Lipase를 이용한 곤충 pheromone 합성 응용

KIST 유전공학연구소 **서영배 · 고영희**

1. 서 론

미생물, 식물, 동물 등으로부터 얻어지는 여러 생리활성물질 중에는 분자내에 부제탄소(chiral carbon)를 가지는 광학활성체(optically active substance)로 존재하는 것들이 대부분을 차지하며, 이러한 미량의 chiral성 생리활성물질들은 일반적으로 거울상 이성질체(enantiomer-광학활성만 반대일뿐 다른 물리적, 화학적 성질은 똑같음)들 사이에 생물활성의 차이를 나타낸다. 예를들면, S-(+)-glutamic acid는 좋은 맛을 내지만 R-(−)-이성체는 그렇지 않다. 따라서 생물활성을 나타내는 거울상 이성질체만을 선택적으로 합성하는 방법의 개발은 학문적으로 물질의 입체화학(stereochemistry)과 생리활성과의 상관관계의 규명에 중요한 역활을 하며, 산업적으로는 효율의 배가라는 실용성을 갖는다. 이러한 생리활성물질의 정확한 생물활성을 평가하기 위해서는 이들을 광학적으로 순수한 형태인 각각의 거울상 이성질체를 합성하여야 한다. 통상적인 유기화학적 수법으로 합성하면 라세미체(racemic type-각각의 enantiomer의 등량화합물)로 얻어지고 광학활성체로 얻을 수 없다. 그래서 부분구조로 chiral center를 가지는 간단한 화합물(광학활성 합성중간체, chiral building block, chiral synthon)을 중간체로 하여 입체선택적으로 반응을 조절함으로써 다양한 광학활성 표적화합물을 합성하는 방법이 활발히 진행되고 있다. Chiral building bolck의 제조 방법에는 1. 광학분활법, 2. 입수 용이한 광학활성 천연물을 직간접으로 이용하는 방법, 3. 화학적 부제합성법, 4. 효소법(미생물이나 효소를 분리하여 사용) 등이 있다 (Fig. 1).

이러한 방법들중 합성화학자들은 일반성 범용성의 화학적 방법(1, 2, 3)을 주로 이용하지만 최근에는 생체반응을 화학합성반응 중에 그대로 접목시킨 효소법을 이용한 chiral building block의 제조에 많은 노력을 기울이고 있다. 본보에서는 화학적수법으로 다양한 특이한 기질을 제조하여 여기에 입체특이적 성질(stereospecificity)과 입체선택적 성질(steroselectivity)이 높은 생물학적 방법들 중에서 주로 lipase를 이용한 부제가수분해반응(asymmetric hydrolysis)과 그 역반응인 에스테르화반응(esterification) 등을 도입한 chiral building block의 제조와 이를 이용한 곤충 생리활성물질인 pheromone의 합성에 대한 최근의 많은 예들중 상품화를 시도하고 있는 매미나방의 pheromne인 (+)-disparlure에 대하여 간단히 소개하고져 한다.

2. Pheromone과 해충방제

Pheromone은 동종의 곤충들 간의 통신수단으로 이용되는 화학물질로서 "한개체로부터 체외로 분비되어서 동종의 다른 개체에 의해 수용되어, 특정의 행동이나 발육과정 등에 있어서 특이한 반응을 유발시키는 물질"로 정의되며, 이들의 종류를 살펴보면 alkane, alkene, alcohol, aldehyde, ketone, ester, lactone, lactol, heterocycle 등 다양한 형태로 나타

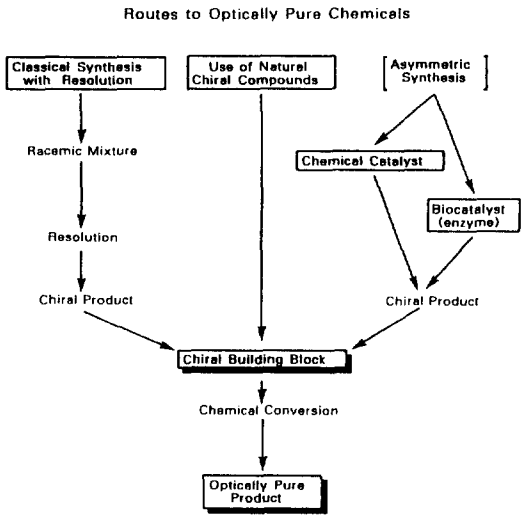
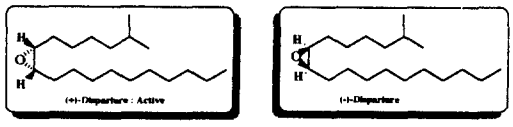


Fig. 1. Routes to Optically Pure Chemicals.

나며 이들중 상당수는 광학활성체로 존재한다. 그리고 곤충 pheromone의 생리활성과 입체화학과의 상관관계를 살펴보면 다양한 양상을 나타내며[1](Fig. 2), 최근 광학활성체 합성기술의 발달로 복잡한 광학활성 pheromone도 고화학순도 및 고광학순도의 합성이 가능하게 되었다.

지금까지 해충방제의 방법으로는 살충제를 중심으로한 화학적 방제가 가장 효과적이고 간편한 방제법으로 광범위하게 행해지고 있지만, 최근에는 이들의 농작물에 대한 잔류독성, 인간과 가축에 대한 급성·만성독성, 자연환경의 파괴, 천적의 소멸, 저항성 곤충의 출현 등 많은 문제점들이 나타나고 있다. 그래서 이러한 화학적 방제법 대신 새로운 방제법의 하나로 pheromone을 이용한 해충의 방제법이 개발되어 무공해 방제법으로 발전해 오고 있다. Pheromone의 이용 방법으로는 (1) 발생예찰법, (2) 대량유인살해법, (3) 교신교란법 등이 있다.

3. 합성실례 Disparlure



1970년 Bierl[2]등에 의해 단리구조결정된 (7R, 8S)-(+)-disparlure는 매미 나방(gypsy moth, *Lymantria dispar*-낙엽수를 중심으로 피해를 주는 삼림 해충-한국, 일본, 시베리아, 미국 등 세계전역에 분포)의 암컷이 방출하는 sex pheromone이며 이의 거울상 이성질체(7S, 8R)-(−)-disparlure는 pheromone 활성의 조해제로 작용하므로 유인용 trap에는 고광학순도의 (+)-체를 필요로 한다. 이 gypsy moth의 방제에 sex pheromone을 이용하여 미국 농무성은 현재 매년 400~500 g의 (+)-체를 이용하여 수컷 성충의 유인시험을 시행하고 있다.

Disparlure의 광학활성체 합성은 많은 연구그룹들이 보고하였으며[1] 그중 lipase를 이용한 합성예를 살펴보면 다음과 같다. Bianchi 등은[3] lipase PPL (porcine pancreatic lipase)을 이용한 (±)-A의 부제가수분해 반응(asymmetric hydrolysis)으로 광학활성 에폭시 알코올(2S, 3R)-A를 얻었으며, 유사한 방법으로 유기용매 하에서 lipase PPL을 이용한 부제에스테르화 반응(asymmetric transesterification)으로 에폭시 알코올 (±)-C로부터 (2R, 3S)-C를 얻어 이들로부터 광학활성 disparlure를 합성하였다 (Scheme 1).

Otto 등은[4] epoxy acid (±)-A를 *Pseudomonas* NRRL-B-2994로 처리하여 광학활성 epoxy acid (9S, 10R)-A를 얻어 이를 (+)-disparlure로 전환 하였다 (Scheme 2).

Mori 등은 필자들도 chiral building block으로 개발 보고한 적이있는 광학활성 monoacetate B[5]를 같은 방법인 *meso*형 diacetate A를 lipase PPL로 처리하여 광학순도 90% e.e.로 얻어 이를 결정성 3,5-dinitrobenzoate C로 유도한 후 재결정을 거쳐 광학순도 거의 100% e.e.의 에폭시 알코올을 얻은 후 이를 이용하여 (+)-disparlure와 (3R, 4R)- 및 (3S, 4S)-3-methyl-4-octanol을 합성하였다[6](Schemen 3).

한편 일본전공(NITTO DENKO)팀은 화학적 부제합성법인 Sharpless epoxidation과 생물학적 부제합성법인 asymmetric transesterification을 혼용하여 약 100g 규모의 대량 합성방법을 보고하였다. 합성 전략은 Sharpless epoxidation반응을 key reaction으로해서 광학활성 에폭시 알코올을 얻고 이의 광학순도 향상은 결정성 중간체 3,5-dinitrobenzoate로 유도한후 재결정을 통하여 광학적으로 순

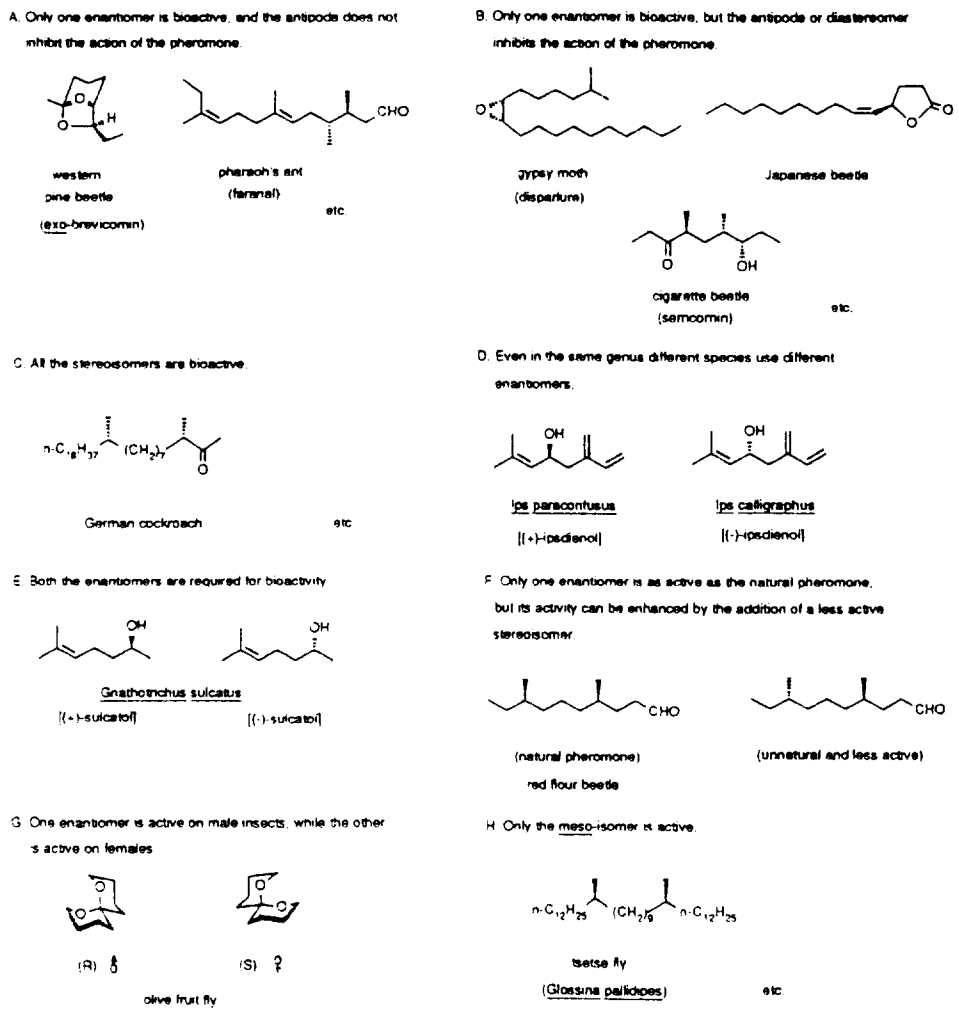
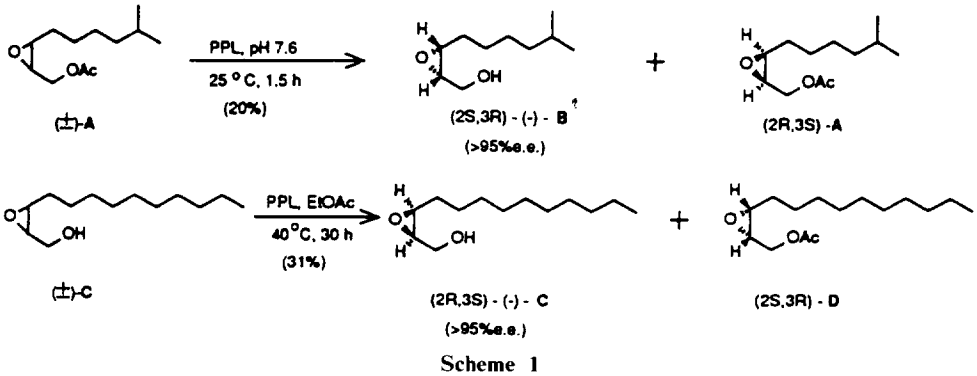
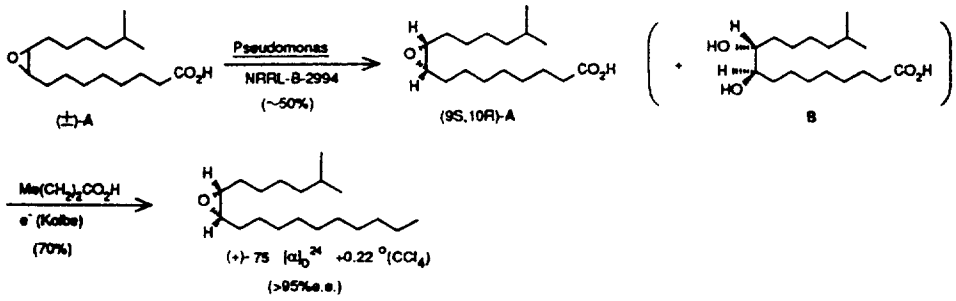


Fig. 2.

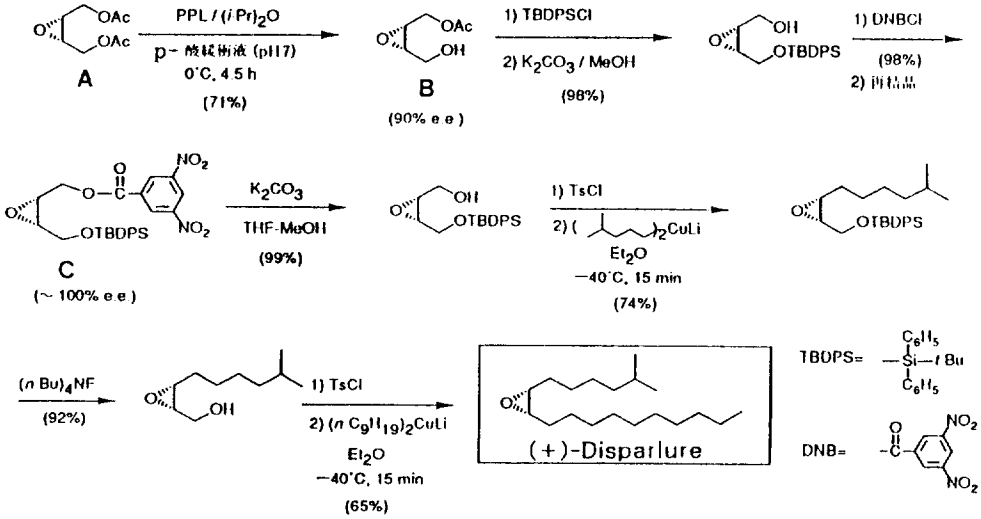


Scheme 1

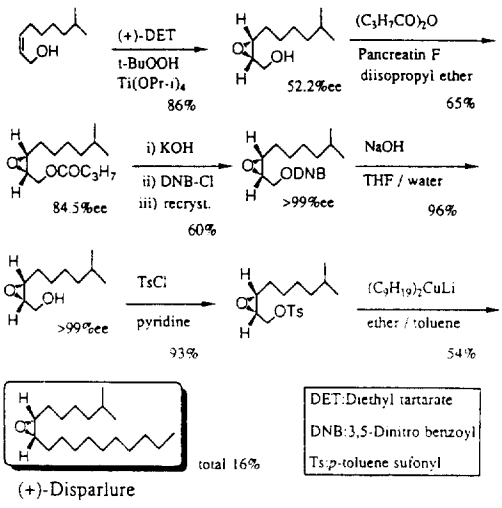
수한 에폭시 알코올을 제조한 후 이를 이용하여 (+)-disparlure를 합성하는 방법이다. 예비실험결과



Scheme 2



Scheme 3



Scheme 4

재결정 공정에서 충분한 수율을 얻기위해서는 최저 80% e.e., 이상의 광학순도가 요구된다는 것을 알았다. 첫단계인 Sharpless epoxidation 반응은 소규모의 실험실 scale로는 아주 유용한 방법(−20℃ 에서 하루정도)이지만 대량 scale에서는 상당한 단가의 상승을 가져온다. 실제 1 mol scale 실험결과 광학순도는 −20℃ 에서 7일간 반응일때 약 80% e.e., 5℃ 에서 40시간 반응일때 65% e.e., 15℃ 에서 15시간 반응일때 52% e.e.를 나타내었다. 그래서 이 팀은 실온에서 Sharpless 에폭시화를 실행하여 광학순도 52% e.e.의 에폭시 알코올을 얻은후 lipase를 이용한 입체선택적 아실화 반응(acylation)으로 광학순도를 85% e.e.로 향상시킨 후 이에 대응하는 결정성 3,5-dinitrobenzoate로 재결정 과정을 거쳐 고광학순도의 에폭시 알코올을 제조한 후 이를 이용하여 총수율

16%로 약 100g scale의 (+)-disparlure를 대량합성 하였다고 보고하였다[7](Scheme 4).

4. 맺는말

이상, lipase를 이용한 광학분할의 한 응용예로 매미나방의 곤충 pheromone인 disparlure의 광학활성체 합성에 대하여 간단히 소개하였다. 선진국에서는 고가의 고부가가치 상품인 Pheromone 제제가 생물농약 시장에서 상당한 시장을 형성하고 있지만-약 4200만 달러/92년도 미국시장-국내시장은 아직 전무한 상태이다. 특히, pheromone 제제중 광학활성 pheromone인 경우는 합성방법의 어려움과 광학순도의 문제로 인해 상품화 된것은 소수에 불과하며, 이제 시장을 형성시켜가는 무공해의 첨단상품이라 볼 수 있겠다. 이러한 관점에서 볼 때 생물활성물질의 광학활성체 합성은 과학이라는 학문적 영역에서 산업화를 위한 기술의 영역으로 접어든 시기로 볼 수 있으며 차세대의 화학공업기술의 영역중에서 아주 중요한 한 기술영역을 차지하리라는데는 의심의 여지가 없으며, 이러한 부제합성의 분야에 화학적인 방법과 선택성이 높은 생물학적인 방법을 적절히 조합하여 사용하면 산업화에 응용범위가 상당히 확대되리라 기대한다.

참고문헌

1. "*The Total Synthesis of Natural Products*". Vol. 9, ed. by J. ApSimon, John Wiley & Sons, New York, 1992.
2. (a) B. A. Bierl, M. Beroza, C. W. Collier, Science, **170**, 87(1970). (b) S. Iwaki, S. Maruo, T. Saito, M. Yamada, K. Katagiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7842 (1974).
3. D. Bianchi, W. Cabri, P. Cesti, F. Francalanci, F. Rama, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 2455(1988).
4. P. P. J. H. L. Otto, F. Stein, C. A. ven der Willigen, *Agric. Ecosyst. Environ.*, **21**, 121(1988).
5. Y. B. Seu, Y. H. Kho. *KIST-GERI Report* BSE71 100-375-3(1992. 2).
6. J. -L. Brevet, K. Mori, *Synthesis,* 1007(1992).
7. (a) E. Fukusaki, S. Senda, Y. Nakazona, H. Yuasa, T. Omata, *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 280(1992). (b) E. Fukusaki, S. Senda, Y. Nakazona, H. Yuasa, T. Omata, *J. Ferment, Bioeng.*, **73**, 284(1992).