

Cyclodextrin의 사용과 pH의 변화를 이용한 Levofloxacin 생산 증대 연구

문지숙, 노윤숙, 오선영¹, 장성재¹, 임상민¹, 김동일

인하대학교 생물공학과 세포배양공학실험실, (주)보령제약 중앙연구소¹

전화 (032) 863-5946, FAX (032) 875-0827

Abstract

Enantioselective production of levofloxacin from ofloxacin butyl ester by porcine liver esterase was enhanced with the addition of α -cyclodextrin(α -CD) and pH change. The conversion yield was increased from 27 to 64% and 100% with 150 mM substrate when the molar ratio of α -CD to substrate was 1 and 2, respectively. When 100 mM of substrate was added with the same molar ratio of α -CD at pH 5.6, the solubility was increased 3.8 times and the conversion yield was increased 4.4 times.

서론

광학적 활성을 갖는 퀴놀론계 항생제인 ofloxacin은 강력한 항균력을 가지고 있다. 특히 ofloxacin의 L-form인 levofloxacin이 D-form의 ofloxacin에 비하여 항생 효과가 뛰어난 것으로 보고되었다.¹⁾ 따라서 항생 효과가 뛰어난 levofloxacin의 선택적 생산이 요구된다. 이를 위하여 L-form의 기질에 특이적으로 반응하는 porcine liver esterase(PLE)를 이용하여 보다 많은 levofloxacin의 생산을 유도할 수 있다. 본 연구에서는 ofloxacin을 산촉매하에서 butanol과 반응시켜 ofloxacin butyl ester를 만든 후 이것을 기질로 하여 levofloxacin을 생산하였다. 이때 butyl기 부분의 ester bond를 PLE가 가수분해하게 된다. 그러나 반응 진행시 기질이 난용성이므로 생산 농도가 낮다는 단점이 있다. 이 문제를 해결하기 위한 방법으로 CD를 사용하였다. CD는 친수성 외부와 소수성 pore를 가지고 있는 물질로 난용성인 기질의 소수성 부분과 결합하여 용해도를 높인다. 기질의 용해도를 높이기 위해 기존에 사용해 왔던 유기용매와는 달리 CD는 미생물의 성장과 효소의 활성에 해가 없기 때문에 여러 생물공학분야로의 응용이 가능하다.²⁾

본 연구에서는 levofloxacin의 생산량 증대를 위해 CD의 첨가 물비를 최적화하고, pH가 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 효소는 Sigma사의 PLE이며 광학선택적 levofloxacin 생산에 사용하였다. α -CD는 Acros사의 제품을 사용하였고, 기질로는 ofloxacin butyl ester를

사용하였다. 효소 반응은 0.1 M, pH 6.8의 인산완충용액 10 mL에 기질을 넣고 일정한 몰비로 CD를 첨가한 후 20분간 초음파 처리하여 준비하고 37°C, 140 rpm에서 수행하였다. 효소의 사용량은 수율의 증대 실험에서는 10 g/L, pH의 영향을 알아보기 위한 실험에서는 2 g/L였다. 분석은 오롬사의 Vintage 2000 LC pump와 영인 M720 UV detector를 사용하였으며 고정상으로는 Shiseido사의 Capcell pak(4.6 mm ψ \times 250 mm) column을 사용하였다. 이동상으로는 증류수와 methanol을 85:15로 혼합하고 1.21 g/L의 L-isoleucine과 1.07 g/L의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하여 사용하였다. 파장은 330 nm, 유속은 1.0 mL/min의 조건하에서 분석하였다. 본 연구에 사용된 PLE는 ofloxacin butyl ester의 L-form과 D-form을 4:1의 비율로 가수분해하는 특성이 있다. 이러한 효소의 광학이성질체에 대한 선택성을 enantioselectivity로 나타내며 그 식은 다음과 같다.

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

본 실험에서는 60%의 enantioselectivity까지 반응의 종결 시점으로 결정하였다.

결과 및 고찰

수율의 증대

기질 150 mM의 고농도에서 PLE를 사용하여 실제 반응을 수행한 결과 levofloxacin의 생산량은 그림 1과 같았다. 그림 2는 반응 종결 시간과 수율을 나타낸 것인데, 기질만 첨가된 경우 27%의 수율을 얻었고, α -CD를 같은 몰비로 첨가하였을 경우 64%, 두배의 몰비로 첨가하였을 경우 100%, 세배의 몰비로 첨가하였을 경우 29%의 수율을 얻을 수 있었다. 이렇게 α -CD가 첨가되면 수율이 증대되는데 이는 용해도의 증가 때문이라고 판단된다.³⁾ 그림 2에 나타난 결과를 통해서 α -CD의 첨가량이 증가하면 반응 종결 시간이 지연됨을 알 수 있는데 이것은 기질이 효소와 반응할 때 기질 단독으로 존재하여야 하기 때문인 것으로 생각된다. 기질은 반응이 진행됨에 따라 소모되고 이에 평형을 유지하기 위해 α -CD와 결합해 복합체를 형성한 기질이 다시 분리되는데 이때 시간이 소요되기 때문이라고 생각된다.⁴⁾ 또한 사

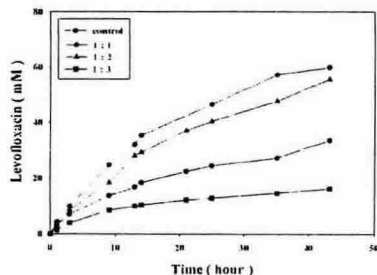


그림 1. CD의 첨가 몰비에 따른 반응 속도의 변화.

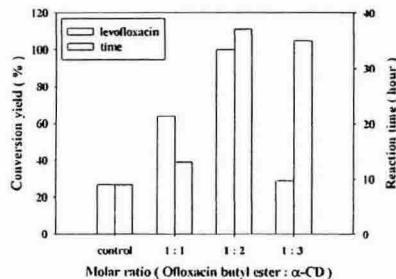


그림 2. CD의 첨가 몰비에 따른 생산 수율.

용한 기질 농도의 3배의 몰비로 α -CD가 첨가된 경우 첨가하지 않았을 때와 수율이 비슷하였다. 이러한 결과의 원인은 α -CD 자체도 일정한 용해도가 있어 그 이상은 용해되지 않는데 이때 용해되지 않은 과량의 α -CD가 반응에 저해를 가한 것으로 판단된다.⁵⁾ 각각의 경우에 기질의 농도를 측정해보면 기질 농도의 두배 이상의 몰비로 α -CD가 첨가된 경우 기질의 용해도는 거의 비슷한 것으로 나타났다. 따라서 α -CD가 3배 이상의 몰비로 첨가되는 것은 무의미하다는 결론을 얻었다.

pH에 의한 영향

위의 실험을 통해 기질 농도의 두배의 몰비로 α -CD가 첨가되는 것이 levofloxacin 생산량 측면에서 최적이었다. 그러나 α -CD의 첨가량이 많을수록 반응종결 시간이 지연되고 자체의 가격 때문에 생산단가가 올라간다는 단점이 있었다. 이런 단점을 해소하기 위해 여러 실험을 수행한 결과 pH에 따라 levofloxacin의 수율이 달라짐을 확인할 수 있었다. 반응용매의 pH를 변화시켜 실험한 결과는 그림 3과 같았다. 그림 4는 각각의 수율을 나타낸 것인데 α -CD가 첨가되지 않은 상태에서 pH 6.8일 때 19%로 낮게 나타났다. 여기에 α -CD를 첨가하면 수율이 47%로 1.8배 증가하였다. 반응용매를 pH 5.6으로 제조하여 α -CD를 첨가하고 반응을 진행시키면 수율이 84%로 4.4배 증가하였다. 위와 같은 결과의 원인을 규명하기 위해 그때의 용해도와

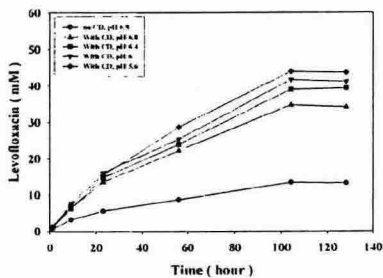


그림 3. pH에 따른 반응 속도의 변화.

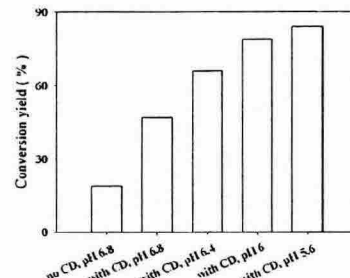


그림 4. pH에 따른 생산수율 변화

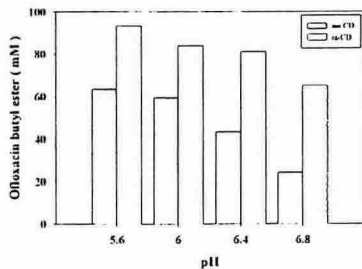


그림 5. 기질의 용해도에 미치는 pH의 영향.

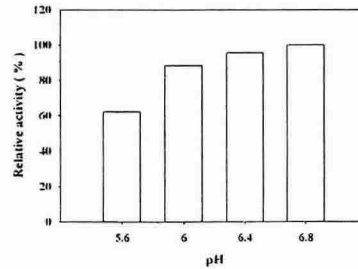


그림 6. 효소의 활성에 미치는 pH의 영향.

활성을 조사해 보았다. 그림 5는 100 mM에서의 용해도를 측정된 결과이다. CD를

첨가하지 않은 상태에서 pH 6.8로 조정하였을 경우 23.4%가 용해되었고, 여기에 α -CD를 첨가하였을 때 65%가 용해되었다. 용매의 pH를 5.6으로 낮추고 α -CD를 첨가한 경우 기질의 93%가 용해되었다. 그림 6은 pH의 변화에 따른 효소의 활성을 나타낸 것이다. pH가 낮아질수록 활성이 떨어짐을 알 수 있다. 그림 5와 그림 6에서 pH에 따라 기질의 용해도와 효소의 활성 면에서 상반된 결과가 나타나는데 pH 5.6에서 효소의 활성은 낮지만 용해도의 증대로 인해 결과적으로 높은 수율을 얻을 수 있었다.

요약

PLE를 이용한 levofloxacin의 생산에서 기질 150 mM 사용의 경우 두배의 물농도로 α -CD를 사용하여 산물의 생산량을 3.7배까지 증가시킬 수 있었다. 그러나 이 경우 α -CD의 사용량이 많아 경제성이 떨어지는 단점이 있다. 이에 같은 물농도로 α -CD를 사용하고 pH에 변화를 주어 용해도를 향상시켜 보았다. 기질 100 mM의 경우 pH 5.6에서 같은 물농도의 α -CD를 사용한 경우 α -CD를 사용하지 않은 것에 비해 4.4배의 수율의 증대가 있었다.

감사의 글

본 연구는 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Suarez A. I. and Perea, E. J., "In vitro activity of levofloxacin, ofloxacin and D-ofloxacin against coryneform bacteria and *Listeria monocytogenes*"(1999), *J. Antimicrob. Chemother.*, 43, 27-32
2. Schlosser, D., Irrgang, S. and Schmauder, H.-P., "Steroid hydroxylation with free and immobilized cells of *Penicillium raistrickii* in the presence of β -cyclodextrin"(1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 16-20
3. Bru, R., Lopez-Nicolas, J. M., Nunez-Delicado, E., Nortes-Ruiperez, D., Sanchez-Ferrer, A. and Garcia-Carmona, F., "Cyclodextrins as hosts for poorly water-soluble compounds in enzyme catalysis"(1997), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 61, 1996
4. Lopez-Nicolas, J. M., Bru R. and Garcia-Carmona, F., "Kinetic characteristics of the oxidation of polyunsaturated fatty acids by lipooxygenase"(1997), *Biochim. Biophys. Acta*, 1347, 140-150
5. Beder, M. L. and Komiyama, M., "Cyclodextrin Chemistry"(1978), Springer-Verlag, New York