



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0143593  
(43) 공개일자 2021년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 13/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 13/001 (2013.01)

C12Y 401/01028 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0060582

(22) 출원일자 2020년05월20일

심사청구일자 2021년05월17일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

신중식

서울특별시 서대문구 백련사길 28-15, 402호(홍은동, 영신빌라2차)

한상우

경기도 성남시 분당구 판교로 430, 106동 602호(이매동, 아름마을건영한성태영아파트)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

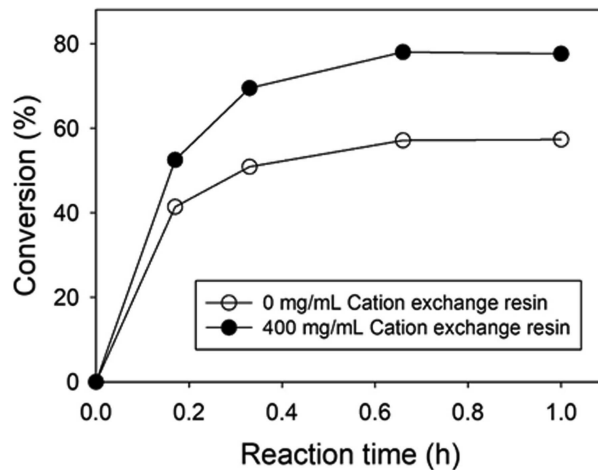
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **생산물 동시 분리를 통한 바이오제닉 아민의 생물학적 생산 방법**

### (57) 요약

본 명세서에는 아미노산을 기질로 하여 아미노산 디카복실레이스, 개방형 반응기 및 양이온교환수지를 사용한 바이오제닉 아민의 생물학적 생산 방법이 개시된다. 발효에 의해 생산된 아미노산을 기질로 사용할 경우 본 발명에 의해 생산된 바이오제닉 아민은 화학적으로 합성된 화합물과 달리 천연유래 화합물로 취급될 수 있다. 또한, 본 발명의 생산방법은 효소 반응 생성물을 기화 및 이온교환수지 흡착을 통해 반응과 동시에 제거함으로써 아미노산 디카복실레이스의 강한 생성물 억제를 완화하여 바이오제닉 아민을 높은 생산 효율로 생산할 수 있다는 이점이 있다. 또 다른 측면에서 본 발명은 효소 반응과 동시에 바이오제닉 아민을 반응액으로부터 분리함으로써 손쉬운 생산물 회수를 가능케 한다.

**대표도** - 도4



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

아미노산 디카복실레이스를 이용해 생물학적 방법으로 바이오제닉 아민을 생산하는 방법으로서,

- (a) 아미노산을 아미노산 디카복실레이스의 기질로 제공하는 단계;
  - (b) 양이온교환수지를 반응액에 첨가하는 단계;
  - (c) 상기 아미노산 디카복실레이스가 상기 아미노산과 반응하여 바이오제닉 아민 및 이산화탄소를 생성하는 단계;
  - (d) 상기 바이오제닉 아민이 양이온교환수지에 흡착하여 반응액으로부터 분리되는 단계;
  - (e) 상기 이산화탄소가 기화를 통해 반응액으로부터 분리되는 단계; 및
  - (f) 상기 양이온교환수지로부터 상기 바이오제닉 아민을 회수하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오제닉 아민의 생촉매적 생산 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아미노산은 L-페닐알라닌, 3,4-다이하이드록시-L-페닐알라닌, L-트립토판, 5-하이드록시-L-트립토판, L-타이로신을 포함하며, 또한 이들 아미노산의 유도체 및 치환체로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오제닉 아민의 생산 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아미노산 디카복실레이스는 *Bacillus atrophaeus* 또는 *Methanococcus jannaschii*로부터 유래된 변이체로서, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열인 것을 특징으로 하는 바이오제닉 아민의 생산 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 양이온교환수지는 폴리스티렌 중합체이고, 술폰기 이온교환기인 것을 특징으로 하는 바이오제닉 아민의 생산 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

본 발명은 아로매틱 아미노산 디카복실레이스(aromatic amino acid decarboxylase)를 이용하여 바이오제닉 아민(biogenic amine)을 생산하는 생물공정에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 탈이산화탄소(decarboxylation) 반응에서의 생성물인 이산화탄소와 아민 생성물을 각각 기화 및 이온 교환 수지를 통해 반응과 동시에 분리함으로써 바이오제닉 아민을 높은 효율로 생산하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0001]

- [0002] 바이오제닉 아민(biogenic amine)은 생체에서 생성되는 아민을 통칭하는 말로써 특히 신경 전달 작용을 하는 생체 화학 정보 전달 물질인 모노아민 신경전달물질(monoamine neurotransmitter)과 미량 아민(trace amine)을 포함하며 뇌 기능에서 중추적인 역할을 한다. 예를 들어 모노아민 신경전달물질인 세로토닌 및 도파민, 노르에피네프린의 감소는 우울증의 원인이 되고, 미량 아민인 2-페닐에틸아민 및 트립타민은 기분 및 식욕 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한, 바이오제닉 아민은 신경 전달 기능 이외에 세포간 커뮤니케이션에도 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 생물학적 중요성으로 인해 바이오제닉 아민의 의약적 용도에서의 활용이 주목받고 있다. 최근 천연물에 대한 수요가 증가함에도, 현재까지 바이오제닉 아민은 화학적 합성법에 의해 생산되고 있고, 생물학적 과정에 기초한 친환경 생산방법에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 천연물로부터 추출에 의해 얻을 수도 있으나 극미량이 존재하기에 생산단가 측면에서 현실적이지 못한 상황이다. 예를 들어 초콜렛에 포함된 2-페닐에틸아민은 초콜렛 1 kg당 3 mg 가량 함유되어 있을 뿐이다.
- [0003] 아로매틱 아미노산 디카복실레이스는 PLP (pyridoxal-5'-phosphate)를 보조인자로 하여 생체 내에서 아미노산의 탈이산화탄소(decarboxylation) 반응을 수행하는 효소이다. 예를 들면, L-도파 디카복실레이스의 경우 L-3,4-다이하이드록시 페닐알라닌의 탈이산화탄소 반응을 수행하며 도파민과 이산화탄소를 생성한다. 이러한 특성으로 인해 아로매틱 아미노산 디카복실레이스는 바이오제닉 아민의 생물학적 합성에 매우 적합하다.
- [0004] 생촉매를 이용한 반응공정에서는 효소의 특성에 따라 반응물에 의한 효소활성 저해(substrate inhibition) 및 생성물에 의한 활성 저해(product inhibition)가 흔히 발생한다. 이러한 효소의 활성 저해는 반응 효율을 저하시키기 때문에 산업적 활용을 위해서는 활성 저해를 완화하여 반응 효율을 높일 수 있는 맞춤형 공정 개발이 필수적이다.
- [0005] 디카복실레이스가 수행하는 탈이산화탄소 반응에서도 반응물 및 생성물에 의한 활성 저해가 다수 보고되어 있다. 선행문헌 (Biochimica et Biophysica Acta, 1986, 870, 31-40)에는 *Drosophila melanogaster* 유래 L-도파 디카복실레이스가 L-도파(L-3,4-다이하이드록시페닐알라닌)에 대해 반응물에 의한 효소 활성 저해를 보이며, 생성물인 도파민에 의한 활성 저해도 보고되어 있다. 또한, 선행문헌 (Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999, 365(1), 17-24)에는 *Pseudomonas stutzeri* 유래 옥살로아세테이트 디카복실레이스가 파이루베이트 및 탄산염에 대해 생성물에 의한 효소 활성 저해가 보고되어 있다.
- [0006] 하지만, 아미노산 디카복실레이스의 높은 산업적 활용성에도 불구하고, 이의 반응물 및 생성물에 의한 활성 저해를 해결할 수 있는 고효율 공정에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 특허문헌1(미국특허, 6015698)에는 *Gibberella* 및 *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pleurotus*, *Nectria* 균주를 사용해 아미노산으로부터 탈이산화탄소 반응을 통해 바이오제닉 아민을 생산하는 방법이 기재되어 있지만, 반응 수율이 22% 이내로 매우 낮다. 선행기술 문헌1(Microbial Cell Factories, 2019, 18, 74)에는 대사공학을 통해 대장균 내에서 L-도파를 생산하는 방법이 기재되어 있지만, 반응물 및 생성물 저해에 대한 공정설계 전략은 보고되어 있지 않다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 미국특허 US 06015698A

### 비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Microbial Cell Factories, 2019, 18, 74

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 생촉매반응과 동시에 생성물을 반응액에서 분리하여 아미노산 디카복실레이스의 생성물에 의한 효소활성 저해를 완화함으로써 바이오제닉 아민을 고효율로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 아미노산 디카복실레이스 반응액에 양이온교환수지(cation exchange resin, CER)를 포함하고 반응기의 뚜껑을 열어 두어 기체 교환을 용이하게 하여 바이오제닉 아민의 생산성을 증대하는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0011] 본 발명에서 제시하는 바이오제닉 아민 생산 방법은 아미노산 디카복실레이스 반응과 동시에 반응 생성물을 양이온교환수지 흡착 및 기화를 통해 반응액에서 분리함으로써 효소 반응 시 생성물에 의한 효소 활성 저해를 완화하여 생산 효율과 수율이 모두 높다는 이점이 있다. 또 다른 측면에서 본 발명은 양이온교환수지에 목적하는 아민생성물이 흡착되기에 반응종료 후 반응액의 추가 처리없이 양이온교환수지만을 필터링을 통해 분리한 후 흡착된 바이오제닉 아민 생성물을 정제할 수 있는 생성물 분리방법을 제공함으로써 바이오제닉 아민의 분리정제를 용이하게 수행할 수 있도록 한다. 또한, 발효에 의해 생산된 L-아로매틱 아미노산을 기질로 사용하여 생산된 바이오제닉 아민은 화학적으로 합성된 화합물과 달리 천연유래화합물로 취급될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 *Bacillus atrophaeus* 유래 아로매틱 아미노산 디카복실레이스 (이하 AADC-BA)의 생성물 저해를 나타낸 도이다.

도 2는 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)에 의한 2-페닐에틸아민 생산 반응에서 밀폐형 및 개방형 반응기의 효과를 비교한 도이다.

도 3은 양이온교환수지(Dowex 50WX8/Na<sup>+</sup>)에 L-페닐알라닌 또는 2-페닐에틸아민의 흡착결과를 나타낸 도이다.

도 4는 개방형 반응기 및 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)를 사용한 2-페닐에틸아민의 생산에 있어 양이온교환수지 유무에 따른 전환율을 비교한 도이다.

도 5는 양이온교환수지를 포함한 개방형 반응기에서 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)를 통한 세로토닌의 생산을 나타낸 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명을 다음과 같이 자세히 설명하고자 한다.

[0014] 본 발명은 아미노산 디카복실레이스를 이용한 바이오제닉 아민의 생산에서 양이온교환수지 및 개방형 반응기를 사용해 생성물을 반응과 동시에 분리하여 생산하는 방법에 관한 것으로서, 다음 단계를 포함한다.

[0015] (a) 아미노산을 아미노산 디카복실레이스의 기질로 제공하는 단계;

[0016] (b) 양이온교환수지를 반응액에 첨가하는 단계;

[0017] (c) 상기 아미노산 디카복실레이스가 상기 아미노산과 반응하여 바이오제닉 아민 및 이산화탄소를 생성하는 단계;

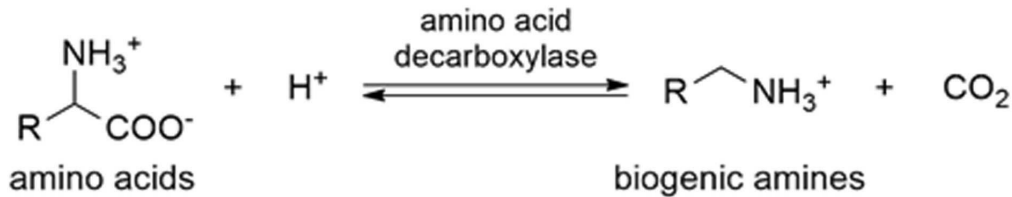
[0018] (d) 상기 바이오제닉 아민이 양이온교환수지에 흡착하여 반응액으로부터 분리되는 단계;

[0019] (e) 상기 이산화탄소가 휘발을 통해 개방계 반응기로부터 분리되는 단계; 및

[0020] (f) 상기 양이온교환수지로부터 상기 바이오제닉 아민을 회수하는 단계;

[0021] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오제닉 아민의 생촉매적 생산 방법으로, 상기 생산 방법은 아래 반응식 1에 의하여 표시될 수 있다.

[0022] [반응식 1]



[0023]

[0024] 상기 아미노산은 아민기와 카복시기를 포함한 화합물이며, 바람직하게는 페닐알라닌, 트립토판, 타이로신, 아스팔틱산, 3,4-다이하이드록시페닐알라닌(도파), 5-하이드록시트립토판, 호모페닐알라닌, *m*-플루오로페닐알라닌, *p*-플루오로페닐알라닌, *p*-클로로페닐알라닌, *p*-브로모페닐알라닌, *p*-니트로페닐알라닌 일 수 있다.

[0025] 상기 반응식 1과 같이 본 발명은 기질로 제공된 아미노산이 아미노산 디카복실레이스에 의하여 탈이산화탄소 반응을 통해 바이오제닉 아민을 생산할 수 있다. 중성의 반응조건에서 (예: pH 7) 기질인 아미노산은 전기적으로 중성인 쌍성이온으로 존재하고, 생성물 중 바이오제닉 아민은 양이온으로 존재한다. 또한, 다른 생성물인 이산화탄소는 평형에 의해 대부분 기체화한다.

[0026] 이온교환수지는 이온교환현상을 일으킬 수 있는 수지로서, 용액에서 이온을 제거하거나 분리할 때 사용한다. 양 이온교환수지를 사용할 경우 상기 반응식 1에서 양이온으로 존재하는 바이오제닉 아민을 반응액으로부터 선택적으로 흡착하여 분리할 수 있다. 기질인 아미노산은 전기적으로 중성이므로 이온교환수지에 흡착하지 않고 반응액 내에 존재하여 반응에 지속적으로 소모된다.

[0027] 탈이산화탄소반응을 통해 생성된 이산화탄소는 수용액상에서 탄산 또는 중탄산염, 탄산염으로 존재할 수 있지만, 수화(hydration) 평형에 의해 대부분 기체화 된다. 이산화탄소의 물에 대한 용해도는 높은 온도 및 낮은 압력에서는 낮아지기 때문에 효소반응조건에서는 일반적으로 수용액상에서 생성된 이산화탄소는 극히 낮은 농도로 존재한다. 따라서 개방형 반응기에서는 지속적인 기체교환을 통해 기체화를 통한 이산화탄소의 제거를 촉진할 수 있다.

[0028] 따라서 이온교환수지 및 기화에 의해 각각 아민과 이산화탄소가 생성과 동시에 지속적으로 반응액으로부터 분리되어 반응액 내에서 낮은 농도로 존재하므로, 아미노산 디카복실레이스의 생성물에 의한 효소활성 저해문제를 해결할 수 있다.

[0029] 상기 바이오제닉 아민은 중성에서 염기조건으로 변할 때 양이온에서 중성으로 변한다. 따라서 양이온교환수지에 흡착된 바이오제닉 아민은 용액의 pH 증가를 통해 용이하게 양이온교환수지로부터 탈착시킬 수 있다. 따라서, 이를 이용하여 반응액으로부터 분리된 양이온교환수지에서 원하는 생성물인 바이오제닉 아민만을 선택적으로 분리정제할 수 있다.

[0030] 상기한 양이온교환수지는 레진 형태로 반응액에 첨가하여 사용될 수 있다. 아미노산 디카복실레이스 반응이 종료되면 바이오제닉 아민이 흡착된 양이온교환수지를 반응액으로부터 분리한 후 NaOH 용액과 같은 염기성 용액을 첨가하여 바이오제닉 아민을 양이온교환수지로부터 회수가 가능하다. 상기 염기는 pH 12 이상의 염기성 용액에서 선택되며, 바람직하게는 1 N 수산화나트륨 및 10% 암모니아수일 수 있다. 회수된 용액은 pH를 낮춘 후 유기용매를 통한 추출을 추가적으로 거치면 바이오제닉 아민의 정제가 가능하다. 상기 유기용매는 소수성 유기용매에서 선택되며, 바람직하게는 *n*-헥산일 수 있다.

[0031] 또한, 상기 이온교환수지는 컬럼(column) 형태로서 효소반응기에 사용될 수 있다. 이때 효소반응기는 연속 흐름 반응기에서 선택되며, 바람직하게는 반응용기, 펌프, 양이온교환수지 컬럼을 포함하는 연속 흐름 반응기일 수 있다. 상기 연속 흐름 반응기는 모듈형태로 반응기에 연결되기 때문에 반응중간에도 분리하여 손쉽게 교체할 수 있다. 이때 분리된 양이온교환수지 컬럼에 염기성 용액을 직접 흘려주어 바이오제닉 아민의 회수가 가능하다. 상기 염기는 pH 12 이상의 염기성 용액에서 선택되며, 바람직하게는 10% 암모니아수, 수산화나트륨(0.1 또는 1 N)일 수 있다.

[0032] 상기 개방형 반응기는 교반기 또는 에어펌프를 함께 사용할 수 있다. 상기 교반기는 자기 교반기(magnetic stirrer) 또는 오버헤드 교반기(overhead stirrer)일 수 있다. 상기 에어펌프는 반응기와는 별도로 설치되어 사용되며 반응액 내부 또는 외부에 튜빙을 통해 연결되어 기체 순환을 촉진시킬 수 있다.

[0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

# [0036] 실시예 1. 아미노산 디카복실레이스의 클로닝 및 정제

[0037] 아미노산 디카복실레이스는 *Bacillus atrophaeus* 또는 *Lactobacillus brevis*, *Methanococcus jannaschii* 균주의 것을 클로닝을 통해 대장균에서 발현하였다. 각 아미노산 디카복실레이스는 편의상 AADC-BA (*Bacillus atrophaeus*) 또는 AADC-LB (*Lactobacillus brevis*), AADC-MJ (*Methanococcus jannaschii*)로 표기하였다. 이를 위해 하기 표 1에 나타난 프라이머를 사용해 pET28a 또는 pET26b 벡터에 클로닝하였다.

표 1

[0038] 아미노산 디카복실레이스의 클로닝을 위한 PCR프라이머 서열

	Primer sequences
AADC-BA	forward: 5' -AGGAGATATACCATGAACAAGTGTCGGAAC-3' reverse: 5' -GTGGTGGTGCTCGAGTTCAGCAACGCATGGATACG-3'
AADC-LB	forward: 5' -AGGAGATATACCATGGAAGAAAGTAATCGCTCAC-3' reverse: 5' -GTGGTGGTGCTCGAGAACATTTTCCTTTTGATTAACCG-3'
AADC-MJ	forward: 5' -AGGAGATATACATATGCGGAACATGCAAGAA-3' reverse: 5' -GGTGGTGGTGCTCGAGGTCCCGCTTAATCGAATTCAG-3'

[0039] 상기 플라스미드로 형질전환된 대장균 (*Escherichia coli* BL21(DE3)) 세포를 카나마이신(50 µg/mL)을 함유한 1 L의 LB 액체배지 (트립톤 10 g/L, 효모 추출물 5 g/L, 염화나트륨 10 g/L)에서 37℃로 현탁도 (optical density, OD) 0.4까지 배양하였고, 이때 IPTG를 최종농도 0.1 mM로 첨가하여 30℃에서 12 시간 추가 배양하여 단백질을 과발현하였다. 이후 5,000×g, 4℃에서 5 분간 원심분리하여 과발현 단백질을 포함한 대장균 세포를 얻었다. 이를 15 mL 버퍼 (50 mM Tris/HCl, 50 mM 염화나트륨, 1 mM EDTA, 1 mM 베타-메캅토에탄올, 0.1 mM PMSF, 0.5 mM PLP, pH 8)로 현탁시킨 후 이를 얼음에 냉각시키며 초음파 세포 파쇄기 (sonicator)를 사용해 세포분쇄를 하였다. 이를 10,000×g, 4℃에서 1시간 원심분리하여 세포잔여물(cell debris)을 제거한 후 얻어진 세포추출액(cell-free crude extract)을 HisTrap HP 컬럼(GE Healthcare, USA) 및 ÄKTAprime plus FPLC (GE Healthcare, USA)를 사용해 정제하였다. 상기 세포추출액을 버퍼(20 mM 소듐포스페이트, 0.15 M 염화나트륨, 0.5 mM PLP, pH 7.6)로 충전된 HisTrap HP 컬럼에 흘려준 후, 이미다졸 농도를 0.05-0.5 M로 변화시키면서 아미노산 디카복실레이스를 용출시켰다. 이후 상기 용출액을 버퍼(50 mM 인산나트륨, 0.15 M 염화나트륨, 0.2 mM PLP, pH 7)로 충전된 HiTrap HP 컬럼 (GE Healthcare)에 흘려주어 잔류 이미다졸을 제거하였다.

[0040] 상기 정제된 아미노산 디카복실레이스를 최종농도 10 mM L-페닐알라닌, 50 mM 포타슘 포스페이트 버퍼 (pH 7)를 포함한 용액에 첨가하여 37도에서 효소반응을 수행하였고, 반응시작 10분 뒤 HPLC 분석을 통해 생성된 2-페닐에틸아민을 정량하였다. 얻어진 효소의 반응성을 하기 표 2에 나타내었다. 1 U은 상기 조건에서 1 분에 1 µmol 2-페닐에틸아민을 생성할 수 있는 효소의 양을 의미한다.

표 2

[0041] 세가지 아미노산 디카복실레이스의 활성비교

	단위 효소활성(Specific activity)
AADC-BA	0.28 U/mL/ µM-enzyme
AADC-LB	0.04 U/mL/ µM-enzyme
AADC-MJ	0.009 U/mL/ µM-enzyme

# [0043] 실시예 2. 아미노산 디카복실레이스의 기질 특이성



[0044] 아미노산 디카복실레이스의 기질 특이성을 확인하기 위하여 pH 7 (50 mM 포타슘 포스페이트), 37℃에서 효소반응을 수행하였다. 반응은 정제된 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA 또는 AADC-MJ)를 기질(최종농도 1 또는 2, 5, 10 mM L-아미노산)에 첨가하여 시작하였고, 반응시간 0-60분에 반응액 일부를 사용해 잔류 기질의 양을 HPLC 분석을 통해 정량하였다. 기질 중 L-호모페닐알라닌은 1 mM, L-타이로신은 2 mM 에서 반응을 수행하였고 동일한 기질 농도조건에서 L-페닐알라닌의 반응속도를 측정하여 이에 대한 상대적 반응속도를 계산하였다. 기질 중 라세믹 혼합액은 5 mM L-페닐알라닌 조건에서의 반응속도를 측정하여 이에 대한 상대적 반응속도를 계산하였다. 얻어진 기질 특이성을 하기 표 3에 나타내었다. AADC-BA 또는 AADC-MJ 모두 트립토판에 대해 가장 높은 활성을 보였다. AADC-BA 경우 페닐알라닌 치환체를 포함해 다양한 아로매틱 아미노산에 대해 높은 반응성을 보였다.

표 3

[0045] 아미노산 디카복실레이스의 기질특이성

기질	AADC-BA	AADC-MJ
L-Phenylalanine	100%	100%
L-Tryptophan	590%	≈ 0%
L-Tyrosine	21%	407%
L-Aspartate	≈ 0%	27%
L-Glutamate	≈ 0%	≈ 0%
L-DOPA	24%	532%
5-Hydroxy-L-tryptophan	71%	해당사항 없음
L-Homophenylalanine	3%	
L-Phenylglycine	≈ 0%	
<i>m</i> -Fluoro-DL-phenylalanine	180%	
<i>p</i> -Fluoro-DL-phenylalanine	290%	
<i>p</i> -Chloro-DL-phenylalanine	833%	
<i>p</i> -Bromo-DL-phenylalanine	300%	
<i>p</i> -Nitro-DL-phenylalanine	450%	

[0047] 실시예 3. 아미노산 디카복실레이스의 pH에 따른 활성도

[0048] 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)의 pH에 의한 활성도를 확인하기 위하여 50 mM 버퍼(pH 4-6, 소듐 시트레이트; pH 6-8, 포타슘 포스페이트; pH 8-10, 소듐 보레이트; pH 7, HEPES), 37℃에서 효소반응을 수행하였다. 반응은 기질(최종농도 10 mM L-페닐알라닌)에 정제된 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)를 첨가하여 시작하였고, 반응 시작 20분 후에 생성물의 양을 HPLC 분석을 통해 정량하였다. 이의 결과를 하기 표 4에 나타내었다. pH 7-8이 효소활성에 가장 적합한 pH 조건으로 밝혀졌다.

표 4

[0049] AADC-BA의 pH에 따른 활성변화

Buffer	pH	AADC-BA의 활성 (mM/min/mM-enzyme)
Sodium citrate	4	<10
	5	20 ± 5
	6	190 ± 10
Potassium phosphate	6	100 ± 10
	7	270 ± 20
	8	280 ± 20
Sodium borate	8	200 ± 10
	9	30 ± 20
	10	<10
HEPES	7	140 ± 10

[0051] 실시예 4. 아미노산 디카복실레이스의 온도에 따른 활성도 및 안정성

[0052] 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)의 온도에 의한 활성도를 확인하기 위하여 50 mM 버퍼(pH 7, 포타슘 포스페이트), 30-65℃에서 효소반응을 수행하였다. 반응은 기질(최종농도 30 mM L-페닐알라닌)에 정제된 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)를 첨가하여 시작하였고, 반응 시작 20분 후에 생성물의 양을 HPLC 분석을 통해 정량하였다. 이의 결과를 하기 표 5에 나타내었다. 37-45도가 효소활성에 가장 적합한 온도조건으로 밝혀졌다.

표 5

[0053] AADC-BA의 온도에 따른 활성변화

Temperature	AADC-BA의 활성 (mM/min/mM-enzyme)
30℃	290±10
37℃	370±40
45℃	380±20
55℃	240±2
65℃	35±5

[0054] 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)의 온도에 의한 안정성을 확인하기 위하여 50 mM 버퍼(pH 7, 소듐 포스페이트), 150 mM 소듐 클로라이드를 포함한 용액에 정제된 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)를 첨가한 후 30-63℃에서 보관하면서 15시간 후 잔류 활성을 확인하였다. 반응은 기질혼합액(최종농도 10 mM L-페닐알라닌, 50 mM 포타슘 포스페이트 버퍼 pH 7)에 각 온도에 보관되어 있던 아미노산 디카복실레이스를 첨가하여 시작하였고, 반응 시작 20분 후에 생성물의 양을 HPLC 분석을 통해 정량하였다. 이의 결과를 하기 표 6에 나타내었다. 55도까지는 안정성이 비교적 높지만 그 이상 온도에서는 효소의 안정성이 급격히 낮아졌다.

표 6

[0055] AADC-BA의 온도에 따른 안정성

Temperature	15시간 인큐베이션 후 잔여 활성
30℃	106±8%
45℃	93±2%
55℃	85±13%
63℃	32±1%

[0057] 실시예 5. 생성물에 의한 아미노산 디카복실레이스의 활성저해

[0058] 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)의 생성물에 의한 활성 저해를 확인하기 위하여 37℃에서 효소반응을 수행하였다. 2-페닐에틸아민에 의한 활성 저해를 확인하기 위해 기질(최종농도 10 mM L-페닐알라닌), 생성물(0-200 mM 2-페닐에틸아민), 및 버퍼(50 mM 포타슘 포스페이트, pH 7)를 포함한 용액에 정제된 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)를 첨가하여 반응하였고, 반응 시작 10 또는 60분 후에 잔류 기질의 양을 HPLC 분석을 통해 정량하였다. 이산화탄소에 의한 효소 활성 저해를 확인하기 위해 기질(최종농도 10 mM L-페닐알라닌) 및 이산화탄소 생성물질(0-100 mM 중탄산염), 버퍼(5 mM 포타슘 포스페이트, pH 7)를 포함한 용액에 정제된 아미노산 디카복실레이스를 첨가하여 반응하였고, 반응 시작 30 분 후에 생성물의 양을 HPLC 분석을 통해 정량하였다. 이의 결과를 도 1에 나타내었다. AADC-BA는 100 mM 중탄산염 또는 2-페닐에틸아민 조건에서 각각 71 또는 73% 활성 저해가 관찰되었다.



[0060] **실시예 6. 밀폐형 또는 개방형 반응기에서의 바이오제닉 아민의 생산성 비교**

[0061] 아미노산 디카복실레이스의 탈이산화탄소 반응에서 이산화탄소 생성물의 기화 및 제거에 따른 반응수율의 증진을 확인하기 위해 밀폐형 및 개방형 반응기에서 바이오제닉 아민 생성반응을 수행하였다. 1.8 mL 용기에 기질 (50 mM L-페닐알라닌) 및 버퍼 (50 mM 포타슘 포스페이트, pH 7), AADC-BA 과발현 세포 (0.83 U/mL)를 포함한 반응액 1 mL를 넣은 후 용기를 밀폐된 조건(밀폐형 반응기)과 밀폐되지 않은 조건(개방형 반응기)에서 반응을 수행하였다. 반응은 37 도에서 자기교반기를 통해 혼합되었다. 반응시간에 따라 반응액 일부를 샘플링하여 생성물을 HPLC 분석하였다. 이의 결과를 도 2에 나타내었다. 개방형 반응기를 사용하여 이산화탄소 생성물의 기화 및 제거를 촉진하였을 때 반응 수율이 밀폐형 반응기 대비 20% (38 반응시간) 증가하였다.

[0063] **실시예 7. 양이온교환수지에서의 효소반응 조성물의 흡착**

[0064] 양이온교환수지(Cation exchange resin, CER)를 사용하여 아미노산 디카복실레이스 반응에서의 반응물 및 생성물의 흡착을 관찰하였다. 양이온교환수지는 Dowex 50WX8 (100-200 mesh)를 대표적인 예로 사용하였다. Dowex 50WX8의 Na<sup>+</sup>이온 형태를 제조하기 위해 판매되는 Dowex 50WX8/H<sup>+</sup>(Sigma Aldrich Cat#217506)를 수산화나트륨 용액처리를 하였다. 구체적으로는 Dowex 50WX8/H<sup>+</sup> 1 g에 1 N 수산화나트륨 용액 10 mL를 첨가하여 이를 37℃에서 1 시간 교반(200 rpm)하였고, 잔류 수산화나트륨을 제거하기 위하여 pH가 6-8에 도달할 때까지 양이온교환수지를 초순수로 세척하였다.

[0065] 아미노산 디카복실레이스(AADC-BA)의 대표 기질(L-페닐알라닌) 및 그 생성물(2-페닐에틸아민)을 사용하여 양이온교환수지에 효소반응 조성물의 흡착여부를 살펴 보았다. 기질 또는 생성물을 포함한 용액(최종농도 10 mM)에 0-21 mg/mL 양이온교환수지를 첨가한 1 mL 용액을 37℃에서 30 분간 교반(200 rpm)하였다. 이를 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리한 후, Nanodrop 2000 분광광도계 (Thermo Fisher Scientific)를 이용해 상등액의 흡광도를 측정하여 각 기질/생성물을 정량하였다. 이 결과는 도 3에 나타내었다. 생성물인 2-페닐에틸아민은 21 mg/mL 농도의 양이온교환수지에서 92% 흡착율을 보였으나, 기질인 L-페닐알라닌은 같은 양이온교환수지 농도에서 4% 흡착율을 보임으로써 사실상 거의 흡착되지 않았다.

[0066] 양이온교환수지에서의 아미노산 디카복실레이스의 흡착여부를 확인하기 위하여 양이온교환수지(최종농도 0-21 mg/mL 양이온교환수지)에 아미노산 디카복실레이스 (AADC-BA)를 최종농도 10 μM로 첨가한 1 mL 용액을 37℃에서 30 분간 교반(200 rpm)하였다. 이를 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리하였고, 상등액 내 잔류 아미노산 디카복실레이스의 농도를 Nanodrop2000을 이용하여 280 nm에서의 흡광도 측정을 통해 확인하였다. 이의 결과를 표 7에 나타내었다. 아미노산 디카복실레이스의 양이온교환수지에서의 흡착은 없는 것으로 관찰되었다.

**표 7**

[0067] AADC-BA의 양이온교환수지의 흡착량 측정

Dowex 50WX8/Na <sup>+</sup> 농도	용액에서의 효소잔류량
2.1 mg/mL	100%
6.3 mg/mL	100%
21 mg/mL	100%

[0069] **실시예 8. 개방형 반응기에서 다양한 바이오제닉 아민의 생산**

[0070] 개방형 반응기에서 아미노산 디카복실레이스를 사용해 다양한 바이오제닉 아민 생산 반응을 수행하였다. 1.8 mL 반응용기에 최종 1 mL 반응액 (10 mM L-아미노산, 50 mM 포타슘 포스페이트 pH 7) 및 AADC-BA 과발현 대장균 (0.13 U/mL)을 첨가하여 반응을 시작하였고, 37도에서 자기교반기를 사용하여 반응액을 교반하였다. 이의 결과를 하기 표 8에 나타내었다. 5가지 바이오제닉 아민 모두를 전환율 90%이상의 효소반응을 통해 생산할 수 있었다.

**표 8**

[0071]

개방형 반응기에서 다양한 바이오제닉 아민의 생산

생성물	반응시간	전환율
2-Phenylethylamine	3 h	96.9%
Dopamine	6.5 h	90.5%
Serotonin	6.5 h	96.9%
Tryptamine	0.3 h	>99%
Tyramine	44.5 h	95.1%

[0073]

실시예 9. 양이온교환수지가 첨가된 개방형 반응기에서 2-페닐에틸아민의 생산

[0074]

개방형 반응기에서 양이온교환수지의 유무에 따른 반응 효율을 AADC-BA의 대표적인 기질인 L-페닐알라닌을 사용하여 비교하였다. 1.8 mL 용기에 최종 1 mL 반응액 (150 mM L-페닐알라닌, 50 mM HEPES pH 7)에 양이온교환수지 (0 또는 400 mg/mL) 및 정제된 AADC-BA (1.4 U/mL) 과발현 대장균 (0.13 U/mL)을 첨가하여 반응을 시작하였다. 반응액은 37도에서 자기교반기를 통해 혼합하며 반응생성물의 제거를 촉진하였다. 이의 결과를 도 4에 나타내었다. 개방형 반응기에서 양이온교환수지를 추가적으로 포함할 경우 반응 1시간 후 37%의 반응 효율 상승 (78% 전환율)을 나타내었다. 또한, 반응액 내의 2-페닐에틸아민의 농도는 3.1 mM 수준으로 낮게 유지됨을 관찰하였다.

[0076]

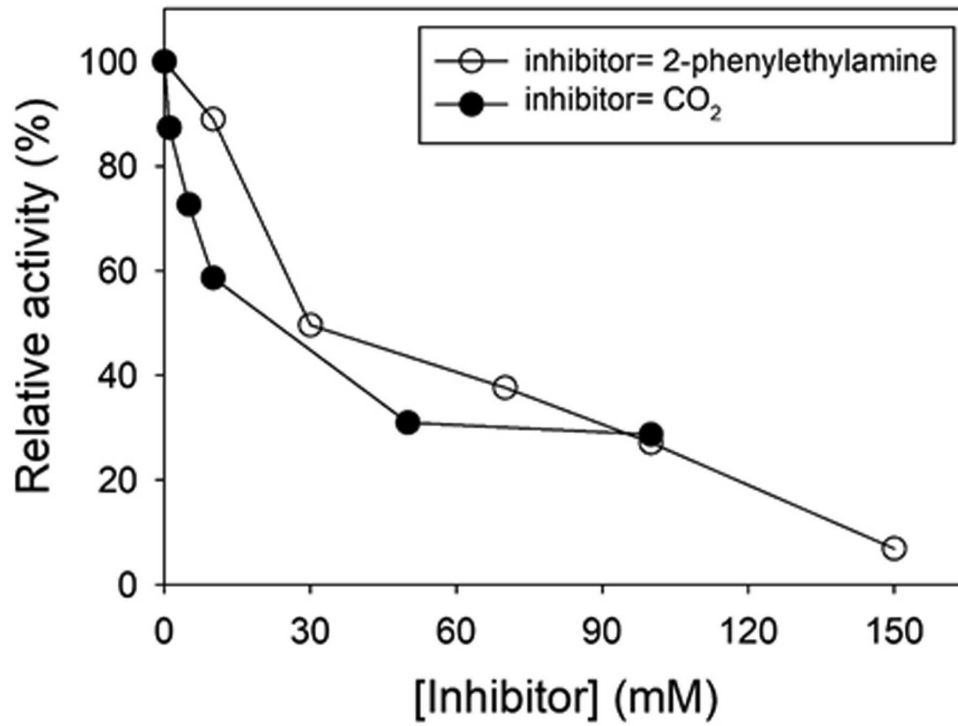
실시예 10. 양이온교환수지가 첨가된 개방형 반응기에서 소규모 제조수준의 세로토닌의 생산

[0077]

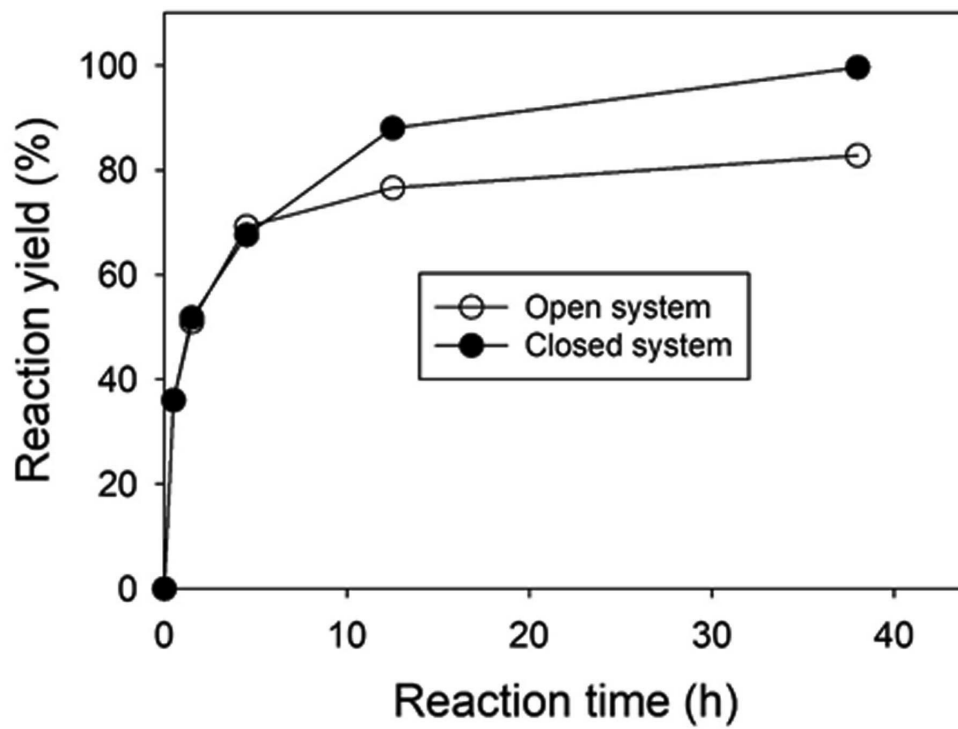
본 발명의 활용성을 보이기 위해 세로토닌의 생축매 생산을 수행하였다. 반응은 100 mL 자켓반응기에 40 mL 반응액 (405 mg 5-하이드록시-L-트립토판, 50 mM 포타슘 포스페이트 pH 7) 및 양이온교환수지 (100 mg/mL Dowex 50WX8/Na<sup>+</sup>), 정제된 AADC-BA (4 U/mL)를 첨가하여 37도에서 진행되었다. 반응액은 자기교반기를 통해 교반(150 rpm)되었으며 반응시간에 따라 반응액 일부로부터 기질 및 생성물을 HPLC분석하였다. 이의 결과를 도 5에 나타내었다. 반응 40분 후 >99% 전환율을 보였으며, 생성된 세로토닌은 대부분 양이온교환수지에 흡착하여 반응액 내에 낮은 농도(40 분 반응 후 1.7 mM)로 존재함을 관찰하였다.

도면

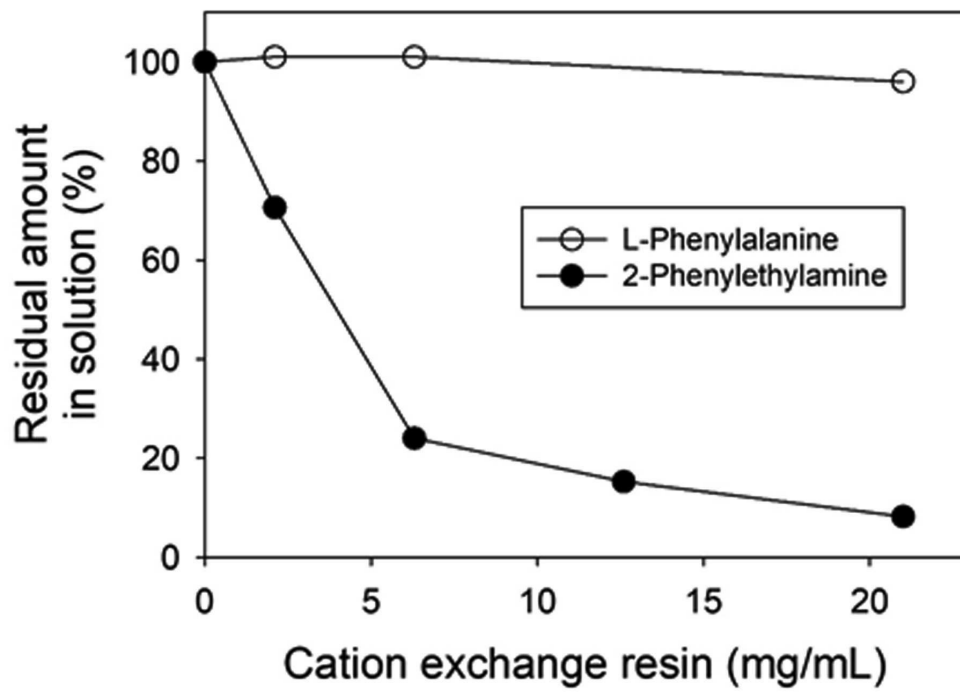
도면1



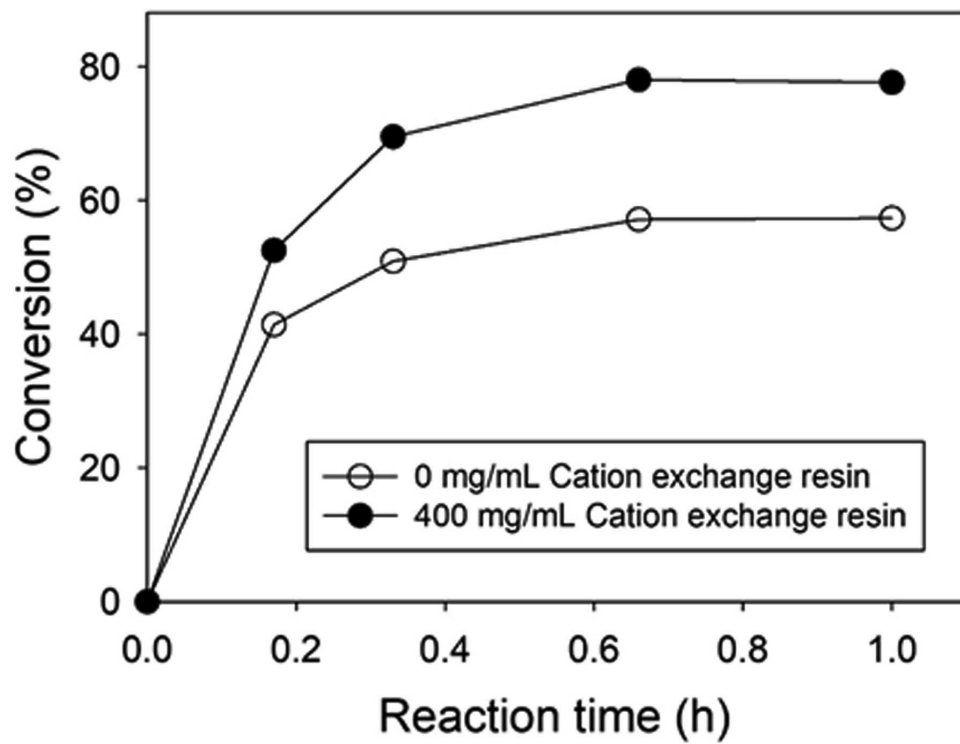
도면2



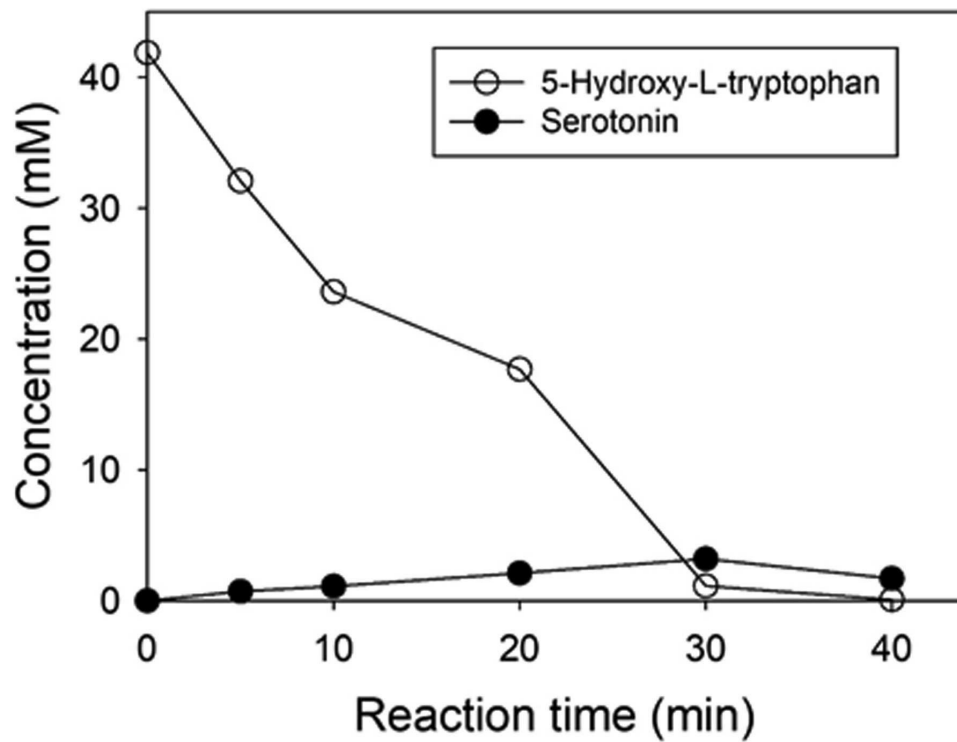
도면3



도면4



도면5



# 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Method for biocatalytic production of biogenic amines with in situ product removal
- <130> PD20-119
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 480
- <212> PRT
- <213> amino acid decarboxylase
- <400> 1

Met Ser Glu Asn Leu Gln Leu Ser Ala Glu Glu Met Arg Gln Leu Gly  
1 5 10 15  
Tyr Gln Ala Val Asp Leu Ile Ile Asp His Met Asn His Leu Lys Ser  
20 25 30  
Lys Pro Val Ser Glu Thr Ile Asp Ser Asp Ile Leu Arg Asn Lys Leu

35                                      40                                      45  
 Thr Glu Ser Ile Pro Glu Asn Gly Ser Asp Pro Lys Glu Leu Leu His  
 50                                      55                                      60  
 Phe Leu Asn Arg Asn Val Phe Asn Gln Ile Thr His Val Asp His Pro  
 65                                      70                                      75                                      80  
 His Phe Leu Ala Phe Val Pro Gly Pro Asn Asn Tyr Val Gly Val Val  
 85                                      90                                      95  
  
 Ala Asp Phe Leu Ala Ser Gly Phe Asn Val Phe Pro Thr Ala Trp Ile  
 100                                      105                                      110  
 Ala Gly Ala Gly Ala Glu Gln Ile Glu Leu Thr Thr Ile Asn Trp Leu  
 115                                      120                                      125  
 Lys Ser Met Leu Gly Phe Pro Asp Ser Ala Glu Gly Leu Phe Val Ser  
 130                                      135                                      140  
 Gly Gly Ser Met Ala Asn Leu Thr Ala Leu Thr Val Ala Arg Gln Ala  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Lys Leu Asn Asn Asp Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Phe Ser Asp Gln  
  
 165                                      170                                      175  
 Thr His Phe Ser Val Asp Arg Ala Leu Lys Val Leu Gly Phe Lys His  
 180                                      185                                      190  
 His Gln Ile Cys Arg Ile Glu Thr Asp Glu His Leu Arg Ile Ser Val  
 195                                      200                                      205  
 Ser Ala Leu Lys Lys Gln Ile Lys Glu Asp Arg Thr Lys Gly Lys Lys  
 210                                      215                                      220  
 Pro Phe Cys Val Ile Ala Asn Ala Gly Thr Thr Asn Cys Gly Ala Val  
 225                                      230                                      235                                      240  
  
 Asp Ser Leu Asn Glu Leu Ala Asp Leu Cys Asn Asp Glu Asp Val Trp  
 245                                      250                                      255  
 Leu His Ala Asp Gly Ser Tyr Gly Ala Pro Ala Ile Leu Ser Glu Lys  
 260                                      265                                      270  
 Gly Ser Ala Met Leu Gln Gly Ile His Arg Ala Asp Ser Leu Thr Leu  
 275                                      280                                      285  
 Asp Pro His Lys Trp Leu Phe Gln Pro Tyr Asp Val Gly Cys Val Leu



290                      295                      300  
 Ile Arg Asn Ser Gln Tyr Leu Ser Lys Thr Phe Arg Met Met Pro Glu  
  
 305                      310                      315                      320  
 Tyr Ile Lys Asp Ser Glu Thr Asn Val Glu Gly Glu Ile Asn Phe Gly  
  
                     325                      330                      335  
 Glu Cys Gly Ile Glu Leu Ser Arg Arg Phe Arg Ala Leu Lys Val Trp  
  
                     340                      345                      350  
 Leu Ser Phe Lys Val Phe Gly Val Ala Ala Phe Arg Gln Ala Ile Asp  
  
                     355                      360                      365  
 His Gly Ile Met Leu Ala Glu Gln Val Glu Ala Phe Leu Gly Lys Ala  
  
                     370                      375                      380  
  
  
 Lys Asp Trp Glu Val Val Thr Pro Ala Gln Leu Gly Ile Val Thr Phe  
 385                      390                      395                      400  
 Arg Tyr Ile Pro Ser Glu Leu Ala Ser Thr Asp Thr Ile Asn Glu Ile  
  
                     405                      410                      415  
 Asn Lys Lys Leu Val Lys Glu Ile Thr His Arg Gly Phe Ala Met Leu  
  
                     420                      425                      430  
 Ser Thr Thr Glu Leu Lys Glu Lys Val Val Ile Arg Leu Cys Ser Ile  
  
                     435                      440                      445  
 Asn Pro Arg Thr Thr Thr Glu Glu Met Leu Gln Ile Met Met Lys Ile  
  
  
                     450                      455                      460  
 Lys Ala Leu Ala Glu Glu Val Ser Ile Ser Tyr Pro Cys Val Ala Glu  
 465                      470                      475                      480  
 <210>     2  
 <211>     396  
 <212>     PRT  
 <213>     amino acid decarboxylase  
 <400>     2  
 Met Arg Asn Met Gln Glu Lys Gly Val Ser Glu Lys Glu Ile Leu Glu  
                     1                      5                      10                      15  
 Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Ser Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Asp Gly Asn

20 25 30  
 Ile Phe Gly Ser Met Cys Ser Asn Val Leu Pro Ile Thr Arg Lys Ile  
 35 40 45  
 Val Asp Ile Phe Leu Glu Thr Asn Leu Gly Asp Pro Gly Leu Phe Lys  
 50 55 60  
 Gly Thr Lys Leu Leu Glu Glu Lys Ala Val Ala Leu Leu Gly Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Asn Asn Lys Asp Ala Tyr Gly His Ile Val Ser Gly Gly Thr Glu  
 85 90 95  
 Ala Asn Leu Met Ala Leu Arg Cys Ile Lys Asn Ile Trp Arg Glu Lys  
 100 105 110  
 Arg Arg Lys Gly Leu Ser Lys Asn Glu His Pro Lys Ile Ile Val Pro  
 115 120 125  
 Ile Thr Ala His Phe Ser Phe Glu Lys Gly Arg Glu Met Met Asp Leu  
 130 135 140  
 Glu Tyr Ile Tyr Ala Pro Ile Lys Glu Asp Tyr Thr Ile Asp Glu Lys  
 145 150 155 160  
 Phe Val Lys Asp Ala Val Glu Asp Tyr Asp Val Asp Gly Ile Ile Gly  
 165 170 175  
 Ile Ala Gly Thr Thr Glu Leu Gly Thr Ile Asp Asn Ile Glu Glu Leu  
 180 185 190  
 Ser Lys Ile Ala Lys Glu Asn Asn Ile Tyr Ile His Val Asp Ala Ala  
 195 200 205  
 Phe Gly Gly Leu Val Ile Pro Phe Leu Asp Asp Lys Tyr Lys Lys Lys  
 210 215 220  
 Gly Val Asn Tyr Lys Phe Asp Phe Ser Leu Gly Val Asp Ser Ile Thr  
 225 230 235 240  
 Ile Asp Pro His Lys Met Gly His Cys Pro Ile Pro Ser Gly Gly Ile  
 245 250 255  
 Leu Phe Lys Asp Ile Gly Tyr Lys Arg Tyr Leu Asp Val Asp Ala Pro  
 260 265 270

Tyr Leu Thr Glu Thr Arg Gln Ala Thr Ile Leu Gly Thr Arg Val Gly  
 275 280 285  
 Phe Gly Gly Ala Cys Thr Tyr Ala Val Leu Arg Tyr Leu Gly Arg Glu  
 290 295 300  
 Gly Gln Arg Lys Ile Val Asn Glu Cys Met Glu Asn Thr Leu Tyr Leu  
 305 310 315 320  
  
 Tyr Lys Lys Leu Lys Glu Asn Asn Phe Lys Pro Val Ile Glu Pro Ile  
 325 330 335  
 Leu Asn Ile Val Ala Ile Glu Asp Glu Asp Tyr Lys Glu Val Cys Lys  
 340 345 350  
 Lys Leu Arg Asp Arg Gly Ile Tyr Val Ser Val Cys Asn Cys Val Lys  
 355 360 365  
 Ala Leu Arg Ile Val Val Met Pro His Ile Lys Arg Glu His Ile Asp  
 370 375 380  
 Asn Phe Ile Glu Ile Leu Asn Ser Ile Lys Arg Asp  
  
 385 390 395