

*Rhodospiridium toruloides*의 광학선택적 가수분해활성을 이용한 Chiral Epichlorohydrin의 회분식 생산

¹이재화 · †이은열

경성대학교 공과대학 식품공학과, ¹신라대학교 공과대학 생명공학과
(접수 : 2003. 10. 14., 게재승인 : 2004. 2. 26.)

Batch Production of Chiral Epichlorohydrin by Enantioselective Hydrolysis Reaction using *Rhodospiridium toruloides*

Jae-Hwa Lee¹ and Eun Yeol Lee[†]

Department of Food Science and Technology, Kyungsoo University, Busan 608-736, Korea

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, Korea

(Received : 2003. 10. 14., Accepted : 2004. 2. 26.)

Enantioselective hydrolysis for the producing chiral epichlorohydrin from its racemic substrate was investigated using epoxide hydrolase activity of *Rhodospiridium toruloides* SJ-4. The effects of reaction parameters including pH, temperature, initial substrate concentration on initial hydrolysis rate and enantioselectivity were analyzed and optimized. The addition of detergent, Tween 20, enhanced the hydrolysis rate and enantioselectivity. Chiral (*R*)-epichlorohydrin with high optical purity (> 99% ee) and yield of 25 % (theoretically 50% maximum yield) was obtained from its racemate of 20 mM.

Key Words : Enantioselective hydrolysis, epichlorohydrin, epoxide hydrolase, *Rhodospiridium toruloides*

서 론

의약품을 포함한 많은 생리활성물질들에는 한 가지 이상의 광학이성질체가 존재하는 경우가 많다. 대부분의 경우 여러 종류의 이성질체 중에서 특정 이성질체 한가지만이 올바른 생리활성을 보여주고, 나머지 이성질체들은 활성이 없거나 경우에 따라서는 심각한 부작용을 주는 경우가 있다(1). 광학 이성질체들의 생리활성 차이가 존재함에 따라 FDA는 신규의약품의 경우 각각의 광학이성질체에 대한 별도의 임상 실험을 요구하고 있어 광학적으로 순수한 형태의 화합물만을 이용한 의약품 및 농약 등의 제조 필요성이 증가되고 있다.

광학활성물질의 효율적인 생산을 위해서는 합성 전구체인 광학활성 중간체 제조 기술 개발이 요구된다. 대표적인 핵심 원료인 광학활성 에폭사이드는 친전자성반응, 친핵성반응, 산·염기반응, 산화·환원반응 등 다양한 반응을 시킬 수 있

어 활용도가 높아 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용될 수 있다(Fig. 1) (2-5). 특히, 본 연구의 대상물질인 광학활성 epichlorohydrin (ECH)은 beta-blockers 등의 광학활성 의약품 중간체로 사용될 수 있으며, 또한 강유전성 액정 등에도 이용되는 등 그 응용범위가 많은 광학활성 에폭사이드이다(6-8).

화학적 ECH 제조기술로는 cobalt-based salen촉매를 이용한 광학분할법이 있으며, 단말 에폭사이드 (terminal epoxide)를 비대칭적으로 가수분해시켜 순수한 광학이성질체를 얻는 기술이다(9). 이 기술은 몇 종류의 라세믹 에폭사이드 기질에 성공적으로 응용된 결과가 보고되었으나, 사용되는 촉매가 고가이고 scale-up이 어렵다는 단점 등으로 인하여 상업화가 지연되고 있다. 생촉매를 이용한 ECH 생산방법으로 일본 Daiso사에서는 라세믹 2,3-dichloro-1-propanol 또는 라세믹 3-chloro-1,2-propanediol로부터 미생물 탈할로젠화 반응을 이용하여 epichlorohydrin 합성 전구체인 광학활성 2,3-dichloro-1-propanol과 glycidol 합성 전구체인 광학활성 3-chloro-1,2-propanediol을 생산하는 공정을 개발하였다(10-12). (*R*)-광학이성질체만을 탈할로젠화 반응을 시킬 수 있는 *Alcaligenes* sp.와 (*S*)-광학이성질체에만 선택적으로 작용하는 *Pseudomonas* sp.를 이용하여 99.4% ee 및 38% 수율로 각각

† Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungsoo University, Busan 608-736, Korea

Tel : +82-51-620-4716, Fax : +82-51-622-4986

E-mail : eylee@star.ksu.ac.kr

의 광학활성 전구체를 얻었다. 이 기술은 기질인 halohydrin의 물에 대해 용해도가 낮으며 dehalogenase의 활성이 낮다는 문제점이 있다.

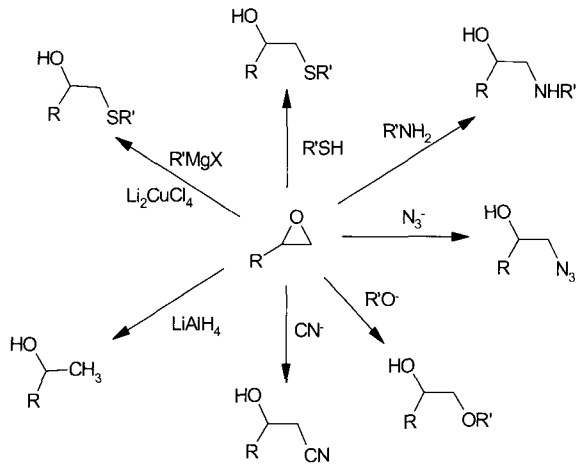


Figure 1. Versatile reactivity of chiral epoxides (2).

이러한 기존방법을 극복할 수 있는 대안으로 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 제조기술에 대한 관심이 증대되고 있다(3, 4). EH를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조는 주로 1,2-epoxyhexane, styrene oxide 등에 대한 연구결과들이 많이 보고되었으며, 라세믹 ECH에 대한 광학분할 반응에 대한 연구는 활발히 진행되지 못했다(6). *Aspergillus niger*를 생축매로 사용하여 수용액상에서의 ECH 라세믹 기질에 대한 입체선택적 가수분해반응을 통해 2% 수준의 매우 낮은 수율로 chiral ECH를 얻은 결과들만이 보고되었다(5). 따라서, 본 연구에서는 라세믹 ECH 기질에 대한 입체선택적 가수분해능이 있는 신규로 분리한 미생물인 *Rhodospiridium toruloides* SJ-4를 이용해 저가의 ECH 라세믹체로부터 고가의 광학활성 ECH를 회분식 광학분할 반응을 통해 제조하고자 하였다. *R. toruloides* SJ-4 유래의 EH 활성을 이용한 라세믹 ECH의 광학분할에 있어서 주요 반응 조건인 pH, 온도, 초기 ECH 기질농도, detergent 첨가 등이 광학분할반응에 미치는 영향을 분석하고, (R)-ECH의 회분식 생산에서의 수율 및 광학순도를 향상시키고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양

R. toruloides SJ-4를 배양하기 위한 배지로는 glucose 10 g/l, yeast extract 1 g/l, peptone 10 g/l, NaCl 2 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.147 g/l, NaH₂PO₄ 1.3 g/l, K₂HPO₄ 4.4 g/l로 구성된 배지를 사용하였으며, pH 7, 배양온도 30℃, 300 rpm에서 48 시간 발효조에서 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 후 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척 후 생축매

로 사용하였다.

입체선택적 가수분해반응

세포 40 mg을 8 ml의 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)에 현탁시킨 후 20 mM 라세믹 ECH를 주입하였다. 반응기로는 screw-cap vial을 사용하였으며, 35℃, 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 (%)= 100 x [S-R] / [S+R])를 결정하였다. 기질인 라세믹 ECH 및 enantiopure epoxide standard는 시약 등급을 구입하여 사용하였다.

pH, 온도, 초기 ECH 농도, detergent 첨가의 영향

*R. toruloides*의 에폭사이드 가수분해효소 활성을 이용한 광학분할 속도에 미치는 pH 및 온도 영향을 분석하기 위하여 반응용액의 pH를 5.0 - 9.0, 온도를 10 - 40℃까지 변화시키면서 광학분할 실험을 수행하였다. 초기기질 농도의 생축매 활성저해효과를 분석하기 위하여 20 - 300 mM 농도의 ECH를 주입하고 입체선택적 가수분해 반응의 초기속도를 측정하였다. Tween 20 등을 포함한 다양한 종류의 detergent를 1 - 10% (v/v) 비율로 첨가한 다음 20 mM 농도의 ECH를 주입하고 입체선택적 가수분해 반응의 초기속도를 측정하였다.

Chiral GC 분석

ECH의 ee 값 및 수율 결정을 위한 GC분석은 불꽃이온 검출기 (FID)가 장착된 가스크로마토그래프를 사용하였다. 분석용 column으로는 silica cyclodextrin capillary β-DEX 250 (60 m length, 0.25 mm ID, and 0.25 μm film thickness) column을 사용하였다. 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℃이었다.

결과 및 고찰

EH활성을 이용한 라세믹 ECH의 입체선택적 가수분해 반응조건 영향분석

A. niger 등을 생축매로 이용하여 수용액상에서 입체선택적 가수분해반응을 수행한 결과 초기농도 10 mM의 저농도에서 2% 수준의 매우 낮은 수율로 광학활성 ECH를 얻은 결과를 얻었다(5). 이는 ECH의 구조상 수용액상에서의 기질 안정성이 낮아 자발적인 분해반응이 일어났기 때문으로, 생축매 없이도 10 mM의 ECH는 수용액상에서 약 5시간정도 지나면 전부 분해될 수 있다. 이러한 기질의 수용액상에서의 불안정성 문제점을 극복하기 위하여 유기용매 상에서의 생축매 반응을 수행한 결과가 보고되었는데, 생축매 활성 저하가 상대적으로 작은 cyclohexane, dodecane 등을 유기용매로 선별하였으며, 이들 유기용매 상에서의 반응을 통해 초기농도를 60 mM까지 증가시켰으며, 수율도 20% 정도로 향상시킬 수 있었다(6). 이 방법의 문제점은 유기용매 상에서의 생축매 활성

이 저하되어 반응시간이 15시간 정도로 매우 길어진다는 단점이 있다.

라세믹 ECH에 대한 입체선택적 가수분해 활성이 있는 *R. toruloides* SJ-4를 이용하여 수용액상에서 광학순도가 높은 (R)-ECH를 회분식으로 효율적으로 생산하기 위하여 반응 pH, 온도, 초기 기질 농도가 반응속도 및 입체선택성에 미치는 영향을 분석하였다. 일반적으로 에폭사이드 가수분해효소는 α/β hydrolase fold에 속하는 효소로 촉매 활성 부위에 존재하는 catalytic triad를 구성하는 aspartic acid의 카르복실기가 oxirane ring에 대해 친핵성 반응을 함으로써 glycol-monoester-enzyme intermediate가 생성되면서 가수분해 반응이 진행된다(3). 따라서, 반응용액의 pH가 낮으면 카르복실기가 중성 (-COOH)이 되므로 촉매 활성이 낮아지는 등 pH가 가수분해 반응에 미치는 영향을 살펴보았다. pH 5.0에서의 상대적 ee 값이 86% 정도를 보였으며 반응속도도 가장 낮았으며, pH가 8.0에서 상대적 ee 값이 가장 높았으며 반응속도도 16.2 nmole/mg · min으로 가장 높았다. 입체특이성 가수분해 반응에 대한 온도의 영향을 알아보기 위하여 10 - 40°C의 온도 구간에서 초기 가수분해 속도 및 광학순도를 측정하였다. 온도 변화에 따른 (S)-ECH에 대한 초기 가수분해 속도를 살펴보면, 최적 온도가 35°C 부근임을 알 수 있었다(data not shown). ECH는 세포 및 효소에 대한 독성이 있는 물질이므로 고농도의 초기 ECH 농도는 반응속도를 저해시킬 수 있다. 따라서, 20 - 300 mM까지 다양한 초기농도에서 시간에 따른 광학순도 변화를 측정하였다. Fig. 2에서와 같이 약 100 mM까지의 초기농도에서는 약 6시간의 반응을 통해 광학순도 100% ee의 (R)-ECH를 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 100 mM 이상에서는 장기간의 반응을 수행해도 상업적으로 의미 있는 최소광학순도인 98% ee 이상을 얻을 수 없었다. 수율을 살펴보면, 광학순도 99% ee 이상 얻을 수 있었던 초기농도에서도 초기농도가 낮을수록 수율이 높았는데, 20 mM에서는 11.0% 수준을 얻을 수 있었으며, 100 mM에서는 5% 미만의 낮은 수율만을 얻을 수 있었다.

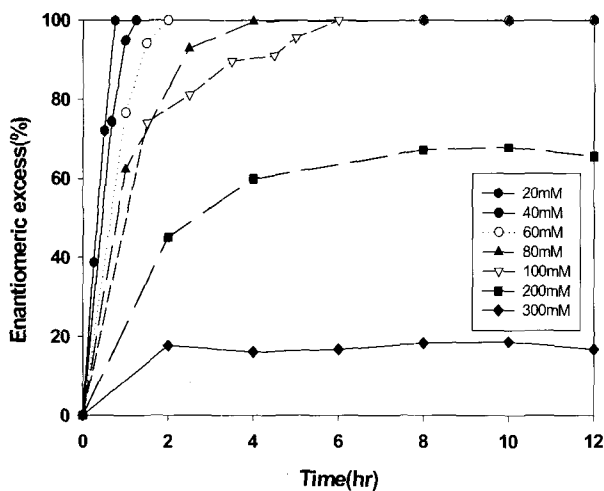


Figure 2. Effect of initial ECH concentration on enantioselective resolution of racemic substrate by *R. toruloides* SJ-4.

Detergent 첨가가 가수분해반응속도 및 입체선택성에 미치는 영향 분석

*R. toruloides*처럼 yeast 계열인 *Rhodotorula glutinis*로부터 분리한 EH 효소를 생촉매로 사용하여 라세믹 1,2-epoxyhexane을 광학분할하는 반응에서 Thesit, sucrosemonolaurate 등의 비이온성 detergent를 첨가하는 경우 입체선택성을 향상시킬 수 있다는 결과가 보고되었다. 이러한 결과는 *R. glutinis*의 EH가 membrane-associated형 단백질로 detergent를 첨가하는 경우 EH 단백질에 대해 보다 활성이 잘 유지될 수 있는 친화적인 환경이 제공되기 때문이며, 오히려 순수한 형태로 분리정제하는 경우 활성 저하가 크게 일어났다(13). 세포 자체를 생촉매로 사용하는 경우에서의 이러한 효과를 얻을 수 있는지를 알아보기 위하여 detergent 첨가가 가수분해반응속도 및 입체선택성에 미치는 영향을 살펴보았다.

Fig. 3에서와 같이 비이온성 detergent인 Tween 20을 2% (v/v)로 첨가한 반응에서 수율이 25%까지 증가된 결과를 얻을 수 있었다. 반응 시간도 30분에서 20분 수준으로 감소되어 Tween 20 첨가에 따른 가수분해 반응속도가 향상되었음을 알 수 있었다. 첨가되는 Tween 20의 농도에 따른 가수분해 반응속도 향상 정도를 보기 위하여 10% (v/v) 농도까지 다양한 농도로 Tween 20을 첨가한 경우에서 초기 가수분해 반응속도를 측정해 본 결과 유사한 결과를 보여주었는데(data not shown), micelle이 형성되는 최소농도이상에서는 Tween 20 첨가량에 따른 가수분해반응속도 향상 정도는 비슷함을 알 수 있었다.

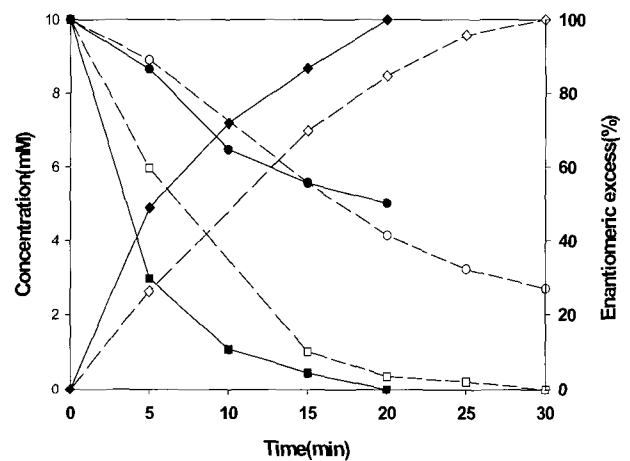


Figure 3. Effect of addition of Tween 20 on enantioselective resolution of racemic ECH by *R. toruloides* SJ-4 (Symbol: (R)-ECH (●), (S)-ECH (■), enantiomeric excess (◆) in the presence of Tween 20; (R)-ECH (○), (S)-ECH (□), enantiomeric excess (◇) in the absence of Tween 20).

입체선택성 가수분해 반응을 이용한 (R)-ECH 생산

중요 회분식 반응조건인 pH, 반응온도, Tween 20 첨가량에 대해 결정된 최적조건인 pH 8, 온도 35°C 및 2% (v/v)의 Tween 20 존재하에서 초기농도 80 mM의 고농도 라세믹 ECH에 대한 입체선택적 광학분할 실험을 수행하였다(Fig. 4).

반응용액의 pH를 8로 조정한 100 mM phosphate 완충용액에 200 mg의 *R. toruloides* SJ-4, 1.0 ml의 Tween 20 및 80 mM (total vol. = 50 ml)의 고농도 라세믹 ECH 기질을 넣은 다음 35°C, 300 rpm에서 교반하면서 입체선택적 가수분해 반응을 수행하였다. Fig. 4에서와 같이 약 1.2시간 정도의 반응을 통해 ee 값이 100%인 (R)-ECH를 12.5% 정도 (이론수율 = 50%)의 수율로 얻었다. 이 결과는 기존의 수용액 연구 결과 대비 수율을 6배 이상 향상시킬 수 있었으며, 유기용매에서의 반응 결과와 비교해서는 유사한 수율을 얻었으나 반응시간을 15시간에서 1.2 시간으로 크게 줄일 수 있었다. *R. toruloides* 유래의 입체선택적 가수분해능이 있는 epoxide hydrolase 활성을 이용하여 라세믹 에피클로로하이드린 기질을 가수분해를 진행할 때, 초기에는 효과적인 광학분할 반응을 진행이 되다가 시간 경과에 따라 반응속도가 감소되어 광학분할 반응이 지연되어 수율 저하가 일어나는 현상을 60 mM 이상의 고농도 반응에서 관측할 수 있었다. 이는 가수분해 반응이 진행됨에 따라 생성되는 산물인 2,3-dichloro-1-propanol에 의한 산물저해 현상 또는 반응시간 경과에 따른 에폭사이드 기질의 높은 반응성에 의한 생축매의 불활성화가 일어나기 때문으로 판단된다. 따라서, 이러한 문제점들을 극복할 수 있는 반응 시스템 및 생축매 개발이 요구되며, 이를 통해 에폭사이드 가수분해 효소를 이용하여 저가의 라세믹 에피클로로하이드린 기질로부터 고부가가치의 광학활성 에피클로로하이드린 생산의 수율 향상을 얻을 수 있을 것이다.

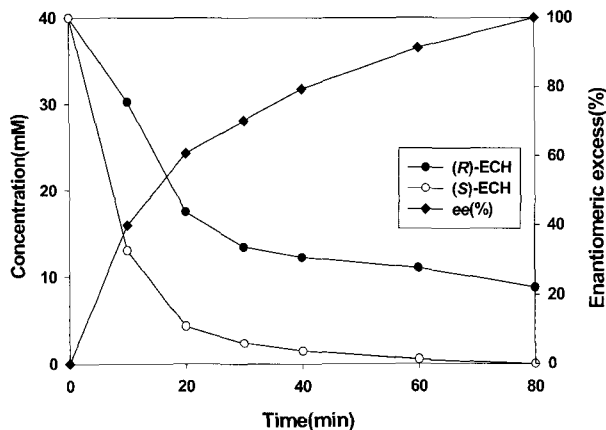


Figure 4. Batch enantioselective resolution of 80 mM racemic ECH for the preparation of (R)-ECH by *R. toruloides* SJ-4.

요약

라세믹 ECH 기질에 대한 입체선택적 가수분해 활성을 가진 *R. toruloides*를 생축매로 이용하여 광학활성 (R)-ECH를 생산하였다. EH의 입체선택적 가수분해능에 영향을 주는 실험인자들인 pH, 반응온도, 초기 ECH 농도 등이 초기 가수분해반응속도에 미치는 영향을 분석하고, 최적 회분식 반응조건을 결정하였다. 또한, Tween 20 등의 detergent를 첨가하여 가수분해 반응속도 및 입체선택성을 향상시킬 수 있었다. pH

8, 반응온도 35°C, 2% (v/v)의 Tween 20이 첨가된 조건에서 약 1.2시간의 반응을 통해 80 mM 라세믹 기질로부터 광학순도 100% ee인 (R)-ECH를 12.5% (이론수율 = 50%) 수율로 얻을 수 있었다.

REFERENCES

- Sheldon, R. A. (1993), *Chirotechnology*, Marcel Dekker, New York.
- Besse, P. and H. Veschambre (1994), Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
- Lee, E. Y. (2002), Epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution for the production of chiral epoxides, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 321-325.
- de Vries, E. J. and D. B. Janssen (2003), Biocatalytic conversion of epoxides, *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 1-7.
- 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.
- 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.
- Kasai, N., T. Suzuki, and Y. Furukawa (1998), Chiral C3 epoxides and halohydrins: their preparation and synthetic application, *J. Mol. Cat. B: Enz.* **4**, 237-252.
- Kasai, N., K. Tsujimura, K. Unoura, and T. Suzuki (1992), Isolation of (S)-2,3-dichloro-1-propanol assimilating bacterium, its characterization, and its use in preparation of (R)-2,3-dichloro-1-propanol and (S)-epichlorohydrin, *J. Ind. Microbiol.* **10**, 37-43.
- 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.
- Kasai, N., K. Tsujimura, K. Unoura, and T. Suzuki (1990), Degradation of 2,3-dichloro-1-propanol by a *Pseudomonas* sp., *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3185-3190.
- Nakamura, T., F. Yu, W. Mizunashi, and I. Watanabe (1991), Microbial transformation of prochiral 1,3-dichloro-2-propanol into optically active 3-chloro-1,2-propanediol, *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1931-1933.
- Suzuki, T., N. Kasai, R. Yamamoto, and N. Minamiura (1992), Isolation of a bacterium assimilating (R)-3-chloro-1,2-propanediol and production of (S)-3-chloro-1,2-propanediol using microbial resolution, *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 443-448.
- Kronenburg, N. A. E. and J. A. M. de Bont (2001), Effects of detergents on specific activity and enantioselectivity of the epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis*, *Enz. Microbiol. Technol.* **28**, 210-217.