

Candida rugosa 리파제를 이용한 광학적으로 순수한 S-(+)-Ketoprofen의 생산

김민곤·최순자·최원아·김철호·*정봉현
생명공학연구소
(접수 : 1999. 2. 8., 게재승인 : 1999. 3. 24.)

Candida rugosa Lipase-Catalyzed Production of Optically Pure S-(+)-Ketoprofen

Min-Gon Kim, Sun-Ja Choi, Won-A Choi, Chul-Ho Kim, and Bong Hyun Chung†
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O.Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea
(Received : 1999. 2. 8., Accepted : 1999. 3. 24)

Enzymatic resolution reactions were investigated using *Candida rugosa* lipase for the production of optically pure S-(+)-ketoprofen. When the enzymatic hydrolysis (and esterification) of racemic ketoprofen esters (and racemic ketoprofen with alcohol) was investigated comparatively, aqueous media was more specific for S-enantiomer than organic media. In the enzymatic hydrolysis of racemic ketoprofen ethyl ester in aqueous media, optimal temperature and pH for enantioselectivity were 37°C and 4, respectively. The stereoselectivity of the enzyme was enhanced by adding dialcohols such as ethylene glycol and propylene glycol. The enantiomeric ratio obtained in the 40 % (v/v) ethylene glycol was 2-fold higher than that without the additive. By adding CH₂Cl₂, CHCl₃ and CCl₄ (5%, v/v), the enantioselectivity was reversed. A dramatic increase in the stereoselectivity was achieved using lipase purified by anion exchange chromatography. The type A lipase (the first eluted lipase fraction) showed an enantiomeric ratio of >100, whereas the type B lipase (the second eluted lipase fraction) exhibited enantiomer ratio of 9.0 in the hydrolysis of racemic ketoprofen ethyl ester.

Key Words : S-(+)-Ketoprofen, *Candida rugosa* lipase, stereoselectivity

서 론

Ketoprofen은 비스테로이드계 소염진통제(NSAID)의 일종으로 prostaglandin 합성의 저해제로 인체내에서 작용한다. 이러한 약리 작용은 S-(+)-ketoprofen의 효과에 의한 것이며 R-에난티오머는 약리활성이 없다(1). 현재 시판되고 있는 대부분의 케토프로펜은 두 형태의 enantiomer가 동량으로 혼합되어 있는 racemate 형태이며, 활성이 없는 에난티오머가 인체내에서 원하지 않는 대사 경로를 유발할 위험성이 있으므로 S-에난티오머만 사용되어지는 것이 바람직하다.

광학이성질체(stereoisomer)로 존재하는 라세믹(racemic) 기질에 대해 한 에난티오머에 대해서만 인식하는 효소의 기능을 이용하여 다양한 광학활성 의약품의 생산이 가능하게 되었다. 광학적으로 순수한 카르복실산류의 생산은 리파제와 같은 가수분해 효소의 반응을 이용할 수 있다. 즉 가수분해효소가 racemate 형태의 카르복실산 에스테르를 가수분해하는 반응에

서 한 에난티오머만을 가수분해하면 추출을 통하여 광학적으로 순수한 카르복실산 또는 카르복실산 에스테르를 얻을 수 있다. 가수분해 반응의 역반응인 에스테르화 반응에 의해서도 같은 목적을 달성할 수 있다. 따라서 다양한 2-arylpropionic acid의 경우도 리파제의 분할(resolution) 반응에 의해 광학적으로 순수한 생성물을 만들 수 있는 것으로 보고된 바 있다(2). 그러나 많은 경우에 있어서 효소의 광학선택성이 낮아 효소를 이용한 광학분할공정의 실용성에 문제가 있는 것으로 보고되고 있으며, 현재 까지 이를 해결하기 위한 다양한 연구들이 진행되어 왔다(3-5). 본 연구에서는 리파제의 광학분할 반응에 의한 (S)-ketoprofen의 생산 최적화 연구를 수행하였으며, 특히 (S)-ketoprofen을 선택적으로 생산할 수 있는 효소반응기술을 개발하는 데 역점을 두고 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재 료

효소는 Meito Sangyo사(일본)의 *Candida rugosa* 유래 리파제(이하 Lipase OF)를 사용하였다. Ketoprofen은 국전시약에서 제공받았으며 MES(2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid), ethanol은 Sigma사(USA)의 제품을 사용하였다. 그 외 여러 가지 첨가제 및 유기용매류는 HPLC 등급의 제품을 사용하였다.

† Corresponding Author : Bioseparation Process Res. Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O.Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea
Tel : 042-860-4442, Fax : 042-860-4594
e-mail : chungbh@kribb4680.kribb.re.kr

Ketoprofen ethyl ester는 화학적인 방법에 의하여 합성하였다. 에탄올 100ml에 30g의 ketoprofen을 녹인 용액을 함유한 round-bottom 플라스크에 황산 2.5ml를 첨가한 후 reflux condenser에 연결시켜 4시간동안 교반·가열함으로써 에스테르화 반응을 진행하였다. 반응물을 증발하여 에탄올을 제거하고, 1M NaHCO₃로 3번 세척하여 미반응한 ketoprofen, 황산, 에탄올을 제거하였으며 그 결과 수율 약 90% 정도의 점액질 액체인 ketoprofen ethyl ester를 얻었다.

효소 반응

다른 언급이 없으면 pH 5.0 아세트이트 완충용액(50mM) 1ml에 효소 25mg(정제 효소인 경우 같은 활성의 효소량)과 0.1ml의 ketoprofen ethyl ester를 200rpm으로 교반하면서 반응하였다.

음이온 크로마토그래피법에 의한 부분정제

리파제 수용액 효소에 30% (NH₄)₂SO₄를 천천히 첨가하면서 교반시킨 후 원심분리를 통하여 침전물을 제거하고 그 상등액에 다시 65% (NH₄)₂SO₄를 첨가하여 충분히 교반한 후 침전된 단백질을 회수하였다. 회수한 단백질을 완충용액에 용해시키고 같은 용액으로 투석한 후 원심분리하여 일은 상등액으로 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다. 10×150mm glass column (Amicon Co., USA)에 이온 교환수지, Q-sepharose^R XL (Pharmacia, Sweden) 5ml를 충전하고 25mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)을 사용하여 평형화하였다. Elution은 0~0.5M NaCl gradient로 하였으며 유속은 1ml/min로 하였다.

분석 방법

Ketoprofen ester, (S)-ketoprofen, (R)-ketoprofen의 농도는 CHIREX column(Phase 3005, Phenomenex, USA)을 이용한 HPLC 방법에 의해 분석하였다. 이동상은 20mM의 ammonium acetate를 녹인 용액이며, 검출은 UV 254nm에서, 이동상 속도 0.8ml/min를 유지하였다. 분석 크로마토그램의 한 예를 Figure 1에 도시하였다. 광학순수도 지표인 enantiomeric excess (ee)와 광학선택성인 enantiomeric ratio(E)는 하기식에 의해 정의되어진다(6)

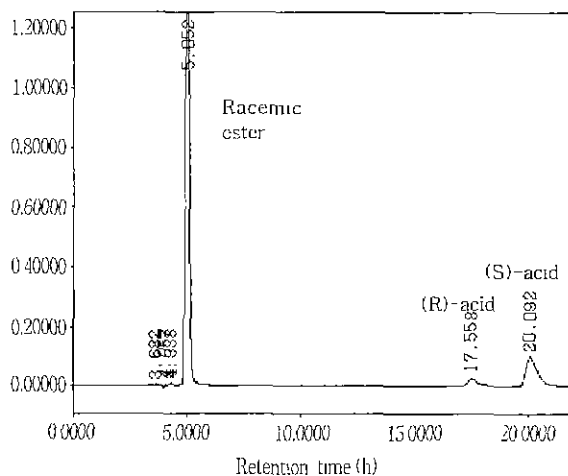


Figure 1. HPLC chromatograms of ketoprofen ethyl ester, (R)-ketoprofen, and (S)-ketoprofen analyzed by a chiral column.

$$ee = \frac{[(S) - \text{ketoprofen}] - [(R) - \text{ketoprofen}]}{[(S) - \text{ketoprofen}] + [(R) - \text{ketoprofen}]}$$

$$E = \frac{(S) - \text{ketoprofen의 생성속도}}{(R) - \text{ketoprofen의 생성속도}} = \frac{\ln[1 - c(1 + ee)]}{\ln[1 - c(1 - ee)]}$$

c conversion

Lipase 활성

pH-stat 방법에 의해 lipase 활성을 분석하였다. 20ml의 Tris-HCl 완충용액(1mM, pH 7.2)과 0.2ml의 tributyrin 혼합액에 일정량의 효소를 첨가한 후 30°C에서 15분동안 교반하면서 pH 7.0이 유지되도록 10mM의 NaOH 용액을 주입하였다 분당 1μmole의 NaOH가 첨가되는 효소의 활성을 1 unit로 정의하였다

결과 및 토론

반응기질 및 반응매질의 영향

효소 반응 매질의 선택은 최근에 와서 매우 흥미로운 연구 대상이 되고 있다. 효소반응이 수용액에서 일어난다는 사실이 일반적인 개념이었으나 유기용매내에서도 다양한 촉매활성을 보이는 사실이 보고되고 있으며 새로운 효소의 산업적 응용이 개척되어 가고 있다(7, 8). 유기용매를 반응매질로 사용할 경우 주로 기질의 용해도를 높일 수 있고 합성 반응이 유리하다는 장점이 있다. 본 연구에서는 ketoprofen에 대한 광학선택적 반응을 유도하기 위하여 수용액에서의 가수분해 반응, 유기용매에서의 가수분해 반응, 수용액에서의 에스테르화 반응을 비교하여 보았다. Table 1에서 정리한 바와 같이, 유기용매 내에서의 반응은 수용액에 비하여 (R)-형태에 대해 선택성이 높은 것으로 나타나고 있다. 이는 유사한 비스테로이드계 소염진통제인 ibuprofen의 광학분할 반응과는 상이한 결과이다. 즉 ibuprofen 또는 ibuprofen ester를 기질로 사용할 경우에는 유기용매나 수용액에 상관없이 (S)-형태에 대해 광학선택성이 있는 것으로 보고되고 있다(3, 9). 유기용매가 효소반응의 광학선택성에 영향을 준다는 많은 연구 결과들이 있으나 아직 그 이유에 대해 정확하게 규명된 바는 없으며, 본 연구에서도 이에 대한 정확한 이유를 밝히지는 못하였다. (S)-ketoprofen의 생산을 목적으로 할 경우에는 유기용매의 사용이 적합하지 않은 것으로 나타나고 있다. 따라서 이후의 실험에서는 (S)-ketoprofen에 대해 광학선택성이 있는 수용액에서의 효소반응에 초점을 두고 광학선택적 반응을 시도하였다.

온도와 pH의 영향

Table 1의 결과에서 나타난 바와 같이, 수용액에서의 가수분해 반응에 의해 ee값이 약 0.7인 것으로 나타나고 있다. 효소적 분할 공정이 산업적 응용성을 가지기 위해서는 ee값이 0.95 이상은 유지되어야 하므로 광학선택성이 높은 효소반응조건을 탐색하는 작업이 가장 필요한 것으로 여겨진다. 먼저 광학선택성에 대한 온도와 pH의 영향을 조사하였으며 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. 조사한 범위 내에서 37°C가 높은 광학선택성을 보였으며, pH가 낮아질수록 높은 선택성을 보인다는 사실을 알 수 있었다. 온도효과에 대한 결과는 ibuprofen의 광학분할 반응에서의 유사한 것으로 나타나고 있다(3) 그러나 ibuprofen의 경우 37°C에서 E값이 38이었던 점에 비하면 ketoprofen의 경우 9 정도로 여전히 만족스럽지 못한 결과를 보여준다. 따라서 반응 선택성을 높이기 위한 다른 방법들을 모색하였다.

Table 1. Effect of reaction media and substrate types on the enantioselectivity and activity of lipase OF-catalyzed hydrolysis of ketoprofen ester and esterification of ketoprofen.

Reaction	Substrate	Media	c	ee	E
Hydrolysis in organic media ¹	Methyl ester	Isopropyl ether	0.16	-0.73	0.14
	Methyl ester	Isopropyl ether(0.03)	0.18	-0.47	0.43
	Methyl ester	Isopropyl ether(0.06)	0.14	-0.37	0.43
	Methyl ester	Cyclohexane(0.06)	0.067	0.23	1.62
Esterification in organic media ²	Ethanol	Isopropyl ether	0.063	-0.46	0.36
	Ethanol	Cyclohexane	0.25	-0.29	0.50
	Propanol	Cyclohexane	0.23	-0.48	0.31
	i-Propanol	Cyclohexane	0.058	-0.20	0.66
	Butanol	Cyclohexane	0.12	-0.35	0.46
Hydrolysis in aqueous buffer ³	Ethyl ester	Acetate(pH5.0)	0.28	0.70	7.4
	Ethyl ester	Phosphate(pH7.0)	0.18	0.65	5.4
	Ethyl ester	Tris(pH7.0)	0.16	0.68	6.0
	Ethyl ester	Acetate(pH5.0)	0.20	0.71	7.0

¹ 25 mg lipase/ml, 50 mM ester, 30 °C, 150 rpm, 팔호값은 수분첨가량(mL)

² 25 mg lipase/mL, 50 mM Ketoprofen, 300 mM ethanol

³ 25 mg lipase/mL, 300 mM ester, 200rpm, 37 °C, 50 mM buffer

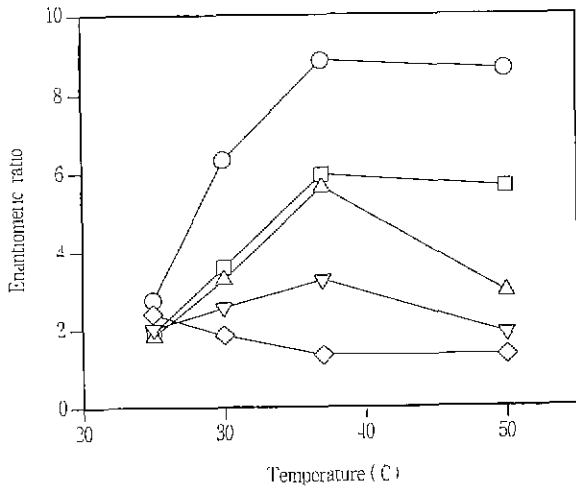


Figure 2. Effects of temperature and pH on the enantiomeric ratio of the enzymatic hydrolysis. 50mM acetate buffer was used for the reactions at pH 4 and 5, and 50mM phosphate buffer was used for those at pH 6, 7, and 8. ○, pH 4; □, pH 5; △, pH 6; ▽, pH 7; ◇, pH 8.

첨가제의 영향

첨가제가 효소의 선택성을 변화시킨다는 많은 보고가 있으며 (3, 10), 이러한 첨가제들은 효소에 직접적으로 영향을 미치거나 기질의 거동에 영향을 준다고 여겨진다(11) 첨가제가 효소의 선택성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 다양한 수용성 (water-miscible) 유기용매, 비수용성(water-immiscible) 유기용매, polyalcohol류 등을 첨가제로 하여 반응선택성 및 반응전환율의 변화정도를 조사하였다. Table 2에서 나타난 바와 같이 광학선택성을 증가시키는 첨가제는 ethylene glycol과 같은

dialcohol류인 것으로 나타났으며, 반대로 메탄올과 같은 모든 유기용매의 첨가에 의해서 반응선택성이 감소하였다. 한 가지 흥미로운 사실은 chloroform과 같은 할로젠족 유기용매의 첨가에 의해 (R)-형태의 케토프로펜에 대해 반응선택성이 더 높게 나타난다는 것이다. 비수계(nonaqueous) 효소반응에서 사용한 유기용매의 종류에 따라 반응선택성이 크게 변하여, 심지어 광학선택성이 반대로 나타난다는 결과를 Tawaki 등이 보고한 바 있다(12). 그러나 본 연구 결과는 5%(v/v) 정도의 비교적 적은 양의 첨가에 의해서도 반응선택성이 역전되이질 수 있다는 매우 흥미로운 사실을 보여주고 있다.

(S)-ketoprofen에 대한 반응선택성을 증가시킨 첨가제 중의 하나인 ethylene glycol의 첨가량을 증가시키면서 반응성을 조사하여 보았다. Figure 3에 나타난 바와 같이 ethylene glycol의 첨가량이 증가함에 따라 반응전환율은 감소하였으나 광학선택성은 증가하는 것으로 나타나고 있다. Ethylene glycol을 40% 첨가한 경우 ee 0.9 정도로 상대적으로 매우 높은 광학순도를 지닌 (S)-ketoprofen을 얻을 수 있었다.

음이온 크로마토그래피법에 의한 부분정제

정제되지 않은 *candida rugosa* 유래의 리파제는 음이온 크로마토그래피법에 의해 2 또는 3종류의 성질이 다른 리파제로 분류되는 것으로 보고되고 있다(13-15). 이렇게 분리된 효소들이 각각 ketoprofen 분할 반응에 어떤 선택성을 보이는지 조사하기 위해 효소를 음이온 교환수지로 정제하였다. Q-Sepharose resin을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피 결과 lipase가 A 형태와 B형태로 분리되었다(Figure 4).

정제된 lipase를 이용하여 ketoprofen ethyl ester를 가수분해 반응시킨 결과 A형태가 0.38의 전환율, >100의 반응선택도(E)를 보여주어 (S)-케토프로펜 생산에 적합한 효소임을 알 수 있었다 (Table 3). 반면 B 형태는 conversion 0.22, E 9.0 정도로 낮은 반응전환율 및 반응선택도를 보여주고 있다. 그러나 Figure 4의 크

Table 2. Effect of additives on the enantioselectivity and activity of Lipase OF -catalyzed hydrolysis of ketoprofen ethylester.

Additive ¹	Relative E	Relative conversion	Additive	Relative E	Relative conversion
No additive (control)	1.0	1.0	1,4-Dioxane	0.73	0.18
Methanol	0.50	0.35	Acetone	0.22	0.36
Ethanol	0.29	0.27	1,4-Dioxane	0.73	0.18
i-Propanol	0.28	0.32	Ethyl acetate	0.54	0.38
Butanol	0.31	0.056	1,2-Dichloroethane	0.049	0.19
1,2-Propanediol	1.31	0.92	Chloroform	0.023	0.15
1,3-Propanediol	1.42	0.80	Carbontetrachloride	0.31	0.43
1,4-Butanediol	1.62	0.85	Benzene	0.20	0.34
Dextran	1.01	1.02	Toluene	0.14	0.29
Methoxy ethanol	0.96	0.59	Xylene	0.25	0.35
Ethoxy ethanol	0.61	0.56	Hexane	0.82	0.95

¹ Each additive was added to 5 % (v/v)

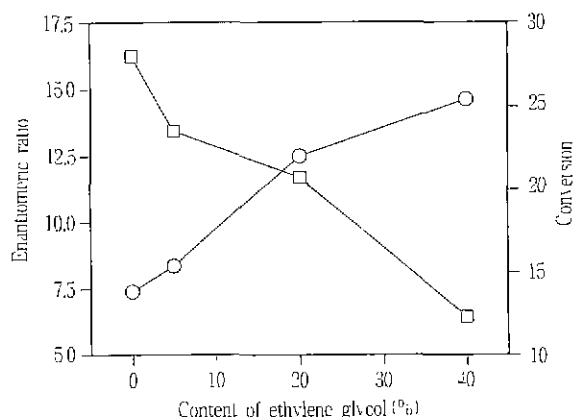


Figure 3 Dependence of the enantioselectivity and activity on the content of ethylene glycol; ○, Enantiomeric ratio; □, Conversion.

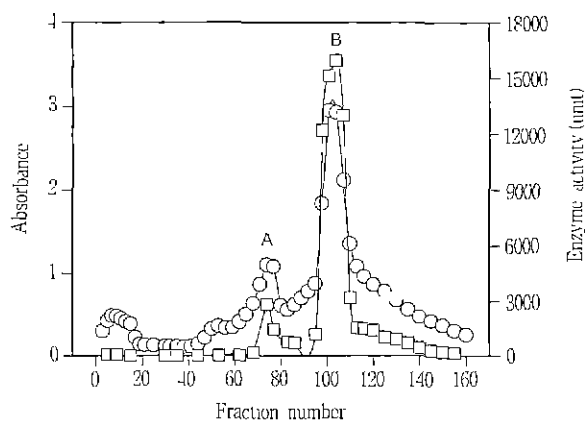


Figure 4. Purification of lipase of by anion-exchange chromatography using Q-sepharose; ○, Absorbance; □, Enzyme activity.

Table 3. Comparison of the activity and stereoselectivity of crude, A-type, and B-type Lipase OF for the hydrolysis of racemic ketoprofen ethylester.

Enzyme	conversion	ee	E
Crude	0.38	0.65	6.9
A type	0.38	>0.99	>100
B type	0.22	0.76	9.0

로마토그램에 나타나는 바와 같이 반응선택성이 좋은 A 형태의 효소의 정제 수율이 B 형태에 비해 매우 적은 문제점이 있다. 이 문제를 해결하기 위한 연구를 현재 계속 수행중에 있다.

요 약

본 연구에서는 광학적으로 순수한 S-(+)-ketoprofen을 얻기 위한 효소적 분할공정을 개발하는 것을 그 내용으로 하고 있다. 결과에 의하면 *Candida rugosa* 유래의 lipase는 음이온 교환 수지에 의해 두 가지 형태의 효소로 분리되었으며 특히 첫번째 peak의 lipase가 (S)-enantiomer에 대해 선택성이 매우 높은 것으로 나타났다. 온도, pH, 첨가제의 영향에 대해서 조사한 결과 높은 활성을 유지하면서 광학적으로 순수한 (S)-ketoprofen을 얻는 조건을 찾지는 못하였으나, 37°C의 온도에서 선택성이 높았으며 ethylene glycol과 같은 polyalcohol 종류가 첨가될 경우 선택성이 증가한다는 결과를 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 국책 생명공학 기술개발 사업의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참 고 문 헌

1. Mauleon, D., R. Artigas, M. L. Garcia, and G. Carganico (1996), Preclinical and Clinical Development of Dexketoprofen, *Drugs*, **52**, 24-46.
2. Sheldon, R. A. (1996), Chirotechnology Designing Economic Chiral Syntheses. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **67**, 1-14.
3. Lee, W. H., K-J. Kim, M. G. Kim, and S. B. Lee (1995), Enzymatic Resolution of Racemic Ibuprofen Esters: Effect of Organic Cosolvents and Temperature. *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 613-615
4. Wu, S-H, Z-W. Guo, and C. J. Sih (1990), Enhancing the Enantioselectivity of *Candida* Lipase Catalyzed Ester Hydrolysis via Noncovalent Enzyme Modification. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1990-1995.
5. Colton, I. J., S. N. Ahmed, and R. J. Kazlauskas (1995), A 2-Propanol Treatment Increases the Enantioselectivity of *Candida rugosa* Lipase toward Esters of Chiral Carboxylic Acids. *J. Org. Chem.*, **60**, 211-217.
6. Chen, C.-S., Y. Fujimoto, G. Girdaukas, and C. J. Sih (1982), Quantitative Analysis of Biochemical Kinetic Resolutions of Enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294-7299.
7. Klivanov, A. M. (1986), Enzymes that Work in Organic Solvents. *Chemtech*, **16**, 354-359.
8. Dordick, J. S. (1989). Enzyme Catalysis in Monobasic Organic Solvents. *Enzyme Microb. Biotechnol.*, **11**, 194-211.
9. 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**, 269-271.
10. Faber, K. (1993), Selectivity-Enhancement of Hydrolase Reactions. *Biocatalysis*, **8**, 91-132.
11. Kim, M. G. and S. B. Lee (1996), Effect of Organic Solvent on Penicillin Acylase-Catalyzed Reactions: Interaction of Organic Solvents with Enzymes. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **1**, 181-190
12. Tawaki, S. and A. M. Klivanov (1991), Inversion of Enzyme Enantioselectivity Mediated by the Solvent, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1882-1884.
13. Linko, Y-Y. and X. Y. Wu (1996), Biocatalytic Production of Useful Esters by Two Forms of Lipase from *Candida Rugosa*, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **65**, 163-170.
14. Shaw, J. F. and C. H. Chang (1989). Characterization of Three Distinct Forms of Lipolytic Enzyme in a Commercial *Candida* Lipase Preparation. *Biotechnol. Lett.*, **11**, 779-784.
15. Veeragavan K. and B. F. Gibbs (1989), Detection and Partial Purification of Two Lipases from *Candida Rugosa*, *Biotechnol. Lett.*, **11**, 345-348.