

Enzymatic transesterification for the synthesis of amino acid-sugar conjugates

전규중¹, 박오진², 양지원¹

한국과학기술원 화학공학과¹, LG CI 생명과학연구소²

전화 (042) 869-3964, FAX (042) 869-3910

abstract

Among the tested ten enzymes, Optimase M-440 showed the highest activity in transesterification of *N*-*t*-Boc-L-Phe-OTFE with D-glucose. Monosaccharides and their derivatives acted as good acyl acceptors in the Optimase M-440 catalyzed transesterification of *N*-*t*-Boc-L-Phe-OTFE. Optimase M-440 showed a preferable catalytic activity on the primary hydroxyl group of saccharides and a good regioselectivity. Optimase M-440 showed the highest activity in pyridine among the tested solvents. As acyl donors, trifluoroethyl esters of amino acids showed a high reactivity in transesterification. Optimase M-440 showed a broad substrate specificity towards amino acid esters and saccharides.

서론

아미노산과 당의 결합체에 대한 연구는 다양한 glycopeptide의 합성¹⁾이나, 효소의 inhibitor, 의약품 소재를 개발하는데 기초가 되는 분야로서 많은 연구들이 이루어져 왔다. N-과 O-linked oligosaccharides와 glycosyl amino acid 등을 합성하기 위한 다양한 화학적인 C-, N-, O-glycosylation²⁾과 여러 형태의 glycoamino acid 등의 합성 결과가 발표되어왔다. 그러나, 다당류에 존재하는 많은 -OH기 때문에 화학적인 방법의 경우에는 적용할 수 있는 범위가 좁고, 다양한 glycoconjugate를 합성하기 위한 일반적인 방법은 없는 상황이다.

이러한 비선택적인 화학적인 방법과는 달리 효소를 이용한 다당류의 모사는 기질특이성과 위치선택성 때문에 원하는 conjugate를 간편하게 합성할 수 있다. Non-aqueous enzymology에 의한 carbohydrate ester의 합성과 관련 효소에 관한 많은 연구가 이루어 졌으나,²⁾ amino acid-sugar conjugate의 합성은 발표된 예가 거의 없다. 이러한 사실을 바탕으로 amino acid-sugar conjugate를 합성하기 위해 효소를 선정하고, 다양한 conjugate를 합성하기 위해 효소의 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. Activated amino acid ester는 Park *et al.* (1999)²⁾와 같이 합성하고 분석하였다. 유기용매는 특별한 정제를 거치지 않고, Drying 후 사용하였다.

2. Activated amino acid ester (0.2 mmol)와 sugar (0.2 mmol)의 혼합물에 2ml의 용매와 효소 (200mg)을 첨가한 후 45°C에서 교반하였다. 8시간후 원심분리로 효소를 제거하고, column chromatography (CHCl₃:MeOH:EtOAc=15:1:1)로 분리하였다. Optimase M-440의 활성은 activated amino acid ester의 소모량으로 측정하였다. Sugar alcohol의 반응성을 조사하기 위한 실험에서는 activated amino acid ester를 0.4 mmol을 사용하였고, Optimase M-440의 양의 변화에 따른 영향을 조사하기 위한 실험 외에는 효소량, 아미노산, 당의 비율을 일정하게 유지하였다.

결과 및 고찰

아미노산과 당의 conjugate를 효소적으로 합성하기 위해 10개의 상용 효소를 대상으로 효소에 의한 transesterfication을 테스트하였다 (Table 1). D-Glucose와 *N-t*-Boc-L-Phe-OTFE를 이용하여 활성을 조사한 결과, Optimase M-440 (alkaline serine protease)가 가장 높은 활성을 보여 주었다. 다양한 용매를 대상으로 Optimase M-440에 의한 transesterfication을 테스트한 결과, pyridine에서 가장 높은 전환율을 얻었다 (Table 2). 일반적으로 당의 경우 유기용매에 대한 용해도가 매우 낮기 때문에 polarity가 낮은 용매에서는 효소에 의한 전환율이 매우 낮고, protease나 lipase 등의 효소는 DMF 또는 DMSO와 같이 극성이 매우 강한 용매에서는 활성이 낮기 때문에, 당의 용해도는 상대적으로 높은 편이나 전환율은 매우 낮았다. Optimase M-440의 활성은 매우 뛰어나서 acyl acceptor인 당과 acyl donor인 amino acid ester에 대해 넓은 기질 특이성을 보여주었다 (Table 3과 4). 테스트 결과를 바탕으로 pyridine을 반응용매로 선정하고 acyl acceptor로서 다양한 단당류와 sugar alcohol 및 단당류의 유도체를 대상으로 Optimase M-440의 기질 특이성을 조사한 결과, Optimase M-440이 primary -OH기가 존재하는 당과 그 유도체의 transesterfication에서 보다 높은 활성을 나타내었다 (Table 3). 이러한 결과는 합성된 conjugate의 구조에서도 확인되었다 (Figure 1). D-Glucose, D-glucosamine과 D-sorbitol의 경우 모두 primary -OH기에만 acylation이 일어났으며, D-glucosamine의 경우에는 amine기에 acylation이 일어나지 않아 Optimase M-440의 regioselectivity가 매우 높은 것을 확인하였다.

L-Phenylalanine의 다양한 ester를 대상으로 activated amino acid ester에 대한 Optimase M-440의 활성을 비교한 결과 D-glucose를 acyl acceptor로서 사용한 경우, trifluoroethyl (TFE) ester가 93% 소모되어 가장 높은 반응성을 보여주었다 (Table 4). D-Glucose를 사용한 경우, L-phenylalanine ester의 반응성의 순서는 다음과 같았다: trifluoroethyl > cyanomethyl > acetone oxime > trichloroethyl > ethyl ester. 이 결과를 바탕으로 다양한 amino acid의 trifluoroethyl ester들을 대상으로 transesterfication을 시험한 결과 L-glycine, L-methinine, L-aspartic acid, L-lysine 등의 transesterfication에서 Optimase M-440은 높은 활성을 보여 주었다. D-Phenylalanine의 경우, 8시간동안 23%의 전환율을 보여 L-form에 비해 반응성이 낮았다. 이러한 결과를 바탕으로 Optimase M-440의 경우 L-form의 trifluoroethyl ester에 대해 높은 활성을 가진 것을 확인하였다. 단, L-tyrosine의 경우 L-phenylalanine과는 -OH기만 차이가 있으나, 전환율은 매우 낮았다 (11%). 이것은 L-tyrosine에 존재하는 -OH기에 의한 steric

hinderance 때문으로 생각된다.

Optimase M-440의 양에 따른 *N-t-Boc-L-Phe-OTFE*의 Optimase M-440에 의한 전환율을 관찰하였다 (Table 5). D-Glucose를 acyl acceptor로 사용한 경우, Optimase M-440의 양을 10mg/ml에서 100 mg/ml로 증가시켰을 경우, *N-t-Boc-L-Phe-OTFE*의 전환율은 단지 20%만 증가하였다. D-Sorbitol의 경우에는 31%가 증가하였다. Optimase M-440이 촉매이므로 pyridine과 접촉하는 시간이 길어질수록 Optimase M-440의 활성이 떨어지기 때문에 Optimase M-440의 양의 증가에 따라 *N-t-Boc-L-Phe-OTFE*의 전환율은 크게 증가하지 않았으며, 반응시간을 연장한 경우에도 전환율은 그다지 증가하지 않았다. 시간에 따른 전환율을 조사하여, 2시간동안 60% 이상의 *N-t-Boc-L-Phe-OTFE*가 소모되고, 5시간 뒤에는 5% 미만의 *N-t-Boc-L-Phe-OTFE*가 소모됨을 확인하였다 (Figure 2).

본 연구를 통하여 Optimase M-440를 이용하여 다양한 amino acid-sugar conjugate를 합성할 수 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. Sandrine G and et al., "Alkylated poly(-lysine citramide) as models to investigate the ability of amphiphilic macromolecular drug carriers to physically entrap lipophilic compounds in aqueous media"(1999), *J. Controlled Release*, 60, 235-247.
2. Park O-J, Jeon G-J, and Yang J-W, "Protease-catalyzed synthesis of disaccharide amino acid esters in organic media"(1999), *Enzyme Microb. Technol.*, 25, 455-462.

Table 1. Enzymatic acylation of D-glucose in pyridine

Enzyme ^a	Supplier	Conversion (D-glucose, 24h)
Optimase M-440	Solvay	98%
Proleather	Amano	87%
APG-380	Solvay	67%
Subtilisin A ^b	Novo	15%
Palatase 2000L	Novo	35%
PPL	Sigma	-
CCL	Sigma	-
Lipozyme IM	Novo	-
Novozym 435	Novo	-
Protease N	Amano	-

a: enzyme concentration; 200mg/ml, b: 25ml

Table 2. Solvent Effect on the activity of Optimase M-440^a

Solvent	Conversion (%)
Pyridine	92
Acetone	85
Tetrahydrofuran	71
Dioxane	63
t-Amyl alcohol	73
Formamide	66
t-Butanol	55
DMF	15
DMSO	-

^aAcyl donor: *N-t-Boc-L-Phe-OTFE*, acyl acceptor: D-Glucose

Table 3. Optimase M-440 catalyzed acylation in pyridine

Acyl acceptor	Conversion (8h)	Acyl acceptor	Conversion (8h)
D-Glucose	92%	D-Glucuronic acid	22%
α -Me-D-Glucose	91%	D-Galacturonic acid	24%
D-Galactose	81%	D-Fucose	23%
D-Fructose	83%	D-Xylose	17%
D-GlcN · HCl	76%	Inositol	15%
N-Acetyl-D-GlcN	89%	Ascorbic acid	0%
D-Sorbitol	93%	D-Mannitol	75%
D-Xylitol	84%	D-Arabitol	81%
D-Gluconic acid	75%	D-Gluconic acid	88%
		δ -lacton	

Table 4. Activity of Optimase M-440 towards amino acid esters^a

Amino acid esters	Conversion (%) (8hr)	Amino acid esters	Conversion (%) (8hr)
<i>N</i> - <i>t</i> -Boc-L-Met-OTFE	96	<i>N</i> - <i>t</i> -Boc-L-Phe-OTFE	92
<i>N</i> - <i>t</i> -Boc-L-Gly-OTFE	84	<i>N</i> - <i>t</i> -Boc-L-PheOxime	84
<i>N</i> - <i>t</i> -Boc-L-Asp-di(OTFE)	77	<i>N</i> - <i>t</i> -Boc-L-Phe-OTCE	71
<i>N</i> - <i>t</i> -Boc-L-Lys-OTFE	87	<i>N</i> - <i>t</i> -Boc-L-Phe-OCM	88
<i>N</i> - <i>t</i> -Boc-L-Try-OTFE	11	<i>N</i> - <i>t</i> -Boc-L-Phe-OEt	22
		<i>N</i> - <i>t</i> -Boc-D-Phe-OTFE	23

a: Acyl acceptor: D-glucose

Table 5. The effect of enzyme content on the conversion of *N*-*t*-Boc-L-Phe-OTFE

Enzyme content (mg/mL)	Conversion (D-Glucose, 8h)	Conversion (D-Sorbitol, 8h)
10	72%	62%
30	76%	79%
50	78%	82%
70	82%	85%
100	92%	93%
200	96%	94%

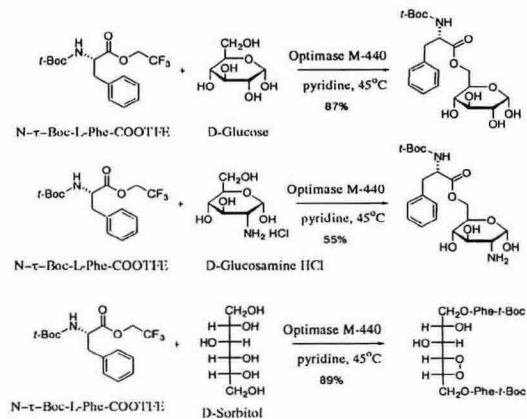


Figure 1. Enzymatic transesterification of sugars

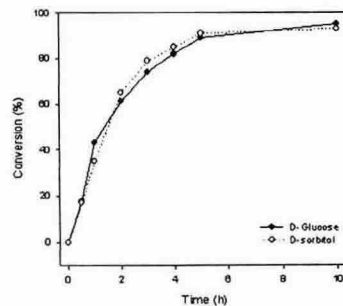


Figure 2. Time profile of conversion of *N*-*t*-Boc-L-Phe-OTFE