

유기용매에서 효소반응을 통한 라세믹 α -Methylbenzylamine 광학적 분할의 최적화

강 병 영 · 김 병 기
서울대학교 공과대학 공업화학과
유전공학연구소

Optimization of the Optical Resolution of Racemic α -Methylbenzylamine Catalyzed by Enzymatic Reaction in Organic Media

Byoung-Young Kang and Byung-Ki Kim

Department Chemical Technology Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
Institute for Molecular Biology and Genetics Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

Optical resolution of racemic α -methylbenzylamine was carried out by using *Bacillus licheniformis* protease in organic media. Enantioselective amidation of racemic amine with an ester as an acyl donor was successfully employed to resolve the racemate. To enhance reaction rate and enantioselectivity, pH-adjustment by lyophilization of enzyme dissolved in buffer, colyophilization with salts or lyoprotectants, selection of solvents and molecular design of esters were investigated. The optimization of the resolution reaction achieved about 30-fold increase in initial reaction rate and about 12-fold increase in enantioselectivity, respectively.

서 론

최근에 들어 chiral drug 및 chiral 화합물의 합성이 유기합성에 있어서 중요한 연구과제로 등장하고 있다(1). 그 이유는 대부분의 경우 생물학적으로 활성이 있는 화합물은 라세믹 혼합물 중 하나의 광학 이성질체뿐이며, 나머지 이성질체는 여분의 밸러스 트이거나 오히려 활성을 나타내는 이성질체의 효과를 억제하기도 한다(2). 그러므로, 라세믹 혼합물을 순수한 광학 이성질체로 분리하는 것이 때로는 필수적이다. 순수 광학이성질체의 분리를 위해서는 전통적인 분할용제를 사용하여 diastereomers의 형태로 만든 후 용융점, 용해도의 차이로 분리하는 방법

(3), 효소나 세포를 이용하여 두 이성질체의 반응속도의 차이를 이용한 분리방법(4-5), 비대칭성 기질을 이용하여 순수한 이성질체만을 얻는 합성방법(6) 등이 있다. 이 중에서 효소의 입체특이성을 이용한 광학 이성질체의 분리는 간단하며 높은 선택성은 가지지만 대부분의 기질이 비수용성이므로 사용에 제한을 받아왔으나, 유기용매에서도 효소가 활성을 띠며, 수계반응과 같이 다양한 반응이 가능하기 때문에 최근 이에 대한 관심이 새로이 대두되었다(7). 현재 비수계 효소반응에서의 가장 큰 문제점은 효소가 유기용매에 녹지 않으므로 수용액상의 반응과 비교하여 볼 때 훨씬 낮은 활성을 보인다는데(8) 있기 때문에 이를 극복하는 방법이 잘 개발되면 효소반응

을 이용한 분할 및 비대칭합성은 유기 합성의 주요 공정으로 이용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 심장질환 치료제, 고혈압 치료제, 구토 억제제 및 분할 용제 등으로 주로 사용되는 키랄 아민 화합물 중의 하나인 (R)- α -methylbenzylamine을 순수 분리하기 위해 유기 용매상에서 효소반응을 수행하였다(9). 이 효소 반응은 Fig. 1에서와 같이 활성 에스테르를 사용하여 아민을 아마이드화하는 반응으로서 두 화합물의 물리적, 화학적 성질을 이용하여 분리가 용이하기 때문에 선택되었으며(10), 선별된 효소를 이용하여 반응을 진행하는데 있어 잘 알려진 바와 같이 매우 낮은 효소 활성으로 반응시간이 수일 정도 소요되었다. 이와 같은 이유 때문에 본 효소반응의 반응속도를 향상시키는 물론 동시에 높은 입체특이성을 유지 혹은 증가시킬 수 있는 방법을 모색하게 되었으며, 이를 위한 최적화 연구를 수행하였다. 다음은 이에 대한 실험결과를 요약하였다.

재료 및 방법

사용 효소 및 시약

Bacillus licheniformis protease는 Novo Nordisk사의 한국지사에서 기증받았고, *Aspergillus oryzae* protease, bovine pancreas α -chymotrypsin, porcine kidney acylase, *Candida cylindracea* lipase, Wheat germ lipase 등은 Sigma Chemical사(St. Louis, U. S. A.)에서, hog pancreas lipase는 Fluka(Hauppauge, Switzerland)사에서 구입하였고, *Pseudomonas cepacia* lipase는 Amano International Enzyme사(Nagoya, Japan)에서 기증받았다. 동결 건조시의 효소의 처리는 phosphate, acetate, borate 등의 완충용액 0.1M농도에 효소를 녹여(100mg/ml) 아세톤/드라이아이스 bath(-70°C)에서 급냉시킨 후 약 24시간 동결건조하여 사용하였다.

(\pm)- α -Methylbenzylamine, n-butyryl chloride, 2, 2, 2-trifluoroethanol, 3-methyl-3-pentanol, ethyl butyrate, ethyl cyclohexylacetate, ethyl chloroacetate 및 ethyl caprylate 등은 Aldrich Chemical사(Milwaukee, U. S. A.)에서 구입하였고 그외에 실험에 사용된 시약은 모두 analytical grade이었다. 사용된 모든 유기 용매는 두 번 증류한 다음 4Å-molecular seive로 건조시킨 후 24시간 후에 사용하였다.

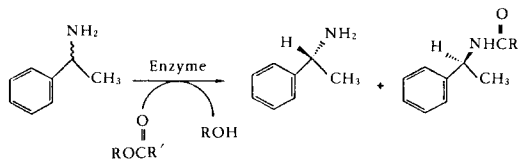


Fig. 1. The reaction scheme of enantioselective amidation using enzymatic resolution.

수분 적정

METTLER DL18수분 적정기(Greifensee, Switzerland)를 사용하여 Karl Fischer titration 방법으로 유기용매, 동결 건조한 효소와 반응 혼합물의 수분을 적정하였다(11).

전환율과 광학선택성(Enantioselectivity) 측정

생성된 아마이드 농도는 Waters사의 HPLC (Millford, U. S. A.)를 사용하여 μ -BONDAPAK™ C18 컬럼(3.9×300mm)을 이용하여 물과 메탄올을 전개용매로, 1.0ml/min 유속으로 gradient control(0~10min; 물/메탄올(80/20), 10~20min; 물/메탄올(20/80))하에서 UV detector(254nm)로 분석하였고, (R)과 (S)-아민 화합물의 각각 농도는 DAICEL Chemical사(Tokyo, Japan)의 CROWN-PAK CR(+)컬럼(4×150mm)을 사용하여 과염소 산수용액(pH 2.0)을 전개용매로 하여 0.8ml/min의 유속으로 UV detector(254nm)에서 분석하였다. 전환율과 광학선택성을 구하는 식은 다음과 같이 정의하였다(12).

$$c = 1 - \frac{A+B}{A_0+B_0}, ee(S) = \frac{B-A}{B+A}, E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee(S))]}{\ln[(1-c)(1+ee(S))]}$$

- A : fast reacting enantiomer
- B : slow reacting enantiomer
- c : 전환율 (degree of conversion)
- ee(S) : enantiomeric excess of substrate
- E : 광학선택성 (enantioselectivity)

반응 조건

반응 유기용매 2ml에 동결 건조한 효소(10mg/ml)을 넣고 2~3분 magnetic stirring시킨 후 (\pm)- α -methylbenzylamine(50mM)와 여러 형태의 에스테르(50mM)을 넣은 후에 표준 반응온도인 30°C에서 반응시켰다. 초기 반응속도는 30분 간격으로 2시간 동안 샘플링하여 측정하였고, 광학선택성은 각 시간마다 측정된 전환율과 ee(S)의 값을 상기한 식을 통해 계산하였다.

Table 1. Screening of enzymes for optical resolution of racemic α -methylbenzylamine.

Enzyme	Substrate specificity	Enantioselectivity
<i>Bacillus licheniformis</i> protease	++++	++++
<i>Aspergillus oryzae</i> protease	++	N. D.
Bovine pancreas α -chymotrypsin	++	N. D.
Porcine kidney acylase	++	N. D.
<i>Candida cylindracea</i> lipase	++	N. D.
Hog pancreas lipase	++	N. D.
Wheat germ lipase	+	N. D.
<i>Pseudomonas cepacia</i> lipase	++	N. D.

++++; very selective, ++; moderately selective, +; nearly nonselective, N. D.; not determined.

결과 및 고찰

효소 선별

상기한 8가지 상업적 효소를 사용하여 본 반응을 수행할 수 있는 효소를 선별하였고, Table 1에서 종합하여 정리하였다. *Candida cylindracea* lipase, hog pancreas lipase, *Pseudomonas cepacia* lipase의 경우에는 아미드를 생성시키지만 입체특이성이 없었고, *Bacillus licheniformis* protease의 경우 주어진 기질에 대한 특이성과 입체 특이성을 동시에 지니고 있는 것으로 밝혀졌다. 이후의 모든 실험은 *Bacillus licheniformis*에서 생산된 protease를 사용하여 수행하였다.

pH의 영향

효소는 수계반응에서 pH에 따라 많은 영향을 받지만 유기용매상에서 반응시킬 경우 pH를 변화시켜 주는 것은 쉽지 않다. 하지만, 효소를 적당한 pH의 완충용액에 녹인 후 급냉시킨 다음에 건조시키면 유기 용매상에서 pH-memory를 유지하는 것으로 알려져 있다(13). Fig. 2는 이 사실에 근거하여 30°C에서 pH를 2.6에서 12까지 바꾸면서 초기반응속도에 어떤 영향을 미치는지 실험하였다. 그 결과 pH 9.5에서 최대 초기반응속도 5.2mM/h를 얻었으며, 이는 완충액을 사용하지 않고 증류수에서 동결건조한 효소의 초기반응속도보다 약 30배 빨랐다. 이것은 효소의 활성 부위에 있는 아미노산의 이온화 상태가 최적 pH에서 냉동건조시켜서 사용할 경우 유기용매 내에서도 그 상태를 유지하기 때문이라고 생

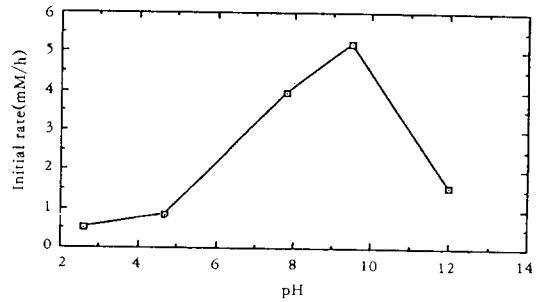


Fig. 2. pH effect on the initial rate; pH 2.6 (phosphate buffer, 0.1M), pH 4.7 (acetate buffer, 0.1M), pH 7.8 (phosphate buffer, 0.1M), pH 9.5 (borate buffer, 0.1M), pH 12 (phosphate buffer, 0.1M).

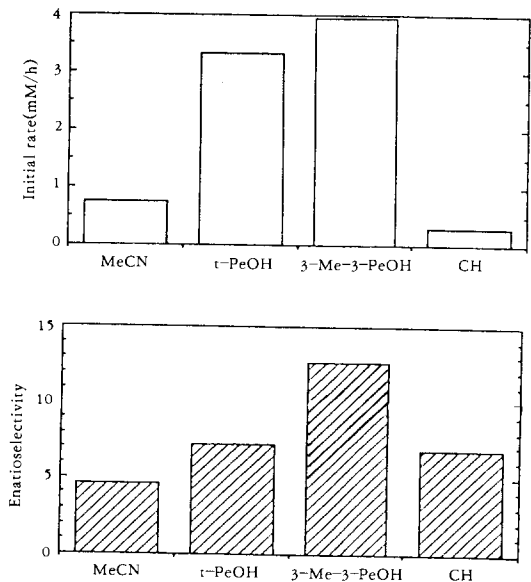


Fig. 3. Solvents' effect on the initial rate and enantioselectivity of amidation reaction; MeCN(acetonitrile), t-PeOH(t-amyl alcohol), 3-Me-3-PeOH(3-methyl-3-pentanol), CH(cyclohexane). Water content of all solvents pretreated with 4-Å molecular sieve was less than 0.02%(w/v).

각되며, 동결건조시 완충액의 pH가 유기용매 내에서의 효소 활성유지에 매우 중요한 요소임을 알 수 있으며, 이미 보고된 논문들의 결과와 유사하였다

(13).

유기용매의 선정

유기용매 반응시 사용되는 용매의 일반적 성질은 기질을 잘 용해시켜야 하며, 효소가 비활성화되는 것을 최소화하여야 한다. 또한, 용매에 따라 효소의 광학선택성이 현저히 변하므로 최적의 용매선정은 대단히 중요하다. 일반적으로 유기용매를 선정하는 기준은 log P(14), dielectric constant(ϵ_r) (15), dipole moment(D) (16) 등이 사용되지만, 반응에 사용되는 기질의 종류에 따라, 효소의 종류에 따라 많은 차이를 보이기 때문에 이들 상수는 대략의 선택 기준 이외는 되지 않는다. 발표된 논문(10)에 의하면 3차 알코올류가 라세믹 아민 화합물의 분할에 적절한 용매로 알려져 3-methyl-3-pentanol, t-amyl alcohol의 3차 알코올과 친수성이 강한 acetonitrile 과 소수성이 강한 cyclohexane을 사용하여 초기 반응속도와 광학선택성을 비교하여 보았다. Fig. 3의 결과를 보면 3-methyl-3-pentanol의 경우 cyclohexane에 비하여 13배의 초기반응속도를 보였으며, acetonitrile에 비해 약 3배의 광학선택성을 보였다. 이를 통해 소수성이 강한 용매가 친수성이 강한 용매에 비해 입체특이성이 뛰어나다는 일반적인 경향은 두드러졌으나, 사용한 네 가지의 유기용매에 대한 성질을 상기한 세 가지 상수로 비교해 보았으나, 특별한 상관관계는 보이지 않았다.

염과 Lyoprotectant의 효과

유기용매에서의 효소반응이 수용액에서의 그것과 비교해서 활성이 현저히 떨어지는 또 다른 중요한 이유중의 하나는 수분 함량이나 수분 활성도라고 알려져 있다(17-18). 이는 사용하는 유기용매와 직접적인 관계가 있으며, 반응에 필요한 최소한의 수분 및 적정 수분의 양을 효소 활성과 관련지어 나타내는 상수인데 사용효소에 따라 그 적정값이 다르다(19)고 보고되고 있으며, 수분 활성도는 용매 내에서의 효소의 유연성 및 기질과 생성물의 용해도와도 관계가 있어 유기 용매에서는 효소가 수용액상에서 보다 덜 유연하거나 기질과 생성물의 용해도의 차이로 인한 기질 및 생성물의 저해현상으로 인해 반응 활성 정도가 떨어진다는 보고가 있다(19-20). 또한, 동결건조시에 효소의 변성때문에 반응활성정도가 낮다는 것도 일반적으로 인정되고 있다(22). 이에 본 실험에서는 효소를 동결건조시에 수분을 조정하기 위한 여러 가지의 염(21)과 효소의 변성을 막아주는

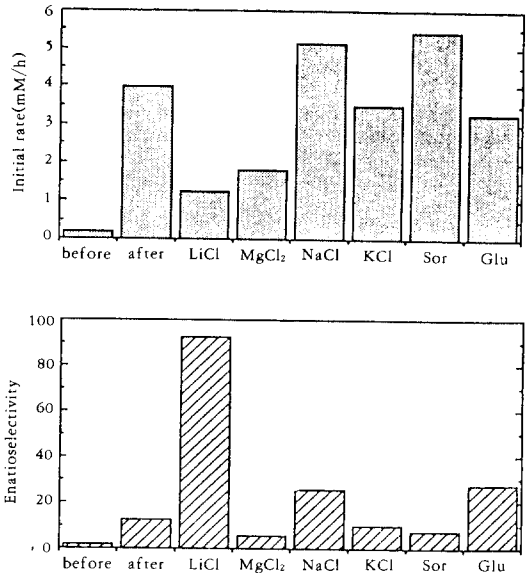


Fig. 4. The effect of salts and lyoprotectants on the initial rate and enantioselectivity of amidation reaction; before (lyophilization without buffer), after (lyophilization with 0.1M phosphate buffer(pH 7.8)), In the case of LiCl, MgCl₂, NaCl, KCl, Sor(D-Sorbitol) and Glu(Glucose), 0.2mmol of each material was added before lyophilization with 0.1M phosphate buffer(pH 7.8).

lyoprotectants(22)을 2mmol 첨가하여 초기 반응속도와 광학선택성의 영향을 고찰하였다. Fig. 4에 의하면, NaCl이나 D-Sorbitol 첨가시는 첨가하지 않은 control에 비해 초기반응속도가 약 30% 정도 증가하였으며, 광학선택성은 NaCl의 경우에는 2배, D-Sorbitol의 경우에는 오히려 40% 감소하였다. 특이한 결과로서는 LiCl의 경우 초기반응속도는 70% 감소했으나, 광학선택성은 약 7배나 증가하였다. 그러나, 초기반응속도와 광학선택성을 동시에 고려했을 경우에는 NaCl을 첨가하였을 경우가 가장 최적의 결과를 나타냈다. 그러나, LiCl을 첨가할 경우 왜 광학선택성이 급격히 증가하는지의 이유는 아직 밝혀지지 못했으며, 현재 연구중에 있다.

에스테르 구조에 대한 효과

라세믹 아민을 가수분해 효소를 사용하여 유기용

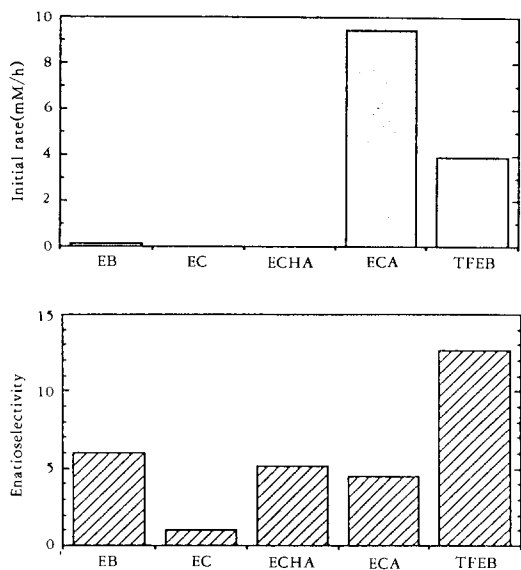


Fig. 5. The effect of structures of esters on the initial rate and enantioselectivity of amida-tion reaction; EB(ethyl butyrate), EC(ethyl caprylate), ECHA(ethyl cyclohexylaceta-te), ECA(ethyl chloroacetate), TFEB(2, 2, 2-trifluoroethyl butyrate).

매에서 반응시켜 아미드 합성반응을 통해 광학 분할하는 본 연구의 반응에서는 아민에 아실기를 제공하는 에스테르의 구조에 따라 초기반응속도와 광학선택성이 변화할 수 있다고 예상되었기 때문에(23) 전자친화성과 주탄소사슬의 길이 등을 변화시켜 각각을 측정하였다. 사용한 2, 2, 2-trifluoroethyl butyrate는(24) 화학적 방법으로 합성하였으며, 2, 2, 2-trifluoroethyl기는 할로겐원소의 전자친화성때문에 ethyl기에 비해 뉴클레오파일인 아민 화합물의 공격을 받을 경우 더욱 잘 떨어져 나간다. 그 결과 Fig. 5에 의하면 2, 2, 2-trifluoroethyl butyrate의 경우 ethyl butyrate에 비하여 30배의 초기 반응속도를 보였고, ethyl chloroacetate의 경우에는 염소가 에스테르기에 있는 탄소의 친전자성을 증가시켜 주고 분자 길이도 2, 2, 2-trifluoroethyl butyrate에 비해 작기 때문에 더욱 반응성이 좋아 이것에 비해 약 2.5배의 초기반응속도의 증가를 나타냈다. 그러나, 광학선택성은 3배 감소하였는데 이는 효소의 활성 부위 중 세린의 수산화기에 결합된 아실기의 길이가 짧기 때문에 반응 기질인 (R)과 (S)-형태의

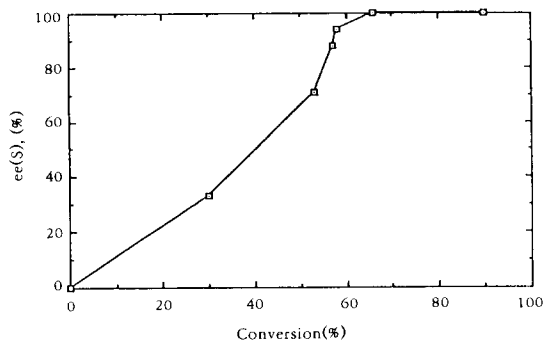


Fig. 6. Correlation between conversion and enantiomeric excess of substrate in the case of the following reaction condition; substrate and cosubstrate is 50mM of (\pm)-methylbenzylamine and 50mM of 2, 2, 2-trifluoroethyl butyrate, respectively. *Bacillus licheniformis* protease was lyophilized with 0.1M of phosphate buffer(pH 7.8) containing 0.2mmol of NaCl. The reaction time to achieve 100% of ee(S) was 22hr at 30°C and its enantioselectivity was about 27.

아민을 구별하는 선택성이 감소했기 때문이라고 예상할 수 있다.

결 론

*Bacillus licheniformis*에서 생산되는 protease가 라세믹 α -methylbenzylamine을 광학 분할시키는 효소로 선별되었고, 라세믹 아민과 2, 2, 2-trifluoroethyl butyrate 각각 50mM를 3-methyl-3-pentanol에 녹여 30°C에서 10mg/ml의 효소를 사용하여 반응시킨 결과 순수한 (R)- α -methylbenzylamine을 34% 얻을 수 있었다. 초기반응속도와 광학선택성을 증가시키기 위하여 효소를 최적화된 pH의 완충용액에 용해한 후 동결건조시켜 사용하였고, NaCl을 첨가시켜 준 경우 30배의 초기반응속도와 12배의 광학선택성의 증가를 나타내었다. 또한, 사용 유기용매 중 3차 알코올류에서 높은 초기반응속도를 나타내었으며, 아실기 제공자인 에스테르의 구조로서는 할로겐 원소가 있는 경우가 더 반응성이 우수했으며, 아실기의 길이가 광학선택성에 많은 영향을 주었다. Fig. 6은 이와 같은 최적화 조건에서

반응을 시킨 경우에 전환율에 따른 ee(S)의 변화를 보여 준 것인데 약 66%의 전환율에서 ee(S)가 거의 100%인 (R)- α -methylbenzylamine을 얻을 수 있었으며, 이 때의 광학선택성은 약 27이었다.

요 약

유기용매상에서 *Bacillus licheniformis*에서 생산되는 protease를 이용하여 라세믹 α -methylbenzylamine의 광학분할을 행하였다. 이 반응은 아실 제 공자로 활성 에스테르를 사용하여 라세믹 아민을 광학선택적으로 아미드로 변환시킨다. 이 반응의 반응 속도와 광학선택성을 증가시켜주기 위해 효소를 완충액에 녹여 pH를 맞추는 후에 동결건조시키거나, 동결건조시 염이나 lyoprotectants를 첨가시키는 방법, 적당한 유기용매의 선정, 에스테르 구조의 디자인 등의 방법을 사용하였다. 그 결과, 30배의 초기 반응속도의 증가 및 12배의 광학선택성이 증가하는 결과를 보였다.

감 사

본 연구는 과학재단에서 시행하는 특정기초연구과제 92-50-00-01에 의해 재정적인 지원을 받은 것이기에 감사드립니다.

참고문헌

1. R. A. Aitken and S. N. Kilényi(1992), *Asymmetric Synthesis.*, 1st ed, 2-5, The University Press, Cambridge.
2. R. Sheldon(1990), *Chem. Ind.*, **2**, 212.
3. R. R. Sealock(1946), *J. Biol. Chem.*, **166**, 1.
4. N. Esaki, H. Shimoi, H. Tanaka and K. Soda (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1231.
5. D. I. Stirling, A. Zeitlin and G. W. Matcham (1990), *U. S. Patent*, **4**, 950, 606.
6. D. W. Brooks, H. Mazdiyasni and P. G. Grothaus(1987), *J. Org. Chem.*, **52**, 3223.
7. A. M. Klivanov(1986), *Chemtech.*, Feb., 100.
8. J. Kim and J. S. Dordick(1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 772.
9. A. L. Gutman, E. Meyer, E. Kalerin, F. Polyak and J. Sterling(1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 760.
10. H. Kitaguchi, P. A. Fitzpatrick, J. E. Huber and A. M. Klivanov(1989), *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3094.
11. H. A. Laitinen, W. E. Harris(1975), *Chemical Analysis.*, 2nd ed, McGraw-Hill, New York.
12. C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas and C. J. Sih(1982), *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294.
13. A. Zaks and A. M. Klivanov(1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 3194.
14. S. Tawaki and A. M. Klivanov(1992), *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1882.
15. Z. F. Xu, R. Affleck, P. Wangikar, V. Suzawa, J. S. Dordick and D. S. Clark(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 515.
16. P. A. Fitzpatrick and A. M. Klivanov(1991), *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3166.
17. R. Affleck, Z. U. Xu, V. Suzawa, K. Focht, D. S. Clark and J. S. Dordick(1992), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 1100.
18. P. J. Halling(1994), *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 178.
19. Z. Yang and D. A. Robb(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 365.
20. H. Kitaguchi, I. Itoh and M. Ono(1990), *Chem. Lett.*, 1203.
21. L. Greenspan(1977), *J. Natl. Bureau. Stds.*, **81A**, 89.
22. K. Dabulis and A. M. Klivanov(1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 566.
23. S. Parida and J. S. Dordick(1991), *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2253.
24. S. Riva and A. M. Klivanov(1988), *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3291.