

미생물 유래의 Epoxide Hydrolase를 이용한 Chiral Styrene Oxide 생산용 비대칭 광학분할시스템개발

이지원 · 윤여준¹ · 이은열^{*}

경성대학교 공과대학 식품공학과, ¹울산대학교 공과대학 화학공학과

Development of Asymmetric Resolution System for the Production of Chiral Styrene Oxide by Microbial Epoxide Hydrolase

Ji Won Lee, Yeo Joon Yoon¹ and Eun Yeol Lee^{*}

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

¹School of Chemical Engineering and Bioengineering, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

Abstract

Asymmetric enantioselective resolution system using epoxide hydrolase activity of *Aspergillus niger* LK was developed and operated for the production of optically pure styrene oxide. Two-phase hollow-fiber reactor system was employed for the enhanced solubility of racemic styrene oxide in organic phase and protection of epoxide hydrolase activity in aqueous phase. For the removal of phenyl-1,2-ethandiol, the inhibitor of epoxide hydrolase, cascade hollow-fiber reactor system was also developed. Chiral (S)-styrene oxide (39 mM in dodecane) could be asymmetrically resolved with high enantiopurity (> 99% ee) using these reactor system.

Key words – asymmetric resolution, hollow-fiber reactor, chiral styrene oxide, *Aspergillus niger* LK

서 론

고부가가치 키랄 의약품 및 농약 등 광학적으로 순수한 형태의 화합물을 보다 효율적으로 합성하기 위하여 사용되는 광학활성 중간체(chiral intermediate) 제조 기술 개발이 활발히 진행되고 있다. 다양한 반응성 및 광학활성으로 인하여 합성전구체로서 가치가 높은 chiral styrene oxide는 친핵성 반응, 친전자성 반응, 산·염기반응 등 다양한 반응

을 유도할 수 있어 상업적 유용성이 크다[1].

Chiral styrene oxide는 cobalt-based salen 키랄촉매를 이용한 화학적 분할법 등의 유기합성 방법과 미생물 유래의 monooxygenase 활성을 이용하여 올레핀 기질에 대한 에폭시화(epoxidation)반응을 통해 제조할 수 있다[7]. 미생물을 생촉매로 이용하여 chiral styrene oxide를 제조하는 또 다른 방법으로는 라세믹 에폭사이드 기질에 대해 특정 이성질체만을 선택적으로 가수분해시키는 에폭사이드 가수분해 효소(epoxide hydrolase)를 이용한 비대칭 분할법(asymmetric resolution)이 있다[8,9]. 이 방법은 라세믹 styrene oxide와 같은 저가의 기질을 사용하는 경우 상업적으로 유

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-51-620-4716, Fax : 82-51-622-4986
E-mail : eylee@star.ksu.ac.kr

용하다. Epoxide hydrolase를 이용한 비대칭적 분할 공정에서의 가장 큰 문제점은 에폭사이드 기질 자체의 우수한 반응성으로 인하여 자발적 가수분해가 일어나 수율 저하가 일어날 수 있으며, 또한, 소수성 구조로 인하여 수용액에 대한 용해도가 작아 volumetric productivity를 높이는 데 어려움이 있다[4,5].

에폭사이드 기질의 수용액상에서의 불안정성과 낮은 용해도 문제는 유기용매를 사용함으로써 극복할 수 있다[5]. 유기용매 사용은 미생물의 epoxide hydrolase 활성 저하를 유발시킬 수 있으므로 이에 대한 해결책이 요구되는데, 이러한 문제점을 극복하기 위하여 수용액상에 생촉매를 두고 유기용매상에 기질을 위치시킨 2상계 hollow-fiber 반응기 시스템을 이용할 수 있다[2,3,6]. Hollow-fiber 막을 중심으로 lumen 부위에는 기질을 포함한 유기용매를 이동시키고 미생물 생촉매는 shell 부위의 수용액상에 위치시킴으로써, 위에 언급된 상반된 문제점을 극복할 수 있다. 이러한 기존의 연구들에서는 상업적 의미가 다소 약한 chiral 1,2-epoxyhexane, chiral 1,2-epoxy-7-octene 등을 모델 화합물로 사용한 연구 결과들만을 보여주고 있어, 본 연구에서는 상업적으로 유용한 chiral styrene oxide를 제조하기 위하여 *Aspergillus niger* LK의 epoxide hydrolase 활성 기반의 비대칭 분할 시스템을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

A. niger LK 포자를 1%(w/v) glucose, 2%(w/v) corn-steep liquor가 포함된 배지에 접종한 후 진탕배양기를 이용하여 교반속도 250rpm, 온도 27°C에서 3일간 배양하였다. 배양액을 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)로 세척하고 4°C에서 3일간 건조시킨 후 균체를 미세 분말로 제조하여 생촉매로 사용하였다.

유기 용매의 선정

Epoxide hydrolase 활성 저하를 가장 적게 줄 수 있는 유기용매를 선정하기 위하여 여러 종류의 유기용매상에서 라세믹 styrene oxide에 대한 비대칭 광학분할반응을 실시하였다. 유기용매 0.3 ml에 1 g의 균체 분말을 넣고 50 mM

potassium phosphate buffer (pH 8.0)로 전체 용량을 1 ml로 만든 후 20 mM 농도로 라세믹 styrene oxide를 첨가하였다. 30°C, 200 rpm 조건의 진탕배양기에서 반응을 수행하였으며, 유기용매층을 GC로 분석하였다.

비대칭 분할 반응기 시스템 구성

Regenerated cellulose로 제조된 hollow-fiber (Alwell, Gambro, Germany)를 사용하여 비대칭 분할 시스템을 구성하였다(Fig. 1). 생촉매 미세분말을 포함한 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0, 170 ml)를 water bath로 30°C로 유지시키면서 Masterflex pump를 이용하여 80 ml/min의 속도로 hollow-fiber membrane의 shell side를 통해 순환시켰다. 라세믹 styrene oxide 기질은 50 ml의 dodecane에 녹인 후 hollow-fiber membrane의 lumen 부위에서 counter-current로 50 ml/min의 속도로 순환시켰다. 비대칭 분할반응에서 생기는 phenyl-1,2-ethanediol에 의한 epoxide hydrolase 활성 저하를 막기 위하여 두번째 hollow-fiber를 부착한 cascade 형 비대칭 분할반응기를 구성하였다 (Fig. 2). Phenyl-1,2-ethanediol을 추출하기 위한 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0, 200 ml)는 두번째 hollow-fiber membrane의 lumen 부위로 흘려주면서 세포 현탁액에 포함되어 있는 diol을 추출하여 제거할 수 있도록 구성하였다. 광학활성 styrene oxide의 광학순도 및 수율은 유기용매상의 샘플 100 µL를 채취하여 chiral GC로 분석하였다.

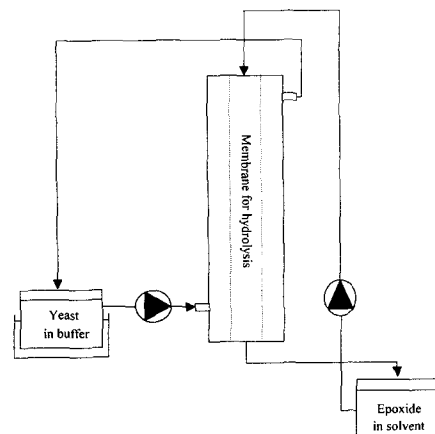


Fig 1. Schematics of aqueous/organic hollow-fiber reactor for asymmetric resolution of racemic styrene oxide

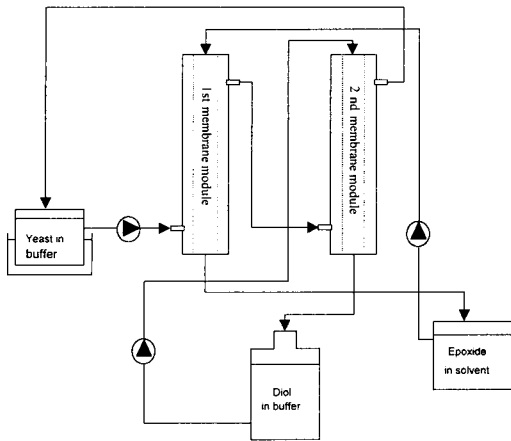


Fig. 2. Schematics of cascade aqueous/organic hollow-fiber reactor for asymmetric resolution of racemic styrene oxide

GC 분석

Chiral styrene oxide의 *ee* (enantiomeric excess = [(S-R)/(S+R)]x100 %) 값 및 수율은 불꽃이온 검출기(FID)가 장착된 가스크로마토그래프(Shimadzu GC-17A, Japan)를 사용하여 결정하였다. Silica cyclodextrin capillary β -DEX 120 (30 m length, 0.25 mm ID, and 0.25 μ m film thickness) column을 사용하였으며, 분석조건은 기존 문헌치를 이용하였다[10].

결과 및 고찰

유기용매 반응시스템 개발 필요성

라세믹 styrene oxide 기질은 소수성 분자구조로 인하여 수용액상에 대한 용해도가 낮은 편이다. 또한, 수용액상에서는 용매인 물분자 자체가 친핵성 반응을 유도하여 styrene oxide 기질에 대한 단순 가수분해 반응이 일어나 수율을 저하시킬 수 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위한 방법으로 유기 용매에서의 비대칭 광학분할 반응을 이용할 수 있으며, 기질의 용해도 증가 및 styrene oxide 기질의 안정화를 통해 생산성 향상을 기대할 수 있다. 그러나, 많은 경우에 있어서 유기용매 자체가 epoxide hydrolase의 활성을 저해시키는 단점이 있으므로 이를 극복할 수 있는 방법 개발이 요구되고 있다.

유기용매 스크리닝

우선 epoxide hydrolase에 대한 활성 저해 효과가 가장 적은 유기용매를 선별하기 위하여 여러 종류의 친수성 및

소수성 유기용매들을 이용하여 라세믹 styrene oxide에 대한 비대칭 광학분할 반응을 실시하였다 (Table 1). 50 mM Phosphate buffer에서의 반응을 대조군으로 사용하였으며, 수용액과 섞이지 않는 유기용매를 30 % (v/v) 비율로 혼합한 2성분 반응용매 시스템에서 비대칭 분할 반응을 진행하였다. Table 1에 제시되어 있는 결과와 같이 유기용매의 소수성을 나타내주는 logP 값이 3이상인 유기 용매의 경우 수용액상에서의 반응 대비 37% 이상의 epoxide hydrolase 활성을 보여주었으나, logP 값이 3이하에서는 수용액상 반응 대비 30% 이하의 수준을 보여주었다. 이러한 결과들로부터 유기용매상에서의 epoxide hydrolase 활성은 사용한 유기용매의 구조와 극성에 따라 많은 활성 차이를 보여줄 수 있었다. 유기용매 및 수용액 2성분 시스템에서의 epoxide hydrolase 활성은 decane, dodecane 등의 소수성 유기용매에서의 활성이 dimethylformamide, diethylsulfoxide 등과 같은 극성용매에 비해 높은 활성을 보임을 알 수 있었다. 특히 유기용매 중 가장 높은 epoxide hydrolase 활성을 유지시켜준 dodecane의 경우 수용액 대비 약 51 % 수준의 활성을 보여주어 비대칭 분할용 hollow-fiber 반응기 시스템 개발에 사용할 유기용매로 선정하였다.

Hollow-fiber membrane을 이용한 비대칭 분할 시스템 개발

유기용매 및 수용액으로 구성된 2성분계에서 생촉매를

Table 1. Asymmetric resolution rate of styrene oxide in various organic solvents by *A. niger* LK^a

Organic solvent	log P	Reaction rate ^b
None ^c	-	104
Pentan	3.0	39.8
Cyclohexane	3.2	36.7
Octane	4.5	43.2
Decane	5.6	46.6
Dodecane	6.6	51.8
Diethyether	0.9	6.9
Methanol	-0.8	13.5
Dimethylformamide	-1.0	24.4
Dimethylsulfoxide	-1.3	33.5

^aHydrolysis reactions were performed in solvent systems containing 0.3(v/v) organic solvent.

^bRelative values of enantioselective hydrolysis rate of (*R*)-styrene oxide compared to hydrolysis rate in aqueous buffer.

^cEnantioselective hydrolysis in aqueous buffer.

이용한 비대칭 분할반응을 수행하는 경우, 유기용매 사용에 따른 기질 농도 증가 및 기질 안전성 향상이라는 장점이외에 유기용매 사용으로 인한 생촉매활성 감소가 동시에 존재함으로써 이러한 상반된 문제점을 동시에 극복하기 위하여 epoxide hydrolase 활성을 가진 미생물 생촉매가 있는 수용액층과 styrene oxide 기질이 녹아있는 유기용매층을 막으로 분리한 상태에서 가장 효율적인 styrene oxide 물질전달을 기대할 수 있는 hollow-fiber membrane을 이용한 비대칭 분할 시스템을 개발하기로 하였다. 무극성의 유기용매가 생촉매가 있는 수용상으로 확산되어 들어와 epoxide hydrolase 활성을 저하시키는 현상을 예방하고, 또한, 유기용매 결손으로 인한 비대칭 분할 반응의 수율 저하를 방지하기 위하여 hollow-fiber membrane의 재질은 친수성 성질을 가진 regenerated cellulose를 사용하였다.

라세믹 styrene oxide에 대한 비대칭 광학분할 반응을 위해 구성된 수용액과 유기용매 2성분 hollow-fiber membrane 반응기 시스템이 Fig. 1에 제시되어 있다. 생촉매로 사용한 epoxide hydrolase 활성이 우수한 *A. niger* 세포는 100 mM phosphate 완충용액(pH 8.0)에 현탁시켜 hollow-fiber의 shell 부위를 통과하면서 lumen 부위에서 공급되는 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 하였다. Fig. 3에서와 같이 100 mM 농도의 기질에 대하여 약 8 시간의 반응기 운전을 통해 광학순도 100% 수준의 chiral styrene oxide를 제조할 수 있음을 알 수 있었다.

이러한 비대칭 분할 시스템에서는 가수분해 반응 산물

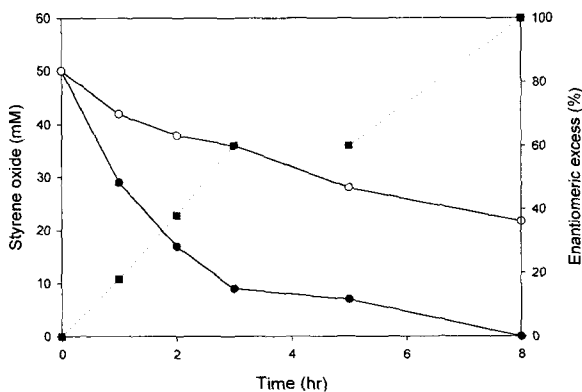


Fig 3. Asymmetric resolution of racemic styrene oxide in an aqueous/organic hollow-fiber reactor system ((R)-styrene oxide (●), (S)-styrene oxide (○), enantiomeric excess (■))

인 phenyl-1,2-ethanediol에 의해 epoxide hydrolase 활성이 저하되는 현상으로 인하여 보다 높은 기질 농도에서는 효율적인 결과를 보여주지 못하였다 (data not shown). 따라서, 수용액상에 존재하는 diol 부산물을 추출 제거하기 위하여 2번째 hollow-fiber 반응기를 연결한 cascade형 시스템을 사용하여 200 mM 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 비대칭 분할 반응을 실시하였다. 첫 번째 반응기에서 생촉매를 포함한 수용액상은 두 번째 hollow-fiber의 lumen 부위를 통과하게 되며, 이때 반응 생성물로서 생촉매 활성 저해 작용을 하는 diol은 shell 부위를 흐르는 diol 추출용 완충용액에 의해 추출 제거된다 (Fig. 2).

고농도의 라세믹 에폭사이드에 대한 비대칭 분할을 위해 구성된 cascade형 hollow-fiber 시스템을 이용하여 200 mM의 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 epoxide hydrolase 활성을 이용한 입체선택적 가수 분해 반응을 수행하였다. 8시간 정도의 반응을 통해 광학적으로 순수한 (ee > 99%) (S)-styrene oxide를 19.5% (이론 수율 대비 39%)의 수율로 얻을 수 있었다 (Fig. 4). 따라서, cascade형 hollow-fiber 반응기 시스템은 단순 수용액상에서 epoxide hydrolase 활성을 이용한 입체선택적 가수분해 반응에서의 문제점들을 극복할 수 있는 비대칭 분할 시스템으로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

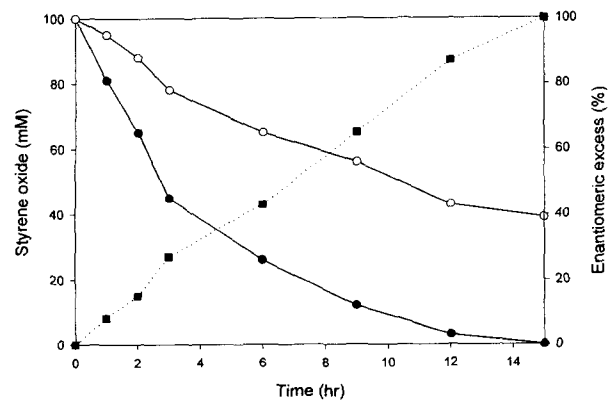


Fig 4. Asymmetric resolution of racemic styrene oxide in a cascade aqueous/organic hollow-fiber reactor system ((R)-styrene oxide (●), (S)-styrene oxide (○), enantiomeric excess (■))

요 약

Apergillus niger LK의 epoxide hydrolase 활성을 이용하

여 chiral styrene oxide를 제조할 수 있는 hollow-fiber 반응기 기반의 비대칭 분할 시스템을 개발하였다. 라세믹 styrene oxide 기질을 dodecane 유기용매에 용해시켜 hollow-fiber 반응기의 lumen 부위로 공급하였으며, 생촉매인 *A. niger* LK 미세분말은 shell 부위로 공급함으로써 막 표면에서 비대칭 분할 반응을 수행하였다. 반응 산물로 생성되는 phenyl-1,2-ethandiol에 의한 epoxide hydrolase 활성 저해효과를 감소시키기 위하여 2번째 hollow-fiber 반응기에서 완충용액을 이용하여 diol을 추출하여 제거시켰다. 2성분 용매를 사용한 cascade형 hollow-fiber 반응기 시스템을 이용하여 광학적으로 순수한 (ee > 99%) (S)-styrene oxide를 19.5% (이론 수율 대비 39%)의 수율로 얻을 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 한국학술진흥재단의 선도과제 (과제번호: KRF-2000-041-E00373) 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Archelas, A. and R. Furstoss. 2001. Synthetic applications of epoxide hydrolases. *Current Opinion in Chem. Biology* **5**, 112-119.
2. Choi, W. J., C. Y. Choi, J. A. M. de Bont and C. A. G. M. Weijers. 1999. Resolution of 1,2-epoxyhexane by *Rhodotorula glutinis* using a two-phase membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 7-11.
3. 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.
4. 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. Tech.* **12**, 225-228.
5. 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.
6. Lee, E. Y. and H. S. Kim. 2001. Development of hollow-fiber reactor system for the production of chiral 1,2-epoxy-7-octene by microbial enantioselective hydrolysis reaction. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 259-263.
7. 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.
8. Mayer, S. F., A. Steinreiber, R. V. A. Orru and K. Faber. 2001. An enzyme-triggered enantio-convergent cascade-reaction. *Tetrahedron Asymmetry* **12**, 41-43.
9. Steinreiber, A. and K. Faber. 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations. *Current Opinion in Biotechnol.* **12**, 552-558.
10. 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 August 5, 2002; Accepted October 1, 2002)