

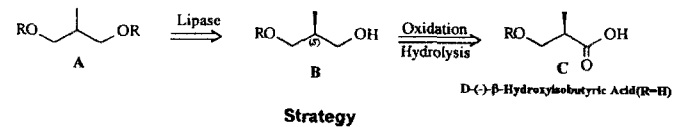
Lipase를 이용한 (S)-3-acetoxy-2-methylpropanol의 제조

서영배* · 서연찬 · 이갑득¹

한국과학기술연구원 생명공학연구소, ¹동국대학교 화학과

Preparation of (S)-3-acetoxy-2-methylpropanol with lipase. Young-Bae Seu*, Yun-Chan Su and Kap-Duk Lee¹. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea. ¹Department of Chemistry, Dongguk University, Kyungju 780-714, Korea – Optically active carboxylic acid, D-(–)-β-hydroxyisobutyric acid {(D)-(–)-HIBA} is a useful chiral starting material for the preparation of enantiomerically pure bioactive compounds which have a chiral methyl carbon center in the molecule such as captopril, α-tocopherol, erythromycin A, muscone and so on. (S)-3-Acetoxy-2-methylpropanol can be used as the precursor of (D)-(–)-HIBA, that is, chemical oxidation of the hydroxyl group and subsequent hydrolysis of acyl group in (S)-3-acetoxy-2-methylpropanol affords D-(–)-β-hydroxyisobutyric acid. (S)-3-Acetoxy-2-methylpropanol was prepared by lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis. In the enzymatic hydrolysis system, lipase AY (*Candida rugosa*) provided the expected (S)-3-acetoxy-2-methylpropanol in 60% e.e. of the enantiomeric purity under the phosphate buffer and organic co-solvent system.

D-(–)-β-Hydroxyisobutyric acid {(D)-(–)-HIBA}는 경구용 혈압강화제인 captopril, α-tocopherol, erythromycin A, muscone 등의 합성에 유용한 원료로 이용되는 광학활성 합성중간체이다. 이중 고혈압치료제인 captopril(1, 2)을 살펴보면 1977년 미국 Squibb사가 개발하여 물질특허를 획득한 이래 세계 의약품 시장에서 매출액 2위(15억 \$/1990년)를 차지하는 의약품이다. D-(–)-β-hydroxyisobutyric acid를 이용한 고혈압 치료제 captopril의 제조방법을 살펴보면 기존방법으로는 2가지 방법으로 대별할 수 있다. 첫째는 세계시장의 대부분을 차지하고 있는 일본 Kanegafuchi사의 isobutyric acid를 *C. rugosa*로 처리하여 얻은 D-(–)-β-hydroxyisobutyric acid를 이용한 방법(3)과 둘째는 racemic 형태의 3-acylthio-2-methylpropanoic acid의 광학활성 amine을 이용한 광학분할법등(4-6)을 들 수 있으나 순수화학적 방법인 후자의 방법이 경쟁력이 훨씬 떨어지는 것을 볼 수 있다. 그래서 세계 여러 group들이 captopril의 주요 합성중간체인 D-(–)-β-hydroxyisobutyric acid의 제조를 시도하였으나 대부분의 화학적 방법은 공정이 복잡하며, 생물학적인 방법은 낮은 수율을 나타내었다. 최근의 예를 보면 1991년 Kyowa Hakko팀이 2-methyl-1, 3-propanediol diacetate를 입체선택적인 부제가수분해 반응으로 (R)-3-acetoxy-2-methylpropanol을 제조하여 이를 이용하여 4 공정을 거쳐 (R)-(–)-HIBA 유도체인 (R)-(–)-3-(acetylthio)isobutyric acid로 전환시킨 예가 보고되어 있으며(7), 이와 유사한 방법의 것으로 1990년 Santaniello등에 의한 (S)-(–)-3-acetoxy-2-methylpro-



panol의 제조에 관한 보고가 있다(8, 9).

본 연구에서는 의약품을 중심으로 한 정밀화학 분야에서 거대한 시장을 형성하고 있는 광학활성 합성의약품의 개발에 있어서 필수적인 광학활성의약품 중간원료물질을 화학적인 방법과 생물학적인 방법을 혼용하여 즉, 화학합성에 의한 기질을 제조하여 여기에 입체선택적 성질(stereoselectivity)과 입체특이적 성질(stereospecificity)이 높은 생물학적 방법들 중에서 lipase를 이용한 부제가수분해반응(asymmetric hydrolysis)을 도입하여 개발하고자 하였다. 광학활성 합성중간원료중 대표적인 고혈압치료제 captopril의 중간원료로 이용되는 D-(–)-β-hydroxyisobutyric acid의 전구체로 –OH group을 산화시킨후 acyl group(R)을 가수분해 시킴으로써 D-(–)-β-hydroxyisobutyric acid C를 얻을 수 있는 (S)-3-acetoxy-2-methylpropanol B를 대칭형 합성기질 diester A로 부터 시중에서 대량으로 유통되는 lipase를 이용하여 개발을 시도하였다.

재료 및 방법

본 연구에서는 최종 개발목표로 한 D-(–)-β-hydroxyisobutyric acid {(D)-(–)-HIBA}를 얻을 수 있는 전구체로 (S)-3-acyloxy-2-methylpropanol을 선정하여 이의 –OH 그룹을 화학적으로 산화시킴으로써 D-(–)-β-hydroxyisobutyric acid를 제조할 목적으로 대칭형의 2-methyl-1,3-propanediol의 diester를 기질로 사용하여

*Corresponding author.

Key words: Lipase, (S)-3-acetoxy-2-methylpropanol, optically active, asymmetric hydrolysis, enantiomeric purity

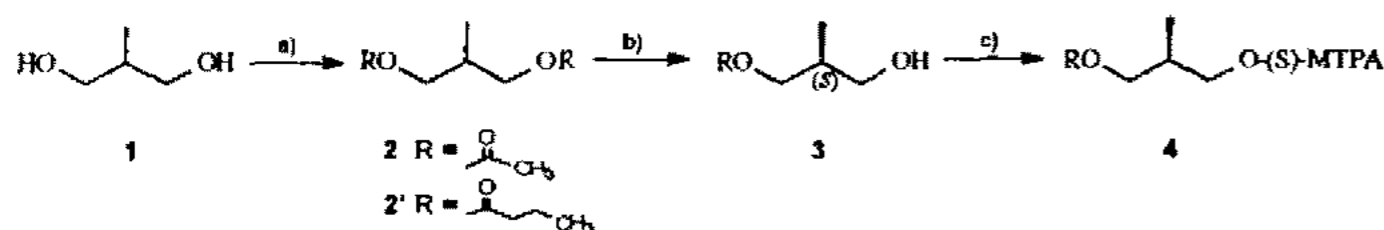
lipase를 이용한 부제가수분해반응으로 선택적으로 한쪽 부분의 ester 결합을 가수분해 시킴으로써 비대칭형의 (S)-3-acyloxy-2-methylpropanol의 개발을 시도하였다. 기질 diester는 2-methyl-1,3-propanediol로부터 합성하여 사용하였으며, lipase는 시판품을 구입하여 더 이상의 정제없이 사용하였다.

기질의 제조

2-methyl-1,3-propanediol diacetate : CaCl₂ 건조관을 부착한 잘 건조된 round flask에 2-methyl-1,3-propanediol 18.0 g(0.2 mol)과 pyridine 200 ml를 넣고 ice-bath 속에서 충분히 냉각시킨후 50.0 g의 acetic anhydride(또는 butyric anhydride)를 천천히 첨가한후 온도를 서서히 올려 실온에서 15시간 교반한후 반응액을 EtOAc에 희석시킨후 포화 CuSO₄ 수용액으로 충분히 씻은후 물, 포화 NaHCO₃ 수용액, brine 순으로 씻고 MgSO₄ 건조후 감압농축하여 crude oil 45 g을 얻었다. 이를 silica gel column chromatography로 정제한 다음 감압증류하여 diester 기질 2-methyl-1,3-propanediol diacetate 2를 31.5 g(91%) 얻었다.

Enzyme을 이용한 부제가수분해반응

지질가수분해효소(lipase)는 지방을 지방산과 글리세롤로 가수분해(hydrolysis)하는 효소로써 지질이외에도 에스테르(ester)형태의 다양한 화합물을 가수분해시킨다. Lipase가 촉매하는 반응은 일반적으로 수용액에서 에스테르를 산과 알코올로 가수분해시키는 반응 이외에도 유기용매중 즉, 소수성 환경하에서 반응시키면 수용액 반응에 비교해서 효소활성이 적고 반응속도가 느려지지만 넓은 기질특이성을 가지고 에스테르화(esterification) 또는 에스테르교환반응(transesterification) 등이 가능하다. Lipase는 이러한 반응중에 부제탄소(chiral carbon)를 인식하는 능력을 가지고 있어서 광학활성체를 제조하는 수단으로 근년에 와서 활발히 이용되고 있으며 본 실험에서도 이들중 lipase의 입체특이성(stereospecificity)을 이용한 부제가수분해반응(asymmetric hydrolysis)을 응용하였다.



a) acetic anhydride(or butyric anhydride)/pyridine b) lipase/buffer c) (R)-MTPA chloride/triethylamine

Synthesis of (S)-3-Acetoxy-2-Methylpropanol 3

사용 Enzyme

Screening에 사용된 enzyme은 시중에서 싼 값에 대량으로 쉽게 구할 수 있는 Amano, Sigma사 등의 제품을 구입하여 사용하였다.

Table 1. Used enzymes for screening of asymmetric hydrolysis

| Enzyme | Origin |
|-----------------------|--------------------------------|
| Lipase PS (Amano) | <i>Pseudomonas</i> sp. |
| Urase (Amano) | <i>Rhizopus niveus</i> |
| PPL (Sigma) | Porcine pancreas |
| Lipase A (Amano) | <i>Aspergillus niger</i> |
| Pancreatin (Amano) | Hog pancreas |
| Lipase M (Amano) | <i>Mucor javanicus</i> |
| Lipase P (Nagase) | <i>Pseudomonas</i> sp. |
| Steapsin (Tokyokasei) | Hog pancreas |
| WG (Sigma) | Wheat Germ |
| PLE (Sigma) | Esterase (Porcine Liver) |
| Toyobo-LIP (Toyobo) | Immobilized Lipase |
| F-AP15 (Amano) | <i>Rhizopus oryzae</i> |
| Acylase (Amano) | <i>Aspergillus species</i> |
| Acylase (Tokyokasei) | <i>Aspergillus species</i> |
| Lipase MY (Meito) | <i>C. cylindracea</i> nov. sp. |
| CCL (Sigma) | <i>Candida cylindracea</i> |
| Lipase AY (Amano) | <i>Candida rugosa</i> |
| Lipase OF (Meito) | <i>Candida cylindracea</i> |
| PLE Isolated | Pig liver esterase |

Lipase를 이용한 부제가수분해 반응

0.1M phosphate buffer 20 ml에 기질 diester 2 0.35 g (2 mmol)과 lipase AY 0.32 g을(무게비 90%)넣고 36시간동안 강렬하게 교반한후 소금을 넣고 EtOAc로 3회 추출한 후 포화 NaHCO₃ 수용액, 물, brine 순으로 씻고 건조(MgSO₄), 감압농축하여 조생성물 0.21 g을 얻었다. 이를 silica gel column chromatography(hexane : EtOAc=2 : 1)로 정제하여 0.16 g의 무색투명 oil상인 광학활성 (S)-(-)-2-methyl-1,3-propanediol monoacetate 3 [$[\alpha]_D^{25}$ -3.2 (CHCl₃), 광학순도 50% e.e.}을 얻었다.

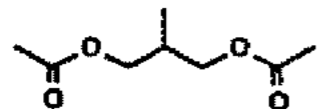
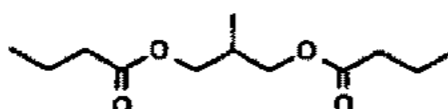
광학순도의 측정(10)

무수조건 하에서 lipase를 이용한 부제가수분해반응으로 얻어진 2-methyl-1,3-propanediol monoacetate 3 10 mg을 dry CH₂Cl₂ 0.5 ml에 녹인후 ice-bath에서 냉각시킨 상태에서 (S)-MTPA[(S)-(+)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetic acid]로부터 제조한 MTPA chloride 16 mg과 Et₃N 0.2 ml를 주입후 15시간 교반한 다음 반응액을 EtOAc에 희석시킨후 포화 CuSO₄ 수용액으로 씻은후 물, 포화 NaHCO₃ 수용액, brine 순으로 씻고 MgSO₄ 건조, 감압농축후 preparative TLC로 정제하여 (S)-MTPA ester 4를 얻어서 300 MHz ¹H-NMR로 광학순도를 측정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 화학적인 방법과 생물학적인 방법을

Table 2. Enantioselective hydrolysis of 2-methyl-1,3-propanediol diesters by various lipases

| Substrate & Condition |  | |  | | |
|-----------------------|---|--------------|---|--|--------------|
| | pH 7.0 [α] _D , CHCl ₃ | Con- fig. | pH 6.5 [α] _D , CHCl ₃ | pH 7.0 [α] _D , CHCl ₃ | Con- fig. |
| Lipase PS (Amano) | +5.0 | R | +5.5 | +3.1 | R |
| PPL | +2.4 | R | +0.6 | 0 | R |
| Lipase OF | -2.3 | S | -2.5 | 0 | S |
| CCL | -1.5 | S | +0.9 | 0 | R |
| Steapsin | +0.7 | R | +0.8 | +0.4 | R |
| Lipase MY | -4.3 | S | -2.0 | 0 | S |
| Toyobo-LIP | +2.0 | R | +2.0 | +1.5 | R |
| Lipase M | +2.5 | R | +3.3 | +2.4 | R |
| F-AP15 | +1.1 | R | +2.4 | +0.8 | R |
| Lipase A | +0.9 | R | +1.9 | +0.5 | R |
| Pancreatin | +1.7 | R | +0.7 | +1.3 | R |
| Urase | +1.9 | R | +3.3 | +2.2 | R |
| Lipase AY | -3.2 | S | +2.2 | +0.5 | R |
| Lipase P (Nagase) | +1.9 | R | +1.3 | +0.4 | R |
| WG | +0.9 | R | +1.5 | +0.9 | R |
| Acylase (Amano) | -2.0 | S | +0.8 | +1.0 | R |
| Acylase (T. Kasei) | -2.6 | S | +1.7 | +0.7 | R |
| PLE | +1.3 | R | +1.3 | +1.4 | R |
| PLE (Sigma) | +1.1 | R | +1.8 | +0.6 | R |

혼용한 방법 즉, 다양한 기질인 대칭 diester를 합성하여 여기에 입체선택적 성질(stereoselectivity)과 입체특이적 성질(stereospecificity)이 높은 lipase를 사용한 부제가수분해반응(asymmetric hydrolysis)을 이용하여 D-(-)-HIBA의 전구체인 (S)-type의 비대칭 광학활성 알코올 (S)-(-)-3-acyloxy-2-methylpropanol을 생산하는 효소와 반응조건을 screening 하였다. 손 쉽게 입수할 수 있는 2-methyl-1,3-propanediol로부터 아실화 반응(acylation)으로 acyl group인 acetyl, butyryl기를 도입한 대칭형 2-methyl-1,3-propanediol diester를 기질로 이용하여 시중에서 싼 값에 대량으로 구입할 수 있는 lipase 20종류를 선별하여 phosphate buffer 7.0의 조건 하에서 부제가수분해반응(asymmetric hydrolysis)으로 (S)-type의 비대칭 광학활성 알코올을 생산하는 lipase를 고유광회전도(specific rotation, [α]_D value) 값의 측정으로 screening 하였다(Table 2).

그 결과 대부분의 lipase들은 (R)-type의 3-acyloxy-2-methylpropanol을 생산하였으나 그중 (S)-type의 monoalcohol인 (S)-(-)-3-acyloxy-2-methylpropanol을 생산

Table 3. Selected enzymes for (S)-(-)-3-acetoxy-2-methylpropanol

| Enzyme | Origin |
|----------------------|-------------------------------------|
| Lipase AY (Amano) | <i>Candida rugosa</i> |
| Lipase MY (Meito) | <i>Candida cylindracea</i> nov. sp. |
| Lipase OF (Meito) | <i>Candida cylindracea</i> |
| CCL (Sigma) | <i>Candida cylindracea</i> |
| Acylase (Amano) | <i>Aspergillus</i> species |
| Acylase (Tokyokasei) | <i>Aspergillus</i> species |

하는 *Candida*와 *Aspergillus* 유래의 lipase 6종을 선별하였다(Table 2). 이들의 pH 영향은 pH 6.5~7.0 사이에서는 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나 저온에서 약간의 광학활성의 증가를 보였으며 그중 광학활성이 떨어지는 2종을 제외하고 4종의 *Candida* 유래의 lipase를 최종 선별 하였다(Table 3).

광학활성을 높이기 위하여 기질 2-methyl-1,3-propanediol diacetate에 대하여 선별된 lipase 4종을 이용한 여러 다양한 조건(유기용매의 첨가, 효소의 고정화, 온도조절)하에서의 specific rotation [α]_D 값을 조사하였으며, 그중 lipase AY-phosphate buffer pH 6.5/isobutyl alcohol(1/1), 0°C의 조건에서 최고의 광학선택성인 광학순도 60% e.e.(enantiomeric excess)를 나타내었다.

최적조건 : Lipase AY in phosphate buffer pH 6.5/
isobutyl alcohol (1/1) at 0°C

Optical Purity : [α]_D -3.8, (CHCl₃), 60% e.e.
Chemical Yield : 65%

요 약

Captopril, α -tocopherol, erythromycin A, muscone과 같은 의약품, 향료등 생리활성물질의 합성에 있어서 유용한 중간원료로 이용되는 광학활성인 D-(-)- β -hydroxyisobutyric acid를 제조하기 위하여 그 전구체로 (S)-(-)-3-acyloxy-2-methylpropanol을 선정하여 lipase의 부제가수분해반응을 이용하여 이의 개발을 시도하였다. 대칭성 기질 2-methyl-1,3-propanediol diacetate 2를 다양한 lipase를 사용하여 부제가수분해(asymmetric hydrolysis)시킨 결과 lipase PS(Amano 제약, *Pseudomonas* sp.)의 경우는 phosphate buffer pH 7.0 조건 하에서 광학순도(optical purity) 95% e.e.의 (R)-(-)-3-acetoxy-2-methylpropanol을 80%의 수율로 생산하였으며, lipase AY(*Candida rugosa*)의 경우는 phosphate buffer pH 6.5/isobutyl alcohol (1/1), 0°C의 조건하에서 목적으로 한 (S)-(-)-3-acetoxy-2-methylpropanol 3을 광학순도 약 60% e.e.로 생산하였다.

참고문헌

1. Ondetti, M.A., B. Rubin, and D.W. Cushman. 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agent. *Science* **196**: 441-444.
2. Ondetti, M.A. and D.W. Cushman. 1977. *Jpn. Kokai Tokkyo, JP* 52-116457.
3. Hasegawa, J., M. Ogura, S. Hamaguchi, M. Shimazaki, H. Kawaharada, and K. Watanabe. 1981. Stereoselective conversion of isobutyric acid to β -hydroxyisobutyric acid by microorganisms. *J. Ferment. Technol.* **59**: 203-208.
4. Iwao, J., M. Oya, E. Kato, and T. Watanabe. 1979. *Jpn. Kokai Tokkyo, JP* 54-151912.
5. Houbiers, J.P.M. 1980. *Jpn. Kokai Tokkyo, JP* 55-38386.
6. Ohashi, N., S. Nagata, and S. Katsube. 1981. *Jpn. Kokai Tokkyo, JP* 56-7756.
7. Mochida K. and T. Uejima. 1991. *Jpn. Kokai Tokkyo, JP* 3-19698.
8. Santaniello, E., P. Ferraboschi, and P. Grisenti. 1990. An efficient chemo-enzymatic approach to the enantioselective synthesis of 2-methyl-1,3-propanediol derivatives. *Tetrahedron Letters* **31**: 5657-5660.
9. Grisenti, P., P. Ferraboschi, A. Manzocchi, and E. Santaniello. 1992. Enantioselective transesterification of 2-methyl-1,3-propanediol derivatives catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase in an organic solvent. *Tetrahedron* **48**: 3827-3834.
10. Dale J.A. and H.S. Mosher. 1973. Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Configurational correlations *via* nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelate, O-methylmandelate, and α -methoxy- α -trifluoromethylphenyl acetate (MTPA)esters. *J. Am. Chem. Soc.* **95**: 512-519.

(Received 19 November 1995)