

미생물 입체선택성 가수분해 반응을 이용한 광학활성 Styrene Oxide 생산

윤성준·*이은열
경성대학교 공과대학 식품공학과
(접수 : 2000. 10. 10., 게재승인 : 2000. 12. 14.)

Production of Chiral Styrene Oxide by Microbial Enantioselective Hydrolysis Reaction

Sung Jun Yoon and Eun Yeol Lee*
Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea
(Received : 2000. 10. 10., Accepted : 2000. 12. 14.)

Chiral epoxides are useful chiral synthons in organic synthesis, and various biological methods have been investigated for their production. In this work, the enantioselective resolution of racemic styrene oxide was investigated using *Aspergillus niger* sp. for the production of optically pure (*S*)-styrene oxide. The enantioselectivity and initial hydrolysis rates of the racemic substrate were highly dependent on the pH, temperature, and the volume ratio of cosolvent. Experimental sets of pH, temperature, and the volume ratio of cosolvent were investigated using a central composite experimental design, and reaction conditions were optimized by response surface analysis. The optimal conditions of pH, temperature, and the volume ratio of cosolvent were determined to be 7.78, 28.32°C, and 2.4%(v/v), respectively, and optically pure (*S*)-styrene oxide (> 99% ee) was obtained at 35% yield using this microbial enantioselective hydrolysis reaction.

Key Words : styrene oxide, enantioselective resolution, response surface methodology, *Aspergillus niger*

서론

생리활성 기능을 가지는 대부분의 생화학 물질들은 분자구조 내에 비대칭 탄소(chiral carbon)를 가지고 있어 여러 가지 광학이성질체들이 존재할 수 있다. 이러한 광학이성질체들 중에서 어느 한 가지의 광학이성질체만이 원하는 생리활성을 가지며 나머지 이성질체들은 활성이 없거나 경우에 따라서는 심각한 부작용을 주는 경우가 많이 있다(1,2). 따라서 광학적으로 순수한 형태의 생리활성 물질 제조는 매우 중요하며, 이러한 광학적으로 순수한 의약품(chiral pharmaceuticals)들을 보다 효율적으로 합성하기 위하여 요구되는 광학활성 중간체(chiral intermediate)의 수요도 급격히 늘고 있는 실정이다. 광학활성 중간체 중 최근에 많은 관심을 불러일으키는 물질이 바로 광학활성 에폭사이드(chiral epoxide)이며, 구조적 특성으로 인하여 반응성이 우수하여 키랄 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 합성 중간체 (synthetic intermediate)로 널리 사용될 수 있다(3).

화학 비대칭 합성 (asymmetric synthesis) 등의 유기합성법과 효소 및 미생물 등의 생촉매(biocatalyst)를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다(4-7). 상업적 측면에서 보면, 화학적 방법의 경우 사용되는 기능성 촉매가 너무 고가이고 특정 구조를 가진 에폭사이드에만 한정적으로 적용된다는 단점이 있어 입체 특이성이 우수한 생촉매를 이용한 합성 방법 개발의 중요성이 부각되고 있다. 생촉매를 이용하는 방법 중에서 알켄 기질을 monooxygenase 활성을 이용하여 에폭시화 시키는 방법은 monooxygenase 효소의 안정성이 낮고, cofactor의 재 순환이 요구되며, 산물저해(product inhibition)가 심해 생산성이 낮다는 단점이 있다. 이러한 문제점을 극복할 수 있는 대안으로써 최근 유용한 방법으로 인식되고 있는 방법이 에폭사이드 가수분해 효소(epoxide hydrolase)를 이용한 입체선택성 광학분할법(enantioselective kinetic resolution)이다(8-11). 라세믹 혼합물에 대한 선택적 가수분해 속도 차이를 이용하여 단일 이성질체를 분리하는 방법이므로 일반적으로 저가인 라세믹 에폭사이드 기질에 대해서 상업성도 우수하다(12).

광학활성 styrene oxide는 β -blocker, non-steroidal anti-inflammatory drug(NSAIDS) 등의 고부가가치 광학활성 의약품 합성용 전구체로 유용하게 이용될 수 있다. 본 연구에서는 라세믹 styrene oxide 기질을 입체선택적 가수분해능이 있는

*Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea
Tel : +82-51-620-4716, Fax : +82-51-622-4986
E-mail : eylee@star.ks.ac.kr

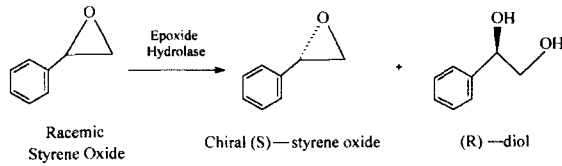


Figure 1. Enantioselective hydrolysis of racemic styrene oxide for the production of chiral (S)-styrene oxide using epoxide hydrolase.

신규로 분리한 미생물인 *Aspergillus niger*를 이용해 고가의 광학활성 styrene oxide를 제조하고자 하였다 (Figure 1). *A. niger*가 보유하고 있는 epoxide hydrolase 활성을 이용한 라세믹 styrene oxide의 광학분할에 있어서 주요 반응 조건인 pH, 온도 및 cosolvent 등이 광학분할반응에 미치는 영향을 분석하고, 입체선택적 가수분해 반응 속도에 대한 여러 가지 환경 인자들의 최적 조건을 구하는 방법으로는 제조공정 및 신제품 개발 등에서 최적화기법으로 널리 활용되고 있는 반응 표면 분석법(response surface analysis)을 사용하였다(13-15). 반응 표면 분석을 위한 실험 계획법으로는 중심합성계획법(central composite design)을 사용하였으며, 상업적으로 유용한 광학활성 에폭사이드 중간체인 chiral styrene oxide를 생산하기 위한 반응기 운전 등에 활용할 수 있는 최적 생산 조건을 구하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 배양 및 생촉매 제조 조건

*Aspergillus niger*를 고체배지(glucose 10 g/L, corn-steep liquor (Sigma) 20 g/L, Bacto-Agar(Difco) 20 g/L)에서 3~4일간 배양한 후 생성된 검은색 spore를 액체배지(glucose 10 g/L, corn-steep liquor(Sigma) 20 g/L)에 접종하여 27℃, 250 rpm에서 3일간 배양한 후 원심 분리하고 상등액을 제거하여 증류수(distilled water)로 두 번 정도 세척하였다. Wet pellet을 4℃에서 3~4일간 건조시켜 얻은 *A. niger* 건조분말을 생촉매로 사용하였다.

입체선택적 광학분할(enantioselective resolution)

A. niger 건조분말 30 mg을 1 ml의 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)에 현탁시킨 후 20 mM 라세믹 styrene oxide를 주입하였다. 반응기로는 screw-cap flask 또는 jacketed glass enzyme reactor를 사용하였으며, 27℃, 250 rpm에서 교반시키면서 반응을 진행시켰다. 초기반응속도는 반응초기 20분 동안의 styrene oxide 농도변화를 측정하고 이를 세포량 및 측정시간으로 나누어 결정하였다. 반응용액을 diethyl ether로 추출한 후, 유기용매 층을 GC로 분석하여 enantiomeric excess ($ee = \frac{(S-R)}{(S+R)} \times 100(\%)$) 값 및 epoxide hydrolase의 활성을 평가하였다. 기질인 라세믹 styrene oxide 및 enantiopure epoxide standard는 시약 등급을 구입하여 사용하였다.

pH, 온도 및 cosolvent의 영향

*A. niger*의 에폭사이드 가수분해효소 활성을 이용한 광학분할 속도에 미치는 pH 및 온도 영향을 분석하기 위하여 반응용액의 pH를 5.0 - 9.0, 온도를 20 - 40℃ 까지 변화시키면서

Table 1. Effect of pH on the enantioselective hydrolysis of racemic styrene oxide

pH	ee* (%)	Yield (%)
5.0	97	6.8
6.0	58	17.7
7.0	75	29.5
8.0	>99	26.4
9.0	79	33.0

*enantiomeric excess, $ee = \frac{S-R}{S+R} \times 100(\%)$

광학분할 실험을 수행하였다. 또한, 0 - 10%(v/v)의 유기용매를 cosolvent로 첨가한 후 위에 제시된 반응조건에서 입체선택적 가수분해 반응을 수행하여 광학분할 속도에 미치는 유기용매 첨가 효과를 분석하였다.

가스크로마토그래피(GC) 분석

광학활성 에폭사이드의 ee값 및 수율을 계산하기 위하여 (R)-enantiomer와 (S)-enantiomer에 대한 분리능이 있는 Supelco社 (미국)의 β-Dex 120 (0.25 mm ID, 30 m length, 25 μm film thickness) column을 사용하였으며, detector로 FID가 장착되어 있는 가스크로마토그래피(Shimadzu 17A, Japan)를 이용하여 styrene oxide를 정량 분석하였다. 이동가스로 질소를 사용하였으며 split ratio는 1:100, flow rate는 0.5 ml/min으로 1 μl의 시료를 주입하여 분석하였고, column, injector, detector의 온도는 각각 100, 220, 220℃였다.

결과 및 고찰

반응 pH의 영향

에폭사이드 가수분해효소의 경우 촉매 활성 부위에 존재하는 aspartic acid의 카르복실기가 oxirane ring에 대해 친핵성 반응을 함으로써 glycol-monoester-enzyme intermediate가 생성되면서 가수분해 반응이 진행된다(16). 따라서, 반응용액의 pH가 낮으면 카르복실기가 중성(-COOH)이 되므로 촉매 활성이 낮아질 수 있을 것으로 예상할 수 있으므로 입체선택적 가수분해 반응에 미치는 pH의 영향을 살펴보았다(Table. 1). pH 5.0의 경우 ee 값은 97% 정도를 보였으나 수율이 매우 낮았으며, pH 9.0에서 수율은 33.0%로 가장 높았으나 ee 값이 79% 이하로 낮게 나왔다. pH가 8.0의 경우, 수율은 26.4% 정도를 보였으며, ee 값이 99% 이상으로 나와 가장 광학적으로 순수한 (S)-styrene oxide를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

온도 및 cosolvent의 영향

입체특이성 가수분해 반응에 대한 온도의 영향을 알아보기 위하여 20 - 40℃의 온도 구간에서 초기 가수분해 속도를 측정하였다. 온도 변화에 따른 (R)-styrene oxide에 대한 초기 가수분해 속도를 살펴보면, 최적 온도가 30℃ 부근임을 알 수 있었고, 30℃에서의 초기 가수분해속도 대비 20℃에서의 상대 초기 가수분해속도가 가장 낮은 값인 79% 정도로 나타남을 알 수 있었다(data not shown). 본 연구에서 입체선택적 가수분해 대상 기질인 styrene oxide는 분자구조상 소수성이 강해 수용액에 대한 용해도가 낮은 편이다. 낮은 용해도에

Table 2. Level of the enantioselective hydrolysis conditions in experimental design

Xn	Independent variables	Level				
		-2	-1	0	1	2
X1	pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
X2	Temperature(°C)	20	25	30	35	40
X3	Cosolvent(%)	0	1	2	3	4

기인한 물질전달 제한은 고농도의 기질을 가수분해시키는 경우 가수분해 반응효율을 저하시킬 수 있으므로 기질의 용해도를 증가시키기 위하여 반응시스템에 유기용매를 첨가하기도 한다(17). 그러나, 이 경우 유기용매의 독성으로 인해 생촉매의 활성이 저하될 수 있는데, *A. niger* 유래의 epoxide hydrolase는 hexane, cyclohexane, dodecane 등의 소수성 유기용매와 acetone, acetonitrile, dimethylsulfoxide (DMSO) 등의 수용액과 혼합성이 우수한 유기용매들을 첨가해 준 모든 경우에서 활성이 저하된다(9). 따라서, 고농도의 기질을 가수분해하기 위한 공정 개발 등을 위해서는 유기용매 첨가로 인한 상반된 효과를 최적화할 수 있는 조건 결정이 중요하므로, 기질에 대한 용해도 및 수용액상과의 혼합성도 우수하고 생촉매에 대한 독성도 상대적으로 작은 DMSO를 cosolvent로 선택하여 0 - 10%(v/v)의 범위에서 가수분해 속도를 측정하고, cosolvent의 volume 비율이 증가함에 따라 증가하다가 감소한 후 다시 약간 증가하는 현상을 나타내었으며 약 3% (v/v)에서 상대적으로 높은 가수분해속도를 얻을 수 있음을 알 수 있었다(data not shown).

반응표면 분석(response surface analysis)법을 이용한 반응 조건 최적화

입체특이성 가수분해 반응에서 중요 실험인자인 pH, 반응 온도, cosolvent, 초기 기질농도, 반응시간 등은 독립 실험인자이지만, 실험인자 상호간의 복합적인 작용이 예상되므로 이러한 실험인자의 변화가 가수분해 속도에 미치는 영향을 반응표면 분석법을 이용하여 통계적으로 분석하고 최적화 실험을 실시하였다. 본 연구에서는 (R), (S)의 라세믹혼합물 중 (R)-이성질체에 대한 상대적 가수분해능이 우수한 *A. niger*의 epoxide hydrolase 활성을 이용하여 (R)-이성질체를 가수분해 시켜줌으로써 광학적으로 순수한 (S)-styrene oxide를 얻는 것이 목적이므로 (R)-이성질체에 대한 가수분해 속도를 최대화할 수 있는 조건을 구하고자 하였다. 반응표면 분석을 위한 실험 계획법으로는 적은 횟수의 실험으로 임계점(stationary point)까지 감지 할 수 있는 중심합성계획(central composite design)법을 사용하였으며, 가장 중요한 세 개의 실험인자인 pH, 반응온도, cosolvent 첨가량을 -2, -1, 0, 1, 2의 다섯 단계의 실험수준으로 나누었다(Table 2). 중심합성 계획법에 따라 총 $2^K + 2K + N_0$ (K : 변수의 개수, N_0 : 중심점의 수)개의 실험점을 결정하였는데, 요인 실험점은 8개이며 축점의 수는 6개, 그리고 한 개의 중심점을 설정하여 총 15가지의 실험점을 결정하였다. 각각의 실험점에서 3번씩 반복 실험하여 구한 (R)-styrene oxide의 초기 가수분해 속도에 대한 실험값의 평균값을 사용하였으며, 각각의 실험인자와 초기 가수분해 속도와의 관계를 결정짓기 위해 아래와 같은 2차 회귀

Table 3. Experimental data for initial hydrolysis rates under different conditions of pH, temperature and the volume ratio of cosolvent.

Exp. No	Culture conditions			Data value
	pH	Temp. (°C)	Cosolvent (%)	
1	-1	-1	-1	66
2	-1	-1	1	74
3	-1	1	-1	49
4	-1	1	1	62
5	1	-1	-1	89
6	1	-1	1	98
7	1	1	-1	73
8	1	1	1	99
9	0	0	0	100
10	-2	0	0	35
11	2	0	0	79
12	0	-2	0	88
13	0	2	0	43
14	0	0	-2	45
15	0	0	2	94

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

모형을 사용하였다.

여기서 y 는 초기 가수분해 속도(%)이며 X_1 , X_2 , X_3 는 각각 pH, 반응온도(°C), cosolvent 첨가량(%(v/v))이며 β_0 는 절편, β_n 은 회귀계수이다. 2차 회귀모형의 계수를 결정하기 위한 회귀 분석은 Statistical Analysis System(SAS)을 사용하여 분석하였다.

중심합성법에 의한 반응 표면 분석

중심합성법에서 제시되어 있는 각각의 실험점에서 얻은 3번의 반복 실험값의 산술평균치가 Table 3에 제시되어 있다. 독립 실험인자들인 pH, 온도 및 cosolvent 첨가량의 변화에 따른 (R)-styrene oxide의 초기 가수분해 속도의 변화 양상을 살펴보기 위하여 SAS 프로그램을 이용하여 실험결과를 분석하였다. 전체 9개의 total regression 분석에 대한 R^2 값이 0.9558($p < 0.05$) 정도로 5% 유의 수준 이내에서 유의성이 인정되어, (R)-styrene oxide의 초기 가수분해 속도는 pH, 온도 및 cosolvent의 영향을 받고 있음을 알 수 있었다. 세 가지 실험 인자들인 pH, 온도, cosolvent 첨가량의 값의 변화에 따른 (R)-styrene oxide의 초기 가수분해 속도에 대한 반응표면을 나타내주는 2차 회귀분석식을 아래와 같이 결정 할 수 있었다.

$$y = 104.227 + 12.1875X_1 - 8.3125X_2 + 7.9318X_3 + 1.8750X_1X_2 + 1.6250X_1X_3 + 2.8750X_2X_3 - 11.2784X_1^2 - 9.1534X_2^2 - 9.7841X_3^2$$

각각의 실험 인자들에 대한 F-ratio 값을 분석한 결과, pH의 F-ratio 값이 13.659($p < 0.01$)로 가장 높게 나타나 (R)-styrene oxide의 초기 가수분해 속도는 pH에 의해 가장 크게 영향을 받고 있음을 알 수 있었으며, 나머지 인자인 온도와 cosolvent 첨가량의 변화에 따른 영향은 각각 F-ratio 값이 7.576($p < 0.05$), 7.690($p < 0.05$)으로 나타나 유의수준 5% 이내에

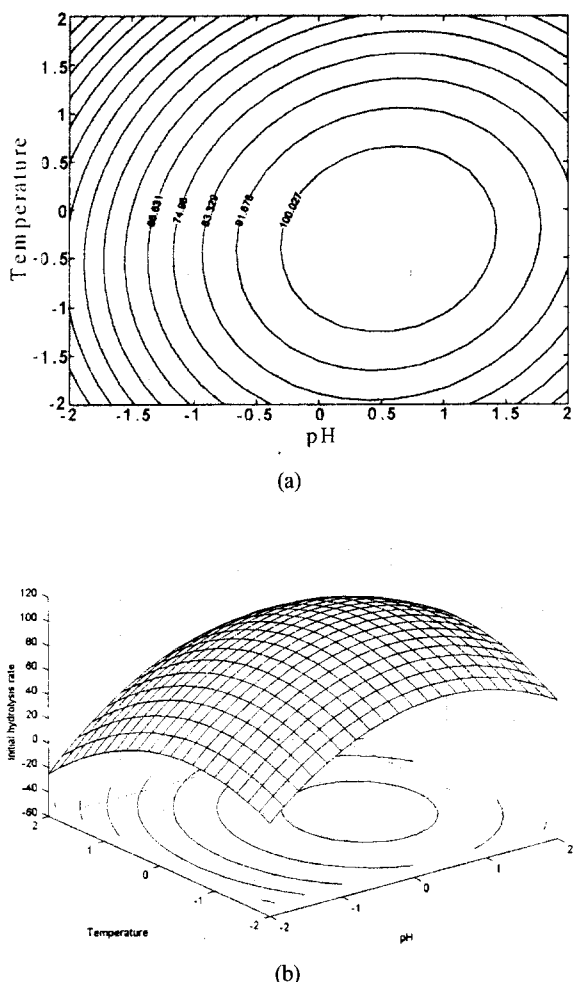


Figure 2. Contour plot (a) and 3-D response surface plot (b) of initial hydrolysis rates of (R)-styrene oxide as a function of pH and temperature.

서 모두 유의성을 인정받을 수 있었다. 반응표면 곡선에 대한 전반적인 모습과 추정된 stationary point 값이 최대치를 주는 지를 알아보기 위하여 canonical analysis를 실시하였다. 2차 곡선에 대한 행렬식의 eigenvalues 값들이 pH, 반응온도, cosolvent 첨가량에 대해 모두 음의 값들이 나와 반응표면이 위로 볼록한 곡면을 나타내어 최대점을 가지고 있음을 알 수 있었다.

실험인자들 중에서 (R)-styrene oxide의 초기 가수분해 속도에 상대적으로 적은 영향을 미치는 변수인 cosolvent 첨가량을 최적값인 2.4%(v/v)로 정한 후 pH 및 반응온도 변화에 따른 초기 가수분해 속도 변화에 대한 contour plot을 실시하였다. Figure 2 (a)에서와 같이 최적의 pH의 범위는 7.375 ~ 8.25 정도였고 온도 범위는 23.5 ~ 33.5°C 영역으로 결정되었다. 이와 같은 조건에서 얻을 수 있는 초기 가수분해 속도에 대한 3차원 반응표면은 Figure 2 (b)에서 제시되어 있다. 반응용액의 pH 변화에 따라 (R)-styrene oxide의 초기분해속도가 가장 큰 영향을 받는다는 사실로부터 효소 활성점에 있는 aspartic acid가 oxirane ring에 대해 친핵성 공격을 통한 효과적인 가수분해 반응을 위해서는 pH 조절이 매우 중요함을 알 수 있었다. Cosolvent 첨가량에 따른 (R)-styrene oxide

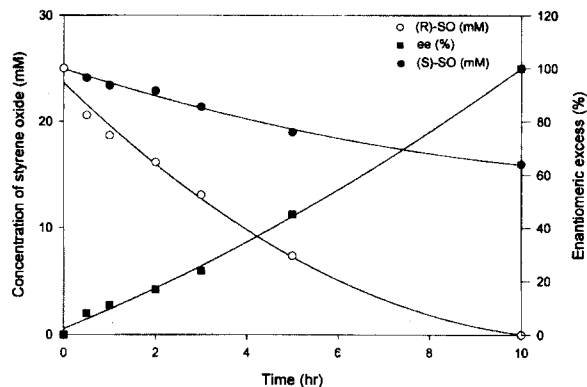


Figure 3. Microbial enantioselective hydrolysis for the production of (S)-styrene oxide using the epoxide hydrolase activity of *A. niger*.

의 초기 가수분해 속도가 그다지 크지 않은 영향을 받은 이유는 cosolvent 첨가에 따른 기질의 용해도 증가라는 긍정적 효과와 유기용매 첨가에 따른 생촉매 활성 저하 효과가 일정 부분 서로 상쇄되었기 때문으로 판단된다.

입체선택성 가수분해 반응을 이용한 (S)-Styrene Oxide 생산

실험인자인 pH, 반응온도, cosolvent 첨가량의 변화에 따른 (R)-Styrene Oxide의 초기 가수분해 속도 변화에 대한 반응표면이 최대치를 주는 임계점이 존재하였으므로 이 조건에서 *A. niger*의 epoxide hydrolase 활성을 이용한 입체선택적 가수분해 반응을 수행하면 효과적으로 (S)-styrene oxide를 생산할 수 있을 것이다. 반응표면 분석을 통해 결정된 최적조건인 pH 7.78, 온도 28.32°C 및 cosolvent 첨가량 2.40%(v/v)에서 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 광학분할 실험을 수행하였다(Figure 3). 반응용액의 pH가 7.8로 조절된 100 mM phosphate buffer 48.8 ml에 300 mg의 *A. niger* 건조분말, 1.2 ml의 DMSO 및 50.0 mM의 라세믹 styrene oxide 기질을 넣은 후 28°C, 250 rpm에서 교반하면서 입체선택적 가수분해 반응을 하였다. Figure 3에 제시되어 있는 것과 같이 약 10시간 정도의 반응을 통해 ee 값이 100%인 광학적으로 순수한 (S)-styrene oxide를 35% 정도(이론수율 = 50%)의 높은 수율로 얻을 수 있었다. 본 연구에서 얻은 입체선택적 가수분해 조건 최적화 결과들은 *A. niger* 등의 미생물 유래의 epoxide hydrolase 활성을 이용한 고부가가치의 광학활성 에폭사이드 중간체 제조를 위한 반응기 시스템 개발 등에 응용될 수 있을 것이다.

요약

에폭사이드 가수분해효소 활성이 우수한 *Aspergillus niger*를 생촉매로 이용하여 입체선택적 가수분해 반응을 통해 라세믹 styrene oxide 기질로부터 광학활성 (S)-styrene oxide를 생산하는 실험을 수행하였다. (R)-styrene oxide 이성질체에 대한 초기 가수분해 속도에 영향을 주는 실험인자들인 pH, 반응온도, cosolvent 첨가량 등에 대해 중심합성계획법을 이용한 반응표면 분석을 통해 가수분해반응 속도를 향상시킬 수 있는 최적 반응조건을 결정하였다. pH 7.78, 반응온도

28.32℃ 및 cosolvent 첨가량 2.4%(v/v)의 조건에서 약 10시간 정도의 반응을 통해 ee 값이 100%인 광학적으로 순수한 (*S*)-styrene oxide를 35% 정도(이론수율 = 50%)의 높은 수율로 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 1999년도 한국학술진흥재단의 신진교수 연구(과제번호 KRF-99-003-E00465)의 지원으로 수행된 연구결과이며, 이에 감사 드립니다. Chiral GC 분석 및 반응 표면분석 관련 실험을 도와준 배현철 학생에게 감사드립니다.

REFERENCES

- Sheldon, R. A. (1996), *Chirotechnology*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Collins, A. N., G. N. Sheldrake, and J. Crosby (1992), *Chirality in industry*, John Wiley & Sons, New York.
- Besse, P. and H. Veschambre (1994), Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
- Gao, Y., R. M. Hanson, J. M. Klunder, S. Y. Ko, H. Masamune, and K. B. Sharpless (1987), Catalytic asymmetric epoxidation and kinetic resolution : Modified procedures including *in situ* derivatization, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5765-5780.
- Tokunaga, M., J. F. Larrow, F. Kakiuchi, and E. N. Jacobsen (1997), Asymmetric catalysis with water : Efficient kinetic resolution of terminal epoxides by means of catalytic hydrolysis, *Science* **277**, 936-938.
- Leak, D. J., P. J. Aikens, and M. Seyed-Mahmoudian (1992), The microbial production of epoxides, *TIBTECH* **10**, 256-261.
- Mahmoudian, M. and A. L. O. Michael (1992), Biocatalysts for production of chiral epoxides, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 23-27.
- Weijers C. A. G. M., A. de Haan, and J. A. M. de Bont (1988), Chiral resolution of 2,3-epoxy alkanes by *Xanthobacter* Py2, *Appl. Microbiol. Biotech.* **27**, 337-340.
- Lee, E. Y., W. J. Choi, S. J. Yoon, H. S. Kim, and C. Y. Choi (1999), Biocatalytic production of chiral epoxides. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 291-296.
- Habets-Crutzen, A. Q. H., J. J. N. Carlier, J. A. M. de Bont, D. Wistuba, V. Schurig, S. Hartmans, and J. Tramper (1985), Stereospecific formation of 1,2-epoxypropane, 1,2-epoxybutane and 1-chloro-2,3-epoxypropane by alkene-utilizing bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* **7**, 17-21.
- Small, F. J., J. K. Tilley, and S. A. Ensign (1995), Characterization of a new pathway for epichlorohydrin degradation by whole cells of *Xanthobacter* strain Py2, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1507-1513.
- Choi, W. J., E. C. Huh, H. J. Park, E. Y. Lee, and C. Y. Choi (1998), Kinetic resolution for optically active epoxides by microbial enantioselective hydrolysis, *Biotechnol. Techniques* **12**, 225-228.
- Yoon, S. J., S. K. Song, M. J. Lee, D. Y. Jeong, H. S. Kim, D. S. Kim, and E. Y. Lee (2000), Production of tetrodotoxin using novel marine microorganism isolated from intestine of pufferfish, *Korean J. Life Science* **10**, 196-201.
- Yoon, S. J., B. D. Ye, S. H. Park, and E. Y. Lee (2000), Optimization of cometabolic trichloroethylene degradation conditions by response surface analysis, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 393-397.
- Gontard, N., S. Guilbert, and J. L. Cuq (1992), Edible wheat gluten films ; Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.* **57**, 190-196.
- Faber, K., M. Mischitz, and W. Kroutil (1996), Microbial epoxide hydrolases, *Chemica Scandinavica* **50**, 249-258.
- Choi, W. J., E. Y. Lee, S. J. Yoon, S. -T. Yang, and C. Y. Choi (1999), Biocatalytic production of chiral epichlorohydrin in organic solvents. *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 339-341.