

## 고정화된 *Chromobacterium chocolatum*의 Whole Cell을 이용한 Dimethyl-*cis*-1,3-dibenzyl-2-oxoimidazolidine-4,5-dicarboxylate의 가수분해

李倫珍 · 沈相均<sup>†</sup> · 安龍鉉<sup>\*</sup>  
단국대학교 이과대학 화학과  
<sup>†</sup>단국대학교 자연과학대학 화학과  
(1997 1. 22 접수)

### The Hydrolysis of Dimethyl-*cis*-1,3-dibenzyl-2-oxoimidazolidine-4,5-dicarboxylate by Immobilized Whole Cells of *Chromobacterium chocolatum*

Younjin Lee, Sangkyun Shim<sup>†</sup>, and Yonghyun Ahn<sup>\*</sup>

Department of Chemistry, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

<sup>†</sup>Department of Chemistry, Dankook University, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea

(Received January 22, 1997)

**요약.** *Chromobacterium chocolatum*의 whole cell을 polyacrylamide의 matrix안에 고정화 하였으며 이를 이용하여 dimethyl-*cis*-1,3-dibenzyl-2-oxoimidazolidine-4,5-dicarboxylate를 가수분해 하였다. 고정화된 mycelium을 이용하여 가수분해하는 최적조건을 연구하였다. 기질의 농도, 반응시간, 용액의 pH변화에 따른 lipase의 안정성 및 반응의 영향을 연구하였다. 고정화된 mycelium의 리파아제의 활동도는 4주이상 지속되었고 wet cell 2 g을 고정화 하여 200 mg의 기질을 pH=7의 반응조건에서 반응시켰을 때 최대 수율로 생성물이 얻어졌다.

**ABSTRACT.** The whole cells of *Chromobacterium chocolatum* was immobilized in the matrix of polyacrylamide and then used for the hydrolysis of dimethyl-*cis*-1,3-dibenzyl-2-oxoimidazolidine-4,5-dicarboxylate. This hydrolysis yielded the optically active monoester (>96% ee) which is useful as an synthetic intermediate of (+)-biotin. We have studied the optimum condition of hydrolysis by using immobilized cells under variable concentration of substrate, reaction time and pH levels. The activity of lipase in immobilized cell was retained for longer than 4 weeks. The best conversion yield of product was obtained when 2 g of wet cell was immobilized and then reacted with 200 mg of substrate at pH 7.

## 서 론

효소의 유기합성에 대한 응용은 최근 크게 증가하고 있으며 광학적으로 활성을 가지는 화합물의 제법에 많이 사용되고 있다.<sup>1</sup> 효소의 촉매기능에 대한 충분한 인식을 가지고 있음에도 불구하고 소수의 효소들만이 의약품 또는 정밀화학제품의 공업적인 제법에 이용되고 있는 실정이다.<sup>2</sup> 이러한 대량생산에 응용하는데 있어서 단점으로 지적되는 것은 실제화학 반응의 조건에서의 효소가 불안정하다는 것이다. *Chromobacterium chocolatum*의 whole cell을 이용하여 dimethyl-*cis*-1,3-dibenzyl-2-oxoimidazolidine-4,5-dicarboxylate와 biphasic aqueous-organic 용액에서 반응

시킨 결과 광학활성이 98% 이상인 *cis*-1,3-dibenzyl-2-oxoimidazolidinedicarboxylic acid monoester를 얻었으며 이는 (+)-biotin의 합성의 중간체로 사용된다.<sup>1</sup> 이와 같은 광학활성을 가지는 중간체의 제법은 (+)-biotin의 공업적인 제법의 과정을 줄일수 있을 뿐만 아니라 광학적으로 순수한 중간체를 얻기위한 재결정에 사용하는 *d*-ephedrine를 사용하지 않아도 되기 때문이다. 최근에 whole cell의 고정화에 대한 많은 방법이 개발되고 있으며 생물활성을 가지는 화합물의 합성에 많이 적용하고 있다. Gel 또는 collagen matrix에 whole cell을 고정화 할 경우 일정한 조건에서 수개월간 활성을 유지할 수 있다.<sup>4</sup> Whole cell을 고정화

한후 생물학적으로 활성을 가지는 화합물의 제법에 활용되었다.<sup>5</sup>

본연구에서는 *Chromobacterium chocolateum*의 whole cell을 polyacrylamide에 고정화하였다. 이고정화 방법으로 얻어진 mycelium을 dimethyl-cis-1,3-dibenzyl-2-oxoimidazolidine-4,5-dicarboxylate의 가수분해 반응에 적용하여 고정화된 효소의 시간에 따른 안정성, 생성물로 변환시킬 수 있는 반응물의 최대량 및 pH의 변화가 생성물의 변화에 미치는 영향을 조사하였다.

## 실 험

**재료 및 방법.** 본 실험에 사용된 균주 *Chromobacterium chocolateum* (IFO-3758)은 Institute for Fermentation, Osaka, (일본)에서 구입하여 사용하였다. 균주 배양에 필요한 시약으로 glucose, polypepton (DIFCO), yeast extract (Aldrich),  $K_2HPO_4$ 를 사용하였고 고정화 실험에 필요한 시약으로 N'-tetramethylethylene diamine (Aldrich), N,N'-methylene bisacrylamide (Aldrich), acrylamide (Aldrich)를 사용하였다. 기술되지 않은 것들은 시중에서 구입할 수 있는 시약 급을 사용하였고 유기용매는 일반적인 정제방법에 의해 정제한 후 사용하였다.

### *Chromobacterium chocolateum* 배양

**균주 배양.** 증류수 100 ml에 polypepton 1 g, yeast extract 0.2 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g을 첨가하고 1 N NaOH로 용액의 pH를 7로 맞춘 후 agar-powder (1.5 g)를 첨가하고 물 중탕을 5분간한다. 잘 녹은 용액을 멸균된 petri dish에 부어서 표면이 굳을 때까지 기다린 후 밀봉하여 실온에서 2일간 방치한 후 오염된 것은 버린다. IFO-3758이 들어있는 바이알을 열고 멸균된 물을 사용하여 백금 wire-loop로 잘 섞은 후 agar-plate에 상하 좌우 streaking한 다음 30°C에서 48~96시간 배양한다.

**대량 배양.** Seed medium은 glucose 1 g, polypepton 1 g, yeast extract 0.5 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g, 증류수 100 ml를 포함하며 121°C에서 15분간 멸균한다. Production medium은 seed medium과 동일한 조성을 갖는다. Seed medium 100 ml을 포함하는 500 ml 삼각플라스크에 잘 자란 spor를 agar plate에서 백금 wire-loop로 떼어 넣은 뒤 28°C, 280 rpm (shaking incubator)에서 3일간 배양한다. 동일한 조성의 production

medium 200 ml에 seed medium 10ml씩을 첨가하여 28°C, 280 rpm에서 24시간 배양한다. 초원심 분리기를 이용하여 6500 g, 4°C 조건하에서 15분간 원심분리하여 cell을 모은다.

### 고정화된 whole cell을 이용한 dialkyl carboxylate의 가수분해

#### *Chromobacterium chocolateum* whole cell의 고정화.

Production medium에서 배양된 *Chromobacterium chocolateum*을 원심 분리하여 cell을 모은다. 이렇게 얻어진 cell(wet weight) 3 g을 0.05 M phosphate buffer(pH 7) 소량으로 세척한 후 Solution A에 넣고 최종 부피가 9.4 ml가 되도록 증류수를 첨가한다. Solution A의 조성은 0.1 M phosphate buffer(pH 7) 5 ml, 25% acrylamide monomer(85% acrylamide, 15% N,N'-methylene bisacrylamide) 2 ml이다. 질소기체 하에서 위 혼합물에 5% N'-tetramethylethylenediamine 0.1 ml와 0.5% ammonium persulfate 0.5 ml을 첨가하고 5°C에서 20분 간 반응시켜 중합반응이 진행되도록 한다. Polyacrylamide의 매트릭스 안에 whole cell이 고정화된다.

**Dimethyl ester(2)의 가수분해.** 젤형태의 고정화된 whole cell을 작은 크기(0.125 cm<sup>3</sup>)로 자른 다음 0.1 M phosphate buffer(pH 7) 75 ml와 isooctane 30 ml를 첨가하고 dimethyl-cis-1,3-dibenzyl-2-oxoimidazolidine-4,5-dicarboxylate 100 mg을 첨가한다. 위 혼합물을 28°C, 200 rpm에서 7일간 shaking incubation한다. 고정화된 whole cell을 거즈를 이용해 거른 다음 반응용액에 1 N NaOH를 가하여 pH를 11로 조절한 후 methylene chloride (2×30 ml)로 추출한다. 그리고 수용액에 1 N HCl을 가하여 pH를 2로 조절한 후 methylene chloride (2×30 ml)로 추출한다. pH=2에서 추출하여 모은 유기층에 무수  $MgSO_4$ 로 물을 제거하고 감압하에서 용매를 제거하면 생성물(monoacid)(3, 수율=70%)을 얻는다. 거즈에 걸러진 cell은 4°C에서 냉장 보관 후 반응에 재이용한다.

<sup>1</sup>H NMR (200MHz,  $CDCl_3$ ) δ 3.68 (s, 3H) 4.08 (d, J=5.0Hz, 1H) 4.15 (s, 2H) 4.17 (d, J=5.0 Hz, 1H) 5.03 (d, J=11Hz, 1H) 5.13 (d, J=11Hz, 1H) 6.7 (bs, 1H) 7.3 (m, 10H).

광학순도를 측정하기 위하여 monoacid를  $LiBH_4$ 로 환원시킨후 산촉매하에서 lactonization한다.<sup>3</sup> 화합물 4; <sup>1</sup>H NMR (200MHz,  $CDCl_3$ ) δ 3.92 (d, J=8.0 Hz,

1H) 4.1(q, J=4 Hz, 1H) 4.15 (s, 2H) 4.3 (d, J=5.8 Hz, 1H) 4.4 (d, J=5.5 Hz, 1H) 4.63 (d, J=15.2 Hz, 1H) 5.04(d, J=15.0 Hz, 1H) 7.3 (m, 10H),  $[\alpha]_D^{20} = +58^\circ$  (c, 1,  $\text{CDCl}_3$ ; ee=99). {lit.  $^{7c}$   $[\alpha]_D^{23} = +58.3^\circ$  (c, 1, benzene)}.

**기질 양에 따른 가수분해.** 원심 분리하여 얻은 wet cell 3 g을 이용하여 이전과 동일한 방법으로 고정화한 후에 phosphate buffer 75 ml와 isoctane 30 ml를 넣은 후 기질의 양을 각각 100 mg, 200 mg, 300 mg을 첨가하여 28 °C, 200 rpm에서 7일간 shaking incubation한다. 위와 동일한 정제방법을 이용하였으며 각기 다른 양의 기질을 사용하였을 때 얻어지는 수득률은 Fig. 2에 정리하였다.

**pH 변화에 따른 가수분해.** 2)번의 실험과 동일한 조건으로 반응하였으며 단지 용액의 pH만을 변경하였다. 동일한 정제방법을 통하여 최종화합물을 분리하였고 수득률은 Fig. 3에 정리하였다.

### 결과 및 고찰

효소 반응에서 흔히 접하게 되는 효소의 안정성에 관한 문제와 한 번 사용한 효소 또는 whole cell을 반복 사용할 수 없는 문제를 해결하기 위해 고정화 연구를 하였다. 본 연구에서는 polyacrylamide를 이용하여 *Chromobacterium chocolateum*의 whole cell을 고정화하였고 이를 biotransformation에 사용하였다.

Isooctane을 유기용매로 사용한 이상계(biphasic system)에서 고정화된 whole cell을 이용하여 dimethyl ester(2)를 가수분해하면 69% 수득률로 생성물을 얻을 수 있다. 고정화된 whole cell은 반복사용이 가능하므로 시간에 따른 안정성을 알아보기 위해 반응이 끝난 cell을 여과한 후 가수분해 반응에 재사용 하여 생화학 촉매의 활성 정도를 확인하였다.

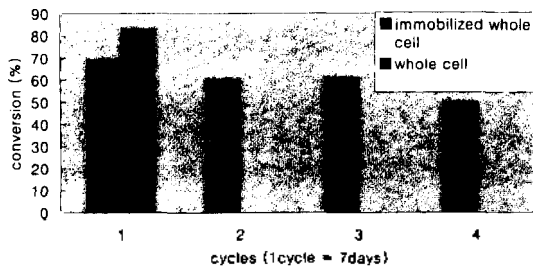


Fig. 1. Multicycle hydrolysis of dimethylester with immobilized cell at 28 °C in 0.1 M phosphate buffer (pH=7)-28% isoctance.

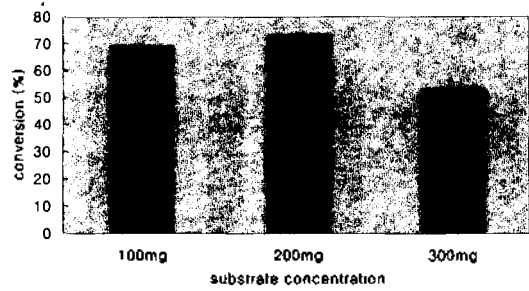


Fig. 2. Effects of substrate concentration on the conversion of substrate into product at 28 °C in 0.1 M phosphate buffer (pH=7)-28% isoctane.

생성물의 수득률 정도를 살펴보면, 1차 반응에서는 69%, 2차 반응은 60%, 수득률로 3차 반응은 61%, 4차 반응은 50% 수득률로 얻었다. (Fig. 1) 1차 반응에서 얻어지는 반응 생성물을 비교하여보면 고정화된 cell를 이용하는 경우 whole cell을 직접 이용한 경우보다 낮은 수득률로 생성물을 얻었지만 4번 이상 반복하여 반응을 진행시킬 수 있으므로 전체적으로 더 많은 양의 생성물을 얻을 수 있다. 고정화하지 않은 whole cell들은 반응이 완결된후 분리하기가 어려워서 재사용이 어려웠다. 고정화된 whole cell의 시간에 따른 안정성을 살펴보면, 반응이 진행되는 7일이 소요되므로 4주 이상 효소의 활성이 지속됨을 알 수 있다. 4차 반응에서의 50%수득율은 여러번 사용 및 30일 이상의 시간경과에 따른 것으로 볼수 있는데 주된 요인은 polyacrylamide에 whole cell이 결합되는 것이 약하여 cell이 떨어진다. 본 실험에서 사용한 고정화는 whole cell과 polyacrylamide가 공유결합으로 결합된 것이 아니고 polyacrylamide의 3차원공간에 cell이 갇힌 형태를 유지하기 때문이다.

본 연구에서 고정화된 whole cell을 사용하여 di-

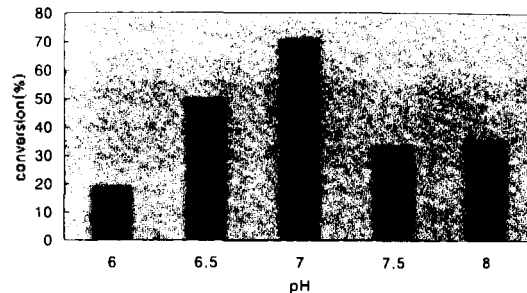
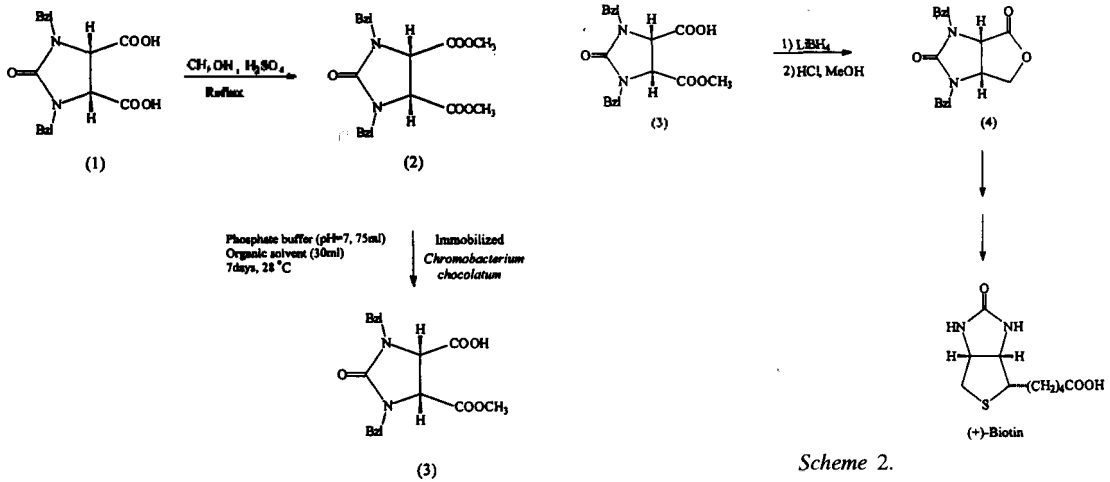


Fig. 3. Effects of pH on the conversion of substrate into product at 28 °C 0.1 M phosphate buffer-28% isooc-



Scheme 1.

methyl ester(2)를 가수분해할 때 whole cell의 단위 g당 변환시킬 수 있는 반응물의 최대량을 보기 위해서 기질의 양을 100 mg, 200 mg, 300 mg으로 증가시켜 isooctane이 첨가된 이상계에서 반응을 진행시켰다. 기질의 양을 100 mg 사용하여 biotransformation하는 경우 69%수득률로 생성물이 얻어졌고 기질의 양을 2배로 증가시킨 경우 72%수득률로 기질의 양을 3배로 증가시킨 경우 53%수득률로 생성물을 얻었다(Fig. 2). Whole cell 2g을 고정화하여 200 mg의 기질을 반응시켰을 때 최대수득률로 얻어짐을 알 수 있었다.

pH 변화에 따른 효소의 안정성을 확인하기 위하여 각기 다른 pH에서 반응을 진행시켰다. Fig. 3에서 볼수 있듯이 pH 6에서 pH 8까지 0.5의 차이를 두면서 반응시킨 결과 pH 7에서 최대의 수율로 생성물이 얻어졌다. 0.5의 pH변화에 수득률의 많은 차이를 미루어 볼 때 *Chromobacterium chocolateum*의 lipase가 pH변화에 매우 불안정함을 보였다. 각각의 실험에서 얻어진 monoacid (3)의 광학활성은 Scheme 2와 같이 LiBH<sub>4</sub>로 환원시킨후 산촉매하에서 lactonization시킨다. 이렇게 얻어진 lactone (4)을 이용하여 optical rotation을 측정할 결과 97-98% e.e.의 광학순도로 얻어졌다.<sup>3</sup>

## 결론

*Chromobacterium chocolateum*의 whole cell을 이용

하여 dimethyl-cis-1,3-dibenzyl-2-oxoimidazoline-4,5-dicarboxylate를 입체특이적으로 가수분해하여 monoester(3)를 높은 광학순도로 얻어진다.<sup>6</sup> 이는 (+)-biotin의 합성에 중간체로 사용하는 것으로 공업적인 응용성이 매우 큰 잇점인 있다.<sup>7</sup> 그러나 이와같은 생체촉매는 재사용에 대한 불리함과 대량생산에 대한 응용성이 약한 것이 결점이다.

본실험은 공업적인 응용성을 높이기 위하여 효소의 재사용에 대한 고정화 연구를 진행하였다. 반복 사용을 용이하게 하기 위해 cell을 polyacrylamide의 매트릭스 안에 고정화하였으며 고정화된 *Chromobacterium chocolateum*을 사용하여 phosphate buffer와 isooctane 혼합용액에서 가수분해에 4번이상 재사용하였다. 이와 같은 결과로부터 가수분해에 응용되는 리파아제 활동도가 4주 이상 지속되었음을 알 수 있다. Wet cell 2g을 이용하여 고정화하였을 때 기질의 양이 200 mg일 때 최대의 수득률로 생성물을 얻을 수 있었다. pH변화에 따른 수득률의 변화에 미루어 볼 때 pH 7에서 본반응에 관여하는 리파아제의 안정성이 제일 높았다.

이와 같은 결과는 대량 생산에 적용할 수 있는 기초자료로 유용하게 사용할 수 있으며 고정화된 물질이 단단하지 않기 때문에 관반응기(column reactor)에 적용하면 많은 양의 기질과 반응시킬수 있다.

본 연구는 이성화학의 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

1. (a) Klivanov, A. M. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 114. (b) Wong, C. H.; Whitesides, G. M. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*; Pergamon; New York, 1994. (c) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 2nd Ed.; Springer-Verlag: New York, 1995.
2. (a) Margolin, A. L. *Enzymes Microb. Technol.* **1993**, *15*, 266. (b) Collins, A. N.; Sheldrake, G. N.; Crosby, J. *Chirality in Industry*; John Wiley & Sons Ltd: New York, 1995.
3. (a) Lee, Y.; Ahn, Y. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1997**, *18*, 101. (b) Ohashi, N.; Shimago, K.; Ikeda, T.; Ishizumi, K. *Eur. Pat.* 84892, 1983.
4. (a) Klivanov, A. M. *Science* **1983**, *219*, 722. (b) Bucke, C. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **300**, **1983**, 369. (c) Kierstan, M.; Bucke, C. *Biotechnol. Bioeng.* **1977**, *19*, 387. (c) Morikawa, Y.; Karube, I.; Suzuki, S. *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, *21*, 261.
5. (a) Vieth, W. R.; Wang, S.; Saini, R. *Biotechnol. Bioeng.*, **1973**, *15*, 565. (b) Mosbach, K.; Larson, P. *Biotechnol. Bioeng.* **1970**, *12*, 19. (c) Kierstan, M.; Bucke, C. *Biotechnol. Bioeng.* **1977**, *19*, 387. (d) Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T. *Appl. Microbiol.* **1974**, *27*, 878.
6. Goldberg, M.W.; Sternbach, L.H. *U.S. Patents* 2489232, 2489235, and 2489238, 1949.
7. (a) Tokuyama, S.; Yamano, T.; Aoki, I.; Takanohashi, K.; Makahama, K. *Chem. Lett.* **1993**, 741. (b) Yamano, T.; Tokuyama, S.; Aoki, I.; Nishiguschi, Y.; Nakahama, K.; Takanohashi, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 1456. (c) Wang, Y.F.; Sih, C.J. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4999.