최근의 단백질공학기술의 발전으로 효소의 구조와 기능간의 관계가 점차 밝혀지고 있어 머지않아 실용화가 될 것으로 전망되고 있다. 또한 효소 특성의 traditional dogma로 자리를 굳혔던 유기용매, 열 등에 대한 불활성화 개념도 수정이 요구되고 있으며 특히 비수계 효소 반응시스템의 개념정립 및 유기용매 존재시 반응평형의 이동을 이용한 가수분해 효소에 의한 유기합성 반응은 산업적으로도 매우 중요한 것으로 평가되어지고 있다.

나. 효소기술의 발전

효소가 상업적으로 이용되기 시작한 것은 1870년대 부터이지만 근대 효소공업의 역사는 통기식 심부배양법(submerged culture)에 의해 미생물효소가 생산되기 시작한 1940년대 중반부터이다. 그 이전까지는 고체배양법(solid-substrate culture)을 사용하였으며 심부배양법의 도입으로 인해 비로소 효소의 대량생산과 공급이 가능하게 되었다. 이때 부터 현재까지를 기술발전 과정에 따라 분류하면 다음과 같다.

1940년대 중반부터 60년대 중반까지를 제 1세대

표 2. 재래 및 새로운 생물촉매의 특징

구분	재래성 생물촉매	새로운(비재래형) 생물촉매
생물촉매	천연효소	개조 혹은 합성효소 <ul style="list-style-type: none"> • 효소조작 • 인공(합성)효소 • 촉매항체 • 화학적 개조효소
반응매edia	수용성 용매	비수용성 매edia <ul style="list-style-type: none"> • 유기 biphasic system • 미수계 유기단계 • 초임계용액
반응환경	상온조건	극한상황 <ul style="list-style-type: none"> • 고온 • 고압 • 극한 pH • 높은 염도
반응형태	정상반응	비정상 반응 <ul style="list-style-type: none"> • 비천연 기질 • 예기치 못한 반응

효소공업시대, 1960년대 중반부터 1980년대 중반 까지를 제 2세대 효소공업시대, 그리고 그 이후를 제 3세대 효소공업시대로 분류하여 각 세대별 효소 공학기술의 시대적 특징을 나타내었다. 그림 1에서 볼 수 있듯이 이제 바로바로 제 3세대 효소공업시대에 접어들었으며 이 기술은 향후 10여년 동안 크게 발전하여 2000년경에는 상당한 산업적 impact를 가져올 것으로 예상되고 있다. 제 3세대 효소공업시대의 기술특징은 유전자 재조합 균주를 이용하여 효소를 생산하고, 단백질공학기술을 이용하여 인공적으로 산업적 목적에 맞도록 변형시킨 효소를 사용하며, 비수계(non-aqueous) 효소반응기 기술을 이용한 비자연적(unnatural) 효소반응의 산업적 이용으로 요약할 수 있다. 따라서 이제 효소 공학분야는 여러 종류의 다양한 타분야 기술을 필요로 하는 「복합기술」의 성격을 띄고 있다.

이른바 「제 3세대 효소공학기술」의 개발에 필요한 주요 관련기술들은 기초 연구분야에 미생물 탐색기술, 유전공학기술, 단백질공학기술, 단일클론항체기술 등이, 그리고 응용연구분야에 유기합성기술, 생물반응기술, 발효공학기술, 분리·정제기술 등이

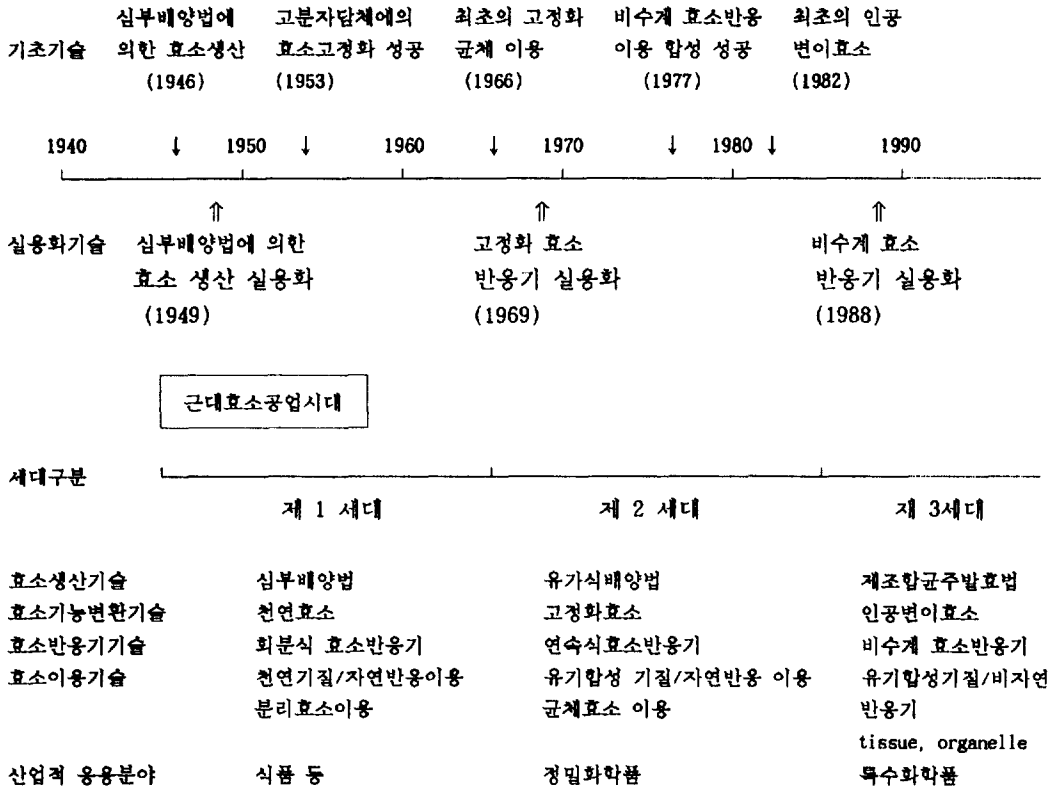


그림 1. 효소공학기술의 발전사

서로 상호 연계되어 있다.

다. 효소촉매 기술개발 동향

효소촉매 기술개발동향을 두가지 측면에서 살펴 보고자 한다. 한가지 측면은 효소자체의 특성 및 기능을 보완 발전시키기 위한 것이며, 다른 한 측면은 효소의 생산 효율성을 증대시키기 위한 것이다. 전자는 이미 앞에서 기술한 바 있는 효소의 특성가운데 효소의 촉매로서의 단점들인 안정성 미흡, 특이성 및 촉매능력의 한계 등을 개선하기 위한 효소촉매의 단점보완 방향과 효소촉매 자체가 가지는 잠재능력을 최대한으로 증대하기 위한 효소촉매의 장점 증대방향으로 구분된다. 한편 효소 생산의 효율성 향상기술에는 1970년대 중반이후에 응용되기 시작한 유전자 재조합기술과 aqueous two-phase partitioning을 소개한다.

1) 효소 특성 변환기술

가) 단백질 공학기술

단백질공학(protein engineering)은 단백질의 기

능을 의도적으로 설계변경하여 여러가지 필요에 부합하도록 하는 기술로서 효소이용기술의 발전에 큰 기여를 할 것으로 기대된다. 단백질 공학기술을 효소에 응용할 경우 반응속도의 증가, 열 및 유기용매에서의 안정성 증가, 최적 pH의 변화 이외에도 기질 특이성 및 반응특이성의 변이 등이 기대되며 조효소 요구성, 단백질 분해효소에 대한 저항성, allosteric 제어의 완화 그리고 분자량 및 subunit 구조의 변화 등이 가능하다. 최근에는 단백질의 구조와 기능간의 관계 해석에 대한 연구가 활발하여 computer aided enzyme design이 가까운 시일내에 실현될 것으로 전망되고 있다.

단백질 공학기술을 효소의 활성증대에 응용한 첫예로 널리 인용되고 있는 Fersht 등의 실험결과를 보면 tyrosyl tRNA 합성효소의 35번 아미노산 잔기를 cysteine에서 serine으로 치환함으로써 ATP에 대한 친화력이 증대되어 증가되는 것으로 나타나고 있으며, subtilisin의 경우 222번의 methionine을

alanine 또는 serine으로 치환함으로써 효소제제에 첨가되는 표백제(peroxide류)에 대한 안정성이 크게 향상되는 것으로 밝혀져 주목되고 있다.

나) 인공효소

효소의 기능을 모방한 소위 생체 모방기술(bio-mimics Technology) 연구 분야의 하나로 인공효소(artificial enzyme)에 대한 연구가 최근 주목받고 있다. 인공효소의 기본개념은 기질의 결합(binding) 부위와 촉매작용(catalysis) 부위를 화학적으로 합성하여 만든것으로서 β -cyclodextrin과 같은 천연 물질이나 합성물질인 소위 'crown ether'류 등을 사용한다. 인공효소의 한 예로 β -cyclodextrin을 이용한 인공합성 chymotrypsin의 경우를 보면 효소와 같은 수준의 촉매활성을 지닌다. 이러한 완전 화학합성에 의한 인공효소 이외에도 효소 또는 단백질의 화학수식에 의한 반합성 효소(semisynthetic enzyme)의 연구도 활발히 진행되고 있다.

또한 최근에는 단일항체기술을 이용하여 촉매활성을 갖는 소위 촉매항체(catalytic antibody)에 대한 연구결과가 발표되어 크게 주목받고 있다. Abzyme 이라고도 불리우는 촉매항체의 원리는 특정반응의 transient-state 구조물질의 유사체에 대한 항체를 만들 경우 항체가 촉매활성을 갖게 된다는 것으로서 특히 효소가 천연 반응기질에만 높은 활성을 갖는데 비해 화학합성 물질 등 비천연물질의 촉매반응을 가능하게 할 것이라는 기대와 함께 앞으로의 연구결과가 제시되고 있다.

다) 화학적 수식

단백질 공학에 비해 비교적 오래전부터 연구되어 온 효소의 화학적 수식(chemical modification) 분야 연구는 크게 ① 저분자 물질에 의한 수식, ② 수용성 고분자에 의한 수식, ③ 불용성 고분자 및 담체를 사용하는 효소 고정화로 분류할 수 있다.

저분자 물질을 이용한 화학적 수식방법에 의해 효소활성 및 안전성이 증대될 수 있고, 이외에도 포함된 금속이온을 변화시키므로써 효소의 활성이 100배까지 증대된 예도 있다. 수용성 고분자를 이용한 효소의 수식에 대한 연구가 최근 크게 증가하고 있는데 특히 polyethylene glycol(PEG)을 사용한 화학적 수식방법이 주목받고 있다. PEG로 수식된 효소의 경우 기질 특이성, 최적 반응온도 등의

변화, 유기용매내에서의 안정성 증가 등이 보고되고 있으며 조효소(NAD)의 재사용에도 활용되고 있다.

한편 효소의 고정화(immobilization) 기술은 종래의 가용성인 유리효소(free enzyme)를 불용성으로 바꾸어 줌에 따라 효소의 연속적 재사용을 가능하게 하여 효소공학기술의 발전에 큰 기여를 하고 있다. 기본적인 원리는 효소를 특정한 담체를 사용하여 고정시키는 것으로서 일반적으로 효소의 고정화에 의하여 안정성이 증대된다. 효소의 고정화 방법은 크게 흡착법, 이온결합법, 공유결합법, cross-linking법, 포괄법 등으로 나눌 수 있는데 효소의 고정화에 사용되고 있는 담체들로서는 alginate, carrageenan과 같은 천연 고분자물질, polyacrylamid의 같은 합성 고분자등 주로 고분자 물질이 많이 사용되고 있으며 이외에 bentonite, pore glass 등 무기물질들도 사용되고 있다.

2) 효소기능 활용기술

가) 유기용매에서 효소반응

현재까지의 생체 촉매반응에는 거의 전부가 수용성의 액체 또는 고체를 사용하였으나 최근에는 물에 난용이거나 불용성인 화합물의 반응기술이 크게 발전하고 있다. 이러한 물에 난용성 또는 불용성인 기질이나 기체상태의 기질의 효율적 반응을 위하여는 적합한 유기용매에 녹여 용해도를 증가시키게 되는데 비수계(non-aqueous) 효소반응이란 종래의 일반적인 효소 반응과는 달리 비수용매가 대부분의 반응매질(reaction medium)을 차지하는 형태의 반응을 일컫는다(효소의 활성 발현을 위하여는 물의 존재가 불가결하므로 엄밀히 말하면 무수(anhydrous)상태에 가까운 미수계(microaqueous) 효소반응이라고 할 수 있다.)

일반적인 traditional dogma에 의해 유기용매 하에서의 효소반응이 매우 어려운 것으로 생각되어져 왔으나 의외로 많은 효소반응이 유기용매 존재하에서도 잘 일어나며 경우에 따라서는 오히려 반응속도가 증가하는 연구결과가 발표되고 있다. 이러한 현상은 용해도 증대를 위해 물이 섞이는 유기용매를 대부분 사용한 종래의 경우와는 달리 물과 섞이지 않는(water-immiscible) 유기용매를 사용하는 경우에는 효소의 불활성화가 크게 감소되며 특히 반응매질(reaction medium)에 수분 함유량이 적은

경우 오히려 더 안정해질 수 있다는 사실이 밝혀지면서 점차 일반적인 것으로 받아들여지고 있다.

유기용매에서의 효소 반응연구는 초기 연구에서는 스테로이드나 지방질 등 난용성 반응기질의 용해도 증가를 위해 유기용매를 사용하였으나 소련의 Klibanov, Martinek, Berezin 그룹에 의해 유기용매 존재하에서는 가수분해 반응의 평형이동으로 인해 그 역반응인 합성반응이 가능하다는 사실이 발표되면서 가수분해 효소를 이용한 유기합성 연구가 최근 크게 주목되고 있다. 또한 이상(two-phase) 유기용매계에서 반응시키는 경우 상분리에 의해 생성 물의 회수가 용이하며 기질 또는 생성물에 의한 반응저해를 감소시킬 수 있는 장점이 있다.

일반적인 효소 반응계는 기존의 수용액 반응이 외에 최근 수용성 이상계(aqueous two-phase) 및 수용성 유기용매(aqueous organic media)에서의 효소 반응이 연구되고 있으며 비수계 효소반응의 경우 유기용매 이외에 초임계 유체(supercritical fluid)에서의 효소 반응도 연구되고 있어 그 실용성 여부가 주목되고 있다. 한편 반응 매질이 종래의 수용액에서 유기용매로 전환됨에 따라 유기용매에서의 효소반응에 적합한 효소 고정화 신기술의 개발도 최근 활발히 이루어지고 있다.

효소가 유기용매내에 존재하는 경우 여러가지 특성이 변하는 것으로 보고되고 있다. 예를 들면 pH 의존도, 열안정성, 기질특이성이 수용액에서 효소가 가지고 있는 고유한 성질과는 다르게 나타나며 특히 거의 무수상태의 유기용매(nearly anhydrous organic solvent)에서 변화가 현저하여 현재 효소 반응과 물의 함량과의 관계 규명 연구가 집중적으로 이루어지고 있다.

수용액에서의 효소 반응은 모두 pH에 의해 그 활성이 크게 좌우되는데 최근 Klibanov 그룹에 의해 효소용액을 pH별로 준비하여 동결건조시킨 다음 물 함량이 0.02% 이하의 무수 octane에서 반응시킨 결과 놀랍게도 동결건조시의 pH에 따라 효소활성이 결정되는 사실을 발견하였다. 이는 효소가 수용액 상태에서의 pH를 기억하고 있음을 의미하는 것으로서 효소의 ionogenic group이 이온화된 상태를 동결건조 상태나 유기용매 존재하에서 그대로 간직하고 있기 때문으로 풀이되고 있다.

한편 효소의 활성(또는 안정성)과 유기용매 종류와의 상호관계를 조사한 결과, 일반적으로 소수성(hydrophobic) 유기용매가 친수성(hydrophilic) 유기용매에 비해 효소활성(또는 안정성)이 높은 것으로 밝혀졌다.

또한 유기용매에서 반응시키는 경우 기질에 대한 특이성도 변화하는 것으로 보고되고 있다. Chymotrypsin을 예로 들면 수용액 상태에서는 N-acetyl-L-histidine methyl ester를 기질로 사용하는 경우가 N-acetyl-L-phenylalanine-ethyl ester의 0.5%에 불과한 반면 octane에서는 20배 이상이나 반응이 더 잘 일어남을 볼 수 있다. 최근에는 수용액 상태에서는 일어나지 않는 반응물이 유기용매 존재하에는 가능한 예들이 보고되고 있다. 이러한 유기용매 존재하에서의 기질 특이성 변화는 효소의 구조변화와 깊은 관계가 있을 것으로 추정되고 있으나 아직 정확한 메카니즘은 규명되어 있지 않다. 한편 효소 반응을 저해하는 물질을 이용하여 유기용매 존재하에서의 효소 활성을 증가시키기도 한다. 즉, chymotrypsin을 N-acetyl-L-phenylalanine과 함께 동결건조시켜 유기용매에서 반응시킨 결과 ligand 없이 동결건조한 효소에 비해 35배나 활성이 증가하였으며 subtilisin의 경우는 N-acetyl-L-Trp-NH₂를 ligand로 사용하여 약 100배까지 향상되는 것으로 나타났다. 이러한 현상도 ligand에 의해 보다 더 active한 형태의 conformation이 형성되며 유기용매 내에서는 효소구조가 수용액 상태에 비해 보다 rigid한 형태로 존재하기 때문인 것으로 해석되고 있다.

효소를 water-immiscible한 유기용매에서 반응시키는 경우 효소의 용해도가 매우 낮아 불용성인 형태로 존재하게 되는데 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법중의 하나가 역마이셀계(reversed-micelle system)를 이용하는 방법이다. 역마이셀에서는 정상적인 마이셀의 경우 계면활성제의 친수성기가 바깥쪽을 향하게 되는 것과 반대의 구조를 갖게되며 효소는 역마이셀의 안쪽에 존재하는 water pool에 자리잡게 되어 soluble하게 되는 특징이 있다.

유기용매에서의 효소 용해도 증가를 위한 또 다른 방법으로는 이미 앞에서 언급한 바 있는 PEG-mo-

dification을 들 수 있다. 일반적으로 수용액 상태에서는 PEG 수식효소의 활성이 수식율이 증가할수록 감소하나 유기용매에서는 효소활성을 극대화하는 최적 수식율이 존재하는 것으로 밝혀지고 있다. PEG 수식효소의 경우도 앞서 유기용매 사용의 경우와 마찬가지로 효소의 기질특이성이 변하는데 PEG 수식효소는 유기용매 존재하에서 뿐만 아니라 수용액 상태에서의 반응에서도 기질특이성이 다른 것으로 보고되고 있다.

지금까지 유기용매에서의 효소 반응에 대하여 언급하였는데 non-aqueous reaction medium으로서 최근 주목받고 있는 것이 초임계 유체(supercritical fluid)를 반응매질로 한 효소반응이다. 초임계 유체는 액체와 기체의 중간적인 물리적 성질을 갖고 있으며 특히 유기용매와는 달리 반응후의 medium 제거가 매우 용이한 장점이 있다. 현재 가장 널리 사용되는 초임계 유체는 인체에 해가 없고 저렴한 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxide; SCCO₂)이다. 아직 많은 연구가 되어 있지 않아 실용성 여부를 가늠하기는 어려우나 앞으로의 개발여하에 따라서는 산업적 응용도 가능할 것으로 보고 있다.

나) 고온·고압 효소반응

최근에는 또 반응조건 변수중의 하나인 압력과 효소 반응관계의 연구가 새로운 과제로 등장하고 있다. 한 연구예를 보면 고정화 amyloglucosidase의 60°C에서의 활성 반감기(half-life)가 상압에서는 5 일이나 3,000 Psig에서는 22일로 4배 이상이나 증가하는 것으로 부산물로 생성되는 CO₂를 이용하여 반응 기내의 압력을 높임에 따라 효소 반응속도가 증가하는 것으로 보고된 바 있다. 또한 수소 압력을 증가시킴으로써 조효소인 NADH 재생효율이 증가된다는 연구결과가 발표된 바 있다.

고온·고압에서의 반응연구는 효소 이외에 미생물 배양 등에도 응용되고 있다. 온천, 화산 분화구, 심해(deep sea) 등에서 분리된 미생물 균주를 이용하여 고온·고압에서의 생육정도 등 microbial physiology 측면에서 최근 연구가 진행되고 있는데 아직 많은 실험결과가 보고되지는 않았으나 일반적으로 배양온도가 높은 경우 압력을 증가시킴에 따라 생육정도가 증가하는 것으로 나타나고 있다. 고

온·고압에서의 미생물 또는 효소 반응연구는 앞으로 새로운 분야로 발전할 가능성이 매우 높다.

다) 효소의 비자연적 반응

근년에 들어 효소의 반응기질에 대한 특이성이 종래의 개념과는 달리 효소에 따라서는 전혀 예상 밖의 기질에도 반응이 일어나는 것으로 밝혀지고 있다. 한예로 dgactose oxidase의 경우를 보면 종래 기질로 알려진 galactose와는 전혀 구조가 다른 지방족 또는 방향족 알콜의 산화반응도 가능한 것으로 보고되고 있다. 또한 유기용매를 사용하는 경우 앞서 언급한 바와 같이 반응 특이성이 변하거나 수용하는 경우 앞서 언급한 바와 같이 반응 특이성이 변하거나 수용액에서는 일어나지 않는 새로운 반응이 일어나는 등 unnatural한 효소 반응이 발표되어 효소의 반응 환경에 따라 활성부위의 구조 변화가 일어나는 것으로 추정된다.

이외에 기존의 효소 반응개념을 벗어난 기체 기질에의 효소반응 연구가 흥미를 끌고 있다. 액체상태가 아닌 기체상태의 에탄올등 알코류가 alcohol oxidase 또는 alcohol dehydrogenase 등에 의해 aldehyde류도 전환됨이 밝혀 짐에 따라 추후 기체 기질에 대한 효소 반응의 응용성이 기대되고 있다. 특히 효소센서에 이용하여 유독 gas 검출이나 기체물질의 분석 등에 실용화가 진전되고 있다.

라) 효소 및 조효소 고정화 신기술

효소 반응에 사용되는 효소 촉매의 형태는 그림 2에 나타난 바와 같이 분류할 수 있는데, 앞에서 언급한 바와 같이 유기용매에서의 효소 반응 등 새로운 효소 반응 시스템이 등장함에 따라 이에 적합한 효소 고정화 신기술이 개발되고 있다. 그중 대표적인 것으로는 PEG를 사용하여 유기용매 가용성 효소를 제조하는 방법과 광가교정 수지(photo-crosslinkable resin)를 사용하는 효소 고정화 방법을 들 수 있다. 광가교정 수지의 대표적인 예로는 polypropylene glycol, polybutadiene, polyurethane 등 이외에도 styrylpyridium group을 함유하고 있는 감광성 polyvinyl alcohol류 등이 개발되어 효소 고정화에 응용되고 있다. 또한 reversed micelle이나 liquid membrane을 이용한 수용성 효소 고정화 기술이 재조명되고 있으며 근년에는 자성유체(magnetic fluid)에 효소를 흡착시켜 자성

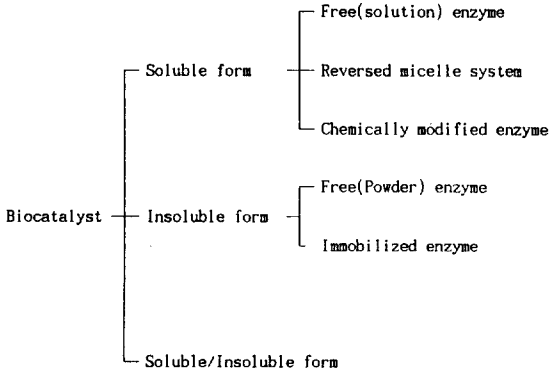


그림 2. 이용형태에 따른 효소촉매의 구분

에 의해 효소를 분리 또는 회수할 수 있는 고정화 방법이 발표되어 큰 관심을 모으고 있다.

그밖에 methacrylic acid-methylacrylate-methylmethacrylate copolymer를 이용하여 반응액의 pH 조절로 soluble-insoluble로 고정화 효소의 형태가 변이하는 새로운 고정화 담체의 개발이 추진되고, 세포활성을 저해하는 toxic solvent를 제거하기 위해 vegetable oil을 calcium alginate gel bead에 함유시키는 방법, 또한 세포농도를 증가시키기 위한 calcium alginate hollow sphere의 이용 등 새로운 고정화 세포기술 등이 개발되고 있다.

또한 최근에 조효소인 ATP나 NAD 등을 수용성 고분자에 결합시켜 막형 반응기(membrane reactor)를 사용 재생시키는 시스템의 개발이 추진되고 있다. 서독의 C.Wandrey 등이 개발한 아미노산 생산공정이 그 대표적인 예로 조효소인 NAD를 화학적으로 수용성 고분자인 dextran이나 PEG 결합시킨 후 alanine dehydrogenase와 formate dehydrogenase를 연결하여 재생시키도록 설계되어 있다.

3) 효소생산의 효율성 향상기술

가) 유전자 재조합 기술의 효소생산 및 분리·정제에의 응용

산업적으로 널리 사용되고 있는 효소들은 거의 모든 gene cloning이 되어 있다고 볼 수 있으며 최근에는 서로 기원이 다른 두개 이상의 효소를 동시에 한 균주에 cloning시켜 미생물 자체를 반응의 촉매로 사용하고자 하는 연구도 이루어지고 있다.

또한 유전자 재조합 기술을 이용하여 효소(단백질)의 분리정제를 효율적으로 할 수 있는 새로운

방법들이 개발되어 유전공학기술의 응용성을 한층 더 높여주고 있다. 단백질 분리에의 응용기술은 크게 hybrid protein을 만든 후 크로마토그래피(chromatography)법에 의해 분리하는 방법과 최근 개발된 metal chelate affinity chromatography 방법으로 나눌 수 있다. 전자의 방법은 원하는 단백질(효소)과 β -galactosidase, protein A, IgG 또는 polyarginine 등 affinity chromatography나 ion-exchange chromatography에 의해 쉽게 분리될 수 있는 단백질과 융합시킨 fused protein이 생성되도록 유전자 재조합 기술을 이용하는 방법이며, 후자는 histidine 함유 펩타이드가 Co^{++} , Ni^{++} 등 금속 이온과 chelate를 형성하여 분리가 용이하다는 점에 착안하여 원하는 단백질(효소)의 C-terminal 또는 N-terminal에 His-(Trp)-chelating sequence를 포함하도록 유전자 재조합시키는 방법이다.

나) 효소 분리 신기술-Aqueous two-phase partitioning

Aqueous two-phase system을 이용한 실용적인 효소 분리공정의 개발은 서독 GBF연구소의 Kula 등에 의해서 1975년경부터 시작되어졌는데 그후 여러 사람들의 연구에 의해 10여년 짧은 연구기간동안 각종 효소의 분리는 물론 최근에는 동물세포 배양으로부터 얻어진 β -interferon의 분리 및 유전공학적 방법에 의해 만들어진 재조합 단백질의 분리에 이르기까지 광범위하게 응용되고 있다.

한편 최근에는 aqueous two-phase system의 효율성을 증가시키기 위하여 phase-forming polymer에 ligand를 부착하여 사용하는 affinity partitioning 기술이 개발되고 있어 효소 또는 단백질의 일차 회수에의 사용에서 앞으로는 정제의 수단으로까지 사용될 전망이다. 특히 aqueous two-phase system을 이용한 효소 분리공정은 scale-up이 용이하며 조업이 간단하여 다단 추출공정 및 연속 추출공정이 개발되어 있는 등 분리공정에 관련된 단위조작 및 장치개발의 연구도 활발히 진행되고 있다.

Aqueous two-phase system을 이용한 효소 분리공정은 상분리(phase separation)를 이용하여 매우 용이하게 단백질 또는 효소를 분리할 수 있다. 최근에는 동물의 조직에서 얻어지는 trypsin 및

chymotrypsin, 동물세포 배양으로부터 얻어진 β -interferon, 재조합 단백질인 β -galactosidase와 protein A의 fusion protein, 그리고 serum albumin 등과 같은 혈장 단백질의 분리에도 이용되고 있다.

또한 기존 two-phase system의 분리효능을 증가시키기 위하여 affinity partitioning이 많이 연구되고 있다. 기본적으로는 affinity chromatography와 같은 개념으로서 분리하고자 하는 효소와 특이적으로 결합하는 ligand를 phase forming polymer에 부착시켜 효소의 분배계수를 크게 증가시키는 방법이다. 이와 더불어 aqueous two-phase system에서 분배가 잘 일어나는 solid adsorbent에 ligand를 붙여 사용하는 affinity chromatography와 affinity partitioning의 혼합방식이 제시되기도 하였다.

Aqueous two-phase system을 이용한 효소 분리공정은 intracellular enzyme의 경우 ① 세포파쇄(cell disruption), ② cell debris제거, ③ 효소 회수 및 polymer분리 단계를 거치며 경우에 따라서는 사용된 polymer 및 salt를 재순환(recycle)시켜 반복 사용할 수 있다.

Aqueous two-phase partitioning 기술을 이용한 효소 및 단백질의 분리가 보편화되기 시작하면서 효율성을 더욱 높이기 위한 몇가지 새로운 방법이 개발되고 있다. 그중의 하나가 Rohm & Haas사에서

개발한 BIOCRYL Bioprocessing Aid(BPA)이다. BPA는 0.1~0.2 μ 크기의 소위 submicron sized polymeric particle(SSPP)으로서 BPA-1000(strong cationic), BPA-1050(weak cationic), BPA-2100(strong anionic) 등 세 종류의 제품들이 시판되고 있으며 weak anionic계, 소수성(hydrophobic) 그룹이나 친화성 (affinity) ligand를 갖는 BPA들이 개발되고 있다.

최근 Sanki사에 의해 개발된 centrifugal partition chromatography(CPC)도 aqueous two-phase partitioning의 분리 효율을 향상시킬 수 있는 새로운 기술로 평가되고 있다. CPC의 기본원리는 liquid-liquid partitioning과 centrifugal force를 이용해 분리하는 일종의 liquid-liquid partition chromatography의 변형된 형태이다. 이를 개발한 Sanki사에서는 실용실용의 소규모에서부터 1000l 용량(처리능력 0.5~1.5 kg/hr)의 산업용까지 판매하고 있다. CPC를 사용하는 경우의 장점으로는 stationary phase가 원심력에 의해 column 내부에 있게 되며 mobile phase의 유속을 크게 증가시킬 수 있어 분리효율 증가 및 처리시간 단축이 가능하고 chromatography의 기능을 갖고 있어 단백질 또는 효소 화합물의 정밀 분획이 가능하다는 점을 들 수 있다.