

## 미생물 에폭사이드 가수분해효소 활성을 이용한 유기용매에서의 광학활성 *para*-Nitrostyrene Oxide 생산

배현철 · 김현숙 · 이수정 · 이은열 · 양승택 · 김희숙\*

경성대학교 공과대학 식품공학과

### Enantioselective Resolution for the Preparation of Chiral *para*-Nitrostyrene Oxide by Microbial Epoxide Hydrolase in an Organic Solvent

Hyun Chul Bae, Hyun Sook Kim, Soo Jung Lee, Eun Yeol Lee, Seung-Taek Yang and Hee Sook Kim\*

Department of Food Science and Technology, College of Engineering,  
Kyungshung University, Busan 608-736, Korea

#### Abstract

Enantioselective resolution of racemic *para*-nitrostyrene oxide was investigated using epoxide hydrolase activity of *Aspergillus niger* LK for the production of optically pure (*S*)-*para*-nitrostyrene oxide. To overcome the poor solubility of the substrate, enantioselective hydrolysis in an organic solvent was attempted under optimized reaction conditions including reaction temperature and water content. (*S*)-*para*-Nitrostyrene oxide with high optical purity (> 99% ee) was obtained at 37 % yield using fungal epoxide hydrolase-catalyzed enantioselective resolution.

**Key words** – epoxide hydrolase, *para*-nitrostyrene oxide, enantioselective resolution, organic solvent, *Aspergillus niger*

#### 서 론

대부분의 생리활성물질들은 여러 종류의 광학이성질체(optical enantiomer)가 존재하는데, 이들 이성질체 중 특정 이성질체만이 원하는 생리활성을 보여주는 반면 나머지 이성질체들은 부작용을 주는 경우가 많다[7]. 광학이성질체들의 생리활성 차이가 존재함에 따라 FDA는 신규의약품의 경우 각각의 광학이성질체에 대한 별도의 임상 실험을 요구하고 있어 광학적으로 순수한 형태의 생리활성물질 합성에 대한 많은 관심이 증대되고 있다. 또한, 신약뿐만 아

니라 기존의 라세믹 의약품도 광학적으로 순수한 형태로 다시 제조·판매하려는 시도가 활발히 진행되고 있다[4].

광학적으로 순수한 생리활성물질을 합성하기 위한 중간체로 광학활성 에폭사이드(chiral epoxide)가 널리 사용되고 있다[1]. 한 예로써, 본 연구의 대상물질인 *para*-nitrostyrene oxide (*p*-NSO)는  $\beta$ -adrenergic blocker인 Nifenalol<sup>®</sup> 등의 합성에 사용되는 고부가가치 광학활성 중간체이다. 생축매를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조법으로 라세믹 에폭사이드 기질을 에폭사이드 가수분해효소(epoxide hydrolase, EH)를 이용하여 특정 이성질체만을 선택적으로 가수분해시켜 제거시켜줌으로써 광학적으로 순수한 에폭사이드 중간체를 얻는 방법이 있다[5]. EH는 반응에서 cofactor를 요구하지 않으며, 일반적으로 유도과정을 거치지 않아도 효

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 82-51-620-4713, Fax : 82-51-622-4986  
E-mail : hskim@star.ksu.ac.kr

소가 효율적으로 발현되며 안정된 구조를 가지고 있어 상업적으로 많은 장점을 가지고 있다[8]. 라세믹 에폭사이드에 대한 입체선택적 가수분해(enantioselective hydrolysis) 반응에서 예상되는 기술적 문제점 중에 하나는 일반적으로 에폭사이드 기질이 수용액에 대한 용해도가 낮아 단순 수용액상에서는 생산성 향상이 어렵다는 문제점이 있다[3]. 이러한, 문제점과 관련하여 친수성 유기용매를 cosolvent로 사용한 연구 결과보고는 있었으나 [6], 유기용매 자체에서의 *p*-NSO 기질에 대한 입체선택적 가수분해반응에 대한 연구보고는 없다. 따라서, 본 논문에서는 방향족 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해능이 우수한 *Aspergillus niger* LK의 EH 활성을 이용하여 소수성 유기용매상에서의 라세믹 *p*-NSO에 대한 입체선택적 가수분해 반응에 대하여 평가해보았다.

## 재료 및 방법

### 미생물 배양 조건

*A. niger* LK 포자를 액체배지(glucose 10 g/L, corn-steep liquor 20 g/L)에 접종하여 27°C, 250 rpm에서 3일간 배양하였다. 균체를 4°C에서 3일간 건조시켜 얻은 *A. niger* LK 건조분말을 생촉매로 사용하였다.

### EH 활성을 이용한 입체선택적 가수분해 반응

본 연구에서 사용한 *p*-NSO는  $\omega$ -bromo-*para*-nitroacetophenone으로부터 문헌에 제시되어 있는 방법을 이용하여 합성하였다[9]. 수용액에서의 입체선택적 가수분해 반응은 *A. niger* LK 건조분말 50 mg과 4 mM의 라세믹 *p*-NSO 기질을 1 ml의 50 mM 인산완충액(pH 8.0)에 현탁시킨 후 30°C, 250 rpm에서 교반하면서 반응을 진행하였다. 반응 후 에폭사이드를 cyclohexane으로 추출한 후, 유기용매 층을 GC로 분석하여 enantiomeric excess (ee =  $\frac{(S-R)}{(S+R)} \times 100(\%)$ ) 값과 수율을 결정하였다. 유기용매상에서의 반응은 20 mM *p*-NSO, 100 mg의 *A. niger* LK 건조분말 및 적절한 양의 물을 첨가한 후 같은 조건에서 반응을 진행하였다.

### 유기용매 선정

*A. niger* LK의 EH 활성 저하가 가장 적은 유기용매를

선정하기 위하여 여러종류의 유기용매에 4 mM *p*-NSO과 50 mg의 *A. niger* LK 건조분말 및 2 % (v/v)의 DDW (distilled & deionized water)을 넣은 후 초기 30분간의 분해속도를 측정하여 가장 높은 활성을 주는 유기용매를 선정하였다.

### 온도 및 water content의 영향

유기용매상의 반응에 있어서 water content 영향은 위와 같은 조건에서 0, 1, 2, 3, 5, 10 % (v/v)의 DDW를 각각 공급한 후 초기 30분간의 분해속도를 측정하여 평가하였고, 반응온도는 같은 조건에서 20, 25, 30, 35, 40°C에서 각각 초기 30분간의 분해속도를 측정하여 평가하였다.

### Gas chromatography 분석

*p*-NSO 정량분석을 위하여 (*R*)-이성질체와 (*S*)-이성질체에 대한 분리능이 있는  $\beta$ -Dex 120 (Supelco Co., USA; 0.25 mm ID, 30 m length, 25  $\mu$ m film thickness) 컬럼을 사용하였으며, GC 조건은 문헌치를 이용하였다[10].

## 결과 및 고찰

### 유기 용매의 선정

일반적으로 방향족 에폭사이드 기질은 소수성 분자구조로 인하여 수용액에서의 용해도가 낮은 편이다. 따라서, 수용액상에서의 *p*-NSO에 대한 입체선택적 가수분해반응은 초기농도 4 mM에서 반응을 실시하였다. Fig. 1과 같이 약

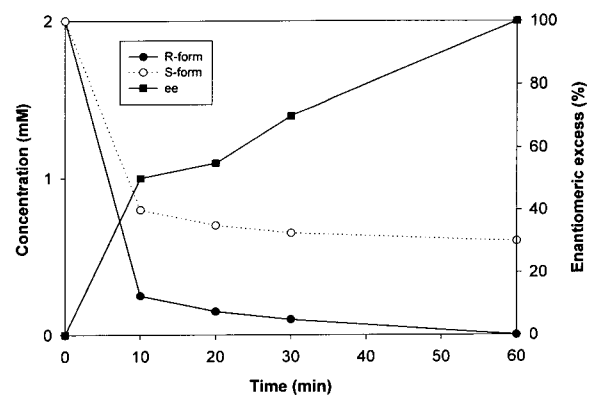


Fig. 1. Enantioselective resolution of 4 mM racemic *para*-nitrostyrene oxide by epoxide hydrolase activity of *A. niger* LK in 50 mM phosphate buffer.

1시간 정도의 반응을 통해 ee 값이 100 %인 광학적으로 순수한 (S)-*p*-NSO를 30 % 정도(이론수율 = 50 %)의 수율로 얻을 수 있었다. 생촉매를 이용한 회분식 생물전환공정의 생산성 향상을 위해서는 초기 기질 농도 증가가 필요한데, *p*-NSO의 경우 수용액에 대한 높은 용해도를 기대하기 어렵기 때문에 유기용매에서의 입체선택적 가수분해 반응을 고려해 볼 수가 있다. 또한, 일반적으로 삼각링 구조의 에폭사이드는 불안정한 구조로 인하여 수용액에서 자발적 분해가 일어날 수 있으므로 수율 저하 및 광학순도 저하가 일어날 수 있는데, 이러한 문제점도 유기용매 사용을 통해 해결할 수 있을 것으로 기대할 수 있다[3].

친수성 유기용매를 cosolvent로 사용하여 수용액에서의 *p*-NSO의 용해도를 증가시켜 입체선택적 가수분해 반응을 수행한 연구결과는 있으나, 소수성 유기용매 자체를 반응 용매로 사용한 연구 결과는 보고되지 않았다. 친수성 유기용매는 cosolvent로의 사용은 효과적이거나, 단일 친수성 유기용매만을 사용하는 경우 급격한 EH 활성 저하가 일어나 효율적인 입체선택적 가수분해 반응을 기대하기가 어렵다[2]. 따라서, 본 논문에서는 소수성 유기용매를 대상으로 EH에 대한 활성 저해 효과가 가장 적은 유기용매를 선발하기 위하여 여러 종류의 유기용매에서 라세믹 *p*-NSO에 대한 가수분해 반응을 시도하였다(Table 1). 대조군으로 50 mM 인산 완충용액에서의 반응을 고려하였으며, Table 1에서와 같이 생촉매 활성은 decane, dodecane 등에서 비교적 높은 활성을 보임을 알 수 있었다. Dodecane의 경우 수용액 대비 약 57% 수준의 활성을 보여주어 유기용매로 선택하였다.

Table 1. Epoxide hydrolase activity of *A. niger* LK in various organic solvents

Organic solvent	Relative rate <sup>a</sup>
None <sup>b</sup>	100
Hexane	37
Cyclohexane	36
Octane	42
Decane	48
Dodecane	57

<sup>a</sup>Relative enantioselective hydrolysis rates in organic solvents to an aqueous solvent.

<sup>b</sup>Enantioselective resolution was performed in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) without organic solvents.

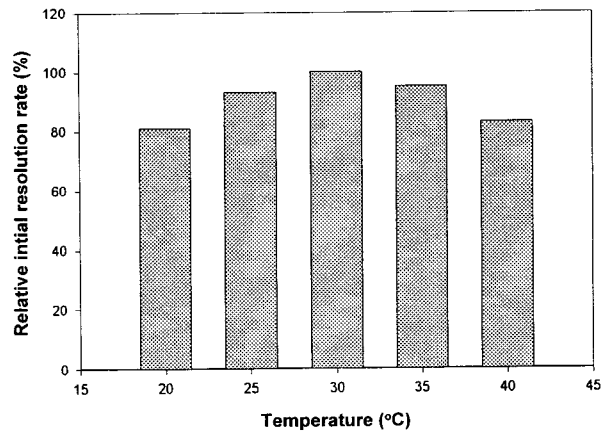


Fig. 2. Effects of temperatures on the enantioselective resolution of racemic *para*-nitrostyrene oxide by *A. niger* LK.

#### 온도 및 water content의 영향

유기용매에서 라세믹 *p*-NSO에 대한 입체특이성 가수분해 반응에 대한 최적 온도를 결정하기 위하여 20 - 40°C의 온도 구간에서 초기 30분간의 가수분해 속도를 측정하였다. Fig. 2와 같이 최적 온도는 30°C 부근임을 알 수 있었고, 가장 낮은 가수분해 속도를 준 20°C 대비 약 20% 정도 효율이 높음을 알 수 있었다. EH 활성을 이용한 라세믹 에폭사이드에 대한 입체선택적 가수분해 반응에서는 물 자체가 반응물로 사용되기 때문에 적절한 양의 물을 첨가해 주어야 한다. 최적 water content를 결정하기 위하여, 0~10% (v/v)의 범위에서 DDW를 첨가한 후 초기 가수분해 속도를 측정된 결과, 약 2% (v/v)에서 상대적으로 가장 높은 광학적 순도 및 수율을 얻을 수 있었다(data not shown).

#### 입체선택적 가수분해 반응을 이용한 (S)-*para*-nitrostyrene oxide 생산

실험을 통해 결정한 최적조건인 반응온도 30°C, DDW 첨가량 2% (v/v)에서 dodecane을 반응용매로 사용하여 라세믹 *p*-NSO에 대한 입체선택적 가수분해를 실시하였다. 수용액에서의 초기농도 4 mM 보다 높은 20 mM의 라세믹 기질에 100 mg의 *A. niger* 건조분말, 2% (v/v)의 DDW를 첨가한 후 30°C, 250 rpm에서 교반하면서 반응을 진행하였다. Fig. 3에서와 같이 약 10시간 정도의 반응을 통해 ee 값이 100%인 광학적으로 순수한 (S)-*p*-NSO를 37% 정도(이론수율 = 50%)의 높은 수율로 얻을 수 있었다. 일반적인

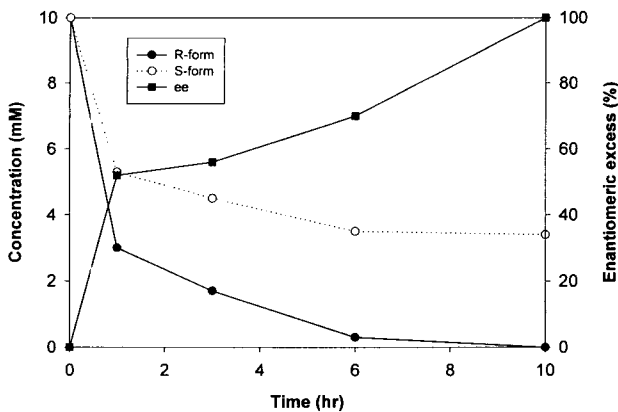


Fig. 3. Enantioselective resolution of 20 mM racemic *para*-nitrostyrene oxide by *A. niger* LK in dodecane.

로 동력학적 분할반응에서 수율은 반응시간이 길어질수록 낮아지는데, 유기용매에서 반응을 진행하는 경우 수용액보다 반응시간이 길어졌음에도 불구하고 수율이 오히려 증가한 결과를 얻을 수 있었다. 이는 유기용매에서의 기질 안정성이 증가되었기 때문으로 판단된다. 따라서, 이러한 유기용매에서의 방향족 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응은 미생물 유래의 EH 활성을 이용한 고부가가치의 광학활성 에폭사이드 중간체 제조를 위한 반응 시스템으로 활용될 수 있을 것이다.

## 요 약

방향족 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해 활성이 우수한 *Aspergillus niger* LK를 이용하여 광학활성 (*S*)-*para*-nitrostyrene oxide를 제조하였다. 수용액에서 기질의 낮은 용해도를 극복하기 위하여 유기용매에서 광학분할 반응을 수행하였으며, 생축매 활성 저하가 가장 적은 dodecane을 유기용매로 선정하였다. 반응온도 30°C 및 최적 water content 2% (v/v)의 조건에서 약 10시간 정도의 반응을 통해 ee 값이 100%인 광학적으로 순수한 (*S*)-*para*-nitrostyrene oxide를 37% 정도(이론수율 = 50%)의 높은 수율로 얻을 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 2001년 경성대학교 교비연구지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고 문헌

- Besse, P. and H. Veschambre. 1994. Chemical and biological synthesis of chiral epoxides. *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
- Choi, W. J., Choi, C. Y., J. A. M. de Bont and C. A. G. M. Weijers. 2000. Continuous production of enantiopure 1,2-epoxyhexane by yeast epoxide hydrolase in a two-phase membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 641-646.
- Choi, W. J., E. Y. Lee, S. J. Yoon and C. Y. Choi. 1999. Biocatalytic production of chiral epichlorohydrin in organic solvent. *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 339-341.
- Collins, A. N., G. N. Sheldrake and J. Crosby. 1992. Chirality in industry. John Wiley & Sons, New York.
- Lee, E. Y., W. J. Choi, S. J. Yoon, H. S. Kim and C. Y. Choi. 1999. Biocatalytic production of chiral epoxides. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 259-264.
- Morisseau, C., H. Nellaiah, A. Archelas, R. Furstoss and J. C. Baratti. 1997. Asymmetric hydrolysis of racemic *para*-nitrostyrene oxide using an epoxide hydrolase preparation from *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 446-452.
- Sheldon, R. A. 1993. Chirality. Marcel Dekker, New York.
- Steinreiber, A. and K. Faber. 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations. *Current Opinion in Biotechnol.* **12**, 552-558.
- Westkaemper, R. B. and R. P. Hanzlik. 1980. A convenient reverse-phase liquid chromatographic assay for epoxide hydrolase. *Anal. Biochem.* **102**, 63-67.
- Yoon, S. J. and E. Y. Lee. 2000. Production of chiral styrene oxide by microbial enantioselective hydrolysis reaction. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 630-634.

(Received May 23, 2002; Accepted July 31, 2002)