

## 2단계 아세톤 침전법으로부터 얻어진 *Candida rugosa* Lipase를 이용한 (R,S)-Naproxen Methyl Ester의 광학선택성 수화반응

이은교 · 최순자 · 정봉현\*  
미생물공정 연구실, 생명공학연구소

**Enantioselective Hydrolysis of (R,S)-Naproxen Methyl Ester Using Two-Step Acetone-treated *Candida rugosa* Lipase.** Lee, Eun Gyo, Soon Ja Choi, and Bong Hyun Chung. *Microbial & Bioprocess Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusung Taejeon, Korea* – A novel two-step acetone treatment method was developed to enhance the enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase (CRL) toward the hydrolysis of racemic naproxen methyl ester. The acetone-treated CRL was considerably more enantioselective than the crude CRL, yielding an enantiomeric excess of 98~100%. The crude and acetone-treated CRLs were subjected to anion exchange chromatography, and their chromatography profiles were compared. In consequence, both chromatography profiles were found to be almost identical, resulting in two separate lipase peaks (lipase A and B). The lipase B, which is known to be less enantioselective, was treated with acetone using a two-step treatment method. The enantioselectivity of acetone-treated lipase B was dramatically increased, yielding an enantiomeric excess of 99 %.

**Key words:** *Candida rugosa* lipase (CRL), (S)-naproxen, (R,S)-naproxen methyl ester, two-step acetone treatment

화학합성에 의해 생산되는 많은 의약품들은 두가지 거울상 이성질체(chantioner)가 혼합된 라세믹(racemate) 형태이다. 이런 라세믹 화합물중에서 대부분의 경우 한 종류의 광학이성질체만이 약리 활성을 나타내며 나머지는 활성이 없거나 부작용을 일으키기도 한다[8]. 그러므로, 의약품 산업에서 단일 거울상 이성질체의 생산은 안전성뿐 아니라 활성증가라는 측면에서 그 중요성이 강조되어지고 있다. 최근 의약품 산업의 추세는 기존의 라세믹 의약품을 약리 활성이 뛰어난 단일 거울상 이성질체로 전환시키는 것이며 앞으로 새롭게 개발될 의약품 역시 순수한 형태만을 생산하는 것이다.

Naproxen (2-(6-methoxy 2-naphthyl)propionic acid)은 비스테로이드계 소염진통제(non-steroidal anti-inflammatory drugs)에 속하며, 생체내 프로스타글란딘(prostaglandin) 축매의 활성을 감소시킴으로써 통증을 완화시키는 작용을 한다[5]. Naproxen과 같은 프로펜류 의약품은 키랄 중심의 한편에 벤젠고리가 다른 한편에는 메틸기 및 카르복실기가 있는 것이 특징이며 그 예로 naproxen 외에 ibuprofen, ketoprofen, phenoprofen, suprofen 등이 있다. Naproxen의 약리작용은 대부분 (S)-naproxen에 의한 것으로 (R)-naproxen은 약리활성이 없는 것으로 알려져 있다[4,9]. 따라

서, 순수한 거울상이성질체의 naproxen을 얻기 위한 여러 방법들이 연구되었는데, 순수한 거울상 이성질체를 얻는 방법으로서 많이 사용되는 것이 diastereomeric crystallization 과 kinetic resolution이다. Diastereomeric crystallization은 라세믹 물질과 키랄성을 갖는 물질을 반응시켜 diastereomer 유도체를 합성하여 분리하는 방법이고 kinetic resolution은 효소 또는 화학촉매의 높은 광학선택성을 이용하여 한가지 물질만을 촉매반응을 통해 분리해 내는 방법이다[11]. 영국의 Syntex사에서는 화학적으로 라세메이트로 합성한 후 diastereomer 분할에 의해 (S)-naproxen을 합성하고 있다. Syntex 공정의 문제점은 광학분할 후 사용된 고가의 N-methyl-D-glucamine을 침전법이나 음이온교환 수지를 사용하여 회수하여야 하며 독성의 화학물질이 많이 쓰이고 있어 이를 대체할 필요성이 있다[1]. 라세믹 화합물을 이용하여 한가지 거울상이성질체를 분리하는 방법으로서 효소를 사용한 방법이 많이 연구되는 이유는 화학촉매보다 뛰어난 광학 선택성과 반응조건의 온화함 때문이다. 또한, 효소는 기질특이성이 넓어 비슷한 종류의 물질에도 폭넓은 응용이 가능하다는 장점을 가지고 있다.

본 연구에서는 *Candida rugosa* 유래의 리파제의 활성 및 광학선택성 증진을 위해 2단계 아세톤 침전법을 개발하였고, 이를 (S)-naproxen의 광학분할에 응용하였다. 또한, 음이온교환 크로마토그래피를 이용하여 분리된 isoenzyme을 이용하여, 아세톤 침전법이 효소의 광학선택성에 미치는 영향을 살펴 보았다.

\*Corresponding author  
Tel 042-860-4442, Fax. 042-860-4594  
E-mail. chungbh@mail.kribb.re.kr

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 효소는 *Candida rugosa* Lipase-OF (Meito Sangyo Co., Japan)였고, (S)-naproxen 및 기타 시약 등은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 사용된 에탄올 및 아세톤은 Merck Co. (Germany)에서 구입하였고, 메탄올은 덕산화학(Korea)에서 구입하였다.

### 효소의 아세톤 처리법

리파제 효소(8 g)를 50 mM 2-[N-morpholino] ethane-sulfonic acid (MES, pH 6.0, 40 ml) 완충용액에 넣고 4°C에서 1시간 동안 녹였다. 효소 용액을 원심분리(12,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 상등액(35 mL)을 분리하였고, 상등액에 아세톤(17.5 ml, 50%v/v)을 천천히 첨가하면서 리파제의 침전을 유도하였다. 침전된 불순물(AF-1)을 원심분리(6,000 rpm, 20 min, 4°C)를 이용하여 분리한 후, 다시 상등액에 17.5 ml의 아세톤(50%v/v)을 첨가하여 두번째 아세톤 침전물(AF-2)을 얻었다. 각 침전물은 동결건조하여 냉장보관하였다.

### 음이온교환 크로마토그래피법에 의한 리파제의 정제

리파제 효소 수용액에 30% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 천천히 첨가하면서 교반시킨 후 원심분리를 통하여 침전물을 제거하고, 그 상등액에 다시 65% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 충분히 교반한 후 침전된 단백질을 회수하였다. 회수한 단백질을 완충용액에 용해시키고 확산투석을 사용하여 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 제거하였으며, 원심분리하여 얻은 상등액으로 음이온교환 크로마토그래피를 수행하였다. 10 × 150 mm glass column (Amicon Co., USA)에 5 mL Q-Sepharose XL (Pharmacia, Sweden)을 충전하였고, 25 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)를 사용하여 컬럼을 평형화하였다. 용출은 0~0.5 M NaCl의 선형농도구배를 이용하였고, 유속은 1 ml/min로 하였다.

### Naproxen methyl ester 합성

Naproxen은 (S)-형태와 나트륨염 형태가 시판되고 있으므로 효소반응기질로 이용하기 위해서 라세미화 반응 후 에스테르화 반응을 수행하여야 한다. Na-naproxen 10 g에 1.2 M HCl 수용액을 40 ml 첨가하여 침전물을 회수하고, 그 침전물에 증류수를 넣어 세척한 후 40~50°C에서 건조하였다. 건조된 분말을 순수 메탄올에 용해한 후 라세미화 반응이 50:50으로 잘 이루어졌는지 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 확인하였다. 확인된 (R,S)-naproxen (10 g)에 메탄올 (30 ml)과 황산 (0.8 ml)을 넣어 reflux condenser가 장착된 수조에서 5시간 이상 반응시킨 후, 미반응 메탄올은 증류기를 이용하여 제거하였다. 회수된 naproxen ester는 NaHCO<sub>3</sub> (1 M, 40 ml)로 3회 세척 후

동결건조하여 상온에서 고체상태인 에스테르 형태의 naproxen 반응물을 얻을 수 있었다. HPLC를 이용하여 생성물이 rac-naproxen methyl ester임을 확인하였다.

### Naproxen methyl ester의 수화반응

리파제를 이용한 효소반응은 수화반응으로서 2 ml microtube를 이용하였고, 반응액 부피는 1 ml이었다. 사용된 기질은 위의 방법에서 제시된 기질합성법에 따라 생성된 naproxen methyl ester (50 mg, 고체상태)를 사용하였다. 효소반응에 사용된 효소량은 2,700 unit 였다.

광학분할 반응의 주요 지표인 반응전환율(c)과 enantiomeric excess (ee<sub>p</sub>)는 아래 식에 의해 정의되어진다.

$$c(\%) = \frac{[(S)\text{-naproxen}] - [(R)\text{-naproxen}]}{[\text{initial naproxen ester}]} \times 100$$

$$ee_p(\%) = \frac{[(S)\text{-naproxen}] - [(R)\text{-naproxen}]}{[(S)\text{-naproxen}] + [(R)\text{-naproxen}]} \times 100$$

### 효소 활성 측정

pH controller를 이용한 pH-stat방법으로 리파제 효소 활성을 측정하였다. 1 mM Tributyrin (20 ml)을 1 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)에 완전히 에멀전화 시킨 용액에 효소 (200 µL)를 첨가하여 30°C 항온조에서 10분 동안 반응시켰다. 리파제 활성은 tributyrin이 분해됨에 따라 생성되는 butyric acid를 중화하기 위해 첨가되는 10 mM 수산화나트륨의 양을 1 unit (µmole/min)로 정의하였다.

### 분석

Naproxen methyl ester 및 생성된 (S)- 또는 (R)-naproxen은 HPLC (Young-Lin M930, Korea)를 사용하여 정량하였다. 기질 및 생성물의 농도는 Chirex Phase 3005 column (Phenomenex Co. USA)을 사용하여 254 nm에서 UV detector로 분석하였다. 크로마토그래피의 이동상은 100 mM ammonium acetate가 첨가된 메탄올을 사용하였고, 유속은 1.0 ml/min로 하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad assay kit (Bradford method)을 사용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 2단계 아세톤 침전법에 의한 효소의 분획

단백질을 농축하고 부분 정제하는 방법중의 하나로 사용되는 유기용매 처리법을 이용하여 리파제의 활성과 광학선택성의 변화를 유도하는 연구가 보고되고 있다 [2,3]. 이런 유기용매 처리법에 의해 리파제의 활성 및 광학선택성이 상승하는 이유를 두가지로 들고 있는데, 그 첫 번째는 유기용매 처리에 의해 기질-효소간의 반응을 저해하고 있는 불순물이 제거되어 부반응없이 반응이 원활히 일어나기 때문이

고, 두 번째는 리파제 효소의 닫힌 구조(close lid)가 열린 구조(open lid)로 바뀜으로 인해 광학선택성의 증가가 유도된다는 것이다[3]. 여러 유기용매(에탄올, 프로판올, 아세톤 등)를 사용하여 효소를 처리한 Chamorro는 정제보다는 효소구조의 변화에서 그 이유를 찾고 있다[2].

본 연구에서는 일반적인 유기용매 처리법이 아닌 2단계 아세톤 침전법을 이용하여 CRL을 분획하였다. 이 방법이 기존의 방법과 구별되는 가장 큰 특징은 원하는 효소를 상등액에서 얻는 것이 아니라 침전물로 얻는 것이다. 기존의 방법은 불순물 제거와 동시에 효소 구조를 바꾸기 위한 방법으로 저온에서 24-46시간 동안 유기용매와 반응시켜 불순물을 침전으로 제거하고 상등액에서 구조가 변화된 효소를 얻게 되지만, 본 연구에서는 1시간 동안의 짧은 시간에 1단계 침전으로 불순물을 제거하고 보다 높은 농도의 아세톤으로 효소를 침전시켜 원하는 효소를 2차 침전물로 얻게 된다. '실험 재료 및 방법'에서 보인 방법에 의해 crude CRL을 처리한 결과를 Table 1에 보였다. AF-1은 첫 번째 단계에서 아세톤 침전으로 얻어진 분획물을 의미하고 AF-2는 두 번째 단계에서 얻어진 분획물을 의미한다. 2단계 아세톤 처리법에 의해 얻어진 CRL은 아세톤 처리를 하지 않은 효소에 비해 약 2.4배의 활성 증가를 보였다. 활성면에서 볼 때 회수율은 약 80%였고, 1단계 침전물이 차지하는 비율은 7%에 불과하였다. 2단계 아세톤 침전법의 특징은 아세톤에 의한 침전반응시간이 짧고, 분획법이 간단하다는 데 있다. 활성 회수율의 손실(약 20%)을 감안하더라도 광학선택성이 크게 증가하기 때문에 crude 효소의 개량법으로서 큰 이점을 가지는 방법이라 할 수 있다.

아세톤 처리법에 의해 얻어진 효소에 의한 naproxen methyl ester의 수화반응

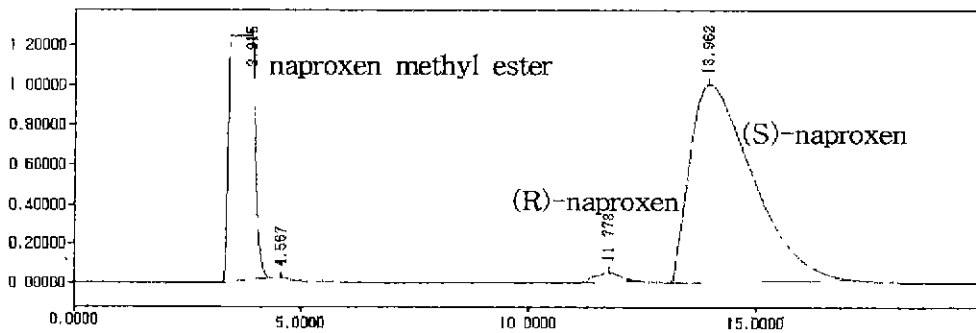


Fig. 2. HPLC chromatogram of (R, S)-naproxen produced from hydrolysis by AF-2.

Naproxen methyl ester 50 mg을 기준으로 25°C, pH 5.0의 50 mM acetate buffer에서 92시간 동안 반응을 하였고, 시간에 따른 전환율 및 광학선택성의 지표가 되는 enantiomeric excess( $ee_p$ )변화는 Fig. 1에 보였다. Fig. 2는 AF-2를 이용하여 수화반응을 한 후, 용액내의 naproxen ester 및 반응생성물에 대한 HPLC 크로마토그램을 보여준다. Fig. 2의 첫번째 피크는 기질로서 naproxen methyl ester이고 뒤의 두 피크는 차례로 생산된 (R)-naproxen과 (S)-naproxen을 나타낸다. AF-2를 효소로 사용했을 경우, 거의 대부분 (S)-형태만을 생산하는 것을 알 수 있다. Fig. 1의 실험결과를 보면, crude CRL과 AF-1은 거의 같은 경향을 보이고 AF-2는 완전히 다른 경향을 보이는 것을 알 수 있다. 특히, enantiomeric excess변화를 살펴보면 AF-1은 crude CRL보다도 낮은 결과를 보이고 AF-2는 crude

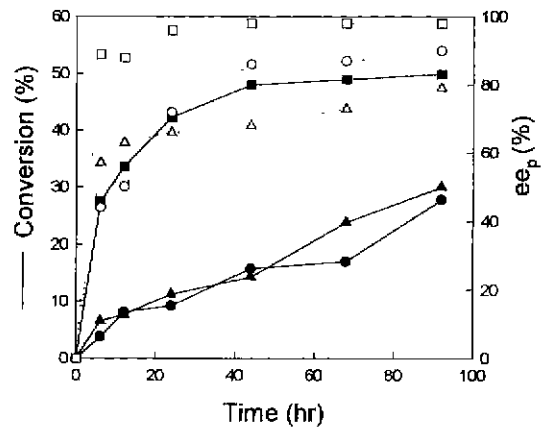


Fig. 1. Time courses of conversion and enantiomeric excess of naproxen methyl ester at 25°C. crude, ●○; AF-1, ▲△; AF-2, ■□; closed symbol, conversion; open symbol, enantiomeric excess

Table 1. Activity, recovery ratio, and enantiomeric ratio of crude and two-step acetone-treated *Candida rugosa* lipase (CRL)

Enzyme	Powder (g)	Total Protein (mg)	Total activity (kU)	Specific activity (kU/mg)	Recovery (%)	E
CRL	16.8	907.2	2118.4	2.34	100	26.6
AF-1	2.87	235.3	150.1	0.64	7.1	11.8
AF-2	3.0	300.0	1683.1	5.61	79.5	> 100

CRL보다 높은 값을 보이는 것을 알 수 있다. 이 결과만을 놓고 보면 AF-1 분획에 의해 저해 작용을 하는 불순물들이 제거되기 때문에 AF-2분획을 사용한 경우에 광학선택성이 증가한다고 추측할 수 있지만 아세톤에 의한 구조변화의 가능성을 배제할 수는 없다.

**음이온교환크로마토그래피를 이용한 아세톤 처리법에 의해 얻어진 리파제의 부분 정제**

앞의 결과에서 보았듯이 2단계 아세톤 침전법에 의해 분획된 CRL은 naproxen methyl ester의 수화반응에 있어 광학선택성이 매우 뛰어난 것을 확인하였으나 광학선택성의 증가요인을 확인하기는 힘들었다 따라서, 이를 확인하기 위하여 이온교환크로마토그래피로 isoenzyme인 리파제 A와 B를 분리하였고, 아세톤 침전처리로 분획한 AF-2를 같은 방법을 사용하여 분리하였다. 본 연구에서 리파제의 정제는

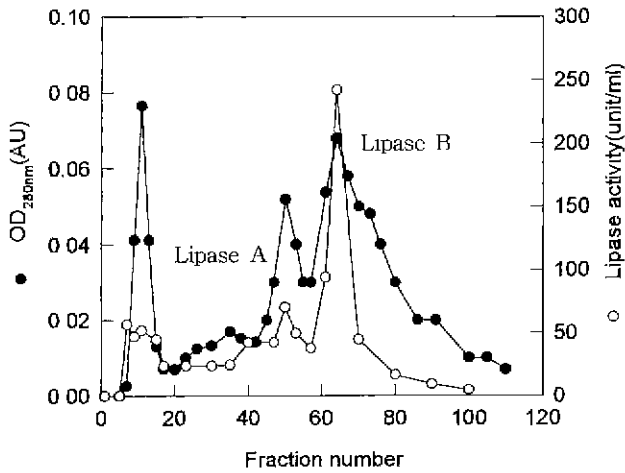


Fig. 3. Purification of acetone-treated lipase AF-2 by Q-Sepharose.

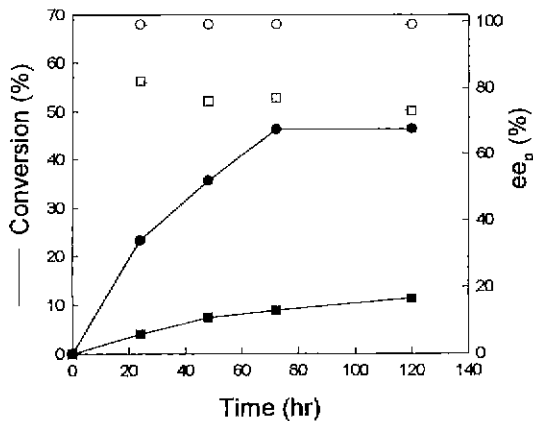


Fig. 4. Time courses of hydrolysis of naproxen methyl ester by Lipase A and Lipase B. Lipase A, ●; Lipase B, ■; closed symbol, conversion; open symbol, enantiomeric excess

김민곤 등[6]이 발표한 Q-Sepharose XL 이온교환방법을 사용하였다. Veeraragavan, Shaw, Lundell 등은 각각 Q-Sepharose와 DEAE-Sepharose CL-6B를 이용하여 서로 다른 리파제 활성(lipase activity)을 보이는 리파제 A와 B를 CRL (Sigma Chemical Co.)로부터 분리하였다[7,10,12]. 본 결과는 활성 및 광학선택성면에서 리파제 A가 B보다 우수하였고, 이는 Veeraragavan의 결과와 비슷하였다. 음이온교환 크로마토그래피를 이용한 CRL의 isoenzyme분리방법을 2단계 아세톤처리법에 의해 얻어진 분획, AF-2에 똑같이 적용하였고, 그 결과를 CRL 크로마토그램과 비교하였다. Fig. 3에서 볼 수 있는 바와 같이 AF-2의 크로마토그램 형태는 crude 리파제와 비슷하게 리파제 A와 B가 함께 공존하고 있음을 알 수 있었다. 이 결과는 아세톤 처리법이 리파제 A와 B를 분리하여 광학활성이 뛰어난 부분만을 추출하는 방법이 아니라는 것을 의미하며, 따라서 아세톤 처리에 의한 효소의 광학선택성 개선은 앞 절에서 살펴본 바와 같이 불순물의 제거로 인한 정제효과와 효소의 구조변화에 기인하는 것으로 추측할 수 있다

**음이온 크로마토그래피에 의한 리파제 A와 B의 분획 및 리파제 B의 아세톤 처리**

광학선택성의 증가 원인을 효소 구조변화에 의한 것임을 확인하기 위하여 분리된 isoenzyme중에서 리파제 B분획을 이용하여 아세톤 침전법에 의한 광학선택성 증가유무를 살펴 보았다. Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 리파제 B보다는 리파제 A가 활성 및 광학선택성면에서 뛰어난 것을 확인할 수 있었고, 광학활성이 뛰어난 리파제 A를 제외하고 리파제 B부분만을 정제하여 동결건조하였다. 리파제 B만을 2단계 아세톤 침전법으로 분획하여 리파제 B-AF1과 리파제 B-AF2를 얻었고, 이를 naproxen methyl ester의 수화반응에

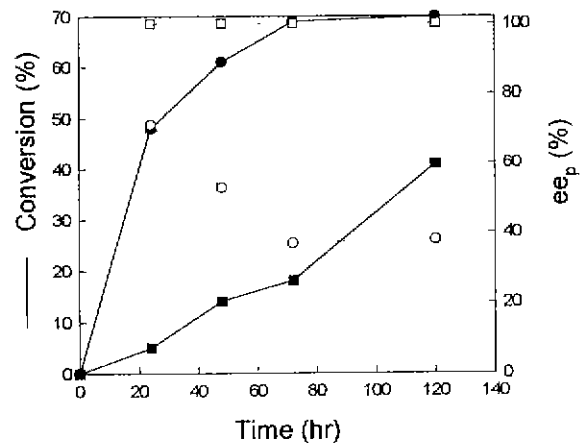


Fig. 5. Time courses of hydrolysis of naproxen methyl ester by LipaseB-F1 and LipaseB-F2. LipB-AF1, ●; LipB-AF2, ■, closed symbol, conversion; open symbol, enantiomeric excess

이용하였다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 활성면에서는 Lipase B-AF1이 보다 큰 값을 보였으나 광학선택성면에서는 리파제 B-AF2가 월등히 뛰어남을 알 수 있다. 이 결과를 볼 때, 활성 및 광학선택성면에서 상대적으로 성능이 떨어지는 리파제 B가 아세톤 침전법에 의해 광학선택성이 증가할 수 있다는 것을 확인할 수 있었고, 이는 곧 아세톤 침전법이 효소의 구조를 바꾸는데 기여한다는 것을 보여주는 결과이다.

## 요 약

*Candida rugosa* 유래 리파제의 광학선택성 증진을 위해 2단계 아세톤 침전법을 개발하였고, 이를 (S)-naproxen의 광학분할에 응용하였다. 2단계 아세톤 처리법에 의해 얻어진 CRL은 아세톤 처리를 하지 않은 효소에 비해 약 2.4배의 활성 증가를 보였고, (R,S)-naproxen methyl ester를 기질로 사용하였을 경우 98%의 enantiomeric excess를 보였다. 2단계 아세톤 침전법으로 얻은 두 번째 분획인 AF-2의 크로마토그램 형태는 crude lipase와 거의 비슷하였고, isoenzyme인 리파제 A와 B가 함께 공존하고 있음을 확인하였다. 광학활성능력이 상대적으로 떨어지는 리파제 B부분만을 2단계 아세톤 침전법으로 분획하여 리파제 B-AF1과 리파제 B-AF2를 얻었고, 이를 naproxen methyl ester의 수화반응에 이용하였다. 그 결과 아세톤 처리후 리파제 B (리파제 B-AF2)의 광학선택성이 급격히 증가하는 것이 확인되었다.

## REFERENCES

- Battistel, E., D. Bianchi, P. Cesti, and C. Pina. 1991. Enzymatic resolution of (S)-(+)-naproxen in a continuous reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 659-664.
- Chamorro, S., J. M. Sanchez-Montero, A. R. Alcántara, and J. V. Sinisterra. 1998. Treatment of *Candida rugosa* lipase with short-chain polar organic solvents enhances its hydrolytic and synthetic activities. *Biotechnol. Lett.* **20**: 499-505.
- 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**: 212-217.
- Giordano, C. and G. Castaldi. 1990. A Stereoconvergent strategy for the synthesis of enantiomerically pure (R)-(-) and (S)-(+)-2-(6-methoxy-2-naphthyl)-propionic acid (naproxen). *Tetrahedron.* **45**: 4243-4252.
- Hayball, P. J. 1996. Chirality and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs.* **52**: 47-58.
- Kim, M. G., S. J. Choi, W. A. Choi, C. H. Kim, and B. H. Chung. 1999. *Candida rugosa* lipase-catalyzed production of optically pure S-(+)-ketoprofen. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**: 225-229.
- Lundell, K., T. Rajjola, and L. T. Kanerva. 1998. Enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida rugosa* lipases for the resolution of secondary alcohols: The effect of *Candida rugosa* isoenzymes. *Enz. Microb. Technol.* **22**: 86-93.
- Margolin, A. L. 1993. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enz. Microb. Technol.* **15**: 266-280.
- Mauleon, D., R. Artigas, M. L. Garcia, and G. Carganico. 1996. Preclinical and clinical development of *dexketoprofen*. *Drugs.* **52**: 24-46.
- Shaw, J. F. and C. H. Chang. 1989. Characterization of three distinct forms of lipolytic enzyme in a commercial *Candida rugosa* lipase preparation. *Biotechnol. Lett.* **11**: 779-784.
- Sheldon, R. A. 1996. Chirotechnology: Designing economic chiral syntheses. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **67**: 1-14.
- Veeraragavan, K. and B. F. Gibbs. 1989. Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnol. Letts.* **11**: 345-348.
- 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.

(Received April 4, 2000)