

## D(-)- $\beta$ -hydroxyisobutyric acid의 생산균주 개량 연구

백승우, 김 남기, 성 동호\*, 백 우현\*  
성균관대학교 화학공학과, 보령제약(주) 종합연구소\*

### A study of strain development for production of D(-)- $\beta$ -hydroxyisobutyric acid

S.W. Baek, N.K. Kim, D.H. Seong\*, W.H. Paik\*  
Department of Chemical Engineering Sung Kyun Kwan University  
\* Boryung Central Research Institute

## 서론

최근 FDA는 “의약품의 chirality가 생물학적 활성에 미치는 특성에 따라 chiral 약품의 판매를 결정하겠다”라는 정책을 발표하였다.<sup>1</sup> 이와 같은 정책의 배경은 첫째, 대개 특정한 생물학적 활성이 한 가지의 enantiomer와만 나타나기 때문이고, 둘째로는 두 가지의 enantiomer 중 하나는 유용한 반면에 다른 하나는 인체에 해로운 특성을 나타내는 것처럼 두 enantiomer가 서로 전혀 다른 활성을 가지고 있는 경우가 있기 때문이다.

그럼에도 불구하고, 현재 세계시장에 유통되고 있는 약 500여종의 합성 chiral 의약품 중에서 무려 90% 정도가 racemate로서 시판되고 있다. 그러나 FDA가 인체의 안전성 문제로 enantiomer 중에서 의학적으로 효능이 있고, 무독한 단일 enantiomer만을 사용한 광학활성 의약품의 생산을 권장하고 있으므로 2000년대에는 약 80%의 chiral 의약품이 단일 enantiomer로 판매되리라 전망된다.

광학활성 의약품의 생산을 위해 화학 합성법을 사용할 경우 racemate 형태로 만들어지기 때문에 이로부터 유용한 단일 enantiomer만을 분리하는 데에 수율이 50%이하로 낮을 뿐만 아니라 고가의 시약이 요구되기 때문에 비경제적이다. 따라서, 생체촉매를 이용한 광학활성 물질의 생산이 각광을 받고 있다.

10대 광학활성 의약품의 매출액을 보면 이미 1993년의 경우 100억 달러를 상회하고 있다.<sup>2</sup> 이러한 광학활성 의약품의 생산을 위해 사용되고 있는 대표적인 광학활성 원료 물질로는 amino acids, hydroxycarboxylic acids, carbohydrates, terpenes, alkaloids 등이 있다. 이들 중에 D(-)- $\beta$ -hydroxyisobutyric acid (D-HIBA)는 경구용 혈압강하제인 captopril과  $\alpha$ -tocopherol 및 erythromycin A의 합성 등에 유용한 원료로 알려져 있다. 이 중에서 현재 고혈압 치료제로써 시장 점유율이 가장 높은 의약품인 ACE (angiotensin converting enzyme) 저해제 captopril (화학명: N-(3-Mercapto-2-D-methylpropanoyl)-L-proline)의 경우 1977년 미국 Squibb사가 개발한 이래 세계 의약품 시장에서 1992년 매출액기준 \$1,655,000,000으로 3위를 차지하고 있는 대형의약품이다.(신약뉴스, vol 3, No 1, 1995)

일반적으로 광학활성을 가지고 있는 hydroxycarboxylic acid는 화학적 방법으로 합성하는 것보다 미생물 또는 효소를 이용하는 bio-conversion으로 생산하는 것이 유리한 것으로 알려져 있다. hydroxyisobutyric acid (HIBA)의 경우에도

화학적인 방법으로 formaldehyde와 ethyl  $\alpha$ -bromopropionate로부터 생산하는 방법이 알려져 있으나 이렇게 얻은 HIBA는 racemate형으로 분리공정이 복잡하여 경제적으로 아주 불리하다. 미생물을 이용하여 HIBA를 생산하기 위한 연구는 Goodhue (1971) 등의<sup>3</sup> *Pseudomonas putida*를 이용한 isobutyric acid (IBA)로부터 L(+)-HIBA의 생산 연구를 시발로 하여 Aberhart (1977) 등은<sup>4</sup> 입체 화학적인 관점에서 IBA 및 methacrylic acid로부터 L(+)-HIBA의 생산에 관한 연구를 수행하였고, Ohta (1979) 등은<sup>5</sup> *Gluconobacter roseus*를 사용하여 2-methyl-1,3- propanediol로부터 수율 47%의 D-HIBA의 생산을 보고한 바 있으나 산업화하기에는 미흡하였다.

1980년대 초 일본 Kanegafuchi사는<sup>6</sup> *Candida rugosa*을 사용하여 IBA로부터 고순도의 D-HIBA를 제조하는 방법을 개발하여 산업화하였으며, Squibb사에 독점 공급하는 것으로 알려지고 있다.

*Candida rugosa*을 이용하여 IBA로부터 D-HIBA 생산시 가장 큰 문제점은 생성된 D-HIBA가 계속해서 분해되어 IBA에서부터의 전환수율이 낮고, 최종 D-HIBA의 축적량이 적다는 것이다. 본 연구에서는 전환수율을 높이고, 최종 D-HIBA의 축적량을 높이기 위해 D-HIBA의 분해능을 상실한 *Candida rugosa*의 변이균주를 UV변이조작을 통하여 얻고자 한다.

## 실 험

### 1. 균주

본 연구에서는 D-HIBA를 생산하는 것으로 알려진 공지의 균주를 한국종균협회(KCCM)로부터 분양 받아 D-HIBA생성능을 검토한 후 그 중 우수한 *Candida rugosa* KCCM 35430 (=IFO 0750)을 연구균주로 선정하여 연구를 진행하였다.

### 2. 배지 및 시약

균주보존을 위한 배지로는 Yeast extract malt extract agar (YM Agar)를 사용하였으며, 종배양배지로는 YM broth를 사용하였다. 분석을 위하여 사용한 시약은 시약 1급을 사용하였으며, 사용한 배지조성은 다음 Table과 같다.

CM Medium ( g/L )	
Glucose	20
Yeast extract	5
beaf extract	10
Peptone	10
Agar	20
1 L D.W., pH 7.0	

G I Medium ( g/L )	
Glucose	40
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7
Yeast extract	3
NaCl	0.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.8
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.06
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.09
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.05
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.01
1 L D.W., pH 7.2	

GII Medium ( g/L )	
Glucose	40
Agar	20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7
Yeast extract	3
NaCl	0.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.8
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.06
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.09
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.05
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.01
Biotin	1mg
Thiamine · HCl	2mg
1 L D.W., pH 7.2	

PA Medium ( g/L )	
Agar	20
Propionic Acid	10
NaOH	5.4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7
Yeast extract	3
NaCl	0.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.8
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.06
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.09
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.05
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.01
Biotin	1mg
Thiamine · HCl	2mg
1 L D.W., pH 7.2	

### 3. UV mutation

UV mutation 방법은 YM slant에 보존 중인 *Candida rugosa* KCCM 35430을 1 loop 떠서 10ml의 GI medium을 포함하는 250ml 삼각플라스크에 접종하여 30℃, 350rpm으로 1일간 회전진탕배양한다. 2ml 배양액을 15000rpm으로 5분간 원심분리시킨다. 원심분리 후 상등액은 제거하고 균체를 saline으로 세척한 다음 다시 saline에 현탁시킨 후 30W, 30cm에서 4분간 UV 조사를 시킨다. 이를 다시 saline으로 단계 희석시킨 후 CM medium에 도말하고, 30℃로 3일간 배양시킨다. 3일간 배양 후, UV조사에 의한 사멸율을 구하기 위해 colony의 갯수를 센다.

### 4. 돌연변이주의 선별

#### 1) 1차선별

선별효율을 높이기 위해 colony 형태가 변이된 균주만 GII, PA medium에 tooth picking하고, 30℃로 5일간 배양한다. 배양 후 GII medium에서 잘 자라고, PA medium에 자라지 않는 균주를 선별하여 다시 GII, PA medium에 tooth picking하여 동일한 배양결과를 보이는 균주만을 선별하여 YM slant에 이식한다.

#### 2) 2차선별

1차선별된 균주를 3% IBA가 포함된 GI medium에 4일간 진탕배양을 한 후 배양액 중의 IBA, D-HIBA를 분석하여 IBA에서 D-HIBA로의 전환수율이 높고 D-HIBA를 과량 축적시킨 균주를 선별한다.

### 5. 분석방법

#### 1) TLC 분석

Thin layer chromatography (TLC)에 사용한 plate는 Kieselgel 60. F<sub>254</sub>.

Merck제 이다. 이동상은 ethyl acetate : propyl alcohol : H<sub>2</sub>O = 10 : 2 : 1를 사용하고, 발색제는 0.1% 2,6-dichlorophenolindophenol-methanol를 사용한다. 원심 분리시킨 배양액을 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 산성화하여 TLC판 위에 점적시킨다.

## 2) 정량분석

분석기기로는 PERKIN-ELMER SIGMA 3B gas chromatograph를 사용한다. 고정상으로는 FAL-M 12% shimalite(AW-DMCS), 80-100 mesh이고,  $\phi$ 2mm × 180cm glass, packed column을 사용한다. 이동상은 N<sub>2</sub> 50ml/min으로 하고, 검출은 FID detector로 한다.

## 결론 및 토의

UV mutation조건은 30W, 30cm에서 4분간 UV 조사하였을 때 *Candida rugosa* KCCM 35430은 99.9%의 사멸율을 보였으며, colony형태변이율은 약 25%로 나타났다.

30회의 UV 변이조작을 하였으며, 약 4만여개의 colony형태 변이균주 중 GII medium에는 잘 자라고, PA medium에는 자라지 않는 변이균주를 150여개 얻었다. 이 균주를 이용하여 액체 배양한 결과 8개의 변이균주가 높은 전환수율과 D-HIBA의 과량축적의 현상을 나타내었다. 그 중 *Candida rugosa* BR-120 균주는 IBA에서 D-HIBA로의 30-40%의 전환수율을 나타내는 *Candida rugosa* KCCM 35430 균주보다 D-HIBA의 생성속도도 빠르고, 전환수율이 90%이상으로 나타났다.

## 참고문헌

- (1) Hodgson, J. : *Bio/Technology*, 10, 1093 (1992)
- (2) Faber, K. and Franssen M.C.R : *TIBTECH.*, 11, 461 (1993)
- (3) Goodhue, D.W., Chenung, H.S., Sabo, F.F. and Ondetti, M.A. : *Biochemistry*, 16, 5484
- (4) Aberhart, D.J. : *Bioorg. Chem.*, 6, 191 (1977)
- (5) Ohta, H and Tetsukawa, H. : *Chem. Lett.*, 1379 (1979)
- (6) Hasegawa, J., Ogura, M., Kanema, H., Noda, N., Kawaharada, H. and Watanabe, K. : *J. Ferment. Technol.*, 60, 501 (1982)

## 감사

본 연구는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 지원에 의하여 수행되었습니다.