

## ***Acinetobacter* sp. SY-01 Lipase를 이용한 아졸계 화합물 전구체에 대한 광학선택적 가수분해 반응과 생성물 제거에 의한 광학선택성 증가**

<sup>1,3</sup>윤문영 · <sup>2</sup>신평균 · <sup>1</sup>정찬성 · <sup>3\*</sup>박정극

<sup>1</sup>한국과학기술연구원 의약화학연구소, <sup>2</sup>한국과학기술연구원 수질환경연구소, <sup>3</sup>동국대학교 생명화학공학과  
(접수 : 2002. 8. 31., 게재승인 : 2003. 1. 27.)

## **Enantioselective Hydrolysis for the Precursor of Azole-containing Compounds using *Acinetobacter* sp. SY-01 Lipase and Increase of Enantioselectivity by the Removal of Reaction Products**

Moon Young Yoon<sup>1,3</sup>, Pyong Kyun Shin<sup>2</sup>, Chang Seong Cheong<sup>1</sup>, and Jung Keug Park<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Medicinal Chemistry Research Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O.Box131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

<sup>2</sup>Water Environment Research Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O.Box131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

<sup>3</sup>Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, 3-26 Pil-Dong, Choong-Gu, Seoul 100-715, Korea

(Received : 2002. 8. 31., Accepted : 2003. 1. 27.)

Screening of a strain was carried out to produce an enantioselective lipase toward the precursor of Itraconazole as azole-containing compounds, which are well known as antifungal drug agents. An *Acinetobacter* sp. SY-01 strain which can selectively hydrolyze the racemic substrates was isolated and the racemic substrate was resolved to the S-ester in 95.6% enantiomeric excess after 74.8% hydrolysis. The optimum temperature and pH for the conversion were 50°C, pH 7.0. However, the temperature and pH had no effect on the enantiomeric excess. Addition of solvents decreased the conversion and slightly increased the enantiomeric excess. However, the kind of solvents had no effect on enantiomeric excess. The substrate concentration decrease enantiomeric excess and this is confirmed by the products generated from hydrolysis, and also enantiomeric excess could be increased by the removal of reaction products.

**Key Words :** Screening, lipase, *acinetobacter*, azole-containing compounds, enantioselective hydrolysis

### 서론

정밀화학제품 중에서 유기화합물로 분리되는 대부분의 고부가가치 의약품들은 분자구조 내에 비대칭 탄소(chiral carbon center)를 한 개 이상 포함하고 있어서 여러 가지 광학 이성질체가 존재할 수 있는데, 기존에 알려진 의약품의 경우 대부분 이성질체의 혼합물 상태로 상품화되어 있다. 그러나 이러한 이성질체 혼합물 중에서 특정 이성질체만이 생리활성작용을 나타내고, 나머지 이성질체는 활성이 없거나 경우에 따라서는 심한 부작용을 유발하기도 한다(1-3). 따라서 신약개발의 초기단계에서 순수 이성질체만 선택적으로 합성하는 것이 요구되었고, 또한 기존의 시장에서 판매되고 있는 라세믹 혼합물 형태의 의약품도 순수 이성질체 형태로 생산하는 것이 매우 중요하게 되었다(4, 5).

대표적인 아졸계 화합물인 이트라코나졸은 잘 알려진 항진균제(antifungal drug agent)로서, 시스 형태의 이성질체를 상업적으로 이용할 수 있고, 라세믹 혼합물 형태로 판매되고 있다. 그러나 이러한 라세믹 형태의 이트라코나졸은 간에 독성이 있고, 부정맥, 메스꺼움, 구토, 과민증, 두드러기, 복통, 두통, 현기증 등의 부작용을 유발할 수 있으므로 현재 화학적 합성기법을 사용하여 광학적으로 순수한 이성질체를 제조하려는 연구가 시도되고 있는 실정이다(6, 7). 그러나 일반적으로 화학적 합성법은 여러 단계를 거쳐야 하는 공정상의 복잡성과 환경문제를 유발하는 단점이 있기 때문에, 유기합성법의 이러한 여러 가지 문제점을 극복하기 위한 대안으로서 생축매를 이용한 광학분할 방법이 활발하게 연구되고 있고(8-14), 생축매 중에서도 protease, esterase, lipase같은 가수분해 효소가 cofactor 없이도 사용 가능하고, 높은 광학선택성과 넓은 기질 수용성을 갖고 있기 때문에 광학활성물질을 생산하는데 가장 많이 사용되고 있다(15-20).

*Acinetobacter*는 활성슬러지에서 주로 발견되며, 인을 축적시키는 특징이 있는 미생물로 폐수처리에 주로 사용되는 미생물(21)이고, 본 균주를 이용하여 내알카리성 lipase 생산에 대한 보고는 되어 있으나(22), 본 lipase가 광학선택성을 나타

\* Corresponding Author: Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, 3-26 Pil-Dong, Choong-Gu, Seoul 100-715, Korea

Tel : +82-2-2260-3365, Fax : +82-2-2271-3489

E-mail : jkpark@dongguk.edu

낸다는 보고는 아직 되어있지 않은 상태이다. 또한 기존의 연구에서는 주로 상용화된 lipase를 이용하여 특정 라세메이트에 적용하는 보고가 대부분이었으나, 라세메이트의 종류가 수없이 많이 있고 기존에 알려진 lipase로 모든 라세메이트에 적용이 가능한 것이 아니기 때문에 새로운 lipase에 대한 탐색과 그것의 응용성에 대한 연구는 필수적이라 할 수 있다.

본 연구에서는 아즐게 화합물의 전구체인 라세믹 형태의 cis-2-bromomethyl-2-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-dioxolane-4-methyl acetate를 광학 선택적 가수분해 반응을 통하여 순수 이성체 제조공정을 개발하기 위한 기초 자료를 확보하기 위하여 본 기질에 광학선택성이 높은 lipase 생산 균주를 탐색하였고, 본 균주가 생산하는 lipase를 이용하여 본 라세믹 기질에 대한 가수분해반응에서 온도, pH, 용매의 종류 및 농도, 기질농도와 반응생성물의 농도, 반응생성물의 제거 등이 광학선택성에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

## 시약 및 재료

본 실험에 사용된 아즐게 화합물 전구체인 라세믹 형태의 cis-2-bromomethyl-2-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-dioxolane-4-methyl acetate (Figure 1)는 화학적으로 합성하였다. TRIZMA 완충액은 Sigma 회사(Sigma Chemical Co., Ltd., USA)로부터 구입한 TRIZMA Base를 200 mM이 되도록 용해한 후 1 N 염산으로 pH 8.0이 되도록 조절한 다음 사용하였다. Olive oil은 Showa 제품(Showa Chemical Co., Ltd., Japan)을 사용하였고, Tween 80은 Junsei제품(Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)을 사용하였다. HPLC용 n-hexane과 isopropyl alcohol은 Tedia 제품(Tedia Company Incorporation, USA)을 사용하였고, 미생물 배양을 위한 Yeast Extract, Tryptone, Peptone, Beef Extract는 Difco 제품(Difco laboratories, USA)을 사용하였다.

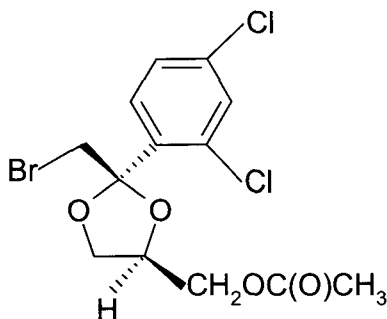


Figure 1. Molecular structure of cis-2-bromomethyl-2-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-dioxolane-4-methyl acetate.

### Lipase 생산 균주 탐색용 배지 조성

lipase 생산 균주 1차 분리를 위한 배지는 tween 80 함유배지로 조성은 tween 80 1.0%, peptone 0.5%, beef extract 0.3%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001%, agar 2.0%로 하였다. lipase 생산 균주 2차 분리를 위한 배지는 rhodamine B 함유배지로 조성은 olive oil 1.0%, peptone 0.5%, beef extract 0.3%, rhodamine B 0.0001%, agar 2.0%로 하였다. lipase 생산을 위

한 배지의 조성은 olive oil 1.0%, tryptone 0.5%, dextrose 0.1%, yeast extract 0.5%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%로 하였다. 각각의 배지에 대한 pH는 모두 7.0으로 조절하여 사용하였다.

### 광학선택적 Lipase 생산균주 탐색

전국 각지의 공단주변 하천, 폐수, 토양시료 1 mL을 생리 식염수에 희석하여 tween 80을 함유한 1차 분리용 배지(23)에 직접 도말하여 30°C에서 4-5일 배양한 후 콜로니 주위에 불투명한 할로(halo)를 형성하는 균주를 분리하였다. 분리된 균주 각각을 olive oil과 rhodamine B를 함유한 2차 분리용 배지(24)에 접종하여 30°C에서 3일 배양한 후 UV를 조사하였을 때 콜로니 주위에 오렌지색 형광을 나타내는 균주를 분리하였다. 최종적으로 분리한 각각의 균주를 lipase 생산용 배지 5 mL를 함유한 시험관(20 mL용량)에 각각 접종하여 30°C, 150 rpm에서 3일 배양한 후 원심분리 하여 배양 상등액에 대한 lipase 활성을 측정하여 lipase 생산균주를 6종 분리하였다. 이렇게 분리한 각각의 균주를 lipase 생산용 배지 5 mL를 함유한 시험관(20 mL용량)에 각각 접종하여 30°C, 150 rpm에서 3일 배양한 후 배양액을 14240 xg 에서 10분 원심분리하여 상등액만을 회수하여 이것을 조효소액으로 사용하였다. 이 조효소액 1 mL와 n-hexane에 10 g/L로 용해한 라세믹 기질 100  $\mu\text{l}$ , 200 mM TRIZMA 완충용액(pH 8.0) 1 mL, 증류수 3 mL을 혼합한 후 40°C에서 250 rpm으로 3시간 가수분해반응 후 n-hexane 1 mL를 투입하고 혼합하여 n-hexane 층만을 회수하여 HPLC를 이용하여 분석하여 광학선택성을 확인하였다. 대조군으로 PCL(Lipase from *Pseudomonas cepacia*, Sigma Cat. # L-9156), CCL(Lipase from *Candida rugosa*, Sigma Cat. # L-1754), YLL(Lipase from *Yarrowia lipolytica*, KCCM 50038)을 사용하여 같은 방법으로 가수분해 반응을 수행하였다.

### 미생물 동정

분리한 균주는 상용화된 API 20NE kit 시험법(bioMieue Inc., France)과 균체 지방산 분포를 분석하는 Microbial Identification System (Microbial ID, Inc., Newark, Del., USA)방법을 이용하여 동정하였다.

### 조효소액의 준비

효소생산배지 (olive oil 1.0%, tryptone 0.5%, dextrose 0.1%, yeast extract 0.5%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%, pH 7.0) 100 mL을 함유한 500 mL 용량의 플라스크에 균주를 접종한후 30°C에서 24시간 예비 배양하였다. 이 배양액을 본 배양액에 0.5% 되도록 첨가한 후 5 L 용량의 jar fermenter(한국 발효기(주))를 이용하여 공기 주입량 5.0 l/min, 교반속도 600 rpm, 온도 30°C에서 24시간 배양한 후 배양액을 14240 g에서 10분 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

### Lipase 활성 측정

lipase 활성은 Tietz와 Fiereck의 방법(25)에 기초를 둔 Sigma Bulletin No. 800 방법에 따라 분석하였다. Lipase

substrate (olive oil emulsion) 3 mL, 200 mM TRIZMA 완충액 1 mL(pH 8.0), 조효소액 1 mL을 혼합하여 40°C에서 6시간 반응시켰다. 반응완료 후 즉시 95% 에탄올 3 mL을 넣고 반응을 정지시킨 후 배양과정에서 유리된 지방산을 50 mM NaOH 용액을 사용하여 적정하였고, 이 때 지시약으로 thymolphthalein (95% ethanol에 녹인 0.9%용액)을 사용하였다. 대조구 실험은 조효소액을 넣지 않고 같은 방법으로 수행하였다. lipase 1 unit은 상기조건에서 1분 동안에 1  $\mu$ mol의 유리지방산을 생산하는 효소의 양으로 정의하였고 아래 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Lipase Activity}(U/l) = \frac{50 \times (T - T_b)}{\text{반응시간 (min)}} \times 1000$$

T : Sample 적정치

T<sub>b</sub> : Blank 적정치

### 광학선택성 분석

조효소액에 의해 가수분해된 라세믹 기질과 생성물에 대한 광학선택성을 조사하기 위하여 HPLC(영린기기(주))를 사용하여 분석하였다. Column은 Chiralcel OD(Chiral Technologies, Exton, PA, USA)을 사용하였으며 크기는 4.6 mm x 250 mm 이고 이동상은 5% isopropyl alcohol을 함유한 n-hexane을 사용하였고, flow rate는 1 mL/min로 하였다. Column pressure는 500 bar, Column temperature는 25°C, detection은 UV 230 nm로 하였다.

전환율(conversion)과 입체선택성의 정도를 나타내는 지표인 enantiomeric excess(ee) 값과 enantioselectivity 값(E)은 다음과 같이 계산하였다(26).

분할(resolution)공정에서 두 가지 반응을 다음과 같이 묘사할 수 있다.



여기에서 A와 B는 라세믹 기질이고, C와 D는 라세믹 생성물이다. 이 때, 전환율(conversion, c)은  $([C]+[D])/([A]+[B]+[C]+[D])$ 로 나타낼 수 있고, B가 A보다 반응속도가 느리다면, 기질에 대한 enantiomeric excess(ee<sub>s</sub>)와 생성물에 대한 enantiomeric excess(ee<sub>p</sub>), enantioselectivity(E)는 아래식과 같이 나타낼 수 있다(15,26).

$$c = \frac{([C] + [D])}{([A] + [B] + [C] + [D])}$$

$$ee_p = \frac{([C] - [D])}{([C] + [D])} \quad ee_s = \frac{([B] - [A])}{([A] + [B])}$$

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_p)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_s)]}$$

### 효소 가수분해반응 조건

n-hexane에 용해한 라세믹 기질(10 g/L)과 조효소액 5 mL (효소 활성 : 4.0 unit)에 TRIZMA 완충액(pH 8.0) 200 mM농도의 용액을 혼합하여 최종 부피가 100 mL이 되도록 조제한 후 500 mL 용량의 baffle flask에 넣고, 150 rpm의 조건에서 가수분해반응을 수행하였다. 온도에 대한 영향은 shaking incubator에서 30, 40, 50, 60°C로 조절하면서 수행하였고, pH

에 대한 영향을 조사하기 위해 pH 5.0 인 경우 sodium acetate-acetic acid 완충액을 사용하였고, pH 6.0, 7.0인 경우 phosphate 완충액을, pH 8.0 인 경우는 TRIZMA 완충액을 사용하여 용액의 pH를 변화시키면서 반응을 수행하였다. 용매에 대한 영향을 조사하기 위하여 각각의 용매가 2%(v/v)되도록 조절한 후 실험하였다. 반응진행 중 전환율과 입체선택성을 측정하기 위해 일정시간 단위로 샘플링 하여 n-hexane 0.5 mL를 혼합하고 n-hexane 층만을 회수한 후 HPLC 분석기를 이용하여 분석하였다.

### 기질과 생성물 분리

가수분해반응을 임의의 시간 진행시킨 후 n-hexane을 첨가하여 에스터 형태의 기질과 알콜 형태의 생성물이 n-hexane층으로 이동하도록 충분히 혼합한 후 n-hexane층만을 분액 깔대기를 이용하여 분리함으로써 기질과 생성물이 함유된 n-hexane 용액을 회수하였다. 이렇게 회수한 용액을 silica gel(Sigma Cat. No. S-9258)이 충전된 크로마토그래피용 컬럼에 통과시켜 기질과 생성물을 silica gel에 흡착시켰다. 여기에 ethyl acetate와 n-hexane을 1:1로 혼합한 용액을 계속 흘리면서 Fraction collector(Bio-Rad Model 2110)를 이용하여 5 ml씩 분획 번호(Fraction No.) 별로 회수하였다. 각각의 분획된 용액을 HPLC 분석기를 이용하여 분석함으로써 기질과 생성물을 분리 회수하였다.

## 결과 및 고찰

### 광학선택성 Lipase 생산미생물 탐색

전국 각지의 공단주변 하천 슬러지, 폐수, 토양을 균원시료로 사용하여 tween 80을 함유한 분리용 배지에서 불투명한 할로(opaque halo)를 형성하는 균주를 1차 분리하였고, 이들을 rhodamine B를 함유한 분리용 배지에서 배양하여 orange fluorescent halo를 형성하는 균주를 2차 분리하여, 이들 각각을 lipase 생산용 배지에서 배양한 후 lipase 활성 측정을 통하여 최종적으로 lipase 생산균주를 60종 분리하였다. 분리한 균주가 분비하는 lipase에 대한 광학선택성을 조사하기 위하여 각각의 균주를 배양한 후 배양 상등액을 이용하여 라세믹 기질에 대한 가수분해반응을 수행한 후 광학선택성을 분석하여 선택성을 나타내는 균주 10종을 분리하였고 이 중에서 가장 광학선택성이 높은 26번 균주를 최종적으로 선별하였다. Table 1은 대조구로 사용한 PCL(lipase from *Pseudomonas cepacia*, Sigma Cat. # L-9156), CCL(lipase from *Candida rugosa*, Sigma Cat. # L-754, YLL(lipase from *Yarrowia lipolytica* KCCM 50038)과 분리한 균주에 대한 lipase 활성과 광학선택성의 시험결과를 나타낸 것이다. 대조구로 사용한 PCL과 CCL의 경우 E 값이 1.0, 0.5로 광학선택성을 거의 나타내지 않았고, YLL은 42.3% 전환되었을 때 생성물에 대한 ee 값이 31.2%를 나타내어 광학선택성을 나타내는 지표인 E 값이 2.4인 반면, 분리균주인 26번 균주는 25.4%전환율에 도달하였을 때 생성물에 대한 ee 값이 66.8%를 나타내어 E 값이 6.3으로 가장 높은 광학선택성을 나타내었다.

Table 1. Screening of the enantioselective lipase producing strains

Number of Isolated strains	Halo size <sup>(a)</sup> in tween 80 Medium	Halo size in rhodamine B Medium	Lipase activity (U/mL)	c(%)( <sup>b</sup> )	ee <sub>p</sub> (%)( <sup>c</sup> )	E <sup>(d)</sup>
YLL <sup>(e)</sup>	+	++	4.59	42.3	31.2	2.4
PCL <sup>(f)</sup>			2.56	67.1	1.1	1.0
CCL <sup>(g)</sup>			4.63	61.6	5.2	0.5
9	+	+	0.31	22.7	63.1	5.4
11	+	++	2.41	26.4	43.0	2.9
12	++	++	4.56	25.8	41.1	2.7
13	+	-	0.36	13.0	40.5	2.5
26	+	+	0.11	25.4	66.8	6.3
36	+	+	0.48	80.9	16.4	2.5
46	+	+	0.76	43.4	31.3	2.4
47	+	+	0.25	27.8	48.6	3.5
54	+	+	0.48	28.2	55.6	4.3
59	+	+	0.50	55.3	22.2	2.0

(a) - : no detectable, + : low, ++ : medium, +++ : large  
(b) Conversion, c(%) =  $\frac{[(R, S) - alcohol]}{[(R, S) - ester] + [(R, S) - alcohol]} \times 100$   
(c) Enantiomeric excess for products, ee<sub>p</sub>(%) =  $\frac{([S - alcohol] - [R - alcohol])}{([S - alcohol] + [R - alcohol])} \times 100$   
(d) Enantioselectivity, E =  $\frac{\ln[1 - c(1 + ee_p)]}{\ln[1 - c(1 - ee_p)]}$   
(e) YLL : Lipase from *Yarrowia lipolytica* (KCCM 50038)  
(f) PCL : Lipase from *Pseudomonas cepacia* (Sigma Cat. # L-9156)  
(g) CCL : Lipase from *Candida rugosa* (Sigma Cat. # L-1754)

Table 2. Biochemical characterizations of isolated strain SY-01

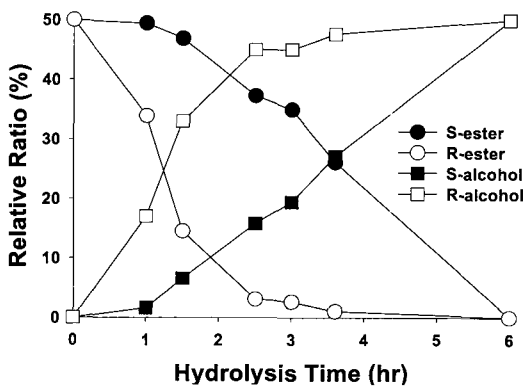
Characterizations	Isolated strain SY-01	<i>Acinetobacter junii</i>
Reduction of nitrates to nitrites	-	-
Indole production	-	-
Glucose acidification	-	-
Arginine dihydrolase	-	-
Urease	-	-
Esculin hydrolysis(β-glucosidase)	-	-
Gelatin hydrolysis(protease)	-	-
β-galactosidase	-	-
Glucose assimilation	-	-
Arabinose assimilation	-	-
Mannose assimilation	-	-
Mannitol assimilation	-	-
N-acetyl-glucosamine assimilation	-	-
Maltose assimilation	-	-
Gluconate assimilation	-	-
Caprate assimilation	+	+
Adipate assimilation	-	-
Malate assimilation	+	+
Citrate assimilation	-	+
Phenyl-acetate assimilation	-	-
Cytochrome oxidase	-	-

Table 3. Percent of total fatty acid of isolated strain SY-01

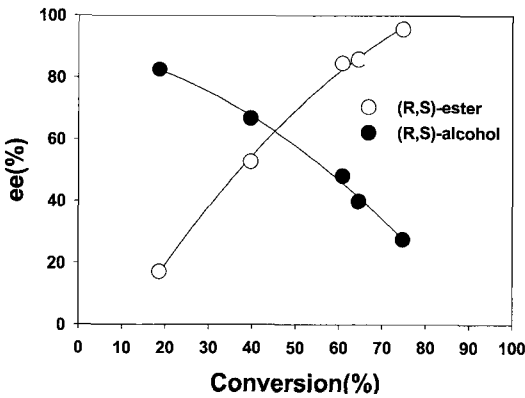
Fatty acid	Isolated strain SY-01	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
n-decanoic acid (10:0)	2.13	
n-dodecanoic acid (12:0)	1.48	4.70
unknown 12.484	0.33	0.33
2-hydroxy dodecanoic acid(12:0 2OH)	3.80	1.57
3-hydroxy dodecanoic acid (12:0 3OH)	4.94	3.48
n-tetradecanoic acid (14 : 0)	0.66	0.68
15:0		0.39
16:1 w7c alcohol		1.43
n-hexadecenoic acid (16 : 1 ω9c)	0.98	
Sum In Feature 3		
2-hydroxy-15-methyl-hexadecenoic acid (16 : 1 ω7c/15 iso 2OH)	22.04	26.32
n-hexadecanoic acid (16 : 0)	18.32	16.23
15-methylhexadecanoic acid(17 : 0 iso)	0.47	1.13
n-heptadecenoic acid (17 : 1 ω8c)	0.53	0.53
n-heptadecanoic acid (17 : 0)	0.49	0.49
n-octadecatrienoic acid(18:3ω6c (6,9,12))	2.02	0.68
n-octadecenoic acid (18 : 1 ω9c)	40.11	29.89
n-octadecenoic acid (18 : 1 ω7c)	0.74	2.80
n-octadecanoic acid (18 : 0)	0.94	3.08

**미생물 동정**

최종적으로 선별한 26번 균주를 API kit(20NE) 를 사용하여 생화학적 특성을 조사하여 본 결과 Table 2와 같이 나타났고 *Acinetobacter junii*로 동정되었다. 또한 Microbial Identification System(Microbial ID, Inc., Newark, Del., USA)을 이용하여 균체 지방산을 분석한 결과 Table 3과 같이 나타났고, Aerobe Bacterial Library(Microbial ID, Inc.)와 비교한 결과 *Acinetobacter calcoaceticus*로 동정되었고, 유사도 0.343으로 나타나서 본 균주를 *Acinetobacter* sp. SY-01로 명명하였다.



(a)



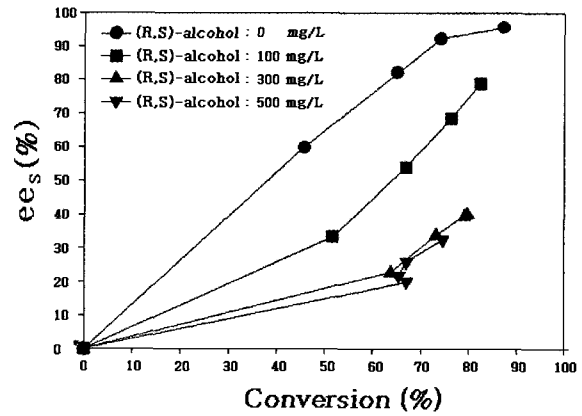
(b)

**Figure 2.** Relative ratio of the R and S enantiomers of the remaining substrates and products during the hydrolysis reaction by the lipase from *Acinetobacter* sp. SY-01 (a), and Enantiomeric excess profiles of the remaining substrates and products as a function of conversion (b) (Temp. 40°C, pH 8.0, n-hexane 1.0%, substrate conc. 100mg/L).

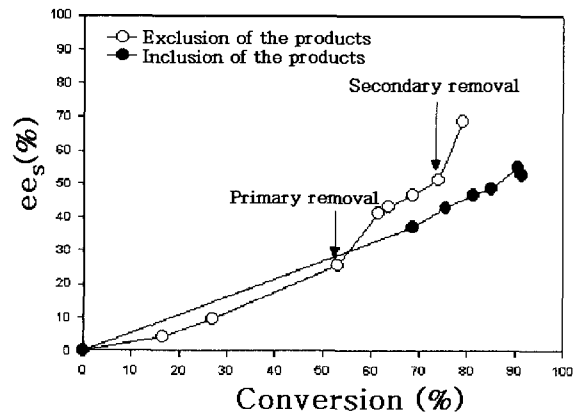
**광학선택적 가수분해반응**

*Acinetobacter* sp. SY-01 균주가 생산하는 lipase를 이용하여 항 진균제의 중간체인 라세믹 형태의 cis-2-bromomethyl-2-(2, 4-dichlorophenyl)-1,3-dioxolane-4-methyl acetate를 가수분해한 결과를 Fig. 2 (a)에 나타내었다. 가수분해가 진행됨에 따라 두 가지 기질 이성체가 각각 차이를 보이면서 감소하였고, 마찬가지로 생성물의 두 가지 이성체도 각각 차이를 보이면서 증가하였다. 가수분해 반응 3.5시간째에 R-ester는 거의 사라진 반면 S-ester는 약 27.1% 남아있는 것을 확인할 수 있어서 본 라세믹 기질의 경우 생성물에서는 순수 이성체가

존재하지 않았고 기질에서 순수 이성체를 확인할 수 있었다. Fig. 2 (b)는 전환율에 대한 ee값으로 다시 표현한 것인데, 전환율이 증가함에 따라 기질에 대한 광학선택성( $ee_s$ )은 증가하였고, 생성물에 대한 광학선택성( $ee_p$ )은 감소하였다. 이상의 결과로 전환율이 74.8% 되었을 때 95.6% ee 값을 가지는 S-ester를 27.1% 수율로 회수할 수 있음을 알 수 있었다.



(a)



(b)

**Figure 3.** Effect of the addition of reaction products on enantioselectivity during the hydrolysis reaction(a) (Temp. 50°C, pH 7.0, n-hexane 2.0%(v/v), substrate conc. 100 mg/L), and effects of the removal of reaction products on enantioselectivity during the hydrolysis reaction (b). (Temp. 50°C, pH 7.0, n-hexane 2.0%(v/v), substrate conc. 1,000 mg/L).

**가수분해 반응에 미치는 환경인자의 영향**

순수이성체의 생산성 증가를 위하여 온도, pH, 용매의 종류 및 농도, 기질 및 반응 생성물이 광학선택성에 미치는 영향에 대하여 조사하여 보았다. 일반적으로, 온도, pH, 반응매 질량의 반응조건이 광학선택성에 영향을 미치는 것으로 보고 (13, 27-30)되고 있기 때문에, 본 효소를 이용한 가수분해 반응에서 이러한 변수들의 영향을 살펴 보았다. Table 4 에 전환율과 광학선택성에 미치는 온도, pH, 용매의 종류와 기질 농도에 대한 영향을 나타내었는데 전환율은 50°C, pH 7.0에서 가장 높게 나타났고, 광학선택성은 온도와 pH의 변화에 큰 영향을 받지 않았다. Jackson 등(13)이 보고한 *Bacillus sphaericus* B-21035 에스테라제의 경우는 매우 좁은 pH 범위에서 ee 값이 크게 증가하는 결과를 보였으나 본 lipase의 경

우는 pH에 영향을 받지 않는 결과를 나타내었다. 용매의 종류가 전환율 및 광학선택성에 미치는 영향을 조사하여본 결과 용매의 첨가에 의해 전환율이 감소하였고 광학선택성은 약간 증가하였다. 특히 cyclohexane, benzene, dodecane의 경우는 가수분해가 거의 이루어지지 않았으므로 광학선택성 값을 계산할 수 없었다. 일반적으로 용매의 극성(polarity)과 소수성(hydrophobicity), 용매의 분자구조, 용매의 분자크기 등의 성질에 의해서 광학선택성이 영향을 받는다고 보고(28-30)되고 있으나, 본 효소의 경우는 용매의 종류에 따라 광학선택성에 변화를 나타내지 않았다. 기질농도는 300 mg/L 이하에서는 전환율과 광학선택성이 크게 감소하지 않았지만 그 이상부터는 기질농도가 증가에 따라 전환율과 광학선택성이 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 이러한 저 농도에서 순수 이성체 생산공정을 개발하는 것은 경제성에서 의미가 적으므로 고농도에서의 반응공정을 개발하기 위하여 기질농도가 증가함에 따라 광학선택성이 감소하는 이유를 파악하고자 하였다. Fig. 3 (a)는 생성물 농도를 임의적으로 첨가하여 가수분해 반응을 수행하면서 광학선택성의 변화를 조사한 결과이고, 생성물 농도가 증가함에 따라 광학선택성이 감소하는 것을 확인하였다. Fig. 3 (b)는 가수분해 반응 중에 발생하는 알콜 형태의 생성물을 실리카겔 컬럼을 이용하여 제거하면서 가수분해 반응을 수행하여 생성물을 제거하지 않은 경우에 비해 광학선택성이 증가하는 것을 확인한 결과이다. 이것으로 가수분해 반응 중에 발생하는 생성물의 농도가 증가함에 따라 광학선택성이 감소하는 것을 확인 하였다. 따라서 본 lipase 효소를 이용하여 항진균제로 사용되는 이트라코나졸 전구체인 본 라세믹 기질로부터 순수 이성체를 생산하는 공정을 개발하기 위해서는 온도 50℃, pH 7.0에서 생성물을 계속 제거해주면서 가수분해 반응을 수행하는 공정을 사용하는 것이 효율적인 것으로 사료된다.

## 요 약

항진균제로 잘 알려진 아졸계 화합물인 이트라코나졸 전구체에 대한 광학선택성 lipase 생산균주 탐색을 수행하였다. 본 라세믹 기질을 선택적으로 가수분해하는 lipase 생산균주인 *Acinetobacter* sp. SY-01 를 분리하였고, 효소 가수분해반응을 수행한 결과 본 라세믹 기질은 전환율이 74.8%에 도달하였을 때 95.6%의 ee값을 가지는 S-ester로 분할되었다. 전환율은 온도 50℃, pH 7.0에서 가장 높게 나타났고, 광학선택성은 온도, pH에 의해 영향을 받지 않았다. 용매의 첨가에 의해 전환율은 감소하였으나 광학선택성은 약간 증가하였다. 기질농도가 증가함에 따라 광학선택성은 감소하였고, 이것은 가수분해반응 생성물에 의한 영향으로 확인되어 반응 생성물을 제거함으로써 광학선택성을 증가시킬 수 있었다.

## 감 사

본 연구는 과학기술부 차세대 정밀화학 기술개발 사업(신화학 공정개발)의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Ariens, E. J. (1993), Nonchiral, homochiral and composite chiral drugs, *Trends Biochem. Sci.* **14**, 68-76.
- Federsel, H. J. (1993), Drug chirality-scale-up, manufacturing, and control, *CHEMTECH* **12**, 24-33.
- Hutt, A. J. and J. O'Grady (1996), Drug chirality: a consideration of the significance of the stereochemistry of antimicrobial agents, *J. Antimicrobial Chemotherapy* **37**, 7-32.
- Deutsch, D.H. (1991), Chiral drugs : The coming revolution, *CHEMTECH* **3**, 157-159.
- Borman, S. (1992), FDA issues flexible policy on chiral drugs, *Chem. Eng. News* **6**(15), 5.
- Gray, N. M. and R. L. Woosley (1995), Methods and compositions of (2R, 4S) Itraconazole for treating fungal yeast and dermatophyte infections, *US Patent No.* 5,474,997.
- McCullough, J. R., C. H. Senanayake, G. J. Tanoury, Y. Hohg, and P. Koch (1999), 2R, 4S, R, S- and 2S, 4R, R, S-Hydroxyitraconazole, *US Patent No.* 5,952,502.
- Lee, E. G., and B. H. Chung (2000), Chiral resolution using enzymes, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(5), 415-422.
- Lee, E. Y. and H. S. Kim (2001), Development of hollow-fiber reactor system for the production of chiral 1,2-epoxy-7-octene by microbial enantioselective hydrolysis reaction, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**(3) 259-263.
- Jones, J. B. (1986), Enzymes in organic synthesis, *Tetrahedron* **42**, 3351-3403.
- Margolin, A. (1993), Enzymes in the synthesis of chiral drugs, *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 266-280.
- Santoniello, E., P. Ferralosci, P. Grisenti, and A. Monzouchi (1992), The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks, *Chem. Rev.* **92**, 1071-1140.
- Michael, A. J., P. L. David, and A. B. Lynne (1995), Enantioselective hydrolysis of ethyl 2-hydroxyalkanoates by an extracellular esterase from a *Bacillus sphaericus* strain, *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 175-179.
- Christopher, R., J. C. Raymond, S. A. Joseph, P. Victor, W. H. Frederick, G. Randolph, and C. Michel (1997), Process development for the production of the (S)-acid precursor of a novel elastase inhibitor(L-694, 458) through the lipase-catalyzed kinetic resolution of a  $\beta$ -lactam benzyl ester, *J. Ferm. Bioeng.* **83**(1), 48-53.
- Mohapatra, S. C. and J. T. Hsu (1999), Optimizing lipase activity, enantioselectivity, and stability with medium engineering and immobilization for  $\beta$ -blocker synthesis, *Biotech. Bioeng.* **64**(2), 213-220.
- Kaoru, N., K. Masamichi, and O. Atsuyoshi (1995), Structure of solvent affects enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterification, *Tetrahedron* **51**(32) 8799-8808.
- Matsumae, H., M. Furui, T. Shibatani, and T. Tosa (1994), Production of optically active 3-phenylglycidic acid ester by the lipase from *Serratia marcescens* on a hollow-fiber membrane reactor, *J. Ferment. Bioeng.* **78**, 59-63.
- Kirchner, G., M. P. Scollar, and A. M. Klibanov (1985), Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7072-7076.
- Seu, Y. B., Y. C. Su, and K. D. Lee (1996), Preparation of (S)-3-acetoxy-2-methylpropanol with lipase, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**(2), 213-216.
- Beata, P., R. Justyna, and Plenkiewicz (1998),

- Lipase-catalyzed kinetic resolution of the racemic mixtures of 1-aryloxy-3-nitrato- and 1-aryloxy-3-azido-2-propanols, *Synthetic Communications* **28**(23), 4355-4364.
21. Anneli S.-L. P (1997), Phosphate uptake kinetics by *Acinetobacter* isolates. *Biotech. Bioeng.* **53**(3), 304-309
  22. Chen, J. Y., C. H. Wen, and T. L. Chen (1999), Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotech. Bioeng.* **62**(3), 311-316
  23. Gerhardt, P. (1981), Manual of Methods for General Bacteriology, p418, American Society for Microbiology, Washington.
  24. Hou, C. T. and T. M. Johnston. 1992. Screening of lipase activities with cultures from the agricultural research services culture collection. *JAOACS* **69**, 1088-1097.
  25. Tietz, N. W. and E. A. Fioreck (1966), A specific method for serum lipase determination, *Clin. Chim. Acta.* **13**, 352.
  26. Chen, C. H., Y. Fujimoto, G. Girdaukas, and C. J. Sih (1982), Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7294-7299.
  27. Sakurai, T., A. L. Margolin, A. J. Russell, and A. M. Klibanov(1988), Control of enzyme enantioselectivity by the reaction medium, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7236-7237.
  28. Nakamura, K., M. Kinoshita, and A. Ohno (1995), Structure of solvent affects enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterification. *Tetrahedron* **51**(32), 8799-8808.
  29. Kinoshita, M., and A. Ohno (1996), Factors influencing enantioselectivity of lipase-catalyzed hydrolysis, *Tetrahedron* **52**(15), 5397-5406.
  30. Ebert, C., L. Gardossi, P. Linda, and R. Vesnaver (1996), Influence of organic solvents on enzyme chemoselectivity and their role in enzyme-substrate interaction, *Tetrahedron* **52**(13), 4867-4876.