

## *Rhodospiridium toruloides*를 이용한 Hollow-fiber 반응기에서의 광학활성 Phenyl Oxirane 생산

김희숙 · 박성훈<sup>1</sup> · 이은열\*

경성대학교 공과대학 식품공학과  
<sup>1</sup>부산대학교 공과대학 화학공학과

### Production of Chiral Phenyl Oxirane by *Rhodospiridium toruloides* in Hollow-fiber Reactor

Hee Sook Kim, Sunghoon Park<sup>1</sup> and Eun Yeol Lee\*

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

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, College of Engineering,  
Pusan National University, Busan 609-735, Korea

#### Abstract

Production of chiral phenyl oxirane by *Rhodospiridium toruloides* SJ-4 was investigated. Racemic phenyl oxirane was kinetically resolved by enantioselective hydrolysis reaction by epoxide hydrolase of *R. toruloides* in two-phase hollow-fiber reactor system. Dodecane with high concentration of the racemic substrate passed through the lumen side and cell suspension was recirculated through the shell side of the hollow fiber reactor. For the removal of phenyl-1, 2-ethandiol to reduce the product inhibition to biocatalysts, another hollow-fiber reactor was employed to extract the diol. Racemic phenyl oxirane up to 300 mM was enantioselectively resolved with high enantiopurity (>99% ee) in hollow-fiber reactor system.

**Key words** – enantioselective hydrolysis, chiral phenyl oxirane, hollow-fiber reactor, *Rhodospiridium toruloides*

#### 서 론

생리활성 물질 대부분은 분자구조 내에 비대칭 탄소가 있어 여러 종류의 광학이성질체가 존재한다. 일반적으로 여러 가지 광학이성질체 중에서 특정 광학이성질체만이 원하는 생리활성을 보이며 나머지 이성질체들은 경우에 따라

서는 심각한 부작용을 줄 수도 있다[11]. 따라서, 의약품 및 농약 등을 광학적으로 순수한 형태로 제조하는 것이 요구되고 있으며, 이를 위해서는 합성 전구체로 사용되는 광학활성 중간체 제조 기술 개발이 중요하다.

광학활성 중간체 중에 최근 많은 연구 대상이 되고 있는 광학활성 에폭사이드(chiral epoxide)는 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용될 수 있는 고부가가치 광학활성 중간체이다. 광학활성 에폭사이드는 화학적 비대칭합성(catalytic asymmetric synthesis)방법

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

을 이용하여 제조할 수도 있으나[1], 입체선택성(enantioselectivity)이 우수한 monooxygenase, epoxide hydrolase 등의 생촉매를 사용하여 제조할 수도 있다[7]. 특히, 라세믹 에폭사이드 기질의 각 광학이성질체에 대한 에폭사이드 가수분해효소 (epoxide hydrolase, EH)의 선택적 분해능 차이를 이용하여 단일 광학이성질체만을 제조하는 입체선택적 광학분할 기술을 이용한 광학활성 에폭사이드 생산에 대한 관심이 증대되고 있다[4,8]. EH 등의 생촉매를 이용한 광학활성 중간체 생산기술은 asymmetric chemocatalysis 기술과 비교하여, 첫째로, 화학 키랄 촉매는 고가인 반면, epoxide hydrolase whole-cell 생촉매는 저비용으로 제조 가능하므로 가격 경쟁력이 우수하고, 둘째로, 유기합성 방법은 기질 특이성이 약해 고순도의 ee 값을 얻기 어려우나, EH의 경우 enantioselectivity가 우수하여 ee 값 99% 이상 가능하고, 셋째로, 중금속 촉매를 사용하지 않고 수용액상에서 반응이 가능하므로 환경친화적 청정기술이다[9,12].

일반적으로 수용액에서의 생촉매 반응에서는 기질의 낮은 용해도로 인하여 최종 생산물의 농도가 낮아져 생산성 제고에 문제가 발생할 수 있다[5]. 이 경우 수상/유기용매 2상계 시스템의 사용을 고려 할 수 있는데, 생촉매를 기반으로 한 2상계 반응 시스템에서는 유기용매층에 있는 소수성 기질이 반응과 동시에 소수성 성질의 산물이 유기용매층으로 *in-situ*로 분리하는 경우 기질 및 산물저해를 예방할 수 있어 공정 효율을 증대시킬 수 있다[6]. 또한, 유기용매층에 있는 최종 산물은 단순한 distillation 등의 방법으로 고순도로 분리할 수 있어 경제성 향상에 도움이 될 수 있다. 그러나, 일반적으로 유기용매에서는 효소등의 생촉매 활성이 현저히 저하된다는 단점이 있으므로, 이러한 문제점을 극복하기 위하여 유기용매 및 수용액 두상을 막으로 구분시켜줄 수 있는 hollow-fiber 막반응기를 이용할 수 있다. Hollow-fiber 반응기를 이용한 기존의 연구에서는 주로 상업적 의미가 약한 광학활성 1,2-epoxyhexane, 1,2-epoxy-7-octene 등의 aliphatic epoxide 기질을 모델 화합물로 사용한 연구 결과들이 주로 보고되었다[2,3,10]. 따라서, 본 연구에서는 hollow-fiber 반응기에서 상업적으로 유용한 aromatic epoxide 중간체인 광학활성 phenyl oxirane을 생산 가능성을 평가하기 위하여, 라세믹 에폭사이드에 대한 입

체선택적 가수분해능이 우수한 *Rhodosporidium toruloides*를 생촉매로 사용하여 고농도 기질로부터 광학활성 phenyl oxirane을 제조하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

생촉매인 *R. toruloides* SJ-4를 배양하기 위한 배지로는 1%(w/v) yeast extract, 1%(w/v) glucose를 포함하는 YPD 배지(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, 배양온도 27°C, 250 rpm에서 48시간 진탕 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 후 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척 후 생촉매로 사용하였다.

### 입체선택적 가수분해반응

세포 2 g (wet cell 기준, dry cell로 환산시 약 23 mg)을 8 ml의 100 mM phosphate buffer(pH 8.0)에 현탁시킨 후 20 mM 농도가 되도록 라세믹 phenyl oxirane을 주입하였다. 반응기로는 screw-cap vial을 사용하였으며, 35°C, 250 rpm의 진탕배양기에서 30분 동안 가수분해 반응을 실시하여 초기반응속도를 결정하였다. 반응 종료 후 반응액을 cyclohexane으로 추출한 후, 유기용매 층을 GC로 분석하여 초기 가수 분해속도와 광학순도(enantiomeric excess, ee = [S-R]/[S+R] × 100%)를 결정하였다.

### 유기용매 선정

생촉매 불활성이 가장 적은 유기용매를 선정하기 위하여 여러 종류의 유기용매를 20%(v/v)으로 첨가한 반응용매에서 라세믹 phenyl oxirane 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 실시하였다. 또한, 20%(v/v) cosolvent 시스템에서 일정 시간 간격으로 EH 활성을 측정하여 유기용매 및 수용액 시스템에서의 EH 활성 안정성을 평가하였다.

### Chiral GC 분석

Phenyl oxirane의 광학순도 값 및 수율 결정을 위한 GC 분석은 불꽃이온 검출기(FID)가 장착된 가스크로마토그래피를 사용하였다. 분석용 column으로는 silica cyclodextrin capillary β-DEX 120 (30 m length, 0.25 mm ID, and 0.25

$\mu\text{m}$  film thickness)를 사용하였다. 이동가스로 질소를 사용하였으며 split ratio는 1:100, flow rate는 0.5 ml/min으로 1  $\mu\text{l}$ 의 시료를 주입하여 분석하였고, column, injector, detector의 온도는 각각 100, 220, 220  $^{\circ}\text{C}$ 였다.

### 광학선택적 가수분해 반응기 구성

사용한 Hollow-fiber membrane (diameter 200  $\mu\text{m}$ , length 21 cm)의 총 표면적은 약 1.0  $\text{m}^2$ 이며, housing은 acrylonitrile-butadiene-styrene(ABS) 공중합체로 되어있다. 세포 현탁액(10 g DCW)을 포함한 100 mM potassium phosphate buffer는 항온조를 이용하여 35 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지시키면서 60 ml/min의 속도로 hollow-fiber membrane의 shell side를 통해 순환시켰다. 라세믹 phenyl oxirane 기질은 선정된 유기용매에 녹인 후 hollow-fiber membrane의 lumen side에서 counter-current로 30 ml/min의 속도로 순환시켰다 (Fig. 1에서 왼쪽 hollow-fiber 반응기만으로 시스템을 구성한 경우). 가수분해반응에서 생기는 diol을 제거하기 위하여 같은 모듈의 hollow-fiber membrane을 직렬로 연결하여 사용하였다 (Fig. 1에서 왼쪽 및 오른쪽 hollow-fiber 반응기 모두로 구성한 경우). Diol 추출용 100 mM po-

tassium phosphate buffer (pH 8.0, 160 ml)를 두 번째 hollow-fiber membrane의 lumen side로 흘려주어 세포 현탁액에 포함되어 있는 diol을 추출하여 제거하였다. 광학활성 phenyl oxirane의 광학순도 및 수율 측정을 위하여 일정한 간격으로 유기용매상의 샘플 100  $\mu\text{l}$ 를 채취하여 10배 정도 희석시킨 후 chiral GC로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 유기용매의 선정

유기용매의 도입으로 기질인 라세믹 phenyl oxirane의 용해도 증가 및 화학적 안정성증가로 입체선택적 가수분해 반응의 효율을 향상시킬 수 있을 것으로 기대할 수 있으나, 유기용매 사용이 생촉매 활성을 저하시킬 수 있으므로 이러한 문제점을 극복할 수 있는 생물반응기 시스템 개발이 요구된다. 일반적으로 친수성 유기용매를 사용하는 경우 세포의 효소 활성에 악영향을 주는 경우가 많이 보고되고 있다. 유기용매 시스템에서는 효소 주위의 필수 물분자층(essential water shell)이 단백질의 3차 구조를 유지시켜 주는 것이 촉매활성 유지에 필수적인 것으로 보고되고 있

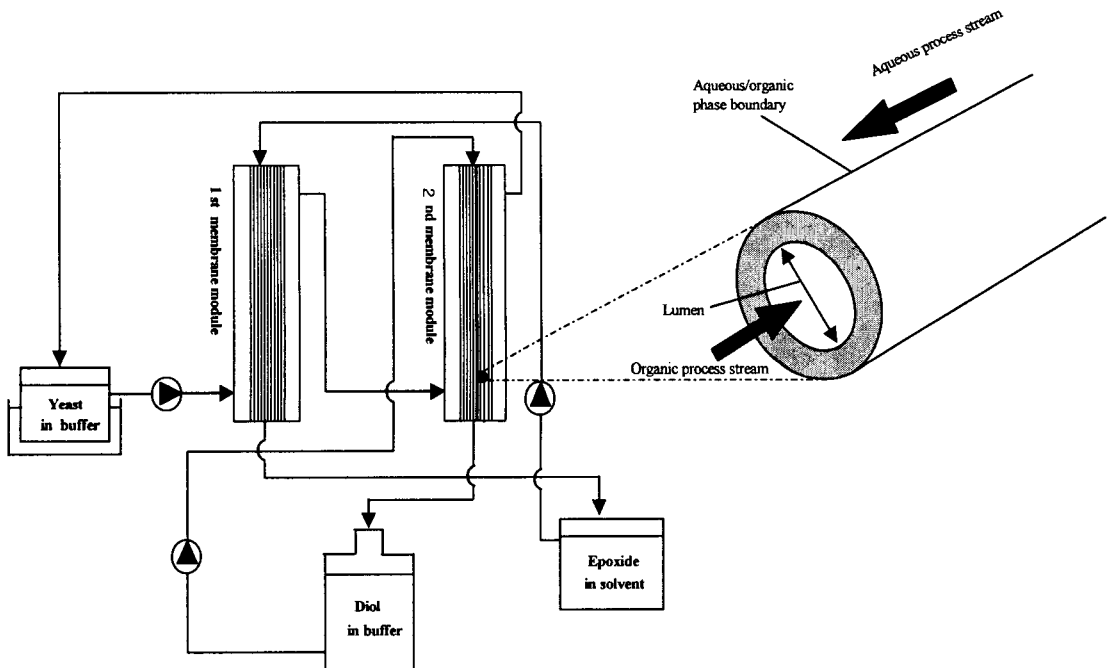


Fig. 1. Schematics of single-stage (left hollow-fiber only) and two-stage (left and light hollow-fiber) hollow-fiber reactor system.

다. 친수성 유기용매를 사용하는 경우 이러한 필수 물분자 층이 쉽게 용해되어 제거될 가능성이 높으므로 본 과제에서는 소수성 계열의 유기용매를 중심으로 유기용매를 선정하였다. 실험 방법으로는 유기용매 2 ml에 세포 농축액 (230 mg DCW/10 ml)이 들어 있는 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)로 전체 용량을 10 ml로 만들고 20 mM phenyl oxirane을 첨가한 후, 35°C, 200 rpm 조건의 진탕배양기에서 30분 동안 반응을 수행하였다. 반응종료 후 10 ml의 ethyl acetate와 혼합시킨 후 유기용매층을 chiral GC로 분석하였다. 유기용매 및 수용액상에서의 라세믹 phenyl oxirane 분배계수는 같은 양의 두 용매층에 존재하는 기질의 양을 측정하여 결정하였다.

Table 1에서와 같이 일반적으로 EH 생촉매 활성은 사용한 유기용매의 구조와 극성에 따라 많은 차이를 보여주었는데, 유기용매 및 수용액 2성분 시스템에서의 EH 활성은 dodecane, hexadecane 등의 소수성 유기용매에서의 활성이 ethylacetate, diethyl ether 등과 같은 극성용매에 비해 높은 활성을 보여주었다. 유기용매 중 가장 높은 EH 활성을 보여준 dodecane의 경우 수용액 대비 약 60% 수준 이상의 활성을 유지시킬 수 있어 이상계 수용액/유기용매 반응 시스템 개발에 사용할 유기용매로 선택하였다.

Table 1. Enantioselective hydrolysis of phenyl oxirane in various organic solvents by *R. toruloides* SJ-4<sup>a</sup>

Organic solvents	Hydrolysis rate (mM min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	ee (%) <sup>c</sup> (Enantiomeric excess)
None <sup>b</sup>	0.00149	100
Ethanol	0.00113	25
Methanol	0.00101	36
2-Methoxyethanol	0.00131	53
Dimethylsulfoxide	0.00137	57
Dimethylether	0.00100	27
Phthalic acid	0.00120	49
Dodecane	0.00132	59
Diocetyl phthalate	0.00131	48

a: Hydrolysis reactions were performed in solvent system containing 20%(v/v) organic solvent.

b: Enantioselective hydrolysis in aqueous buffer.

c: Relative ee (Relative enantioselectivity was calculated by dividing the value of a corresponding enantioselectivity (E = ln(Ro/R)/ln(So/S)) by that of the best result.)

### 1단계 Hollow-fiber 반응기 시스템을 이용한 고농도 Phenyl Oxirane의 광학분할

유기용매 및 수용액으로 구성된 2성분계에서 생촉매를 이용한 비대칭 분할반응을 수행하는 경우, 유기용매 사용에 따른 기질 농도 증가 및 기질 안정성 향상이라는 장점이외에 유기용매 사용으로 인한 생촉매활성 감소가 동시에 존재함으로 이러한 상반된 문제점을 동시에 극복하기 위하여 EH 활성을 가진 미생물 생촉매가 있는 수용액층과 phenyl oxirane 기질이 녹아있는 유기용매층을 막으로 분리한 상태에서 가장 효율적인 phenyl oxirane 물질전달을 기대할 수 있는 hollow-fiber membrane을 이용한 비대칭 분할 시스템을 개발하기로 하였다 (Fig. 1). 무극성의 유기용매가 생촉매가 있는 수용상으로 확산되어 들어와 EH 활성을 저하시키는 현상을 예방하고, 또한, 유기용매 결손으로 인한 입체선택적 분할반응의 수율 저하를 방지하기 위하여 hollow-fiber membrane의 재질은 친수성 성질을 가진 regenerated cellulose를 사용하였다.

생촉매로 사용한 *R. toruloides* SJ-4 세포 (10 g DCW)는 100 mM phosphate 완충용액(pH 8.0)에 현탁시켜 반응기 시스템의 첫 번째 hollow-fiber의 shell 부위를 통해 60 ml/min 이동시키면서 입체선택적 가수분해 반응을 실시하였다. 기질이 녹아 있는 유기용매층은 hollow-fiber 반응기의 lumen 부위를 30ml/min 통과하면서 막의 표면적을 통해 생촉매와 접촉하게 되면서 입체선택적 가수분해 반응이 일어나게 된다. 고농도의 라세믹 에폭사이드에 대한 광학분할을 위해 구성된 1단계 hollow-fiber 반응기 시스템을 이용하여 200 mM의 phenyl oxirane 기질에 대하여 EH 활성 기반의 입체선택적 가수분해 반응을 수행하였다. 10시간 정도의 반응을 통해 광학적으로 순수한(>98% ee) (S)-phenyl oxirane (yield = 35%, 이론 수율 대비)을 얻을 수 있었다 (Fig. 2).

1단계 hollow-fiber 반응기 시스템을 사용하여 300 mM phenyl oxirane에 대한 입체 선택적 가수분해반응을 실시하였다. 반응기 운전 시작 18시간 후에도 ee 값이 69.2에서 향상되지 못하고 계속적으로 비슷한 속도로 (S)-phenyl oxirane와 (R)-phenyl oxirane이 분해됨을 볼 수 있었다 (data not shown). 이는 EH 생촉매의 활성 감소나 초기기질의 저해보다는 가수분해 반응에서 필연적으로 수반되는 고농도의 diol 산물 생성에 따른 반응속도 저해 현상이 가장 큰

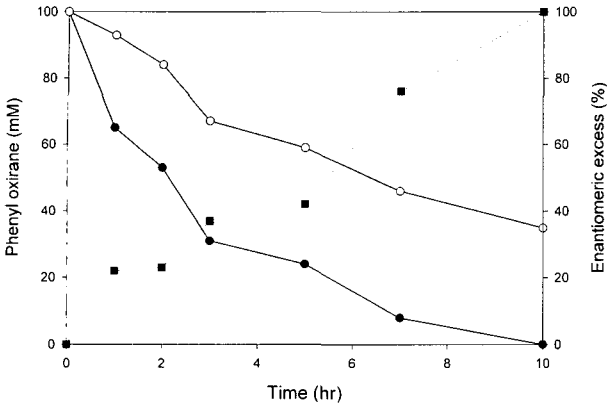


Fig. 2. Kinetic resolution of racemic phenyl oxirane in a single-stage two-phase hollow-fiber reactor system using *R. toruloides* SJ-4. ((*R*)-Phenyl oxirane (●), (*S*)-Phenyl oxirane (○), enantiomeric excess (■))

원인으로 판단된다. 따라서, 1단계 hollow-fiber 반응기 시스템은 phenyl oxirane 기질의 수용액상에서의 화학가수분해로 인해 수율이 낮아지는 문제점과 기질의 낮은 용해도로 인한 낮은 단위 부피당 생산성 문제점을 해결할 수 있는 시스템으로 평가할 수 있으나, 고농도 반응의 경우 반응산물인 phenyl-1,2-ethanediol 생성에 따른 EH 반응속도 저해 현상을 극복할 수 있는 반응기 시스템이 요구됨을 알 수 있다.

2단계 Hollow-fiber 반응기 시스템을 이용한 광학활성 phenyl oxirane 생산

고농도 phenyl oxirane의 입체선택적 가수분해 반응에서 생기는 고농도의 phenyl-1,2-ethanediol을 제거할 수 있는 기능을 가진 두 번째 hollow-fiber를 직렬로 연결한 2단계 hollow-fiber 반응기 시스템을 구성하였다. 우선, 1단계에서와 마찬가지로 세포 현탁액을 포함한 100 mM potassium phosphate buffer는 water bath를 이용하여 35℃로 유지시키면서 일정 속도로 첫 번째 hollow-fiber membrane의 shell side를 통해 순환시켰다. 라세믹 phenyl oxirane 기질은 유기용매에 녹인 후 첫 번째 hollow-fiber membrane의 lumen side에서 counter-current로 일정속도로 순환시켰다. 첫 번째 hollow-fiber 막의 표면적을 통해 EH whole-cell 생축매와 접촉하게 되면서 입체선택적 가수분해 반응이 일어나게 된다. 가수분해반응에서 생기는

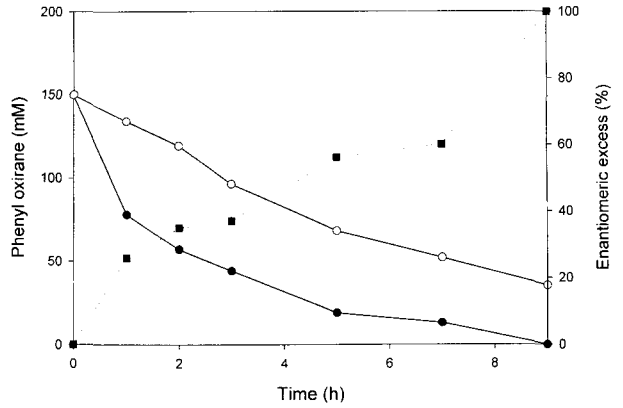


Fig. 3. Kinetic resolution of racemic phenyl oxirane in a two-stage two-phase hollow-fiber reactor system using *R. toruloides* SJ-4. ((*R*)-styrene oxide (●), (*S*)-styrene oxide (○), enantiomeric excess (■))

phenyl-1,2-ethanediol을 추출·제거하기 위하여 두 번째 hollow-fiber membrane을 직렬로 부착하였다. Phenyl-1,2-ethanediol 추출용 potassium phosphate buffer를 두 번째 hollow-fiber membrane의 lumen side로 흘려주어 세포 현탁액에 포함되어 있는 phenyl-1,2-ethanediol을 추출하여 제거하도록 구성하였다 (Fig. 1).

2단계 hollow-fiber 반응기 시스템을 이용하여 300 mM의 phenyl oxirane 기질에 대하여 *R. toruloides* SJ-4의 EH 활성을 이용한 입체선택적 가수분해 반응을 수행하였다. 9 시간 정도의 반응을 통해 광학적으로 순수한(>99% ee) (*S*)-phenyl oxirane (yield = 11.8%, 이론 수율 대비)을 얻을 수 있었다 (Fig. 3). 따라서, phenyl-1,2-ethanediol을 제거를 통해 고농도에서도 phenyl oxirane에 대해 입체선택적 분할 반응을 진행시킬 수 있음을 알 수 있었다. 2단계 hollow-fiber 반응기 시스템의 성능을 평가하기 위하여 매우 고농도인 1 M의 racemic phenyl oxirane에 대한 동력학적 분해 반응을 수행하였다. *R. toruloides* SJ-4를 생축매로 이용하여 약 18~24시간 정도의 반응을 통해 3% 수준의 낮은 수율로 광학적으로 순수한(>98% ee) (*S*)-phenyl oxirane을 얻을 수 있었다. *R. toruloides* SJ-4 자체가 생축매로써의 촉매능에 문제가 있어 1 M의 고농도에서 효율적인 입체선택적 가수분해 반응을 수행할 수 없었는지를 판단하기 위하여 *Aspergillus niger* 등의 다른 생축매를 사용하여 2단계 hollow-fiber 반응기를 운전한 경우에서도 *R. toruloides*

SJ-4와 유사한 수준으로 동력학적 분해 결과를 보여주었다 (data not shown). 따라서, hollow-fiber 반응기를 이용하여 300 mM 수준의 고농도에서도 EH의 입체선택적 가수분해 반응으로 광학활성 phenyl oxirane을 제조할 수 있음을 알 수 있었으며, 이론 수율 대비 12~35% 수준인 낮은 수율을 높이고 300 mM 이상의 고농도에서의 입체선택적 가수분해반응을 수행하기 위해서는 고효율 생축매 개발 및 수용액상에 대한 유기용매상에서의 기질 분배도가 높은 유기용매 선정 등에 대한 추가 연구가 필요함을 알 수 있었다.

## 요 약

*Rhodospiridium toruloides* SJ-4의 epoxide hydrolase의 입체선택적 가수분해 반응을 이용하여 hollow-fiber 반응기에서 라세믹 phenyl oxirane 기질로부터 광학활성 phenyl oxirane을 생산하였다. 라세믹 에폭사이드 기질의 수용액상에서의 낮은 용해도로 인한 저농도 반응의 문제점을 극복하기 위하여 dodecane 유기용매에 용해시켜 lumen 부위로 공급하였으며, 생축매인 *R. toruloides* 세포 현탁액은 수용액상인 shell 부위에 위치시킴으로써 유기용매 사용에 따른 생축매 활성 저하를 줄인 1단계 반응기 시스템에서는 200 mM의 고농도에서 (S)-phenyl oxirane을 생산할 수 있었다. 또한, 반응 산물로 생성되는 diol에 의한 생축매 활성 저해효과를 감소시키기 위하여 2단계 hollow-fiber 반응기에서는 완충용액을 이용하여 diol을 제거시킨 결과 300 nM에서 EH 활성을 이용한 입체선택적 가수분해반응을 수행할 수 있었으며, 200~300 mM의 고농도 라세믹 기질로부터 99% ee 이상의 광학순도를 가진 (S)-phenyl oxirane을 이론 수율 대비 12~35% 수율로 얻을 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Besse, P. and H. Veschambre. 1994. Chemical and biological synthesis of chiral epoxides. *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
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. Cleij, M., A. Archelas and R. Furstoss. 1998. Microbiological transformations 42. A two-phase preparative scale process for an epoxide hydrolase catalysed resolution of *para*-bromo  $\alpha$ -methyl-styrene oxide. Occurrence of a surprising enantioselectivity enhancement. *Tetrahedron: Asymmetry* **9**, 1839-1842.
7. de Vries, E. J. and D. B. Janssen. 2003. Biocatalytic conversion of epoxides. *Current Opinion Biotechnol.* **14**, 1-7.
8. Hellström, H., A. Steinreiber, S. F. Mayer and K. Faber. 2001. Bacterial epoxide hydrolase-catalyzed resolution of a 2,2-disubstituted oxirane: optimization and upscaling. *Biotechnol. Letters.* **23**, 169-173.
9. 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.
10. 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.
11. Sheldon, R. A. 1993. *Chirotechnology*. Marcel Dekker, New York.
12. Weijers, C. A. G. M. and J. A. M. de Bont. 1999. Epoxide hydrolases from yeasts and other sources: versatile tools in biocatalysis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **6**, 199-214.

(Received October 5, 2003; Accepted November 6, 2003)