

Catechol생산을 위한 Tyrosinase의 안정화

*박 종 현 · **김 용 환 · * · **유 영 제 · ***이 윤 식
*서울대학교 생물화학공학협동과정, **화학공학과, ***공업화학과

Stabilization of Tyrosinase for Catechol Production

*Jong Hyeon Park, **Yong Hwan Kim, * · ** Young Je Yoo and ***Yoon Sik Lee

*Biochemical Engineering and Biotechnology Program

**Department of Chemical Engineering

*** Department of Chemical Technology, College of Engineering

Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

Tyrosinase has two types of enzymatic activities, cresolase catalyzing the hydroxylation of monophenol and catecholase catalyzing the oxidation of *o*-phenol. Gradual inactivation of the enzyme during the reaction is a barrier to be overcome for the commercial application of the enzyme. Tyrosinase was stabilized by modifying the lysine residue of the enzyme using glutaraldehyde. In addition to that, tyrosinase was also stabilized by adapting the continuous reactor system. In packed bed reactor quinone could be easily removed, so the stability of tyrosinase increased. Borate buffer retarded the reaction rate of catechol to quinone and consequently decreased the tyrosinase inactivation. Tyrosinase immobilized on controlled pore glass showed significantly enhanced stability in a packed-bed reactor.

서 론

생물공학의 진보에 힘입어 금속촉매나 산·알칼리 촉매를 이용한 기존의 화학공정을 효소를 이용하는 생물학적 공정으로 대체하고자 하는 연구가 증가하고 있다.

Tyrosinase(polyphenol oxidase)는 monophenol의 *ortho*-hydroxylation 및 *o*-diphenol의 dehydrogenation을 촉매할 수 있는 효소로서 방향족 화합물의 hydroxylation 반응을 수행할 수 있는 능력을 갖고 있으며 phenol을 catechol로, catechol을 다시 *o*-benzoquinone으로 산화시킨다(1). 기존의 금속촉매에 의한 방향족 화합물의 화학적 hydroxylation의 경우, hydroxylation에 의해 붙여지는 -OH기가

관능기에 비선택적으로 결합하여 생산물로 catechol과 hydroquinone(*ortho*-위치나 *para*-위치)이 일정한 비율로 나오게 되는 반면 tyrosinase 같은 효소를 이용할 경우 선택적으로 특정의 위치에 -OH기를 삽입시켜 항상 catechol만을 얻게 된다. 따라서 catechol같은 *o*-diphenol을 원한다면 이와 같은 효소를 사용하여 반응의 수율을 높일 수 있다. 이와 같이 효소를 이용하여 hydroxylation반응을 수행하려는 근본적인 이유는 효소반응이 갖고 있는 기질선택성뿐만 아니라 여러 장점들을 제공하기 때문이다. 그러나 많은 장점을 갖고 있는데도 불구하고 효소촉매의 실제 산업적 응용범위가 제한되는 것은 여러 가지 촉매로서의 문제점을 갖고 있기 때문이다.

Tyrosinase를 이용하여 catechol이나 *o*-benzoqu-

inone을 생산하는데는 효소반응의 생물공학적 특성을 고려한 적절한 반응기 시스템의 선정이 매우 중요하다. Tyrosinase는 cresolase와 catecholase의 두 촉매활성을 가지고 있으므로 phenol이나 catechol 중 어느 것을 기질로 하든지 최종생산물로 얻게 되는 것은 o-benzoquinone이다. o-Benzoquinone은 유기합성에서 매우 중요한 dehydrogenating agent로 쓰인다. 이는 매우 불안정하기 때문에 생산되는 즉시 다른 화합물의 형태로 변환시켜 주는 것이 필요하다. 그러한 예로서 coumestans, benzofuran derivatives의 합성에 이용되는 예가 보고된 바 있다(2). Catechol(3)은 현재 H₂O₂를 hydroxylation agent로 하는 화학적 공정에 의해 생산되고 모피염색, 가죽가공, 사진현상액, 중합반응 저해제, 농약제조, 합성향료 제조, 의약품 원료 등으로 쓰이는 정밀화학제품이다. 따라서 catechol의 생산성을 높이기 위해서는 catechol에서 o-benzoquinone으로의 전환율을 줄이면서 phenol에서 catechol로의 전환을 높이는 일이 필요하다.

기존의 catechol 생산공정을 tyrosinase를 이용한 생물화학적 공정으로 대체하기 위해서는 극복해야 할 몇 가지 문제점이 있는데 그 중의 하나는 반응 중간체에 의해 효소가 비활성화되어 오랜 시간 조업이 불가능하다는 점이다. 본 논문에서는 tyrosinase 반응 비활성화를 막는 여러 가지의 방법을 시험하여 그 결과를 보고한다.

실험 재료 및 방법

효소

Sigma사로부터 구입한 mushroom tyrosinase (monophenol monooxygenase; polyphenol oxidase; EC 1. 10. 3. 1)를 이용하였다.

효소 분석방법

Tyrosinase는 cresolase와 catecholase의 두 가지 활성을 가지고 있으므로 효소활성 측정시 어느 활성을 측정하여도 무방하나, cresolase의 활성측정은 시간지연이 존재하므로 일반적으로 catecholase활성의 측정이 널리 쓰인다. 본 연구에서도 catecholase activity로 효소의 활성을 측정하였으며 사용한 방법은 dopachrome method(4)이었다. 1분 동안 1 μmol의 L-DOPA를 dopachrome(흡광계수 = 3660M⁻¹cm⁻¹)으로 전환시킬 수 있는 효소의 양을 1unit으로 정의하였다.

효소의 화학적 변형

Lysine 아미노산 잔기에 대해 화학적 변형을 가해 이에 따른 활성도와 안정성을 측정하였다. Lysine을 변형시키는 시약으로는 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonate, pyridoxal phosphate, glutaraldehyde, ethylacetimidate, dimethyl adipimidate 등이 널리 쓰이고 있으며, 본 연구에서는 glutaraldehyde로 lysine을 변형시켰다. 먼저 pH 7.0인 100mM phosphate buffer에 tyrosinase(2g/ℓ)를 용해시킨 다음 glutaraldehyde를 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.14, 0.2, 0.4%로 첨가한 후 10시간 반응시켰다. 다시 pH 6.5인 100mM phosphate buffer 4°C에서 16시간 투석한 다음 이렇게 만들어진 효소의 반응 활성도를 관찰하였다. 이렇게 얻어진 효소의 화학적 변형정도의 측정은 Fields(5)의 방법을 따랐다. 효소의 amino group의 측정은 Okuyama와 Satake(6)에 의해 제안된 방법을 택하였다.

효소 고정화

효소 고정화는 담체 결합법을 이용하였으며, 고정화 효소 충전층 반응장치를 이용하여 반응성을 측정하였다. 담체 결합은 이온 결합법과 공유 결합법에 대해 각각의 조업 안정성을 검토하였다. 이온결합법은 활성화시킨 aminopropyl-glass bead 70mg (average pore size: 170 Å, 200~400mesh, amine content: 165 μmol/g glass)을 column(외경; 7cm, 내경; 0.2cm, 길이; 5cm)에 packing시킨 후 48시간 동안 5mg의 효소를 재순환시켰다. 공유결합법은 활성화시킨 aminopropyl-glass bead 70mg (average pore size: 170 Å, 200~400mesh, amine content: 165 μmol/g glass)을 column(외경; 7cm, 내경; 0.2cm, 길이; 5cm)에 packing시킨 후 24시간 동안 glutaraldehyde를 재순환시켰다. 여기에 100mM phosphate buffer로 씻은 후, 48시간 동안 5mg의 효소를 재순환시켜 고정화하였다.

결과 및 고찰

안정화 물질의 첨가

최근 polyol, polysaccharide, salts 등을 첨가하여 효소를 안정화시키는 연구가 많이 이루어졌으나, 정확한 기작은 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 PEG와 ethylene glycol을 첨가하여 안정화에 대한 영향을 검토하였다. Fig. 1에서와 같이 control 상태에서는 반응 100분 후 13%의 활성도만이 유지되었으

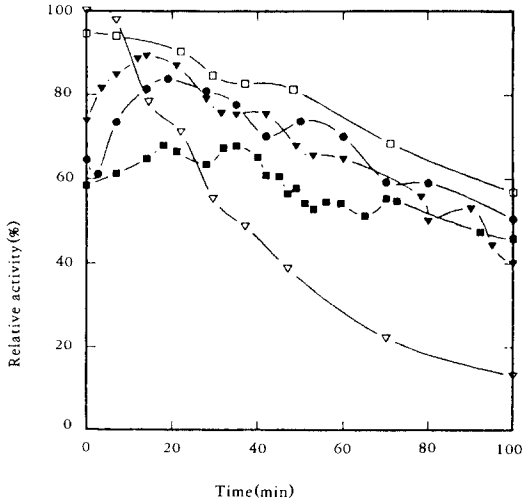


Fig. 1. Comparison of tyrosinase activities when treated with various stabilizing additives (1g/l).

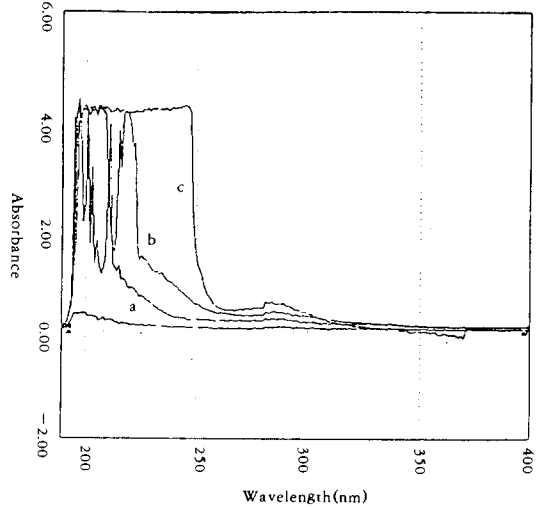
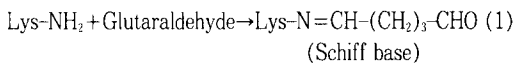
▽ control; ▼ PEG400; ■ PEG8,000; ● PEG35,000; □ ethylene glycol.

나, ethylene glycol의 첨가 결과 58%의 활성도를 유지할 수 있었으며, PEG400, 8000, 35000의 첨가 결과, 활성도가 각각 초기의 41%, 46%, 52%를 유지하였다. 이는 quinone에 의한 친핵성 공격에 의해 tyrosinase 효소의 conformation에 변화가 일어나 효소활성을 잃는데, 안정화 물질이 효소의 conformation 변화속도를 지연시켜 비활성 속도가 느려진 것으로 판단된다.

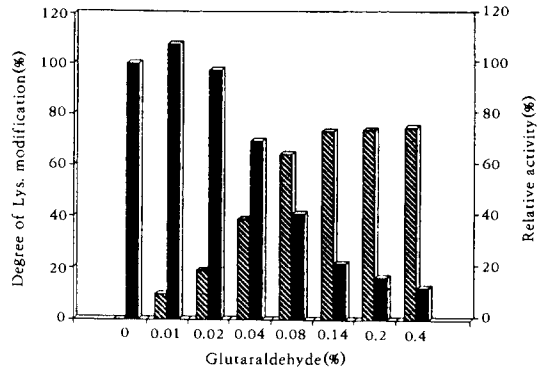
효소의 화학적 변형

단백질 표면의 아미노산 잔기를 바꾸어줌으로써 안정성을 향상시키려는 연구가 많이 진행되고 있으며(7-10), 본 연구에서의 대상 효소인 tyrosinase의 경우 단백질 표면의 lysine기가 quinone에 의해 친핵성 공격을 받아 비활성화가 일어나므로 lysine기를 적절하게 변형시켜주면 안정성이 향상될 것으로 생각되어 효소를 화학적으로 변형시키는 실험을 수행하였다.

Tyrosinase residue중 lysine residue를 다음 (1)과 같이 bifunctional agent로 알려진 glutaraldehyde로 amino group을 변형시켰다.



(a)



(b)

Fig. 2. Effects of tyrosinase modification using glutaraldehyde.

(a) Wavelength scanning of glutaraldehyde-modified tyrosinase
a: tyrosinase, b: modified tyrosinase, c: glutaraldehyde

(b) Effects of glutaraldehyde concentration on tyrosinase activity and degree of modification ■ degree of modification; ● relative activity.

Glutaraldehyde로 처리한 효소는 spectrum 관찰 결과 Fig. 2(a)에서와 같이 오른쪽으로 shift되었으며 또 효소의 유리 lysine기를 측정함으로써 효소의

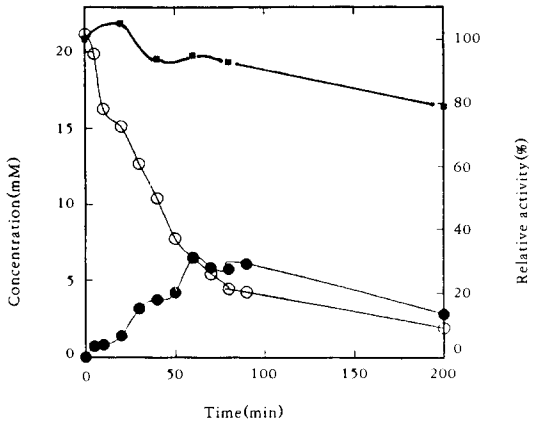


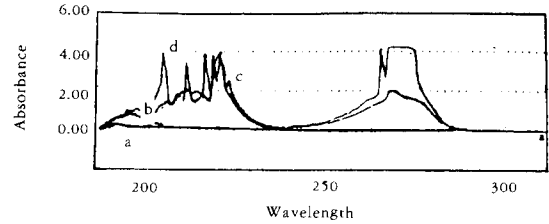
Fig. 3. Time courses of phenol and catechol concentrations for modified tyrosinase.

■ relative activity; O phenol; ● catechol.

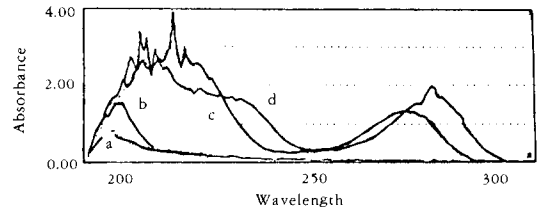
화학적 변형을 확인할 수 있었다. 효소의 활성이 크게 떨어지지 않으면서, 효소를 변형시키는 적절한 glutaraldehyde의 농도 선택이 필요하다. 실험 결과 Fig. 2(b)에서와 같이 0.02%의 glutaraldehyde 첨가까지는 효소 활성이 느리게 감소하였으나, 0.04% 부터는 효소 활성이 급격히 떨어져 초기 활성의 12% 까지 감소하였다. Lysine기의 변형 정도는 0.08% 까지 넣어준 glutaraldehyde양에 따라 비례하나 0.08% 이상에서의 변형효율은 크게 증가하지 않았다. 이는 효소의 외부에 위치한 lysine기는 glutaraldehyde와 쉽게 반응하나, 효소 내부에 위치한 lysine기는 쉽게 반응하지 않기 때문이다(5). Fig. 3은 0.03% glutaraldehyde에 의해 lysine기가 변형된 효소를 이용하여 반응시킨 결과이다. 200분까지도 초기 활성의 83%까지 유지되어 안정성이 크게 향상되었음을 보여준다. 이러한 안정화 원인은 quinone에 의해 공격받는 lysine의 amino기가 변형됨으로써 효소에 대한 친핵성 공격이 줄어들어 효소의 비활성화가 줄어든 것으로 생각되어진다.

Borate Buffer의 이용

Phenol에서 catechol로의 전환속도는 유지하면서 비활성화를 일으키는 quinone으로의 전환을 줄이면 효소를 안정하게 유지시킬 수 있을 것이다. 이를 위해 일반적으로 사용되는 phosphate buffer 대신 borate buffer를 이용하였다. Boeskin(11)은 catechol이 borate와 complex를 형성함을 밝혔다. Fig. 4(a), (b)에서와 같이 borate는 phenol과는 복합체를



(a)



(b)

Fig. 4. UV-visible wavelength scanning.

(a) Wavelength scanning of phenol and borate

a: no phenol, no borate buffer

b: no phenol in 50mM borate buffer (pH 8.0)

c: 0.01g/l phenol in 50mM borate buffer (pH 8.0)

d: 0.05g/l phenol in 50mM borate buffer (pH 8.0)

(b) Wavelength scanning of catechol-borate complex

a: no phenol, no borate buffer

b: no phenol in 50mM borate buffer (pH 8.0)

c: 0.01g/l phenol in 50mM borate buffer (pH 8.0)

d: 0.05g/l phenol in 50mM borate buffer (pH 8.0)

형성하지 않고, 두 개의 hydroxyl기를 가진 catechol과 유일하게 복합체를 형성함을 wavelength scan을 통해 확인하였다. Borate buffer에서의 catechol은 286nm에서 흡광도가 증가함을 보인다.

반응매질로는 조건에 따라 50mM phosphate buffer(pH 7.0), 50mM phosphate buffer(pH 8.0), 50mM borate buffer(pH 8.0), 100mM borate buffer(pH 8.5), 50mM borate buffer(pH 10.0)을

사용하였으며, 효소는 0.5mg를 사용하여 buffer에 넣어 주었다. Fig. 5(a)는 catechol을 기질로 했을 경우, 효소반응 10분 후 생성된 catechol의 농도가 일정하여지고 있음을 보이며, borate 농도에 따라 catechol의 반응속도가 달라짐을 보여준다. 반응중의 catechol의 농도는 borate의 농도가 높아질수록 복합체를 형성하는 양이 많아져, quinone으로 전환되는 속도가 느려져 높아지고, 따라서 효소의 비활성화의 속도도 현저하게 느려진다. Borate농도는 pH가 증가함에 따라 높아지지만, tyrosinase의 최적 pH가 중성 근처이므로 적절한 pH의 선택이 중요하다. Fig. 5(b)에서는 고정화된 tyrosinase의 반응 안정성에 미치는 buffer의 역할을 보여주고 있다. 고정화된 tyrosinase의 경우도 역시 borate buffer가 효소를 안정화시키고 있음을 볼 수 있다.

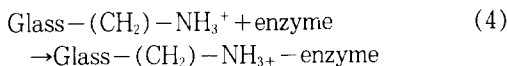
Borate의 농도는 식 (2)와 같이 Handerson-Hasselbalch식을 이용하여 계산할 수 있으며, quinone으로 전환되는 속도가 급격히 줄어드는 곳에서의 catechol농도를 평형상태의 농도로 하여 복합체, catechol 및 borate간의 평형 상수를 식 (3)로부터 계산한 결과 $K_{eq}=122.5$ 를 얻었다. 이 평형상수를 이용하여 borate농도에 따른 catechol 최종평형 생성량을 계산할 수 있으므로(boric acid; $pK=9.24$), catechol의 생성량을 예측할 수 있다.

$$pH = pK + \log \frac{H_2BO_2}{H_2BO_3} \quad (2)$$

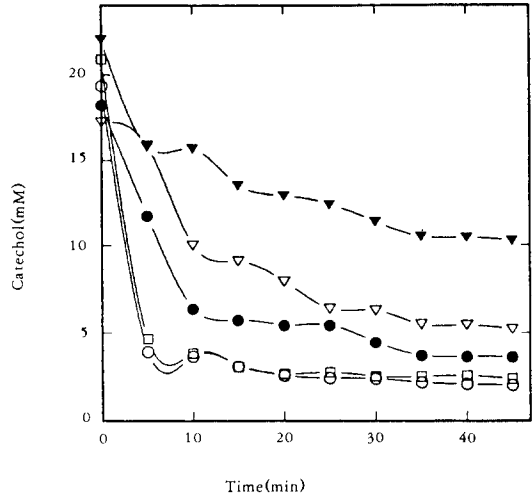
$$K_{eq} = \frac{[complex]}{[catechol][borate]} \quad (3)$$

효소 고정화

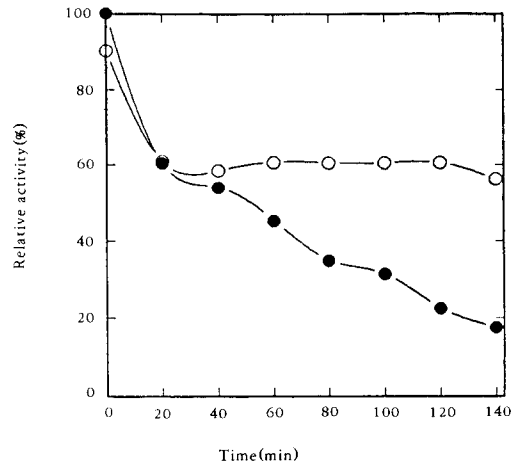
본 연구에서는 aminopropyl로 활성화된 glass bead를 이용한 담체결합법으로 효소를 고정화하였다. 담체 결합법은 이온결합법과 공유결합법이 있으며 이에 따른 효소안정성을 검토하였다. 먼저 이온 결합법에 의한 고정화 방법을 살펴 보면 다음 (4)식과 같다.



효소를 반응기에 48시간 재순환시키는 동안의 고정화 효율은 약 78%를 보였다. 비활성화를 시키는 quinone과 효소의 접촉시간을 줄여 주기 위하여 packed bed reactor를 이용하여 실험한 결과 회분식보다 좋은 결과를 얻을 수 있었다. Fig. 6에서와 같



(a)



(b)

Fig. 5. Effects of buffer on tyrosinase reaction.
 (a) Time courses of catechol concentration in borate buffer
 ○; phosphate buffer 50mM, pH 7.0
 □; phosphate buffer 50mM, pH 8.0
 ●; borate buffer 50mM, pH 8.0; 2.72mM borate
 ▽; borate buffer 100mM, pH 8.5; 15.4mM borate
 ▼; borate buffer 50mM, pH 10.0; 42.6mM borate
 (b) Effects of buffers on immobilized tyrosinase stability in batch reactor
 ● phosphate buffer 50mM, pH 7.0
 ○ borate buffer 50mM, pH 10.0

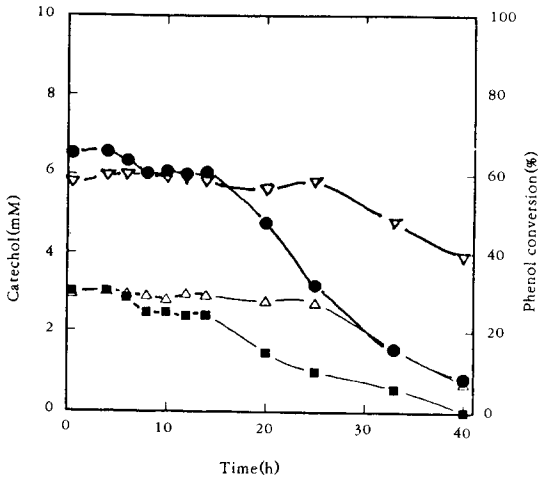


Fig. 6. Effects of buffers on tyrosinase stability in a packed-bed reactor.

- phosphate buffer, phenol
- ▽ borate buffer, phenol
- phosphate buffer, catechol
- △ borate buffer, catechol

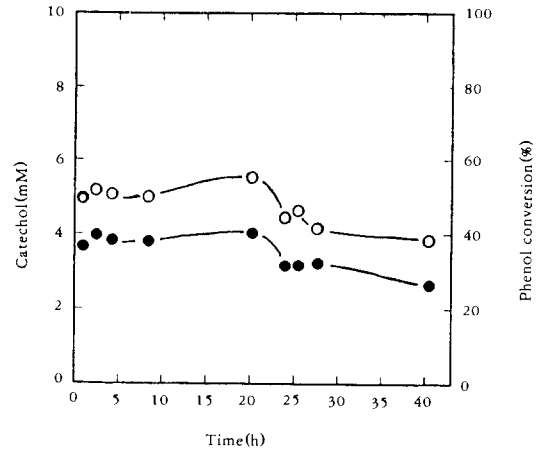


Fig. 8. Time courses of phenol and catechol concentrations in immobilized tyrosinase in a packed-bed reactor.

- phenol ● catechol

phosphate buffer에서는 borate buffer에서 보다 초기 반응효율이 좋았으나, 12시간 후부터는 비활성화가 일어나 borate buffer에서 더 좋은 반응효율을 보였다. 반응 40시간 후 phosphate buffer에서는 70%의 활성도 감소를 보였으며, borate buffer에서는 35%의 활성도 감소를 보였다. 이러한 borate buffer의 tyrosinase에 대한 작용은 앞에서 회분식으로 반응시킨 경우와 동일하였다. 즉 연속식으로 반응시킨 경우에도 borate buffer가 tyrosinase 반응을 안정화시켰다.

공유결합과 이온결합에 의한 고정화에 대한 안정성을 비교한 결과, Fig. 7에서와 같이 공유결합에 의한 고정화가 이온결합에 의한 고정화에서보다 안정성이 향상되었다. 이는 일반적으로 공유결합이 이온결합보다 더 강한 결합으로 알려져 있다. 공유결합법을 이용하여 효소를 고정화하였을 경우 효소의 탈리 현상이 줄어들어 Fig. 7에서와 같이 상당기간이 경과된 후에도 phenol의 전환율이 높게 나타난다. Fig. 8은 borate buffer를 반응매질로 사용했을 경우 40시간까지도 일정한 반응 효율을 나타냄을 보여준다. 이는 효소를 고정화하여 연속적으로 반응시키는 방법과 borate buffer를 이용하여 효소를 안정화시키는 방법을 동시에 적용한 것이다. 이러한 방법을 이용하면 효소비활성을 일으키는 물질인 quinon을 제거시켜 줌으로써 장시간 동안 안정한 반응 효율을

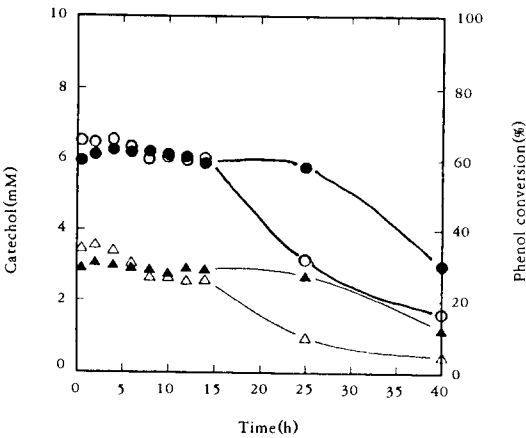


Fig. 7. Effects of immobilization types on tyrosinase stability in a packed-bed reactor.

- ionic bond, phenol
- covalent bond, phenol
- △ ionic bond, catechol
- ▲ covalent bond, catechol

이 phosphate buffer(pH 7.0, 100mM)와 borate buffer(pH 8.0, 100mM)에서 각각 반응한 결과,

얻을 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 tyrosinase 효소반응시에 발생하는 반응 비활성화를 막아 조업 안정성을 향상시키는 것을 목적으로 연구를 수행하였다. Quinone에 의해 친핵성 공격을 받는 lysine기를 bifunctional reagent인 glutaraldehyde로 변형시켜 줌으로써 효소의 비활성화를 줄일 수 있었다. 또한, 고정화된 효소를 충전층 반응기에 충전시켜 비활성화를 일으키는 생산물을 연속적으로 제거함으로써 효소의 안정성을 크게 향상시켰다. 고정화 방법으로는 glass bead를 이용한 담체 가교법을 이용하였으며, 이때 glutaraldehyde와 효소의 lysine이 반응하게 되어 quinone에 의한 친핵성 공격을 받지 않게 되어 안정성이 더욱 향상되었다. 반응매질로 borate buffer를 이용하게 되면 catechol과 borate의 복합체 형성으로 catechol에서 quinone으로의 전환이 줄어들게 되어 효소 비활성화가 감소하였다.

감 사

본 연구는 생물공정연구센터의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. H. S. Mason(1959) "Structure of Melanins," in *Pigment Cell Biology*, 563-582, Academic Press, New York.
2. I. Tabakovic, Z. Grujic and Z. Bejtovic (1983), *J. Heterocyclic Chem.*, **20**, 635.
3. J. Varagnat and Kirk-Othmer(1981), *Encyclopedia of Chemical Technology*, **13**, Wiley-Interscience, New York.
4. N. H. Horowitz, H. M. Feldman and M. L. Pall(1970), *J. Biol. Chem.*, **245**(11), 2784.
5. R. Fields(1972), *Methods in Enzymology*, **25**, 464-468.
6. T. Okuyama and K. Satake(1960) *J. Biochem.*, **47**, 454.
7. T. K. Ghose, A. Fiechter and N. Blakebrough (1979), *Advances in Biochemical Engineering*, **12**, 41-118.
8. C. H. Hirs(1967), *Methods in Enzymology*, 11,548.
9. A. Sadana and J. P. Henley(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 256-268.
10. J. P. Henley and A. Sadana(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 956.
11. J. Boeskin(1949), *Advances in Carbohydrate Chem.*, **4**, 189.