한국생물공학회지 제16권 제3호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 16, No. 3, 259-263(2001)

미생물 입체선택성 가수분해반응을 이용한 광학활성 1,2-epoxy-7-octene 생산을 위한 Hollow-fiber 반응기 시스템 개발

†이 은 열 · 김 희 숙
경성대학교 공과대학 식품공학과
(접수 : 2001. 4. 16., 게재승인 : 2001. 5. 17.)

Development of Hollow-fiber Reactor System for the Production of Chiral 1,2-epoxy-7-octene by Microbial Enantioselective Hydrolysis Reaction

Eun Yeol Lee† and Hee Sook Kim
Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea
(Received : 2001. 4. 16., Accepted : 2001. 5. 17.)

The development of hollow fiber reactor system for the production of chiral 1,2-epoxy-7-octene by epoxide hydrolase for *Rhodotorula glutinis* was investigated. Dodecane with high solubility of the racemic substrate passed through the lumen side of the hollow fiber reactor and cell suspension was recirculated through the shell side. The 2nd hollow fiber reactor was coupled to the production reactor to extract the diol byproduct which was the inhibitor of epoxide hydrolase. Optically pure (*S*)-1,2-epoxy-7-octene (0.6 M in dodecane) could be obtained using hollow-fiber reactor system.

Key Words : hollow-fiber reactor, enantioselective hydrolysis, 1,2-epoxy-7-octene, *Rhodotorula glutinis*

서 론

대부분의 생리활성 물질들은 분자구조상에 비대칭 탄소가 있어 여러 가지의 광학이성질체(optical enantiomer)가 존재하며, 이러한 라세믹혼합물(racemic mixture)중에서 특정 이성질체만이 생리활성 작용을 수행하는 경우가 많으며 나머지 이성질체는 활성이 없거나 경우에 따라서는 심한 부작용을 유발하기도 한다(1). 따라서, 광학적으로 순수한 형태의 화합물만을 이용한 의약품 및 농약 등의 제조 필요성이 증가되고 있으며, 이러한 키랄 의약품 등의 합성을 위해서는 합성 전구체(synthetic precursor)로 사용되는 광학활성 중간체(chiral intermediate) 제조 기술 개발이 중요하다(2). 광학활성 중간체 중에 최근 많은 연구 대상이 되고 있는 키랄에폭사이드(chiral epoxide)는 불안정한 삼각링구조와 산소원자의 전기음성도로 인한 분자 극성이 존재하며 우수한 반응성을 가지고 있어 친핵성 반응, 친전자성 반응 등 다양한 반응을 유도할 수 있으므로 키랄의약품과 같은 고부가가치 화합물을 합성하기 위한 키랄중간체로 널리 이용 될 수 있다(3-6).

키랄에폭사이드는 화학적 비대칭합성(catalytic asymmetric synthesis)방법을 이용하여 제조할 수도 있으나, 입체선택성(enantioselectivity)이 우수한 생촉매를 사용하면 보다 효율적으로 제조할 수 있다. 특히, 각각의 광학이성질체에 대한 생촉매의 선택적 분해능 차이를 이용하여 단일 광학이성질체를 제조하는 입체선택성 광학분할(enantioselective resolution) 기술은 이론적 수율은 50%이지만 일반적으로 저가의 기질인 라세믹 에폭사이드의 경우에서는 상업적으로 유용한 방법이 될 수 있다. 라세믹 에폭사이드 기질을 선택적으로 가수분해시키는 특성을 가진 효소가 에폭사이드 가수분해 효소(epoxide hydrolase, EHase)이다(7). 미생물 유래의 epoxide hydrolase를 이용한 라세믹에폭사이드의 입체선택적 가수분해에 대한 연구가 보고되어 왔으나(8-10), 대부분 에폭사이드 기질들이 화학적으로 가수분해되어 광학적 순도가 낮을 수 있는 수용액상에서 광학분할 연구가 수행되었다(11). 또한 일반적으로 에폭사이드 기질은 수용액상에서는 용해도가 낮아 volumetric productivity를 향상시키는 데에는 제한이 많다. 이러한 문제점은 유기용매상에서 광학분할을 수행함으로써 극복할 수 있다(12). 그러나, 유기용매에서는 효소 등의 생촉매 활성이 저하

†Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea
Tel : +82-51-620-4716, Fax : +82-51-622-4986
E-mail : eylee@star.ksu.ac.kr

된다는 단점이 있다. 따라서 이러한 상반된 문제점들을 동시에 극복하기 위해서는 유기용매 및 수용액 두상을 동시에 사용할 수 있는 hollow-fiber membrane bioreactor를 이용할 수 있다(13-15). Hollow-fiber membrane을 중심으로 lumen 부위에는 기질을 녹인 유기용매상을 흘려보내고 생촉매는 shell 부위의 수용액상에 위치시킴으로써, 기질의 용해도 및 안정성을 향상시킴과 동시에 생촉매 활성을 높게 유지시킬 수 있다. Hollow-fiber membrane에 의해 제공되는 넓은 표면적을 통해 유기용매상의 기질이 생촉매가 있는 수용액상으로 물질전달이 일어나고 동시에 광학분할 반응을 수행할 수 있다. 본 연구에서는 preparative-scale 규모의 광학활성 에폭사이드 제조 공정 개발의 일환으로 라세믹 1,2-epoxy-7-octene 기질을 광학분할 할 수 있는 *Rhodotorula glutinis* 생촉매를 사용한 hollow-fiber membrane bioreactor system을 개발하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

생촉매로 사용한 효모세포인 *Rhodotorula glutinis* CIMW 147는 네덜란드 Wageningen Agricultural University의 산업미생물 연구부(Industrial Microbiology Division)로부터 제공받았으며, 0.2%(w/v) yeast extract와 2%(w/v) glucose를 포함하는 mineral 배지를 사용하여 30℃에서 48시간 진탕 배양하였다(16). 배양된 세포는 원심분리 후 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 씻은 후 농축하여 생촉매로 사용하였다.

유기용매의 선정

생촉매 불활성이 가장 적은 유기용매를 선정하기 위하여 여러종류의 유기용매상에서 1,2-epoxy-7-octene의 가수분해반응을 실시하였다. 유기용매 3 mL에 세포 농축액(0.95 g dry weight/5 mL)이 들어 있는 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)로 전체 용량을 10 mL로 만들고 0.2 mmol 1,2-epoxy-7-octene을 첨가한 후, 35℃, 200 rpm 조건의 진탕배양기에서 3시간 동안 반응을 수행하였다. 일정한 시간간격으로 1 mL의 샘플을 채취하고 1 mL의 ethyl acetate와 혼합시킨 후 유기용매층을 chiral GC로 분석하였다. 유기용매 및 수용액상에서의 1,2-epoxy-7-octene 분배계수는 같은 양의 두 용매층에 존재하는 기질의 양을 측정하여 결정하였다.

Diol의 저해 효과

1,2-Epoxy-7-octene의 가수분해반응에서 생기는 7-octene-1,2-diol에 의한 product inhibition 정도를 평가하기 위하여 0.5 g dry weight를 포함한 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)에 0.2 mmol 농도의 라세믹 1,2-epoxy-7-octene 기질과 여러 농도의 라세믹 7-octene-1,2-diol을 첨가하고 전체 용량을 10 mL로 만들었다. 35℃, 200 rpm의 진탕배양기에서 가수분해반응을 실시하였으며, 일정한 간격으로 샘플을 채취하여 chiral GC로 분석하였다.

광학선택적 가수분해 반응기 구성

Regenerated cellulose 중합체(Bio Nephross Allegro, COBE Nephross, The Netherlands)로 제조된 hollow-fiber를 사용하여 Figure 1과 같이 광학선택적 가수분해 반응기시스템을 구성하였다. Hollow-fiber membrane (diameter 200 μm, length 21 cm)의 총 표면적은 약 1.0 m^2이며, housing은 acrylonitrile-butadiene-styrene(ABS) 공중합체로 구성되어있다. 세포 현탁액 (7 g dry weight)을 포함한 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0, 160 mL)는 water bath를 이용하여 35℃로 유지시키면서 Masterflex pump를 이용해 100 mL/min의 속도로 1st hollow-fiber membrane의 shell side를 통해 순환시켰다. 라세믹 1,2-epoxy-7-octene 기질은 75 mL의 dodecane에 녹인 후 1st hollow-fiber membrane의 lumen side에서 counter-current로 500 mL/min의 속도로 순환시켰다. 가수분해반응에서 생기는 7-octene-1,2-diol을 추출하기 위하여 2nd hollow-fiber membrane을 사용하였다. Diol 추출용 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0, 160 mL)는 2nd hollow-fiber membrane의 lumen side로 흘려주어 세포 현탁액에 포함되어 있는 diol을 추출하여 제거하였다. 또한, phosphate buffer와 dodecane을 reservoir에서 혼합시켜줌으로써 diol 추출 용액 중에 포함된 미반응 기질과 dodecane층에 포함된 diol을 각각 반대 상으로 이동시켜주었다. 광학활성 1,2-epoxy-7-octene의 광학순도 및 수율 측정을 위하여 유기용매상의 샘플 100 μL를 채취하여 10배 정도 희석시킨 후 chiral GC로 분석하였다. Diol 농도를 결정하기 위하여 수용액상에서 300 μL의 샘플을 채취하고 동량의 ethylacetate를 첨가한 후 유기용매층을 chiral GC로 분석하였다.

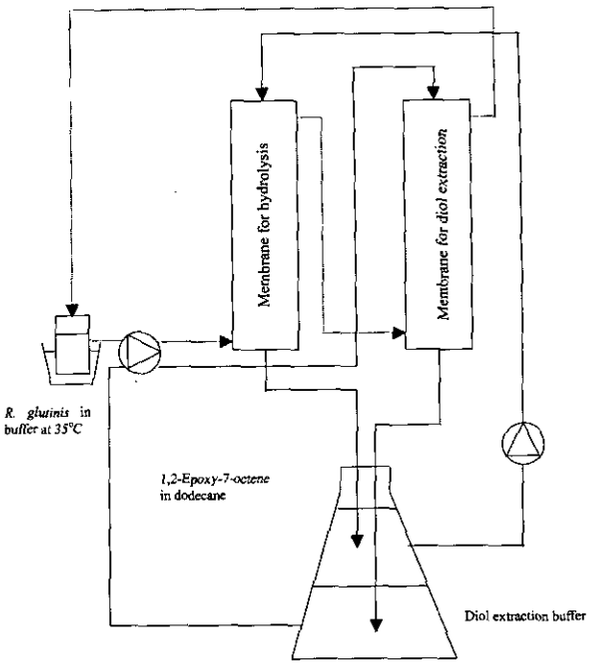

Figure 1. Schematics of a hollow-fiber bioreactor system for epoxide hydrolase-catalyzed resolution of racemic 1,2-epoxy-7-octene.

GC 분석

1,2-Epoxy-7-octene 및 7-octene-1,2-diol의 ee (enantiomeric excess = [(S-R)/(S+R)]x100%) 값 및 수율 결정을 위한 GC 분석은 불꽃이온 검출기(FID)가 장착된 가스크로마토그래프

Table 1. Enantioselective hydrolysis rate and partition coefficient of 1,2-epoxy-7-octene in various organic solvents

Organic solvent	Partition coefficient	Reaction rate[b]
None[a]	-	104
Hexane	140	58
Octane	145	62
Decane	148	65
Dodecane	142	70
Cyclohexane	150	50
Ethylacetate	300	0.04
Diethyl ether	350	1.8
Dichlormethane	380	3.4

[a]Hydrolysis was performed in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0) without organic solvent.
[b]Initial rate of epoxide hydrolysis in nmol/min · mg dw.

(Simazhu GC-17A, Japan)를 사용하였다. 분석용 column으로는 silica cyclodextrin capillary β-DEX 120 (30 m length, 0.25 mm ID, and 0.25 μm film thickness) column을 사용하였으며, 분석조건은 기존 문헌치를 이용하였다(9).

결과 및 고찰

유기 용매의 선정

라세믹 에폭사이드 기질의 대부분은 소수성 분자구조로 인하여 수용액상에 대한 용해도가 낮다. 또한, 수용액상에서는 물분자 자체가 친핵성 반응을 유도하여 에폭사이드 기질의 비선택적 가수분해 반응이 일어날 수도 있어 단순 수용액상에서의 입체선택적 가수분해 반응의 경우 생산성이 낮을 수 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위한 방법으로 유기 용매에서 입체선택적 가수분해 반응을 적용시킬 수 있는데, 이 경우 기질의 용해도 증가 및 에폭사이드 기질의 화학적 안정성을 통해 단위 체적당 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 그러나, 많은 경우 유기용매 자체가 효소 및 미생물 생촉매에 대한 활성 저해 효과를 주는 단점도 있으므로 이에 대한 극복 방법 개발 등이 필요하다(14). 본 연구에서는 에폭사이드 가수분해 효소에 대한 활성 저해 효과가 가장 적은 유기용매를 선발하기 위하여 여러종류의 유기용매를 이용하여 라세믹 1,2-epoxy-7-octene의 가수분해 반응을 시도하였다 (Table 1). 대조군으로 50 mM phosphate buffer에서의 반응을 고려하였으며, 수용액과 섞이지 않는 유기용매를 30%(v/v) 비율로 혼합한 용매상에서 가수분해반응을 진행하였다. Table 1에 제시되어 있는 결과와 같이 생촉매의 활성은 사용한 유기용매의 구조와 극성에 따라 많은 차이를 보여줌을 알 수 있었다. 유기용매 및 수용액 2성분 시스템에서의 생촉매 활성은 decane, dodecane 등의 소수성 유기용매에서의 활성이 ethylacetate, diethyl ether 등과 같은 극성용매에 비해 높은 활성을 보여주었다. 유기용매중 가장 높은 생촉매 활성을 보여준 dodecane의 경우 수용액 대비 약 70% 수준의 활성을 유지시킬 수 있어 hollow-fiber 반응기 시스템 개발에 사용할 유기용매로 선택하였다.

Table 2. Effect of 7-octene-1,2-diol on the enantioselective hydrolysis rate of 1,2-epoxy-7-octene

Diol conc. (mM)	Reaction rate[a]
0	104
30	110
60	89
100	40
200	36
400	1.4

[a]Initial rate of epoxide hydrolysis in nmol/min · mg dw

Diol의 저해 효과

일반적으로 생촉매 반응에 있어서 반응산물에 의한 효소 반응속도 저해가 일어날 수 있다. 에폭사이드 가수분해 효소의 경우 반응산물인 diol이 높은 농도에서는 저해 작용을 유발시킨다는 결과 보고가 있으므로 본 연구에서도 반응산물인 7-octene-1,2-diol의 저해 효과를 분석하였다. 50 mM Phosphate 완충용액에 0~400 mM 농도의 7-octene-1,2-diol을 첨가한 후 1,2-epoxy-7-octene에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 실시하였다. Diol의 농도가 60 mM 수준까지는 약 90% 정도까지 생촉매 활성을 유지하는 결과를 보인 반면, 100 mM 이상의 농도에서는 급격한 활성 감소 현상이 일어났으며, 400 mM 농도에서는 거의 활성을 얻을 수가 없었다 (Table 2). 이와 같은 결과로부터 고농도 가수분해 반응에서 필연적으로 수반되는 고농도의 diol 산물 생성에 따른 생촉매 반응속도 저해 현상을 극복할 수 있는 반응기 시스템 구성이 필요함을 알 수 있다.

Hollow-fiber membrane을 이용한 고농도 1,2-epoxy-7-octene의 광학분할

유기용매 및 수용액으로 구성된 2성분계에서 생촉매를 이용한 광학분할을 하는 경우, 유기용매 사용에 따른 기질 농도 증가라는 장점 이외에 유기용매 사용으로 인한 생촉매활성 감소라는 문제점을 극복하기 위하여 생촉매가 있는 수용액층과 기질이 들어있는 유기용매층을 분리한 상태에서 효율적인 물질전달과 더불어 입체선택적 가수분해 반응을 실시할 수 있는 hollow-fiber membrane을 이용하기로 하였다. 무극성의 유기용매가 생촉매가 있는 수용상으로 들어오는 것을 방지하기 위하여 hollow-fiber의 재질은 친수성 성질을 가진 regenerated cellulose를 사용하였다.

1,2-Epoxy-7-octene에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 실시한 수용액과 유기용매 2상 hollow-fiber membrane 반응기 시스템이 Figure 1에 제시되어 있다. 생촉매로 사용 할 *R. glutinis* 세포는 100 mM phosphate 완충용액(pH 8.0)에 현탁시켜 반응기 시스템의 첫 번째 hollow-fiber의 shell 부위를 통해 이동하면서 입체선택적 가수분해 반응을 하게 된다. 가수분해 반응 후 수용액상은 두 번째 hollow-fiber의 lumen 부위를 통과하게 되며, 이때 반응 생성물로써 생촉매 활성 저해 작용을 하는 diol은 shell 부위를 흐르는 diol 추출용 완충용액에 의해 추출 제거된다. 기질이 녹아 있는 유기용매층은 첫 번째 hollow-fiber 반응기의 lumen 부위를 통과하면서 막의 표면적을 통해 생촉매와 접촉하게 되면서 입체선택적 가

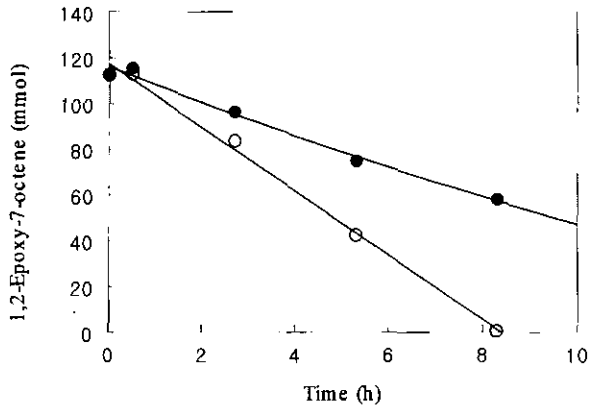

Figure 2. Kinetic resolution of racemic 1,2-epoxy-7-octene in hollow-fiber bioreactor system. ((*R*)-1,2-epoxy-7-octene (○) and (*S*)-1,2-epoxy -7-octene (●))

Table 3. Concentration of 1,2-epoxy-7-octene in dodecane, cell suspension and diol extraction buffer during kinetic resolution in the hollow-fiber reactor system

Time (h)	EPOXIDE dodecane (mM)		EPOXIDE cell suspension (mM)		EPOXIDE extraction buffer (mM)	
	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
0	1500	1500	0	0	0	0
0.5	1445	1455	0	1.8	1.9	2.6
2.7	1087	1155	0	6.8	0.9	3.6
5.3	564	825	0	8.7	0	4.8
8.3	6.9	620	0	6.9	0	4.1

수분해 반응이 일어나게 된다. 두 번째 hollow-fiber 반응기를 통과한 diol 추출용 완충용액과 첫 번째 hollow-fiber 반응기를 통과한 유기용매층은 삼각플라스크에서 혼합되게 되며, 이곳에서 dodecane층에 포함된 diol은 완충용액상으로, 그리고 완충용액상에 포함된 1,2-epoxy-7-octene은 dodecane층으로 이동하게 되어 광학분할 수율을 높이고자 하였다.

고농도의 라세믹 에폭사이드에 대한 광학분할을 위해 구성한 2단 hollow-fiber 반응기 시스템을 이용하여 48 mL의 dodecane에 226 mmol의 1,2-epoxy-7-octene 기질을 공급한 후 에폭사이드 가수분해효소 활성을 이용한 입체선택적 가수 분해 반응을 수행하였다. 8시간 정도의 반응을 통해 광학적으로 순수한(>98% ee) (*S*)-1,2-epoxy-7-octene(6.9 g, 55 mmol, 24% yield)을 얻을 수 있었다 (Figure 2). 반응기 운전상의 초기 가수분해 속도와 enantiomeric rate (E) 값은 각각 60 nmol/min, mg · dw와 7이였다. 유기용매인 dodecane, 생촉매가 현탁된 수용액상 그리고 diol 추출용 완충용액상에 포함된 1,2-epoxy-7-octene의 농도를 각각 분석해 본 결과, 목적 생산물인 (S)-1,2-epoxy-7-octene은 대부분 dodecane 층에 존재하고 있음을 확인 할 수 있었다 (*Table 3*). 그러나, *lumen* 부위의 dodecane 층이 shell 부위로의 이동으로 인하여 세포 현탁액 및 추출 완충용액층에서도 목적 대상물인 (S)-1,2-epoxy-7-octene이 존재하고 있었는데, 이는 수율 저하의 한 원인이 되기도 하므로 이에 대한 개선이 필요함을 알 수 있었다. 결론적으로, 새로운 반응기 시스템을 이용하여 고농도의 에폭사이드를 고효율로 광학분할 할 수 있음을 알 수 있었고, 이러한 반응기 시스템은 반응성이 우수한 에폭사이드 기질이 수용액상에서 자발적 분해과정을 통해 수율이 낮아지는 단점과 소수성 구조를 가진 기질의 수용액상에서의 낮은 용해도로 인한 생산성 저하라는 두가지 문제점을 극복할 수 있는 시스템으로 평가 할 수 있었다.

요 약

*Rhodotorula glutinis*의 epoxide hydrolase 활성에 의한 입체선택적 가수분해 반응을 이용하여 광학활성 1,2-epoxy-7-*octene*을 고농도로 생산할 수 있는 hollow-fiber 반응기 시스템을 개발하였다. 라세믹 에폭사이드 기질의 수용액 상에서의 불안정성 및 낮은 용해도를 극복하기 위하여 dodecane 유기용매에 용해시켜 hollow-fiber 반응기의 lumen 부위로 공급하였으며, 생촉매인 *R. glutinis* 세포 현탁액은 shell 부위로 공급하여 막 표면에서 입체선택적 가수분해 반응을 수행하였다.반응 산물로 생성되는 diol에 의한 생촉매 활성 저해효과를 감소시키기 위하여 2번째 hollow-fiber 반응기에서는 완충용액을 이용하여 diol을 추출하여 제거시켰다. 2단계 및 2성분 용매를 사용한 hollow-fiber 반응기 시스템을 이용하여 0.6 M의 고농도 라세믹 기질로부터 광학적으로 순수한(>98% ee) (*S*)-1,2-epoxy-7-octene(6.9 g, 55 mmol, 24% yield; 이론 수율 50%)을 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 1999년도 한국학술진흥재단의 신진교수 연구과제(과제번호 KRF-99-003-E00465) 및 일부는 2000년도 선도과제(과제번호 KRF-2000-041-E00373)의 지원으로 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다. 반응기 구성 및 연구결과에 대해 조언을 해 주신 네덜란드 바게닝겐 대학의 Weijers 박사님과 서울대 최원재 박사님, 그리고 GC 분석 및 실험을 도와 준 윤성준 학생에게도 감사드립니다.

REFERENCES

1. Sheldon, R. A. (1993), Chirotechnology, Marcel Dekker, New York.
2. Stinson, S. C. (1997), Chiral drug market shows signs of maturity, *C&EN.* **75**, 38-70.
3. Lee, E. Y., W. J. Choi, S. J. Yoon, H. S. Kim, and C. Y. Choi (1999), Biocatalytic production of chiral epoxides, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 291-296.
4. de Bont, J. A. M. (1993), Biotransformation of optically pure epoxides, *Tetrahedron, Asymmetry* **4**, 1331-1340.
5. Besse, P. and H. Veschambre (1994), Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
6. Archelas, A. and R. Furstoss (1999), Biocatalytic approaches for the synthesis of enantiopure epoxides, *Topics in Current Chemistry* **200**, 159-191.
7. Orru, R. V. A. and K. Faber (1999), Stereoselectivities of

microbial epoxide hydrolases, *Current Opinion in Chemical Biology*. **3**, 16-21.
8. 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. Enzymatic* **6**, 199-214.
9. 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.
10. Zhang, J., J. Reddy, C. Roberge, C. Senanayake, R. Greas, and M. Chartrain (1995), Chiral bio-resolution of racemic indene oxide by fungal epoxide hydrolases, *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 244-246.
11. Pedragosa-Moreau, S., C. Morisseau, J. Baratti, J. Zylber, and R. Furstoss (1997), Microbiological transformations 37. An enantioconvergent synthesis of the β-blocker (R)-Nifknalol® using a combined chemoenzymatic approach, *Tetrahedron* **53**, 9707-9714.
12. Choi, W. J., E. Y. Lee, S. J. Yoon, S. T. Yang, and C. Y. Choi (1999), Biocatalytic production of chiral epichlorohydrin in organic solvents, *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 339-341.
13. 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.
14. Klibanov, A. M. (1997), Why are enzyme less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol.* **15**, 97-101.
15. Vermue, M., J. Sikkema, A. Verheul, R. Bakker, and J. Tramper (1993), Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* sp. and the gram negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* sp., *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 747-758.
16. Weijers, C. A. G. M (1997), Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*, *Tetrahedron: Asymmetry* **8**, 639-647.