

Development of novel enzyme system for production of enantiomerically pure  $\beta$ -amino acids : Kinetic resolution of racemic 3-amino-*n*-butanoic acid using transaminase from *Alcaligenes denitrificans* Y2k-2

임성엽, 조병관, 김병기  
 서울대학교 응용화학부 및 유전공학연구소  
 전화 (02)880-7528, 팩스 (02)874-1206

Abstract

(R,S)-3-amino-*n*-butanoic acid(DL- $\beta$ -homoalanine) has been kinetically resolved using *Alcaligenes denitrificans* Y2k-2 as a biocatalyst, which was isolated from soil by enrichment culture, which was carried out with minimal media containing (R,S)-3-amino-*n*-butanoic acid as a sole nitrogen source. The enzyme which performed this kinetic resolution assumed to belong to the  $\omega$ -transaminase family, because *A. denitrificans* used pyruvate as amino acceptor and its transaminase activity was inhibited by gabaculine, aminooxy acetic acid and hydroxylamine. In whole cell reaction, (R,S)-3-amino-*n*-butanoic acid was kinetically resolved to the corresponding (R)-3-amino-*n*-butanoic acid with excellent *E* (>100) in the presence of pyruvate as an amino acceptor at 37°C. (S-specific) We observed the substrate inhibition for pyruvate at 100mM. In this study, characteristics of transaminase activity of *Alcaligenes denitrificans* Y2k-2, such as substrate specificity and thermostability, are carried out for the development of (R)-3-amino-*n*-butanoic acid production system.

1. 서론

최근에 비천연 아미노산 합성에 관심과 이에 대한 연구가 늘어가고 있다. 그 이유는 의학이나 제약 분야에서 활용이 가능한, 비천연 아미노산들의 중요한 생물학적 활성 때문이다. 특히 베타아미노산은 대부분이 그 자체가 강력한 항박테리아성 성질을 가지고 있고, 자연적으로 발생하는 수많은 펩타이드, terpenes, alkaloids, macrolides 등의 핵심적인 구성체이며, (1) 베타아미노산은 페니실린으로 잘 알려진 항생제 계열인  $\beta$ -lactam의 전구체이다. 또한 생물학적 활성이 중요한 대부분의 펩타이드가 프로테아제와 같은 효소에 의해 쉽게 분해되는 단점을 베타아미노산과 같은 비천연 아미노산에 의해서 해결할 수 있다는 연구보고도 있다.

베타아미노산의 합성 및 생산에 관하여 많은 내용이 보고되고 있다. 최근 유기합성 및 생물공학에서 주요한 연구 과제 중의 하나인 광학적으로 순수한 화합물의 생산이라는 흐름에 따라, 베타아미노산 역시 광학적으로 순수한 형태를 얻기 위한 연구

가 중요하기 때문에 대부분의 연구들이 비대칭 합성이나 광학 분할 방향으로 이루어지고 있다. 하지만 베타아미노산 합성 연구의 대다수는 유기합성적 방법에 근거하고 있다.(2)

효소를 사용하는 생변환은 효소가 갖는 입체특이성 및 기질특이성을 이용할 수 있으며 온화한 조건에서 반응을 수행할 수 있다는 점이 유기합성에 대한 장점이다. 지금까지 보고된 효소에 의한 베타아미노산의 합성은 penicillin acylase를 이용한 입체특이적 아실화반응(3) 및  $\alpha$ -chymotrypsin이나 esterase 등을 이용한 입체특이적 가수분해반응이 대표적인 성공 사례이다.

본 연구에서는 베타아미노산에 대하여 광학적인 활성이 있는 트랜스아미나제를 가진 균주를 선별하고, 이를 이용하여 라세믹 베타아미노산을 트랜스아민화반응으로 반응속도 차이에 의한 광학분할을 수행하였다. 특히 베타아미노산이 트랜스아민화반응을 거쳐 생성되는  $\beta$ -keto acid는 자체 구조상의 불안정성으로 인하여 쉽게 분해되는 성질이 있기 때문에, 트랜스아미나제에 의한 트랜스아민화반응이 가역반응이라는 문제점을 쉽게 해결할 수 있다.(Figure 1) 이런 점에 착안하여 광학적으로 순수한 베타아미노산을 트랜스아미나제를 이용한 광학분할로 생산하는 것이 효율적일 수 있다는 생각으로 본 연구가 시작되었다.

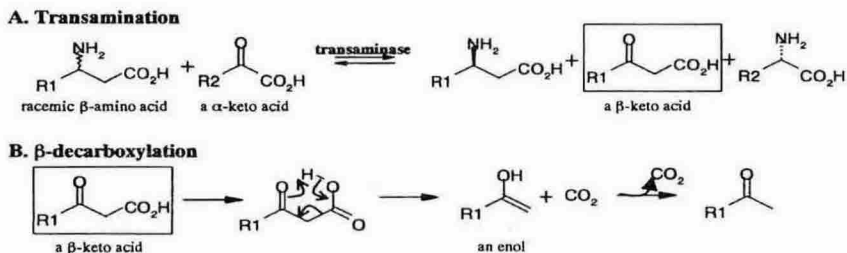


Figure 1. Transamination reaction performed by transaminase(A) and  $\beta$ -decarboxylation occurring spontaneously or by heat(B)

여러 가지 베타아미노산 치환체 합성의 전구체이고 베타펩타이드( $\beta$ -peptides)의 구성체로 이용이 가능한 3-amino-*n*-butanoic acid의 광학적 분할을 모델시스템으로 선정하였고, 이 화합물에 (S)-3-amino-*n*-butanoic acid(L-homoalanine)에 선택적 활성을 가진 균주를 토양에서 분리하고 선별한 후, 이 균주를 이용하여 모델 베타아미노산의 광학분할을 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 균주 선별방법

여러 지역에서 채취한 흙을 LB 배지에서 2시간 배양한 후, 상등액 0.1 mL을 (R,S)-3-amino-*n*-butanoic acid를 유일한 질소원(10mM)으로 첨가한 최소배지

10mL에 접종하고 37°C, 250rpm의 조건으로 배양하였다. 세포혼탁도가 약 1.0이 되면 배양액을 같은 조성의 고체 최소배지 위에 전개하고 성장한 콜로니를 LB 배지에 접종하였다. 세포혼탁도가 일정 농도에 이르면 50mM sodium phosphate(pH 7.0) 완충용액으로 세척한 후, 각 균주의 세포혼탁도를 일정하게 맞추고 광학분할 반응을 수행하였다. 반응은 트랜스아미나제의 특성인 기질저해 현상을 고려하여 10mM (R,S)-3-amino-*n*-butanoic acid, 20mM sodium pyruvate를 기질로 이용하고 37°C, 250rpm의 조건에서 수행하였다. 반응물에 남아있는 (R,S)-3-amino-*n*-butanoic acid를 분석한 후, 전환율에 따른 enantiomeric excess(ee<sub>s</sub>)를 측정하고 enantiomeric ratio(E)를 계산하여 각 균주를 비교하는 기준으로 설정하였다.

## 2) 분석방법

(R,S)-3-amino-*n*-butanoic acid는 GITC로 유도체를 만든 후, C<sup>18</sup> Symmetry HPLC column(Waters, USA)과 전개액으로는 10mM Phosphate (pH 2.8)와 methanol을 60:40 (v/v)의 조건으로 이용하여 250nm에서 enantiomer를 각각 분석했다(4). Pyruvate는 Aminex HPX-87H column(Bio-Rad, USA)을 이용하여 5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 수용액의 조건으로 205 nm에서 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

대략 200여 개의 콜로니에 대해 광학분할 반응을 수행하여 E값이 가장 우수한 균주를 선별할 수 있었으며 동정하여 *Alcaligenes denitrificans* Y2k-2로 명명하였다. 효소의 광학활성은 S form에 선택적이며 E값은 100 이상인 것으로 측정되었다(Fig. 2).

Aminoxy acetic acid, gabacullin 또는 hydroxylamine과 같은 트랜스아

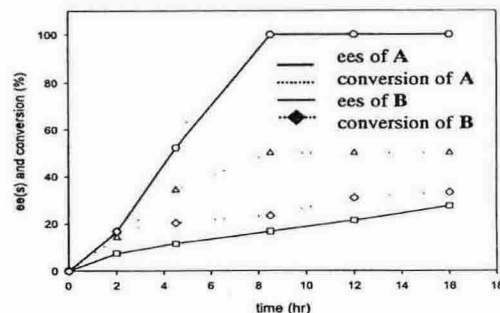


Figure 2. Profile of kinetic resolution of DL3-amino-*n*-butyric acid: (A) 10 mM DL-3-aminobutyric acid + 20 mM pyruvate; (B) 10 mM DL-3-aminobutyric acid

Table 1. amino acceptor specificity

amino acceptor	relative activity (%)
pyruvate	100
glyoxylic acid	122
oxalacetic acid	85
2-ketoglutaric acid	36
2-ketobutyric acid	28

미나제의 대표적인 저해제들이 반응성을 급격히 감소시키고(data not shown), 아민 수용체인 pyruvate가 첨가된 것과 첨가되지 않은 것이 전환율에서 현격한 차이를 보이므로(Fig. 1) 이 반응에 관계하는 효소가 트랜스아미나제라고 추측되었다.

아민 수용체에 대한 특이성 실험에서는 아민 수

용체의 크기, 즉 분자량이 작을수록 반응성이 향상되는 경향을 볼 수 있다(Table 1). 기질 농도에 따른 반응성에 대한 실험으로 pyruvate 0.1 M 이상에서 기질 저해

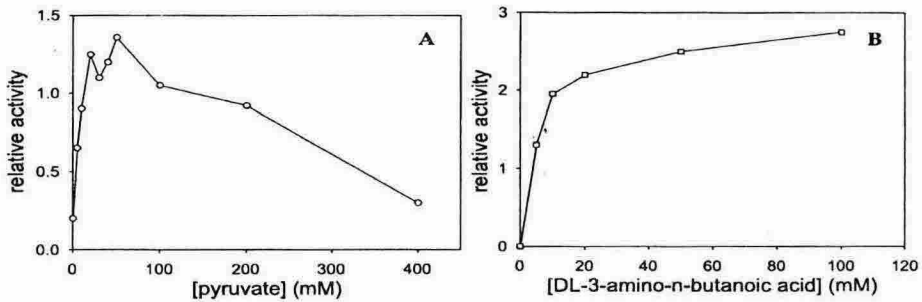


Figure 3. Relative activity at various substrate concentration; (A) 10mM DL-3-amino- *n*-butyric acid, (B) 20mM sodium pyruvate

가 있음을 알 수 있다(Fig. 3). 효소의 특성 실험으로 열적 안정성에 대한 테스트를 하였고, 다른 베타아미노산 및 광학적 성질을 가지는 여러가지 아민에 대한 효소의 특이성을 보았다.

#### 4. 요약

(R,S)-3-amino-*n*-butanoic acid에 대한 광학분할 능력이 우수한 균주 *Alcaligenes denitrificans* Y2k-2를 토양으로부터 분리하였다. 광학분할 반응에 관계하는 효소는 트랜스아미나제로 추정되며, 아민 수용체에 대한 특이성에서 크기가 작을수록 반응성이 높아지는 경향이 있다. pyruvate에 의한 기질저해 현상이 나타나는데, 효율적인 생산 체계를 갖추기 위해서 이 문제를 해결할 필요가 있으며 현재 효소의 정확한 특성을 파악하기 위한 실험을 진행 중이다.

#### 5. 참고문헌

- 1) G. Cardillo and C. Tomasini, Asymmetric Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids and  $\alpha$ -Substituted  $\beta$ -Amino Acids(1996), *Chem. Soc. Rev.*, 117-128
- 2) D. C. Cole, Recent Stereoselective Synthetic Approaches to  $\beta$ -Amino Acids(1994), *Tetrahedron*, Vol. 50 No. 32, 9517-9582
- 3) V. A. Soloshonok, et al., Biocatalytic Resolution of  $\beta$ -Fluoroalkyl- $\beta$ -amino acids(1994), *Tetrahedron Assymetry*, Vol. 5 No. 6, 1119-1126
- 4) S. Ito, et al., Resolution of the enantiomers of thiol compounds by reversed-phase liquid chromatography using chiral derivatization with 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl isothiocyanate(1992), *J. Chromat.*, 626, 187-196