

## Porcine Liver Esterase를 이용한 광학선택적인 레보플록사신의 생산

이 상 윤 · 민 병 혁 · 황 성 호 · 구 윤 모 · 이 철 균 · <sup>1</sup>송 성 원 · <sup>1</sup>오 선 영 · <sup>1</sup>임 상 민 · <sup>1</sup>김 상 린 · \*김 동 일  
인하대학교 생물공학과, <sup>1</sup>(주)보령제약 중앙연구소  
(접수 : 2000. 4. 17., 게재승인 : 2000. 6. 15.)

## Enantioselective Production of Levofloxacin from Ofloxacin Butyl Ester by Porcine Liver Esterase

Sang-Yoon Lee, Byung-Hyuk Min, Sung-Ho Hwang, Yoon-Mo Koo, Choul-Kyun Lee, Seong-Won Song<sup>1</sup>,  
Sun-Young Oh<sup>1</sup>, Sang-Min Lim<sup>1</sup>, Sang-Lin Kim<sup>1</sup>, and Dong-Il Kim\*  
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
<sup>1</sup>Central Research Institute, Boryung Pharmaceutical Co., Ltd.  
(Received : 2000. 4. 17., Accepted : 2000. 6. 15.)

In this paper, enantioselective production of levofloxacin by porcine liver esterase was investigated. To enhance the productivity, various factors which affect the enzyme activity and the enantioselectivity were optimized. In terms of temperature and pH, 45°C and 4.8 were found to be the best conditions for enzyme reaction. Addition of ofloxacin butyl ester, the substrate, at the concentration of 5 g/L was desirable to avoid the product inhibition and the activity of porcine liver esterase was maintained up to 72 hours. In addition, to enhance the availability of substrate, effect of solvent was also examined. It was found that the application of 5%(v/v) of acetone, acetonitrile, and dimethylsulfoxide did not increase the conversion of substrate and the presence of 5%(v/v) butanol inhibited the enzyme activity significantly.

**Key Words** : porcine liver esterase, levofloxacin, ofloxacin, enantioselectivity

### 서 론

1980년대 이후로 새로운 항생물질로 각광받고 있는 quinolone 계열의 항생제는 기존의 항생제에 내성을 가지고 있는 *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* 등의 전염성 미생물에 대해 높은 항생효과를 보이는 것으로 알려져 있으며 이러한 기작이 DNA gyrase의 활성을 억제하기 때문이라는 것이 보고된 이후로 10,000여종 이상의 새로운 quinolone 유도체가 합성되었다(1). Quinolone 계열의 항생제인 ofloxacin은 levofloxacin과 D-ofloxacin이 1:1로 혼합되어 있는 광학이성질체이며 같은 quinolone 계열의 항생제인 ciprofloxacin, norfloxacin, sparfloxacin과 비교하여 *Corynebacterium*과 *Listeria monocytogenes*에 대한 효능이 우수하였으며 특히 levofloxacin이 ofloxacin과 D-ofloxacin에 비교하여 항생효과가 탁월한 것으로 보고되었다(2). 따라서 ofloxacin으로부터 levofloxacin만을 분리정제하여 생산한다면 높은 항생효과를 지니며 부가가치가 높은 제품을 생산

할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

일반적으로 광학이성질체는 한가지 이성질체만이 생물학적인 활성을 지니며 다른 한가지의 이성질체에 의해 그 활성이 감소하게 되므로 광학특이적인 분리공정이 필요하다. 이러한 광학이성질체의 분리를 위하여 효소의 광학이성질체에 대한 특이성을 이용하는 방법이 보고되었으며 directed evolution을 이용하여 효소의 광학선택성을 향상시키기는 방법도 시도된 바 있다(3,4). 또한 광학선택성을 지닌 효소를 발현하는 미생물을 선별하여 이용하는 시도도 이루어져 왔으며 이와 같이 미생물을 이용하는 경우는 효소를 사용한 공정에 비하여 간단하고 비용이 저렴한 장점을 지니고 있다(5). 효소와 미생물을 이용한 광학이성질체의 분리는 기존의 화학적인 방법에 비하여 높은 광학특이성을 지니며 그 반응이 온화한 조건에서 이루어지므로 공정에서 에너지 소비를 감소할 수 있다는 장점을 기대할 수 있으며 광학선택성을 지니는 esterase를 발현하는 *Psuedomonas* 등을 선별하여 광학선택적으로 R-β-acetylmercaptoisobutylic acid을 생산하였다는 보고도 있다(6).

최근 특정효소가 ofloxacin의 ester를 가수분해함에 있어서 광학특이성을 가진다는 것이 새로이 밝혀졌으며 이러한 효소의 광학선택성을 이용하여 ofloxacin으로부터 levofloxacin을 생산할 수 있음이 확인되었다(7). 이에 본 연구에서는 levofloxacin과

\*Corresponding Author : Department of Biological Engineering,  
College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
Tel : 032-860-7515, Fax : 032-875-0827  
E-mail : kimdi@inha.ac.kr

D-ofloxacin이 1:1로 혼합되어 있는 ofloxacin을 산촉매하에서 butanol과 반응시켜 ofloxacin butyl ester로 변환시킨 뒤에 이를 기질로 하여 광학선택성을 지닌 esterase로 ester 결합을 가수분해하여 levofloxacin을 선택적으로 생산하는 공정의 최적화를 시도하였다. 이러한 공정은 비교적 상업적 가치가 낮은 ofloxacin을 원료로 하여 부가가치가 높은 levofloxacin을 생산할 수 있으며 효소의 광학선택성을 이용하여 선택적으로 levofloxacin을 생산하므로 분리공정에서도 유리할 것이다. 따라서 효소를 사용한 공정에서 효소의 활성과 광학선택성에 영향을 줄 수 있는 pH, 온도, 산물의 저해 현상 등을 조사하여 levofloxacin의 선택적 생산을 위한 공정을 최적화하고자 하였으며 효소의 안정성을 확인하였다. 또한 비교적 소수성인 기질의 특성을 보완하기 위한 방법으로 유기용매를 첨가할 경우의 levofloxacin 생산성을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에서는 Sigma 사의 porcine liver esterase를 변환용 효소로 사용하였다. 효소 반응을 위해서는 Sigma 사의 monosodium phosphate와 disodium phosphate를 사용하여 pH 6.8의 0.1 M 인산완충용액을 제조하였으며 기질로는 ofloxacin butyl ester를 사용하였다.

### 효소 반응 조건

인산완충용액에 5 g/L의 ofloxacin butyl ester를 첨가한 뒤 20 분간 초음파분쇄하여 용해시켜 반응에 사용하였으며 2 g/L의 porcine liver esterase를 넣어 효소 반응을 개시하였다. 효소 반응은 30°C, 200 rpm으로 유지되는 회전식 배양기에 100-mL flask에 20 mL의 반응액을 첨가하여 수행하였으며 반응 시간에 따라 0.1 mL의 시료를 채취하여 끓는 물에 5분간 정지하여 효소의 반응을 정지시키고 동량의 methanol을 첨가한 뒤 vortexing하였으며 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 0.1 mL 회수하여 분석에 사용하였다.

### 분석 조건

반응액으로부터 채취한 시료를 앞에서 언급한 방법으로 전처리한 뒤 이를 희석하여 levofloxacin의 분석에 사용하였다. 분석은 오토펙사의 Vintage 2000LC pump와 영인 M720 detector를 사용하여 330 nm에서 측정하였으며 고정상으로 Shiseido 사의 Capcell pak (4.6 mm  $\phi$   $\times$  250 mm) column을 사용하였다. 그리고 이동상은 증류수와 methanol을 85:15로 혼합하여 1.21 g/L의 L-isoleucine과 1.07 g/L의 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O를 첨가한 뒤 1.0 mL/min의 유속으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 기질 농도의 영향

효소반응을 이용한 levofloxacin의 선택적 생산공정의 최적화와 실험에 사용된 porcine liver esterase의 기초적 특성을 파악하기 위하여 기질의 농도를 1 g/L에서 20 g/L로 다르게 하여 그 영향을 관찰하였으며 Figure 1에 도시하였다. 기질의 농도가 1,

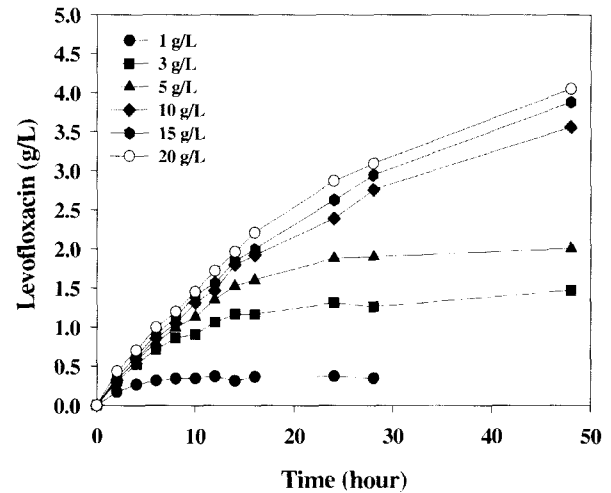


Figure 1. Effect of substrate concentration on the enantioselective production of levofloxacin.

3, 5 g/L인 경우에 적합한 enantioselectivity를 유지하면서 모든 levofloxacin이 생산되는데 소요되는 시간은 각각 12, 14, 24시간이었으며 이 때의 전환수율은 각각 98.2, 100.0, 99.4%였다. 그러나 기질의 농도가 10, 15, 20 g/L인 경우는 48시간까지 효소에 의해 생산된 levofloxacin의 전환수율이 각각 94.0, 68.2, 53.4%로 낮아졌다.

본 연구에 사용된 porcine liver esterase는 L-form과 D-form이 1:1로 혼합되어 있는 ofloxacin butyl ester의 ester 결합을 사르는 역할을 하며 이 때 L-form과 D-form의 기질과 각각 4:1의 비율의 속도로 반응한다. 이러한 효소의 광학이성질체에 대한 선택성을 enantioselectivity로 나타내었으며 그 정의는 다음과 같다.

$$\text{Enantioselectivity} = \frac{(L\text{-form}) - (D\text{-form})}{(L\text{-form}) + (D\text{-form})} \times 100$$

기질의 농도를 다르게 하여 효소반응을 진행했을 경우 시간에 따른 enantioselectivity의 변화를 Figure 2에 도시하였다. 앞에서 언급한 바와 같이 esterase에 의해 L-form과 D-form의 기질의 ester 결합이 4:1의 비율로 분해된다면 그 때의 enantioselectivity는 60%가 된다. 그러나 기질로 사용되는 ofloxacin butyl ester는 L-form과 D-form이 1:1로 혼합되어 있으므로 대부분의 L-form의 기질이 효소와 반응한 뒤에는 D-form의 ester 결합이 효소에 의해 분해되며 이에 따라 enantioselectivity가 감소하게 되어 결과적으로 60% 이하의 수치를 나타낸다. 이러한 특징은 반응의 진행 정도를 파악하거나 반응의 종결시점을 결정하는데 하나의 인자로서 사용될 수 있을 것이며 *Pseudomonas aeruginosa* 유래의 lipase와 porcine pancreas 유래의 lipase가 보이는 광학선택성인 54, 13.6%와 비교되는 결과이다(8). 반응시간에 따라 enantioselectivity는 서서히 감소하며 특히 대부분의 levofloxacin이 생산되는 시간 이후에는 enantioselectivity가 60% 이하로 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 *Candida cylindracea* 유래의 lipase의 enantioselectivity가 기질의 농도에 비례한다는 결과와 일치하는 것이었다(9). 따라서 분리 정제 공정의 용이성을 고려할 때 적정시점에서 반응을 종결시키는 것이 필수적이라 생각된다.

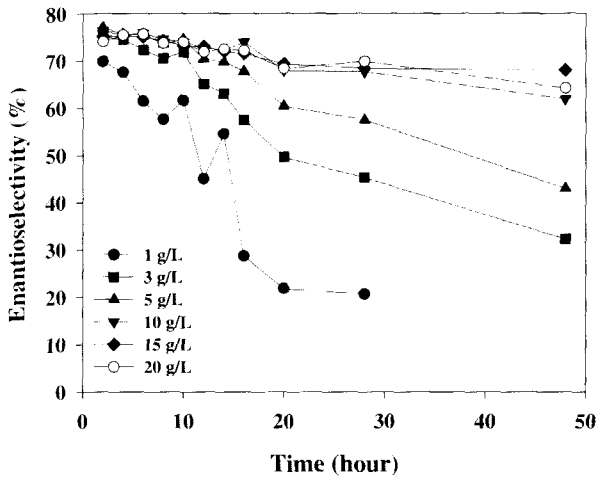


Figure 2. Time course changes of enantioselectivity at various substrate concentrations.

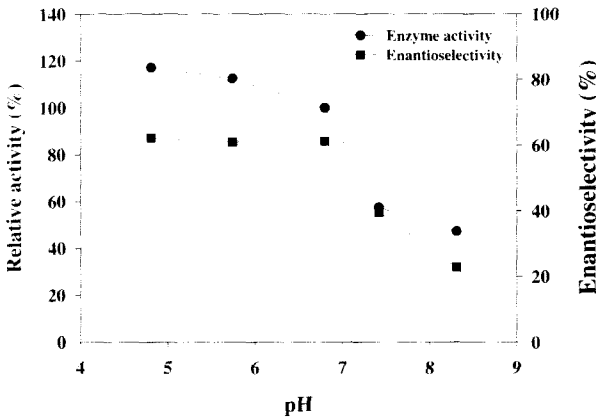


Figure 3. Effect of pH on enzyme activity and enantioselectivity.

**pH의 영향**

본 연구에 사용된 porcine liver esterase의 기본적인 특성을 파악하고자 인산완충용액의 pH에 따른 효소의 활성과 그 때의 enantioselectivity를 조사하여 Figure 3에 도시하였으며 효소의 활성은 pH 6.8에서의 결과를 기준으로 하여 상대값으로 나타내었다. 일반적인 pH에 의한 효소활성의 변화와는 다르게 최적 pH의 범위가 4.8에서 6.8 정도로 넓었으며 pH 7 이상에서는 급격한 효소 활성의 감소와 enantioselectivity의 저하가 관찰되었다. 이는 높은 pH에서 효소의 구조적인 변화에 기인한 것으로 생각되며 이러한 결과는 이후의 공정설계나 생산에서 중요한 인자로 작용할 것으로 사료된다. 특히 기질로 사용되는 ofloxacin butyl ester는 비교적 소수성으로 용해도가 낮으며 이러한 낮은 용해도는 효소와의 접촉에 영향을 주어 생산공정에서 제한인자로 작용할 수 있을 것으로 생각된다. 본 실험에서는 높은 pH보다는 낮은 pH에서 기질의 용해도가 증대되는 것이 관찰되었으며 이러한 특성도 낮은 pH에서의 효소활성 증가에 영향을 주었을 것으로 판단된다.

**온도의 영향**

Figure 4에는 첨가한 기질이 모두 가수분해되었을 때를 기준으로 하여 각기 다른 온도에서의 porcine liver esterase의 효소활

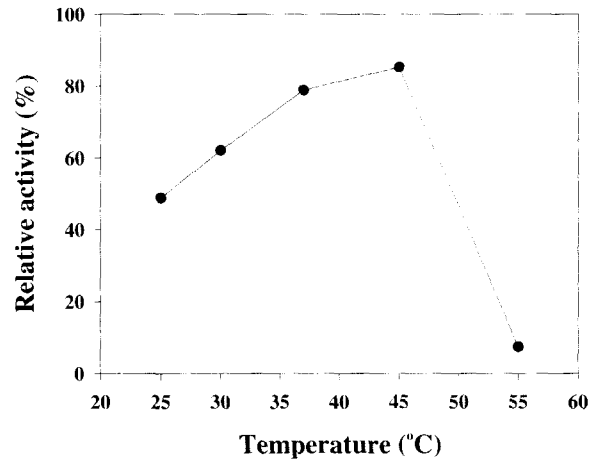


Figure 4. Effect of temperature on enzyme activity.

성의 변화를 도시하였다. 온도는 효소의 activation energy와 밀접한 관계를 가지고 있으며 효소의 활성과 반응속도에 큰 영향을 미치므로 반응조건 최적화와 공정의 설계에서 반드시 고려해야 한다. 본 실험의 결과에서 porcine liver esterase의 최적 반응 온도는 45°C였으며 30°C에서의 결과에 비해 37.5% 높은 효소활성을 보였다. 그리고 55°C에서는 효소의 활성이 크게 감소하였으며 이러한 결과는 40~50°C까지는 구형 단백질의 용해도가 증가하지만 그 이상의 온도에서는 효소의 3차구조의 변화를 야기하여 효소의 용해도가 크게 감소하게 되어 효소의 활성이 급격히 감소했기 때문으로 사료된다(10). 따라서 최적 온도를 사용할 경우 현재의 반응조건보다 반응시간을 단축하여 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

**안정성**

시간에 따른 효소의 활성 감소 여부를 조사하기 위하여 2 g/L의 esterase를 0.1 M의 인산완충용액(pH 6.8)에 녹인 뒤 30°C, 200 rpm로 유지되는 shaking incubator에서 교반하였으며 0, 24, 48, 72, 144시간째에 조음파분쇄로 유회시킨 ofloxacin butyl ester를 5 g/L 첨가하여 효소의 활성을 측정하였으며 그 결과는 Figure 5에 나타내었다.

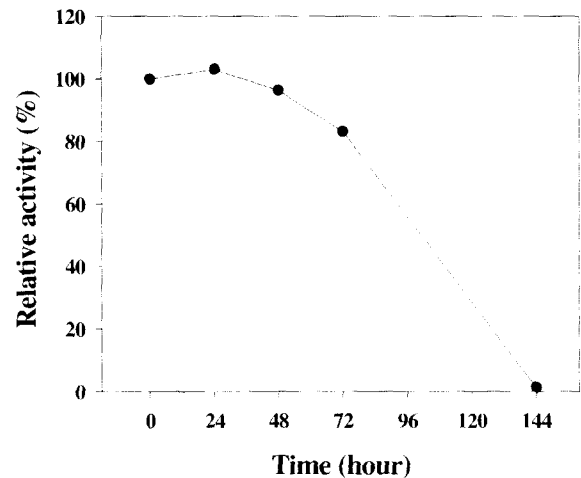


Figure 5. Activity change of porcine liver esterase in reaction buffer.

앞에서의 기질의 농도에 따른 영향에서 언급한 바와 같이 5 g/L의 기질을 첨가하는 경우의 최적 반응종결 시간은 24시간이었으며 10 g/L의 기질을 첨가할 때는 이론적으로 가능한 농도의 levofloxacin이 생산되기까지 약 48시간 이상이 소요된다. Figure 5에 도시한 바와 같이 48시간까지는 효소의 활성이 크게 변하지 않고 안정성이 유지되었으나 72시간에는 효소의 활성이 83.2%로 감소했으며 144시간에는 효소의 활성이 거의 보이지 않았다. 따라서 비교적 고가인 효소의 효율적인 사용을 위하여 기질의 농도를 높이는 경우에는 그 반응시간이 최대 72시간 이상이 되지 않도록 하는 것이 바람직하며 기질의 농도를 10 g/L 이하로 첨가하는 것이 효과적일 것으로 생각된다. 이러한 효소의 안정성은 효소를 포집하거나 흡착 또는 공유결합으로 담체에 고정화한 경우 증가하게 되며 고정화에 의한 효소의 안정성의 증대는 고정화효소의 가장 큰 장점으로 작용하여 효소의 안정적인 재사용을 가능하게 할 수 있을 것이다(11,12).

**산물저해**

기질로 사용한 ofloxacin butyl ester가 porcine liver esterase에 의해 ester 결합이 절단되면 그 산물로 ofloxacin과 butanol이 생산된다. 일반적으로 효소반응에 의해 생성되는 산물은 효소의 활성을 저해하므로 ofloxacin과 butanol의 농도에 따른 효소의 활성을 비교하고자 외부에서 인위적으로 ofloxacin과 butanol을 첨가했을 때의 효소의 활성을 측정하여 그 결과를 Figure 6에 나타내었다. 기질을 5 g/L (11.98 mM)의 농도로 첨가한 경우 24시간 경과 후에는 약 6 mM의 ofloxacin과 butanol이 생산된다. Figure 6에 나타낸 바와 같이 6.32 mM의 ofloxacin를 첨가했을 때는 84.5%, 6.75 mM의 butanol을 첨가한 경우는 97.3%의 효소 활성을 관찰할 수 있었으며 butanol보다는 ofloxacin에 의한 효소의 활성 저하가 크다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 기질의 농도를 5 g/L 이상으로 첨가하는 경우는 생성되는 ofloxacin에 의해 효소의 활성이 크게 저해될 수 있을 것이며 기질의 손실이나 반응시간의 연장으로 인해 생산성을 낮추는 결과를 초래할 것으로 생각된다.

**기질의 첨가방법**

전술한 바와 같이 본 연구에 사용된 기질인 ofloxacin butyl ester는 비교적 소수성으로 물에 대한 용해도가 낮다. 이러한 성

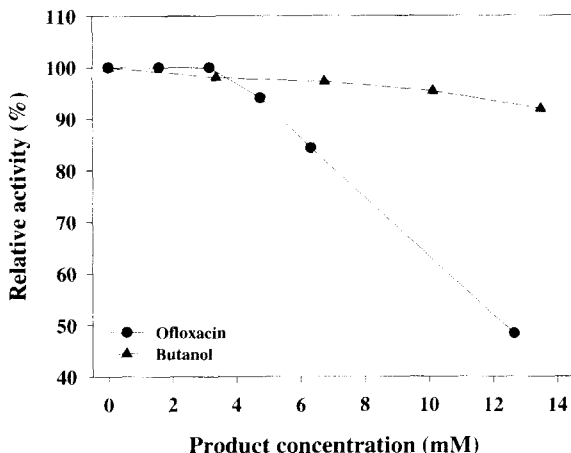


Figure 6. Effect of product concentration on enzyme activity.

질은 반응속도를 제한하는 인자로 작용할 수 있으므로 선행된 실험에서는 기질을 완충용액에 녹인 뒤 조음과 분쇄하여 emulsion 형태로 만든 뒤 esterase를 첨가하여 반응을 진행시켰으며 본 실험에서는 여러 가지 유기용매에 기질을 녹인 뒤 완충용액에 첨가하여 기질의 용해도를 증대시키고 그 때의 반응속도를 관찰하고자 하였다.

실험에 사용된 유기용매는 alcohol 종류와 기타 용매로 나누어 사용하였으며 각각의 경우에 사용된 유기용매는 alcohol 종류로는 chain 길이에 따라 methanol, ethanol, propanol, butanol과 기타 용매 종류로는 acetonitrile, dimethylsulfoxide (DMSO), acetone을 사용하였다. 반응에 사용할 양의 기질을 녹인 각각의 유기용매를 완충용액에 5%(v/v)로 첨가한 뒤 esterase를 첨가하여 반응을 개시하였으며 그 결과는 Figure 7, 8과 같다.

Methanol 등의 alcohol에 기질을 녹인 뒤 첨가하는 경우는 alcohol의 chain의 길이에 비례하여 esterase의 활성이 감소하였으며 butanol을 사용했을 때는 대조구에 비해 esterase의 활성이 96.2% 감소하여 반응이 거의 진행되지 않았다. 특히 methanol에 기질을 녹인 뒤 첨가했을 때는 대조구에 비해 기질의 용해도는 증가했음에도 불구하고 esterase의 활성은 오히려 감소했으며 이러한 결과는 esterification되어 있는 ofloxacin이 esterase에 의해 그 ester 결합이 잘리면서 생성되는 산물인 alcohol에 의한 product inhibition과 유사한 영향일 것으로 생각된다. 따라서 효소의 enantioselectivity를 증진시키는 방법과 동시에 효소반응 뒤에 생

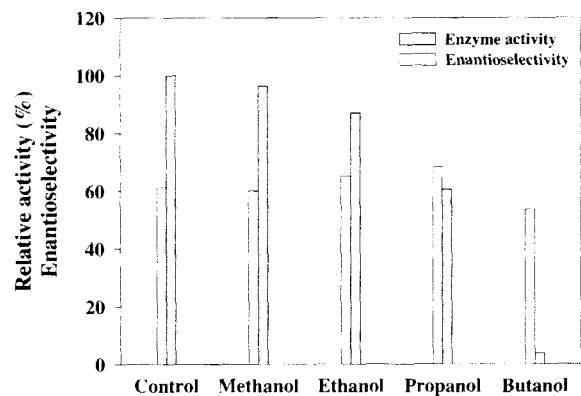


Figure 7. Effect of various alcohols on enzyme activity and enantioselectivity.

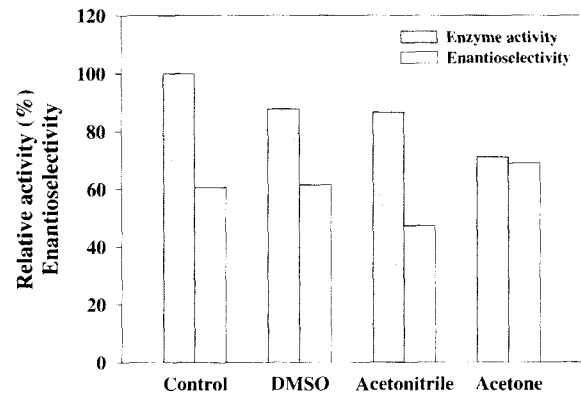


Figure 8. Effect of solvent addition on enzyme activity and enantioselectivity.

정되는 부산물에 의한 효소의 활성저해도 고려해야 할 것으로 생각되며 그 때의 활성저해의 정도는 alcohol의 chain의 길이에 비례한다는 것을 감안해야 할 것으로 사료된다. 그리고 alcohol 종류 이외의 유기용매를 사용한 경우에서도 대조구에 비하여 효소의 활성을 증가시키지 못했는데 이러한 결과는 일반적으로 esterase나 lipase에 의한 반응은 가역적인 반응이며 유기용매상에서 주로 esterification 반응이 일어나며 수용액상에서는 가수분해 반응이 수행되는 것과 연관되어 있을 것으로 생각된다(13,14).

## 요 약

본 연구에서는 porcine liver esterase를 이용하여 levofloxacin의 광학선택적으로 생산하였으며 이 때의 enantioselectivity는 60%였다. 반응조건을 최적화한 결과 최적온도와 최적 pH는 각각 45°C, pH 4.8이었으며 72시간 동안 효소의 안정성이 유지되었다. 기질로 사용된 ofloxacin butyl ester의 가수분해로 생산되는 ofloxacin과 butanol의 농도에 따른 효소의 활성을 고려하여 초기 기질의 농도는 5 g/L 이하로 첨가하는 것이 바람직하였다. 그리고 기질의 용해도를 증대시키기 위한 방법으로 유기용매에 기질을 녹인 뒤에 반응을 수행했을 때는 오히려 효소의 활성이 감소하였으며 그 정도는 alcohol 종류의 유기용매에서는 chain의 길이에 비례하여 증가하였다.

## REFERENCES

- Blondeau, J. M. (1999), A Review of the Comparative *in-vitro* Activities of 12 Antimicrobial Agents, with a Focus on Five New 'Respiratory Quinolones', *J. Antimicrob. Chemother.*, **43**, 1-11.
- Martinez-Martinez, L., A. Pascual, A. I. Suarez, and E. J. Perea (1999), *In-vitro* Activity of Levofloxacin, Ofloxacin, and D-ofloxacin against Coryneform Bacteria and *Listeria monocytogenes*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **43**, 27-32.
- Kim, M. G. and S. B. Lee (1996), Enzymatic Resolution of Racemic Ibuprofen by Lipase-Catalyzed Esterification Reaction: Effects of Water Content and Solid Supports, *J. Ferment. Bioeng.*, **81**(3), 269-271.
- Jaeger, K. E. and M. T. Reetz (2000), Directed Evolution of Enantioselective Enzymes for Organic Chemistry, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 68-73.
- Vicenzi, J. T., M. J. Zmijewski, M. R. Reinhard, B. E. Landen, W. L. Muth, and P. G. Marler (1997), Large-scale Stereoselective Enzymatic Ketone Reduction with *in situ* Product Removal via Polymeric Adsorbent Resins, *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 494-499.
- Gokul, B., J. H. Lee, K. B. Song, T. Panda, S. K. Rhee, and C. H. Kim (2000), Screening of Microorganisms Producing Esterase for the Production of (R)- $\beta$ -Acetylmercaptoisobutyric Acid from (R,S)- $\beta$ -Acetylmercaptoisobutyrate with (R,S)- $\beta$ -Acetylmercaptoisobutyrate Methyl Ester, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, **5**, 57-60.
- Seong, D. H. and S. L. Kim (1999), A Process for Preparing Optically Active Pyridobenzoxazine Derivatives Thereof, Korean Patent: 99-7183.
- Hayagawa, I., S. Atrashi, M. Imamura, S. Yokohama, N. Higashihashi, K. Sakano, and M. Ohshima (1992), Optically Active Pyridobenzoxazine Derivatives and Intermediates Thereof, United States Patent, 5, 142-046.
- Sanchez, E. M., J. F. Bello, M. G. Roig, F. J. Burguillo, J. M. Moreno, and J. V. Sinisterra (1996), Kinetic and Enantioselective Behavior of the Lipase from *Candida cylindracea*: A Comparative Study between the Soluble Enzyme and the Enzyme Immobilized on Agarose and Silica Gels, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 468-476.
- Palmer, T. (1995), *Understanding Enzymes*, 4th ed., pp. 63, Prentice Hall/Ellis Horwood, New York.
- Fernandez-Lafuente, R., D. A. Cowan, and A. N. P. Wood (1995), Hyperstabilization of a Thermophilic Esterase by Multipoint Covalent Attachment, *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 366-372.
- Bagi, K., L. M. Simon, and B. Szajani (1997), Immobilization and Characterization of Porcine Pancreas Lipase, *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 531-535.
- Briand, D., E. Dubreucq, and P. Galzy (1995), Functioning and Regioselectivity of the Lipase of *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice in Aqueous Medium, *Eur. J. Biochem.*, **228**, 169-175.
- Janssen, A. E. M., A. van der Padt, and K. Van't Riet (1993), Solvent Effects on Lipase-Catalyzed Esterification on Glycerol and Fatty Acids, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 953-962.