

## *Acinetobacter* sp. SY-01 리파제를 이용한 이트라코나졸 전구체의 광학선택적 가수분해와 생성물 제거에 의한 광학선택성 증가

윤 문영, 신평균\*, 정 찬성\*\*, 박 정극  
 동국대학교 생명화학공학과  
 한국과학기술연구원 수질환경연구센터\*  
 한국과학기술연구원 의약화학연구센터\*\*

### Enantioselective Hydrolysis by Itraconazole precursor using *Acinetobacter* sp. SY-01 Lipase and Increase of Enantioselectivity by the Removal of Products

Moon Young Yoon, Pyong Kyun Shin\*, Chang Seong Cheong\*\*, Jung Keug Park  
 Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University  
 Water Environment Research Center, Korea Institute of Science and Technology\*  
 Medicinal Chemistry Research Center, Korea Institute of Science and Technology\*\*

#### 서론

정밀화학제품 중에서 유기화합물로 분류되는 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<sup>(1)</sup>. 따라서 신약개발의 초기단계에서 순수 이성질체만 선택적으로 합성하는 것이 요구되었고, 또한 기존의 시장에서 판매되고 있는 라세믹 혼합물 형태의 의약품도 순수 이성체 형태로 생산하는 것이 매우 중요하게 되었다<sup>(2)</sup>.

아졸계 화합물인 이트라코나졸은 잘 알려진 항진균제(antifungal 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<sup>(3,4)</sup>. 그러나 일반적으로 화학적 합성법은 여러 단계를 거쳐야 하는 공정상의 복잡성과 환경문제를 유발하는 단점이 있기 때문에, 유기합성법의 이러한 여러 가지 문제점을 극복하기 위한 대안으로서 생촉매를 이용한 광학분할 방법이 활발하게 연구되고 있고, 생촉매 중에서도 protease, esterase, lipase같은 가수분해 효소가 co-factor 없이도 사용 가능하고, 높은 광학선택성과 넓은 기질 수용성을 갖고있기 때문에 광학활성물질을 생산하는데 가장 많이 사용되고 있다.

본 연구에서는 이트라코나졸의 전구체인 라세믹 형태의 cis-2-bromomethyl-2-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-dioxolane-4-methyl acetate에 광학선택성이 높은 리파제 생산 균주를 탐색하였고, 본 균주가 생산하는 리파제를 이용하여 라세믹 이트라코나졸 전구체에 대한 가수분해반응에서 온도, pH, 용매종류, 기질농도, 반응생성물이 전환율 및 광학선택성에 미치는 영향을 조사하여 보았다.

#### 실험재료 및 방법

##### 광학선택성 리파제 생산균주 탐색

전국 각지의 공단주변 하천, 폐수, 토양시료 1ml을 생리식염수에 희석하여 트윈 80(Tween 80)을 함유한 분리용 배지(Tween 80 1.0%, Peptone 0.5%, Beef extract 0.3%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.001%, Agar 2.0%, pH 7.0)에 직접 도말하여 30℃에서 4-5일 배양한 후 콜로니 주위에 불투명한 할로(halo)를 형성하는 균주를 1차 분리하였다. 분리된 균주 각각을 로다민 B(Rhodamine B)를 함유한 분리용 배지(Olive oil 1.0%, Peptone 0.5%, Beef extract 0.3%, Rhodamine B 0.0001%, Agar 2.0%, pH 7.0)에 접종하여 30℃에서 3일 배양한 후 UV를 조사하였을 때 콜로니 주위에 오렌지색 형광을 나타내는 균주를 2차 분리하였다. 최종적으로 분리된 각각의 균주를 리파제 생산용 배지(Olive oil 1.0%, Tryptone 0.5%, Dextrose 0.1%, Yeast Extract 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, pH 7.0) 5ml를 함유한 시험관(20ml용량)에 각각 접종하여 30℃, 150rpm에서 3일 배양한 후 원심분리 하여 배

양 상등액에 대한 리파제 활성을 측정하여 리파제(Lipase) 생산균주를 60종 분리하였다. 이렇게 분리한 균주를 리파제 생산용 배지 5ml를 함유한 시험관(20ml용량)에 각각 접종하여 30℃, 150rpm에서 3일 배양한 후 배양액을 12000rpm에서 10분 원심분리하여 상등액만을 회수하여 이것을 조효소액으로 사용하였다. 이 조효소액 1ml과 n-hexane에 10g/L로 용해한 라세믹 기질인 cis-2-bromomethyl-2-(2,4-dichloro-phenyl)-1,3-dioxolane-4-methyl acetate(Fig.1) 100 $\mu$ l, 200mM 트리즈마 완충용액(pH8.0) 1ml, 증류수 4ml을 혼합한 후 40℃에서 250rpm으로 3시간 가수분해반응 후 n-hexane 1ml를 투입하고 혼합하여 n-hexane층만을 회수하여 HPLC를 이용하여 분석 하므로써 광학선택성을 확인하였다.

### 미생물 동정

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

### 리파제 활성 측정

리파제 활성은 Tietz와 Fiereck의 방법에 기초를 둔 Sigma Bulletin No. 800방법에 따라 분석하였다. 리파제 1 unit은 1분 동안에 1 $\mu$ mol의 유리지방산을 생산하는 효소의 양으로 정의하였고 아래 식에 의해 계산하였다.

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

T : Sample 적정치

T<sub>b</sub> : Blank 적정치

### 광학선택성 분석

효소용액에 의해 가수분해된 라세믹 기질과 생성물에 대한 광학선택성을 조사하기 위하여 HPLC(영린기기(주))를 사용하여 분석을 시행하였다. column은 Chiralcel OD(Chiral Technologies, Exton, PA, USA), column 크기는 4.6mm x 250mm, 이동상은 5% isopropyl alcohol을 함유한 n-hexane을 사용하였고, flow rate는 1ml/min로 하였다. column pressure는 500bar, column temperature 25℃, detection은 UV 230nm로 하였다. 분석 크로마토그램의 한 예를 Figure 2에 나타내었고, retention time은 기질인 에스터 형태가 7.6, 8.1 min., 생성물인 알코올 형태가 14.1, 16.1 min.으로 나타났다.

전환율(Conversion)과 입체선택성의 정도를 나타내는 지표인 Enantiomeric excess(ee)값과 Enantioselectivity 값(E)은 다음과 같이 계산하였다<sup>(5)</sup>.

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



여기에서 A와 B는 라세믹 기질이고, C와 D는 라세믹 생성물이다. 이때, 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 아래 식과 같이 나타낼 수 있다.

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

$$ee_s = \frac{([B] - [A])}{([A] + [B])}$$

$$ee_p = \frac{([C] - [D])}{([C] + [D])}$$

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

### 효소 가수분해반응 조건

n-hexane에 용해한 라세믹 기질 (10g/l)과 조효소액 5ml(효소 활성 : 4.0unit)에 TRIZMA 완충액(pH 8.0) 200mM농도의 용액을 혼합하여 최종 부피가 100ml이 되도록 조제한 후 500ml 용량의 baffle flask에 넣고, 150rpm의 조건에서 가수분해반응을 수행하였다. 온도에 대한 영향은 shaking incubator에서 30, 40, 50, 60°C로 조절하면서 수행하였고, pH에 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. 반응진행중 전환율과 입체선택성을 측정하기 위해 일정시간 단위로 샘플링 하여 n-hexane 0.5ml을 혼합하고 n-hexane층만을 회수한 후 HPLC 분석기를 이용하여 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 광학선택성 리파제 생산미생물 분리 및 동정

전국 각지의 공단주변 하천슬러지, 폐수, 토양을 균원시료로 사용하여 트윈(Tween) 80을 함유한 분리용 배지에서 불투명한 할로(opaque halo)를 형성하는 균주를 1차분리하였고, 이들을 Olive oil 과 로다민 B (rhodamine B)를 함유한 분리용 배지에서 배양하여 UV 조사하에서 orange fluorescent halo를 형성하는 균주를 2차 분리하여 이들 각각을 리파제 생산용 배지에서 배양한후 리파제 활성 측정을 통하여 최종적으로 리파제 생산균주를 60종 분리하였다. 분리한 균주가 분비하는 리파제에 대한 광학선택성을 조사하기 위하여 각각의 균주를 배양한후 배양 상등액을 이용하여 라세믹 기질에 대한 가수분해반응을 수행한후 광학선택성을 분석하여 선택성을 나타내는 균주 10종을 분리하였고 이 중에서 가장 광학선택성이 높은 26번 균주(SY-01 균주)를 최종적으로 선별하였다. 대조구로 사용한 PCL(lipase from *Pseudomonas cepacia*, Sigma Cat # L-9156), CRL(lipase from *Candida rugosa*, Sigma Cat # L-1754)의 경우 입체선택성을 전혀 나타내지 않았고, YLL(lipase from *Yarrowia lipolytica*, KCCM 50038) 는 42.3% 전환되었을 때 생성물에 대한 광학선택성( $ee_p$ )이 31.2%를 나타낸 반면, 분리균주인 26번 균주는 25.4%전환율에 도달하였을 때 생성물에 대한 광학선택성( $ee_p$ )이 66.8%로 가장 높게 나타났다. 최종적으로 선별한 26번 균주를 API kit(20NE) 를 사용하여 생화학적 특성을 조사하여본 결과 *Acinetobacter junii*로 동정되었고, 또한 Microbial Identification System(Microbial ID, Inc., Newark, Del., USA)을 이용하여 균체 지방산을 분석하여 Aerobe Bacterial Library(Microbial ID, Inc.)와 비교한 결과 *Acinetobacter calcoaceticus*로 동정되었고, 유사도는 0.343으로 나타나서 본 균주를 *Acinetobacter sp.* SY-01로 명명하였다.

#### 광학선택적 가수분해반응

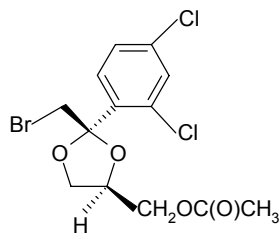
*Acinetobacter sp.* SY-01 균주가 생산하는 리파제를 이용하여 항 진균제의 중간체인 racemic cis-2-bromomethyl-2-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-dioxolane-4-methyl acetate를 가수분해한 결과를 Figure 3의 (a)에 나타내었다. 가수분해가 진행됨에 따라 두 가지 기질 이성체가 각각 차이를 보이면서 감소하였고, 마찬가지로 생성물의 두 가지 이성체도 각각 차이를 보이면서 증가하였다. 가수분해 반응 3.5시간째에 기질에 대한 이성체중 R-ester는 거의 사라진 반면 나머지 S-ester는 약 25% 정도 남아있는 것을 확인할 수 있어서 본 라세믹 기질의 경우 생성물 에서는 순수 이성체가 존재하지 않았고 기질에서 순수 이성체를 확인할수 있었다. Figure 3의 (b) 그림은 전환율에 대한 ee값으로 다시 표현한 것인데, 전환율이 증가함에 따라 기질에 대한 입체선택성( $ee_s$ )은 증가하였고, 생성물에 대한 입체선택성( $ee_p$ )은 감소하였다. 이상의 결과로 본 라세믹 기질은 전환율이 74.8%에 도달하였을때 95.6%의 ee값을 가지는 S-ester로 분할되었다. 전환율은 50°C, pH 8.0에서 가장 높게 나타났지만 광학선택성에는 영향을 미치지 않았다. 용매의 첨가에 의해 전환율은 감소하였지만 광학선택성은 약간 증가하였고, 기질농도가 증가함에 따라 전환율과 광학선택성이 감소하였다. 이것은 가수분해반응중 발생하는 생성물에 의한 영향으로 확인되어, 생성물을 제거하므로서 광학선택성을 증가시킬수 있었다.

### 참고 문헌

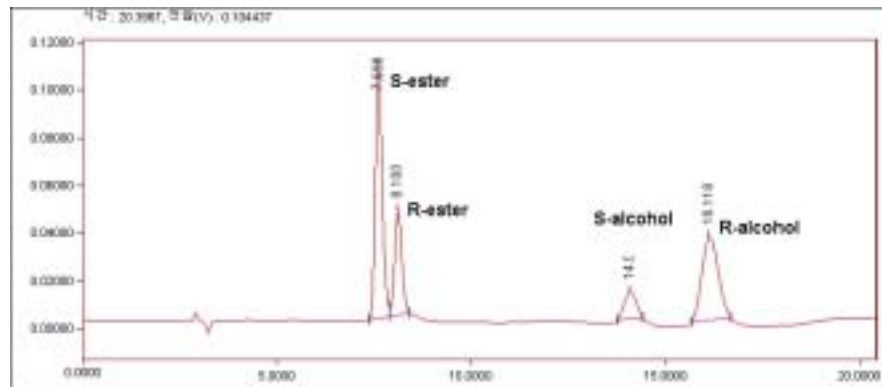
1. Hutt, A.J. and O'Grady, J., Drug chirality: a consideration of the significance of the stereochemistry of antimicrobial agents., *J. Antimicrobial Chemotherapy* **37**, 7-32(1996)
2. Deutsch, D.H., Chiral drugs : The coming revolution., *CHEMTECH*, **3**, 157-159(1991)
3. Gray, N. M., Woosley, R. L., Methods and compositions of (2R, 4S) Itraconazole for treating fungal yeast and dermatophyte infections. *US Patent No.* 5,474,997(1995)
4. McCullough, J. R., Senanayake, C. H., Tanoury, G.J., Hohg, Y., Koch, P., 2R, 4S, R, S- and 2S, 4R, R, S-Hydroxyitraconazole. *US Patent No.* 5,952,502(1999)
5. Chen C.H., Fujimoto Y., Girdaukas G. and Sih C.J., Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolutions of Enantiomers, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7294-7299 (1982)

### 감사

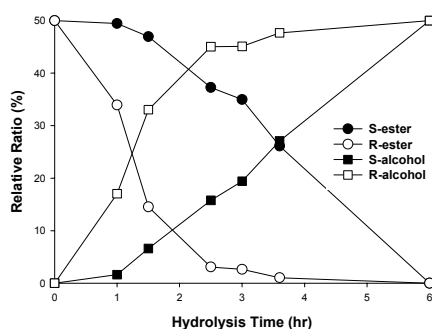
본 연구는 과학기술부 차세대 정밀화학 기술개발 사업(신화학 공정개발)의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.



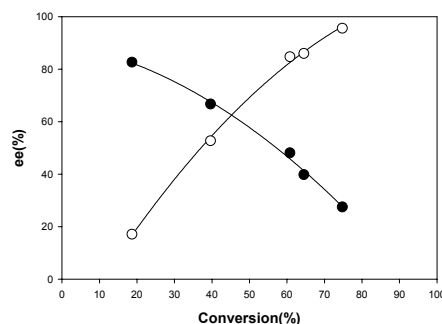
**Fig. 1.** Molecular structure of cis-2-bromomethyl-2-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-dioxolane-4-methyl acetate.



**Fig. 2.** HPLC chromatogram of (R,S)-ester and (R,S)-alcohol for the resolved Itraconazole precursor



(a)



(b)

**Fig. 3.** (a) Relative ratio of the R and S enantiomers of the remaining substrates and products at the hydrolysis reaction by the lipase from *Acinetobacter sp.* SY-01. (b) Enantiomeric excess of the remaining substrates and products as a function of conversion.