



에쿠올 유도체 합성 방법

서울대학교 -김병기 교수님

기술 분류	BT(LC0314.)
기술 분야	의약품 원료 생산 기술
적응증	항산화, 항암, 갱년기 질환 등
기술 완성도 (TRL)	<input type="checkbox"/> 아이디어 단계 <input type="checkbox"/> 연구개발 진행단계 (추가실험 필요한 단계) <input checked="" type="checkbox"/> 연구개발 완료단계 (충분한 실험 데이터가 확보된 단계) <input type="checkbox"/> 전임상 단계 <input type="checkbox"/> 초기 임상(P1/2a) <input type="checkbox"/> 후기 임상(P2b/3)
관련특허	<p>I. 에쿠올 유도체를 생산하는 재조합 대장균 및 이를 이용한 에쿠올 유도체 합성 방법 (출원번호: 10-2017-0026774/등록번호: 10-2005237)</p> <p>- PCT 출원 (PCT/KR2018/002201)</p> <p>II. 활성이 증대된 테트라하이드로다이드제인 환원효소 및 에쿠올 유도체 생산에 의 응용 (출원번호: 10-2018-0093505/등록번호: 10-2079003)</p>

01 기술 개요

기술 개요	에쿠올 유도체 합성 방법
기술 특성	<p>본 기술은 혐기성 미생물인 슬래키아 이소플라보니컨버턴스(<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>)이 아닌, 재조합 대장균을 호기성 조건 하에서 배양하여 에쿠올 유도체를 생산하는 방법에 관한 것임</p> <p>기술 1 의 방법을 통해 에쿠올, 디하이드로에쿠올, 5-하이드록시-에쿠올(5-hydroxy-equol) 및 5-하이드록시-디하이드로에쿠올(5-hydroxy-dehydroequol)의 선택적 합성이 가능하고, 호기성 조건에서 수 시간 단위로 수행 가능하여 생산 비용 절감 및 생산물로 인한 고부가가치 획득이 가능함</p> <p>기술 2 는 에쿠올 생산 재조합 대장균에 있는 테트라하이드로다이드제인 환원효소(THDR)에 P464A 변이를 적용하여 5-하이드록시-에쿠올의 수율은 증가시키고 5-하이드록시-디하이드로에쿠올의 수율은 낮추어 생산 선택성을 높여 에쿠올 유도체 생산 효율을 증가시키는 기술임</p>

	<p>본 기술은 효율적인 대량생산 가능하여 의약품, 식품 등 다양한 응용처 활용 용이함</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 에쿠올 합성 재조합 균주 2. 재조합 균주 이용 에쿠올 유도체 합성(구획화 생산, 선택적 생산) ⇒생산성 증대&고효율 3. 수용성 고분자를 이용한 에쿠올 수율 증진
<p>기술 적용(활용) 가능분야</p>	<p>"<u>항산화제</u>", "<u>항암제</u>", "<u>갱년기 질환 치료제</u>" 등으로 활용될 수 있음</p>

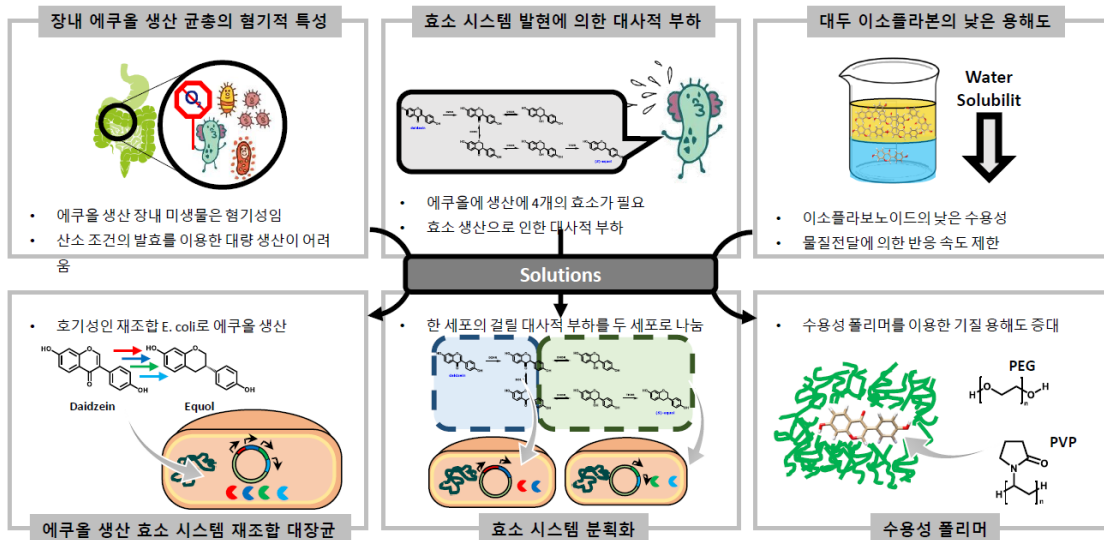
02 기존 기술의 문제점

- 기존 에쿠올 생산 기술은 한계점이 존재하는데, 슬래키아 이소플라보니컨버턴스(*Slackia isoflavoniconvertens*)가 혐기성 미생물이라는 점에서 바이오 공법 상의 한계점이 존재함 : 자연계 유래 혐기성 미생물을 그대로 이용하기 때문에 혐기성 조건에서 배양해야 하는 바, 낮은 생산성, 생산 설비의 고도화, 고비용 등의 단점 존재함
- 화학공법을 이용하여 에쿠올을 생산할 경우, 복잡한 생산 경로, 라세믹 에쿠올 합성, 유독성 약품 사용으로 뷰티산업, 식품산업, 의약품 산업에 부적절함

[기존 에쿠올 생산 기술의 한계]

생산 기술 (공법)	한계점
<p>바이오 공법</p>	<p>자연계 유래 혐기성 미생물을 그대로 이용하기 때문에 낮은 생산성, 생산 설비의 고도화 등의 단점 존재</p>
<p>화학 공법</p>	<p>복잡한 생산 경로, 라세믹 에쿠올 합성, 유독성 약품 사용으로 뷰티산업, 식품, 의약품 산업에 부적절함</p>

- 이에 에쿠올의 고효율 고수율 저비용 합성 방법이 필요함

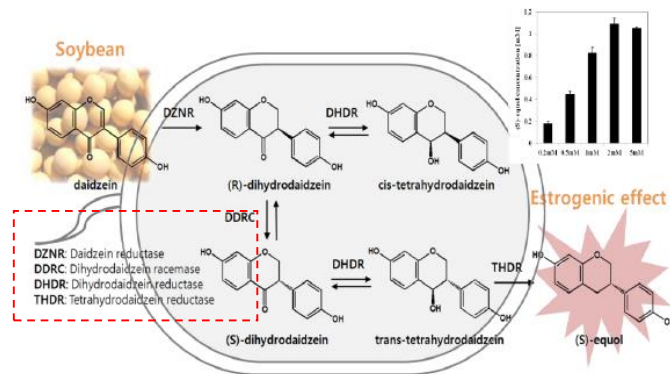


03 기존 기술 대비 우수성

- ◇ 본 기술은 재조합 대장균을 호기성 조건으로 배양하여 에쿠올 유도체를 생산하는 방법에 관한 것임
- ◇ 본 기술의 방법을 통해 에쿠올, 디하이드로에쿠올, 5-하이드록시-에쿠올(5-hydroxy-equol) 및 5-하이드록시-디하이드로에쿠올(5-hydroxy-dehydroequol)의 선택적 합성이 가능하고, 호기성 조건에서 수 시간 단위로 수행 가능하여 생산 비용 절감 및 생산물로 인한 고부가가치 획득이 가능함
- ◇ 본 기술의 방법으로 에쿠올 유도체의 효율적인 대량생산 및 고수율(1.2 g/L, 1.35g/L) 수득이 가능하여 의약품, 식품 등 다양한 분야에 응용이 가능함

1. 에쿠올 합성 재조합 대장균

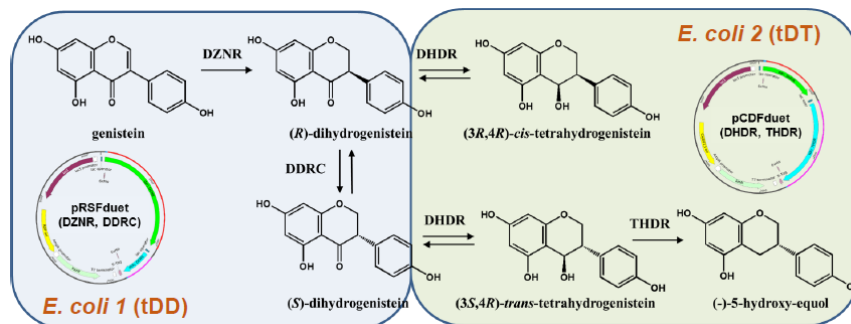
- 에쿠올 변환 관여 4 개 효소 발현 재조합 대장균
- 재조합 대장균은 호기성 재조합 *E. coli*
- : 호기성 환경에서 에쿠올 생산 가능
- ⇒ 비용 절감 & 시간 단축



[에쿠올 합성 재조합 대장균 개발]

2. 재조합 대장균 이용 에쿠올 유도체 합성_구획화 합성 방법

- 반응시간 10 시간 만에 기질의 전환율 95%이상
- 5-하이드록시-에쿠올(5-hydroxy-equol) 199 mg/L 생산
- 5-하이드록시-디하이드로에쿠올(5-hydroxy-dehydroequol) 63 mg/L 생산
- 구획화된 반응계를 이용한 선택적 합성 가능
- 에쿠올 생산 재조합 대장균에 있는 4 개의 에쿠올 생산 효소 중 테트라하이드로다이드제인 환원효소(THDR)에 P464A 변이를 적용하여 5-하이드록시-에쿠올 1.35 g/L 생산
- ⇒ 빠른 생산 시간 & 높은 생산성 & 고효율 & 고수율



[구획화된 합성 반응의 도식도]

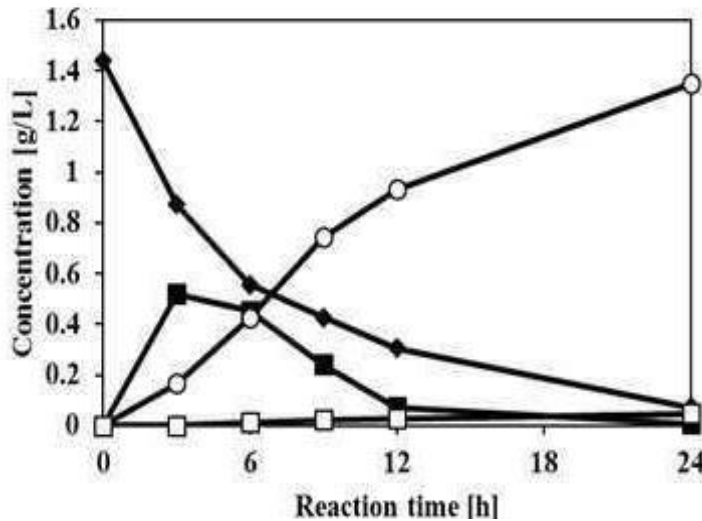
3. 재조합 대장균 이용 에쿠올 유도체 합성_위치 선택적 합성 방법

- 에쿠올 생산 재조합 대장균에 있는 4 개의 에쿠올 생산 효소 중 테트라하이드로다이드제인 환원효소(THDR)에 P464A 변이를 적용

- 그 결과, 5-하이드록시-에쿠올의 수율을 1.35 g/L 까지 증가시키면서

5-하이드록시-디하이드로에쿠올의 수율은 기존의 0.26 g/L 에서 0.05 g/L 까지 낮추어 선택성을 높였고, 다른 에쿠올 유도체 생산 효율을 증가시킴

**5-하이드록시-디하이드로에쿠올은 목적성에 따라 부산물로 취급되기도 하므로 이러한 선택적 수율 증진은 중요한 기술임



닫힌 마름모(◆): 제니스테인,
닫힌 정사각형(■): 다이하이드로제니스테인,
열린 원(○): 5-하이드록시-에쿠올
열린 정사각형(□): 5-하이드록시-디하이드로 에쿠올

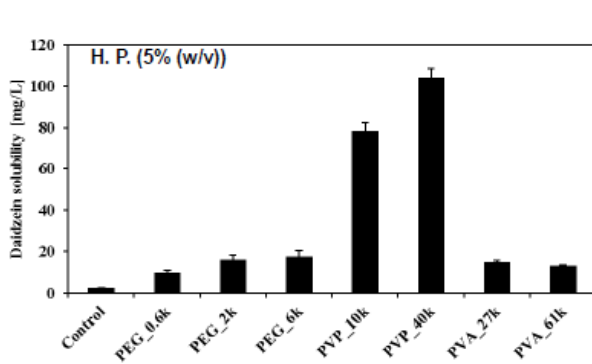
[폴리비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone, PVP) 5%와 디메틸설폭사이드 (dimethylsulfoxide, DMSO) 용액에서 니스테인의 연속적인 공급이 tDDDT-TPA 에 의해 5-하이드록시-에쿠올로 생전환될 때, 반응 시간에 따른 반응 물질 및 5-하이드록시-에쿠올의 농도 측정 결과]

Table 2. Bacterial species for production of reductive isoflavone derivatives and their production efficiency.

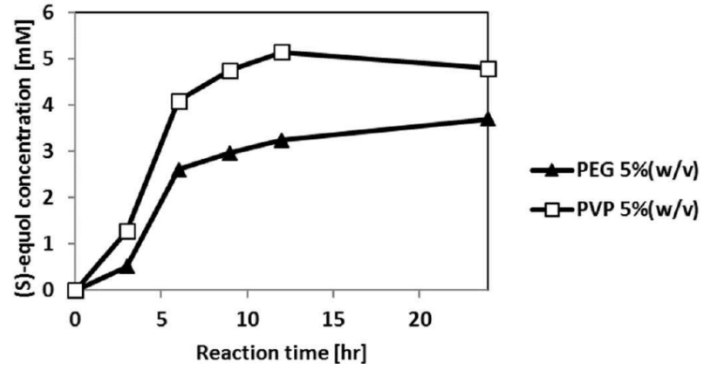
Species	Reaction	Substrate	Product	Initial substrate conc. (mg/L)	Titer (mg/L)	Productivity (mg/L/h)	Reference
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Reduction	of 100 ml soy milk	Equol	n.d.	4.6	0.1	Tsangalis et al. (2002)
<i>Bifidobacterium longum-a</i>				n.d.	5.1	0.1	
<i>Bifidobacterium animalis</i>				n.d.	5.4	0.1	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CS1		of 2% (w/v) P. lobata extract		n.d.	246.0	3.4	Kwon et al. (2018)
<i>Lactobacillus</i> sp. CS2				n.d.	144.0	2.0	
<i>Lactobacillus</i> sp. CS3				n.d.	158.0	2.2	
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i> JCM16059		Daidzein		38.1	31.1	0.3	Jim et al. (2008)
<i>Slackia</i> sp. YIT 11861				250.0	240.0	2.5	Tsuji et al. (2013)
<i>Lactococcus garvieae</i> 20-92				80.0	57.0	0.6	Uchiyama, Ueno and Suzuki (2006)
<i>Slackia</i> sp. TM-30				12.5	6.2	<-0.1	Tamura, Hori and Nakagawa (2014)
<i>Eggerthella</i> sp. YY7918				12.7	12.1	0.2	Yokoyama and Suzuki (2008)
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i> DSM22006				21.4	12.6	0.9	Matthies, Blaut and Braune (2009)
<i>Slackia</i> sp. NATTS				102.0	91.1	3.8	Tsuji et al. (2010)
<i>Eggerthella</i> sp. Julong 732, <i>Lactobacillus</i> sp. Niu-O16				305.0	183.0	7.6	Wang et al. (2007)
<i>Eubacterium</i> sp. D1		Daidzein	Equol	200.0	3.4	<-0.1	Yu, Yao and Zhu (2008)
<i>Eubacterium</i> sp. D2				200.0	3.6	<-0.1	
<i>Asaccharobacter celatus</i> gen. nov.sp. nov do03				49.0	33.6	0.4	Minamida et al. (2006, 2008)
<i>Coriobacteriaceae</i> sp. Mt1B8				25.4	17.0	0.9	Matthies et al. (2008)
<i>Escherichia coli</i> strain tDDDT, recombinant				254.0	206.0	51.5	Lee et al. (2016a)
tDDDT (supplemented with polyvinylpyrrolidone)				1270.0	1220.0	50.8	Lee et al. (2018b)
Strain Julong 732		DHD		103.0	84.8	0.9	Wang et al. (2005)
<i>Slackia</i> sp. NATTS				25.6	20.4	0.9	Tsuji et al. (2010)
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i> DSM22006		Genistein	5-OH-equol	22.7	8.0	0.2	Matthies, Blaut and Braune (2009)
<i>Coriobacteriaceae</i> sp. Mt1B8				27.0	15.5	0.5	Matthies et al. (2008)
<i>Escherichia coli</i> strain tDD and tDT, recombinant				270.0	230.0	38.0	Lee et al. (2017)
<i>Slackia equalifaciens</i> AUH-JLC257				162.0	129.0	1.8	Xie et al. (2015)

4. 수용성 고분자를 이용한 에쿠올 수율 증진

- 반응계에 수용성 고분자 추가하여 에쿠올의 수율을 증진시킬 수 있음을 확인
 - PVP 첨가 반응: 반응시간 12 시간 만에 5 mM 에쿠올 합성 (수율 99% 이상, 1.16 g/L)
 - PEG 첨가 반응: 반응시간 24 시간 만에 3.7 mM 에쿠올 합성 (수율 74% 이상, 0.9 g/L)
- ⇒ 수용성 고분자 추가 → 기질의 용해도 증가 → 에쿠올 생산 수율 증가



[수용성 고분자에 의한 용해도 증가]

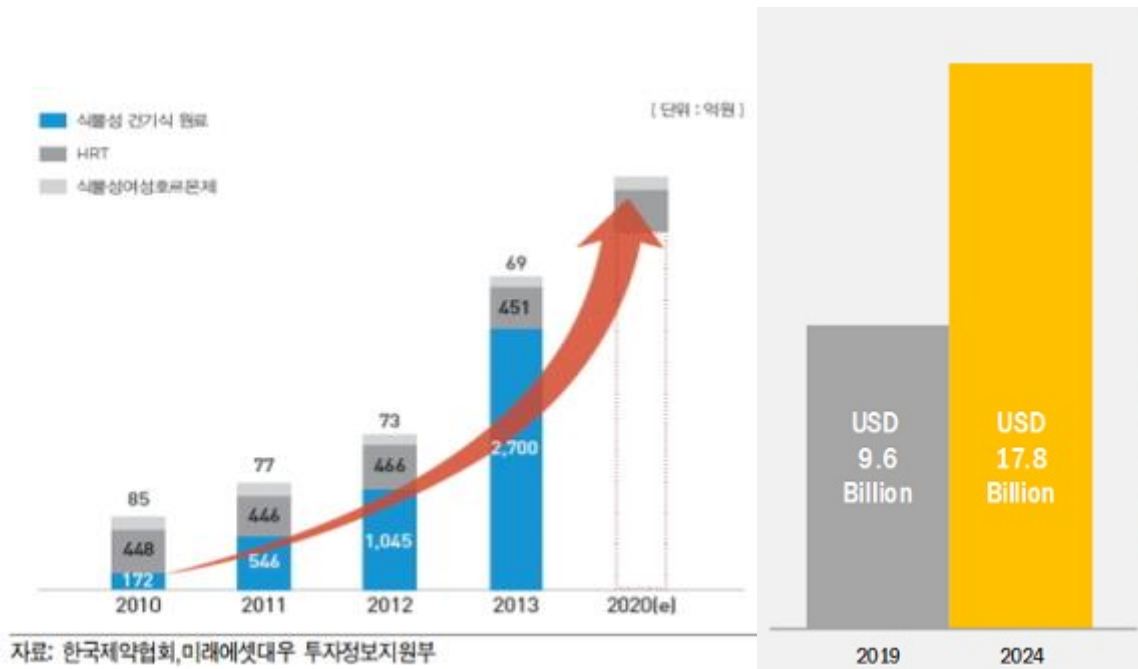


[수용성 고분자 추가에 따른 에쿠올 생산 수율]

04 시장 현황

◇ 에쿠올 시장규모

- 본 기술은 에쿠올 유도체 생산 방법에 관한 것으로, 에쿠올과 하이드록시-에쿠올을 생산할 수 있음
- 에쿠올은 여성 갱년기 질환 치료제, 에스트로겐 수용체 베타에 선택적으로 결합하여 유방암과 관련된 부작용 감소시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있어, 본 기술이 적용될 시장은 여성 갱년기 증상 치료 시장을 타겟할 수 있음 (다만, 하이드록시-에쿠올은 시장 개척 중임)



< 여성 갱년기 시장 규모 추정 >

** 출처: MARKETS AND MARKETS, 2020.01

- 글로벌 여성 건강 관리 시장의 시장 규모를 살펴보면, 2019년 약 96억 달러에서 2024년까지 예측 기간 동안 13.2%의 연평균 성장률로 178억 달러 규모를 형성할 것으로 예상함
- 이에 갱년기 증상 치료 시장 규모 또한 유사한 연평균 성장률을 보일 것으로 예상됨

05 기술 문의처

구분	기관명	담당자	직급	연락처	e-mail
연구자	서울대학교	김병기	교수	02-880-6774	byungkim@snu.ac.kr
기술권리자	서울대학교 산학협력단	박지영	변리사	02-880-2038	jypat@snu.ac.kr