P513

고정화 Hydantoinase를 이용한 D-phenylalanine 제조

민경현, 한재갑, 황보종현, 강기권, 박동철, 최덕호, 정태만

대상(주) 중앙연구소

Abstract

Preparation for the D-phenylalanine using chemo-enzymatic reaction was investigated. D,L-5-benzylhydantoin was synthesized chemically from L-phenylalanine and converted to N-carbamoyl-D-phenylalanine by the immobilized hydantoinase. The pH and temperature affected the solubility and racemization rate of benzylhydantoin. The optimal temperature and pH of the process were 50℃, 8.5, respectively and the conversion yield hadn't much difference with the hydantoinase content in 10hrs. Thus produced N-carbamoyl-D-phenylalanine was transformed chemically into D-phenylalanine.

서 론

최근 natural한 아미노산의 성장성이 둔화된 반면, unnatural한 아미노산은 항생제, 펩타이드, 생리활성 물질 등의 의약품 전구체로서의 응용이 크게 확대되고 있다. 그중 D-phenylalanine은 dextroamphetamine sulfate, methamphetamine hydrochloride, l-norephedrine hydrochloride 등의 광학활성을 지닌 peptide, gramicidin 등의 항생제, achatin 등의 신경계 peptide의 중요한 전구체 및 구성물질로서 중요한 역할을 하고 있다. D-amino acids는 기존의 D,L-아미노산의 유기합성 및 입체특이적 결정화 등의 방법을 이용한 유기화학적 방법으로 생산되어 왔지만, 입체특이성 및 경제성 등의 문제점으로 인해 최근에는 산업적으로 효소공학적 방법으로 대체되고 있다. D-amino acids 전환 반응에 이용되는 효소 중 hydantoinase는 기질에 따라 선택적으로 여러 광학활성을 지닌 아미노산 유도체를 제조할 수 있는 특징을 지닌다. Hydantoinase는 기질인 hydantoin의 5번 탄소에 치환된 작용기에 따라 각각의 N-carbamoyl-D-amino acid로 전환시키며, 연속해서 화학적이나 효소적으로 N-carbamoyl기를 제거하면 D-amino acid가 생성된다. D-phenylalanine의 제조 역시 유기화학적으로 합성된 D,L-5-benzylhydantoin을 출발물질로 하여 N-carbamoyl-D-phenylalanine을 생성하게 되며, 화학적 방법에

의해 계속적으로 D-phenylalanine이 만들어진다. 그러나, 기존의 hydantoinase를 이용한 D-amino acids 제조는 주로 반응시간이 짧고, 기질에 대한 specific activity가 높은 phenylglycine이나 hydroxyphenylglycine 등의 제조공정에 주로 연구가 되어왔다. 이에 반해 D,L-5-benzylhydantoin은 낮은 용해도와 전환율로 인해 산업적으로 크게 이용되지는 못하였다. 본 연구에서는 상업적으로 이용되는 고정화된 hydantoinase를 이용하여, 최적의 효소반응 조건하에서 N-carbamoyl-D-phenylalanine을 만들고, 연속해서 화학적 방법을 이용하여 D-phenylalanine을 합성하고자 한다.

재료 및 방법

고정화 hydantoinase(EC 3.5.2.2)는 Roche에서 구입하여 사용하였고, D,L-5-benzyl hydantoin은 대상(주)의 L-phenylalanine로부터 합성하였다. Hydantoinase의 cofactor로 2mM $MnCl_2 4H_2O$를 첨가하였으며, 3M 암모니아로 pH를 조절하였다. 기질 및 효소의 산화방지를 위해 5mM Na_2SO_3를 용액에 첨가하고, 질소 purging 하였다.

결과 및 고찰

D,L-5-benzylhydantoin의 용해도

D,L-5-benzylhydantoin은 일반적으로 Bucherer-Bergs 합성법에 의해 phenyl-acetaldehyde로부터 제조되지만, 경제적인 측면에서 L-phenylalanine로 부터 합성하였다. Benzylhydantoin은 5번 탄소 위치에 결합되어 있는 benzyl($C_6H_5-CH_2-$) 기의 특성상 수용액상의 용해도가 매우 낮은 성질을 가지고 있어, 효소반응의 기질로 사용되는데 매우 어려운 점이 있다. 따라서, 적절한 반응기질농도를 확인하고자 pH 및 온도에 따른 benzylhydantoin의 용해도를 측정하였다(Table 1).

Table 1. Solubility of D,L-5-benzylhydantoin on pH and temperature.

Temperature(℃) / pH	50	55	60
8.0	0.9%	1.1%	1.3%
8.5	1.1%	1.2%	1.5%
9.0	1.5%	1.7%	2.1%
9.5	2.1%	2.4%	3.0%

Hydantoinase에 의한 N-carbamoyl-D-phenylalanine 전환 반응

고정화된 hydantoinase 3.74 ku/ℓ를 반응조건 50℃, pH 8.5, 기질농도 1.0% 내에서 V_{max}, K_m값을 측정한 결과, 각각 361.8 μM/min, 6.0 mM을 얻었다.

Hydantoinase는 특이적으로 D-benzylhydantoin과 반응하여, N-carbarmoyl-D-phenylalanine을 생성하는데, 남아있는 L-benzylhydantoin은 고온, 알카리 조건에서 D-form으로 racemization 된다고 보고되었다. 따라서 반응 생산성을 좌우하는 racemization의 영향을 확인하기 위해 일반적으로 hydroxyphenylhydantoin등의 기질의 반응에 적용된 pH 및 온도를 기준으로 실험하였다. pH 8.5에서 9.5로 증가시 반응초기는 pH 8.5가 9.5보다 초기 반응속도는 컸지만, 오히려 50% 기질 전환 후의 반응속도는 pH 9.5에서 76%가 향상되었고, 온도 또한 50℃에서 65℃로 증가시 50% 기질 전환 후의 반응속도가 79%까지 증가함을 보였다. 이는 용해된 기질 중 50%를 차지하는 D-form이 완전히 반응한 후, 잔존하는 L-form의 racemization이 pH 및 온도 증가에 따라 빨라지기 때문이다.

5% Benzylhydantoin의 suspension상태에서 hydantoinase양에 따른 전환율을 비교하였다(Fig. 1). 이 결과 초기 반응속도는 효소량에 비례하여 증가하였지만, 약 10시간동안 반응이 진행된 후 전환율은 큰 차이를 보이지 않았다. 이 때의 benzylhydantoin의 L과 D form의 비율은 초기 50:50에서 이미 반응 1시간만에 80:20이 되었으며, 반응 종료시까지 평형을 유지하였다(Fig. 2). 이는 용해된 D-form 대부분이 반응초기에 D-carbamoylate로 전환되지만, 미용해된 기질의 낮은 용해속도 및 racemization 속도로 인해 반응에 이용되는 D-benzylhydantoin의 양이 제한되기 때문이다. 따라서, 반응의 생산성을 높이기 위해 15 ku/ℓ hydantoinase에서 10시간 동안 반응을 진행하였고, 미용해된 hydantoinase는 다음 batch에 재사용하여 경제성을 맞추었다.

D-phenylalanine 합성

반응 종료후 N-carbamoyl-D-phenylalanine을 회수하기 위해 반응액을 10℃, pH7.0으로 조정하였다. 이후 반응액내에 용해된 benzylhydantoin을 침전시키고, 여과하여 순수한 N-carbamoyl-D-phenylalanine을 얻을 수 있었다. 침전된 benzylhydantoin은 회수, 건조하여 재사용하였다.

D-phenylalanine은 Carbamoyl 용액에 IR-120 이온교환수지를 첨가한 후, $NaNO_2$를 천천히 떨어뜨리며 합성하였으며. 이때의 전환율은 약 66%이었다. 수지에 흡착된 D-phenylalanine의 회수는 냉각 증류수와 2M 암모니아로 수세, 용리한 후 증류수와 아세톤 혼합액에서 결정화를 수행하였으며, 이 결과 80%의 회수 수율과 순도

99%이상의 D-phenylalanine을 얻을 수 있었다.

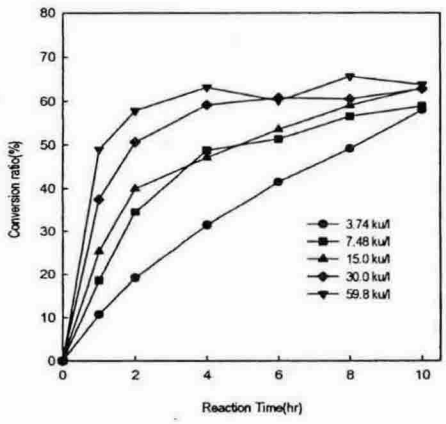

Fig. 1. The conversion of 5% benzylhydantoin to N-carbamoyl-phenylalanine with the immobilized D-hydantoinase content at pH 8.5 and 50℃.

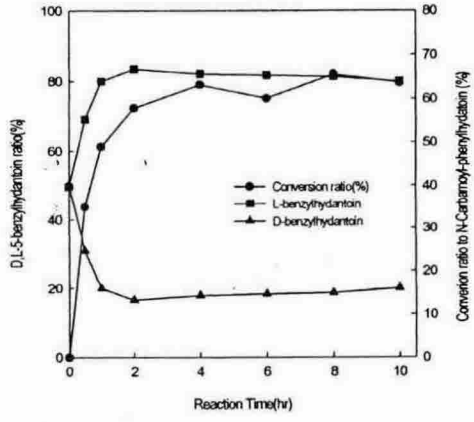

Fig. 2. The profile of D,L-5-benzylhydantoin with the conversion to N-carbamoyl-phenyl-alanine.

참고문헌

1. Oliver keil, Manfred P.Schneider and J.Peter Rasor (1995), New Hydantoinases from Thermophilic Microorganisms-Synthesis of Enantiomerically Pure D-Amino acids, *Tetrahedron:Asymmetry*, 6(6), 1257-1260.

2. Robert A.Lazarus (1990), Chemical Racemization of 5-benzylhydantoin, *J.Org.Chem*, 55, 4755-4757.

3. Cheng-Kang Lee and Kung-Chern Lin (1996), N-carbamoyl-D-p-hydroxyphenylglycine production using immobilized D-hydantoinase from recombinant *E.coli*, *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 623-627.