

## $\alpha$ -Chymotrypsin을 이용한 Kyotorphin 유도체의 합성

全裕珍\* · 金世權

부산수산대학교 자연과학대학 화학과  
(1994. 3. 16 접수)

## The Synthesis of Kyotorphin Derivative by $\alpha$ -Chymotrypsin

You Jin Jeon\* and Se Kwon Kim

Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

(Received March 16, 1994)

**요 약.** 효소를 이용한 생리활성 펩티드의 합성 연구에 관한 기초자료를 얻기 위하여, Kyotorphin(진통 작용을 가진 펩티드) 유도체가  $\alpha$ -chymotrypsin을 이용한 이상계(two-phase system; 유기상과 수용액상) 조건하에서 Ac-Tyr-OH과 Arg-NH<sub>2</sub>로부터 합성되었다. Ac-Tyr-OH(10 mM)과 Arg-NH<sub>2</sub>(20 mM)와의 Kyotorphin 유도체 합성에 대한 유기용매의 효과에서 ethyl acetate계에서의 합성 수율이 다른 유기용매(dichloromethane, *n*-butanol, *n*-hexane, chloroform)에서 보다도 더 높았다. Kyotorphin 유도체의 합성에 미치는 최적조건을 보면, 효소 농도는 10  $\mu$ M, 온도 및 pH는 각각 35°C 및 7.0이었으며, 유기상/수용액상의 비( $\alpha$ )는 15였다. Kyotorphin 유도체 합성의 최적 반응조건하에서 수율은 70.2%였으며, 이때의 반응은 24시간 후에 평형에 도달하였다.

**ABSTRACT.** In order to obtain the basic data for synthetic studies of bioactive peptide using enzyme, Kyotorphin(analgesic peptide) derivative was synthesized from Ac-Tyr-OH and Arg-NH<sub>2</sub> by  $\alpha$ -chymotrypsin in two phase system(organic phase and aqueous phase). In effect of organic solvent on Kyotorphin derivative synthesis from Ac-Tyr-OH(10 mM) and Arg-NH<sub>2</sub> (20 mM), the synthesis in ethyl acetate system of organic solvents was higher than those in other organic solvents (*n*-butanol, *n*-hexane, dichloromethane and chloroform). The optimal conditions for the synthesis are as follows: enzyme conc., 10  $\mu$ M; reaction pH, 7.0; reaction temp., 35°C; the ratio of organic phase volume/aqueous phase volume ( $\alpha$ ), 15. Under the optimal conditions, the yield was 70.2%, and the reaction achieved to equilibrium after 24 hrs.

### 서 론

현재 상업적으로 유용한 펩티드들은 화학적인 방법으로 만들어져 이용되고 있으나, 이 방법은 아미노산의 결사슬 위치에 보호기의 도입과 제거, 도입된 보호기에 의한 용해도 감소, 라세미화 유발 및 비효율적인 부산물의 생성 등 많은 제약을 받고 있다. 특히 고온 고압과 같은 강력한 반응 환경에서 합성이 진행됨으로 생산비 증가를 초래할 뿐만 아니라, 유독성 시약을 사용함으로써 환경오염을 야기시키고 있다. 이러한 단점을 해결하고자 효소를 이용하여 유용 펩티드를 합성하는 연구가 활발히 진행되고

있다. 이러한 펩티드 합성에 효소를 이용할 경우, 결합할 수 있는 아미노산의 수가 한정되어 있고, 물 용매에 의해 가수분해가 일어나서 수율이 감소하는 등<sup>2</sup> 단점도 있으나, 보호기의 도입이 불필요하며, 위치특이적인 펩티드 결합으로 인하여 부반응의 감소 및 라세미화 생성이 없고, 온화한 반응조건과 유독한 시약을 사용하지 않는 점 등 화학적인 합성법을 보완할 수 있는 잇점도 있다<sup>3,4</sup>. 효소에 의한 합성법은 과거에는 단백질 분해효소가 그 역방향으로 펩티드결합 형성반응을 촉매한다는 사실을 알지 못하였으나, 1937년 Bergmann 등에 의해 역가수분

해 방향으로 펩티드결합이 형성된다는 사실이 최초로 보고됨에 따라 비로서 많은 관심과 발전이 시작되었다.<sup>5</sup> 이에 관한 연구로는 감미제로서 유용한 aspartame의 합성과 pork insulin을 human insulin으로 변환하는 반합성법이 그 대표적이라고 할 수 있다. 이러한 펩티드 합성에서 수율을 감소시키는 가장 큰 요인은 용매에 의한 가수분해 반응이 경쟁적으로 일어난다는 것이다. 따라서 유기용매를 첨가하여 상대적으로 물의 농도를 낮춘 용매 조건하에서 반응이 많이 이용되고 있다.<sup>6-8</sup> 따라서 이러한 높은 농도의 유기용매를 반응조건으로 사용할 경우 첫째, 열역학적 평형을 가수분해반응에서 합성반응으로 이동시킬 수 있고 둘째, 물이 존재할 때 일어나는 부반응을 억제시킬 수 있으며 셋째, 효소의 열안정성이 향상되고 넷째, 미생물 오염이 없다는 등 많은 장점을 가지고 있다.<sup>10</sup>

일반적으로 효소를 촉매로 이용하여 펩티드를 합성하는 조건에는 평형론적 조절에 의한 합성(equilibrium controlled synthesis, ECS)과 반응속도론적으로 조절된 합성(kinetically controlled synthesis, KCS)의 두가지 경로에 의해 실시된다. Homandberg 등<sup>11</sup>은  $\alpha$ -chymotrypsin의 촉매에 의한 benzyloxycarbonyltryptophanyl glycineamide의 합성을, Semenov 등<sup>12</sup>은  $\alpha$ -chymotrypsin 촉매하에 acetyltryptophanyl leucineamide의 합성을, 그리고 Nakanishi 등<sup>13</sup>은 thermolisin 촉매작용에 의하여 aspartame 전구체인 benzyloxycarbonylaspartyl phenylalanine methyl ester의 합성을 ECS 조건에 따라 합성하였으며, Fastrez와 Fersht<sup>14</sup>는  $\alpha$ -chymotrypsin의 촉매작용에 의한 펩티드 합성의 가능성을 KCS 조건에 따라 제시하였으며, 그 이후로 Morihara와 Oka<sup>15</sup>는 같은 방법으로 펩티드 합성에서 친핵체의 특이성에 대하여 연구한 바가 있다.

최근에 아미노산 및 그 유도체들이 결합된 oligopeptide에 여러가지 생리활성이 있다는 사실이 알려져 있으며, 특히 진통작용을 가진 Kyotorphin은 tyrosine과 arginine으로 이루어진 dipeptide(Tyr-Arg)라는 사실이 밝혀졌다.<sup>16</sup> 이러한 Kyotorphin은 Clapes 등<sup>17</sup>과 Herrmann 등<sup>18</sup>이 효소를 이용하여 KCS 조건에 따라 합성을 연구한 바 있다.

본 연구에서는 효소를 이용한 생리활성 펩티드의

합성을 위한 기초자료를 얻고자 ECS 조건에 따라 진통작용을 가진 Kyotorphin의 합성 조건을 규명하였다.

## 실 험

**시약 및 분석방법.** Bovine pancreas로부터 추출된  $\alpha$ -chymotrypsin(활성: 40 units/mg protein; 분자량: 25 kDa)[EC 3.4.21.1]은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였다. Kyotorphin 유도체(Ac-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>) 합성의 carboxyl 성분인 Ac-Tyr-OH(acetyltirosine), amine 성분인 Arg-NH<sub>2</sub>(arginineamide·2HCl) 및 표준시약 Ac-Tyr-OEt(acetyltirosine ethyl ester)는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였다. HPLC 분석의 이동상 용매로 사용되는 acetonitrile과 물은 LAB-SCAN Co.로부터 HPLC 분석용을 구입하여 사용하였다. 그의 모든 실험에서 사용된 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

모든 반응의 수율은 HPLC(Parmacia LKB Co.; ODS C<sub>18</sub> column, 4.9 mm×250 mm)로 분석하였으며, 분석조건은 다음과 같다. 즉, 반응물 중 유기상과 수용액상에서 각각 20  $\mu$ 씩 분취하여 이를 1N HCl 0.7 ml와 acetonitrile 0.3 ml 혼합용액에 첨가하여 완전히 혼합하였다. 이때 효소는 1N HCl의 영향으로 효소가 불활성화되기 때문에 반응은 정지된다. 혼합용액 중에서 20  $\mu$ 를 injection하여 280 nm에서 흡광도값에 대한 면적비로 합성 수율을 계산하였다. 이동상 용매로는 30% 수용성 acetonitrile을 사용하였으며 1 ml/min의 유속으로 10분간 일정하게 흘러서 분석하였다.

**Kyotorphin 유도체(Ac-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>)의 합성에서 유기용매의 선택.** Kyotorphin 유도체의 합성은 수용액상과 소수성 유기상이 공존하는 이상계 용매(two-phase system solvent) 조건하에서 실시하였다. 즉, 수용액상(0.2M sodium carbonate buffer, pH 9.0) 용매에 Ac-Tyr-OH과 Arg-NH<sub>2</sub> 및  $\alpha$ -chymotrypsin을 녹여서 2 ml로 한 후, 그 위에 유기용매(*n*-butanol, *n*-hexane, chloroform, dichloromethane, ethyl acetate 등)를 같은 양 첨가하여  $\alpha=1$ 이 되도록 하였다. 여기서  $\alpha$ 는 유기상의 부피(*V*<sub>2</sub>)와 수용액상의

부피( $V_0$ )의 비를 나타낸 것이다. 반응 기질 및 효소의 농도는 전체부피(유기상 부피+수용액상 부피)를 기준으로 하여 Ac-Tyr-OH, Arg-NH<sub>2</sub> 그리고  $\alpha$ -chymotrypsin은 각각 10 mM, 20 mM 그리고 10  $\mu$ M이 되도록 하였다. 기질이 들어있는 수용액상은 arginine amide 1분자에 HCl염이 2분자가 결합하고 있기 때문에 pH의 감소가 일어나므로 2N NaOH를 사용하여 원하는 pH로 보정한 후 반응을 진행시켰다. 반응은 35°C 에서 24시간 동안 실시하였으며, 반응 중 미셀 형성을 방지하기 위하여 Khmelnsky 등<sup>18</sup>의 방법에 따라 항온수조내에서 조심스럽게 흔들어 주면서 진행하였다.

**Kyotorphin 유도체 합성에서 pH 및 온도의 영향.** Ac-Tyr-OH(10 mM), Arg-NH<sub>2</sub>(20 mM) 및  $\alpha$ -chymotrypsin(10  $\mu$ M)이 각각 함유되어 있는 ethyl acetate(2 ml)/완충용액(2 ml)의 이상계에서 pH 변화(5.0~10.0)와 온도 변화(20~50°C)에 따라 24시간 반응시켜 합성 수율을 계산하였다. 이때 완충용액으로는 0.2 M sodium acetate buffer(pH 5.0), 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.0~7.0), 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 및 0.2 M sodium carbonate buffer(pH 9.0~10.0)를 각각 사용하였다.

**Kyotorphin 유도체 합성에서 Ac-Tyr-OH와 Arg-NH<sub>2</sub> 농도비의 영향.** Carboxyl 성분인 Ac-Tyr-OH을 10 mM로 하고 amine 성분인 Arg-NH<sub>2</sub>의 농도를 5 mM에서 200 mM까지 변화시켜 Ac-Tyr-OH과 Arg-NH<sub>2</sub>의 농도비에 따른 Kyotorphin 유도체의 합성 수율에 미치는 영향을 검토하였다. 합성 수율은 pH 7.0, 35°C 에서 24시간 동안 반응하여 측정하였다.

**Kyotorphin 유도체 합성에서 효소농도의 영향.** Ethyl acetate 이상계( $\alpha=1$ )에 Ac-Tyr-OH(10 mM) 및 Arg-NH<sub>2</sub>(20 mM)를 가하고,  $\alpha$ -chymotrypsin 농도를 1  $\mu$ M에서 80  $\mu$ M까지 변화시켜 35°C, pH 7.0 에서 24시간 동안 반응한 후 합성 수율을 측정하였다.

**Kyotorphin 유도체 합성에서 이상계 비( $\alpha$ )의 영향.** Ethyl acetate의 유기상의 부피( $V_0$ )와 수용액상(10 mM Ac-Tyr-OH와 20 mM Arg-NH<sub>2</sub> 및 10  $\mu$ M  $\alpha$ -chymotrypsin 함유)의 부피( $V_0$ ) 비, 즉  $\alpha$ 의 값을 0, 0.33, 0.6, 1.0, 3.0, 7.0 및 15.0으로 하고, 전체부피를

4 ml로 하여 pH 7.0, 35°C 에서 24시간 반응시켜  $\alpha$ 의 변화에 따른 합성 수율의 효과를 검토하였다.

**Kyotorphin 유도체 합성에서 반응시간의 영향.** Ac-Tyr-OH(10 mM), Arg-NH<sub>2</sub>(20 mM) 및  $\alpha$ -chymotrypsin(10  $\mu$ M)이 각각 함유된 ethyl acetate 이상계( $\alpha=15.0$ )의 반응 혼합물을 pH 7.0, 35°C 에서 1 시간부터 72시간까지 시간의 경과에 따른 합성 수율의 변화를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**Kyotorphin 유도체(Ac-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>)의 합성에서 유기용매의 선택.** Ac-Tyr-OH과 Arg-NH<sub>2</sub>로부터의 Kyotorphin 유도체 합성은 수용액상과 소수성 유기용매가 공존하는 이상계내에서 ECS 조건에 따라 반응을 진행시켰으며, 수율은 HPLC 분석으로

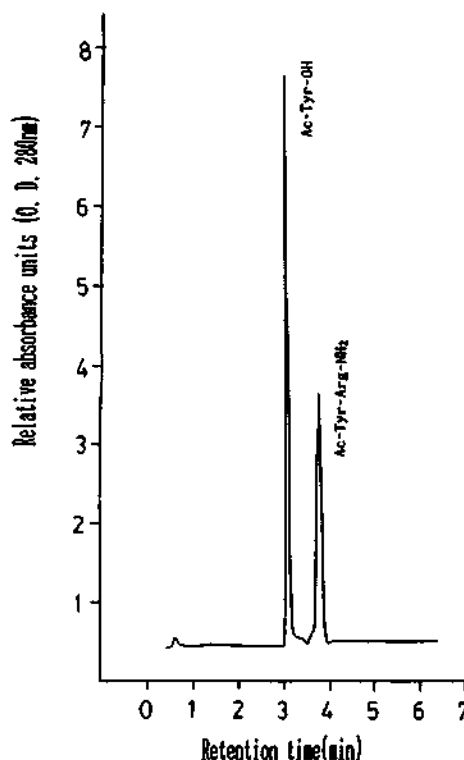


Fig. 1. The result of HPLC analysis after Kyotorphin derivative synthesis from Ac-Tyr-OH and Arg-NH<sub>2</sub>. Analytic conditions: column=C<sub>18</sub> RP-column 4.6×250 mm, flow rate=1 ml/mg, elution solvent=30%(v/v) acetonitrile, elution time=10 min.

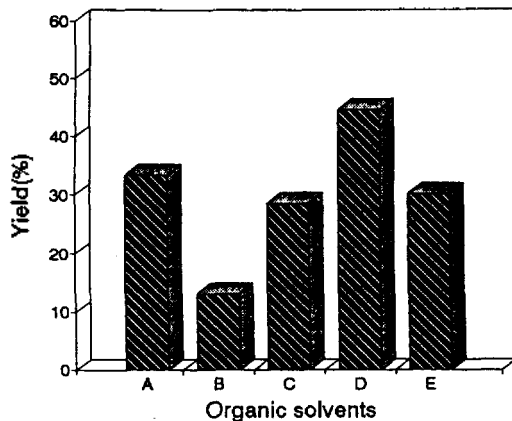


Fig. 2. The effect of water-immiscible organic solvent on Kyotorphin derivative synthesis in two-phase solvent system. The coupling between Ac-Tyr-OH (10 mM) and Arg-NH<sub>2</sub> (20 mM) was carried out in various two-phase system ( $\alpha=1$ ) with different organic solvents at 35°C, pH 9.0 for 24 hrs with  $\alpha$ -chymotrypsin (10  $\mu$ M). A: *n*-Butanol, B: Chloroform, C: Dichloromethane, D: Ethyl acetate, E: *n*-Hexane.

측정하였다(Fig. 1). 유기용매 중 ethyl acetate를 사용하였을 경우에 합성 수율이 44.6%로 가장 높았으며, chloroform을 사용하였을 경우에는 수율이 13.0%로 가장 낮았다(Fig. 2). Chaplin과 Bucke<sup>20</sup>에 의하면, ethyl acetate의 소수성도는 0.7인데 반하여 chloroform은 그보다 훨씬 더 큰 2.2의 수소성도를 가지고 있다고 하였는데, 이것으로 보아 합성 수율은 유기용매의 소수성도와 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다. Nakanishi 등<sup>13</sup>은 aspartame 전구체인 benzoyloxycarbonyl aspartyl phenylalanine methyl ester를 이상제에서 합성할 경우, 유기용매로 ethyl acetate를 사용하는 것이 1,2-dichloroethane과 chloroform을 사용하는 것보다 더 높은 수율을 얻었다고 보고하였다. 또한 Blanco 등<sup>21</sup>도 여러가지의 소수성 유기용매가 존재하는 이상제내에서 효소의 활성을 비교한 결과, ethyl acetate, dichloromethane, chloroform의 순으로 활성이 높은 것으로 보고하였다.

**Kyotorphin 유도체 합성에서 pH 및 온도의 영향.** Kyotorphin 유도체의 합성 수율에 미치는 pH의 영향은 Fig. 3과 같이 pH 7에서 50.9%로 가장 높았으며, pH 5와 pH 10에서는 각각 20.9%와 30.4%로 낮았다. 이 결과는  $\alpha$ -chymotrypsin의 가수분해할 때의 최적

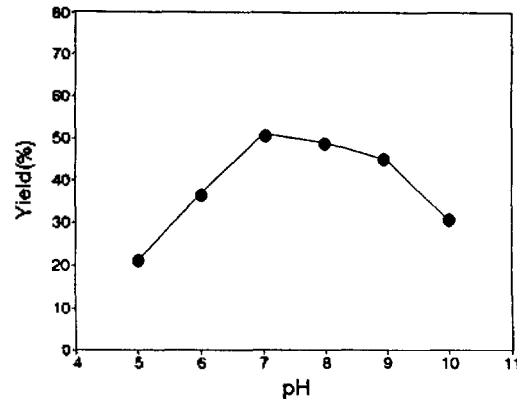


Fig. 3. The effect of pH on the yield of Kyotorphin derivative synthesis. The coupling between Ac-Tyr-OH (10 mM) and Arg-NH<sub>2</sub> (20 mM) was carried out in ethyl acetate/aqueous solvent system ( $\alpha=1$ ) at 35°C for 24 hrs with  $\alpha$ -chymotrypsin (10  $\mu$ M).

pH 조건인 8~9와는 다른 결과를 보이고 있는데, 대개 ECS 조건에 따라 역평형 반응을 진행하는 펩티드 합성은  $\alpha$ -아미노기와  $\alpha$ -카르복시기의 pK값 사이의 등전점 즉, 대개 pH 6~7 사이에서 이루어지는 것으로 알려져 있다. 따라서 pH 10 이상에서는 기질의 이온화에 의해서, 그리고 pH 6 이하에서는  $\alpha$ -chymotrypsin의 활성이 크게 저하되기 때문에 각각 수율이 감소하는 것으로 판단된다. Khmelnitski 등<sup>22</sup>도 ethyl acetate와 수용액의 이상제에서  $\alpha$ -chymotrypsin을 이용한 acetyltryptophanyl leucine amide 합성에 미치는 pH의 효과를 검토한 결과, pH 7, 10, 5의 순으로 합성 수율이 감소한다고 보고한 바 있다. 그러나 이러한 ECS 조건과는 달리 KCS 조건에서  $\alpha$ -chymotrypsin에 의한 펩티드 합성 수율은 대개 pH 9.0에서 가장 높다고 보고하였다<sup>21,23</sup>. 이러한 결과는 효소가 특이적으로 작용하는 기질의 carboxyl 말단에 활성 에스테르화의 존재 유무에 따라 그 차이가 있는 것으로 판단된다.

그리고 온도에 의한 영향(Fig. 4)은 30~40°C의 범위에서는 합성 수율이 50% 정도로 유지하였지만, 50°C 이상에서는 효소의 열역학적인 구조적 불안정성 때문에 활성의 저하로 수율이 매우 낮았다. 그러나 이와는 반대로 Meos 등<sup>24</sup>은 H-Tyr-OEt와 H-Arg-OH를 결합시켜 Kyotorphin을 합성할 때에 수용액의 ice 상태에서 80%의 수율을 얻었다고 하는 보고도

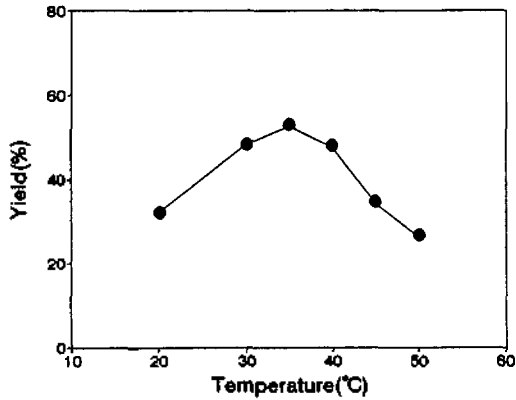


Fig. 4. The temperature dependence on the yield of Kyotorphin derivative synthesis. The coupling between Ac-Tyr-OH (10 mM) and Arg-NH<sub>2</sub> (20 mM) was carried out in ethyl acetate/aqueous solvent system ( $\alpha=1$ ) at pH 7 for 24 hrs with  $\alpha$ -chymotrypsin (10  $\mu$ M).

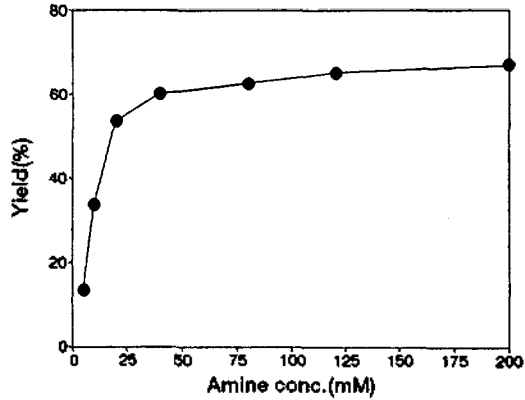


Fig. 5. The effect of amine concentration on Kyotorphin derivative synthesis. The coupling between Ac-Tyr-OH (10 mM) and Arg-NH<sub>2</sub> (5~200 mM) was carried out in ethyl acetate/aqueous solvent system ( $\alpha=1$ ) at pH 7 for 24 hrs with  $\alpha$ -chymotrypsin (10  $\mu$ M).

있다.

본 연구결과로만 볼 때, 상온조건하에서 실시된  $\alpha$ -chymotrypsin의 최적온도는 일반적으로 알려져 있는 가수분해 조건과 같은 경향을 보였지만, 최적 pH는 서로 다른 경향을 보였다.

**Kyotorphin 유도체 합성에서 Ac-Tyr-OH과 Arg-NH<sub>2</sub> 농도비의 영향.** Carboxyl 성분인 Ac-Tyr-OH의 농도를 10 mM로 고정해 두고 amine 성분인 Arg-NH<sub>2</sub>의 농도를 변화시켜 합성 수율에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다. 즉, Arg-NH<sub>2</sub>의 농도가 20 mM일 때까지는 수율이 53.4%로 급격하게 증가하였으나, 그 이후로는 완만한 증가를 보였다. 이러한 결과로 볼 때, ethyl acetate-수용액의 이상 계내에서의 합성 반응은 Ac-Tyr-OH과 Arg-NH<sub>2</sub> 농도비가 1:2 정도가 가장 적당하였다. Flörsheimer 등은 Eupergit C에 고정화시킨  $\alpha$ -chymotrypsin을 이용하여 N-formyltyrosylarginine propyl ester의 합성에서 N-formyltyrosyl propyl ester의 농도가 10 mM일 때 합성 수율은 arginine propyl ester의 농도가 10 mM될 때까지 급격하게 증가하였으나, 그 이상의 농도가 첨가하여도 수율은 완만하게 증가하였다고 보고하였다.

**Kyotorphin 유도체의 합성에서의 기질 및 효소 농도의 영향.** Ac-Tyr-OH(10 mM)과 Arg-NH<sub>2</sub>(20

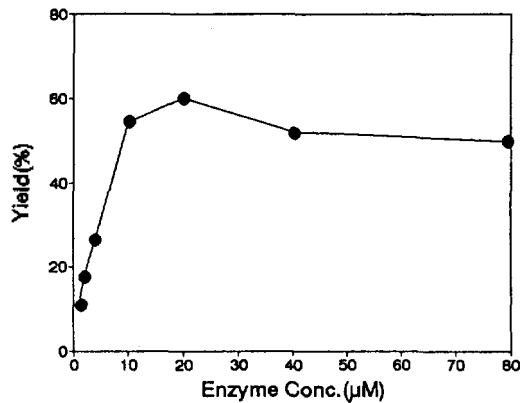


Fig. 6. The effect of enzyme concentration on Kyotorphin derivative synthesis. The coupling between Ac-Tyr-OH (10 mM) and Arg-NH<sub>2</sub> (20 mM) was carried out in ethyl acetate/aqueous solvent system ( $\alpha=1$ ) at pH 7 for 24 hrs with  $\alpha$ -chymotrypsin.

mM)의 기질 혼합액에 효소의 농도를 1~80  $\mu$ M까지 변화시켜 합성 수율을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 효소의 농도가 10  $\mu$ M까지는 수율이 거의 직선적으로 증가하여 60.1%를 얻었으나, 효소의 농도가 20  $\mu$ M 이상에서는 수율이 거의 일정하였다. Morihara와 Oka<sup>3</sup>는 10% dimethylformamide 유기용매하에서 0.1 M acetylphenylalanine ethyl ester와 0.1 M leucineamide의 합성 반응 중  $\alpha$ -chymotrypsin의 농도가 10  $\mu$ M일 때까지는 합성 수율이 급격히 증가하

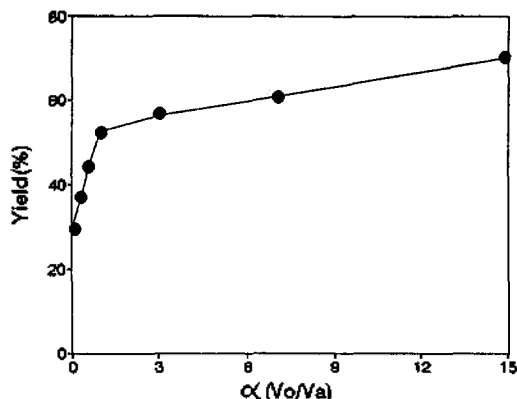


Fig. 7. The effect of  $\alpha$  ( $=V_o/V_a$ ) on Kyotorphin derivative synthesis in two-phase solvent system. The coupling between Ac-Tyr-OH (10 mM) and Arg-NH<sub>2</sub> (20 mM) was carried out at pH 7 for 24 hrs with  $\alpha$ -chymotrypsin (10  $\mu$ M).

였으나, 그 이상의 효소 농도가 첨가되어도 수율의 변화는 없었다고 보고하였다.

**Kyotorphin 유도체 합성에서 이상계 비( $\alpha$ )의 영향.** 전체부피를 4 ml로 고정하여 두고, 유기용매(ethyl acetate)의 부피와 수용액상의 부피의 비 즉,  $\alpha$ 값을 0에서 15까지 변화시켜 수율을 측정한 결과(Fig. 7),  $\alpha$ 값이 1일 때 52.6%까지 수율이 급격하게 증가하였으며,  $\alpha$ 값이 15일 때 70.2%로 가장 높은 수율을 얻었다. 따라서 본 실험의 조건하에서는  $\alpha$ 값이 증가할수록 수율이 증가하였다. 반응 중 소수성이 증가하는 펩티드기 형성되면 그 생성물은 유기상으로 이동하게 되고, 반응이 진행되는 수용액상에서는 평형이 계속해서 합성 방향으로 진행하게 된다. 따라서 유기상의 부피가 증가할수록 생성물의 저장 효율이 증가하기 때문에 합성 수율이 증가하는 것으로 판단된다. Khmel'nitski 등<sup>22</sup>은 acetyltrypophanyl leucineamide의 합성에서  $\alpha$ 값이 50일 때까지 직선적으로 수율이 증가하였으며, 그 이상의  $\alpha$ 값이 증가하여도 수율의 변화는 없었다고 보고하였다. 또한 Blanco 등<sup>21</sup>은 ethyl acetate 이상계에서  $\alpha$ -chymotrypsin의 안정성을 5시간 경과한 후 측정된 결과,  $\alpha$ 값이 10일 경우가 1일 경우보다 잔존활성이 약 20% 이상 더 높은 것으로 보고하였다. 따라서 이상계내에서 합성 반응 중 유기상의 부피가 펩티드 합성의 수율 및 안정성에 미치는 효과는 상당히 큰 것으로

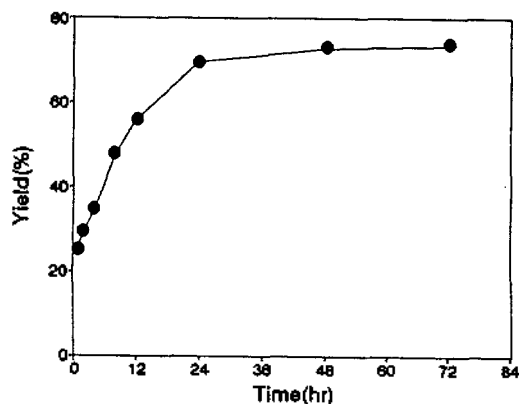


Fig. 8. The effect of reaction time on Kyotorphin derivative synthesis. The coupling between Ac-Tyr-OH (10 mM) and Arg-NH<sub>2</sub> (20 mM) was carried out with 10  $\mu$ M  $\alpha$ -chymotrypsin in ethyl acetate/aqueous solvent system ( $\alpha=15$ ) at pH 7.

판단된다.

#### Kyotorphin 유도체 합성에서 반응시간의 영향.

Ethyl acetate 유기용매상의 부피와 수용액상의 부피비 즉,  $\alpha$ 값을 15로 하여 Kyotorphin 유도체의 합성 수율을 시간 경과에 따라 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. 반응이 1시간 경과 후 수율은 23%였으며, 반응시간 24시간 경과하였을 때는 69.4%까지 급격하게 증가하였으나, 그 이상의 시간이 경과하여도 수율은 일정하였다. Clapes 등<sup>17</sup>은 Kyotorphin 유도체의 합성 반응을 KCS 조건에 따라 행한 결과, 반응시간 10분 이내에 수율이 평형에 도달하였다고 보고한 바 있다. 따라서 평형론적으로 조절된 합성법에 따른 Kyotorphin 유도체의 반응은 속도론적으로 조절된 합성법의 일반적인 반응속도에 비해 상당히 느리게 진행하였다. Clapes 등<sup>20</sup>은 KCS 조건에 따라 Kyotorphin 유도체를 합성한 결과, 반응시간 20분 경과한 후 60%의 합성 수율을 얻었다고 보고한 바 있다.

## 결 론

$\alpha$ -chymotrypsin 이용하여 이상계 조건하에서 Kyotorphin 유도체의 합성은 Ac-Tyr-OH와 Arg-NH<sub>2</sub>와의 축합반응에 의하여 여러가지 조건을 검토하면서 시도하였다. 먼저, Ac-Tyr-OH(10 mM)과 Arg-NH<sub>2</sub>(20 mM)와의 Kyotorphin 유도체의 합성을 이

상계의 비( $\alpha$ =유기상/수용액상)가 1인 반응계에서 합성 수율에 미치는 유기용매의 효과를 검토한 결과, dichloromethane, *n*-butanol, *n*-hexane, chloroform 및 ethyl acetate 등의 유기용매 중 ethyl acetate를 사용하였을 때 44.6%로 가장 높은 수율을 얻은 반면, chloroform을 사용하였을 경우는 13.0%로서 수율이 가장 낮았다. Kyotorphin 유도체의 합성에 미치는 최적조건을 보면, 기질 농도는 Ac-Tyr-OH 및 Arg-NH<sub>2</sub>가 각각 10 mM 및 20 mM, 효소 농도는 10  $\mu$ M였으며, 온도 및 pH는 각각 35°C 및 7.0이었다. Kyotorphin 유도체 합성의 최적 반응조건하에서 이 상계의 비( $\alpha$ )가 증가할 수록 수율은 증가하였으며, 합성반응은 24시간 후에 평형에 도달하였다.

이상과 같이 유기용매 내에서 효소를 이용한 Kyotorphin 유도체의 합성을 시도한 결과, 온화한 반응 조건하에서 수율이 비교적 높게 나타났으나 합성반응은 느리게 진행하였으므로, 기질인 Ac-Tyr-OH의 카르복시 말단을 적당하게 변형시키면 좀더 빠른 진행을 수행할 수 있을 것으로 기대한다.

## 인 용 문 헌

- Kasche, V.; Michaelis, G.; Galunsky, B. *Biotech. Lett.* **1991**, *13*, 75.
- Kimura, Y.; Nakanishi, K.; Matsuno, R. *Enzyme Microb. Technol.* **1990**, *12*, 272.
- West, J. B.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2728.
- Nilsson, K.; Mosbach, K. *Biotech. Bioeng.* **1984**, *26*, 1146.
- 相澤益男, 新酵素利用技術: シーエムシー編集部, 1988; p 95.
- Clapes, P.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. *J. Biotech.* **1990**, *15*, 323.
- Kise, H.; Hayakawa, A.; Noritomi, H. *J. Biotech.* **1990**, *14*, 239.
- Cassells, J. M.; Halling, P. J. *Biotech. Bioeng.* **1989**, *33*, 1489.
- Noritomi, H.; Kise, H. *Biotech. Lett.* **1987**, *6*, 383.
- Dordick, J. S. *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, *11*, 194.
- Homandberg, G. A.; Mattis, J. A.; Laskowski, M. *Biochemistry* **1978**, *17*, 5220.
- Semenov, A. N.; Berezin, I. V.; Martinek, K. *Biotech. Bioeng.* **1981**, *23*, 355.
- Nakanishi, K.; Kimura, Y.; Matsuno, R. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *161*, 533.
- Fastrez, J.; Fersht, A. R. *Biochemistry* **1973**, *12*, 2025.
- Morihara, K.; Oka, T. *Biochem. J.* **1977**, *163*, 531.
- Takagi, H.; Shiomi, H.; Ueda, H.; Amano, H. *Nature* **1979**, *282*, 410.
- Clapes, P.; Valencia, G.; Torres, J. L.; Reig, F.; Garcia-Anton, J. M.; Mata-Alvarez, J. *Biochimica et Biophysica Acta* **1988**, *953*, 157.
- Herrmann, G.; Schwarz, A.; Wandrey, C.; Kula, M. R.; Knaup, G.; Drauz, K. H.; Berndt, H. *Biotech. and App. Biochem.* **1991**, *13*, 346.
- Khmelnitsky, Y. L.; Levashov, A. V.; Klyachko, N. L.; Martinek, K. *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, *10*, 710.
- Chaplin, M. F.; Buche, C. In *Enzyme technology*; Cambridge University Press: Cambridge, U. K., 1990; p 220.
- Blanco, R. M.; Halling, P. J.; Bastida, A.; Cuesta, C.; Guisan, J. M. *Biotech. Bioeng.* **1992**, *39*, 75.
- Khmelnitski, Y. L.; Dien, F. K.; Semenov, A. N.; Martinek, K.; Veruovic, B.; Kubanek, V. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 4425.
- Aso, K. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 729.
- Meos, H.; Tougu, V.; Haga, M.; Aaviksaar, A.; Schuster, M.; Jakubke, H.-D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1559.
- Flörsheimer, A.; Kula, M.-R.; Schütz, H.-J.; Wandrey, C. *Biotech. Bioeng.* **1988**, *33*, 1400.
- Clapes, P.; Mata-Alvarez, J.; Valencia, G.; Reig, F.; Torres, J. L.; Garcia-Anton, J. M. *J. Chem. Tech. Biotech.* **1989**, *45*, 191.