

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0099763 (43) 공개일자 2009년09월23일
(51) Int. Cl. <i>C07D 301/04</i> (2006.01) <i>C07D 301/02</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0024937 (22) 출원일자 2008년03월18일 심사청구일자 2008년03월18일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내 (72) 발명자 정진현 서울 동대문구 이문2동 삼성래미안아파트 202동 101호 심유란 서울 동대문구 이문2동 334-26, 102호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 안소영	

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) (2R,3S)-(3-(치환된메틸)-옥시란-2-일)메탄올의 신규한제조방법

(57) 요약

본 발명은 라세미체인 시스-(3-(치환된메틸)옥시란-2-일)메틸아세테이트를 반응용매 중에 효소 PPL(porcine pancreatic lipase)로 가수분해시켜 동적분할하는 단계를 포함하는 광학이성질체인 (2R,3S)-(3-(치환된메틸)-옥시란-2-일)메탄올을 고순도 및 고수율로 제조하는 방법을 제공한다.

(72) 발명자

왕방

서울 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 약학대학
509호

문한서

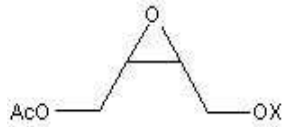
서울 동대문구 회기동 102-99 장미원빌라 201호

특허청구의 범위

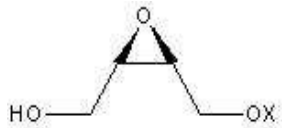
청구항 1

라세미체인 하기 화학식1 화합물을 반응용매 중에 효소 PPL(porcine pancreatic lipase)로 가수분해시켜 동적분할하는 단계를 포함하는 광학이성질체인 화학식2 화합물의 제조방법:

[화학식1]



[화학식2]



상기식에서,

Ac는 아세틸기를 의미하며,

X는 C1~C6의 알칸, C2~C3의 알켄, 벤젠 또는 나프탈렌이며, 여기서 알칸 및 알켄은 비치환되거나, 플로로, 클로로, 브롬, 요오드, 니트로, 벤젠, 나프탈렌으로 1이상 치환된 것이다.

청구항 2

제1항에 있어서, X가 벤질인 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 반응 용매가 크실렌(xylene)인 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 반응 용매가 유기용매 및 완충액의 혼합용매인 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 반응용매가 유기용매 및 완충액이 1:1 부피비로 혼합된 것인 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 유기용매가 유기용매의 극성도와 관계된 log P값이 3.00 내지 3.50인 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 유기용매가 크실렌, 시클로헥산 또는 헥산인 제조방법.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 완충액이 포스페이트 완충액인 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 완충액의 pH가 6.5 내지 7.9인 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 완충액의 pH가 7.2인 제조방법.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 반응온도가 25℃인 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

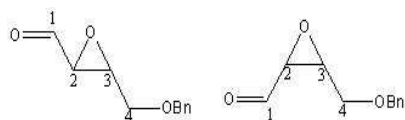
기술 분야

<1> 본 발명은 (2R,3S)-(3-(치환된메틸)-옥시란-2-일)메탄올을 입체선택적으로 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 3-(벤질옥시메틸)옥시란-2-카르브알데히드는 하기 구조식1으로 나타낼수 있으며 4개의 탄소 모두가 완전하게 기능화된 화합물로서 생물학적 활성 천연물의 중요한 구성 단위이다(Lanier. M.; Pastor, R. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2491-2492; (b) Righi, G.; Rumboldt, G. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3557-3560; (c) Concellon, J. M.; Bardales, E. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 189-191; (d) Ichikawa, E.; Kato, K. *Synthesis* **2002**, 1-28; (e) Tosaki, S.; Nemoto, T.; Ohshima, T.; Shibasaki, M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 495-498; (f) Concellon, J. M.; Bardales, E.; Llavona, R. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1585-1588. 참고)(하기 구조식 1에서, Bn은 벤질기를 의미한다).

<3> [구조식 1]



<4>

<5> 특히 상기 구조식 1의 화합물 중 광학이성질적으로 순수한 이성질체는 위치선택적(regioselective) 및 입체선택적(stereoselective) 고리 열림 반응, 상호교환반응(metathesis) 또는 비대칭 알돌 응축반응(asymmetric aldol condensation)을 통한 전합성에서 다양한 중간체로 사용된다. 예를 들어, 상기 구조식 1의 시스-화합물의 아세토니드(acetonide) 형태는 고리형 구아니딘-당(cyclic guanidine-sugar)의 전합성에서 출발물질로 사용되며, 시스-화합물의 3탄소 위치에 메틸기가 치환된 화합물은 포막틴A(phomactin A)의 3개의 고리 내부를 구성하는 결정적인 중간체로 사용된다(Mohr, P. J.; Halcomb, R. L. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2413-2416 참조).

<6> 또한, 상기 구조식의 화합물은 베이리스-힐만 반응[Baylis-Hillman reaction(Krishna, P. R.; Lopinti, K. R.; Kannan, V. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7874-7850 참조)], 위티그 반응[Wittig reaction(Choudary, B. M.; Mahendar, K.; Kantam, M. L.; Ranganath, K. V. S.; Athar, T. *Adv. Synth.Catal.* **2006**, *348*, 1977-1985 참조)], 무카이야마 알돌리제이션[Mukaiyama aldolisation(Ruland, Y.; Noereuil, P.; Baltas, M. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8895-8903 참조)]과 같은 다양한 반응 방법 개발을 위한 선구물질로 사용된다.

<7> 따라서, 많은 유용한 물질의 전합성에서 중간체로 이용되는 상기 구조식 화합물의 광학이성질체를 수득하는 효율적인 방법 개발이 현재 주요 이슈화 되고 있다. 이와 더불어, 상기 구조식1의 화합물 중 특정 광학이성질체인 (2R, 3S)-3-치환된 옥시란-2-카르브알데히드를 제조하는 방법에 있어서, 출발물질로 사용가능한 (-)-(2R, 3S)-옥시란-2-일-메탄올의 효과적인 입체선택적 방법의 개발도 요구되고 있다.

<8> PPL(porcine pancreatic lipase)은 가수분해 및 에스테르 교환반응 효소이며, 리파아제 류 중에서도 순도가 높고 생산단가가 낮으며, 다른 리파아제들 보다 더 친유성인 것으로 알려져 있다. 또한 크루트한 PPL은 수-유기 용매에서 그들의 표면을 더 증가시키고, 효소 표면 주변의 내부 안에 필수적으로 존재하는 물은 리파아제 활성을 유지시키고 유기용매 중 효소의 표면에 기질이 더 잘 결합되게 한다고 보고되어진다(Hazarika, S.; Goswami, P.; Dutta, N. N.; Hazarika, A. K. *Chem. Eng. J.* **2002**, *85*, 61-68. 참조). 그러나 PPL이 분자량이 작은 분자인 옥시란(oxirane) 화합물의 동적분할(kinetic resolution)에 사용된 예는 매우 적다. 예를 들어, PPL에 의한 아세틸 교환 반응을 통한 시스-3-((벤질옥시메틸)옥시란-2-일)메탄올의 동적 분할은 시스-(+)-(2S,3R)-옥시란-2-일-메탄올이 더 잘 일어난다고 보고되어 있을 뿐이다(Ferenc Faigl Angelika Thurner Melinda Battancs Ferenc Farkas Laszlo Poppe Viktoria Bodai Ildiko Kmezc Bela Simandi *Tetrahedron : Asymmetry*, **2005**, *16*,

3841-3847 참고). 즉, 현재까지 PPL 효소를 이용한 (-)-(2R, 3S)-옥시란-2-일 -메탄올의 효과적인 동적 분할은 보고된바가 없다.

발명의 내용

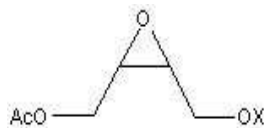
해결 하고자하는 과제

<9> 본 발명의 목적은 (2R,3S)-(3-(치환된메틸)-옥시란-2-일)메탄올을 입체선택적으로 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

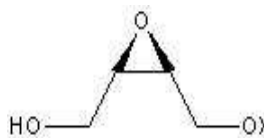
과제 해결수단

<10> 본 발명은 라세미체인 하기 화학식1 화합물을 반응용매 중에서 효소 PPL(porcine pancreatic lipase)로 가수분해시켜 동적분할하는 단계를 포함하는 광학이성질체인 화학식2 화합물의 제조방법을 제공한다.

<11> [화학식1]



<13> [화학식2]



<15> 상기식에서,

<16> Ac는 아세틸기를 의미하며,

<17> X는 C1~C6의 알칸, C2~C3의 알켄, 벤젠 또는 나프탈렌이며, 여기서 알칸 및 알켄은 비치환되거나, 플로로, 클로로, 브롬, 요오드, 니트로, 벤젠, 나프탈렌으로 1이상 치환된 것이며, 바람직하게는 플로로, 클로로, 브롬, 요오드, 니트로, 벤젠, 나프탈렌으로 1이상 치환된 C1~C6 알칸이며, 더욱 바람직하게는 벤질(benzyl, Bn)이다.

<18> 본 발명의 제조방법에서, 반응 용매는 다양한 극성도를 가지는 유기용매일 수 있으며, 크실렌(xylene)이 바람직하다. 보다 바람직한 반응 용매는 완충액 및 유기용매의 혼합용매 일 수 있다. 본 발명에서 사용되는 바람직한 완충액은 pH=7.2의 포스페이트 완충액이고, 리파아제 촉매에 의해 가수분해되어 반응 환경이 점차적으로 산화될 경우 [2,2,1]-이환 올소에스테르 중간체([2,2,1]-bicyclic orthoester intermediate)의 재배열(rearrangement)을 통해 2-메틸-D-에리트리톨로 전환되는 것을 방지한다. 따라서, 완충액과 유기용매의 혼합용매의 사용은 단순히 유기용매만을 사용한 경우보다 산성 생성물을 즉시 중성화하여 생성물인 옥시란 환이 추가로 분열되는 것을 억제하는 효과가 있다.

<19> 완충액 및 유기용매의 혼합비는 본 발명의 목적을 만족하는 한 다양하게 변화할 수 있다. 예를 들어 완충액 및 유기용매는 1:10 내지 10:1의 부피비로 혼합될 수 있으며, 바람직한 부피비는 1:1 부피비(v/v)이다.

<20> 본 발명에서 사용되는 완충액 및 유기용매의 혼합용매에서, 유기용매의 극성도와 관계된 log P값은 3.00 내지 3.50인 것이 바람직하다. 여기서 log P는 1-옥탄올 및 물의 이중상 시스템(two-phase system)을 기준으로 한 용매의 분배계수의 로그값으로 정의되며, 극성도를 나타낸다. 이러한 유기용매의 log P값은 PPL 효소에 의한 가수분해의 결과비와 일치하는 값으로 중요한 매개변수이다. 즉, log p값이 클수록 극성용매이다.

<21> 완충액 및 유기용매의 혼합용매에서, 유기용매는 크실렌, 시클로헥산, 헥산과 같은 비극성용매가 보다 바람직하다.

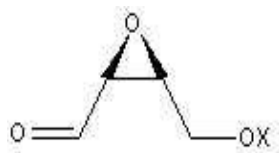
<22> 본 발명의 완충액 및 유기용매의 혼합용매에서, 완충액은 일반 효소반응에 사용되는 완충액이라면 사용 가능하다. 예를 들어, 포스페이트, 시트르산(Citric acid), 소듐 테트라보레이트(Sodium tetraborate)등을 이용한 완충액이 있으며, 바람직하게는 포스페이트를 이용한 완충액이다.

<23> 본 발명에서 사용가능한 완충액의 pH는 본 발명에서 사용되는 PPL 효소의 활성에 영향을 미치지 않는 범위인 pH=4.0~10.5가 바람직하고, pH가 6.5 내지 7.9이 보다 바람직하며, pH가 7.2가 더욱 바람직하다.

<24> 본 발명의 반응은 0℃~ 60℃에서 수행될 수 있으며, 10℃ 내지 35℃일 때 보다 바람직하다. 반응온도가 너무 낮아지면 반응속도가 늦어지고, 너무 높으면 효소의 변성이 일어난다. 바람직한 반응온도는 약 25℃이다.

<25> 또한 본 발명은 본 발명의 화학식2 화합물을 제조하는 단계 및 화학식2 화합물을 산화 반응시켜 화학식3의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 화학식3 화합물의 제조방법을 제공한다.

<26> [화학식3]



<27> 상기 식에서,

<28> X는 C1~C6의 알칸, C2~C3의 알켄, 벤젠 또는 나프탈렌이며, 여기서 알칸 및 알켄은 비치환되거나, 플로로, 클로로, 브롬, 요오드, 니트로, 벤젠, 나프탈렌으로 1이상 치환된 것이며, 바람직하게는 플로로, 클로로, 브롬, 요오드, 니트로, 벤젠, 나프탈렌으로 1이상 치환된 C1~C6 알칸이며, 더욱 바람직하게는 벤질(benzy1)이다.

<29> 화학식2 화합물을 화학식3 화합물로 산화시키는 방법은 1차 알코올을 알데히드로 산화시키는 공지된 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, Swern oxidation, PCC oxidation, 및 데스-마틴 퍼아이오딘난(Dess-Martin periodinane)을 이용하는 방법이 있으며, 바람직하게는 데스-마틴 퍼아이오딘난(Dess-Martin periodinane)을 이용하는 방법이 있다. 여기서, 데스-마틴 퍼아이오딘난(Dess-Martin periodinane)은 *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538 에 기재된 방법으로 제조한다.

효 과

<30> 본 발명은 라세미체인 시스-(3-(치환된메틸)옥시란-2-일)메틸아세테이트를 PPL효소를 이용한 동적 분할로 광학 이성질체인 (2R,3S)-(3-(치환된메틸)-옥시란 -2-일)메탄올을 고수율, 고순도로 수득할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<31> 하기 실시예에 의해 본 발명을 더 상세히 설명한다. 하기 비제한적인 실시예는 본 발명의 제조방법을 예시할 뿐이며, 본 발명의 영역을 제한하지 않는다. 본 발명에 따른 제조방법은 일반적인 산업적 제조에 용이하게 적용될 수 있음을 특징으로 한다.

<32> 이하에서 사용된 시료 및 PPL은 알드리치 및 시그마(Aldrich and Sigma)사로부터 구입하였다. THF(Tetrahydrofuran) 및 에틸에테르는 나트륨금속 및 벤조키논을 이용하고, 아르곤(Ar) 기체하에서 증류하여 사용하였으며, 디클로로메탄, 아세트니트릴 및 톨루엔은 수소화칼슘(calcium hydride)을 이용하여 증류하였다. 다른 용매들을 Aldrich, J. T. Baker, 및 Fisher 사로부터 최상급으로 구입하여 사용하였다. 효소반응은 25℃에서 160rpm으로 JEIO TECH(Korea) incubatory orbital shaker SI-300R에서 수행하였다. 전환률(conversion rate) 및 광학순도(enantiomeric excess)는 Hewlett-Packard 1200, LC(liquid chromatograph, CHIRALCEL OD)을 이용하여 키랄 HPLC(고성능액체크로마토그래피) 분석으로 측정하였다. 광학회전(Optical rotations)은 JASCO DIP-1000 디지털 편광계(digital polarimeter)으로 측정하였으며, NMR 스펙트럼은 용매로 CDCl₃를 사용하고, Bruker Avance 400 분광기를 이용하여 측정하였다. 화학적 이동값(Chemical shifts)은 TMS(tetramethylsilane)의 값에 대한 상대적인 ppm 값으로 계산하였다. 커플링상수(Coupling constants)는 헤르츠(hertz)로 기재하였고, 양성 전기분무이온화[Positive electrospray ionization(ESI⁺)]는 Hewlett-Packard 분광기를 이용하여 측정하였다. IR 스펙트럼은 JASCO 420 FT-IR 분광기를 사용하여 측정하였다. TLC(Thin layer chromatography)는 미리 코팅된 실리카겔 플레이트(Merck 60 F₂₅₄)를 사용하여 수행하였으며, 프레쉬 컬럼 크로마토그래피(Fresh column chromatography)는 실리카 겔 60(Merck, 0.040-0.063mm, 230-400 mesh)을 사용했으며, 전개 용매로 헥산 및 에틸아세테이트를 이용하였다.

<34>

<35> <제조예> 라세미체인 시스-3-(벤질옥시메틸)옥시란-2-일)메틸아세테이트(화학식1의 화합물)의 제조

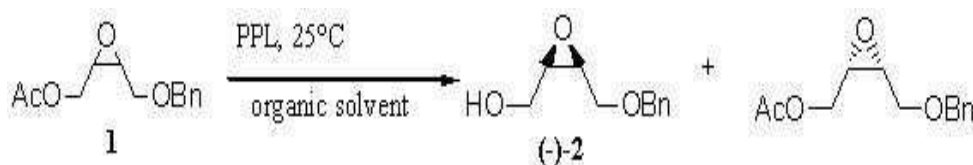
<36> 시스-4-벤질옥시-부트-2-엔-1-올(2,425mg, 13.61mmol)의 CH_2Cl_2 (40ml)의 용액에 0°C 에서 한 번에 NaHCO_3 (2,172mg, 25.85mmol)을 넣고 5분간 교반한 후에, *m*CPBA (2,818mg, 16.33mmol)을 넣고 실온으로 온도를 상승시키면서 3시간동안 반응시켰다. 그 용액을 포화된 탄산수소나트륨수용액(25ml)으로 반응을 중단시키고, 반응용액을 CH_2Cl_2 으로 희석시켰다. 유기층을 분리하고 수용액층을 CH_2Cl_2 으로 3번 추출하였다. 수집한 유기층을 브라인(brine) 및 무수의 MgSO_4 으로 건조시키고, 용매를 진공증발시키고 잔류물을 프레쉬(fresh) 컬럼 크로마토그래피(*n*-hexane:EtOAc = 3:1v/v)로 분리하여 옥시란 화합물을 무색의 오일로 78%수율로 수득하였다. 옥시란 화합물(2,062mg, 10.61mmol)의 CH_2Cl_2 (40ml)용액에, 피리딘(1.28ml, 15.94mmol), DMAP(259.64mg, 2.12mmol) 및 $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ (1.30ml, 12.74mmol)을 0°C 에서 첨가하고 실온에서 6시간동안 교반하였다. 혼합물을 디클로로메탄(40ml)으로 희석시키고 물로 세척하였다. 유기층을 수집하고, 용매를 진공 증발시킨 후에, 잔류물을 프레쉬 컬럼 크로마토그래피(*n*-hexane:EtOAc=4:1v/v)하여 표제의 화합물인 아세틸화된 라세믹 에폭시드 화합물을 99% 수율(1,318mg)로 수득하였다 [$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 7.31 (m, 5H) 4.56 (d, J=7.2 Hz, 2H) 4.39 (m, 1H) 3.95 (q, J=12.32, J=6 Hz, 1H) 3.75 (m, 1H) 3.52 (m, 1H) 3.13 (m, 2H) 2.06 (m, 3H)].

<37> <실시예 1>순수유기용매 중에서의 (2R, 3R)-3-(벤질옥시메틸)옥시란-2-일)메탄올의 제조

<38> 제조예에서 제조한 화합물인 라세미체인 시스-3-(벤질옥시메틸)옥시란-2-일) 메틸아세테이트(100mg)을 하기 표1에 기재된 용매에 넣고, 효소 PPL(100mg)을 넣고, 25에서, 3시간 또는 48시간 동안 반응시켰다(반응식 1참조).

<39> 상기 반응에서 유기용매의 성질 및 유기용매중의 기질의 용해도와 관련된 효소의 성향이 PPL에 의한 가수분해의 전환율(conversion rate) 및 E 값에 어떤 영향을 미치는지를 알아내기 위해 반응용매에 따른 효소의 반응성을 살펴보았다. 그 반응 결과를 요약하면 표1과 같다.

<40> [반응식 1]



<41>

<42> (상기 반응식에서 Bn은 벤질기를 의미한다)

<43> [표1] 순수 유기용매에서의 PPL-효소의 가수분해 결과

번호	용매	log P ^a	3h			48h			생성물
			전환율 ^b (%)	ee _p ^c (%)	E ^d	전환율 ^b (%)	ee _p ^c (%)	E ^d	
1	1,4-다이옥산	-1.10	27.6	12.1	1.33	72.0	20.1	1.77	(-)-2
2	메탄올	-0.76	19.4	16.3	1.45	24.8	25.7	1.67	(-)-2
3	아세트니트릴	-0.33	16.6	10.9	1.31	80.0.	27.5	2.42	(-)-2
4	아세톤	-0.23	22.0	69.3	5.73	42.8	82.7	12.67	(-)-2
5	테트라히드로푸란	0.49	22.1	61.1	4.26	47.5	83.4	13.77	(-)-2
6	디클로로메탄	0.60	28.9	63.7	4.83	84.3	79.3	17.24	(-)-2
7	에틸에테르	0.85	33.1	9.2	1.26	76.2	0.7	1.18	(-)-2
8	톨루엔	2.50	23.7	37.8	2.23	59.7	39.8	2.84	(-)-2
9	크실렌	3.10	37.7	26.7	1.78	59.5	95.9	67.50	(-)-2
10	시클로헥산	3.20	23.5	76.6	7.95	67.2	83.3	16.66	(-)-2
11	헥산	3.50	23.0	73.3	6.80	42.4	76.0	8.69	(-)-2

<44>

<45> ^a Reference : *Biotechnology and Bioengineering* 1987, 30, (1), 81-87

<46> ^b 키랄 컬럼을 사용한 HPLC 분석결과에 근거하여 전환율을 측정하였다.

<47> ^c 키랄 컬럼을 사용한 HPLC 분석결과에 근거하여 광학순도(enantiomeric excess)를 측정하였다.

<48> ^d $E = \ln[(1-ee_s)/\{1+(ee_s/ee_p)\}]/\ln[(1+ee_s)/\{1+(ee_s/ee_p)\}]$

<49> 순수한 11가지의 유기용매에서의 반응식1에 따른 PPL-효소에 의한 가수분해의 전환률과 log P의 상관관계에 대한 대략적인 지표를 표1에 나타내었다. 라세믹 화합물 1의 PPL 효소에 의한 가수분해는 용매의 종류에 따라 매우 다양하게 관찰되었다. 유기용매의 종류는 라세믹 화합물 1의 E 값에 매우 중요한 영향을 미치며, log P는 전환률 및 입체선택 (enantioselectivity)에 큰 영향을 나타냄을 알 수 있었다. 표1에서 번호 1 내지 11의 결과를 보면, 헥산(log P = 3.50), 시클로헥산(log P = 3.20), 및 크실렌(log P = 3.10)과 같은 지용성 용매에서 생성물의 광학순도가 매우 높았다. 특히, 크실렌에서 라세믹 화합물 1을 PPL로 반응시켰을 때 초기 3시간에서의 E 값은 1.78로 높지 않았으나, 48시간반응 후, 95.9ee%, 67.5의 E값 및 59.45%의 전환률을 나타내어, 순수 유기용매를 사용한 PPL 반응에서 크실렌이 가장 우수한 효과를 나타내었다.

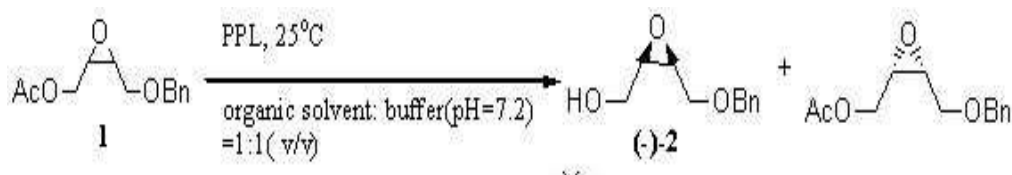
<50> 또한, 극성용매인 아세톤의 E 값은 E=5.73(3 시간)에서 E=12.67(48시간)으로 꾸준히 증가하였으며, 낮은 log P값을 가지는 에테르 유형인 테트라히드로푸란은 48시간 후에 E 값이 13.77이 었다. 또한, 테트라히드로푸란과 비슷한 log P값을 가지는 디클로로메탄은 테트라히드로푸란보다 더 높은 E값(3 시간에서 4.83, 48 시간에서 13.77) 및 전환률(3시간에서 28.93%, 48시간에서 84.34%)을 나타내었다.

<51> <실시예2> 완충액-유기용매 혼합물에서의 반응

<52> 제조예에서 제조한 화합물1인 라세미체인 시스-3-(벤질옥시메틸)옥시란-2-일) 메틸아세테이트 100mg을 하기 표2에 기재된 용매 및 완충액을 1:1 부피비로 혼합한 용매 200ml에 첨가하고, PPL 100mg을 넣고, 25에서, 3시간 또는 48시간 동안 반응시켰다(반응식 2참조).(단, 여기서 완충액은 pH=7.2의 포스페이트 완충액을 사용하였다).

<53> 유기용매-완충액(1:1, v/v) 혼합물은 가수분해된 생성물(카르복실산)을 중성화시켜 옥시란 고리의 추가의 분열을 억제하며, 열역학적 수 활성도(Thermodynamic water activity, a_w)는 염을 함유한 완충 용액으로 최대로 조정한다. 따라서, 본 발명자는 수-유기용매 시스템에서의 유기용매의 성질 및 유기용매중의 기질의 용해도와 관련된 효소의 성향이 PPL에 의한 가수분해의 전환율(conversion rate) 및 E 값에 어떤 영향을 미치는지를 알아내기 위해 반응용매에 따른 효소의 반응성을 살펴보았다.

<54> [반응식 2]



<55>

<56> [표2] 완충액 및 유기용매(1:1v/v) 혼합용매에서의 PPL-효소의 가수분해 결과

번호	용매	log P ^f	3h			48h			생성물
			전환률 ^a (%)	ee ^b (%)	E ^d	전환률 ^a (%)	ee ^b (%)	E ^c	
1	1,4-다이옥산	-1.10	16.4	23.7	1.75	20.9	47.2	3.12	(-)-2
2	메탄올	-0.76	32.6	58.5	4.46	52.1	79.4	12.14	(-)-2
3	에탄올	-0.24	24.9	57.5	4.15	26.8	69.7	6.53	(-)-2
4	아세톤	-0.23	33.7	63.5	5.37	50.5	83.6	15.20	(-)-2
5	디클로로메탄	0.60	28.0	39.5	2.57	45.9	76.3	10.22	(-)-2
6	에틸에테르	0.85	76.7	97.0	99.73	91.3	82.2	26.55	(-)-2
7	톨루엔	2.50	89.9	93.4	58.32	69.6	81.9	17.86	(-)-2
8	크실렌	3.10	89.8	95.3	48.64	82.6	98.0	153.91	(-)-2
9	시클로헥산	3.20	91.9	96.1	103.27	90.2	99.5	>200	(-)-2
10	헥산	3.50	88.7	89.0	34.67	89.8	96.2	129.95	(-)-2

<57>

<58> ^a Reference *Biotechnology and Bioengineering* 1987, 30, (1), 81-87

<59> ^b 키랄 컬럼을 사용한 HPLC 분석결과에 근거하여 전환률을 측정하였다.

<60> ^c 키랄 컬럼을 사용한 HPLC 분석결과에 근거하여 광학순도(enantiomeric excess)를 측정하였다.

<61> ^d $E = \ln[(1-ee_s)/\{1+(ee_s/ee_p)\}]/\ln[(1+ee_s)/\{1+(ee_s/ee_p)\}]$

<62> 10가지의 유기용매 및 완충액을 1:1 부피비로 혼합한 용매중의 반응식2에 따른 PPL-효소에 의한 가수분해의 전환률과 log P의 상관관계에 대한 대략적인 지표를 표2에 나타내었다. 표2에 따르면, 용매의 log P값 및 완충액-유기용매에서의 PPL 효소의 가수분해의 입체선택성이 정비례하는 것은 아니지만, 크실렌, 시클로헥산 및 헥산 (번호 8 내지 10, log P는 3.10 내지 3.50의 값을 가짐)은 PPL에 의한 라세미 화합물 1의 가수분해에 매우 효과적임을 알 수 있다. 특히 시클로헥산(번호 9)은 48시간 반응 후에 이들 3개의 용매 중에서 가장 높은 99.5ee% 및 E (>200)값을 나타내었다. 크실렌 및 헥산 역시 48시간 반응 후에 E값이 100(153.91 및 129.95)을 초과하므로 라세미 화합물 1의 PPL-효소에 의한 가수분해의 동적분할에 효과적임을 알 수 있다. 특히 이 두용매 역시 모두 반응 3시간 후에 우수한 입체선택성을 가지고(95.3%, 89.0%), 반응 48시간 후에는 꾸준히 ee% 값이 증가하여 98.0%, 96.2%의 값을 나타낸다.

<63> 또한, 에틸에테르 및 톨루엔은 반응 초기 3시간에는 우수한 결과를 나타내었으며, (번호 6 및 7), 물과 매우 잘 혼합되는 메탄올 및 아세톤은 역시 적당한 E값을 가졌다(번호 2 및 4).