

유전자 재조합 *E. coli*를 이용한 levofloxacin의 광학선택적 생산

민병혁, 이상윤, 조종문, 오선영¹, 장성재¹, 임상민¹, 김동일*

인하대학교 생물공학과 세포배양공학실험실, (주)보령제약 중앙연구소¹

전화 (032) 863-5946, FAX (032) 872-4046

Abstract

Levofloxacin is L-form stereoisomer of ofloxacin. It has better antibacterial activity than D-ofloxacin. In this study, levofloxacin was produced enantioselectively by using high density culture of recombinant *E. coli* containing a foreign esterase gene. Final cell concentration was 89 g/L at the end of fed-batch culture and the cells were used for levofloxacin production after IPTG induction at the optimized condition. For the immobilization of recombinant *E. coli*, 1.5% sodium alginate showed the best result to maintain enzyme activity and enantioselectivity.

서론

광학 이성질체는 서로 거울상으로 대칭되는 구조를 이루며 생체내에서 기능과 생리활성에도 차이를 보이게 된다. 현재 시판되는 화학적 의약품의 상당수가 이러한 광학이성질체 물질이고, 이중 일부는 절반이 한쪽상만을 선택적으로 분리하여 사용하고 있다. 따라서 이러한 광학이성질체 물질의 선택적 분리에 대한 세계적 관심이 모아지고 있다. 광학이성질체의 선택적인 생산 방법으로는 비대칭 합성, 입체특이적 결정화, 선택적 분리 등이 있으며¹⁾, 많이 알려진 분리방법으로는 크로마토그래피를 이용한 방법, 효소를 이용한 방법이 있고, 최근에는 *in situ* racemization을 이용하여 이론 수율을 100%까지 얻을 수 있는 dynamic kinetic resolution 방법에 대한 연구가 진행되고 있다²⁾. 효소적 방법은 화학적인 방법에 비해 mild condition에서 반응이 가능하고 에너지 소비가 적으며 광학선택성이 높은 이점이 있지만, 효소의 가격과 효소안정성의 감소로 인해 사용에 제한을 받는다.

Ofloxacin은 3-C 위치에 비대칭 탄소를 갖는 퀴놀론계 항생제로 강력하고 광범위한 항균스펙트럼을 갖고 있다. Ofloxacin은 L형과 D형이 1:1로 섞여있는 광학이성질체의 혼합물이며 L형의 ofloxacin만을 levofloxacin이라 구별하여 지칭한다. Levofloxacin은 라세미 형태의 ofloxacin에 비해 우수한 항균활성을 갖고 있으며 최근 많은 제약회사에서 L형의 선택적인 분리 생산을 통해 고부가가치의 levofloxacin 생산 연구를 수행중이다.

본 연구에서는 ofloxacin을 산촉매하에서 butanol과 반응시켜 ester bond를 형성하고

이 물질을 광학 선택성을 가진 효소(esterase)를 사용하여 가수분해함으로써 최종적으로 levofloxacin을 생산하고자 하였다. 이때 사용한 효소는 *Bacillus* 속에서 유래하였고 이 효소를 coding하는 유전자를 pET vector에 삽입한 후 *E. coli*(BL21)의 발현시스템을 이용하여 발현시켰다. 이때 효소가 발현된 세포를 whole cell biocatalyst의 개념으로 사용하였으며 미생물 발효에 의한 부피생산성을 높이기 위해 미생물의 고농도 배양을 진행하였다. Biocatalyst로서 세포의 고정화는 효소의 고정화만큼이나 일반적인 방법으로 많이 사용되고 있다. 세포의 고정화는 정해진 공간안에 높은 세포 농도를 유지할 수 있고 고정화된 세포의 재사용시 세포를 회수하는데 드는 비용을 절감할 수 있으며 연속공정을 사용할 경우 세포의 washout 문제가 발생하지 않는다. 또한 세포가 고정화된 기질내에서 외부환경(pH, 온도, 유기용매, 독성물질 등)으로부터 보호를 받기 때문에 세포의 안정성도 증가하는 장점이 있다.

본 연구의 목적은 발효조건의 최적화를 통해 고농도배양을 수행하고 세포내 효소활성을 극대화 할 수 있는 효과적인 유도시기 결정과 고정화를 통해 세포의 장기간 재사용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 균주는 보령제약 중앙연구소에서 유전자 재조합한 *Escherichia coli*(BL21)이었으며 vector는 pET24b를 사용하였다. Vector에 삽입된 유전자는 *Bacillus* 속에서 유래한 광학선택성을 보유한 esterase를 coding하고 있다.

고농도 배양을 위해서는 Kbiotech사의 5-L 발효조를 사용하였으며 이때 working volume은 2 L였다. 접종균체를 5%(v/v)로 접종한 후 배양을 진행하였으며 kanamycin을 40 mg/L가 되도록 첨가하여 selective pressure로 사용하였다. 배양온도는 37°C이었으며 초기 통기속도는 2 vvm, 교반속도는 300~800 rpm으로 운전하였다. 이후 산소고갈을 방지하기 위해 100% 산소를 간헐적으로 공급하여 용존산소를 30%이상으로 유지하였다.

미생물 고농도 배양을 위해 사용한 초기배지의 조성은 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 6.75 g/L KH_2PO_4 , 0.85 g/L citric acid, 0.7 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L glucose, 20 g/L yeast extract, 5 mL trace metal solution이었고, 유기식배양을 위한 공급배지는 500 g/L glucose, 15 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g/L yeast extract로 제조하여 사용하였다.

목적 효소의 발현은 IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 1 mM로 첨가하여 유도하였고 세포고정화는 목적 효소가 발현된 세포를 원심분리하여 회수한 다음 sodium alginate 용액과 혼합하여 bead를 제조한 후 반응에 사용하였다.

균체량의 측정은 spectrophotometer(Agilent 8453)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였고 세포의 esterase 활성 분석은 *p*-nitrophenyl caprylate(PNPC)를 일정량의 세포와 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소반응 후 생산된

levofloxacin은 HPLC를 사용하여 330 nm에서 분석하였다.

결과 및 고찰

광학선택성을 높이기 위한 방법으로 80%의 광학선택성을 지닌 효소를 발현하는 재조합 *E. coli*를 사용하여 levofloxacin을 생산하고자 하였으며, 균체의 고농도배양을 위하여 공급배지의 최적화와 순산소를 이용하여 89 g/L의 최고 균체농도를 얻을 수 있었다(Figure 1). 생산성의 최대화를 위해서는 고농도의 유효효소 생산균주와 더불어 높은 단위세포당 효소활성이 요구된다. 따라서 induction 조건의 최적화가 필요하며, IPTG에 의한 induction시 IPTG 자체가 세포생장에는 부정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데 본 연구에서도 마찬가지로 결과를 얻을 수 있었으며 결과적으로 세포농도와 활성을 고려할 때 대수기 후반에 induction하는 경우가 가장 우수한 것으로 사료된다. Figure 2에 도시한 바와 같이 12시간째에 IPTG를 첨가했을 때 세포의 생장은 둔화되었으며 효소활성은 induction 후 6시간까지 지속적으로 상승하였다가 하락하는 경향을 보여주었다. 다음으로 IPTG 첨가시기에 따른 영향을 조사한 결과 높은 균체농도를 얻기 위해서는 대수기후반에 induction하는 것이 유리하며 최대 효소활성을 위해서는 induction 후 6시간째에 세포를 회수하여 levofloxacin의 생산에 사용하는 것이 바람직하다는 결론을 내릴 수 있었다.

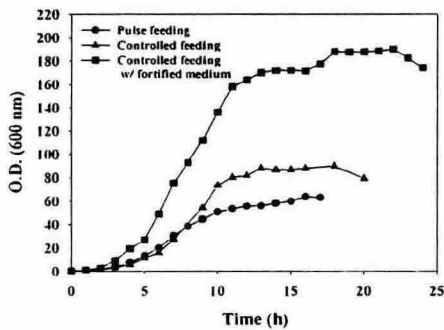


Figure 1. Effect of fermentation condition on cell growth.

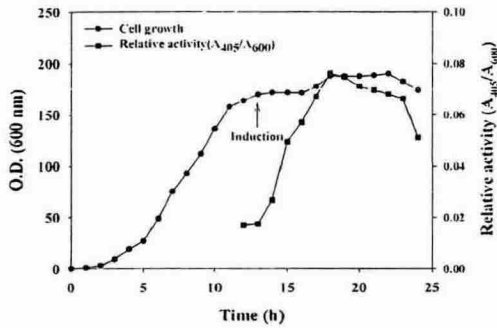


Figure 2. Effect of IPTG induction on cell growth and cell activity.

이후 균체의 재사용 가능성을 확인하기 위하여 세포를 고정화하여 levofloxacin의 생산에 이용하였으며 고정화하지 않은 세포와 비교하였다. 고정화하지 않은 세포의 효소활성을 Figure 3에 도시하였고 alginate 농도에 따른 고정화세포의 활성을 Figure 4에 나타내었다. 발효액으로부터 균체를 회수하여 바로 사용하는 경우는 시간에 따라 활성이 급격히 감소하여 72시간 뒤에는 초기활성의 43%만을 나타내었지만 고정화세포는 5회 재사용뒤에도 고정화세포의 초기활성을 유지함을 확인할 수 있었다. 또한 1.5%의 alginate를 사용한 경우에 3% alginate와 비교하여 2배 이상의 높은 활성을 나타내었으며, 이는 고정화에 사용된 동량의 세포를 사용한 결과와 비교할 때 70%의 포집효율을 보인 것이다.

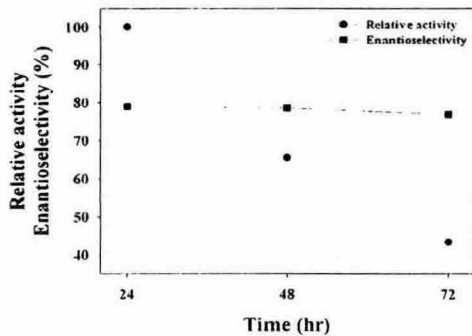


Figure 3. Time course changes of cell activity and enantioselectivity.

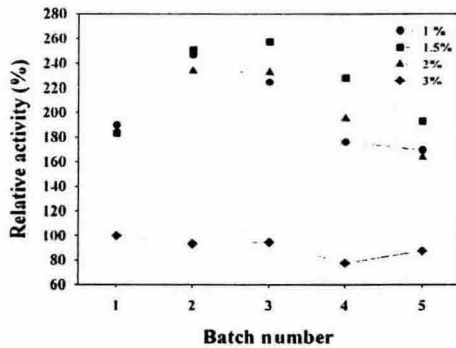


Figure 4. Effect of alginate concentration on immobilized cell activity.

요약

Levofloxacin은 ofloxacin의 L형의 광학이성질체로 D형의 ofloxacin보다 뛰어난 항균 활성을 갖는다. 본 연구에서는 광학선택성을 지닌 외래 효소를 재조합균주에서 발현 시키고 고농도배양과 세포고정화를 통해 levofloxacin을 생산하였다. *E. coli* 고농도 배양을 수행하여 89 g/L의 세포농도를 얻었으며 IPTG 1 mM로 단백질 발현을 유도하여 levofloxacin 생산 반응에 사용할 때 최적 첨가시기를 결정하였다. 세포고정화를 위해서는 sodium alginate를 사용하였으며 1.5% 첨가시 가장 우수한 효소활성을 나타내었고 재사용시에도 효소활성과 광학선택성이 유지됨을 확인하였다.

감사

본 연구는 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Chang C. S., Tsai S. W. and Kuo J., "Lipase-catalyzed dynamic resolution of naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester by hydrolysis in isooctane"(1999), *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 120-126.
2. Brown S. A., Parker M. C. and Turner N. J., "Dynamic kinetic resolution: synthesis of optically active α -amino acid derivatives"(2000), *Tetrahedron-Asymmetr.*, **11**, 1687-1690.