

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0142625 (43) 공개일자 2013년12월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 41/00 (2006.01) C12N 11/14 (2006.01) C12N 9/20 (2006.01) C12M 1/40 (2006.01)	(71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)	(72) 발명자 정진현 서울시 동대문구 이문2동 삼성래미안아파트 202동 101호 최용성 인천시 연수구 송도동 4-1 더샵퍼스트월드 C동 1402호 (뒷면에 계속)
(21) 출원번호 10-2012-0065990 (22) 출원일자 2012년06월20일 심사청구일자 2012년06월20일	(74) 대리인 특허법인다나	

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 효소가 고정된 알지네이트 비드를 이용한 라세미 화합물의 분할 방법

(57) 요약

본 발명은 마이크로 플로우 리액터(micro flow reactor)를 통하여 효소가 고정화된 알지네이트 비드를 제조하고 연속 흐름 반응기(continuous flow reactor)에서 상기 알지네이트 비드와 라세미 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는 라세미 화합물의 분할 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 마이크로 비드에 효소를 고정시킴으로써 효소의 사용을 줄이면서 반응 효율을 높이고 반응이 끝난 후 별도의 효소 분리 작업이 필요하지 않아 후처리 과정이 없어 용매의 사용량을 줄일 수 있는 이점이 있다. 또한 마이크로 플로우 리액터를 이용한 효소의 연속 반응 공정으로 배치 반응과 비교하여 불 때 이산화탄소의 높은 전환율을 보여준다.

(72) 발명자

김윤정

인천광역시 남동구 구월동 1117-18 길원오피스텔
404호

임지순

대전광역시 서구 둔산2동 1203 은하수아파트 106동
402호

이인수

인천광역시 연수구 청학동 96-4 송도영남아파트 7
동 404호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S1073622

부처명 중소기업청

연구사업명 중소기업이전기술개발사업

연구과제명 Microflow Bioreactor를 이용한 Continuous Bioconversion System 개발 및 상용화

기 여 율 1/1

주관기관 씨엔에스

연구기간 2010.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

연속 흐름 반응기(continuous flow reactor)내에서 라세미 화합물을 광학활성 물질로 분할할 수 있는 효소가 고정되어 있고, 마이크로 플로우 리액터(micro flow reactor)를 통하여 생성된 알지네이트 비드를, 상기 효소와 반응할 수 있는 기능기(functional group)를 함유한 라세미 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는 라세미 화합물의 분할 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

효소가 고정화된 알지네이트 비드는, 마이크로 플로우 리액터(micro flow reactor)에서 유속을 제어하여 크기가 조절된 것인 라세미 화합물의 분할 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

효소는 리파아제(lipase) 또는 프로테아제(protease)인 라세미 화합물의 분할 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

기능기는 하이드록시기 또는 아민기인 라세미 화합물의 분할 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

반응은 헥산:THF:비닐 아세테이스(vinyl acetate)가 2:1:1로 혼합된 반응용매의 존재 하에서 실시되는 것인 라세미 화합물의 분할 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

반응은 헥산:THF:에틸 아세테이트(ethyl acetate)가 2:1:1로 혼합된 반응용매의 존재 하에서 실시되는 것인 라세미 화합물의 분할 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 효소가 고정된 알지네이트 비드를 이용한 라세미 화합물의 분할 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 광학 이성질체는 분자 모양이 거울 대칭이 되는 분자이다. 화학 반응시 입체적인 모양이 다르므로 입체적인 화학반응에서 특정한 종류의 광학 이성질체만 반응에 참여할 수 있으므로 최근 광학활성 화합물의 중요성이 점점

켜져 가고 있으며, 의약품뿐만 아니라, 기능 재료의 연구, 개발의 면에서도, 순수한 광학활성 키랄 분자를 선택적 및 효율적으로 창제하는 수단이 필요 불가결하게 되고 있다.

[0003] 종래에는 효소와 반응물질을 함께 넣어 섞어 준 후 반응이 끝나면 이들을 분리하는 회분식 방법으로 광학 활성 물질을 제조하였으나 회분식 방법은 효소의 농도가 반응속도에 영향을 미쳐 많은 양의 효소와 용매가 필요하다는 문제가 있었다.

[0004] 이러한 문제를 해결하기 위해 다양한 종류의 비드에 효소를 결합시켜 순수한 광학활성 키랄 분자를 제조하는 기술에 대해 많은 연구가 이루어지고 있으며 리파아제를 글루타르알데히드에 가교에 의해 고정시키고 이를 칼슘알지네이트 비드에 포획하는 방법(비특허 문헌 1; Biocatalysis and Biotransformation, September-October 2006; 24(5) 352-357)이 개시된 바 있다.

[0005] 그러나 이러한 방법에 의하더라도 비드의 크기가 너무 크거나 혹은 크기가 작더라도 불균일하여 반응 효율이 떨어지는 문제점이 여전히 남아있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 1. Biocatalysis and Biotransformation, September-October 2006; 24(5) 352-357

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명자들은 입자 크기가 균일한 알지네이트 비드를 제조하고 상기 알지네이트 비드에 효소를 고정함으로써 라세미 화합물을 효율적으로 분할할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 연속 흐름 반응기(continuous flow reactor)내에서 라세미 화합물을 광학활성 물질로 분할할 수 있는 효소가 고정되어 있고, 마이크로 플로우 리액터(micro flow reactor)를 통하여 생성된 알지네이트 비드를, 상기 효소와 반응할 수 있는 기능기(functional group)를 함유한 라세미 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는 라세미 화합물의 분할 방법을 제공한다.

[0009] 한 구체예에서, 상기 효소가 고정화된 알지네이트 비드는 마이크로 플로우 리액터에서 유속을 제어하여 크기가 조절된 것일 수 있다.

[0010] 다른 구체예에서, 상기 효소는 리파아제(lipase) 또는 프로테아제(protease)일 수 있다.

[0011] 다른 구체예에서, 상기 반응기는 하이드록시기(-OH) 또는 아민기(-NH₂)일 수 있다.

[0012] 다른 구체예에서, 상기 반응은 헥산(hexane):THF(tetrahydrofuran):비닐 아세테이트(vinyl acetate)가 2:1:1로 혼합된 반응용매의 존재 하에서 실시되는 것일 수 있다.

[0013] 다른 구체예에서, 상기 반응은 헥산(hexane):THF(tetrahydrofuran):에틸 아세테이트(ethyl acetate)가 2:1:1로 혼합된 반응용매의 존재 하에서 실시되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 마이크로 크기의 단분산성 알지네이트 비드를 이용하여 효소 활성이 우수하고 효소와 라세미 화합물의 연속적인 반응에 의해 광학 활성 물질을 대량생산할 수 있는 기술을 제공하는 효과가 있다.

[0015] 본 발명은 다양한 산업분야에 있어서 라세미 화합물에서 생리활성을 가진 광학 활성체를 분할하는데 활용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0017] 본 발명은 연속 흐름 반응기(continuous flow reactor)내에서 라세미 화합물을 광학활성 물질로 분할할 수 있는 효소가 고정되어 있고, 마이크로 플로우 리액터를 통하여 생성된 알지네이트 비드를, 상기 효소와 반응할 수 있는 기능기(functional group)를 함유한 라세미 화합물과 반응시키는 단계를 포함하는 라세미 화합물의 분할 방법에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명에서, 알지네이트 비드는 마이크로 사이즈이며 입자의 크기가 균일한 비드를 제조함으로써, 작은 비드 크기로 인하여 비표면적이 극대화되고 균일한 입자 크기로 인하여 비드 사이의 공극이 줄어 반응성을 개선시킨 것이다.
- [0019] 본 발명에서, 비드에 효소를 고정화함으로써 효소의 사용을 줄이면서 효소와 반응물질의 접촉 빈도를 증가시켜 반응 효율을 개선시킬 수 있다.
- [0020] 본 발명에서, 상기 마이크로 플로우 리액터는 마이크로 단위 이하의 공간에서 화학 반응이 수행되는 반응기를 일컫는다. 바람직하게는 상기 마이크로 플로우 리액터는 마이크로 채널을 포함하고 있어, 반응물들이 상기 마이크로 채널 내부를 통과하면서 반응이 진행된다. 상기 마이크로 플로우 리액터의 구조 등은 미국등록특허 US 6449184, US 6228434 또는 US 6192596을 참조할 수 있다. 상기 특허들에 기재된 마이크로 플로우 리액터의 구조 등이 본원 발명에도 적용될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 마이크로 플로우 리액터를 포함하는 시스템은 저장부, 혼합부, 마이크로 플로우 리액터 및 상기 저장부, 혼합부 및 마이크로 플로우 리액터를 각각 연결하는 유로를 포함할 수 있다. 상기 저장부는 상기 마이크로 플로우 리액터에 반응물들이 주입되기 전 주입된 반응물들을 저장하는 역할을 수행한다. 상기 저장부의 개수는 필요에 따라 적절하게 조절될 수 있다. 상기 혼합부는 상기 저장부로부터 유입된 반응물들을 균일하게 혼합하여 혼합물을 생성하는 역할을 수행한다. 상기 마이크로 플로우 리액터에서는 상기 혼합부로부터 유입된 상기 혼합물에 포함된 반응물들이 서로 반응한다. 상기 마이크로 플로우 리액터는 마이크로 채널을 포함하고 있어, 상기 반응물들을 포함하는 혼합물이 상기 마이크로 채널을 통과하면서 반응이 수행될 수 있다. 상기 마이크로 플로우 리액터의 온도, 압력 및 상기 마이크로 플로우 리액터에서 상기 반응물들이 정치되는 시간 등을 조절하여 최종 형성되는 생성물의 수율 및 불순물 발생율을 조절할 수 있다. 상기 유로는 반응물 또는 혼합물들을 상기 시스템의 저장부, 혼합부 또는 마이크로 플로우 리액터로 이동시키는 역할을 수행한다. 상기 반응물 또는 혼합물의 상기 유로에서의 유속 및 상기 유로의 길이에 따라 상기 마이크로 플로우 리액터에서 수행되는 반응의 효율을 조절할 수 있다.
- [0022] 상기 마이크로 플로우 리액터를 포함하는 시스템은 전술한 저장부, 혼합부 및 마이크로 플로우 리액터 외에 추가적으로 마이크로 플로우 리액터를 조절하는 제어부 및 최종 생성물을 저장하는 수거부 등을 더 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에서, 마이크로 플로우 리액터는 용액 수송용 펌프, 마이크로 단위의 내경을 갖는 +형 교차 구조를 가지는 장치 및 교반기로 이루어질 수 있다. 상기 마이크로 플로우 리액터의 펌프는 syrris사의 FRX 펌프를 사용하였다. +형 교차점의 중심을 기준으로 시계방향으로 A, B, C, D 유로라고 칭하면 A와 C유로는 유기용매가 들어오는 입구이고 B유로는 소듐-알지네이트 수용액이 들어오는 입구이며, D유로는 생성된 드랍릿(droplet)과 유기용매가 빠져나가는 출구이다. D유로의 끝 부분은 염화칼슘 용액 안에 위치한다.
- [0024] 한 구체예에서, 상기 효소가 고정화된 알지네이트 비드는 마이크로플로우 리액터에서 유속(flow rate)을 제어하여 크기가 조절된 것일 수 있다.
- [0025] 알지네이트 비드는 자연으로부터 얻어진 다당류로 구성되어 있어 무독성, 생분해능력이 탁월하며 합성방법이 매우 간편하고 빨라서 널리 이용되고 있으며 알지네이트는 칼슘과 같은 2가 양이온을 이용하여 쉽게 가교가 이루어진다. 생성되는 알지네이트 비드는 다양한 생물학적 분자 예를 들어, DNA, 단백질, 효소, 항체, 세포 등을 캡슐화에 사용되고 있다.
- [0026] 상기 알지네이트 비드는 수분을 포함하는 가교형태로 효소를 포괄하는 방법으로 효소의 활성 유지에 유리할 수 있다.
- [0027] 다른 구체예에서, 상기 효소는 리파아제(lipase) 또는 프로테아제(protease)일 수 있다.
- [0028] 상기 리파아제는 *C.antarctica* lipase B (CAL-B)로 엔자임텍에서 구입하였다.

- [0029] 다른 구체예에서, 상기 기능기는 하이드록시기(-OH) 또는 아민기(-NH₂)일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 기능기를 함유하는 라세미 화합물로 1-페닐에탄올, 1-(1-나프틸)에틸아민을 사용하였다. 상기 1-페닐에탄올, 1-(1-나프틸)에틸아민은 알드리치 및 TCI 제품을 구입하여 사용하였다.
- [0031] 다른 구체예에서, 상기 반응은 헥산(hexane):THF(tetrahydrofuran):비닐 아세테이트(vinyl acetate)가 2:1:1로 혼합된 반응용매의 존재 하에서 실시되는 것일 수 있다.
- [0032] 다른 구체예에서, 상기 반응은 헥산(hexane):THF(tetrahydrofuran):에틸 아세테이트(ethyl acetate)가 2:1:1로 혼합된 반응용매의 존재 하에서 실시되는 것일 수 있다.
- [0033] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] <실시예 1> 리파아제가 고정된 마이크로 크기의 알지네이트 비드의 제조
- [0035] 1. 소듐-알지네이트 수용액(Na-alginate solution)의 제조(리파아제 혼합)
- [0036] 리파아제는 *C.antarctica* lipase B (CAL-B)를 사용하고 엔자임텍에서 구입하였다.
- [0037] 증류수 또는 탈이온수 100ml에 소듐-알지네이트(Na-alginate) 2g과 리파아제(CalB) 2ml를 넣은 후, 잘 교반하여 균일한 수용액을 준비하였다.
- [0038] 2. 염화칼슘 용액(CaCl₂ solution)의 제조
- [0039] 증류수 또는 탈이온수 100ml에 염화칼슘(CaCl₂) 2g을 넣은 후, 잘 교반하여 균일한 용액을 준비하였다.
- [0040] 3. 마이크로 플로우 리액터 준비
- [0041] 용액수송용 펌프, 마이크로 단위의 내경을 갖는 +형 교차구조를 가지는 장치, 교반기를 준비하였다. 펌프는 syrris사의 FRX 펌프를 사용한다. 설명을 위해 +형 교차점의 중심을 기준으로 시계방향으로 A, B, C, D 유로라고 칭하면 A와 C유로는 유기용매(hexane)가 들어오는 입구이고 B는 소듐-알지네이트 수용액(Na-alginate solution)이 들어오는 입구이다. D는 생성된 드랍릿(droplet)과 유기용매가 빠져나가는 출구이다.
- [0042] 4. 펌프를 이용하여 유기용매를 0.6 ml/min(A, C각 0.3 ml/min)의 속도로 흘려주었다.
- [0043] 5. 펌프를 이용하여 소듐-알지네이트 수용액(Na-alginate solution)을 0.15ml/min의 속도로 흘려주었다. 유속을 변경함으로써 비드의 크기를 조절 할 수 있었다.
- [0044] 6. 출구 D의 끝 부분은 염화칼슘 용액(CaCl₂ solution) 안에 위치하였다. 염화칼슘 용액(CaCl₂ solution)이 들은 비커는 교반기를 이용하여 잘 저어주었다. 소듐-알지네이트 드랍릿(Na-alginate droplet)이 염화칼슘 용액(CaCl₂ solution)과 반응하여 경화된 칼슘-알지네이트 비드(Ca-alginate bead)를 생성하였다.
- [0045] 7. 생성된 비드는 여과하여 증류수를 이용하여 잘 세척하여 주고, 필요에 따라 건조하였다. 건조 방법은 자연건조, 감압건조, 동결건조 등 다양하게 적용할 수 있다.
- [0046] <실시예 2> 연속 흐름 반응기(continuous microflow reactor)를 이용한 라세미 화합물의 분할
- [0047] 1. 준비
- [0048] 연속 흐름 반응기의 펌프는 syrris사의 FRX 펌프를 사용하고 효소가 고정된 마이크로 비드를 충전하기 위한 컬럼은 ommifit사의 내경 150mm인 솔벤트 플러스 컬럼(solvent plus column)을 사용하였다. 1-페닐에탄올(1-phenylethanol), 1-(1-나프틸)에틸아민(1-(1-Naphthyl)ethylamine), 비닐 아세테이트(vinyl acetate), 에틸 아세테이트(ethyl acetate)는 알드리치 및 TCI 제품을 구입하였다. 그밖에 모든 용매는 증류하여 사용하였다.
- [0049] 2. 연속 흐름 반응기에서의 라세미 화합물의 에난티오머(enantiomer) 선택적 아세틸레이션(acetylation)
- [0050] (1) 라세미 알코올(racemic alcohol)
- [0051] 1-페닐에탄올(1-phenylethanol)을 5mmol을 헥산:THF:비닐 아세테이트가 2:1:1인 혼합액(40ml)에 넣어 시료를 준비하였다. Nobozyme435 (5.5g)를 채운 컬럼을 마이크로 플로우 리액터 펌프(Micro flow Reactor pump)와 연결한 후 헥산(hexane):THF (2:1)에서 충분히 고정화된 효소를 2.0 ml/min의 유속으로 씻어준 후 준비한 1-페닐

에탄올(1-phenylethanol)용액으로 바꾸어 30℃에서 1.5, 1.0, 0.5, 0.1, 0.05 ml/min의 유속으로 컬럼을 통과시켰으며 매 단위마다 샘플을 취하여 HPLC로 측정하였다.

[0052] HPLC 분석은 HPLC 1200(Agilent) Series Autosampler(G1329A)장비를 이용하였으며, 컬럼은 Eclipse XDB-C18 4.6*150 mm과 CHIRALCEL OD-H 4.6*250 mm을 사용하였다.

[0053] 이동상은 1-페닐에탄올(1-phenylethanol)의 경우 *n*-헥산(Hexane) : 2-프로판올(propanol) = 90 : 10 (v/v)으로 전개하였으며 유속은 1 ml/min, 온도는 25℃, 검출은 UV 254nm에서 진행하였고 1-(1-나프틸)에틸아민(1-(1-Naphthyl)ethylamine)의 경우 *n*-헵탄(Heptan) (TFA 1%) : 2-프로판올(propanol) : 메탄올(methanol) = 90 : 7 : 3 (v/v), 유속은 1 ml/min, 온도는 25℃, 검출은 UV 254nm에서 진행하였다.

[0054] 유속 0.1 ml/min의 속도로 컬럼을 통과시켰을 때 전환속도(conversion rate) 50%, e.e 100%의 값으로 (R)-폼(form)의 아세틸레이션된 생성물을 얻을 수 있었다.

[0055] (2) 라세미 아민(racemic amine)

[0056] 1-(1-나프틸)에틸아민(1-(1-Naphthyl)ethylamine)을 5mmol 취하여 헥산:THF:에틸 아세테이트의 비율이 2:1:1인 혼합액(40ml)에 넣어 시료를 준비하였다. 효소를 채운 실린지를 연결한 마이크로 플로우 리액터를 펌프와 연결한 후 헥산(hexane): THF (2:1)에서 충분히 고정화된 효소를 2.0 ml/min의 유속으로 씻어준 후 준비한 1-(1-나프틸)에틸아민(1-(1-Naphthyl)ethylamine) 용액으로 바꾸어 30℃에서 1, 0.5, 0.1, 0.05 ml/min의 유속으로 컬럼을 통과시켰으며 매 단위마다 샘플을 취하여 HPLC로 측정하였다. HPLC 분석 방법은 라세미 알코올에서와 동일하게 진행하였다.

[0057] 유속 0.05 ml/min의 속도로 컬럼(column)을 통과시켰을 때 전환속도 39.6%, e.e 100%의 값으로 (R)-폼(form)의 아세틸레이션된 생성물을 얻을 수 있었다.

[0058] <비교예 1> 배치(batch)상에서의 라세미 화합물의 분할

[0059] 1. 배치(batch)상에서의 라세미 화합물의 에난티오머(enantiomer)

[0060] 선택적 아세틸레이션(acetylation)

[0061] (1) 라세미 알코올(racemic alcohol)

[0062] 1-페닐에탄올(1-phenylethanol)을 5mmol 취하여 헥산:THF:비닐 아세테이트가 2:1:1인 혼합액(40ml)에 넣고 효소를 동일한 양을 첨가하였다. 이 용액을 30℃, 120rpm으로 셰이킹 인큐베이터(shaking incubator)에서 인큐베이션(incubation)하였다. 1, 2, 4, 6, 10시간 단위로 샘플을 1ml씩 취하여 여과(filtration) 한 후 HPLC로 결과를 측정하였다.

[0063] HPLC 분석 방법은 상기 실시예 2에서와 동일하게 실시하였으며, 분석 결과 유속 0.1 ml/min의 속도로 컬럼을 통과시켰을 때 10시간 반응 후 전환속도 50%, e.e 100%의 값으로 (R)-폼(form)의 아세틸레이션된 생성물을 얻을 수 있었다.

[0064] (2) 라세미 아민(racemic amine)

[0065] 1-(1-나프틸)에틸아민(1-(1-Naphthyl)ethylamine) 5mmol을 헥산:THF:에틸 아세테이트가 2:1:1인 혼합액(40ml)에 넣고 효소를 아민과 동일한 양을 첨가하였다. 이 용액을 30℃, 120rpm으로 셰이킹 인큐베이터(shaking incubator)에서 인큐베이션(incubation)하였다. 1, 3, 6, 24시간 단위로 샘플을 1ml씩 취하여 여과 한 후 HPLC로 결과를 측정하였다.

[0066] HPLC 분석 방법은 상기 실시예 2에서와 동일하게 실시하였으며, 분석 결과 유속 0.05 ml/min의 속도로 컬럼을 통과시켰을 때 24시간 반응 후 전환속도 31.9%, e.e 100%의 값으로 (R)-폼(form)의 아세틸레이션된 생성물을 얻을 수 있었다.