

## *Rhodotorula* sp. CL-83 유래의 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 라세믹 Styrene Oxide 입체특이성 가수분해 조건 최적화

이 은 열

경성대학교 공과대학 식품공학과

### Optimization of Epoxide Hydrolase-Catalyzed Enantioselective Hydrolysis of Racemic Styrene Oxide

Eun Yeol Lee

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

#### Abstract

Enantioselective hydrolysis of racemic styrene oxide by *Rhodotorula* sp. CL-82 was investigated. Reaction conditions including pH, temperature, and volume ratio of organic cosolvent were optimized using response surface methodology, and the optimal conditions of pH, temperature, and the volume ratio of cosolvent were determined to be 7.64, 33.26°C, and 3.09 % (v/v), respectively. Chiral (*S*)-phenyl oxirane could be obtained with high enantiomeric purity (ee > 99%) and 20% yield (theoretical yield = 50%) at the optimal condition.

**Key words** – enantioselective hydrolysis, *Rhodotorula* sp. CL-82, styrene oxide, response surface methodology

#### 서 론

에폭사이드(epoxide)는 반응성이 우수한 oxirane 링구조로 인하여 친전자성반응, 친핵성반응 등 다양한 반응을 유도할 수 있어 유기합성용 중간체로 널리 사용되고 있다[2]. 특히, 광학활성을 가지는 키랄 에폭사이드는 고부가가치 광학활성 의약품 합성용 핵심중간체로서의 중요성이 증대되고 있다[1,5,6].

생촉매를 이용하여 키랄 에폭사이드를 제조하는 방법으로는 monooxygenase 등의 산화환원효소를 이용하여 이중

결합에 직접 oxirane 링을 도입하는 방법과 라세믹 에폭사이드 기질의 각 광학이성질체에 대한 생촉매의 선택적 가수분해능을 이용하여 단일 광학이성질체만을 분리하는 기술이 있다[3,7]. (*R*), (*S*)-이성질체로 혼합되어 있는 라세믹 에폭사이드 기질로부터 특정 광학이성질체만을 선택적으로 diol로 가수분해시켜줌으로써 궁극적으로 한 종류의 에폭사이드만을 제조할 수 있는 효소가 에폭사이드 가수분해 효소(epoxide hydrolase, EH)이다. EH는 monooxygenase에 비해 cofactor 재순환이 요구되지 않으며, 비교적 안정된 구조를 가지고 있다는 장점이 있다[4].

본 논문에서는 EH 활성이 우수한 *Rhodotorula* sp. 균체를 생촉매로 이용하여 라세믹 (*R*, *S*)-styrene oxide로부터 (*R*)-styrene oxide만을 입체선택적으로 가수분해시켜 제거

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

함으로써 광학순도 99% 이상의 (S)-styrene oxide를 제조함에 있어 주요 반응 조건인 pH, 온도 및 기질 용해도 향상을 위한 유기용매 첨가량 등이 미치는 영향을 분석하고 반응 표면 분석법을 이용하여 생산조건을 최적화하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포 배양

*Rhodotorula* sp. CL-82를 배양하기 위한 배지로는 1% (w/v) yeast, 1%(w/v) glucose를 포함하는 최소배지 (Peptone 10 g/l, NaCl 2 g/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.147 g/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.3 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.4 g/l)를 사용하였으며, 배양 온도 27℃, 250 rpm에서 48시간 진탕 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 후 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척한 다음 생축매로 사용하였다.

#### 입체선택성 가수분해반응

세포 300mg(건조중량기준)을 10 ml의 100 mM phosphate buffer(pH 8.0)에 현탁시킨 다음 20-80 mM 라세믹 styrene oxide를 주입하였다. 반응기로는 screw-cap vessel을 사용하였으며, 35℃, 250 rpm의 진탕배양기에서 30분 동안 가수분해 반응을 실시하여 초기 가수분해속도를 결정하였다. 반응 종료 후 반응액을 cyclohexane으로 추출한 후, 유기용매 층을 chiral GC로 분석하여 초기 가수분해속도와 광학순도(enantiomeric excess, ee = [S-R]/[S+R] × 100%)를 결정하였다[8].

#### pH, 온도 및 cosolvent의 영향

반응표면 분석법을 이용한 입체선택적 가수분해효소 반응조건 최적화를 위하여반응용액의 pH를 6.5 - 8.5, 온도를 27.5 - 37.5℃, 그리고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 1 - 5% (v/v)까지 변화시키면서 광학분할 실험을 수행하였다.

### 결과 및 토론

#### 반응표면 분석법을 이용한 반응조건 최적화

Lab culture collection에서 선별한 에폭사이드 가수분해 능이 우수한 *Rhodotorula* sp. CL-82 유래의 EH 활성을 이용하여 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 입체선택적 가

수분해 반응을 이용하여 키랄 (S)-styrene oxide 제조함에 있어서 반응표면 분석법(response surface analysis)을 이용하여 pH, 온도 및 cosolvent 비율 등 반응조건 최적화를 실시하였다. pH, 반응온도, cosolvent 등 세개의 실험인자의 변화가 입체선택적 가수분해에 미치는 영향을 분석하기 위한 실험점들은 중심합성계획법(central composite design)을 이용하여 결정하였으며, 실험조건과 (R)-styrene oxide 가수분해 속도와와의 함수관계를 설명해줄 수 있는 2차 회귀 모형의 계수는 Statistical Analysis System(SAS)을 이용한 회귀분석을 통해 결정하였다.

세 가지 반응조건을 각각 -2, -1, 0, 1, 2 등의 다섯 단계의 실험수준으로 나누고 (Table 1), 중심합성 계획법에 따라 총 2<sup>K</sup> + 2K + N<sub>0</sub> (K: 변수 개수, N<sub>0</sub>: 중심점 갯수)개의 실험점에서 각각 2번 반복 실험을 실시하여 입체선택적 가수분해 속도에 대한 실험 결과를 얻었다 (Table 2). 실험 평균값에 대하여 SAS 프로그램을 사용하여 회귀분석을 실시한 결과, pH, 온도, cosolvent 첨가량에 따른 *Rhodotorula* sp. CL-82 생축매의 입체선택적 가수분해 속도를 나타내주는 반응표면(response surface)에 대한 2차 회귀분석식은 아래와 같이 결정할 수 있었다.

$$y = 0.00233 + 0.00010X_1 + 0.00008X_2 - 0.00001X_3 - 0.00035X_1^2 + 0.00027X_1X_2 - 0.00027X_2^2 + 0.00012X_1X_3 - 0.00008X_2X_3 - 0.00030X_3^2$$

여기서 y는 생축매의 입체선택적 가수분해 속도(mM/mg · min)이며 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>는 각각 pH, 반응온도(℃), cosolvent 첨가량(%(v/v))이며 β<sub>0</sub>는 절편, β<sub>n</sub>은 회귀계수이다.

2차 회귀분석을 통해 결정된 *Rhodotorula* sp. CL-82 생축매의 입체선택적 가수분해 속도를 나타내주는 반응표면 곡선에 대한 eigenvalues 값들이 세가지 변수에 대해 모두 음의 값들이 나와 최대점이 존재함을 알 수 있었다. F-ratio

Table 1. Level of the enantioselective hydrolysis conditions in experimental design

X <sub>n</sub>	Independent variables	Level				
		-2	-1	0	1	2
X <sub>1</sub>	pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
X <sub>2</sub>	Temperature(℃)	27.5	30	32.5	35	37.5
X <sub>3</sub>	cosolvent(%)	1	2	3	4	5

Table 2. Experimental data for initial hydrolysis rates under the 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	0.00179
2	-1	-1	1	0.00132
3	-1	1	-1	0.00100
4	-1	1	1	0.00097
5	1	-1	-1	0.00121
6	1	-1	1	0.00137
7	1	1	-1	0.00165
8	1	1	1	0.00198
9	0	0	0	0.00233
10	-2	0	0	0.00081
11	2	0	0	0.00103
12	0	-2	0	0.00090
13	0	2	0	0.00160
14	0	0	-2	0.00114
15	0	0	2	0.00127

값이 가장 적게 나온 실험인자인 cosolvent 첨가량을 3% (v/v)으로 결정하고, pH 및 반응온도 변화에 따른 입체선택적 가수분해 속도 변화를 분석하였다. Fig. 1에서와 같이 최대점을 가진 3차원 반응표면을 얻을 수 있었으며, 최대점에서의 최적 pH 및 반응온도는 각각 7.6, 33.3°C로 결정할 수 있었다.

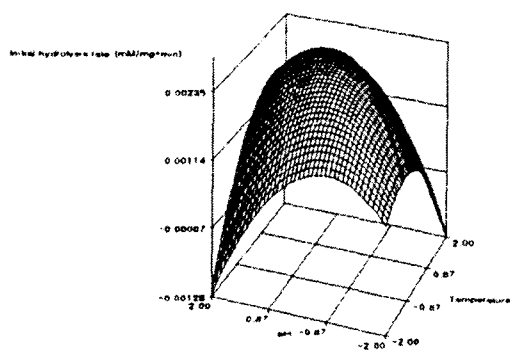


Fig. 1. Effects of pH and temperature on the initial enantioselective hydrolysis rate of *Rhodotorula* sp. CL-82.

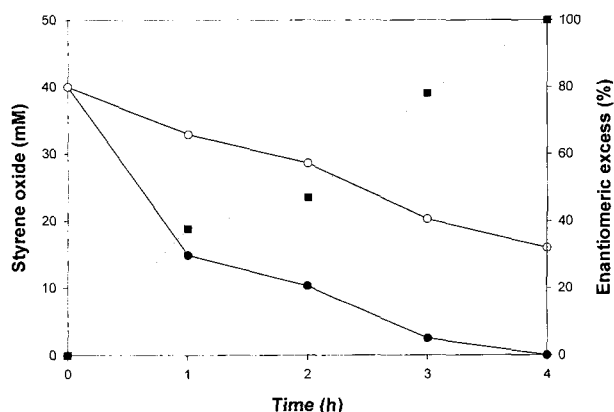


Fig. 2. Enantioselective hydrolysis of racemic phenyl oxirane by *Rhodotorula* sp. CL-82 in batch reactor. (Symbol: (R)-Phenyl oxirane (●), (S)-Phenyl oxirane (○), enantiomeric excess (■))

최적조건에서의 라세믹 styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해 반응

반응표면 분석에서 결정한 최적조건에서 *Rhodotorula* sp. CL-82 균체를 생축매로 사용하여 라세믹 styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 실시하였다. 최적조건으로 결정된 pH 7.6, 온도 33.3°C, cosolvent 첨가량 3%(v/v)에서 건조중량 300 mg의 *Rhodotorula* sp. CL-82 균체를 80 mM의 라세믹 styrene oxide가 들어 있는 10 ml reaction vessel에 넣고 shaking을 해주면서 입체선택적 가수분해 반응을 실시하였다. 약 4시간 정도의 반응 시간 경과 후 20% 수율(이론 수율 대비 40%) 수준으로 광학적으로 순수한 (ee > 99%) (S)-styrene oxide을 얻을 수 있었다.

## 요 약

*Rhodotorula* sp. CL-82 유래의 epoxide hydrolase 활성을 이용하여 라세믹 styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 실시하였다. *Rhodotorula* sp. CL-82 생축매의 입체선택적 가수분해속도를 나타내주는 반응표면 곡선에 대한 분석을 통해 pH, 반응온도, cosolvent 첨가량에 대한 최적조건을 각각 7.6, 33.3°C, 3%(v/v)으로 결정하였다. 최적 반응조건에서 약 4시간 정도의 반응을 통해 ee값이 99% 이상인 광학적으로 순수한 (S)-styrene oxide를 이론 수율 대비 40% 수율로 얻을 수 있었다.

### 감사의 글

이 논문은 2002학년도 경성대학교 특별과제연구비에 의하여 연구되었음.

### 참고 문헌

1. Archelas, A. and R. Furstoss. 2001. Synthetic applications of epoxide hydrolases. *Current Opinion in Chem. Biology* **5**, 112-119.
2. Besse, P. and H. Veschambre. 1994. Chemical and biological synthesis of chiral epoxides. *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
3. 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.
4. 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.
5. Lee, E. Y. 2002. Epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution for the production of chiral epoxides. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 321-325.
6. Steinreiber, A. and K. Faber. 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations. *Current Opinion in Biotechnol.* **12**, 552-558.
7. Weijers, C. A. G. M. 1997. Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*. *Tetrahedron: Asymmetry* **8**, 639-647.
8. 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 November 5, 2002; Accepted December 21, 2002)