

*Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 3-chloro-4-fluoropropiophenone 환원 반응 최적화

이해룡, 정 민, 유익근, 홍순호*

Optimization of Reduction of 3-chloro-4-fluoropropiophenone by Whole Cells of *Saccharomyces cerevisiae*

Hae Ryong Lee, Min Jeong, Ik-keun Yoo, and Soon Ho Hong*

접수: 2011년 11월 11일 / 게재승인: 2011년 11월 29일
 © 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Reduction of 3-chloro-4-fluoropropiophenone by *Saccharomyces cerevisiae* as a whole cell biocatalyst was optimized. Effects of glucose, *S. cerevisiae* and 3-chloro-4-fluoropropiophenone concentrations on conversion of reduction reaction was investigated. Optimum concentrations of glucose, *S. cerevisiae* and 3-chloro-4-fluoropropiophenone were 100, 40 and 20 g/L, respectively. At optimum condition, 100% of conversion was achieved in 12 hours of reaction.

Keywords: 3-Chloro-4-fluoropropiophenone, *Saccharomyces cerevisiae*, Reduction, Biotransformation

1. 서론

파록세틴 (Paroxetine)은 선택적 세로토닌 재흡수 억제 항우울제이며, SmithKline Beecham에서 Seroxat와 Paxil이란 상품명으로 1992년 출시하였다. 제품으로 출시 이후 파록세틴은 항우울제 시장 선두제품으로 자리를 잡고 우울증, 강박장애, 공황 장애, 사회 공포증과 범불안장애 치료에 사용되고 있다 [1]. 다른 의약품과 마찬가지로 파록세틴은 광학적으로 순수 (Enantiopure)하여야 한다. 현재 사용하는 생산 공정에서는 화학적인 방법을 이용하여 광학순수한 파록세틴을 생산

하고 있지만 사용되는 화학적 공정의 단점인 높은 단가 및 낮은 효율로 인하여, 핵심 중간체인 3-chloro-4-fluoro-(1S)-hydroxyphenylpropane를 직접 생산하는 공정에 많은 관심이 집중되고 있다 [2-5].

3-chloro-4-fluoropropiophenone 광학활성 환원반응의 산업적 중요성에도 불구하고, 이에 대한 연구는 아직 한번도 보고되지 않았다. 본 연구진은 *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast)을 이용하여 3-chloro-4-fluoropropiophenone 환원반응을 수행하였다 (Fig. 1). 낮은 가격과 이용의 편의성, GRAS (generally regarded as safe)인증 등을 고려할 때, 효모는 효율적인 장점을 지닌 바이오 촉매라고 할 수 있다. 특히, 인체에 사용되는 의약품 전구체의 생산에 매우 적합한 바이오 촉매로 여겨지고 있으며, 다양한 광학활성 환원반응의 바이오 촉매로서 널리 활용 되어 왔다 [6-9]. 본 연구에서는 *S. cerevisiae*을 이용한 3-chloro-4-fluoropropiophenone 환원반응에 영향을 미치는 다양한 인자들을 분석하였으며, 이를 바탕으로 3-chloro-4-fluoropropiophenone 환원반응의 최적화를 수행하였다.

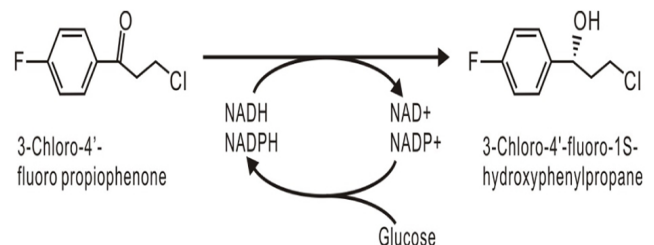


Fig. 1. Schematic diagram of the 3-chloro-4'-fluoropropiophenone reduction with *S. cerevisiae*.

울산대학교 화학공학부
 School of Chemical Engineering, University of Ulsan, 93 Daehakro,
 Nam-gu, Ulsan 680-749, Korea
 Tel: +82-52-259-1293, Fax: +82-52-259-1689
 e-mail: shhong@ulsan.ac.kr

2. 재료 및 방법

2.1. 3-Chloro-4-fluoropropiophenone 합성

Fluorobenzene 19.5 mL와 dichloromethane 200 mL를 상온에서 혼합하여 5분 가량 교반 한 후, 3-chloropropionyl chloride 20.8 mL를 투입하여 5분간 교반하였다. 교반한 혼합물을 10°C로 냉각하여 AlCl₃를 서서히 투입한 후, 6시간 동안 80°C로 가열하였다. 상온으로 냉각된 혼합물에 HCl 18 mL를 첨가하여 1시간동안 80°C에서 교반을 하였다. 교반된 반응물에 H₂O 250 mL를 천천히 투입하여 상온에서 교반한다. 반응물을 Separate funnel을 이용하여 분리하고, 아래층의 용액을 수집하였다. 수집된 용액 속의 dichloromethane를 evaporator를 이용하여 제거하였다. Toluene : Heptane = 1 : 5 (15 mL : 75 mL)를 첨가 후, 다시 80°C로 2시간 동안 교반하여, 상온으로 냉각 후 3시간 동안 교반하였다. 만들어진 결정을 filtering하여 heptane으로 washing 한 후, 건조하여 생산물을 회수하였다.

2.2. 3-Chloro-4-fluoropropiophenone 환원반응

바이오 촉매로써 효모 중 *S. cerevisiae*을 사용하여 3-chloro-4-fluoropropiophenone 환원반응을 수행하였다. 다양한 농도의 포도당과 *S. cerevisiae* (Sigma-Aldrich), 3-chloro-4-fluoropropiophenone를 혼합하고, 100 mM의 phosphate buffer solution을 첨가하여 총 부피를 5 mL로 맞추었다. 준비된 혼합물을 30°C의 shaking incubator (RPM 200)에서 6시간 동안 반응하였으며, 1 M의 NaOH 수용액을 첨가하여 반응용액의 pH를 7로 조절하였다. 6시간 후 반응물을 SPE (Solid Phase Extraction) 방법으로 분리하고 GC로 분석하였다. GC에 사용된 컬럼은 Varian CP Chirasil DEX-CB (25 m × 0.32 mm × 0.25 μm) 이다. 환원반응의 전환율은 아래와 같이 계산하였다.

$$Conversion(\%) = \frac{[S_0] - [S]}{[S_0]} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 3-Chloro-4-fluoropropiophenone 합성

Fluorobenzene 19.5 mL과 3-chloropropionylchloride 20.8 mL (총 40.3 mL, 47.5 g)을 이용하여 순수한 3-chloro-4-fluoropropiophenone 41.6 g을 합성하였고, 수율은 87.6%이다. 반응 후, 결과물을 TLC (Hexane : Ethyl Acetate = 4 : 1, R_f : 0.65)와 NMR로 확인하였다 (Fig. 2).

3.2. 3-Chloro-4-fluoropropiophenone 환원반응

*S. cerevisiae*을 이용하여 합성된 3-chloro-4-fluoropropiophenone 환원반응을 수행하였다. 환원반응조건의 최적화를 위하여 다양한 농도의 포도당과 *S. cerevisiae*, 3-chloro-4-fluoropropiophenone을 이용한 환원반응을 수행하였다 (Table 1). 첫째, *S. cerevisiae*, 3-chloro-4-fluoropropiophenone

의 농도를 각각 40, 20 g/L로 고정하고 포도당의 농도를 50, 100, 150 g/L로 변화시키면서 환원반응을 수행하였다. 포도당의 농도 변화에서는 100 g/L의 포도당을 첨가하였을 경우 98.1%의 가장 높은 전환율 (Conversion)을 확인하였다. 둘째, 3-chloro-4-fluoropropiophenone의 농도가 환원반응에 미치는 영향을 분석하기 위하여 3-chloro-4-fluoropropiophenone의 농도를 10, 20, 50 g/L로 변화시키면서 반응을 수행하였으며, 20 g/L의 3-chloro-4-fluoropropiophenone를 이용하였을 경우 가장 높은 전환율을 확인하였다. 셋째, *S. cerevisiae*의 농도를 10, 20, 40 g/L으로 변화시키면서 반응을 수행한 결과, 40 g/L의 *S. cerevisiae*을 환원반응에 이용하였을 경우 가장 높은 전환율을 확인하였다. 각 조건변화 실험 결과로부터 최적의 조건은 포도당, *S. cerevisiae*, 3-chloro-4-fluoropropiophenone 농도는 각각 100, 40, 20 g/L임을 확인하였으며, 이 조건에서 98.1%의 전환율을 달성하였다 (Table 1).

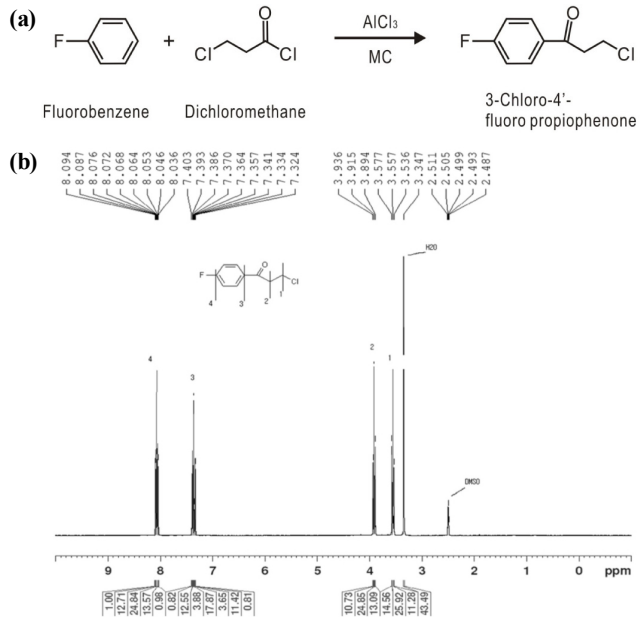


Fig. 2. (a) Schematic diagram of the 3-chloro-4'-fluoropropiophenone synthesis. (b) NMR result of synthesized 3-chloro-4'-fluoropropiophenone.

Table 1. Effect of glucose, yeast and 3-chloro-4'-fluoropropiophenone concentrations on the reduction of 3-chloro-4'-fluoropropiophenone with *Saccharomyces cerevisiae*. The 5 ml of reaction mixture was stirred for 6 h at 30°C and pH was maintained at 7.

Glucose (g/L)	Dried yeast (g/L)	3-chloro-4'-fluoropropiophenone (g/L)	Conversion (%)
50	40	20	95.8
100	40	20	98.1
150	40	20	97.4
100	40	10	95.8
100	40	20	98.1
100	40	50	97.5
100	10	20	97.1
100	20	20	97.2
100	40	20	98.1

다음으로 3-chloro-4-fluoropropiophenone 환원반응의 전환율을 시간에 따라 분석하였다 (Fig. 3). 반응의 전환율은 시작 2시간 후까지 급격히 증가하여 약 50%의 전환율을 나타내었다. 그 이후 전환율의 증가속도는 이전과 비교하면 현저히 감소하였으며, 완만한 기울기를 보인다. 이후 서서히 전환율이 증가하며 12시간 후에 100%의 전환율을 달성하였다.

본 환원반응의 예상 생산물인 3-chloro-4-fluoro-(1S)-hydroxyphenylpropane을 분석하였다. 반응 초기에는 3-chloro-4-fluoro-(1S)-hydroxyphenylpropane만 환원반응의 결과물로서 생산이 이루어지지만, 약 5시간 후부터 3-chloro-4-fluoro-(1R)-hydroxyphenylpropane의 생산이 동시에 이루어짐을 확인하였다 (data not shown). 반응 후 8시간이 경과한 다음부터는 생산물속의 3-chloro-4-fluoro-(1R)-hydroxyphenylpropane의 비율이 지속적으로 증가하였다.

3-chloro-4-fluoropropiophenone 환원반응은 성공적으로 이루어졌지만, 반응 생산물의 광학활성은 원하는 수준에 도달하지 못하였다. 따라서, 본 연구에서 사용된 *S. cerevisiae* 이외의 다양한 바이오 촉매를 테스트하여 높은 전환율과 함께 높은 광학활성을 보여주는 최적의 바이오 촉매를 찾는 후속 연구의 수행이 필요하다.

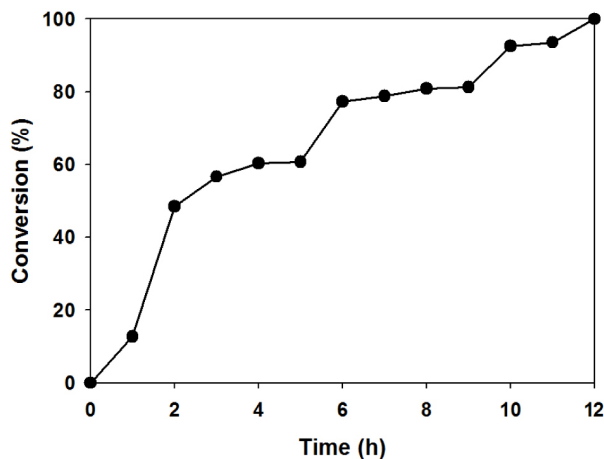


Fig. 3. Time profile of 3-chloro-4'-fluoropropiophenone reduction reaction.

4. 결론

본 연구에서는 *S. cerevisiae*를 바이오 촉매로 이용한 3-chloro-4-fluoropropiophenone 환원반응의 최적화를 수행하였

다. 실험 결과 최적의 포도당, *S. cerevisiae*, 3-chloro-4-fluoropropiophenone 농도는 각각 100, 40, 20 g/L임을 확인하였다. 최적의 조건에서 환원반응을 수행하였을 경우, 12시간 반응 후에 100%의 환원율을 얻었다.

감사

본 연구는 2011년도 울산대학교 연구비의 지원으로 이루어졌습니다.

References

1. Katzman, M. A. (2009) Current considerations in the treatment of generalized anxiety disorder. *Adis International LTD, New Zealand. CNS Drugs* 23: 103-120.
2. Glieder, A., R. Weis, W. Skranc, P. Poehchlauer, I. Dreveny, S. Majer, M. Wubbolts, H. Schwab, and K. Gruber (2003) Comprehensive step-by-step engineering of an (R)-hydroxynitrile lyase for large-scale asymmetric synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 4815-4818.
3. Sun, Y., X. Wan, J. Wang, Q. Meng, H. Zhang, L. Jiang, and Z. Zhang (2005) Ru-catalyzed asymmetric hydrogenation of α -Ketoesters with $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ as additive. *Org. Lett.* 7: 5425-5427.
4. Uhm, K., S. Lee, H. Kim, H. Kang, and Y. Lee (2007) Enantioselective resolution of methyl 2-chloromandelate by candida antarctica lipase A in a solvent-free transesterification reaction. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 45: 34-38.
5. van Langen, L. M., R. P. Selassa, F. van Rantwijk, and R. A. Sheldon (2005) Cross-linked aggregates of (R)-oxynitrilase: a stable, recyclable biocatalyst for enantioselective hydrocyanation. *Org. Lett.* 7: 327-329.
6. Johanson, T., M. Carlquist, C. Olsson, A. Rudolf, T. Frejd, and M. F. Gorwa-Grauslund (2008) Reaction and strain engineering for improved stereo-selective whole-cell reduction of a bicyclic diketone. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 1111-1118.
7. Katz, M., I. Sarvary, T. Frejd, B. Hahn-Hägerdal, and M. F. Gorwa-Grauslund (2002) An improved stereoselective reduction of a bicyclic diketone by *Saccharomyces cerevisiae* combining process optimization and strain engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 641-648.
8. Li, G., K. Huang, Y. Jiang, and P. Ding (2007) Production of (R)-mandelic acid by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* on chitosan carrier. *Process Biochem.* 42: 1465-1469.
9. de Souza Pereira, R. (1998) The use of baker's yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds. *Crit. Rev. Biotechnol.* 18: 25-83.