

Enzymatic synthesis of ester-linked conjugates of amino acid and monosaccharide

전규중, 박오진, 신문식, 양지원

한국과학기술원 화학공학과

전화 (042) 869-3964, FAX (042) 869-3910

abstract

In this study the enzymatic synthesis of ester-linked conjugates of amino acid and monosaccharide in pyridine was tested by the catalysis of Optimase M-440, an alkaline serine protease. Optimase M-440 showed the higher activity in the reaction of monosaccharides which have one or more primary -OH groups. And also Optimase M-440 showed high regioselectivity; The transesterification of primary -OH group selectively occurred.

서론

아미노산과 당의 결합체에 대한 연구는 lectin의 binding characteristics, regulatory function 등의 cell communication과 다양한 glycopeptide의 합성¹⁾이나, 효소의 inhibitor, 의약품 소재를 개발하는데 기초가 되는 분야로서 다양한 연구가 이루어져 왔다. N-과 O-linked oligosaccharides와 glycosyl amino acid 등을 합성하기 위해 화학적인 C-, N-, O-glycosylation²⁾과 다양한 형태의 glycoamino acid 등의 conjugate를 합성하는 방법, glycopeptide 합성을 위한 template의 합성과 응용 등에 관해 많은 연구자들이 다양한 결과를 발표하였다. 그러나, 화학적인 방법으로 이러한 glycoconjugate를 합성하기 위해서는 sugar와 amino acid 등의 functional group을 선택적으로 protection, deprotection하여야 하기 때문에, 다수의 reagent를 사용하는 지루한 반응의 수가 늘어나고 전반적인 수율이 낮아지는 등의 단점이 발생한다. 따라서, 화학적인 방법의 경우에는 적용할 수 있는 범위가 좁고, 다양한 glycoconjugate를 합성하기 위한 일반적인 방법은 없는 상황이다.

본 연구에서는 이러한 화학적 방법의 단점을 극복하고자 protease인 Optimase M-440³⁾를 사용하여 monosaccharide와 아미노산이 ester로 연결된 conjugate를 간편하고 선택적으로 합성하고자 하였다.

재료 및 방법

1. Pyridine 1.66 ml에 glucose 60 mg (0.333 mmol), *t*-Boc-L-Phe-trifluoroethyl

ester 157 mg (0.333 mmol), Optimase M-440 166 mg을 첨가한 후, 45°C에서 교반하였다. TLC 상에서 *t*-Boc-L-Phe-trifluoroethyl ester의 소모를 확인한 후 원심분리를 통하여 효소를 제거하고, rotatory evaporator에서 pyridine을 제거하였다. silica gel column chromatography (CHCl₃: MeOH: EtOAc=15 : 1: 1)로 분리하여 전환율을 계산하고, NMR (DMSO-d₆)을 이용하여 생성물의 구조를 확인하였다. glucose이외의 다른 단당과 유도체에 대해서도 동일한 조건에서 반응시켰다.

2. Pyridine 3 ml에 sorbitol 109 mg (0.60 mmol), *t*-Boc-L-Phe-trifluoroethyl ester 417 mg (1.20 mmol)에 Optimase M-440 300 mg을 첨가한 후, 45°C에서 교반하였다. TLC 상에서 *t*-Boc-L-Phe-trifluoroethyl ester의 소모를 확인한 후 원심분리를 통하여 효소를 제거하고, rotatory evaporator에서 pyridine을 제거하였다. silica gel column chromatography (CHCl₃: MeOH: EtOAc=8 : 1: 1)로 분리하여 전환율을 계산하고, NMR (DMSO-d₆)을 이용하여 생성물의 구조를 확인하였다. Primary -OH기가 두 개인 sugar alcohol의 경우 동일한 조건에서 반응시켰다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용한 Optimase M-440은 alkaline serine protease로서 *Bacillus licheniformis*에서 생산하며, 세제의 첨가제로서 개발된 효소제품이다. Optimase M-440은 pyridine과 같은 극성이 강한 용매에서 amino acid ester (acyl donor)와 sugar의 transesterification을 일으키며, monosaccharide와 sugar alcohol 등에 대해 높은 촉매능을 보였다 (Table 1과 2).

Optimase M-440의 활성은 단당류의 종류에 따라 차이를 보였다. monosaccharide의 구조에 따라 차이는 있으나, primary -OH기가 있는 경우에 Optimase M-440에 의해 높은 전환율을 보였다. 그러나, primary -OH기가 없는 xylose, fucose, glucuronic acid, inositol 등에서는 전환율이 매우 낮았다(Table 1). Glucose로부터 생성된 conjugate의 구조를 ¹³C-NMR에서 분석한 결과 glucose의 C6가 61.3 ppm에서 반응 후 64.8 ppm로 downshift 하여 primary -OH기(C6)에만 esterification이 일어난 것을 확인하였다. Optimase M-440은 단당류의 반응성과 일치하는 높은 위치선택성을 나타냈다(Figure 1). xylose, fucose, inositol 등의 경우에는 약 25% 미만의 conversion이 일어났으며, 다수의 생성물이 생성되어 Optimase M-440의 위치선택성이 나타나지 않았다.

Sorbitol과 같은 sugar alcohol의 경우, 두 개의 primary -OH기(C1, C6)가 있어 반응성을 확인하기 위해 2 당량의 amino acid ester를 사용하였다. 동일한 시간 동안의 전환율을 확인한 결과(Table 2), 구조에 따라 차이는 있지만 높은 전환율을 보였다. 생성물과 sorbitol의 ¹³C-NMR을 비교한 결과, sorbitol의 C1은 62.6 ppm에서 63.5 ppm으로, C6는 66.7 ppm에서 67.4 ppm으로 각각 downshift 하였다. 따라서

sorbitol 양끝의 primary -OH기에 phenylalanine과 ester bond로 결합한 생성물임을 확인하였다(Figure 1). Mannitol, xylitol, arabitol에서도 primary -OH기에만 모두 ester bond가 생성되는 동일한 결과가 얻어, Optimase M-440의 위치선택성을 sugar alcohol에서도 확인하였다.

본 연구의 수행으로 Optimase M-440가 sugar의 primary -OH기에 높은 활성을 보임을 확인하였고, monosaccharide 외에 sugar alcohol 등의 derivative 경우에도 응용할 수 있음을 확인하였다.

감사

본 연구는 광주과학기술원 환경모니터링 신기술연구센터를 통한 한국과학재단의 우수연구지원센터의 일부 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Urge, L., Jackson, D. C., and et al., "Synthesis and Conformational Analysis of N-glycopeptides that Contain Extended Sugar Chain"(1994), *Tetrahedron*, 50(8), 2373-2390.
2. Lowary, T., Meldal, M., and et al., "Novel Type of Rigid C-Linked Glycosylacetylene-Phenylalanine Building Blocks for Combinatorial Synthesis of C-linked Glycopeptides"(1998), *J. Org. Chem.*, 63(26), 9657-9668.
3. Park, O.-J., Park, H. G., and Yang, J.-W., "Enzymatic transesterification of monosaccharides with amino acid esters in organic solvents"(1996), *Biotechnol. Lett.*, 18(4), 473-478.

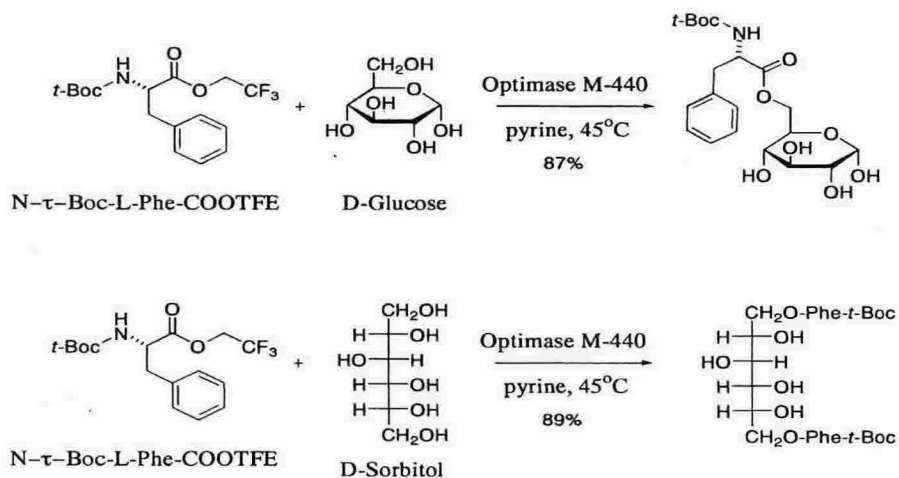


Figure 1. Enzymatic transesterification of glucose and sorbitol

Table 1. Conversion ratio of monosaccharides in the presence of Optimase M-440

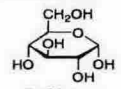
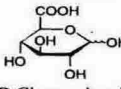
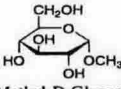
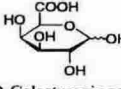
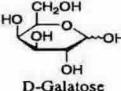
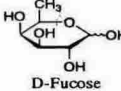
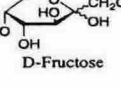
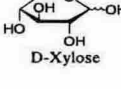
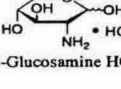
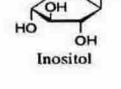
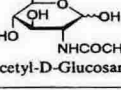
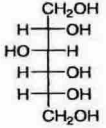
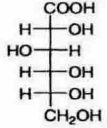
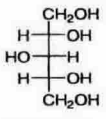
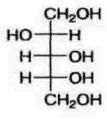
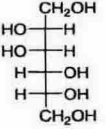
Monosaccharide	Conversion (%) (8 hr)	Monosaccharide	Conversion (%) (8 hr)
 D-Glucose	92	 D-Glucuronic acid	22
 α -Methyl-D-Glucoside	91	 D-Galacturonic acid	24
 D-Galactose	81	 D-Fucose	23
 D-Fructose	83	 D-Xylose	17
 D-Glucosamine HCl	76	 Inositol	15
 N-acetyl-D-Glucosamine	89		

Table 2. Conversion ratio of sugar alcohols in the presence of Optimase M-440

Monosaccharide	Conversion (%) (8 hr)	Monosaccharide	Conversion (%) (8 hr)
 D-Sorbitol	93	 D-Gluconic acid	75
 D-Xylitol	84	 D-Arabitol	81
 D-Mannitol	75		