

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 6월 19일 (19.06.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/092496 A1

- (51) 국제특허분류:
C07C 227/32 (2006.01) *C12P 41/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/011574
- (22) 국제출원일: 2013년 12월 13일 (13.12.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0145526 2012년 12월 13일 (13.12.2012) KR
10-2012-0145528 2012년 12월 13일 (13.12.2012) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 120-749 서울시 서대문구 연세로 50, 연세대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 신중식 (SHIN, Jong-Shik); 411-755 경기도 고양시 일산서구 탄현마을 3단지 304-401, Gyeonggi-do (KR). 박을수 (PARK, Eul-Soo); 410-816 경기도 고양시 일산동구 백석동 1251-7 301호, Gyeonggi-do (KR). 말릭샤히어 (MALIK, M. Shaheer); 120-749 서울시 서대문구 연세대학교 무악학사, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 137-130 서울시 서초구 바우피로 225 한마음빌딩 4층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

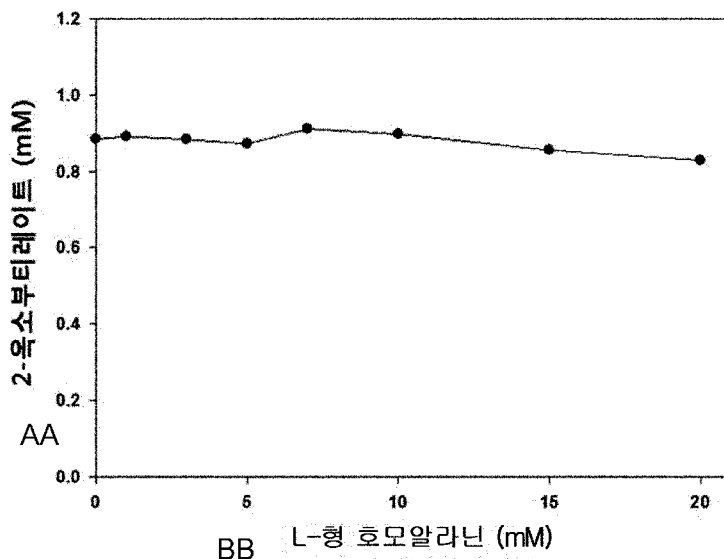
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD FOR PREPARING OPTICALLY ACTIVE AMINE COMPOUND USING DERACEMIZATION

(54) 발명의 명칭 : 탈라세믹화를 이용한 광학 활성 아민 화합물의 제조방법



AA ... 2-oxobutyrate (mM)
BB ... L-homocysteine (mM)

(57) Abstract: The present invention relates to methods for preparing amino acid and amine having an optical activity. Both methods are configured such that α -keto acid is formed as a reaction intermediate so as to enable racemic amino acid or racemic amine which is a racemic amine compound to be optically isolated even without using expensive α -keto acid as a starting material during kinetic resolution by omega-transaminase, thereby not only significantly reducing production cost but also enabling the produced optically active amine compound to have high optical purity.

(57) 요약서: 본 발명은 광학 활성을 가지는 아미노산 및 아민의 제조방법에 관한 것이다. 두 제조방법 모두 α -케토산이 반응 중간체로 형성되기 때문에 오메가 트랜스아미네이즈에 의한 키네틱 레졸루션 수행시 고가의 α -케토산을 출발 물질로 사용하지 않고도 라세믹 아민 화합물인 라세믹 아미노산 또는 라세믹 아민을 광학적으로 분리할 수 있어 생산 비용을 크게 낮출 수 있을 뿐만 아니라 생성된 광학 활성 아민 화합물은 높은 광학적 순도를 가진다.

WO 2014/092496 A1

명세서

발명의 명칭: 탈라세믹화를 이용한 광학 활성 아민 화합물의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 오메가 트랜스아미네이즈를 이용하는 광학 활성 아민 화합물의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 라세믹 아민 또는 아미노산을 오메가 트랜스아미네이즈를 생체 촉매로 사용하여 광학 활성 아민 또는 아미노산으로 분할하는 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 키랄(Chiral)이란 왼손과 오른손이 서로 겹칠 수 없는 거울상의 관계에 있음에 비유된 그리스어로 '손'을 의미하며 이러한 키랄 화합물은 광학 활성(편광을 회전시키는 능력)이 있다. 이러한 의미로 의약품 중에서 어떤 두 분자가 서로 겹칠 수 없는 3차원적 구조에 기인하여 거울상 이성질체의 관계에 있을 때, '키랄의약품'으로 분류한다. 현재 순수한 키랄 화합물의 생산에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이중 키랄 아민 또는 키랄 아미노산은 제약, 농약 및 화학산업에서 중요한 역할을 한다.
- [3] 키랄 아민은 여러 알츠하이머 병의 치료제인 (S)-리바스티그민, 항고혈압제인 델레바불, 항당뇨병제인 시타글립틴, 항부정맥제이자 항근경직제인 벡실레틴과 같은 다수의 의약품 제조에 반드시 필요하다. 키랄 아민의 이러한 약제학적 유용성 때문에, 선택적 결정화나 비대칭적 촉매수소화와 같은 화학공정에 대한 친환경적인 대안으로서 동역학적 분할, 비대칭 합성(asymmetric synthesis), 탈라세믹화(deracemization) 등과 같은 생체촉매를 이용한 광학 활성 키랄 아민의 제조에 대한 연구가 활발히 진행되었다.
- [4] 또한, 키랄 아미노산 역시 의약, 식품, 농업 및 화학산업 등 다양한 분야에 사용되는 중요한 화합물이다. 천연 아미노산의 경우에는 발효 공정 등을 통해 간단히 생산할 수 있지만 비천연 아미노산의 경우에는 생체 촉매 또는 화학촉매를 이용하여 생산할 수 밖에 없다. 비천연 아미노산을 화학촉매로 생산하는 경우에 사용되는 촉매는 그 비용이 매우 고가여서 비천연 아미노산의 생산 단가를 높이는 요인이 되는 문제점이 있다. 따라서 생체 촉매를 이용하여 비천연아미노산을 생산하는 방법이 주로 사용된다.
- [5] 한편, 오메가 트랜스아미네이즈는 높은 전환율, 우수한 거울상 선택성과 높은 안정성을 가지며, 외부 보조인자를 요하지 않아 키랄 화합물의 생산에 효과적인 생체 촉매로 각광 받고 있다. 특히 오메가 트랜스아미네이즈와 함께 아미노 수용체로서 α -케토산을 기질로 제공하고 라세믹 화합물을 키네틱레졸루션 반응시켜 탈라세믹화하여 광학 활성 아민 또는 아미노산을 수득하는 방법이

부각되고 있다. 이때 아미노 수용체로서 α -케토산을 사용하는 이유는 기존의 저가의 아미노 수용체인 프로판알 및 부탄알은 거울상체의 잉여율이 낮고, 효소를 심하게 비활성화시키며, 화학독성을 가짐에 반해 α -케토산은 이러한 문제들의 해결이 가능하다. 다만 α -케토산이 이러한 문제들을 해결할 수 있다고 하여도, 그 단가가 지나치게 높기 때문에 이를 통한 최종 광학 활성 화합물의 생산 단가도 그만큼 높아질 수 밖에 없다는 문제점이 있다. 이를 해결하기 위해 한국등록특허공보 제10-1291586호는 비트레오실라 헤모글로빈과 D-아미노산 옥시다아제의 융합단백질을 이용하는 방법이 보고되었으나 분리 대상이 호모알라닌에 한정되어 제한이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 라세믹 아민 화합물로부터 광학 활성 아민 화합물의 제조방법을 제공하는 것이며, 보다 구체적으로는 고가의 α -케토산을 출발 물질로 사용하지 않고 중간체로 형성함으로써 오메가 트랜스아미네이즈의 기질로 이용하여 생산 단가를 감소시키면서 광학적 순도가 높은 라세믹 아민 화합물로부터 광학 활성을 가진 아민 화합물의 제조방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [7] 위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 광학 활성 아미노산의 제조방법은 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [8] 1) 기질인 라세믹 아미노산, 아미노 수용체 및 아미노 공여체를 효소인 D- 또는 L- 선택적 아미노산 트랜스아미네이즈 및 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 제공하는 단계,
- [9] 2) 상기 1)단계에서 제공된 기질 중 라세믹 아미노산과 아미노 수용체가 효소인 D- 또는 L- 선택적 아미노산 트랜스아미네이즈의 반응에 의하여 α -케토산을 생산하는 단계,
- [10] 3) 상기 α -케토산이 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈와 반응하여 광학 활성 아미노산을 생산하는 단계.
- [11]
- [12] 또한, 본 발명의 한 특징에 따른 광학 활성 아민의 제조방법은 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [13] 1) 기질인 라세믹 아민 및 L-쓰레오닌을 효소인 쓰레오닌 디아미네이즈 및 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 제공하는 단계,
- [14] 2) 상기 쓰레오닌 디아미네이즈는 L-쓰레오닌을 디아미네이션하여 아미노 수용체인 α -케토산을 생산하는 단계,
- [15] 3) 상기 1)단계에서 제공된 라세믹 아민과 상기 2)단계에서 생성된 α -케토산이 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 의하여 키네틱 레졸루션을

통해 광학 활성 아민을 생산하는 단계.

[16]

[17] 본 발명의 일 구체예에 의하면, 상기 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈는 오크로박트럼안트로피(*Ochrobactrum anthropi*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 1]의 염기서열로 암호화 되는 효소 또는 파라고쿠스텐이트리피컨스(*Paracoccus denitrificans*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 2]의 염기서열로 암호화 되는 효소일 수 있다.

[18] 또한, 상기 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈는 아스퍼질러스 terreus(*Aspergillus terreus*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 3]의 염기서열로 암호화 되는 효소 또는 아스로박터 종(*Arthrobacter* sp.)에서 유래된 것으로서, [서열번호 4]의 염기서열로 암호화 되는 효소일 수 있다.

[19] 상기 라세믹 아미노산은 라세믹 알라닌, 라세믹 세린, 라세믹 호모세린, 라세믹 노르발린, 라세믹 노르류신 및 라세믹 류신으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[20] 상기 라세믹 아민은 α -메틸벤질아민, 4-플루오로- α -메틸벤질아민, α -에틸벤질아민, 1-메틸-3-페닐프로필아민, 1-아미노인단, sec-부틸아민, 사이크로프로필에틸아민, 2-아미노펜테인, 2-아미노옥테인, 1-메톡시-2-프로필아민 및 알라니놀로 이루어지는 군 중에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[21]

[22] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 광학 활성 아미노산 또는 광학 활성 아민을 제공한다.

발명의 효과

[23] 본 발명에 따른 광학 활성 아민 화합물의 제조방법에 의해 광학 활성을 가지는 아민과 아미노산을 생산하게 되면, 오메가 트랜스아미나제를 이용한 광학 활성 화합물 제조방법에 사용되던 고가의 α -케토산을 기질로 제공하지 않아도 되므로, 최종 수득되는 광학 활성 아민 화합물인 광학 활성 아민 또는 광학 활성 아미노산의 생산 단가를 크게 절감시킬 수 있다.

[24] 또한 상기 최종 수득되는 광학 활성 아민 화합물은 높은 광학 순도를 가짐으로 의약품, 농약 등에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[25] 도 1은 L-아미노산에 대한 D-아미노산 트랜스아미네이즈의 불활성을 나타내는 그래프이다.

[26] 도 2는 아미노 공여체로서 아이소프로필아민을 사용하여 L-아미노산으로의 전환율을 보여주는 그래프이다.

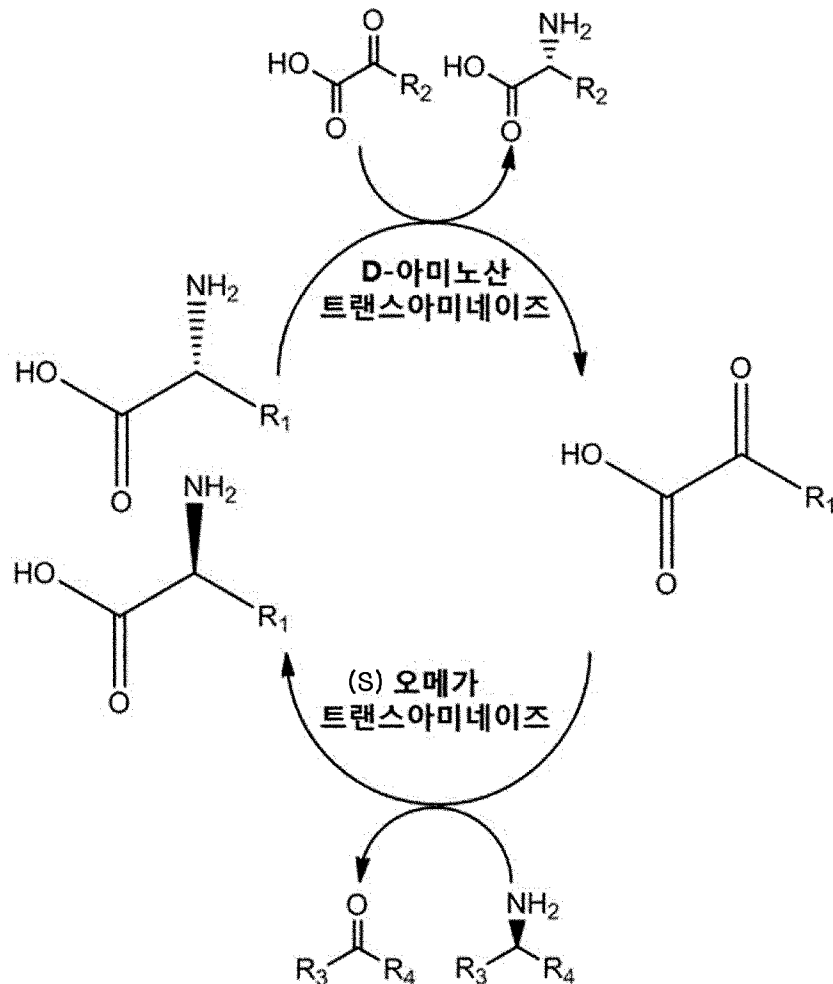
[27] 도 3은 본 발명에 따른 일 실시예에 따른 라세믹 호모알라닌으로부터 L-호모알라닌의 생산량을 보여주는 그래프이다.

- [28] 도 4는 본 발명에 따른 일 실시예에 따른 기질인 α -케토글루타레이트 및 아이소프로필아민과 최종 생성물인 D-글루타메이트의 반응시간에 따른 농도를 나타낸 그래프이다.
- [29] 도 5은 오메가 트랜스아미네이즈에 대하여 아미노 수용체로써 파이루베이트(pyruvate)와 프로판알(propanal)의 활성을 비교한 그래프이다.
- [30] 도 6는 본 발명에 따른 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 사용하여 (S)와 (R) 배열 α -메틸벤질아민의 농도를 반응시간에 따라 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 이에 본 발명자들은 생산 단가를 절감시키는 광학 활성 아민 화합물의 제조방법을 개발하기 위하여 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 탈라세믹화를 이용한 비대칭 광학 활성 아민 화합물의 제조방법을 완성하였다.
- [32] 일반적으로 라세믹 아민 화합물로부터 광학적으로 순수한 아민 화합물을 분할하는 방법은 동역학적 분할, 비대칭합성(asymmetric synthesis), 탈라세믹화(deracemization) 등의 방법을 통해 수행될 수 있다. 이중 상기 탈라세믹화를 통해 광학적으로 순수한 아민 화합물의 생산은 기질로 제공된 라세믹 아민 화합물의 탈라세믹화 후 α -케토산과 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈의 반응에 의해 생산될 수 있다. 본 발명은 이러한 라세믹 아민 화합물의 광학 분할에 사용되는 고가의 α -케토산을 기질로 제공하지 않고 중간체로 생성되게 하여 광학 활성 아민 화합물의 생산 단가를 낮추면서도 높은 순도의 광학 활성을 가지는 아민 화합물을 생산하는 방법에 관한 발명이다. 본 발명의 라세믹 아민 화합물은 라세믹 아민 또는 라세믹 아미노산일 수 있으며, 본 발명의 방법에 의해 제조되는 광학 활성 아민 화합물은 광학 순도가 높은 아미노산과 아민 화합물일 수 있다.
- [33]
- [34] 구체적으로 본 발명에 따른 L-아미노산의 제조방법은 하기 단계를 포함한다.
- [35] 1) 기질인 라세믹 아미노산, 아미노 수용체 및 아미노 공여체를 효소인 D-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈 및 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 제공하는 단계,
- [36] 2) 상기 1)단계에서 제공된 기질 중 라세믹 아미노산과 아미노 수용체가 효소인 D-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈의 반응에 의하여 α -케토산을 생산하는 단계,
- [37] 3) 상기 α -케토산이 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈와 반응하여 광학 활성을 띠는 L-아미노산을 생산하는 단계.
- [38] 본 발명에 따른 상기 L-아미노산의 생산방법은 하기 [반응식 1]에 나타나는 바와 같이 제조될 수 있다.
- [39] [반응식 1]

[40]



[41] (상기 R_1 은 각각 독립적으로 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 하이드록시메틸, 하이드록시에틸 및 2-메틸프로필로 이루어지는 군 중에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으며, 상기 R_2 는 2-카르복시에틸, 페닐, 페닐메틸 일 수 있다.)

[42] 상기 [반응식 1]에 나타나는 바와 같이 본 발명은 라세믹 아미노산 중 D-아미노산이 D-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈의 기질이 되며, D-아미노산의 아미노기가 D-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈에 의하여 아미노 수용체에 전달되며 그 결과 α -케토산을 중간체로서 생산할 수 있다. 이렇게 중간체로 생산된 α -케토산이 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 의하여 아미노 공여체로부터 아미노기를 전달받아 L-아미노산을 생산함으로써, 본 발명에서 최종 수득하려는 목적물인 L-아미노산의 수득이 가능하다. 즉, D-아미노산 트랜스아미네이즈와 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈의 반응에 의하여 라세믹 아미노산을 탈라세믹화(deracemization)함으로써 순수한 L-아미노산을 수득할 수 있다.

[43]

[44] 구체적으로 본 발명에 따른 D-아미노산의 제조방법은 하기 단계를 포함한다.

[45] 1) 기질인 라세믹 아미노산, 아미노 수용체 및 아미노 공여체를 효소인 L-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈 및 (R)-선택적 오메가

트랜스아미네이즈에 제공하는 단계,

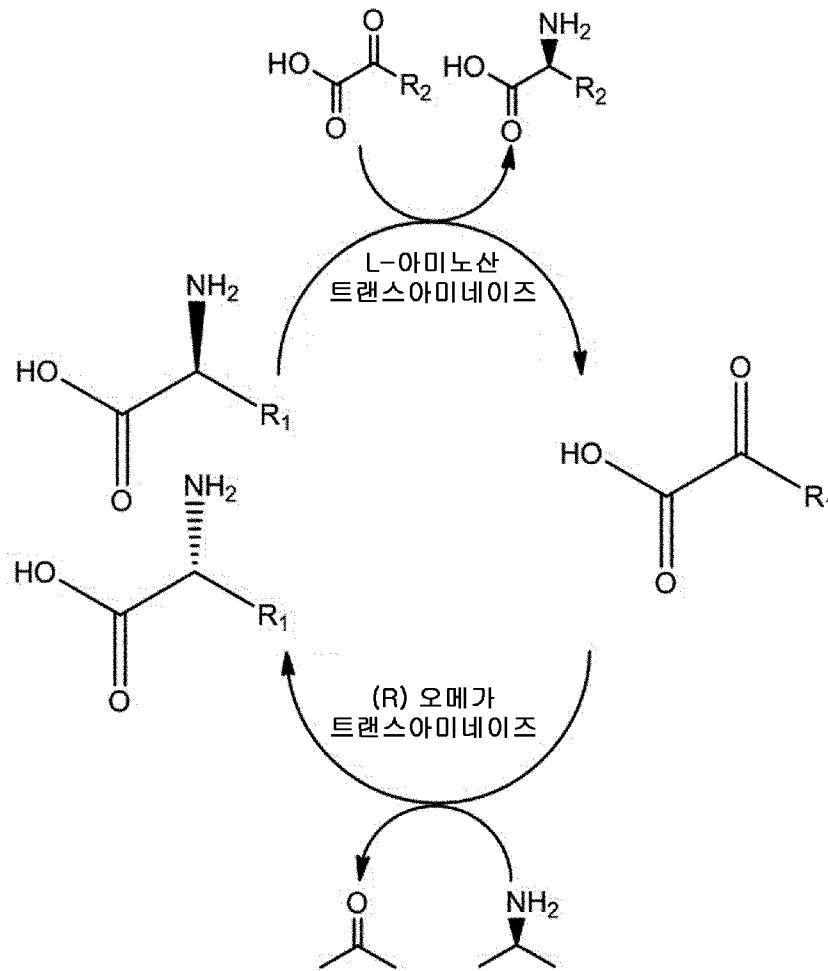
[46] 2) 상기 1)단계에서 제공된 기질 중 라세믹 아미노산과 아미노 수용체가 효소인 L-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈의 반응에 의하여 α -케토산을 생산하는 단계,

[47] 3) 상기 α -케토산이 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈와 반응하여 광학 활성을 띠는 D-아미노산을 생산하는 단계.

[48] 본 발명에 따른 상기 D-아미노산의 생산방법은 하기 [반응식 2]에 나타나는 바와 같이 제조될 수 있다.

[49] [반응식 2]

[50]



[51] (상기 R_1 은 각각 독립적으로 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 하이드록시메틸 및 하이드록시에틸로 이루어지는 군 중에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으며, 상기 R_2 는 2-카르복시에틸, 페닐, 페닐메틸 일 수 있다.)

[52] 상기 [반응식 2]에 나타나는 바와 같이, 본 발명은 라세믹 아미노산 중 L-아미노산만이 L-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈의 기질이 되며, L-아미노산의 아미노기가 L-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈에 의하여 아미노 수용체에 전달되며, 그 결과 α -케토산을 중간체로서 생산할 수 있다. 이렇게 중간체로 생산된 α -케토산이 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈에

의하여 아미노 공여체로부터 아미노기를 전달받아 D-아미노산을 생산함으로써, 본 발명에서 최종 수득하려는 목적물인 D-아미노산의 수득이 가능하다. 즉, L-아미노산 트랜스아미네이즈와 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈의 커플드 엔자임(coupled enzyme) 반응에 의하여 라세믹 아미노산을 탈라세믹화(deracemization)함으로써 순수한 D-아미노산을 수득할 수 있다.

- [53] 상기 [반응식 1] 또는 [반응식 2]에 나타난 바와 같이, 본 발명은 α -케토산이 기질로 제공되지 않고 중간체로 생산하는데, 이는 상기 D-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈가 라세믹 아미노산 중의 D-아미노산만을, L-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈가 라세믹 아미노산 중의 L-아미노산만을 선택하여 아미노산의 아미노기를 아미노 수용체에 전달하여 α -케토산이 생성된다.
- [54] 따라서, 상기 [반응식 1]에서는 라세믹 아미노산 중 L-아미노산이 반응에 참여하지 않으며, 라세믹 아미노산 중 D-아미노산만이 상기 [반응식 1]에 의해 L-아미노산으로 거울상 이성질화됨으로써 라세믹 아미노산으로부터 L-아미노산이 광학분할된다. 또한, 마찬가지로 상기 [반응식 2]에서는 라세믹 아미노산 중 D-아미노산이 반응에 참여하지 않으며, 라세믹 아미노산 중 L-아미노산만이 상기 [반응식 2]에 의해 D-아미노산으로 거울상 이성질화됨으로써 라세믹 아미노산으로부터 D-아미노산이 광학분할된다. 본 발명에 따라 라세믹 아미노산에서 분할된 광학 활성 아미노산의 광학적 순도는(enantiomeric excess; ee)는 99% 이상일 수 있다.
- [55] 상기 [반응식 1]에 나타나는 바와 같이, 생성물인 L-아미노산과 함께, 아미노 수용체가 아미노산으로부터 아미노기를 전달받아 생성되는 물질도 반응에 참여하지 않고 최종 생성물로 남게되며, D-글루타메이트, D-페닐글라이신 또는 D-페닐알라닌일 수 있다. 또한, 아미노 공여체가 오메가 트랜스아미네이즈에 의해 아미노기를 제공하고 생성된 케톤 역시 최종 생성물일 수 있다.
- [56] 또한, 상기 [반응식 2]에 나타나는 바와 같이, 생성물인 D-아미노산과 함께, 아미노 수용체가 아미노산으로부터 아미노기를 전달받아 생성되는 물질도 반응에 참여하지 않고 최종 생성물로 남게되며, L-글루타메이트, L-페닐글라이신 또는 L-페닐알라닌일 수 있다. 또한, 아미노 공여체가 오메가 트랜스아미네이즈에 의해 아미노기를 제공하고 생성된 케톤 역시 최종 생성물일 수 있다.
- [57] 본 발명에 따라 최종 생산되는 광학 활성 아미노산은 바람직하게는 광학 활성을 지닌 D- 또는 L- 배열 알라닌, 호모알라닌, 세린, 호모세린, 노르발린, 노르류신 및 류신으로 이루어지는 군 중에서 선택된 어느 하나 이상의 L- 또는 D- 아미노산일 수 있다.
- [58] 상기 1)단계에서 기질로 제공되는 물질 중 라세믹 아미노산은 본 발명에 제공되는 기질인 D- 또는 L- 선택적 아미노산 트랜스아미네이즈와 (S) 또는 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 대해 활성을 지니는 아미노산이라면 특별한 제한 없이 기질로 제공될 수 있으며, 바람직하게는 알라닌, 세린,

호모세린, 노르발린, 노르류신 및 류신으로 이루어지는 군 중에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산일 수 있다.

[59] 상기 1)단계에서 기질로 제공되는 물질 중 아미노 수용체는 상기 D- 또는 L-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈에 대해서는 활성을 지니고 있으면서도 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 대해서는 활성을 보이지 않아야 하는데, α -케토글루타레이트, 페닐글라이옥실레이트, 페닐파이루베이트는 이에 대한 활성이 존재하지 않아 본 발명에 따른 상기 반응의 바람직한 아미노 수용체로 제공될 수 있다.

[60] 상기 1)단계에서 기질로 제공되는 물질 중 아미노 공여체는 D- 또는 L-아미노산 선택적 트랜스아미네이즈에 대하여는 활성이 존재하지 않으면서 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 대해 활성이 존재하면서 아미노기를 제공하는 것이어야 하므로, 바람직하게는 아이소프로필아민, 메틸벤질아민 및 벤질아민으로 이루어지는 군 중에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[61] 상기 D-아미노산 트랜스아미네이즈는 라세믹 아미노산의 탈라세믹화를 가능하게 하면서 아미노 수용체와 활발하게 반응하는 것이라면 특별한 제한 없이 사용될 수 있는 것이지만, 본 발명에서는 바실러스 스파리쿠스(*Bacillusphaericus*)로부터 유래된 것으로서, [서열번호 5]의 염기서열로 암호화되는 효소를 이용하는 것이 바람직하다.

[62] 또한, 상기 L-아미노산 트랜스아미네이즈는 라세믹 아미노산의 탈라세믹화를 가능하게 하면서 아미노 수용체와 활발하게 반응하는 것이라면 특별한 제한 없이 사용될 수 있는 것이지만, 본 발명에서는 대장균(*Escherichiacoli*)로부터 유래된 것으로서, [서열번호 6]의 염기서열로 암호화되는 효소를 이용하는 것이 바람직하다.

[63] 상기 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈는 α -케토산과 반응하여 L-형아미노산을 생산하는 것이라면 특별한 제한 없이 사용될 수 있는 것이지만, 본 발명에서는 오크로박트럼안트로피(*Ochrobactrumanthropi*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 1]의 염기서열로 암호화되는 효소를 이용하거나 파라고쿠스텐이트리피컨스(*Paracoccusdenitrificans*)로부터 유래된 것으로서, [서열번호 2]의 염기서열로 암호화되는 효소를 이용하는 것이 바람직하다.

[64] 또한, 상기 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈는 α -케토산과 반응하여 D-아미노산을 생산하는 것이라면 특별한 제한 없이 사용될 수 있는 것이지만, 본 발명에서는 아스퍼질러스 터레우스(*Aspergillus terreus*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 3]의 염기서열로 암호화 되는 효소 또는 아스로박터 종(*Arthrobacter sp.*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 4]의 염기서열로 암호화 되는 효소를 이용하는 것이 바람직하다.

[65]

[66] 구체적으로, 본 발명에 따른 광학 활성 아민 화합물의 제조방법은 하기 단계를

포함한다.

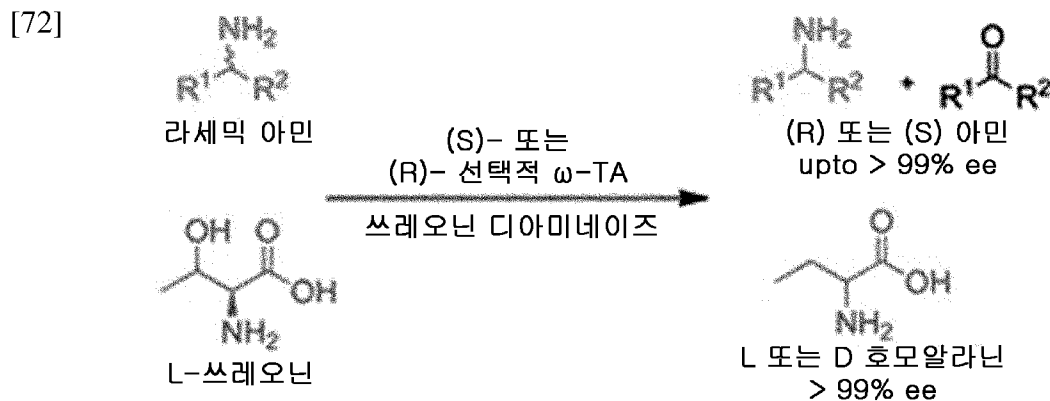
[67] 1) 기질인 라세믹 아민 및 L-쓰레오닌을 효소인 쓰레오닌 디아미네이즈 및 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 제공하는 단계,

[68] 2) 상기 쓰레오닌 디아미네이즈는 L-쓰레오닌을 디아미네이션하여 아미노 수용체인 α -케토산을 생산하는 단계,

[69] 3) 상기 1)단계에서 제공된 라세믹 아민과 상기 2)단계에서 생성된 α -케토산이 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 의하여 광학 활성 아민을 생산하는 단계.

[70] 상기 본 발명에 따른 광학 활성 아민 화합물의 제조방법은 하기 [반응식 3]으로 나타낼 수 있다.

[71] [반응식3]

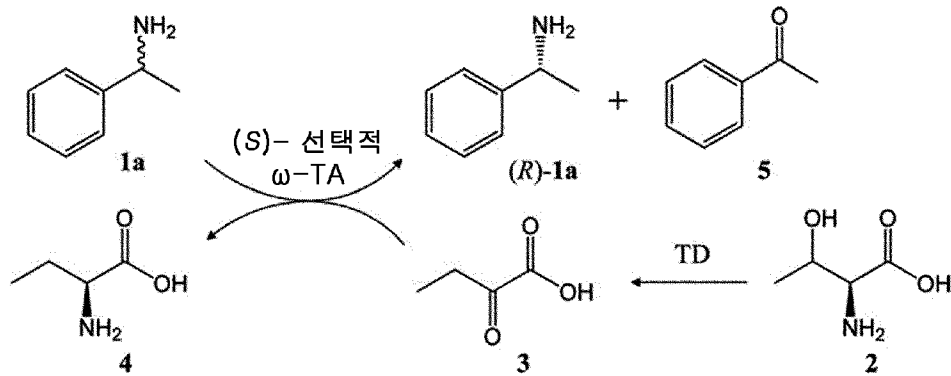


[73] 상기 [반응식 3]과 같이 본 발명은 1)단계에서 라세믹 아민과 L-쓰레오닌을 기질로서 제공하고, 여기에 효소인 쓰레오닌 디아미네이즈와 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈((S)- 또는 (R)- 선택적 ω -TA)를 제공할 수 있다. 이중 상기 쓰레오닌 디아미네이즈는 상기 L-쓰레오닌을 디아미네이션시켜 2-옥소부티레이트를 생산할 수 있다. 이러한 상기 2-옥소부티레이트는 아미노 수용체로 작용할 수 있으며, 이를 통해 아미노 수용체인 고가의 α -케토산으로 사용될 수 있다. 또한 상기 2-옥소부티레이트는 종래 또 다른 아미노 수용체로 사용되고 있는 프로판알보다 현저히 향상된 효과를 가지는 아미노 수용체로 작용할 수 있다.

[74] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 1)단계에서 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 제공하는 경우에는 상기 3)단계에서 라세믹 아민 중 (S)-아민과 상기 2)단계에서 생성된 α -케토산이 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 의하여 (R)-아민과 L-호모알라닌을 생산할 수 있다. 이는 상기 쓰레오닌 디아미네이즈와 상기 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈가 커플드 엔자임(coupled enzyme) 반응을 통한 키네틱 레졸루션(kinetic resolution)을 수행함으로써 생산되는 것일 수 있다.

[75] 또한, 상기 1)단계에서 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 제공하는 경우에는 상기 3)단계에서 라세믹 아민 중 (R)-아민과 상기 2)단계에서 생성된

- α -케토산이 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 의하여 (S)-아민과 D-호모알라닌을 생산할 수 있다. 이는 상기 쓰레오닌 디아미네이즈와 상기 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈가 커플드 엔자임(coupled enzyme) 반응을 통한 키네틱 레졸루션(kinetic resolution)을 수행함으로써 생산되는 것일 수 있다.
- [76] 따라서, 상기 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 제공하는 경우 반응 후 최종 생성물은 (R)-아민과 케톤 및 L-호모알라닌일 수 있으며, 또한 상기 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 제공하는 경우 반응 후 최종 생성물은 (S)-아민과 케톤 및 D-호모알라닌일 수 있다.
- [77] 상기 쓰레오닌 디아미네이즈는 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)에서 유래한 것으로서, [서열번호 7]의 염기서열로 암호화되는 효소일 수 있다.
- [78] 상기 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈는 α -케토산과 반응하여 L-형아미노산을 생산하는 것이라면 특별한 제한 없이 사용될 수 있는 것이지만, 본 발명에서는 오크로박트럼안트로피(*Ochrobactrum anthropi*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 1]의 염기서열로 암호화되는 효소를 이용하거나 파라고쿠스텐이트리피컨스(*Paracoccus denitrificans*)로부터 유래된 것으로서, [서열번호 2]의 염기서열로 암호화되는 효소를 이용하는 것이 바람직하다.
- [79] 또한, 상기 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈는 α -케토산과 반응하여 D-아미노산을 생산하는 것이라면 특별한 제한 없이 사용될 수 있는 것이지만, 본 발명에서는 아스퍼질러스 터레우스(*Aspergillus terreus*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 3]의 염기서열로 암호화 되는 효소 또는 아스로박터 종(*Arthrobacter* sp.)에서 유래된 것으로서, [서열번호 4]의 염기서열로 암호화 되는 효소를 이용하는 것이 바람직하다.
- [80] 상기 라세믹 아민은 바람직하게는 α -메틸벤질아민, 4-플루오로- α -메틸벤질아민, α -에틸벤질아민, 1-메틸-3-페닐프로필아민, 1-아미노인단, sec-부틸아민, 사이크로프로필에틸아민, 2-아미노펜테인, 2-아미노옥테인, 1-메톡시-2-프로필아민 및 알라니놀로 이루어지는 군 중에서 선택된 어느 하나 이상의 것일 수 있다.
- [81] 본 발명의 바람직한 일 실시예로서 α -메틸벤질아민(1a)과 L-쓰레오닌(2)을 기질로 제공하여 이루어지는 반응을 하기 [반응식 4]로 나타냈다.
- [82] [반응식4]
- [83]



[84] 상기 [반응식 4]에 나타난 바와 같이, 쓰레오닌 디아미네이즈(TD)가 L-쓰레오닌(2)을 디아미네이션하여 2-옥소부티레이트(3)를 생산하면 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈((S)-selective ω -TA)가 라세믹 α -메틸벤질 아민(1a) 중 (S)- α -메틸벤질 아민만을 선택적으로 기질로 사용하여 디아미네이션 한 후, 다시 2-옥소부티레이트(3)를 아미네이션하는 트랜스아미네이션 반응을 할 수 있다. 이러한 반응을 통해 결과적으로는 아세트페논(5)과 L-호모알라닌(4)을 생산하게 된다. 이는 결국 최종 생성물로서 (R)- α -메틸벤질아민((R)-1a), L-호모알라닌 및 아세트페논을 수득할 수 있음을 의미한다.

[85] 또한 상기 [반응식 4]의 일부 변형으로서, (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 사용하는 반대의 경우에는 쓰레오닌 디아미네이즈(TD)가 L-쓰레오닌을 디아미네이션하여 2-옥소부티레이트(3)를 생산하면 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈((R)-selective ω -TA)가 라세믹 α -메틸벤질아민(1a) 중 (R)- α -메틸벤질 아민만을 선택적으로 기질로 사용하여 디아미네이션 한 후, 다시 2-옥소부티레이트(3)를 아미네이션하는 트랜스아미네이션 반응을 할 수 있다. 이러한 반응을 통해 결과적으로는 아세트페논과 D-호모알라닌을 생산하게 된다. 이는 결국 최종 생성물로서 (S)- α -메틸벤질아민, D-호모알라닌 및 아세트페논을 수득할 수 있음을 의미한다.

[86] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 리간드, 의약품 및 생리활성물질은 본 발명에 따른 제조방법에 의해 생산된 순도 99%이상의 L- 또는 R- 아미노산 또는 L- 또는 R- 아민을 포함하는 리간드, 의약품 및 생리활성물질로서 당업계에 적용되는 공지의 리간드, 의약품 및 생리활성물질이 모두 포함될 수 있다. 또한 상기 리간드, 의약품 및 생리활성물질은 당업계에 적용되는 모든 공지의 방법으로 제조되는 리간드, 의약품 및 생리활성물질이 모두 포함될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[87] 실시예 1. 오크로박트럼엔트로피(*Ochrobactrum anthropi*)로부터 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 암호화하는 재조합 DNA의 제조

[88] 오크로박트럼엔트로피(*Ochrobactrum anthropi*)를 LB-브로쓰(펩톤 10 g/L, 효모 추출물 5 g/L, 염화나트륨 5 g/L, pH 7) 중에서 37 °C, 12 시간 배양한 후 싱글 콜로니로부터 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 발현하는 유전자를

합성하였으며, 이를 DNA 프라이머를 이용하여 PCR 방법에 의하여 증폭하여
수득하였다. 수득된 DNA 단편을 발현 벡터 DNA pET28a(+)에 Nde1, Xho1
제한효소와 라이게아제를 이용하여 삽입하였다. 이때 사용된 프라이머는 하기
표 1과 같다.

[89] 표 1

[Table 1]

구분	염기서열
정방향 프라이머	5'-GATATACCATGGNNACTGCTCAGCC AAACTCT-3'
역방향 프라이머	5'-CGAGTGCGGCCGTCCTGGTGAGGCT TGC-3'

[90]

[91] 실시예 2. 파라고쿠스텐이트리피컨스(*Paracoccusdenitrificans*)로부터
(S)-선택적 오메가 트랜스아미네아제를 암호화하는 재조합 DNA의 제조

[92] 파라고쿠스텐이트리피컨스(*Paracoccusdenitrificans*)를 LB-브로쓰(펩톤 10 g/L,
효모 추출물 5 g/L, 염화나트륨 5 g/L, pH 7) 중에서 37 °C, 12 시간 배양한 후 싱글
콜로니로부터 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네아제를 발현하는 유전자를
합성하였으며, 이를 DNA 프라이머를 이용하여 PCR 방법에 의하여 증폭하여
수득하였다. 수득된 DNA 단편을 발현 벡터 DNA pET28a(+)에 Nde1, Xho1
제한효소와 라이게아제를 이용하여 삽입하였다. 이때 사용된 프라이머는 하기
표 2와 같다.

[93] 표 2

[Table 2]

구분	염기서열
정방향 프라이머	5'-GATATACATATGAACCAACCGCAAA GC-3'
역방향 프라이머	5'-GTGGTGCTCGAGGGCCACCTCGGCA AA-3'

[94]

[95] 실시예 3. 아스퍼질러스터레우스(*Aspergillus terreus*)로부터 (R)-선택적 오메가
트랜스아미네아제를 암호화하는 DNA 및 벡터 DNA로 이루어진 재조합 DNA의
제조

[96] 아스퍼질러스터레우스(*Aspergillus terreus*) 유래의 (R)-선택적 오메가
트랜스아미네아제 유전자 서열(NCBI gene ID: 115385557)을 pGEM-T vector에
합성하여 플라스미드로부터 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네아제를 발현하는

유전자를 합성하였으며, 이를 DNA 프라이머를 이용하여 PCR 방법에 의하여 증폭하여 수득하였다. 수득된 DNA 단편을 발현 벡터 DNA pET28a(+)에 Nco1, Xho1 제한효소를 이용하여 클로닝하였다. 이때 사용된 프라이머는 하기 표 3과 같다.

[97] 표 3

[Table 3]

구분	염기서열
정방향 프라이머	5'-AGAAGGAGATATACCATGGCCTCCATGGACAAAGTCT-3'
역방향 프라이머	5'-GGTGGTGGTGGTGGCTCGAGGTTCTCTCGTTATAATC-3'

[98]

[99] 실시예 4. 바실러스 스페리쿠스(*Bacillusphaericus*) 유래의 D-아미노산 트랜스아미네이즈를 암호화하는 재조합 DNA의 제조

[100] 바실러스 스페리쿠스(*Bacillus sphaericus*) 유래의 D-아미노산 트랜스아미네이즈 유전자 서열(NCBI gene ID: 849138)을 pGEM-T vector에 합성하여 플라스미드로부터 D-아미노산 트랜스아미네이즈를 발현하는 유전자를 합성 DNA 프라이머를 이용하여 PCR 방법에 의하여 증폭하여 수득하였다. 수득된 DNA 단편을 발현 벡터 DNA pET28a(+)에 Nco1, Xho1 제한효소를 이용하여 클로닝하였다. 이때 사용된 프라이머는 하기 표 4와 같다.

[101] 표 4

[Table 4]

구분	염기서열
정방향 프라이머	5'- GATATACCATGGCATACTCATTATGG-3'
역방향 프라이머	5'-GTGGTGCTCGAGGGCATTAATTGAAATTGG-3'

[102]

[103] 실시예 5. 대장균(*Escherichia coli*) 유래의 L-아미노산 트랜스아미네이즈를 암호화하는 재조합 DNA의 제조

[104] 대장균(*Escherichiacoli*) 유래의 L-아미노산 트랜스아미네이즈로서 L-가지사슬 아미노산 트랜스아미네이즈 유전자를 pGEM-T 벡터에 합성하여 플라스미드로부터 L-가지사슬 아미노산 트랜스아미네이즈를 발현하는 유전자를 합성 DNA 프라이머를 이용하여 PCR 방법에 의하여 증폭하여 수득하였다. 수득된 DNA 단편을 발현 벡터 DNA pET28a(+)에 Nco1, Xho1

제한효소를 이용하여 클로닝하였다

[105]

[106] 실시예 6. 대장균(*Escherichia coli*) 유래의 쓰레오닌 디아미네이즈를 암호화하는 DNA 및 벡터 DNA로 이루어진 재조합 DNA의 제조

[107] 대장균(*Escherichiacoli*)을 LB-브로쓰(펩톤 10 g/L, 효모 추출물 5 g/L, 염화나트륨 5 g/L, pH 7)중에서 37 °C, 12 시간 배양한 후 싱글콜로니로부터 쓰레오닌디아미네이즈를 발현하는 유전자를 합성하였으며, 이를 DNA 프라이머를 이용하여 PCR 방법에 의하여 증폭하여 수득하였다. 수득된 DNA 단편을 발현 벡터 DNA pET28a(+)에 Nde1, Xho1 제한효소와 라이게이즈를 이용하여 삽입하였다. 이때 사용된 프라이머는 하기 표 5와 같다.

[108] 표 5

[Table 5]

구분	염기서열
정방향 프라이머	5'-GATATACATATGGCTGACTCGCAACCCCTG-3'
역방향 프라이머	5'-GTGGTGCTCGAGACCCGCCAAAAGAA-3'

[109]

[110] 실시예 7. 형질 전환 균주로부터 효소 과발현 및 정제

[111] 상기 실시예 1 내지 실시예 6에 의해 수득된 플라스미드를 사용하여 *E.coli* BL21(DE3)를 형질 전환시켰다. 가나마이신을 함유하는 LB-보로쓰 300 mL에서 배양시킨 후, IPTG(최종 농도 1 mM)를 현탁도(OD) 0.5에서 첨가하였다. 이후 6 시간 이상 37 °C에서 배양한 후 4 °C에서 10000×g 로 20 분간 원심분리하여 세균세포를 얻어 15 mL 리서스펜션 버퍼(50 Mm Tris-HCl, 50 mM 염화칼슘, 1 mM β-머캅토에탄올, 0.1 mM PMSF, 20 μM PLP, pH 7)로 현탁시켰다. 이를 빙냉시키면서 초음파 처리를 한 다음 4 °C에서 17000×g로 30분간 원심 분리하여 상층액을 조추출액으로 수득하였다. 이 조추출액을 친화성 크로마토그래피를 이용하여 원하는 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈, (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈, D-아미노산 트랜스아미네이즈, L-아미노산 트랜스아미네이즈와 쓰레오닌 디아미네이즈를 정제하여 효소 용액을 얻었다.

[112]

[113] 실시예 8. 정제된 효소의 활성측정 및 농도결정

[114] 효소의 활성 및 농도 결정은 37 °C 에서 50 mM potassium phosphate 버퍼 pH 7 에서 수행되었다. 활성 측정을 위한 효소반응은 반응시작 10분 후 반응용액 100 μl에 아세도니트릴 600 μl를 넣어 멈추었다.

[115] 상기 실시예 1 내지 3에서 정제된 1 unit의 (S)- 또는 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈 활성은 20 mM 파이루베이트, 20 mM (S)-α-메틸벤질아민에서 1분 동안 1 μmole의 아세토펜이 생기는 것을 의미한다. 상기 실시예 4와 5에서

정제된 1 unit의 D- 또는 L- 선택적 트랜스아미네이즈 활성은 20 mM D-알라닌과 2-옥소부티레이트에서 1분 동안 파이루베이트 1 μmole 이 생기는 것을 의미한다. 또한, 상기 실시예 6에서 정제된 1 unit의 쓰레오닌디아미네이즈 활성은 0.1 mM PLP, 50 mM L-쓰레오닌 에서 1분 동안 2-옥소부티레이트 1 μmole 이 생기는 것을 의미한다.

[116] 활성 측정시 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈의 경우는 아세트페논을 HPLC를, D- 또는 L- 선택적 아미노산 트랜스아미네이즈 경우는 파이루베이트를, 쓰레오닌 디아미네이즈의 경우는 2-옥소부티레이트를 이용하여 측정하였다.

[117]

[118] 실시예 9. 아민 및 아미노산의 분석

[119] 생산물의 농도분석과 광학적 순도(enantiomeric excess; ee)를 구하기 위하여 키랄 아민과 아미노산은 GITC와 Marfey 시약을 이용하여 유도체화 한 후 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 분석하였다. 일반적인 GITC 유도체화 과정은 반응샘플(0.5 mM 이하의 아민 또는 아미노산)과 유도체화용액 (1.5 mM GITC, 1.5 mM 트라이에틸아민 in 아세토나이트릴)과 1:1로 섞은 후 상온에서 35분 이상 반응시켰다. 이후 C18 컬럼과 HPLC를 이용하여 분석하였다. 유속은 1 ml/min 이며 254 nm에서 UV 측정기를 이용하여 분석하였다. Marfey reagent 유도체화 과정은 10 μl 의 샘플을 1 M 소듐바이카르보네이트 8 μl 와 40 μl 1% Marfey reagent 를 섞은 후 40 °C에서 1 시간 반응한 후 식히고 8 μl 의 1 M 염산을 섞어준다. 이 용액을 434 μl 의 40% 아세토나이트릴 용액과 섞은 후 C18 컬럼과 HPLC를 이용하여 분석한다. 유속은 1 ml/min 이며 온도는 40 °C 그리고 320 nm에서 UV 측정기를 이용하여 분석하였다. 그 결과를 하기 [표 6]에 나타내었다. 광학적 순도는 위에서 측정된 (S)-거울상체(enantiomer)의 농도(C_S)와 (R)-거울상체(enantiomer)의 농도(C_R)를 이용하여 계산하였다. 그 계산식은 아래에 나타내었다.

[120] [계산식]

$$[121] \quad \% ee^R = \frac{(C_R - C_S)}{(C_R + C_S)} \times 100$$

[122] 또한 하기 표 6에서 α -메틸벤질아민은 1a로, 4-플루오로- α -메틸벤질아민은 1b로, α -에틸벤질아민은 1c로, 1-메틸-3-페닐프로필아민은 1d로, 1-아미노인단은 1e로, sec-부틸아민은 1f로, 사이크로프로필에틸아민은 1g로, 2-아미노펜테인은 1h로, 2-아미노옥테인은 1i로, 1-메톡시-2-프로필아민은 1j로, 알라니놀은 1k로 각각 나타내었다.

[123] 표 6

[Table 6]

	방출 상태(elution condition) ^a	반응 시간 (분)	
		(R)-형태	(S)-형태
GITC 유도체화			
1a	A55%, B45%의 등용매용리	14.5	16.2
1b	A55%, B45%의 등용매용리	18.7	21.5
1c	A55%, B45%의 등용매용리	24.5	26.4
1d	A55%, B45%의 등용매용리	39.4	42.0
1e	A60%, B40%에서 A50%, B50%로의 점변용리	14.1	16.6
1f	A50%, B50%의 등용매용리	13.3	14.4
1h	A50%, B50%의 등용매용리	27.5	30.6
1i	A65%, B35%의 등용매용리	23.6	25.4
1j	A60%, B40%에서 A65%, B35%로의 점변용리	24.9	27.0
4	A55%, B45%의 등용매용리	5.3	4.
알라닌	A50%, B50%의 등용매용리	5.6	4.6
Marfey 시약 유도체화			
1g	A50%, B50%의 등용매용리	26.9	28.5
1k	A55%, B45%의 등용매용리	4.9	3.3

[124] A:메탄올(0.1%TFA), B:TDW(0.1%TFA)

[125]

[126] 실시예 10. 정제된 D-아미노산 트랜스아미네이즈의 케토산에 대한 기질 특이성 및 케토산에 의해 전환된 광학 활성 아미노산

[127] 상기 실시예 7에서 정제된 D-아미노산 트랜스아미네이즈를 사용하여 하기 [표 7]에 나타낸 각종 케토산과 D-알라닌 또는 D-호모알라닌을 기질로 하여 반응을 수행하였다. 20 mM 케토산, 20 mM D-알라닌 또는 D- 호모알라닌 및 50 mM 인산칼륨 (pH 7)에서 0.1 U/ml 의 D-아미노산 트랜스아미네이즈에 의한 반응을 37 °C에서 10 분간 반응시키고 생성된 케토산(파이루베이트 또는 2-옥소부티레이트)의 생성량을 측정하였다. D-아미노산 트랜스아미네이즈는 2-옥소부티레이트, β -하이드록시파이루베이트, 머캅토파이루베이트, 플루오로파이루베이트, 3-메틸-2-옥소부티레이트, 2-옥소페타노에이트, 4-메틸-2-옥소펜타노에이트, 2-케토흡사노에이트, α -케토글루타레이트,

페닐파이루베이트, 파이루베이트 등의 케토산에 대하여 활성이 존재함을 확인하였고 그 결과를 하기 표 7 및 표 8에 나타내었다.

[128]

[129] 표 7

[Table 7]

기질		생성물	
아미노 수용체	아미노 공여체	D-아미노산	파이루베이트(mM)
2-옥소부티레이트	D-알라닌	호모알라닌	1.375
β -하이드록시파이루베이트	D-알라닌	세린	0.079
머캅토파이루베이트	D-알라닌	시스테인	0.022
플루오로파이루베이트	D-알라닌	플루오로알라닌	0.053
브로모파이루베이트	D-알라닌	브로모알라닌	0.000
3-메틸-2-옥소부티레이트	D-알라닌	발린	0.014
트라이메틸파이루베이트	D-알라닌	tert-류신	0.000
2-옥소페타노에이트	D-알라닌	노르발린	0.882
4-메틸-2-옥소펜타노에이트	D-알라닌	류신	0.073
2-케토헥사노에이트	D-알라닌	노르류신	0.531
α -케토글루타레이트	D-알라닌	글루타메이트	0.971
페닐글라이옥실레이트	D-알라닌	페닐글라이신	0.000
페닐파이루베이트	D-알라닌	페닐알라닌	0.075
2-(3-하이드록시-1-아다만틸)-옥소-에타노에이트	D-알라닌	3-하이드록시아다만틸글라이신	0.000

[130]

[131] 표 8

[Table 8]

기질		생성물	
아미노수용체(케토산)	아미노공여체(D-아미노산)	D-아미노산	2-옥소부티레이트(mM)
파이루베이트	D-호모알라닌	알라닌	0.399
2-옥소펜타노에이트	D-호모알라닌	노르발린	0.651

[132]

[133] 실시예 11. 정제한 D-아미노산 트랜스아미네이즈의 L-형 아미노산 농도에 따른 활성 저하 여부

[134] 상기 실시예 7에서 정제된 D-아미노산 트랜스아미네이즈를 사용하여 라세믹 아미노산의 계속적인 디라세마이제이션을 위해서는 최종 생산되는 L-아미노산에 의한 D-아미노산 트랜스아미네이즈 효소의 활성에 영향을 미치지 않아야 한다. 그 이유는 최종 생산되는 L-아미노산에 의해 그 활성이 저하된다면 계속적인 반응을 이끌어내기 어렵기 때문이다. 20 mM D-형 호모알라닌, 20 mM 파이루베이트 및 50 mM 인산칼륨(pH 7)에서 L-형 호모알라닌의 농도를 각각 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 mM로 하여 D-아미노산 트랜스아미네이즈의 활성을 확인하기 위하여 37 °C에서 10분간 반응시키고 2-옥소부티레이트의 생산량을 측정하였다. 이 결과 D-아미노산 트랜스아미네이즈는 최종 생산되는 L-아미노산에 의하여 활성이 저하되지 않는 것을 확인하였다. 그 결과는 하기 도 1에 나타내었다.

[135]

[136] 실시예 12. 정제한 오메가 트랜스아미네이즈의 케토산에 대한 기질특이성 및 케토산에 의해 전환된 광학 활성 아미노산

[137] 상기 실시예 7에서 정제된 *O.anthropi*와 *P.denitrificans* 유래의 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈의 케토산에 대한 기질특이성을 조사하였다. 20 mM 케토산, 20 mM (S)- α -메틸벤질아민 및 50 mM 인산칼륨(pH 7)에서 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 의한 반응을 37 °C에서 10 분간 반응시키고 생성된 아세트페논의 생산량을 측정하였다. (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈는 글라이옥실레이트, 파이루베이트, 2-옥소부티레이트, β -하이드록시파이루베이트, 플루오로파이루베이트, 2-옥소펜타노에이트, 4-메틸-2-옥소펜타노에이트(*P.denitrificans*), 2-케토헥사노에이트 등의 케토산에 대하여 활성이 존재함을 확인하였다. 그 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

[138] 표 9

[Table 9]

기질		생성물		
아미노 수용체 (케토산)	아미노공여체 (S)-아민	L-아미노산	아세트페논 (mM)	
			<i>O.anthroti</i>	<i>P.denitrificans</i>
글라이옥실레이트	(S)- α -메틸벤질아민	글라이신	1.733	1.076
파이루베이트	(S)- α -메틸벤질아민	알라닌	1.284	1.216
2-옥소부티레이트	(S)- α -메틸벤질아민	호모알라닌	0.173	0.821
β -하이드록시파이루베이트	(S)- α -메틸벤질아민	세린	0.183	0.066
머캅토파이루베이트	(S)- α -메틸벤질아민	시스테인	0.012	0.008
플루오로파이루베이트	(S)- α -메틸벤질아민	플루오로알라닌	0.554	0.339
브로모파이루베이트	(S)- α -메틸벤질아민	브로모알라닌	0.010	-0.001
3-메틸-2-옥소부티레이트	(S)- α -메틸벤질아민	발린	-0.001	-0.002
트라이메틸파이루베이트	(S)- α -메틸벤질아민	<i>tert</i> -류신	-0.002	-0.004
2-옥소페타노에이트	(S)- α -메틸벤질아민	노르발린	0.078	1.032
4-메틸-2-소펜타노에이트	(S)- α -메틸벤질아민	류신	0.005	0.175
3-메틸-2-옥소펜타노에이트	(S)- α -메틸벤질아민	아이소류신	0.001	-0.004
2-케토헥사노에이트	(S)- α -메틸벤질아민	노르류신	0.006	0.713
α -케토글루타레이트	(S)- α -메틸벤질아민	글루타메이트	-0.001	-0.003
페닐글라이옥실레이트	(S)- α -메틸벤질아민	페닐글라이신	-0.005	-0.008
2-(3-하이드록시-1-아다만틸)-2-옥소에타노에이트	(S)- α -메틸벤질아민	3-하이드록시아다만틸글라이신	-0.002	-0.004

[139]

[140] 상기 표 9에서 확인할 수 있는 바와 같이 α -케토글루타레이트는 오메가 트랜스아미네이즈에 대해서는 활성이 존재하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 상기 표 7 및 표 8에서 확인할 수 있는 바와 같이 상기 α -케토글루타레이트는 D-아미노산 트랜스아미네이즈에 대해서는 활성이 존재하는 것을 확인할 수 있어 본 발명에서 아미노 수용체로 작용하는 바람직한 일실시예에 해당할 수 있음을 확인되었다.

[141]

[142] 실시예 13. 정제한 오메가 트랜스아미네이즈의 아민에 대한 기질특이성 및 파이루베이트로부터 전환된 L-알라닌

[143] 상기 실시예 4에서 정제된 오.안트로피(*O.anthropi*)와 피.덴트리피칸(*P.denitrificans*) 유래의 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈의 아민에 대한 기질특이성을 조사하였다. 20 mM 아민, 20 mM(S)-아민(40mM라세믹 sec-부틸아민) 및 50 mM 인산칼륨 (pH 7)에서 오메가 트랜스아미네이즈에 의한 반응을 37 °C에서 10 분간 반응시키고 생성된 L-형 알라닌의 생산량을 측정하였다. 오메가 트랜스아미네이즈는 (S)- α -메틸벤질아민, 아이소프로필, sec-부틸아민 등의 아민에 대하여 활성이 존재함을 확인하였다. 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

[144] 표 10

[Table 10]

기질		생성물		
아미노공여체 (아민)	아미노 수용체 (케토산)	케톤	L-형 알라닌 (mM)	
			<i>O.anthroti</i>	<i>P.denitrificans</i>
(S)- α -메틸벤질아민	파이루베이트	아세트페논	0.715 $\pm$ 0.082	0.451 $\pm$ 0.077
sec-부틸아민	파이루베이트	2-부타논	0.164 $\pm$ 0.019	0.000 $\pm$ 0.000
아이소프로필아민	파이루베이트	아세톤	0.309 $\pm$ 0.050	0.033 $\pm$ 0.002

[145] 실험예

[146] 실험예 1. 정제한 오메가 트랜스아미네이즈가 반응하고 아미노 공여체로써 아이소프로필아민을 사용한 경우 케토산으로부터 고농도의 L-아미노산의 생산

[147] 실시예 7에서 정제된 오메가 트랜스아미네이즈를 이용하여 케토산으로부터 고농도의 L-아미노산이 생산됨을 확인하는 실험을 수행하였다. 100 mM 2-옥소부티레이트, 100 mM 아이소프로필아민 및 50 mM 인산칼륨(pH 7)에서 1U/ml 오메가 트랜스아미네이즈에 의한 반응을 37 °C에서 반응시키고 시간에 따라 생산된 L-호모알라닌의 생산량을 측정하였다. 아이소프로필아민을 아미노공여체로 사용하고 정제한 오메가 트랜스아미네이즈에 의해 케토산으로부터 고농도의 L-호모알라닌이 생산되며, 그 전환율은 80% 이상으로 진행되는 것을 확인하였다. 그 결과를 하기 도 2에 나타내었다.

[148]

[149] 실험예 2. 정제한 D-아미노산 트랜스아미네이즈와 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈의 커플링 반응에 의한 고농도 라세믹 아미노산의 L-아미노산으로의 전환

[150] 실시예 4에서 정제된 D-아미노산 트랜스아미네이즈와 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 이용하여 고농도 라세믹 아미노산으로부터 L-아미노산이 생산됨을 확인하는 실험을 진행하였다. 100 mM 라세믹 아미노산, 70 mM α -케토글루타레이트 또는 페닐글라이옥실레이트 또는 페닐파이루베이트(아미노 수용체), 70 mM 아이소프로필아민(아미노 공여체), 0.1 mM PLP 및 50 mM인산칼륨(pH 7)에서 4 U/ml D-아미노산 트랜스아미네이즈와 20U/ml (S)-선택적오메가트랜스아미네이즈커플링반응을 37 °C 에서 진행하였다. 류신과 노르류신의 경우는 50 mM 라세믹 아미노산, 35 mM α -케토글루타레이트 또는 페닐글라이옥실레이트 또는 페닐파이루베이트, 35 mM 아이소프로필아민의 기질을 사용하여 반응하였다. 알라닌 생산을 위한 디라세마이제이션 반응의 경우에는 반응 시간 별로 기질, 생성물을 측정하였으며 호모알라닌, 세린, 호모세린, 노르발린, 류신, 노르류신의 경우에는 D-아미노산과 L-아미노산을 분석하였다. 다양한 아미노산들에 대해서 100 mM 라세믹 아미노산(류신과 노르류신은 50 mM)으로부터 L-아미노산을 99 % 이상의 광학적 순도(ee)를 디라세마이제이션을 통하여 얻을 수 있었다. 그

결과를 하기 도 3, 도 4 및 표 11에 나타내었다.

[151] 표 11

[Table 11]

아미노산	L-아미노산 최종 농도 (mM)	ee (%)	반응시간 (h)
알라닌	100.15	99.34	10
호모알라닌	99.24	99.94	6
세린	101.84	98.92	25
노르발린	103.86	99.16	25
노르류신	55.29	99.30	20
류신	49.66	99.81	10
호모세린	98.51	98.87	25

[152]

[153] 실험예 3. 정제한 L-형 가지사슬 아미노산 트랜스아미네이즈와 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈의 커플링 반응에 의한 고농도 라세믹 아미노산의 D-아미노산으로의 전환

[154] 상기 실시예 7에서 정제된 L-형 가지사슬 아미노산 트랜스아미네이즈와 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 이용하여 고농도 라세믹 아미노산으로부터 D-아미노산이 생산됨을 확인하는 실험을 진행하였다. 100 mM 라세믹 아미노산, 70 mM α -케토글루타레이트, 70 mM 아이소프로필아민, 0.1 mM PLP 및 50 mM 인산칼륨(pH 7)에서 4 U/ml L-형 가지사슬 트랜스아미네이즈와 20U/ml (R)-선택적오메가트랜스아미네이즈커플링반응을 37 °C 에서 진행하였다. 노르류신의 경우는 50 mM 라세믹 아미노산, 35 mM α -케토글루타레이트, 35 mM 아이소프로필아민의 기질을 사용하여 반응하였다. 알라닌, 호모알라닌, 세린, 호모세린, 노르발린, 류신, 노르류신의 경우에는 D-아미노산과 L-아미노산을 분석하였다. 다양한 아미노산들에 대해서 100 mM 라세믹 아미노산(노르류신은 50 mM)으로부터 D-아미노산을 99 % 이상의 광학적 순도(ee)를 디라세마이제이션을 통하여 얻을 수 있었다. 그 결과를 하기 표 12에 나타내었다.

[155] 표 12

[Table 12]

아미노산	D-아미노산 최종 농도 (mM)	ee (%)	반응시간 (h)
알라닌	102.88	99.10	20
호모알라닌	99.54	99.82	15
세린	100.71	99.01	20
노르발린	98.42	99.01	20
노르류신	48.58	99.51	20
호모세린	97.78	98.89	25

[156]

[157] 실험예 4. 정제한 오메가 트랜스아미네이즈를 이용한 광학 활성 키랄 아민의 키네틱레졸루션(kinetic resolution) 반응 시 파이루베이트와 프로판알의 아미노 수용체로써 활성 비교

[158] 상기 실시예 7에서 정제된 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 이용하여 라세믹 α -메틸벤질아민과 파이루베이트 또는 프로판알을 기질로 사용하여 반응을 수행하였다. 100 mM α -메틸벤질아민, 80 mM 파이루베이트 또는 프로판알, 0.1 mM PLP, 50 mM Phosphate 버퍼 pH 7.5, 37 °C 조건에서 *O.anthropi* 유래의 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈 5 U/ml을 첨가하여 시간에 따라 α -메틸벤질아민의 양을 (S)- α -메틸벤질아민과 (R)- α -메틸벤질아민으로 나눠서 각각 측정하였으며, 이의 광학적 순도를 구하였다. 그 결과 파이루베이트의 경우 3시간의 반응 만에 99% 이상의 enantiomeric excess로 (R)- α -메틸벤질아민을 얻을 수 있었으나 프로판알의 경우 24시간의 반응에도 57%의 광학적 순도로 (R)- α -메틸벤질아민을 얻을 수 있었다. 그 결과를 하기 도 5에 나타내었다.

[159]

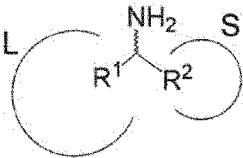
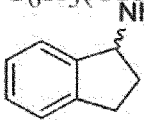
[160] 실험예 5. 정제한 오메가트랜스아미네이즈의 아민에 대한 기질 특이성 조사

[161] 상기 실시예 7에서 정제된 *O.anthropi* 유래의 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈의 아민에 대한 기질특이성을 조사하였다. α -메틸벤질아민(1a), 4-플루오로- α -메틸벤질아민(1b), α -에틸벤질아민(1c), 1-메틸-3-페닐프로필아민(1d), 1-아미노인단(1e), sec-부틸아민(1f), 사이크로프로필에틸아민(1g), 2-아미노펜테인(1h), 2-아미노옥테인(1i), 1-메톡시-2-프로필아민(1j)과 알라니놀(1k) 11가지 아민들에 대하여 기질특이성을 조사하였다. 10 mM의 racemic 아민, 10 mM 파이루베이트 0.1 mM PLP, 50 mM Phosphate 버퍼 pH 7.5, 37 °C 조건에서 *O.anthropi* 유래의 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈 0.125 U/ml을 첨가하여 10분간 반응하여 L-알라닌의 생성량을 GITC 유도체화를 통하여 측정하였다. 모든 활성은 5% 이하 전환율의

초기반응속도 구간에서 측정되었다. α -메틸벤질아민의 초기반응속도는 0.033 mM/min으로 측정되었다. α -메틸벤질아민에 대한 활성을 100%로 하였을 때 아릴알킬아민인 4-플루오로- α -메틸벤질아민(1b)의 경우는 91%, α -에틸벤질아민(1c)는 18%, 1-메틸-3-페닐프로필아민(1d)은 70%, 1-아미노인단(1e)은 64%((S)-1-아미노인단은 (S)- α -메틸벤질아민의 153%)의 활성을 지녔으며, 알킬아민의 경우 sec-부틸아민(1f)는 54%, 사이크로프로필에틸아민(1g)는 63%, 2-아미노펜테인(1h)은 29%, 2-아미노옥테인(1i)은 146%, 1-메톡시-2-프로필아민(1j)은 60%, 알라니놀(1k)은 63%의 활성을 지녔다. 그 결과를 하기 표 13에 나타내었다.

[162] 표 13

[Table 13]

			
기질	R ¹	R ²	상대적 활성(%)
1a	C ₆ H ₅	CH ₃	100 ^c
1b	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	CH ₃	91
1c	C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₃	18
1d	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂	CH ₃	70
1e			64 (153) ^d
1f	CH ₃ CH ₂	CH ₃	54
1g	Cyclopropyl	CH ₃	63
1h	CH ₃ (CH ₂) ₂	CH ₃	29
1i	CH ₃ (CH ₂) ₅	CH ₃	146
1j	CH ₃ OCH ₂	CH ₃	60
1k	HOCH ₂	CH ₃	63

[163]

[164] 실험예 6. 쓰레오닌 디아미네이즈와 오메가 트랜스아미네이즈가 커플드 엔자임(coupled enzyme) 반응 하여 키네틱 레졸루션(kinetic resolution)을 수행하는 경우 농도 변화에 따른 광학 활성 키랄 아민의 수득률

[165] 상기 실시예 7에서 정제된 쓰레오닌 디아미네이즈와 오메가 트랜스아미네이즈를 이용하여 각 효소의 농도를 하기 [표 14]과 같이 다양하게 하여 coupled enzyme 반응을 수행하였다. 100 mM 라세믹 α -메틸벤질아민, 60 mM L-쓰레오닌, 0.1 mM PLP, 50 mM Phosphate 버퍼 pH 7.5, 37 °C 조건에서 2.5시간 반응하였다. 쓰레오닌 디아미네이즈의 농도를 9U/ml로 고정하고 오메가

트랜스아미네이즈의 농도를 1.25U/ml, 2.50U/ml, 3.75U/ml로 늘려 주었을 때 광학적 순도가 28%, 65%, 90%로 증가하는 것을 확인하였지만 오메가 트랜스아미네이즈의 농도를 1.25U/ml로 고정하고 쓰레오닌디아미네이즈의 농도를 9U/ml, 18U/ml, 27U/ml로 증가시켰을 경우에는 광학적 순도(ee)가 28%, 24%, 26%로 향상되는 것을 확인하지 못하였다. 따라서 이 coupled enzyme 반응의 rate determining step은 오메가 트랜스아미네이즈의 반응이므로 오메가 트랜스아미네이즈의 농도를 증가시키는 것이 바람직하다. 그 결과를 하기 표 14에 나타내었다.

[166] 표 14

[Table 14]

ω -TA(U mL ⁻¹)	TD(U mL ⁻¹)	4 ^a (mM)	(R)-1a ^b 의 ee(%)
1.25	9	15	28
2.50	9	33	65
3.75	9	47	90
1.25	18	19	24
1.25	27	13	26

[167] (ω -TA: 오메가 트랜스아미네이즈, TD:쓰레오닌디아미네이즈, a: GITC 유도체의 HPLC 분석에서 측정된 표준 칼리브레이션에 의해 측정된 농도, b: GITC 유도체의 HPLC 분석에 의해 측정함)

[168]

[169] 실험예 7. L-쓰레오닌과 라세믹 아민을 기질로 하면서, (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈와 쓰레오닌 디아미네이즈의 커플드 엔자임 반응을 이용한 (R)-아민의 수득과 L-호모알라닌의 생산

[170] 실시예 9에서 가장 좋은 결과를 얻은 효소 비율을 참고하고 실시예 7에서 정제된 오메가 트랜스아미네이즈와 쓰레오닌 디아미네이즈를 이용하여 커플드 엔자임 반응을 이용한 아민의 키네틱 레졸루션과 L-호모알라닌의 생산 실험을 수행하였다. 11가지 아민(α -메틸벤질아민(1a), 4-플루오로- α -메틸벤질아민(1b), α -에틸벤질아민(1c), 1-메틸-3-페닐프로필아민(1d), 1-아미노인단(1e), sec-부틸아민(1f), 사이크로프로필에틸아민(1g), 2-아미노펜테인(1h), 2-아미노옥테인(1i), 1-메톡시-2-프로필아민(1j)과 알라니놀(1k))에 대하여 키네틱 레졸루션을 수행하였다. 100 mM 아민(1a-1k), 60 mM L-쓰레오닌, 0.1 mM PLP, 50 mM phosphate 버퍼 pH 7.5에 3.75 U/ml (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈와 9 U/ml 쓰레오닌 디아미네이즈를 첨가하여 각 아민의 농도와 enantiomeric excess를 측정하였다. α -에틸벤질아민(1c), 2-아미노옥테인(1i), 알라니놀(1k)을 제외한 모든 아민에 대해서 10시간 이내의 반응시간만에 99% 이상의 enantiomeric excess를 얻을 수 있었다.

α -에틸벤질아민(1c), 2-아미노옥테인(1i), 알라니놀(1k)의 키네틱 레졸루션을 위해서 이 커플드 엔자임 반응의 rate determining step인 오메가 트랜스아미네이즈의 농도를 10U/ml로 증가 함으로서 α -에틸벤질아민(1c), 2-아미노옥테인(1i)에 대하여 30시간 이내에 99% 이상의 enantiomeric excess를 얻을 수 있었고 알라니놀(1k)에 대해서는 66%의 enantiomeric excess를 얻을 수 있었다. 모든 반응에서 L-호모알라닌이 99% enantiomeric excess로 생성 되는 것을 확인 하였다. 그 결과를 하기 표 15에 나타내었다.

[171] 표 15

[Table 15]

키랄 아민	반응시간(h)	전환율(%)	(R)-아민의 ee(%)
1a	3	49.9	>99
1b	3.5	50.5	>99
1c	28	35.1	52
1c	30	50.1	>99
1d	5	50.9	>99
1e	7	50.0	>99
1f	8	50.2	>99
1g	8	50.1	>99
1h	9	50.5	>99
1i	24	37.4	58
1i	24	50.2	>99
1j	9	50.6	>99
1k	30	40.8	66

[172]

[173] 실험예 8. L-쓰레오닌과 라세믹 아민을 기질로 하면서, (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈와 쓰레오닌 디아미네이즈의 커플드 엔자임 반응을 이용한 (S)-아민의 수득과 D-호모알라닌의 생산

[174] 실시예 7에서 정제된 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈와 쓰레오닌 디아미네이즈를 이용하여 커플드 엔자임 반응을 이용한 아민의 키네틱 레졸루션과 D-호모알라닌의 생산 실험을 수행하였다. 30mM α -메틸벤질아민, 20 mM L-쓰레오닌, 0.1 mM PLP, 50 mM phosphate 버퍼 pH 7.5에 1.5 U/ml (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈와 4.5 U/ml 쓰레오닌 디아미네이즈를 첨가하여 각 (S) 배열 또는 (R) 배열 α -메틸벤질아민의 농도를 반응시간에 따라 측정하였다. 99%이상의 광학적 순도를 5시간 반응만에 얻을 수 있었으며,

마찬가지로 D-호모알라닌을 99%이상의 광학적 순도로 얻을 수 있었다. 그 결과를 하기 도 6에 나타내었다.

산업상 이용가능성

- [175] 본 발명의 라세믹 아민 화합물 제조방법에 따르면 α -케토산이 반응 중간체로 형성되므로 고가의 α -케토산을 반응 출발 물질로 사용할 필요가 없으며, 본 발명의 방법에 의해 제조된 광학 활성 아민 화합물은 광학적 순도가 99% 이상이므로 키랄 화합물을 필요로 하는 의약, 농약 산업 등에 폭넓게 사용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1]

1) 기질인 라세믹 아미노산, 아미노 수용체 및 아미노 공여체를 효소인 D- 또는 L- 선택적 아미노산 트랜스아미네이즈 및 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 제공하는 단계;
2) 상기 1)단계에서 제공된 기질 중 라세믹 아미노산과 아미노 수용체가 효소인 D- 또는 L- 선택적 아미노산 트랜스아미네이즈의 반응에 의하여 α -케토산을 생산하는 단계; 및
3) 상기 α -케토산이 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈와 반응하여 광학 활성 아미노산을 생산하는 단계를 포함하는 광학 활성 아민 화합물의 제조 방법.

[청구항 2]

제1항에 있어서,
상기 1)단계에서 D-아미노산 트랜스아미네이즈를 제공하는 경우에는 상기 2)단계에서 라세믹 아미노산 중 D-아미노산과 아미노 수용체가 효소인 D-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈에 의하여 α -케토산을 생산한 후, 상기 3)단계에서 α -케토산이 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 의하여 L-아미노산을 생산하는 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조 방법.

[청구항 3]

제1항에 있어서,
상기 1)단계에서 L-아미노산 트랜스아미네이즈를 제공하는 경우에는 상기 2)단계에서 라세믹 아미노산 중 L-아미노산과 아미노 수용체가 효소인 L-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈에 의하여 α -케토산을 생산한 후, 상기 3)단계에서 α -케토산이 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 의하여 D-아미노산을 생산하는 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조 방법.

[청구항 4]

제1항에 있어서,
상기 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈는 오크로박트럼안트로피(*Ochrobactrum anthropi*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 1]의 염기서열로 암호화 되는 효소 또는 파라코쿠스텐이트리피킨스(*Paracoccus denitrificans*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 2]의 염기서열로 암호화 되는 효소인 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조 방법.

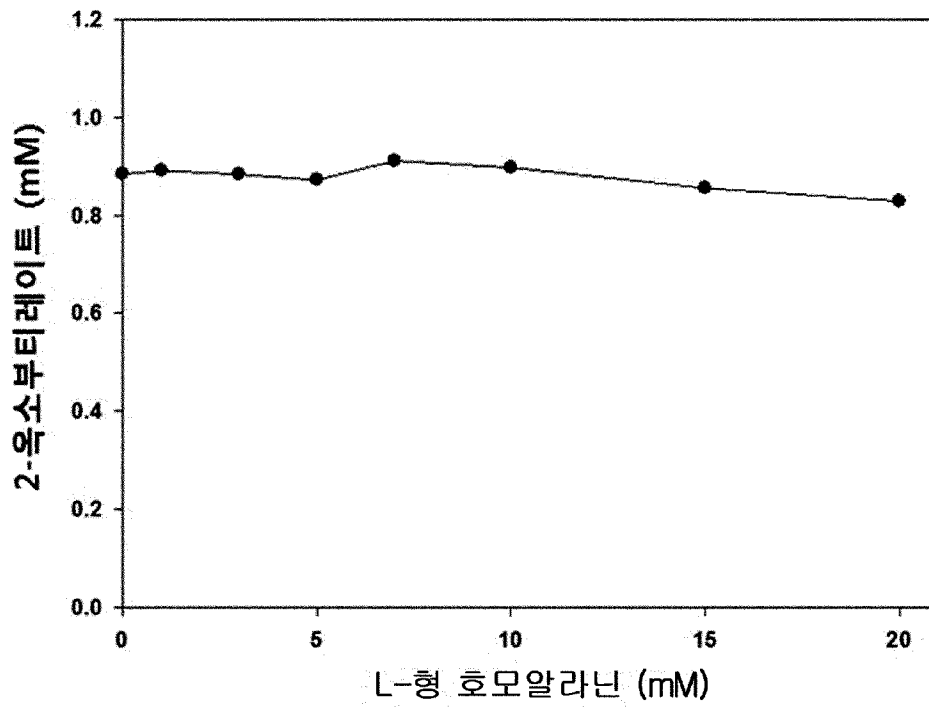
[청구항 5]

제1항에 있어서,
상기 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈는 아스퍼질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 3]의 염기서열로 암호화 되는 효소 또는 (*Arthrobacter* sp.)에서 유래된 것으로서, [서열번호 4]의 염기서열로 암호화 되는 효소인 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조 방법.

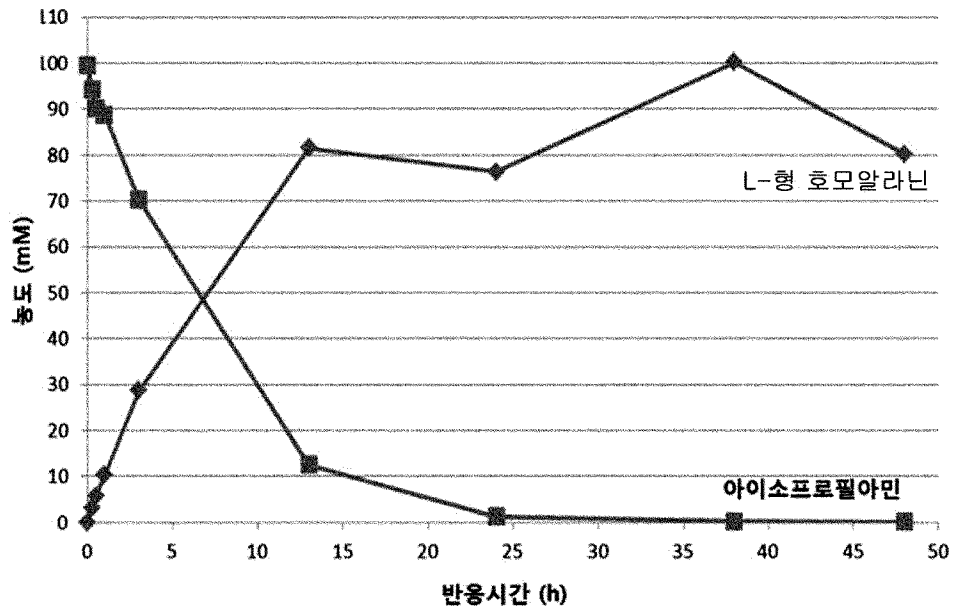
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 라세믹 아미노산은 라세믹 알라닌, 라세믹 세린, 라세믹 호모세린, 라세믹 노르발린, 라세믹 노르류신 및 라세믹 류신으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 아미노 수용체는 α -케토글루타레이트, 페닐글라이옥실레이트 또는 페닐파이루베이트 중에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 아미노 공여체는 아이소프로필아민, 메틸벤질아민 또는 벤질아민으로 이루어지는 군 중에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 D-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈는 바실러스 스파리쿠스(*Bacillusphaericus*)로부터 유래된 것으로서, [서열번호 5]의 염기서열로 암호화되는 효소인 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 L-선택적 아미노산 트랜스아미네이즈는 대장균(*Escherichiacoli*)로부터 유래된 것으로서, [서열번호 6]의 염기서열로 암호화되는 효소인 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조 방법.
- [청구항 11] 1) 기질인 라세믹 아민 및 L-쓰레오닌을 효소인 쓰레오닌 디아미네이즈 및 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 제공하는 단계;
2) 상기 쓰레오닌 디아미네이즈는 L-쓰레오닌을 디아미네이션하여 아미노 수용체인 α -케토산을 생산하는 단계; 및
3) 상기 1)단계에서 제공된 라세믹 아민과 상기 2)단계에서 생성된 α -케토산이 (S)- 또는 (R)- 선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 의하여 키네틱 레졸루션을 통해 광학 활성 아민을 생산하는 단계를 포함하는 광학 활성 아민 화합물의 제조방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 1)단계에서 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 제공하는 경우에는 상기 3)단계에서 라세믹 아민 중 (S)-아민과 상기 2)단계에서 생성된 α -케토산이 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 의하여 키네틱 레졸루션을 통해 (R)-아민을

- [청구항 13] 생산하는 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조방법.
제11항에 있어서,
상기 1)단계에서 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈를 제공하는 경우에는 상기 3)단계에서 라세믹 아민 중 (R)-아민과 상기 2)단계에서 생성된 α -케토산이 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈에 의하여 키네틱 레졸루션을 통해 (S)-아민을 생산하는 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조방법.
- [청구항 14] 제11항에 있어서,
상기 (S)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈는
오크로박트럼엔트로피(*Ochrobactrum anthropi*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 1]의 염기서열로 암호화 되는 효소 또는 파라고쿠스텐이트리피컨스(*Paracoccus denitrificans*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 2]의 염기서열로 암호화 되는 효소인 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조방법.
- [청구항 15] 제11항에 있어서,
상기 (R)-선택적 오메가 트랜스아미네이즈는 아스퍼질러스 터레우스(*Aspergillus terreus*)에서 유래된 것으로서, [서열번호 3]의 염기서열로 암호화 되는 효소 또는 아스로박터 종(*Arthrobacter* sp.)에서 유래된 것으로서, [서열번호 4]의 염기서열로 암호화 되는 효소인 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조방법.
- [청구항 16] 제11항에 있어서,
상기 라세믹 아민은 α -메틸벤질아민, 4-플루오로- α -메틸벤질아민, α -에틸벤질아민, 1-메틸-3-페닐프로필아민, 1-아미노인단, sec-부틸아민, 사이크로프로필에틸아민, 2-아미노펜테인, 2-아미노옥테인, 1-메톡시-2-프로필아민 및 알라니놀로 이루어지는 군 중에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조방법.
- [청구항 17] 제11항에 있어서,
상기 쓰레오닌 디아미네이즈는 대장균(*Escherichia coli*)로부터 유래된 것으로서, [서열번호 7]의 염기서열로 암호화되는 효소인 것을 특징으로 하는 광학 활성 아민 화합물의 제조방법.
- [청구항 18] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해서 제조된 광학 활성 아미노산.
- [청구항 19] 제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해서 제조된 광학 활성 아민.

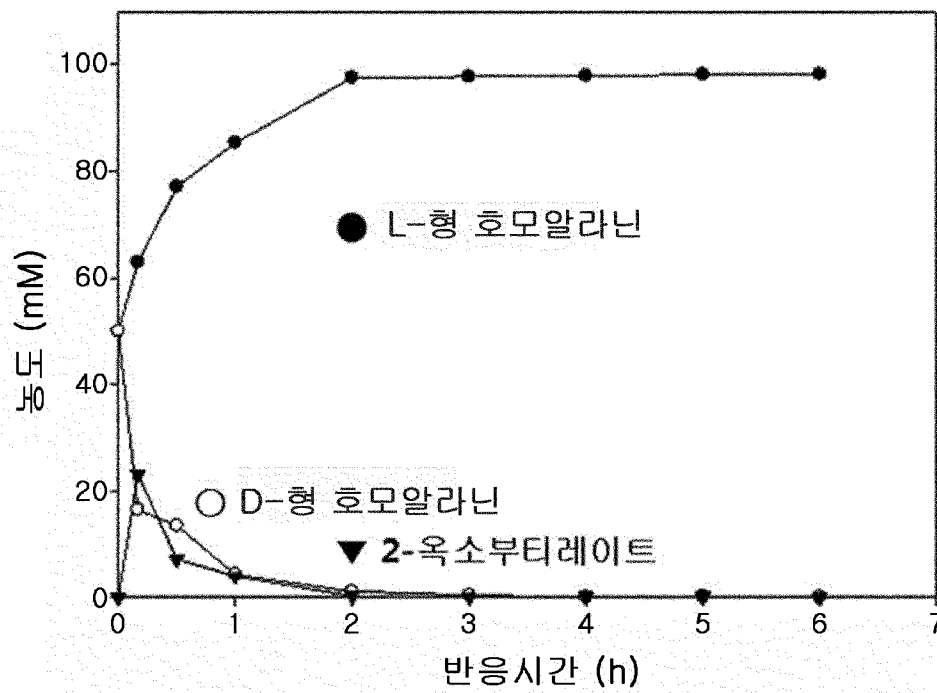
[Fig. 1]



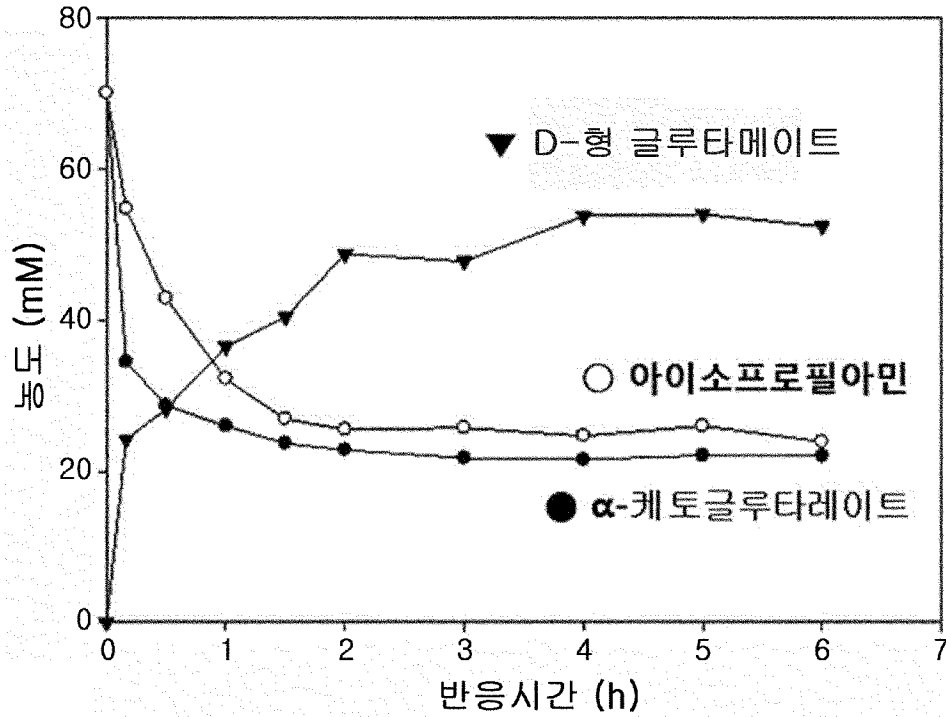
[Fig. 2]



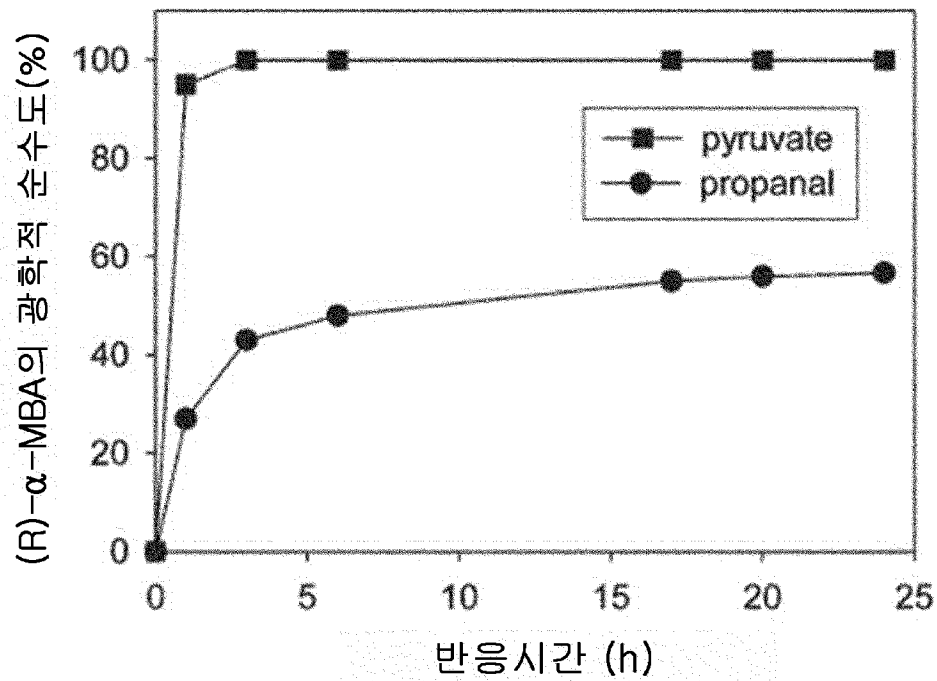
[Fig. 3]



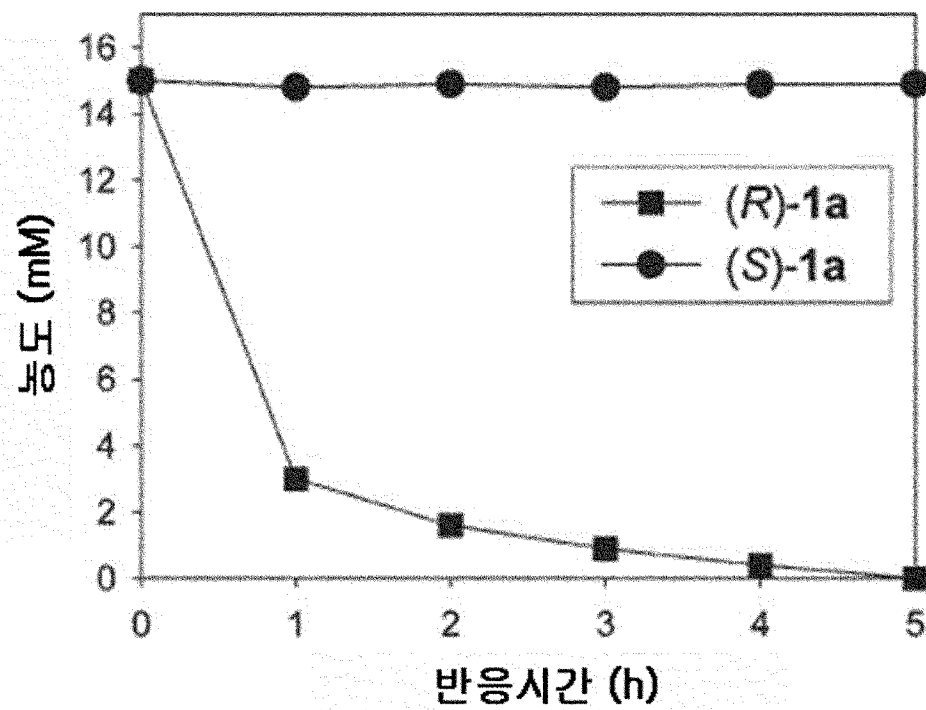
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/011574**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07C 227/32(2006.01)i, C12P 41/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07C 227/32; C12P 13/06; C12P 17/10; C12N 9/10; C12P 13/00; C12P 41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: racemic amino acid, amino receptor, amino donor, transaminase, omega transaminase, optically active amine, α -keto acids**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2009-0246837 A1 (ROBINS, Karen et al.) 01 October 2009 See the entire document.	18,19 1-17
X A	WO 2012-007548 A1 (DSM IP ASSETS B.V.) 19 January 2012 See the entire document.	18,19 1-17
X A	WO 2011-106696 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 01 September 2011 See the entire document.	18,19 1-17
X A	JONG-SHIK SHIN et al., "Asymmetric synthesis of chiral amines with w-transaminase", Biotechnology and Bioengineering, vol. 65, no. 2, pp. 206-211, 20 October 1999 See the entire document.	18,19 1-17
X A	DOMINIK KOSZELEWSKI et al., "Synthesis of optically active amines employing recombinant w-transaminases in E. coli cells", ChemCatChem, vol. 2, pp. 73-77, 2010 See the entire document.	18,19 1-17
X	KAZUO YONAHARA et al., "D-amino acid aminotransferase of Bacillus sphaericus", The Journal of Biological Chemistry, vol. 250, no. 17, pp. 6983-6989, 1975	18,19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 MARCH 2014 (24.03.2014)

Date of mailing of the international search report

24 MARCH 2014 (24.03.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/011574

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	See the entire document.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/011574

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2009-0246837 A1	01/10/2009	AU 2007-214717 A1	23/08/2007
		AU 2007-214717 B2	22/12/2011
		BR P10707454 A2	03/05/2011
		CA 2637821 A1	23/08/2007
		CN 101384723 A	11/03/2009
		CN 101384723 B	27/03/2013
		DE 602007006765 D1	08/07/2010
		DK 1987152 T3	30/08/2010
		EA 017070 B1	28/09/2012
		EA 200870262 A1	27/02/2009
		EP 1818411 A1	15/08/2007
		EP 1987152 A1	05/11/2008
		EP 1987152 B1	26/05/2010
		EP 2202317 A1	30/06/2010
		EP 2202318 A1	30/06/2010
		ES 2345734 T3	30/09/2010
		IL 192637 D0	11/02/2009
		IL 219163 D0	28/06/2012
		IL 219164 D0	28/06/2012
		JP 2009-526531 A	23/07/2009
		JP 2013-188217 A	26/09/2013
		KR 10-1294499 B1	07/08/2013
		KR 10-2008-0093437 A	21/10/2008
		MX 2008010416 A	27/01/2009
		PT 1987152 E	18/08/2010
		WO 2007-093372 A1	23/08/2007
WO 2012-007548 A1	19/01/2012	CN 103189519 A	03/07/2013
		EP 2593556 A1	22/05/2013
		JP 2013-530713 A	01/08/2013
		MX 2013000494 A	15/02/2013
WO 2011-106696 A2	01/09/2011	CN 102884179 A	16/01/2013
		EP 2539444 A2	02/01/2013
		EP 2539444 A4	18/09/2013
		US 2013-0029386 A1	31/01/2013
		WO 2011-106696 A3	20/10/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07C 227/32(2006.01)i, C12P 41/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07C 227/32; C12P 13/06; C12P 17/10; C12N 9/10; C12P 13/00; C12P 41/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 라세믹아미노산, 아미노 수용체, 아미노 공여체, 트랜스아미네이즈, 오페가 트랜스 아미네이즈, 광학 활성 아민, 알파 케토산

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	US 2009-0246837 A1 (ROBINS KAREN 외 2명) 2009.10.01 전체 문헌 참조.	18, 19 1-17
X A	WO 2012-007548 A1 (DSM IP ASSETS B.V.) 2012.01.19 전체 문헌 참조.	18, 19 1-17
X A	WO 2011-106696 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2011.09.01 전체 문헌 참조.	18, 19 1-17
X A	JONG-SHIK SHIN et al., "Asymmetric synthesis of chiral amines with w-transaminase", Biotechnology and Bioengineering, Vol. 65, No. 2, pp. 206-211, 1999.10.20 전체 문헌 참조.	18, 19 1-17
X A	DOMINIK KOSZELEWSKI et al., "Synthesis of optically active amines employing recombinant w-transaminases in E. coli cells", ChemCatChem, Vol. 2, pp. 73-77, 2010 전체 문헌 참조.	18, 19 1-17
X	KAZUO YONAHARA et al., "D-amino acid aminotransferase of Bacillus sphaericus", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 250, No. 17, pp. 6983-6989, 1975	18, 19

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 03월 24일 (24.03.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 03월 24일 (24.03.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이선화

전화번호 +82-42-481-5603



C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	전체 문헌 참조.	1-17

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2009-0246837 A1	2009/10/01	AU 2007-214717 A1 AU 2007-214717 B2 BR PI0707454 A2 CA 2637821 A1 CN 101384723 A CN 101384723 B DE 602007006765 D1 DK 1987152 T3 EA 017070 B1 EA 200870262 A1 EP 1818411 A1 EP 1987152 A1 EP 1987152 B1 EP 2202317 A1 EP 2202318 A1 ES 2345734 T3 IL 192637 D0 IL 219163 D0 IL 219164 D0 JP 2009-526531 A JP 2013-188217 A KR 10-1294499 B1 KR 10-2008-0093437 A MX 2008010416 A PT 1987152 E WO 2007-093372 A1	2007/08/23 2011/12/22 2011/05/03 2007/08/23 2009/03/11 2013/03/27 2010/07/08 2010/08/30 2012/09/28 2009/02/27 2007/08/15 2008/11/05 2010/05/26 2010/06/30 2010/06/30 2010/09/30 2009/02/11 2012/06/28 2012/06/28 2009/07/23 2013/09/26 2013/08/07 2008/10/21 2009/01/27 2010/08/18 2007/08/23
WO 2012-007548 A1	2012/01/19	CN 103189519 A EP 2593556 A1 JP 2013-530713 A MX 2013000494 A	2013/07/03 2013/05/22 2013/08/01 2013/02/15
WO 2011-106696 A2	2011/09/01	CN 102884179 A EP 2539444 A2 EP 2539444 A4 US 2013-0029386 A1 WO 2011-106696 A3	2013/01/16 2013/01/02 2013/09/18 2013/01/31 2011/10/20