

반응표면분석법을 이용한 광학활성 phenyl oxirane의 회분식생산 최적화

김희숙 · 박성훈¹ · 이은열*

경성대학교 공과대학 식품공학과

¹부산대학교 공과대학 화학공학과

Optimization of Batch Production of Chiral Phenyl Oxirane by Response Surface Analysis

Hee Sook Kim, Sunghoon Park¹ and Eun Yeol Lee*

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

¹Department of Chemical Engineering, College of Engineering,
Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Abstract

Batch production of (S)-phenyl oxirane was investigated using epoxide hydrolase activity of *Rhodospiridium toruloides* SJ-4. Effect of reaction condition of asymmetric bihydrolysis of racemic phenyl oxirane was analyzed and optimized by response surface methodology. The optimal conditions of pH, temperature and DMSO cosolvent ratio were 7.4, 34 °C, and 2.3%(v/v), respectively. The final yield was enhanced up to 67%, and reaction times required to reach 99% ee (enantiomeric excess) decreased down to 50% by response surface methodology. Enantiopure (S)-phenyl oxirane with 100% enantiopurity and 24% yield (theoretical yield = 50%) was obtained from racemic substrate.

Key words – asymmetric bihydrolysis, epoxide hydrolase, phenyl oxirane, *Rhodospiridium toruloides*

서 론

Oxirane ring의 불안정성 및 산소 원자의 전기음성도에 기인한 극성 때문에 에폭사이드 (epoxide)는 반응성이 대단히 우수하여 친전자성반응, 친핵성반응, 산·염기반응, 산화·환원반응 등 다양한 반응을 유도할 수 있다[5]. 이러한 다양한 반응성과 함께 광학 성질을 가지는 광학활성 에폭사이드(chiral epoxide)는 광학활성 의약품, 농약 및 기능

성 식품의 합성용 중간체로 널리 사용되는 고부가가치 광학활성 중간체이다[1].

광학활성 에폭사이드는 여러 종류의 키랄화학촉매를 이용한 asymmetric chemocatalysis 또는 monooxygenase 및 epoxide hydrolase 등의 생촉매를 이용하여 제조할 수 있다[6,8]. 최근에는 라세믹 에폭사이드 기질들의 광학이성질체에 대한 에폭사이드 가수분해효소 (epoxide hydrolase, EH)의 선택적 분해능 차이를 이용하여 단일 광학이성질체만을 제조하는 입체선택적 광학분할 (enantioselective resolution) 기술을 이용한 광학활성 에폭사이드 제조기술의 상업화에 대한 관심이 증대되고 있다[9,10]. 상업용 촉매

*To whom all correspondence should be addressed

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

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

로써의 EH 특성을 분석해보면, monooxygenase 등의 산화 효소에 비하여 1) cofactor 가 요구되지 않고, 따라서, 2) 세포 자체를 생축매로 쉽게 이용할 수 있으며, 3) 일반적으로 유도 (induction) 과정을 거치지 않아도 효소가 constitutive 하게 발현되며, 4) monooxygenase에 비해 안정된 구조를 가지고 있어 상업적 응용성이 큰 생축매로 평가 할 수 있다 [7].

본 논문에서는 epoxide hydrolase가 있는 yeast인 *Rhodospiridium toruloides* SJ-4를 생축매로 사용하여 고부가가치 광학활성 phenyl oxirane을 경제성 있게 생산할 수 있는 회분식 생산을 최적화하고자 하였다. 원료인 라세믹 (R, S)-phenyl oxirane으로부터 epoxide hydrolase의 enantioselectivity를 이용하여 (R)-phenyl oxirane만을 입체선택적으로 가수분해시켜 제거함으로써 광학순도 98% 이상의 (S)-phenyl oxirane을 제조하는 경제성 있는 청정생산공정을 개발하고자 하였다. 각 광학이성질체에 대한 epoxide hydrolase의 비대칭 가수분해 (asymmetric hydrolysis) 반응을 이용하여 단일 광학이성질체만을 제조하는 방법은 이론적 수율은 50%이므로 반응조건 최적화에 널리 사용되고 있는 실험계획법인 반응표면분석법을 이용하여 회분식 생산조건을 최적화하였다.

실험재료 및 방법

세포 배양

Rhodospiridium toruloides SJ-4를 배양하기 위한 배지로 는 1%(w/v) yeast extract, 1%(w/v) glucose를 포함하는 YPD배지(Peptone 10 g/l, NaCl 2 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.147 g/l, NaH₂PO₄ 1.3 g/l, K₂HPO₄ 4.4 g/l)를 사용하였으며 [2], 배양온도 27°C, 250 rpm에서 48시간 진탕 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 후 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척 후 생축매로 사용하였다.

입체선택성 가수분해반응(enantioselective hydrolysis)

세포 400 mg (dry cell weight)을 10 ml의 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)에 현탁시킨 후 20 mM 라세믹 phenyl oxirane를 주입하였다. 반응기로는 screw-cap vial을 사용하였으며, 35°C, 250 rpm의 진탕배양기에서 30분 동안 가수분해 반응을 실시하여 초기반응속도를 결정하였

다. 반응 종료 후 반응액을 cyclohexane으로 추출한 후, 유기용매 층을 GC로 분석하여 초기 가수분해속도와 광학순도(enantiomeric excess, ee = [S-R]/[S+R]×100%)를 결정하였다. 기질인 라세믹 phenyl oxirane 및 enantiopure epoxide standard는 시약 등급을 구입하여 사용하였다.

Chiral 화합물의 GC 분석

Phenyl oxirane의 ee 값 및 수율 결정을 위한 GC분석은 불꽃이온 검출기(FID)가 장착된 가스크로마토그래피를 사용하였다. 분석용 column으로는 silica cyclodextrin capillary β-DEX 120 (30m 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°C였다[3,4].

결과 및 토론

반응 표면 분석법을 이용한 *R. toruloides* SJ-4에 의한 chiral phenyl oxirane 회분식 제조조건 최적화

R. toruloides SJ-4 유래의 epoxide hydrolase activity를 이용한 라세믹 phenyl oxirane의 입체선택적 가수분해 반응에 있어서 주요 반응 조건인 pH, 온도 및 에폭사이드 기질의 용해도 증가를 위해 첨가되는 DMSO(dimethyl sulfoxide) 등의 cosolvent 등이 입체선택적 가수분해반응에 미치는 영향을 분석하고, 최적 반응조건을 결정하기 위하여 반응표면 분석법(response surface analysis)을 사용하였다. 중심합성계획법(central composite design)을 이용하여 실험점들을 결정하였으며, 2차 회귀모형의 계수를 결정하기 위한 회귀 분석은 Statistical Analysis System (SAS)을 사용하여 분석하였다.

Response surface analysis를 이용한 최적 반응조건 결정

중요 실험인자인 pH, 반응온도, cosolvent 등은 복합적인 상호작용이 예상되므로 이러한 실험인자의 변화가 가수분해 속도에 미치는 영향을 반응표면 분석법을 이용하여 통계적으로 분석하여 최적 반응조건을 결정하였다. 세 가지 실험 인자에 대하여 각각 -2, -1, 0, 1, 2의 다섯 단계의

실험수준으로 나누고 (Table 1), 중심합성 계획법에 따라 총 $2^K + 2K + N_0$ (K: 변수의 개수, N_0 : 중심점의 개수)개의 실험점을 결정하였다. 실험점은 8개의 요인실험점, 6개의 축점, 그리고 1개의 중심점을 포함하여 총 15개로 구성하였다. 각각 2번 반복 실험한 결과를 이용하였으며, 실험조건과 (R)-phenyl oxirane 분해 속도와의 함수관계는 다음과 같은 2차 회귀식을 사용하였다.

$$y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2$$

여기서 y는 분해 속도(%)이며 X_1, X_2, X_3 는 각각 pH, 반응온도(°C), cosolvent 첨가량(%(v/v))이며 β_0 는 절편, β_n 은 회귀계수이다. 실험 결과 해석은 SAS 프로그램을 사용하였다.

중심합성법에 의한 반응 표면 분석

Table 2에 제시되어 있는 각각의 실험점에서 얻은 실험값을 대상으로 SAS 프로그램을 이용하여 실험결과를 분석하였다. 전체 9개의 total regression 분석에 대한 R^2 값이 0.987 ($p < 0.05$) 정도로 5% 유의 수준 이내에서 유의성이 인정되었으며, *R. toruloides* SJ-4의 epoxide hydrolase의 (R)-phenyl oxirane 가수분해 속도는 pH, 온도 및 cosolvent의 영향을 받음을 알 수 있었다. SAS 분석을 통해 pH, 온도, cosolvent 첨가량 변화에 따른 (R)-phenyl oxirane의 초기 가수분해 속도 변화를 나타내주는 반응표면에 대한 2차 회귀분석식은 아래와 같이 결정하였다.

$$y = 0.00236 - 0.00033X_1 - 0.00045X_2 + 0.00041X_3 + 0.00049X_1X_2 + 0.00051X_1X_3 - 0.00014X_2X_3 - 0.00117X_1^2 - 0.00119X_2^2 - 0.00060X_3^2$$

실험 parameter들에 대하여 각각 F-ratio 값을 분석한 결

Table 1. Level of enantioselective hydrolysis conditions in experimental design

Xn	Independent variables	Level				
		-2	-1	0	1	2
X1	pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
X2	Temperature(°C)	25	30	35	40	45
X3	cosolvent(%)	0	1	2	3	4

Table 2. Experimental data for initial hydrolysis rates under the different conditions of temperature, pH and the volume ratio of cosolvent.

Exp. No	Culture conditions			Data value
	Temp. (°C)	pH	Cosolvent (%)	
1	-1	-1	-1	0.00210
2	-1	-1	1	0.00189
3	-1	1	-1	0.00143
4	-1	1	1	0.00099
5	1	-1	-1	0.00146
6	1	-1	1	0.00189
7	1	1	-1	0.00124
8	1	1	1	0.00152
9	0	0	0	0.00231
10	-2	0	0	0.00149
11	2	0	0	0.00102
12	0	-2	0	0.00169
13	0	2	0	0.00089
14	0	0	-2	0.00135
15	0	0	2	0.00121

과, pH의 F-ratio 값이 60 ($p < 0.05$)으로 가장 높게 나타나 (R)-phenyl oxirane의 초기 가수분해 속도는 pH에 의해 가장 크게 영향을 받고 있음을 알 수 있었으며, 나머지 인자인 온도와 cosolvent 첨가량의 변화에 따른 영향은 각각 F-ratio 값이 40 ($p < 0.05$), 24 ($p < 0.05$)로 나타나 유의수준 5% 이내에서 모두 유의성을 인정받음을 알 수 있었다.

반응표면 곡선에 대한 전반적인 모습과 추정된 stationary point 값이 최대치를 주는지를 알아보기 위하여 canonical analysis를 실시한 결과, 2차 곡선에 대한 행렬식의 eigenvalues 값들이 pH, 반응온도, cosolvent 첨가량에 대해 모두다 음의 값들이 나와 반응표면이 위로 볼록한 곡면 형태임을 알 수 있었고, 따라서 최적조건인 최대점이 존재함을 알 수 있었다.

실험 인자중에서 가장 적은 영향을 주는 cosolvent 첨가량을 2.3%(v/v)로 결정한 후 pH 및 반응온도 변화에 따른 가수분해 속도 변화를 분석하였다. Fig. 1에서와 같이 contour plot을 통해 최적 pH를 7.3, 반응온도를 34.4°C로 결정할 수 있었다. pH와 온도 변화에 따른 (R)-phenyl oxirane 가수분해 속도에 대한 3차원 반응표면이 Fig. 2에 나타나 있다.

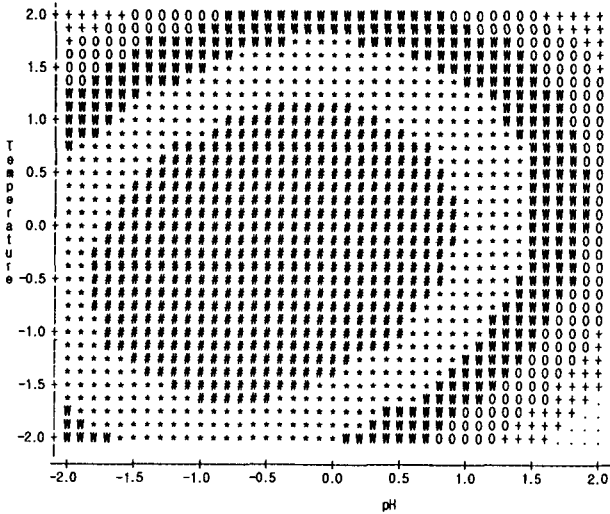


Fig. 1. Contour plot of the effect of pH and temperature on enantioselective hydrolysis reaction.

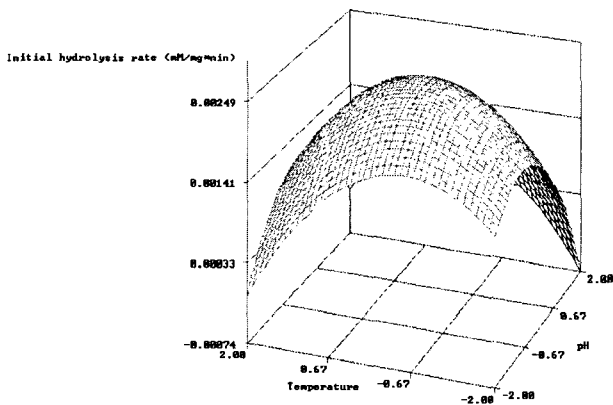


Fig. 2. Response surface of enantioselective hydrolysis reaction as a function of pH and temperature.

입체선택성 가수분해 반응을 이용한 (S)-phenyl oxirane 생산

반응표면 분석을 통해 얻은 최적 조건에서 *R. toruloides* SJ-4의 epoxide hydrolase 활성을 이용하여 100 mM 라세믹 phenyl oxirane에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 수행하였다. pH 7.4, 온도 34°C 및 cosolvent 첨가량 2.3% (v/v)의 최적 조건에서 400 mg (dry cell weight)의 균체를 10 ml reaction vessel에 넣은 다음 광학분할 실험을 수행하였다. Fig. 3에 나타난 것과 같이 약 3시간 정도의 반응을 통해 ee 값이 100%인 (S)-phenyl oxirane를 24% 정도(이론 수율 = 50%)의 수율로 얻을 수 있었다. 이 결과로부터 기

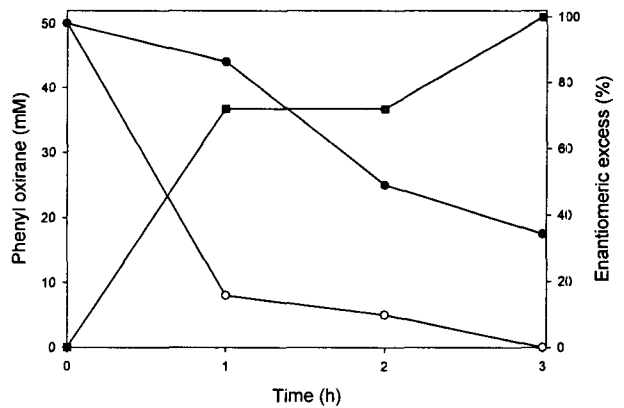


Fig. 3. Asymmetric biohydrolysis of racemic phenyl oxirane for the production of enantiopure phenyl oxirane by *R. toruloides* SJ-4 in batch reactor. (Symbol : (R)-Phenyl oxirane (○), (S)-Phenyl oxirane (●), enantiomeric excess (■))

존 조건에서의 회분식 분할 결과 대비 67% 정도의 수율 향상을 얻을 수 있었으며, 반응시간도 약 50% 정도 줄일 수 있었다.

요 약

라세믹 phenyl oxirane 기질에 대한 asymmetric biohydrolysis 활성이 우수한 *Rhodospiridium toruloides* SJ-4를 생촉매로 이용하여 입체선택적 가수분해 반응을 통해 라세믹 phenyl oxirane 기질로부터 광학활성 (S)-phenyl oxirane를 회분식으로 생산하는 실험을 수행하였다. (R)-phenyl oxirane 이성질체에 대한 초기 가수분해 속도에 영향을 주는 실험인자들인 pH, 반응온도, DMSO cosolvent 첨가량 등에 대해 중심합성계획법을 이용한 반응표면 분석을 통해 가수분해반응 속도를 향상시킬 수 있는 최적 반응조건을 결정하였다. pH 7.4, 반응온도 34°C 및 DMSO 첨가량 2.3%(v/v)의 조건에서 라세믹 기질 초기 농도 100 mM로부터 약 10시간 정도의 반응을 통해 ee 값이 100%인 광학적으로 순수한 (S)-phenyl oxirane를 24% 정도 (이론 수율 = 50%)의 높은 수율로 얻을 수 있었다.

참고 문헌

1. Archelas A. and R. Furstoss. 2001. Synthetic appli-

- cations of epoxide hydrolases. *Current Opinion in Chem. Biology* **5**, 112-119.
2. Botes, A. L., C. A. G. M. Weijers and M. S. van Dyk. 1998. Biocatalytic resolution of 1,2-epoxyoctane using resting cells of different yeast strains with novel epoxide hydrolase activities. *Biotechnol. Letters* **20**, 421-426.
 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. Tech.* **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. de Vries, E. J. and D. B. Janssen. 2003. Biocatalytic conversion of epoxides. *Current Opinion Biotechnol.* **14**, 1-7.
 6. Lee, E. Y. 2002. Epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution for the production of chiral epoxides. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 321-325.
 7. Moriseau, C., H. Nellaiah, A. Archelas, R. Furstoss and J. C. Baratti. 1997. Asymmetric hydrolysis of racemic *para*-nitrostyrene oxide using an epoxide hydrolase preparation from *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 46-452.
 8. Steinreiber, A. and K. Faber. 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations. *Current Opinion in Biotechnol.* **12**, 552-558.
 9. Tang, Y.-F., J.-H. Xu, Q. Ye and B. Schulze. 2001. Biocatalytic preparation of (*S*)-phenyl glycidyl ether using newly isolated *Bacillus megaterium* ECU1001. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **13**, 61-68.
 10. Weijers, C. A. G. M. 1997. Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*. *Tetrahedron: Asymmetry* **8**, 639-647.

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