



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0044738
(43) 공개일자 2024년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/62 (2022.01) C12N 11/00 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/62 (2022.01)
C12N 11/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0124133
(22) 출원일자 2022년09월29일
심사청구일자 2022년09월29일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
나정걸
서울시 서초구 고무래로 89, 107동 302호 (반포동, 반포써밋)
박철환
서울시 노원구 덕릉로 83길 9-7, 103동 2402호 (중계4동, 중계2차 한화꿈에그린 The First 아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인에스알비

전체 청구항 수 : 총 11 항

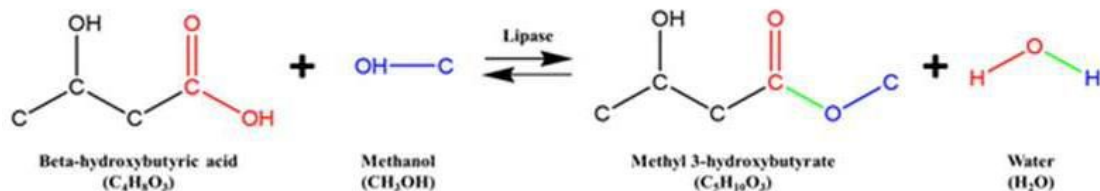
(54) 발명의 명칭 리파아제를 이용한 메틸 3-하이드록시부티레이트의 합성 방법

(57) 요약

본 발명은 리파아제를 이용한 메틸 3-하이드록시부티레이트의 합성 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 제조 방법을 이용할 경우, 상온 및 상압 조건의 공정 운용이 가능하며 분리 및 정제 과정이 간단하므로 공정의 효율성 및 경제성이 높다. 또한, 최적의 반응 조건을 확립하기 위해 일련의 반응 조건 최적화를 달성함으로써 생산량 및 비용의 최적화를 달성할 수 있다.

아울러, 본 발명의 제조 방법을 이용할 경우, 산 혹은 염기 촉매를 이용한 기존의 방식을 대체함으로써 친환경적으로 메틸 3-하이드록시부티레이트를 제조할 수 있기 때문에 환경 보존에 기여할 수 있으며, 생촉매인 효소를 사용하여 식품 향신료로 이용되는 메틸 3-하이드록시부티레이트의 안전성 및 신뢰성을 높일 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 9/16 (2013.01)

(72) 발명자

손제민

경상남도 창원시 성산구 안민로 101번길 29, 103동 302호 (안민동, 대동청솔아파트)

이혜선

서울특별시 도봉구 시루봉로 17길 7, 302호 (방학동)

이택

서울특별시 마포구 독막로 266, 109동 1801호 (대흥동, 태영아파트)

오종민

경기도 의정부시 송양로 94, 1909동 1406호 (민락동, 4-2 4-3 민락엘리트아파트)

박시재

경기도 일산서구 하이파크3로 62, 501동 1002호 (덕이동, 하이파크시티일산아이파크5단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711131177
과제번호	2015M3D3A1A01064926
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1 가스 리파이너리 사업
연구과제명	가스 전달 한계를 극복하는 고효율 C1 가스 전환 시스템 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

리파아제의 존재 하에 베타하이드록시부티르산과 메탄올을 반응시키는 것을 특징으로 하는 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 리파아제는 에스테르 및 알코올 기질 특이성 리파아제인 것을 특징으로 하는, 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 리파아제는 무위치 선택성 리파아제인 것을 특징으로 하는, 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 리파아제는 고정화된 리파아제인 것을 특징으로 하는, 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 리파아제는 Novozym 435인 것을 특징으로 하는, 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 리파아제의 농도는 2.5 내지 30 g/L인 것을 특징으로 하는, 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 베타하이드록시부티르산과 메탄올의 몰 비율이 1:0.5 내지 1:3인 것을 특징으로 하는, 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 반응이 30 내지 60 °C에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 반응이 용매 하에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 용매는 아세톤나이트릴, 아세톤, tert-아밀 알코올, 1,2-다이클로로에테인, 클로로폼, 톨루엔, 사이클로헥세인 및 n-헥세인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 반응은 6시간 동안 이루어지는 것을 특징으로 하는, 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리파아제를 이용한 메틸 3-하이드록시부티레이트 (methyl 3-hydroxybutyrate)의 합성 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 메틸 3-하이드록시부티레이트 (methyl 3-hydroxybutyrate)는 최근 경구 복용을 통한 케톤 테라피 발현 유도제로써 사용 가능성이 확인되었으며, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)는 메틸 3-하이드록시부티레이트를 향료로 소개하며 식품으로써의 안정성을 확인하였다. 이에 따라 메틸 3-하이드록시부티레이트는 식품 첨가제, 건강 보조제 등에 사용되고 있다. 최근 개인 건강 및 면역력에 대한 관심이 높아지고 시장이 커짐과 동시에 메틸 3-하이드록시부티레이트의 수요 또한 성장하고 있다.

[0003] 기존의 메틸 3-하이드록시부티레이트 합성 방법은 고온 또는 황산 등의 화학적 공정을 이용하는 것이었다. 따라서 공정의 효율성 및 경제성이 낮았으며, 식품 보조제 및 건강 보조제로 사용되는 메틸 3-하이드록시부티레이트의 안전성 및 신뢰성에 부정적 인식이 증가하였고, 환경 오염의 문제도 대두되기 시작하였다.

[0004] 그러나, 메틸 3-하이드록시부티레이트 합성의 촉매로 효소를 이용한 연구는 선행된 것이 없었으며, 효소 반응의 핵심요소인 효소의 종류, 효소의 농도, 반응물의 몰 비율, 반응 온도 및 반응 용매의 최적화를 통해 전환율을 높이는 연구는 전무한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자는 리파아제 (Lipase)의 존재 하에 베타하이드록시부티르산 (β -hydroxybutyric acid)과 메탄올 (Methanol)을 반응시켜 메틸 3-하이드록시부티레이트 (methyl 3-hydroxybutyrate)를 합성하였다. 또한, 합성에 이용되는 효소의 종류, 효소의 양, 반응물의 몰 비율, 반응 온도 및 반응 용매의 종류를 변화시켜 최적화된 공정의 조건을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 본 발명의 목적은 리파아제의 존재 하에 베타하이드록시부티르산과 메탄올을 반응시키는 것을 특징으로 하는 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 리파아제를 이용한 메틸 3-하이드록시부티레이트의 합성 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 제조 방법을 이용할 경우, 상온 및 상압 조건의 공정 운용이 가능하며 분리 및 정제 과정이 간단하므로 공정의 효율성 및 경제성이 높다. 또한, 최적의 반응 조건을 확립하기 위해 일련의 반응 조건 최적화를 달성함으로써 생산량 및 비용의 최적화를 달성할 수 있다.

[0008] 아울러, 본 발명의 제조 방법을 이용할 경우, 산 혹은 염기 촉매를 이용한 기존의 방식을 대체함으로써 친환경적으로 메틸 3-하이드록시부티레이트를 제조할 수 있기 때문에 환경 보존에 기여할 수 있으며, 생촉매인 효소를 사용하므로 식품 향신료로 이용되는 메틸 3-하이드록시부티레이트의 안전성 및 신뢰성을 높일 수 있다.

[0009] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0010] 본 발명의 일 양태는 리파아제의 존재 하에 베타하이드록시부티르산과 메탄올을 반응시키는 것을 특징으로 하는 메틸 3-하이드록시부티레이트의 제조 방법에 관한 것이다.

[0011] 본 발명의 일 구체예에서, 리파아제는 에스테르 및 알코올 기질 특이성 리파아제일 수 있다.

[0012] 일반적으로 리파아제는 그 종류에 따른 기질 특이성을 가지며, 본 발명의 에스테르화 반응에서는 에스테르 기질 특이성 리파아제와 에스테르 및 알코올 기질 특이성 리파아제의 두 가지로 나뉜다. 본 발명의 에스테르화 반응에서는 기질로 메탄올을 사용하므로 에스테르 및 알코올 기질 특이성 리파아제가 유리하게 작용할 수 있다.

- [0013] 본 발명의 일 구체예에서, 리파아제는 무위치 선택성 리파아제일 수 있다.
- [0014] 일반적으로 리파아제는 그 종류에 따른 위치 선택성을 가지며, 무위치 선택성 리파아제와 1,3-위치 선택성 리파아제의 두 가지 혹은 1,3-위치 특이성 리파아제를 포함한 세 가지로 나뉜다. 본 발명의 에스테르화 반응에서는 무위치 선택성 리파아제가 유리하게 작용할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에서, 리파아제는 고정화된 리파아제인 것일 수 있다.
- [0016] 리파아제는 고정화 여부에 따라 고정화된 리파아제 및 고정화되지 않은 리파아제로 분류된다. 고정화되지 않은 효소는 고정화된 효소에 비해 유기용매 조건 및 고온 조건에서 낮은 활성을 나타내거나 혹은 활성을 나타내지 못하는 단점이 존재하지만, 보다 낮은 가격으로 인해 널리 이용되고 있다. 본 발명에 따르면 리파아제는 고정화된 리파아제인 것이 바람직하다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에서, 고정화된 리파아제는 Novozym 435, Lipozyme RM IM 및 Lipozyme TL IM으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 예를 들어 Novozym 435인 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구체예에서, 리파아제의 농도는 2.5 내지 30 g/L, 2.5 내지 25 g/L, 2.5 내지 20 g/L, 5 내지 30 g/L, 5 내지 25 g/L, 5 내지 20 g/L, 10 내지 30 g/L, 10 내지 25 g/L, 10 내지 20 g/L, 15 내지 30 g/L, 15 내지 25 g/L, 또는 15 내지 20 g/L, 예를 들어 15 g/L인 것일 수 있다.
- [0019] 리파아제의 농도가 2.5g/L 미만이면 반응이 너무 느리게 이루어질 수 있고 30 g/L을 초과하면 기질 전달 저해 현상이 발생하여 전환율이 증가하지 않거나 나아가서는 감소하기도 하는 문제점이 발생할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 구체예에서, 베타하이드록시부티르산과 메탄올의 몰 비율은 1:0.5 내지 1:3, 1:0.5 내지 1:2.5, 1:1 내지 1:3, 1:1 내지 1:2.5, 1:1.5 내지 1:3, 1:1.5 내지 1:2.5, 1:2 내지 1:3, 또는 1:2 내지 1:2.5, 예를 들어 1:2인 것일 수 있다.
- [0021] 베타하이드록시부티르산과 메탄올의 몰 비율이 1:0.5 미만이면 반응 수율이 낮아질 우려가 있고 1:3 초과이면 반응이 저해될 수 있다. 메틸 3-하이드록시부티레이트의 생성에 이용되는 에스테르화 반응은 가역적인 반응이기 때문에 높은 전환율을 위해서 역반응을 억제하여야 하는데, 메탄올의 공급은 르 샤틀리에의 원리 (Le Chatelier's principle)에 의해 정반응을 촉진시키고 유효충돌의 증가를 통해 전환율을 높이지만, 최적의 몰비율을 넘어선 메탄올의 과잉 공급은 효소인 리파아제의 활성을 방해하기 때문이다.
- [0022] 본 발명의 일 구체예에서, 반응의 온도는 30 내지 60 °C, 30 내지 50 °C, 40 내지 60 °C, 또는 40 내지 50 °C, 예를 들어 40 °C인 것일 수 있다.
- [0023] 온도가 30°C 미만이면 반응이 너무 느리게 일어날 가능성이 있고, 60°C 초과하면 리파아제의 변성 및 공정 비용의 증가 우려가 있다. 반응 온도가 증가함에 따라 분자의 운동 속도가 증가하여 유효 충돌 빈도를 증가시키므로 반응 속도 또한 증가하지만, 리파아제와 같은 효소는 단백질로 이루어진 특성으로 인해 고온의 조건에서 변성되어 활성을 잃기 때문이다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예에서, 반응은 용매 하에서 이루어지는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구체예에서, 용매는 아세톤나이트릴, 아세톤, tert-아밀 알코올, 1,2-다이클로로에테인, 클로로폼, 톨루엔, 사이클로헥세인 및 n-헥세인으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어 클로로폼인 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 구체예에서, 반응은 6시간 동안 이루어지는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명은 리파아제를 이용한 메틸 3-하이드록시부티레이트의 합성 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 제조 방법을 이용할 경우, 상온 및 상압 조건의 공정 운용이 가능하며 분리 및 정제 과정이 간단하므로 공정의 효율성 및 경제성이 높다. 또한, 최적의 반응 조건을 확립하기 위해 일련의 반응 조건 최적화를 달성함으로써 생산량 및 비용의 최적화를 달성할 수 있다.
- [0028] 아울러, 본 발명의 제조 방법을 이용할 경우, 산 혹은 염기 촉매를 이용한 기존의 방식을 대체함으로써 친환경적으로 메틸 3-하이드록시부티레이트를 제조할 수 있기 때문에 환경 보존에 기여할 수 있으며, 생촉매인 효소를 사용하므로 식품 향신료로 이용되는 메틸 3-하이드록시부티레이트의 안전성 및 신뢰성을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 메틸 3-하이드록시부티레이트 합성 과정을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0032] 실시예 1: 시약 및 효소의 준비

[0033] 본 발명의 생성물인 메틸 3-하이드록시부티레이트와 반응물인 베타하이드록시부티르산은 Cayman Chemical (미시건, 미국)에서, 메탄올은 대정화금 (경기도, 한국)에서 구매하였다. 반응 용매로 사용된 아세톤, tert-아밀 알코올, 1,2-다이클로로에테인, 클로로폼, 사이클로헥세인, n-헥세인은 대정화금 (경기도, 한국)에서, 아세토나이트릴과 톨루엔은 준세이 (도쿄, 일본)에서 구매하였다. 효소 Novozym 435, Lipozyme RM IM 및 Lipozyme TL IM은 노보자임 (Bagsvaerd, 덴마크)으로부터 구매하였다.

[0035] 실시예 2: 메틸 3-하이드록시부티레이트의 합성

[0036] 베타하이드록시부티르산과 메탄올을 리파아제를 이용하여 메틸 3-하이드록시부티레이트를 합성하였다. 이론적으로 1 몰의 베타하이드록시부티르산과 1 몰의 메탄올이 반응하여 1 몰의 메틸 3-하이드록시부티레이트와 1 몰의 물이 생성된다.

[0037] 베타하이드록시부티르산과 메탄올이 100 mM의 농도가 되도록 클로로폼에 용해시켜 10 ml headspace vial에 4 ml 만큼 넣어주었다. 그 후 용액에 고정화된 리파아제를 넣은 후 butyl rubber stopper와 aluminum crimp seal로 밀봉하였다. 일정한 온도를 유지하기 위해 shaking incubator에서 150 rpm으로 6시간 동안 반응시켰다.

[0039] 실시예 3: 메틸 3-하이드록시부티레이트의 분석

[0040] 반응을 마친 용액을 1 ml 주사기를 이용하여 채취하고 syringe filter(PTFE, 0.20 μ m, 13mm, Advantec)로 필터링하여 2 ml vial에 샘플을 주입하였다. 준비된 샘플은 가스 크로마토그래피 (Agilent Technologies, 7890A)를 이용하여 분석하였다. 각 샘플은 오토샘플러 (Agilent Technologies, 7693)를 통해 채취되었다. 샘플의 주입 부피는 0.5 μ L로 설정하였다. Inlet의 온도, 압력, 전체 유속, septum purge flow는 250 $^{\circ}$ C, 13.615 psi, 15.1 mL/min, 3mL/min으로 설정하였다. 컬럼은 Agilent 19091N-133 (260 $^{\circ}$ C; 30 m $\times$ 250 μ m $\times$ 0.25 μ m)을 사용하였으며 유속, 압력, 평균 속력, 오븐 온도, holdup 시간은 각각 1.1 mL/min, 13.615 psi, 29.373 cm/s, 80 $^{\circ}$ C, 1.7022 min으로 설정하였다. 검출에는 불꽃이온검출기를 이용하였고 온도는 250 $^{\circ}$ C, 수소와 공기, 질소의 주입 속도는 각각 40 mL/min, 400 mL/min, 20 mL/min으로 설정하였다. 메틸 3-하이드록시부티레이트의 전환율은 100 mM 농도로 제작한 스탠다드 메틸 3-하이드록시부티레이트 용액의 분석 결과 값을 토대로 도출하였다.

[0042] 실시예 4: 반응 조건의 최적화

[0043] 메틸 3-하이드록시부티레이트의 합성 조건의 영향을 확인하기 위해 고정화된 리파아제의 종류 및 농도, 베타하이드록시부티르산과 메탄올의 몰 비율, 반응 온도 및 반응 용매의 종류를 각각 다르게 한 실험을 진행하였다.

[0045] 4-1. 효소의 종류 최적화

[0046] 먼저 고정화된 리파아제의 종류에 따른 영향을 파악하기 위해 리파아제의 농도를 5 g/L로 Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM을 이용하여 실험을 진행하였다. 베타하이드록시부티르산과 메탄올의 몰 비율은 1:1.0, 반응 온도는 30 $^{\circ}$ C, 용매는 클로로폼을 사용하였다.

[0047] 그 결과 Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM을 사용했을 때 전환율은 1% 이하로 관찰되었다. 반면 Novozym 435을

사용하였을 때는 약 47%의 전환율을 확인하였다. Novozym 435의 경우 위치선택성과 입체선택성이 없다. 반면 Lipozyme RM IM과 Lipozyme TL IM은 3차 알코올의 1번과 3번의 하이드록시기와 반응하는 1,3-위치선택성을 갖는다. 따라서 베타하이드록시부티르산과 메탄올을 에스터화 반응을 통해 합성할 때, 무위치선택성인 Novozym 435이 최적의 효소임을 확인하였다.

표 1

효소	위치선택성	기질특이성	전환율 (%)
Novozym 435	Non-specific	Esters and alcohols	46.95 ± 2.07
Lipozyme TL IM	1,3-specific	Esters	0.07 ± 0.00
Lipozyme RM IM	1,3-specific	Esters	0.13 ± 0.01

4-2. 효소의 농도 최적화

고정화된 리파아제의 농도 영향을 파악하기 위해서 Novozym 435 농도를 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30 g/L로 변화시켜 실험을 진행하였다. 이때 베타하이드록시부티르산과 메탄올의 몰 비율은 1:1.0, 반응 온도는 30 ℃, 용매는 클로로폼을 사용하였다.

효소의 농도에 따른 메틸 3-하이드록시부티레이트의 전환율은 2.5 g/L일 때 30.00%, 5 g/L일 때 46.95%, 10 g/L일 때 58.67%, 15 g/L일 때 69.85%, 20 g/L일 때 71.41%, 25 g/L일 때 72.45%, 30 g/L일 때 72.58%로 관찰되었다. 메틸 3-하이드록시부티레이트의 전환율은 Novozym 435의 농도가 증가함에 따라 증가하였으나 15 g/L 이상에서는 유의미한 수준의 전환율 증가가 관찰되지 않았다. 이는 적정 수준 이상의 효소를 첨가할 경우 기질 전달 저해 현상의 영향을 받아 전환율이 증가하지 않거나 나아가서는 감소하기도 하는 영향 때문이다.

즉, 반응에 첨가되는 효소의 양은 공정의 경제성에도 영향을 가지기 때문에 적정 수준 넣어주어야 하는데, 15 g/L 이후 증가한 리파아제 양 대비 유의미한 수준의 전환율 증가를 관찰하지 못하여 15 g/L를 최적의 농도로 설정하였다.

표 2

Novozym 435 농도 (g/L)	전환율 (%)
2.5	30.00
5	46.95
10	58.67
15	69.85
20	71.41
25	72.45
30	72.58

4-3. 반응물의 몰 비율 최적화

반응물의 몰 비율의 영향을 확인하기 위해 베타하이드록시부티르산과 메탄올의 몰 비율을 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:3으로 변화시켜 실험을 진행하였다. 이때 Novozym 435의 농도는 15 g/L, 반응 온도는 30 ℃, 용매는 클로로폼에서 반응하였다.

메틸 3-하이드록시부티레이트의 전환율은 1:0.5 몰 비율에서 35.11%, 1:1 몰 비율에서 69.85%, 1:1.5 몰 비율에서 81.48%, 1:2 몰 비율에서 86.05%, 1:2.5 몰 비율에서 85.43%, 1:3 몰 비율에서 82.48%로 관찰되었다. 메틸 3-하이드록시부티레이트의 전환율은 반응물의 몰 비율이 1:2 일 때 86.05%로 가장 높은 값으로 관찰되었으며 그 이상 및 이하 몰 비율에서는 전환율이 감소하였다. 따라서, 본 발명에서는 1:2의 몰비율이 최적임을 확인하였다.

표 3

물 비율 (베타하이드록시부티르산 : 메탄올)	전환율 (%)
1:0.5	35.11
1:1	69.85
1:1.5	81.48
1:2	86.05
1:2.5	85.43
1:3	82.48

리파아제의 에스터 합성 반응의 메커니즘을 보면 리파아제의 활성 부위에 베타하이드록시부티르산이 먼저 반응하여 중간 생성물질이 만들어진다. 중간 생성물질에 친핵체인 메탄올의 하이드록시기가 반응하여 에스터가 생성된다. 따라서 메커니즘을 고려해보았을 때 효소 활성 부위 주변에 메탄올의 비율이 증가할수록 반응성이 커져 전환율이 증가함을 확인할 수 있었다.

반면 과량의 메탄올이 첨가될 경우 베타하이드록시부티르산과 먼저 반응해야 되는 효소가 메탄올과 먼저 반응하여 dead-end inhibition 현상이 일어나 에스터 합성을 방해한다. 이는 다중 기질일 때의 고정화 효소 메커니즘인 Bi Bi pingpong 메커니즘의 현상으로 이해할 수 있다.

4-4. 반응 온도 최적화

반응 온도의 영향을 확인하기 위해 반응 온도를 30, 40, 50, 60 °C로 변화시켜 실험을 진행하였다. 이때 Novozym 435의 농도는 15 g/L, 베타하이드록시부티르산과 메탄올의 물 비율은 1:2, 용매는 클로로폼을 사용하여 진행하였다.

메틸 3-하이드록시부티레이트의 전환율은 30 °C의 반응온도에서 86.05%, 40 °C의 반응 온도에서 94.59%, 50 °C의 반응 온도에서 92.05%, 60 °C의 반응 온도에서 60.09%로 관찰되었다. 반응 온도의 증가는 반응물과 효소의 충돌을 증가시키고 효소의 활성 역시 증가시킬 수 있지만, 적정 수준 이상의 효소는 효소의 단백질 구조 변성을 야기할 수 있어 효소 활성을 저해할 수 있기 때문이다. 따라서 본 발명에서는 40 °C가 최적의 반응 온도임을 확인하였다.

표 4

반응 온도 (°C)	전환율 (%)
30	86.05
40	94.59
50	92.05
60	60.09

4-5. 반응 용매 최적화

반응 용매의 영향을 파악하기 위해서 친수성과 소수성을 나타내는 지표인 log P 값에 따라서 아세트나이트릴 (log P = -0.45), 아세톤 (log P = -0.16), tert-아밀 알코올 (log P = 1.04), 1,2-다이클로로에테인 (log P = 1.41), 클로로폼 (log P = 1.75), 톨루엔 (log P = 2.68), 사이클로헥세인 (log P = 3.39), n-헥세인 (log P = 3.94)의 용매를 선정하여 실험을 진행하였다. 이때 Novozym 435의 농도는 15 g/L, 베타하이드록시부티르산과 메탄올의 물 비율은 1:2, 반응 온도는 40 °C에서 반응시켰다.

메틸 3-하이드록시부티레이트 전환율은 아세트나이트릴 용매 조건에서 33.32%, 아세톤 용매 조건에서 36.07%, tert-아밀 알코올 용매 조건에서 41.06%, 1,2-다이클로로에테인 용매 조건에서 88.14%, 클로로폼 용매 조건에서 94.59%로 관찰되었으며 톨루엔, 사이클로헥세인, n-헥세인 용매 조건에서는 반응물인 베타하이드록시부티르산이 용해되지 않아 에스터화 반응 유도가 불가하였다.

반응 용액 내에 반응물인 베타하이드록시부티르산과 메탄올, 리파아제, 생성물인 메틸 3-하이드록시부티레이트

와 물이 존재한다. 따라서 반응물 및 생성물과 반응 용매의 용해성이 우수해야 하며, 사용되는 용매에서 리파아제의 활성과 안정성을 유지하여야 한다. log P 값은 친수성과 소수성을 나타내는 지표로, 일반적으로 용매의 log P 값이 0보다 작으면 친수성으로, 0보다 크면 소수성으로 판단한다. 과도한 친수성 혹은 소수성을 갖는 용매는 반응물과 생성물을 용해시킬 수 없으며 효소의 활성 역시 저해할 수 있다. 과도한 친수성의 반응 용매는 반응물보다 효소에 더 많이 접촉하게 되어 반응물의 효소로의 접근을 방해하게 된다. 따라서 일반적으로 리파아제는 반응 용매의 소수성이 증가함에 따라 활성이 좋아지게 되는데, 이는 반응 용매의 효소에의 간섭이 적어지기 때문이다. 하지만 반응 용매의 소수성이 과다해질 경우 에스터화 반응에서 생성되는 물이 효소 곁에 층을 단단하게 이루게 되어 반응물의 접근을 방해하게 된다. 따라서 에스터화 반응 유도를 위해 적절한 반응 용매의 탐색이 필요하다.

[0072]

본 발명에서는 아세트나이트릴, 아세톤, tert-아밀 알코올, 1,2-다이클로로에테인, 클로로폼, 톨루엔, 사이클로헥세인, n-헥세인을 반응 용매로 사용하여 다양한 범위의 log P 값에 대해 적절한 반응 용매를 탐색하였고, 그 결과 클로로폼이 최적의 용매임을 확인하였다.

표 5

[0073]

반응 용매	화학식	log P	전환율 (%)
아세트나이트릴	C ₂ H ₃ N	-0.45	33.32
아세톤	C ₃ H ₆ O	-0.16	36.07
tert-아밀 알코올	C ₅ H ₁₂ O	1.04	41.06
1,2-다이클로로에테인	C ₂ H ₄ Cl ₂	1.41	88.14
클로로폼	CHCl ₃	1.75	94.59
톨루엔	C ₇ H ₈	2.68	Insoluble
사이클로헥세인	C ₆ H ₁₂	3.39	Insoluble
n-헥세인	C ₆ H ₁₄	3.94	Insoluble

[0075]

4-6. 결론

[0076]

베타하이드록시부티르산과 메탄올을 리파아제를 통해 에스터화 반응을 유도하여 메틸 3-하이드록시부티레이트를 합성하였으며 합성에 관련된 조건들을 최적화하였다. 그 결과, 고정화된 효소로 Novozym 435를 사용, 효소 농도는 15 g/L, 베타하이드록시부티르산과 메탄올의 물 비율은 1:2, 반응 온도는 40 ℃으로 설정, 및 반응 용매로 클로로폼을 사용하였을 때, 메틸 3-하이드록시부티레이트의 전환율이 94.59%의 높은 값으로 도출되었다.

도면

도면1

