

반응표면 분석법을 이용한 광학활성 styrene oxide의 생산조건 최적화

이은열, 윤성준, 배현철, 강진희
경성대학교 식품공학과

전화 (051) 620-4716, FAX (051) 622-4986

ABSTRACT

Chiral epoxides are useful chiral synthons in organic synthesis and various biological methods have been investigated for the production of chiral epoxides. In this work, enantioselective resolution of racemic styrene oxide was investigated using an isolated *Aspergillus niger* sp. for the production of optically pure (S)-styrene oxide. The enantioselectivity and initial hydrolysis rates of racemic substrate were highly dependent on the pH, temperature, and the volume ratio of cosolvent. The experimental sets of pH, temperature, and the volume ratio of cosolvent were designed using central composite experimental design, and the reaction conditions were optimized using response surface analysis. The optimal conditions of pH, temperature, and the volume ratio of cosolvent were determined to be 7.78, 28.32°C, and 2.4 % (v/v), respectively, and optically pure (S)-styrene oxide (> 99% ee) could be obtained with the 35 % yield by microbial enantioselective hydrolysis reaction.

INTRODUCTION

광학활성 중간체 중 최근에 많은 관심을 불러일으키는 물질이 바로 광학활성 에폭사이드(chiral epoxide)이며, 구조적 특성으로 인하여 반응성이 우수하며 키랄 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 합성 중간체 (synthetic intermediate)로 널리 사용될 수 있다(1). 이러한 에폭사이드 중간체 제조에 있어, 화학 비대칭 합성 (asymmetric synthesis) 등의 유기합성법과 효소 및 미생물 등의 생촉매(biocatalyst)를 이용한 방법들에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다(2, 3). 상업적 측면의 광학활성 에폭사이드 연구에 있어, 화학 비대칭 합성 (asymmetric synthesis) 등의 유기합성에 의한 제조와 효소 및 미생물 등의 생촉매(biocatalyst)를 이용한 광학활성 에폭사이드 합성법에 관한 연구가 진행되고 있지만, 각각 촉매가 너무 고가이고 특정 구조를 가진 에폭사이드에만 한정적으로 적용할 수 있으며, scale-up이 어렵다는 단

점과 cofactor의 재 순환이 요구되며, 효소 안정성이 낮고, 산물저해(product inhibition)가 심해 생산성이 낮다는 단점으로 인해, 에폭사이드 가수분해 효소(epoxide hydrolase)를 이용한 입체선택성 광학분할(enantioselective kinetic resolution) 방법이 최근 유용한 방법으로 인식되어지고 있다(4, 5). 또한 라세믹 혼합물에 대한 선택적 가수분해 속도 차이를 이용하여 단일 이성질체를 분리하는 방법이므로 일반적으로 저가인 라세믹 에폭사이드 기질에 대해서 상업성도 우수하다(6). 광학활성 styrene oxide는 β -blocker, non-steroidal antiinflammatory drug(NSAIDS) 등의 고부가가치 광학활성 의약품 합성용 전구체로 유용하게 이용될 수 있다. 본 연구에서는 라세믹 styrene oxide 기질을 입체선택적 가수분해능이 있는 *Aspergillus niger*를 이용해 고가의 광학활성 styrene oxide를 제조하고자 하였다. *A. niger*가 보유하고 있는 epoxide hydrolase 활성을 이용한 라세믹 styrene oxide의 광학분할에 있어서 주요 반응 조건인 pH, 온도 및 cosolvent 등이 광학분할반응에 미치는 영향을 분석하고, 반응표면 분석법 중 중심합성 계획법을 이용해 입체선택적 가수분해 반응 속도에 대한 여러 가지 환경 인자들의 최적 조건을 구해 상업적으로 유용한 광학활성 에폭사이드 중간체인 chiral styrene oxide를 생산하기 위한 반응기 운전 등에 활용할 수 있는 최적 생산 조건을 구하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

*Aspergillus niger*를 액체배지(glucose 10 g/L, corn-steep liquor(Sigma) 20 g/L)에 접종하여 27°C, 250 rpm에서 3일간 배양한 후 원심 분리하고 상등액을 제거하여 증류수(distilled water)로 두 번 정도 세척하였다. Wet pellet을 4°C에서 3~4일간 건조시켜 얻은 *A. niger* 건조분말을 생촉매로 사용하였으며, 반응은 27°C, 250 rpm으로 교반시키면서 Screw-cap flask에 *A. niger* 건조분말 30 mg을 1 ml의 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)에 현탁시킨 후 20 mM 라세믹 styrene oxide를 첨가함으로써 진행시켰다. 반응용액을 cyclohexane으로 추출한 후, 유기용매 층을 GC로 분석하여 enantiomeric excess (ee) 값 및 epoxide hydrolase의 활성을 평가하였다. *A. niger*의 에폭사이드 가수분해효소 활성을 이용한 광학분할 속도에 미치는 pH 및 온도의 영향을 분석하기 위하여 반응용액의 pH를 5.0 - 9.0, 온도를 20 - 40°C까지 변화시키면서 광학분할 실험을 수행하였다. 또한, 0 - 10 %(v/v)의 유기용매를 cosolvent로 첨가한 후 위에 제시된 반응조건에서 입체선택적 가수분해 반응을 수행하여 광학분할 속도에 미치는 유기용매 첨가 효과를 GC를 이용하여 정량 분석하였다.

RESULTS AND DISCUSSION

에폭사이드 가수분해효소 활성을 이용한 광학분할 속도에 미치는 pH, 온도 및

cosolvent의 영향을 분석한 결과 pH의 경우, 전반적으로 pH가 높을수록 높은 ee 값과 수율을 얻을 수 있었는데, pH 5.0에서의 ee 값은 97 % 정도를 보였으나 수율이 매우 낮았으며, pH 7.0에서 수율은 30.5 %로 가장 높았으나 ee 값이 75 % 이하로 낮게 나왔다. pH가 8.0의 경우, 수율은 26.4 % 정도를 보였으며, ee 값이 99% 이상으로 나와 가장 광학적으로 순수한 (*S*)-styrene oxide를 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 온도 변화에 따른 (*R*)-styrene oxide에 대한 초기 가수분해 속도를 살펴보면, 최적 온도가 30°C 부근임을 알 수 있었고, 30°C에서의 초기 가수분해속도 대비 20°C에서의 상대 초기 가수분해속도가 가장 낮은 값인 79 % 정도로 나타남을 알 수 있었다. 고농도의 기질을 가수분해하기 위한 공정 개발 등을 위해서는 유기용매 첨가로 인한 상반된 효과를 최적화할 수 있는 조건 결정이 중요하므로, 기질에 대한 용해도 및 수용액상과의 혼합성도 우수하고 생축매에 대한 독성도 상대적으로 작은 DMSO를 cosolvent로 선택하여 0 - 10 % (v/v)의 범위에서 가수분해 속도를 측정 한 결과, cosolvent의 volume 비율이 증가함에 따라 증가하다가 감소한 후 다시 약간 증가하는 현상을 나타내었으며 약 3 % (v/v)에서 상대적으로 높은 가수분해속도를 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 입체특이성 가수분해 반응에서 중요 실험인자인 pH, 반응온도, cosolvent, 초기 기질농도, 반응시간 등은 독립 실험인자이지만, 실험인자 상호간의 복합적인 작용이 예상되므로 이러한 실험인자의 변화가 가수분해 속도에 미치는 영향을 반응표면 분석법을 이용하여 통계적으로 분석하고 최적화하는 실험을 실시하였으며, 반응표면 분석을 위한 실험 계획법으로는 적은 횟수의 실험으로 임계점(stationary point)까지 감지 할 수 있는 중심합성계획(central composite design)법을 사용하였고, 가장 중요한 세 개의 실험인자인 pH, 반응온도, cosolvent 첨가량을 -2, -1, 0, 1, 2의 다섯 단계의 실험수준으로 나누었다. 독립 실험인자들인 pH, 온도 및 cosolvent 첨가량의 변화에 따른 (*R*)-styrene oxide의 초기 가수분해 속도의 변화 양상을 살펴본 결과 전체 9개의 total regression 분석에 대한 R^2 값이 0.9558($p < 0.05$) 정도로 5 % 유의 수준 이내에서 유의성이 인정되었으며, (*R*)-styrene oxide의 초기 가수분해 속도는 pH, 온도 및 cosolvent의 영향을 받고 있음을 알 수 있었다. 실험 인자들의 상대적 중요성을 알 수 있는 F-ratio 값을 분석한 결과, pH, 온도, cosolvent의 F-ratio 값이 각각 13.659($p < 0.01$), 7.576($p < 0.05$), 7.690($p < 0.05$)으로 나타나 (*R*)-styrene oxide의 초기 가수분해 속도는 pH에 의해 가장 크게 영향을 받고 있음을 알 수 있었으며, 유의수준 5% 이내에서 모두 유의성을 인정받을 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 곡면을 가져 최대점을 가지고 있음을 알 수 있었다. 실험인자들 중에서 (*R*)-styrene

oxide의 초기 가수분해 속도에 상대적으로 적은 영향을 미치는 변수인 cosolvent 첨가량을 최적값인 2.4 %(v/v)로 정한 후 pH 및 반응온도 변화에 따른 초기 가수분해 속도 변화에 대한 contour plot을 실시한 결과, 최적의 pH의 범위는 7.375 ~ 8.25 정도였고 온도 범위는 23.5 ~ 33.5°C 영역으로 결정되었다. 반응용액의 pH 변화에 따라 (*R*)-styrene oxide의 초기분해속도가 가장 큰 영향을 받는다는 사실로부터 효소 활성점에 있는 aspartic acid가 oxirane ring에 대해 친핵성 공격을 통한 효과적인 가수분해 반응을 위해서는 pH 조절이 매우 중요함을 알 수 있었고, cosolvent 첨가량에 따른 (*R*)-styrene oxide의 초기 가수분해 속도가 그다지 크지 않은 영향을 받은 이유는 cosolvent 첨가에 따른 기질의 용해도 증가라는 긍정적 효과와 유기용매 첨가에 따른 생촉매 활성 저하 효과가 일정부분 서로 상쇄되었기 때문으로 판단된다. 반응표면 분석을 통해 결정한 최적조건인 pH 7.78, 온도 28.3 2°C 및 cosolvent 첨가량 2.40 %(v/v)에서 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 광학분할 실험을 수행한 결과, 약 10시간 정도의 반응을 통해 ee 값이 100 %인 광학적으로 순수한 (*S*)-styrene oxide를 35 % 정도(이론수율 = 50 %)의 높은 수율로 얻을 수 있었다. 본 연구에서 얻은 입체선택적 가수분해 조건 최적화 결과들은 *A. niger* 등의 미생물 유래의 epoxide hydrolase 활성을 이용한 고부가가치의 광학활성 에폭사이드 중간체 제조를 위한 반응기 시스템 개발 등에 응용될 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. Besse, P. and H. Veschambre, Chemical and biological synthesis of chiral epoxides(1994), *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
2. Leak, D. J., P. J. Aikens and M. Seyed-Mahmoudian, The microbial production of epoxides(1992), **TIBTECH** **10**, 256-261.
3. Mahmoudian, M. and A. L. O. Michael, Biocatalysts for production of chiral epoxides(1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 23-27.
4. Weijers C. A. G. M., A. de Haan, J. A. M. de Bont, Chiral resolution of 2,3-epoxy alkanes by *Xanthobacter* Py2(1988), *Appl. Microbiol. Biotech.* **27**, 337-340.
5. Lee, E. Y., W. J. Choi, S. J. Yoon, H. S. Kim and C. Y. Choi, Biocatalytic production of chiral epoxides(1999). *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 291-296.
6. Choi, W. J., E. C. Huh, H. J. Park, E. Y. Lee and C. Y. Choi, Kinetic resolution for optically active epoxides by microbial enantioselective hydrolysis(1998), *Biotechnol. Techniques* **12**, 225-228.