

## L-리보스 생산을 위한 L-아라비노스의 에피머반응

전영주 · 송성문 · 이창수 · 김인호<sup>†</sup>

충남대학교 화학공학과  
305-764 대전시 유성구 궁동 220  
(2010년 12월 30일 접수, 2011년 2월 10일 채택)

### Epimerization of L-Arabinose for Producing L-Ribose

Young Ju Jeon, Sung Moon Song, Chang Soo Lee and In Ho Kim<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea  
(Received 30 December 2010; accepted 10 February 2011)

#### 요 약

L-리보스는 항바이러스 약의 출발물질로 근래 관심의 대상이다. 이 물질은 에피머 반응에 의해 L-아라비노스로 부터 얻을 수 있다. 몰리브덴 산화물이나 몰리브덴산 촉매 그리고 메탄올/물 용액에서 에피머 반응을 수행하였다. 반응 온도, 메탄올 분율, 촉매종류를 선정하여 최적 반응을 찾고자 하였다. 이온교환크로마토그래피를 이용하여 에피머 반응물을 분리하였고 L-리보스 HPLC 크로마토그램에서 반응수율을 계산하였다. Sodex 이온교환 HPLC 칼럼과 Phenomenex NH<sub>2</sub> HPLC 칼럼을 분석의 편의성 면에서 비교하였다. 20% 메탄올, 60 °C, 그리고 40 g/L 몰리브덴산 조건에서 21% 최대수율을 얻었다.

**Abstract** – L-ribose has recently attracted interest as a starting material for antiviral drug. It could be obtained from L-arabinose by epimerization reaction. Epimerization reaction was carried out with molybdenum oxide or molybdic acid catalyst and methanol/water solution. Reaction temperature, methanol percentage, and catalyst kind were selected to find an optimum reaction condition. Ion exchange chromatography was used for separating epimerization reaction mixture, and then HPLC chromatogram of L-ribose fraction obtained to calculate the yield of the reaction. Shodex ion exchange HPLC column(Model SC1011) and Phenomenex Luna NH<sub>2</sub> HPLC column were compared to employ a convenient HPLC analysis. It was found that the usage of 20% methanol, 60 °C, and 40 g/L molybdic acid gives the best reaction condition with a yield of 21%.

Key words: L-Ribose, Epimerization, L-Arabinose

#### 1. 서 론

L-리보스는 식품과 화장품 및 의약품의 원료로 널리 사용되고 있다. 특히, L-리보스는 L-리보뉴클레오사이드, L-올리고리보뉴클레오사이드 및 다른 많은 치료용 제제의 합성에 있어서 골격을 구성하는 중요한 핵심 오탄당이다[1]. 최근 수 년 사이에, 의학분야에서 L-탄화수소 및 그의 뉴클레오시드 유도체의 사용이 크게 증가되고 있으며, 몇 가지의 변형된 뉴클레오시드는 유용한 항바이러스제로서 상당한 잠재성을 보이고 있다[2]. 또한 신체 조건 하에서 긴 안정성을 갖는 엔트-아프타머(ent-aptamers)는 치료용으로도 사용될 수 있는 잠재성이 높은 후보 물질이다[3].

생체 내에 존재하는 뉴클레오티드는 D-리보스를 포함한다. 간염 바이러스는 생체 내의 뉴클레오티드를 이용하여 증식을 하게 되는

데, L-리보스가 생체 내로 들어가도록 하고 바이러스가 증식할 수 있도록 한다. 자연계에 존재하지 않는 L-리보스를 이용하여 바이러스는 증식하지 못하기 때문이다. 그러므로 L-리보스는 감염 치료제로서의 중요한 역할을 한다.

L-리보스는 산업적으로 제조방법이 확립되어 있지 않은 희소 당질 중의 하나이며, L-리보스의 공업적 제조방법의 확립이 요구되고 있다. L-리보스를 생산할 수 있는 방법이 알려져 있으나 상대적으로 많은 비용이 들어간다. 따라서 저비용과 상업적으로 L-리보스를 생산할 수 있는 방법이 요구되고 있다. L-아라비노스, D-글루코스, L-자일로스, D-갈락토스 및 D-리보스를 L-리보스 유도체로 전환하는 몇몇 방법이 보고되어 있다[3]. Seo[4] 등은 또한 D-당 락톤으로부터 L-당을 합성하는 우수한 방법을 보고하였다.

그러나 이런 방법들은 낮은 수율, 고가의 출발물질에 대한 요구성, 많은 반응 단계 및 대량 합성의 어려움 등의 단점을 가지고 있다. 따라서 미생물 및 그의 효소를 사용하여 L-리블로스로부터 L-리보스를 생화학적으로 생산하는 방법이 보고되고 있다[5]. L-리보

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

<sup>‡</sup>이 논문은 충남대학교 유승곤 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

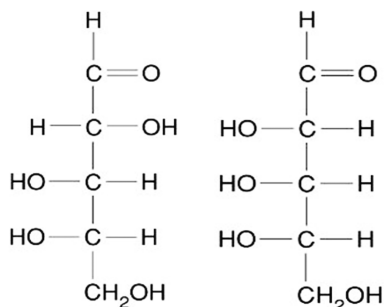


Fig. 1. L-arabinose and L-ribose.

스에 특이적으로 기질 반응하는 호열성 L-리보스 이성화효소는 호열성과 L-리보스에 기질 특이적인 성질을 동시에 가지므로 고온 조건에서 부산물의 생성을 최소화 하면서 효소 반응을 수행할 수 있다.

본 연구에서는 L-아라비노스를 원료 물질로 하여 몰리브덴산(molybdic acid)이나 산화몰리브덴(molybdenum oxide) 촉매 하에서 L-리보스를 얻고자 하였다. L-리보스 얻기 위한 최적조건을 찾기 위해서 반응 시간, 촉매의 농도를 변화시켜 L-리보스의 농도를 확인하여 수율을 계산하였다. L-리보스와 분자식은 같고 2번 탄소만의 위치가 다른 C-2 에피머관계인 L-아라비노스로부터 에피머화 반응을 통해 L-리보스를 얻는 것이다(Fig. 1). 에피머반응은 몰리브덴(Mo) 금속을 촉매로 이용한 한 단계의 간단한 반응으로, 이 반응의 장점은 매우 간단하며 미반응된 L-아라비노스를 재회수하여 다시 반응시킬 수 있는 장점이 있다.

## 2. 실험

L-리보오스를 얻어내기 위한 원료물질로 L-아라비노스(99%, Sigma, U.S.A.)를 사용하였고, 용매는 HPLC급 메탄올(J. T. Baker, U.S.A.)과 증류수를 사용하였다. 촉매로는 몰리브덴산과 산화몰리브덴(99.5%, Sigma, U.S.A.)을 구입하였다. 처음 대조군 반응 조건은 메탄올 6 ml, 증류수 24 ml와 L-아라비노스 3 g에(L-아라비노스 농도 100 g/L) 촉매로 산화몰리브덴을 사용하였고 촉매의 농도를 20 g/L로, 온도를 60 °C로 하여 실험하였다. 반응시간은 10시간이었고 중간에 샘플을 취하여 L-리보스의 농도를 측정하였다. 180 ml의 병을 용매와 시료를 넣어 반응 용기로 사용하였고, 온도를 유지시키기 위해서 항온조(Polystat Model 12105-30, USA)와 반응 용기를 중탕할 수 있는 1,000 mL의 중탕 기구를 설치하였다. 촉매와 시료사이에 접촉면적을 증가시키기 위해서 자석교반기를 1,000 mL의 중탕 용기 밑에 두고 반응 용기 안에는 마그네틱 바를 넣어 교반시키면서 반응을 수행하였다. 반응조건 변화실험으로 온도를 50~70 °C, 촉매농도 10~60 g/L, 메탄올조성 그리고 촉매종류로 몰리브덴산을 추가하였다.

반응물 분리에 사용된 칼럼은 Dowex Ca<sup>+</sup> 수지가 충전된 유리 칼럼(GE healthcare XK16, Sweden)이었다. 수지는 polystyene divinylbenzene을 기본 골격으로 Ca<sup>+</sup> 이온이 관능기로 달려있다. 이 수지 70 mL를 LC 칼럼에 충전하여 분리 실험을 하였다. D-리보스를 표준물질로 이용하여 칼럼에서 체류시간을 측정하였다. D-ribose를 사용한 이유는 액체크로마토그래피(LC) 칼럼에서는 높은 농도(100 g/L)와 많은 양의 주입(1 mL)이 필요하고 L-리보스와 체류시간이 같고 가격이 저렴하기 때문이다. 이 LC 칼럼의 온도는 50 °C로 하였다. 이동상

은 증류수를 이용하였고 펌프(GE healthcare P-500, Sweden)를 사용하였다. 검출기로 783 UV detector(Applied Biosystems, USA)를 사용하였다. 자외선 검출기의 파장은 197 nm이었다.

Jasco사의 편광광도계를 이용하여 L-리보스와 D-리보스의 편광을 측정하였고 합성된 리보스의 편광을 측정하여 L-리보스임을 확인하였다. D-리보스는 (-) 편광을 보이고 L-리보스는 (+) 편광을 보인다고 보고되고 있다.

HPLC 칼럼으로 Showa denko 사의 SC1011(6.0×300 mm) 칼럼을 이용하였다. 이 HPLC 칼럼은 LC 칼럼과 입자는 작고 같은 종류의 수지가 고압으로 충전되어 있는 HPLC 칼럼으로 작은 주입량(10 µl)으로도 분석이 가능하다. 이 칼럼을 이용하여 합성된 L-리보스의 농도를 알기 위하여 표준물질인 D-리보스를 이용하여 검정곡선을 만들어 농도를 측정하였다. 이 HPLC 칼럼의 온도는 70 °C로 조정하였고 이동상과 검출기는 LC와 같은 조건이다.

HPLC 분석을 위하여 다른 칼럼으로 Luna NH<sub>2</sub>(4.6×250 mm, Phenomenex, USA)를 사용하였고 분리에 사용된 이동상은 acetonitrile(J. T. Baker, USA)와 증류수를 85:15(v/v)의 부피비로 제조하였고 0.45의 멤브레인 필터로 여과한 뒤 sonicator(Brason, USA)로 약 1 시간 동안 탈기한 후 실험에 사용하였다. 이동상을 펌프(Beckman 110B Solvent Delivery Module)로 이송하였고 검출기는 783 UV detector(Applied Biosystems, USA)를 사용하였다. 자외선 검출기의 파장은 197 nm이며 시료의 주입은 Model AS-100T HPLC Automatic sampling system(Bio-rad, USA)에 10이나 100 µL의 sample loop를 설치한 후 시료를 주입하였다.

## 3. 결과 및 고찰

반응을 통해 생성된 L-리보스 분획의 편광을 측정하였다. 표준물질인 L-리보스와 D-리보스의 편광을 측정된 결과, (+)와 (-)의 값을 보였다. 생성된 리보스의 편광은 (+)값을 보여 D형이 아닌 L형임을

Table 1. Measurement of ribose specific rotation

	L-ribose	D-ribose	Epimerization Product
$\alpha$ (by polarimeter)	+0.171	-0.181	+ 0.134
$[\alpha]_D^{20}$	+17.1°	-0.181°	+ 16.7°

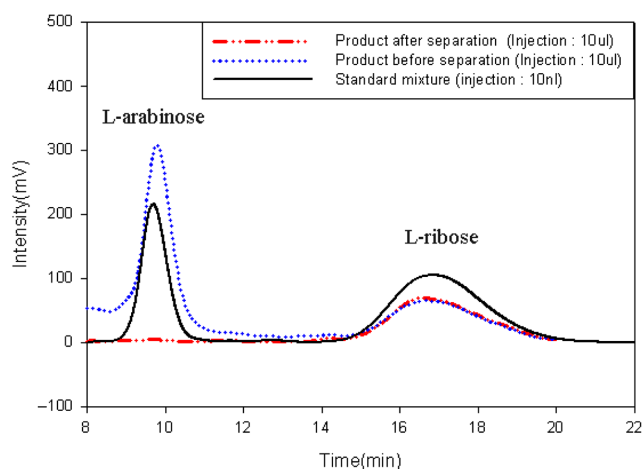


Fig. 2. Chromatograms of reaction mixture on SC 1011 HPLC column; temperature: 70 °C, flowrate: 1 mL/min, detector: UV, sample loading: 10 µL.

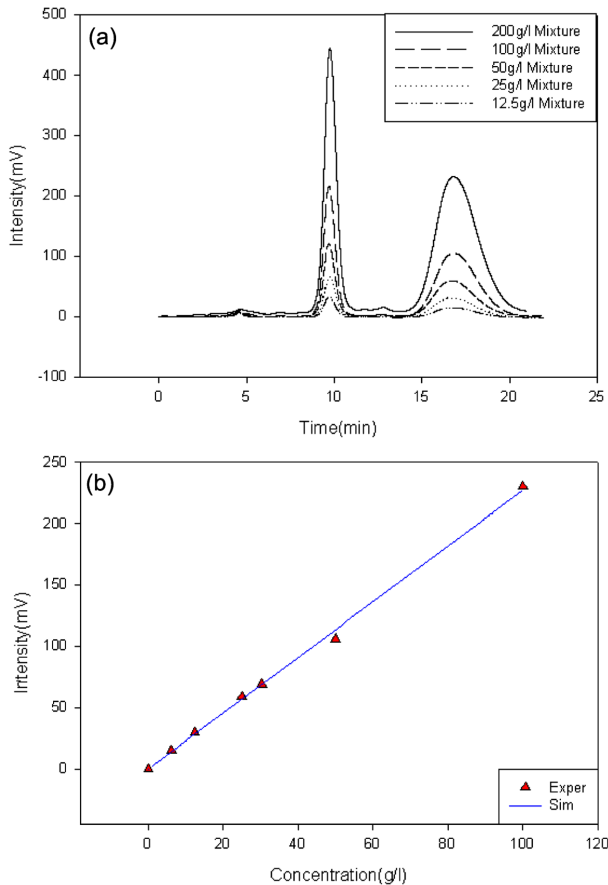


Fig. 3. Chromatograms of standard mixture on SC1011 column(A) and calibration curve for D-ribose(B).

알 수 있다.

반응물에서 L-리보스 농도를 알기 위하여 유리 LC 칼럼으로 분리한 L-리보스 분획을 채취하여 SC 1011 HPLC 칼럼을 이용하여 생성된 L-리보스 농도를 측정하였다. Fig. 2의 점선은 예피머 반응

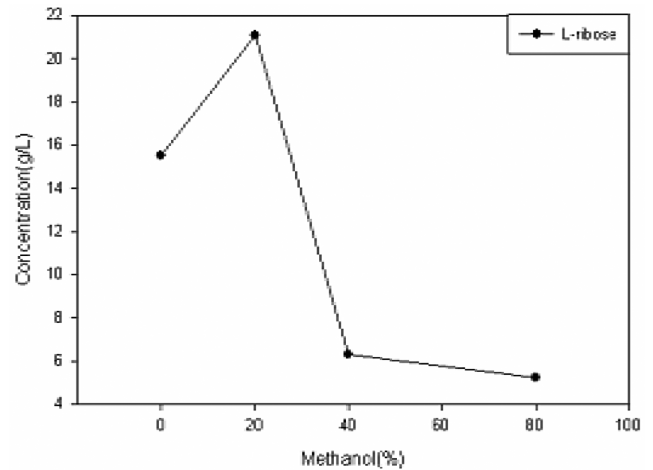


Fig. 4. L-ribose formation after 40 hrs by change of methanol composition.

후 LC 칼럼으로 분리하기 전 L-아라비노스와 L-리보스의 HPLC 크로마토그램이다. LC 칼럼으로 분리하여 분획된 L-리보스의 단일피크 크로마토그램도 Fig. 2에서 보이고 있다. Fig. 2의 실선은 농도가 알려진 L-아라비노스와 D-리보스의 혼합 표준시료의 크로마토그램이다. LC 칼럼에서 L-리보스가 잘 분리되었음을 HPLC 크로마토그램의 단일 피크로 알 수 있다.

Fig. 3A에서 농도 변화에 따른 L-아라비노스와 D-리보스 표준물질의 SC 1011 HPLC 칼럼 크로마토그램을 보인다. 첫 번째 피크인 L-아라비노스와 둘째 피크인 L-리보스의 높이가 농도증가에 따라 비례하여 증가함을 보이고 있다. 칼럼에서 D-와 L-리보스의 체류시간은 동일하며 크로마토그래피 검정곡선 실험에서는 저가의 D-리보스를 사용하였다. Fig. 3A를 이용하여 D-리보스 검정곡선(Fig. 3B)을 만들 수 있었다. 검정곡선을 이용하여 식 (1)을 만들 수 있었으며 이 식을 이용하여 계산한 결과 처음 합성된 L-리보스의 농도는 15 g/L(15% 수율)이었다.

$$Y_{(Intensity)} = 2.2 X_{(Concentration\ of\ produced\ L-ribose)} + 0.0228 \quad (1)$$

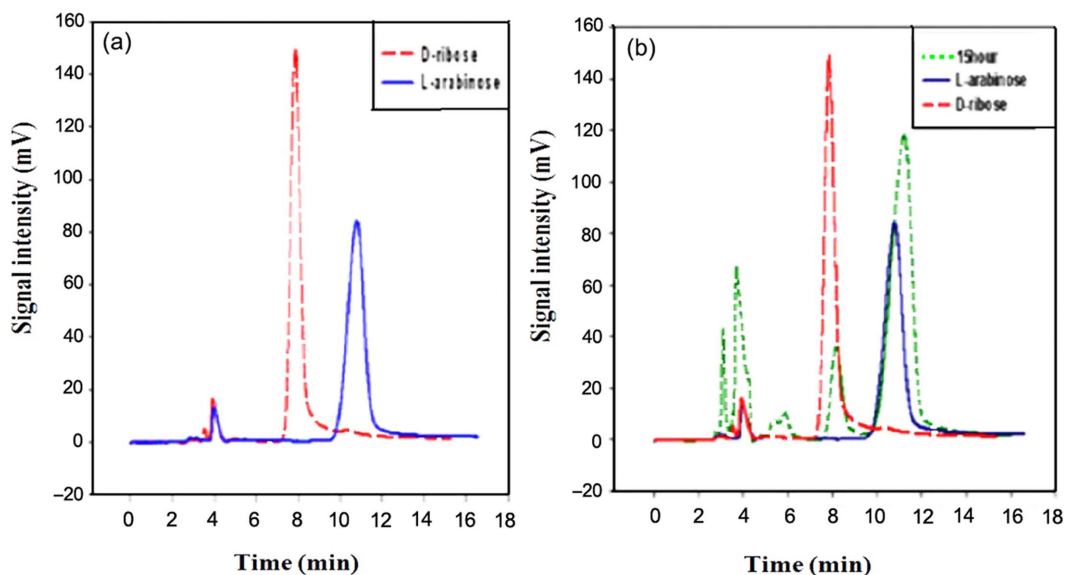


Fig. 5. Chromatograms of standard mixture (A) and reaction mixture after 15 hours (B) on Luna NH<sub>2</sub> column; temperature: 60 °C, flowrate: 1.0 mL/min, detector: UV, sample loop: 100 mL.

더 좋은 반응 조건을 알기 위하여 용매의 조성, 산화몰리브덴의 양, 온도를 변화시켰다. 반응 조건에 대한 농도변화 측정은 위와 같은 방법으로 LC를 이용하여 분리한 후 HPLC 칼럼을 이용하여 분석하였고 결과를 Fig. 4에 보였다. 용매의 조성으로 20%의 메탄올에서 40시간 반응 후 가장 높은 21 g/L L-리보스 농도를 보였다. 20% 이상의 메탄올을 사용할 경우 반응 용매 증발이 빨리 일어나 용매의 양이 감소하여 L-리보스 농도가 감소하였다.

Luna NH<sub>2</sub> HPLC 칼럼에서 L-아라비노스의 체류시간은 약 11분, D-리보스의 체류시간은 약 8분으로 (Fig. 5A), SC1011 HPLC 칼럼의 L-아라비노스의 체류시간 약 10분, D-리보오스의 체류시간 약 17분에 (Fig. 3) 비교하면 짧았고 Luna NH<sub>2</sub> HPLC 칼럼이 사용하기 간편하였다. 따라서 이후 실험의 분석은 Luna 칼럼을 이용하였다. Fig. 5B에서 에피머 반응물을 직접 HPLC칼럼으로 분석한 예를 보이고 있다.

반응 후 15시간 경과했을 때 L-아라비노스, L-리보스 기타 불순물 피크를 볼 수 있다. 촉매로 사용된 산화몰리브덴의 농도를 10~60 g/L로 하여 에피머 반응을 수행한 결과, Fig. 6와 같이 촉매의 농도가 증가할수록 L-리보스의 농도가 증가함을 알 수 있었다. 촉매의 농도를 10 g/L로 하여 약 8%의 수율을 얻었고 촉매의 농도를 40 g/L로 하여 약 15%의 수율을 얻을 수 있었다. 이후 촉매의 농도는 40 g/L로

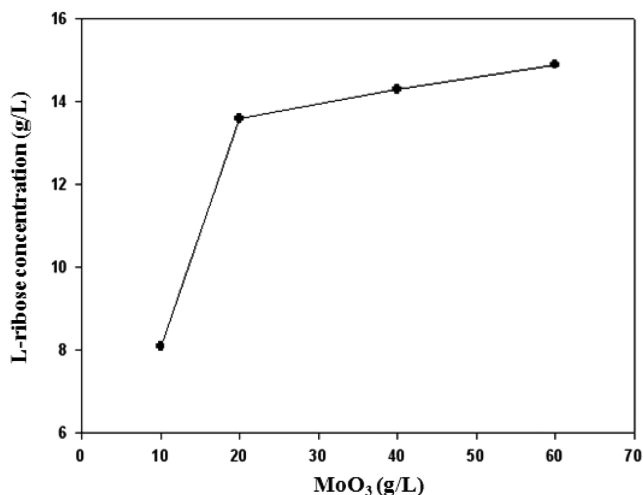


Fig. 6. L-ribose concentration from 10, 20, 40 and 60 g/L MoO<sub>3</sub>.

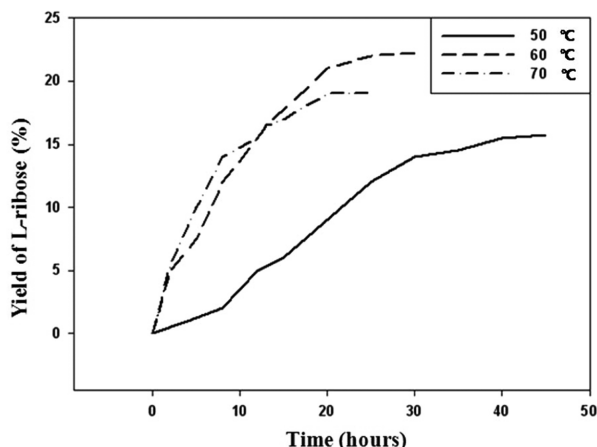


Fig. 7. L-ribose concentration with reaction time by using molybdenum oxide.

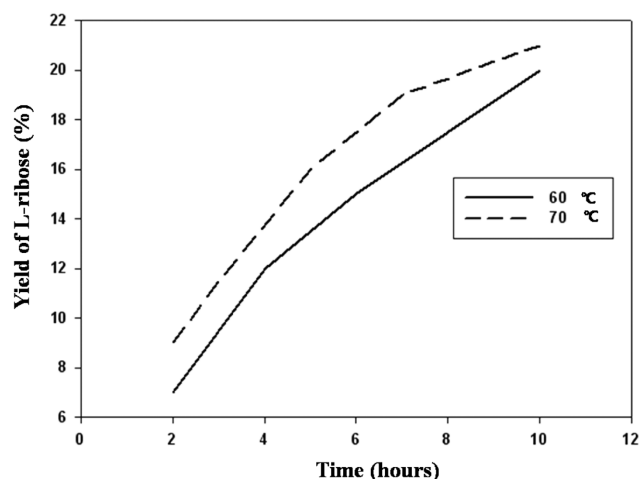


Fig. 8. L-ribose concentration with reaction time by using molybic acid.

정하였다.

산화몰리브덴 촉매의 농도를 40 g/L, 온도를 50~70 °C로 하여 반응이 시작된 후 40 시간까지 적당한 시간 간격으로 생성물을 샘플링하여 Luna HPLC를 사용하여 분석하였다. 시간이 지남에 따라 L-리보스의 농도가 증가하지만 그 기울기는 점차 감소함을 알 수 있었다. Fig. 7은 시간이 지남에 따라 L-리보스의 농도 변화를 나타낸 것이다. 온도 50 °C에서 반응 시간이 15 시간이었을 때에는 L-리보오스의 수율이 약 7%였고, 24 시간이었을 때에는 약 13%, 38 시간이었을 때에는 약 17%였다. Fig. 7에서 에피머 반응을 시작하고 50 °C에서는 38시간, 60 °C에서는 20시간, 70 °C에서는 15시간 후에 에피머 반응이 평형에 도달한다. 이는 온도가 높아질수록 에피머 반응 평형 도달시간이 짧아짐을 알 수 있다. 산화 몰리브덴 촉매를 사용했을 때 60 °C에서 L-리보스의 수율이 21%로 가장 높게 나오는 것을 알 수 있었다.

다른 촉매제 몰리브덴산을 사용하여 온도가 60, 70 °C에서 에피머반응의 평형 시간과 L-리보스의 수율변화를 Fig. 8에 보였다. Fig. 8에서 관찰할 수 있듯이 60 °C에서는 6시간 수율 15%, 70 °C에서는 6시간 후에 수율이 18%인 에피머반응 결과를 보였다. 모두 10시간 이내에 수율 20%에 도달하는 빠른 반응을 보이고 60 °C에서 안정적으로 리보스가 얻어졌다.

몰리브덴산은 용매와 단일상으로 혼합이 이루어져 Mo 이온과 L-아라비노스 사이에 접촉이 활발히 되어 반응시간이 짧아진 것으로 사료된다. 산화몰리브덴 촉매 사용시 시간에 따른 L-리보스 농도의 증가 추세를 보아 1차 반응식에 맞추어 반응속도 상수  $k$ 를 구할 수 있으리라 생각되며 계산한 결과  $k = 0.0162(60\text{ }^{\circ}\text{C})$ ,  $C_A = 100\exp(-0.0162t)$ 로 L-아라비노스 농도가 변화하였다.

#### 4. 결 론

L-리보스를 L-아라비노스로부터 얻기위해 에피머반응을 수행하였다. 산화몰리브덴 촉매의 양이 10 g/L에서 60 g/L로 증가됨에 따라 L-리보오스의 농도는 증가하여 산화 몰리브덴 촉매 농도가 높을수록 수율이 높았다. 38 시간까지 반응시켰을 때 L-리보오스의 농도는 증가되나 그 증가율이 점차 감소되어 38 시간이 되었을 때 수율이 약 20%가 되었다. 1차 반응속도 상수는  $k = 0.0162$ 이고 L-아라

비노스 반응 속도식은  $C_A=100\exp(-0.0162t)$ 으로 결정하였다. 온도가 높아질수록 에피머반응 평형 도달시간이 짧아진다. 몰리브덴산이 산화몰리브덴보다 훨씬 빠르게 반응 평형에 도달하도록 촉매 작용을 하며, 에피머 반응에서 몰리브덴산은 균일상인데 비해 산화몰리브덴은 불균일상으로 혼합되기 때문에 몰리브덴산 반응의 평형도달시간이 짧았다. L-리보스의 수율은 같은 온도에서는 몰리브덴산이나 산화몰리브덴이나 비슷한 수율을 보였다. 두 촉매 모두 60 °C에서 가장 높은 L-리보스의 수율을 나타냈다.

## 감 사

이 연구는 2010 지역인력양성사업에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Byun, Y. R., "New Thermophilic L-Ribose Isomerase and its Application," KR10-0809445(2008).

2. Jeon, Y. J. and Kim, I. H., "Determination of Adsorption Isotherms and Separation of L-Arabinose and D-Ribose in Cation Exchange Chromatography and HPLC," *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 31-36(2008).
3. Okano, K., "Synthesis and Pharmaceutical Application of L-Robose," *Tetrahedron*, **65**, 1937-1949(2009).
4. Seo, M. J., An, J. H., Shim, J. H. and Kim, G. C., "One-pot Inversion of D-Mannono-1,4-Lactone for the Practical Synthesis of L-Ribose," *Tetrahedron Letters*, **44**, 3051-3052(2003).
5. Zakaria, A. S., Tsuyoshi, S., Shakhawat, H., Masaru, U., Goro, T. and Ken, I., "Biochemical Preparation of L-Ribose and L-Arabinose from Ribitol," *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 444-448(1999).