

에폭사이드 가수분해효소에 의한 광학수렴반응을 이용한 광학활성 에폭사이드 및 Vicinal Diol 제조

이 은 열

경성대학교 공과대학 식품생명공학과

(접수 : 2007. 4. 20., 게재승인 : 2007. 6. 20.)

Enantioconvergent Hydrolysis of Racemic Epoxides for Production of Enantiopure Epoxides and Vicinal Diols using Epoxide Hydrolases

Eun Yeol Lee

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

(Received : 2007. 4. 20., Accepted : 2007. 6. 20.)

One drawback of conventional kinetic resolution of racemic epoxides by epoxide hydrolase (EH) is that the theoretical yield can never exceed 50%. This 50% limitation can be overcome by using enantioconvergent process, in which both enantiomers of the racemic epoxide are transformed via stereochemically matching pathways into a single enantiopure diol as the sole product in 100% theoretical yield. In order to make a single enantiopure vicinal diol, the two enantiomers of the racemic epoxide must be hydrolyzed with retention and inversion of configuration each other. The EHs should be enantio- and regioselective at the same time. The enantioconvergent hydrolysis with EHs and relevant biotransformation for preparing enantiopure epoxides and vicinal diols with a high yield are reviewed.

Key Words : Enantioconvergent hydrolysis, enantioselectivity, epoxide hydrolase, enantiopure vicinal diol, regioselectivity

서 론

대부분의 생명현상에 작용하는 생체물질들은 광학활성(chirality)을 가지고 있다. 특히, 의약품의 경우 특정이성질체만이 약리활성을 가지고, 나머지 광학이성질체는 약효가 없거나 심각한 부작용을 일으키는 경우도 있다. 이러한 문제 때문에 미국 FDA에서는 1990년대 초반부터 각각의 광학이성질체에 대한 개별적인 임상을 요구하고 있다. 따라서 신약의 대부분은 순수한 광학이성질체로 개발되고 있으며, 합성에 사용되는 고부가가치 광학활성 중간체의 수요도 따라서 증가되고 있다. 광학활성 화합물의 미국 내의 수요는 매년 평균 9.4%씩 증가하여 2005년에는 151억 달러 규모의 시장을 형성한 것으로 분석되고 있다.

광학활성 에폭사이드와 vicinal diol (vic-diol)은 반응성이 대단히 우수하여 친전자성반응, 친핵성반응, 산·염기반응, 산화·환원반응 등 다양한 반응을 유도할 수 있다 (1). 광

학활성 에폭사이드 및 vic-diol은 현재 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용되고 있다. 광학활성 에폭사이드와 vic-diol은 에폭사이드 가수분해효소 (epoxide hydrolase, EH)를 생촉매로 이용하여 라세믹 에폭사이드로부터 제조할 수 있다(2, 3). 에폭사이드 가수분해효소의 입체선택적 가수분해 활성을 이용하여 라세믹 이성질체 중 특정 이성질체만을 가수분해하여 제거함으로써 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있다(4, 5). 또한, 가수분해 산물인 vic-diol도 광학적으로 순수한 형태로 얻을 수 있다.

에폭사이드 가수분해효소의 입체선택적 가수분해 활성을 이용하여 광학활성 에폭사이드를 제조하는 경우, 두 가지 이성질체 중 특정 이성질체를 전부 가수분해하여 제거하기 때문에 이론 수율 자체가 50%를 넘을 수 없다는 단점이 있다(6) (Fig. 1). 이러한 문제점을 극복할 수 있는 방법으로는, monooxygenase, peroxidase 등을 이용하여 prochiral 기질에 대하여 비대칭합성 (asymmetric synthesis)을 통해 광학활성 물질을 제조하는 방법, 기질 적합성이 낮은 이성질체를 계속적으로 라세믹화 반응 (racemization)을 시키면서 동시에 동력학적 분할반응을 진행시키는 dynamic kinetic resolution 법, 서로 상호 보완적인 입체선택성 및 위치선택성을 가지

† Corresponding Author : Department of Food Science and Biotechnology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

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

E-mail : eylee@ks.ac.kr

는 두개의 효소를 이용하는 광학수렴반응 (enantioc convergent hydrolysis) 등이 있다(3, 7-9) (Fig. 2). 이러한 합성법은 다른 이성질체를 분리하는 비용을 줄여주고, 라세믹 원재료 사용 효율을 높일 수 있고, 최종 제품의 수율을 향상시킬 수 있어 산업적으로 중요한 의미를 가진다. 본 총설에서는 최근에 많은 연구와 상업화의 대상이 되고 있는 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 광학수렴반응을 중심으로 높은 수율로 광학활성 에폭사이드 및 vic-diol을 합성하는 최근 기술 개발 동향을 분석하였다.

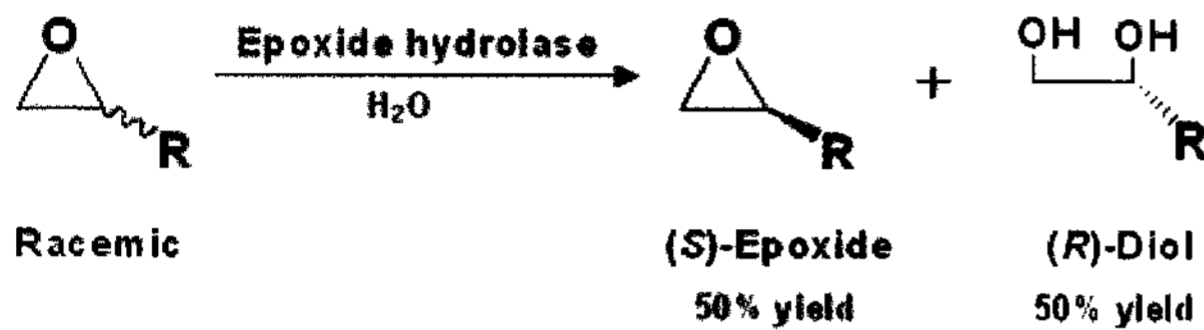
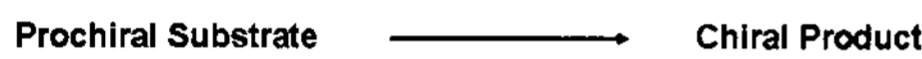
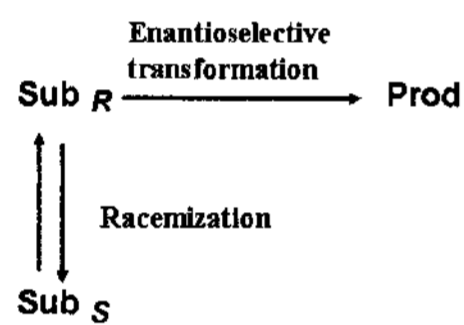


Figure 1. Reaction schemes of the kinetic resolution of racemic epoxides using epoxide hydrolases(2).

□ Asymmetric synthesis



□ Dynamic kinetic resolution



□ Enantioconvergent process

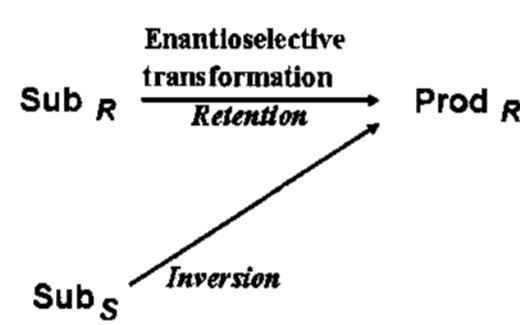


Figure 2. Biocatalytic preparation of enantiopure epoxides, halohydrins and vicinal diols. Nu represents nucleophiles other than water(2).

이론 수율이 100%인 광학활성 화합물 합성법

다양한 생촉매를 이용하여 광학활성 에폭사이드와 vic-diol을 합성할 수 있다(Fig. 3). 첫째로, Monooxygenase나 peroxidase를 이용하여 알켄 기질의 이중결합에 광학선택적으로 에폭사이드 링을 도입시켜 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있다. 둘째로, Halohydrin dehalogenase를 이용한 haloalcohol의 halide와 alcohol기 사이에 intramolecular dehalogenation 반응을 통해 에폭사이드를 제조할 수 있다. 셋째로, 라세믹 에폭사이드의 특정 이성질체만을 입체선택적으로 가수분해시켜 제거함으로써 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있다. 이 반응의 생성물은 vic-diol이며, 반응 조건 조절을 통해 높은 광학순도를 가진 vic-diol을 제조할 수도 있다.

위에 제시된 생촉매를 이용하여 광학활성 에폭사이드 및 vic-diol을 제조하는 방법들에 있어서 이론수율을 100%까지 높이는 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 첫 번째 방법으로는 prochiral 기질에 대하여 직접 에폭시화반응을 진행하여 광학활성 에폭사이드를 이론수율 100%로 제조하는 비대칭 합성법 (asymmetric synthesis)이 있다 (Fig. 2). 두 번째 방법으로는, 기존의 동력학적 분할법에 속도가 상대적으로 빠른 racemization 반응을 동시에 진행

시켜 이론수율을 100%로 얻는 dynamic kinetic resolution (DKR)법이 있다. 이 방법에서는 분할속도가 낮은 이성질체를 지속적으로 라세믹화시켜 동력학적 분할의 이론 수율을 100%로 높이는 방법이다(9, 10) (Fig. 2). 세 번째 방법으로는 서로 상보적인 입체특이성 및 위치특이성을 가진 생촉매들을 이용하여 두 개의 광학이성질체 모두를 한 가지의 광학활성 물질로 전환시키는 광학수렴 반응 (enantioc convergent process)이 있다(Fig. 2). Monooxygenase를 이용한 비대칭 합성법은 보조인자인 NAD(P)H의 효율적인 재생산이 반드시 필요하며, 산화효소의 구조 불안정성 등이 문제가 된다. DKR법은 racemization 반응이 분할 반응 속도보다 매우 빠르게 일어나야 하며, 많은 경우 중금속 촉매를 이용하여 racemization 반응을 진행한다. 이러한 방법들에 비해 광학수렴 반응은 서로 상보적인 입체선택성 및 위치선택성을 가진 가수분해 생촉매들을 사용하여 이론수율 100%를 얻을 수 있으므로, 보조인자들이 필요없으며 중금속 촉매를 사용하지 않으므로 보다 환경친화적인 방법이라고 할 수 있다.

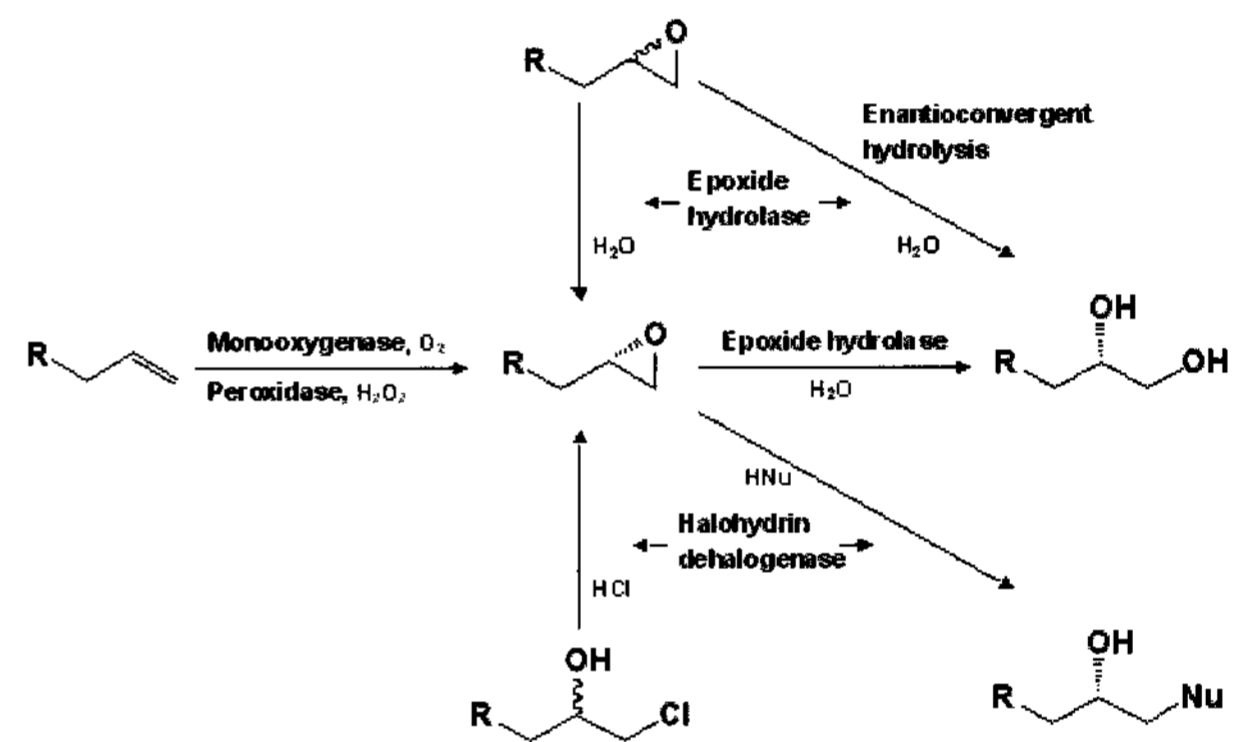


Figure 3. Three possible ways to obtain a 100% theoretical yield(9).

두 종류의 에폭사이드 가수분해효소들을 사용하는 광학수렴반응을 이용한 광학활성 vic-diol 제조방법

서로 상호보완적인 입체특이성 및 위치특이성을 가진 두 종류의 에폭사이드 가수분해효소를 이용하면, 라세믹 에폭사이드 기질로부터 한 종류의 vic-diol을 이론수율 100%, 광학순도 100%로 제조할 수 있다(10) (Fig. 4(a)). 곰팡이 유래의 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 광학수렴 반응의 최초 연구 사례로는, *Aspergillus niger*와 *Beauveria sulfurescens* 유래의 에폭사이드 가수분해효소 활성을 이용하여 라세믹 styrene oxide로부터 (R)-phenyl-1,2-ethanediol을 제조한 연구 결과가 있다(11). *A. niger*의 에폭사이드 가수분해효소는 (R)-이성질체 에폭사이드 링의 단말 β-탄소를 선택적으로 가수분해시켜 입체성을 유지한 상태에서 (R)-diol을 생성시켰다. 반면에 *B. sulfurescens*의 에폭사이드 가수분해효소는 (S)-이성질체의 α-탄소 위치에서 가수분해 반응을 진행하여 입체전환 (inversion)이 일어남으로써 결과적으로 (R)-diol이 생성되었다. 이러한 반응기작을 통해 약 2시간의 반응을 거쳐 89% enantiomeric excess (ee) 수준의 (R)-phenyl-1,2-ethanediol을 제조할 수 있었다. *A. niger* 유래의 에폭사이드 가수분해효소를 사용한 다른 예로는, *A.*

*niger*와 감자인 *Solanum tuberosum* 유래의 에폭사이드 가수분해효소를 조합사용하여 뇌신경안정제 (neuroprotective agent)인 (*R*)-Eliprodil 합성에 사용되는 (*R*)-*p*-chlorostyrene oxide를 제조한 결과가 있다(12). *S. tuberosum* 에폭사이드 가수분해효소와 *A. niger* 에폭사이드 가수분해효소를 사용하여 0.2 M의 라세믹 *p*-chlorostyrene oxide로부터 (*R*)-*p*-chlorostyrene oxide를 96%*ee*의 높은 광학순도와 93%의 높은 수율로 제조하였다. 서로 상보적인 입체특이성과 위치특이성을 가지는 두 종류의 에폭사이드 가수분해효소들을 조합사용하여 β -adrenergic receptor agonist 합성에 사용되는 광학활성 2-, 3-, 4-pyridyloxirane를 제조한 결과도 보고되었다(13). 인간, soybean (*Glycine max*), *S. tuberosum* 및 *Arabidopsis thaliana* 유래의 에폭사이드 가수분해효소들은 (*S*)-이성질체에 대해 입체선택적 가수분해 활성이 있는 반면, *A. niger*, *Mortierella isabellina*, *Cunninghamella elegans* 유래의 에폭사이드 가수분해효소들은 (*R*)-이성질체에 대해 입체선택적 가수분해 활성을 가지고 있었다. 이들 두 부류의 에폭사이드 가수분해효소들을 조합하여 사용하여 (*R*)-pyridyldiol을 제조할 수 있었다.

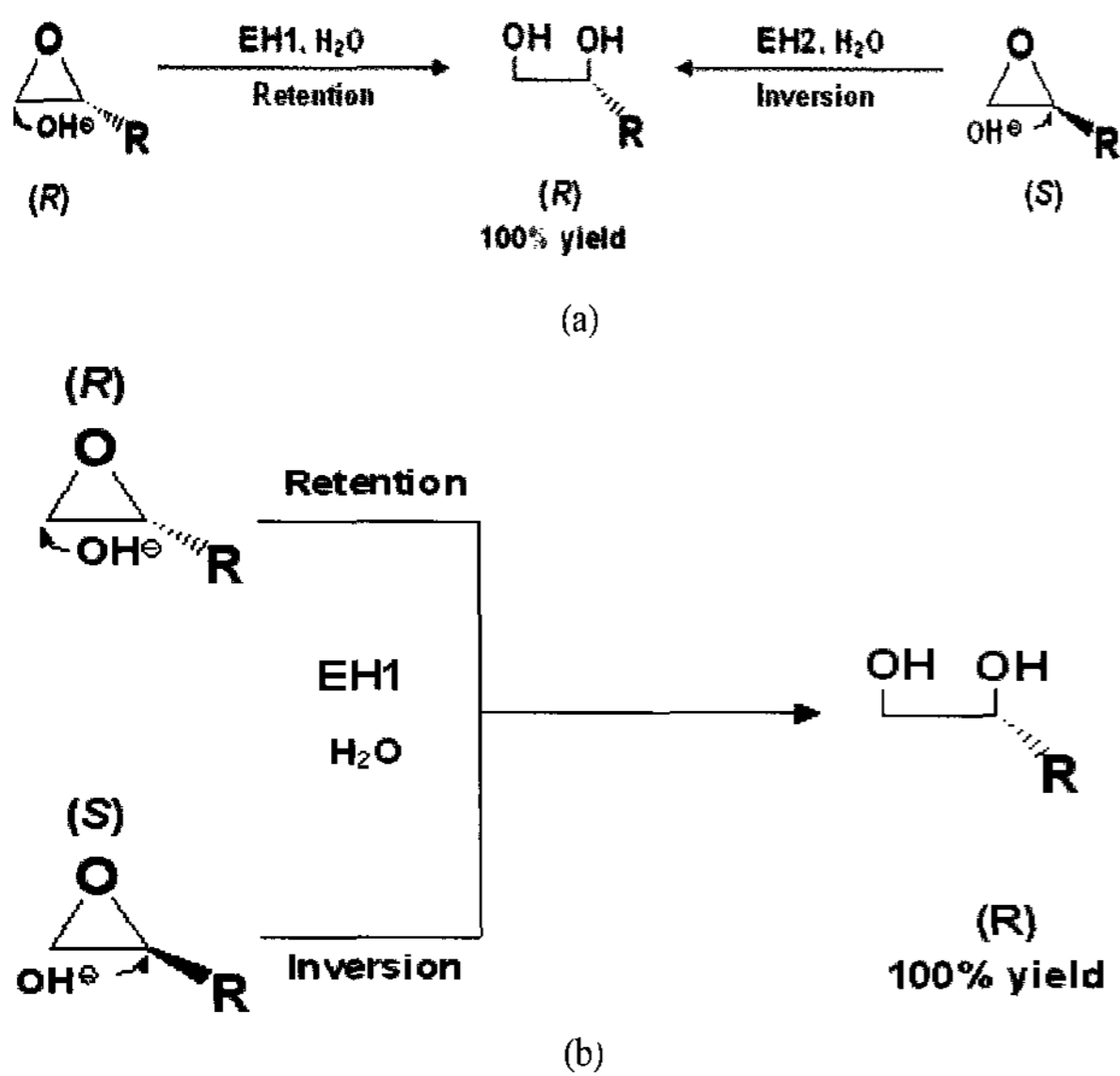


Figure 4. Reaction schemes of the enantioconvergent hydrolysis of racemic epoxides using two enantiocomplementary epoxide hydrolases (a) and single epoxide hydrolase. Given yields are theoretical values (2).

최근에 directed evolution 방법을 이용하여 입체선택성을 높인 에폭사이드 가수분해효소를 이용하여 vic-diol의 최종 광학순도를 높인 연구결과가 보고되었다(14, 15). Saturation mutagenesis 방법을 이용하여 (*R*)-이성질체에 대한 입체선택성을 높인 *Agrobacterium radiobacter* AD1 유래의 에폭사이드 가수분해효소와 *S. tuberosum* 에폭사이드 가수분해효소를 사용하여 라세믹 styrene oxide 기질로부터 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol을 4.7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein 수준의 높은 반응속도로 제조하였다. 최종 산물인 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol의 광학순도를 98 %*ee*로 얻을 수 있었으며, 거의 100% 수준의 수율로 제조하였다. 이 결과는 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 광학수렴 반응의 상업화 가능성을 보여준 결

과로 평가할 수 있으나, 한 가지 단점은 초기 기질농도가 5 mM 정도로 낮아 volumetric productivity가 낮다는 점이다. 낮은 기질 농도를 사용한 이유는 *S. tuberosum* 에폭사이드 가수분해효소가 vic-diol에 의한 산물 저해를 심하게 받았기 때문이다. 만약 분자공학을 이용하여 산물저해를 받지 않는 *S. tuberosum* 에폭사이드 가수분해효소를 개발하는 경우 상업화의 가능성이 높아질 것이다.

한 종류의 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 광학수렴 반응

한 종류의 특정 에폭사이드 가수분해효소만을 사용하여도 광학활성 vic-diol을 제조할 수 있다. 이 방법에서는 한 종류의 에폭사이드 가수분해효소가 (*R*)- 및 (*S*)-이성질체의 에폭사이드 링 탄소에 대하여 서로 다른 위치특이성을 가지고 가수분해함으로써 광학수렴 반응이 진행된다(Fig. 4(b)). 미생물 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 최초의 연구사례로는, 동결건조시킨 *Nocardia* EH1 세포를 단일 생축매로 사용한 광학수렴반응을 통해 (*2R,3R*)-heptane-2,3-diol을 91%*ee*의 광학수도로 79% 수율로 제조한 연구결과이다(16). ¹⁸OH₂가 labelling된 기질을 사용한 실험을 통해, *Nocardia* 에폭사이드 가수분해효소는 (*S*)-이성질체와 (*R*)-이성질체에 대해 각각 서로 다른 탄소위치에서 가수분해반응이 진행되는 것이 밝혀졌다.

Rhodococcus ruber SM 1789, *R. ruber* CBS 717, *Streptomyces lavendulae* ATCC 55209, *Mycobacterium paraffinicum* NCIMB 10420 등 박테리아 유래의 에폭사이드 가수분해효소를 사용하여 라세믹 trialkyl 에폭사이드 기질에 대한 광학수렴반응을 통해 97%*ee*의 높은 광학순도를 가진 (*R*)-2-methylnonane-2,3-diol을 제조한 결과가 보고되었다(17). ¹⁸O-labelling된 기질을 사용한 실험을 통해, 사용한 단일 에폭사이드 가수분해효소들이 각각의 이성질체에 대하여 서로 다른 위치선택성을 가지고 가수분해 반응을 진행함이 밝혀졌다. 이외에도 *Rhodococcus* sp. 또는 *Streptomyces* sp.를 사용하여 라세믹 trisubstituted terpenoid 에폭사이드로부터 광학수렴 반응을 통해 97%*ee* 광학순도를 가진 diol을 제조한 결과도 보고되었다(18). 제조된 광학활성 diol은 (*R*)-(+)-marmin을 95%*ee* 수준으로 제조하는데 사용되었다.

박테리아 이외에도 동물 및 식물 유래의 단일 에폭사이드 가수분해효소를 사용한 광학수렴 반응 결과도 보고되었다. Rabbit liver로부터 얻은 microsomal 에폭사이드 가수분해효소를 생축매로 사용하여 (\pm)-9,10-epoxystearic acid, *cis*-(\pm)-5,6-epoxyhexadecane, *cis*-(\pm)-11,12-epoxyhexadecan-1-ol 와 meso *cis*-9,10-epoxyoctadecane 기질에 대한 광학수렴 반응을 수행한 결과, 90%*ee* 이상의 광학순도를 가진 *threo*-(*1R,2R*) diol을 제조할 수 있었다(19, 20). *cis*- β -Ethyl, β -*n*-propyl, β -*n*-butyl 및 β -*n*-hexyl기가 치환된 styrene oxide에 대해서도 같은 방법을 사용하여 90%*ee* 이상의 광학순도를 가진 (*R,R*)-*threo*-diol을 제조한 결과도 보고되었다(21). 식물 유래인 *S. tuberosum* 에폭사이드 가수분해효소가 라세믹 기질에 대하여 서로 상호보완적인 입체선택성 및 위치선택성을 가지고 있음이 밝혀져, 단일 효소만을 사용해도 라세믹 styrene oxide 기질을 86%*ee*의 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol

로 100% 전환시킬 수 있었다(22). 반응기작을 살펴보면, (R)-이성질체에 대해서는 에폭사이드 링의 단말 탄소에 대해 가수분해반응을 우선적으로 진행하였고, (S)-이성질체에 대해서는 benzylic 탄소에 대해 우선적으로 가수분해반응을 진행하여 (R)-phenyl-1,2-ethanediol만이 최종산물로 생성된 것이다. 9회의 반복 회분식 반응을 통해 라세믹 m-chlorostyrene oxide로부터 (R)-m-chlorostyrene diol을 97%ee 및 88% 수율로 제조할 수 있었다.

이론적 측면에서 살펴보면, 한 종류의 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 광학수렴반응에서 산물의 광학순도를 높이기 위해서는 enantiomeric ratio (E, $E = (k/K_M)_S/(k/K_M)_R$) 값이 낮은 에폭사이드 가수분해효소를 사용하면 된다. E 값이 낮으면 두 이성질체가 전환되는 속도가 비슷하게 되므로, 결과적으로 전체 광학수렴 반응은 신속히 진행될 수 있다. 높은 순도의 (R)-산물이 생성되기 위해서는 (R)-기질의 C2 위치에서의 retention 반응속도상수 (k_2)가 inversion 반응속도상수 (k_1)보다 매우 높아야 하며, (S)-이성질체의 C1 위치에서의 inversion 반응속도상수 (k_4)가 retention 반응속도상수 (k_3)보다 매우 높아야 한다(10) (Fig. 5). 이러한 기준에 맞추어 선별한 *Streptomyces lavendulae* ATCC 55209는 E 값이 약 4.2 정도로 낮은 편이며 동시에 각각의 이성질체에 대한 위치선택성이 우수한 미생물 생촉매였다. *S. lavendulae*를 생촉매로 사용하여 라세믹 (±)-2-methyl-2,3-epoxynonane으로부터 97%ee의 높은 광학순도를 가진 (3R)-2-methyl-nonane-2,3-diol을 60%의 수율로 제조할 수 있었다. 이러한 접근은 directed evolution 등의 분자공학적 조작을 거치지 않고 적절한 wild-type의 생촉매를 사용하여도 높은 순도의 광학활성 diol을 제조할 수 있음을 보여준 결과들이다.

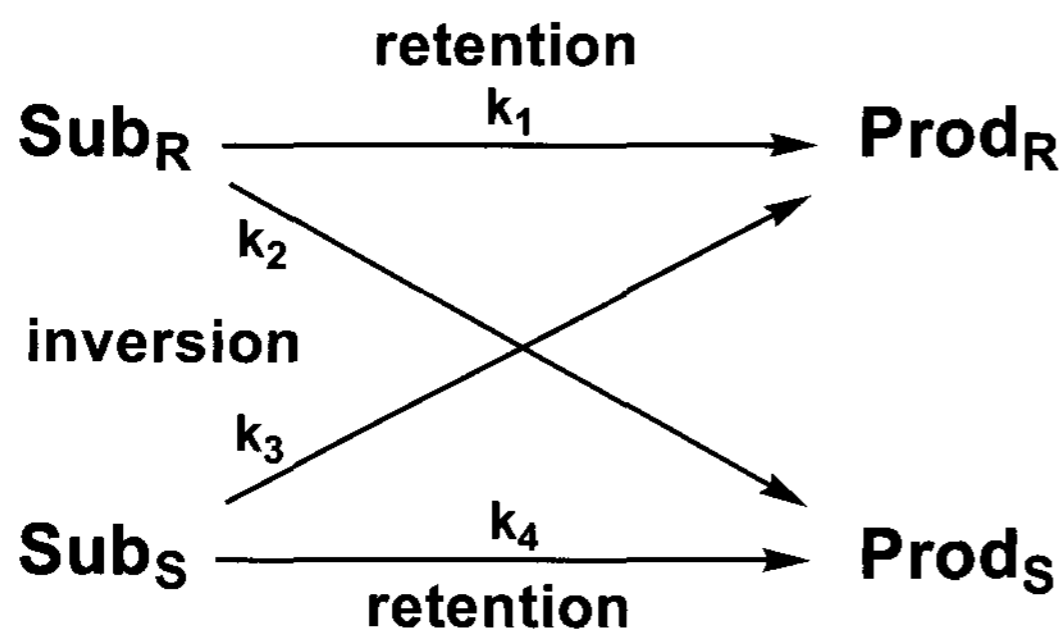


Figure 5. Strategies for obtaining an enhanced enantiopurity of the chiral product through enantioconvergent process(10).

에폭사이드 가수분해효소에 의한 cascade reaction을 이용한 광학활성 에폭사이드 제조

Domino 반응이라고도 하는 cascade 반응은 반응 진행 중에 반응성이 좋은 중간산물이 발생함과 동시에 다른 반응에 의해 최종산물로 연속적으로 전환되는 반응이다. 에폭사이드 가수분해효소가 촉발시키는 cascade 반응을 통해 라세믹 2,3-disubstituted haloalkyl 에폭사이드 기질로부터 광학활성 에폭사이드 또는 tetrahydrofuran (THF) 유도체를 생합성 할 수 있다(Fig. 6). 반응 기작을 살펴보면, haloalkyl기가 치환되어 있는 에폭사이드를 에폭사이드 가수분해효소

로 가수분해하면 해당되는 vic-diol이 생성된다. 이 vic-diol은 약간의 알칼리 pH 조건에서도 자발적인 ring closure 반응이 진행되어 epoxyalcohol 또는 THF가 생성되는 것이다(23, 24). 이 반응은 세 가지 특징이 있다. 첫째로, 에폭사이드 기질이 에폭사이드 가수분해효소에 의해 한 종류의 vic-diol로 가수분해 된다는 점이다. 둘째로는, haloalkyl 치환기의 길이에 따라 최종적으로 생성되는 환의 크기가 결정된다는 점이다. Halomethyl로부터는 epoxy alcohol이 haloethyl로부터는 THF 유도체가 합성된다. 또한, 반응 중에 두 개의 chiral center가 입체선택성을 유지하면서 S_N2 cyclization 반응이 진행되어 궁극적으로 높은 광학순도를 가진 epoxyalcohol이 생성된다. 반응 사례를 살펴보면, *Mycobacterium paraffinicum* NCIMB 10420 유래의 에폭사이드 가수분해효소를 사용한 경우, 92%ee의 높은 광학순도를 가진 epoxyalcohol을 76%의 수율로 얻었다. *Rhodococcus* sp. SM 1788 유래의 에폭사이드 가수분해효소를 사용하면, 라세믹 haloethyl 에폭사이드로부터 five-membered ring인 THF를 86%ee의 광학순도와 79%의 수율로 제조할 수 있었다.

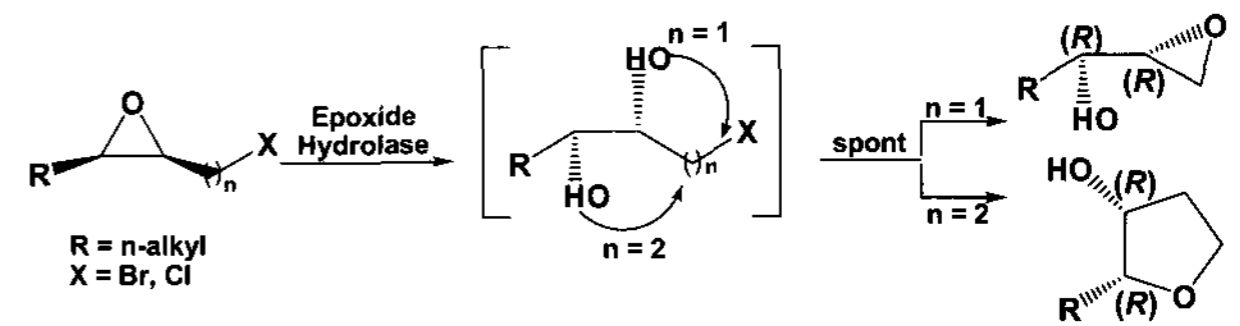


Figure 6. Epoxide hydrolase-triggered enantioconvergent hydrolysis and spontaneous cyclization of haloalkyl epoxides(23, 24).

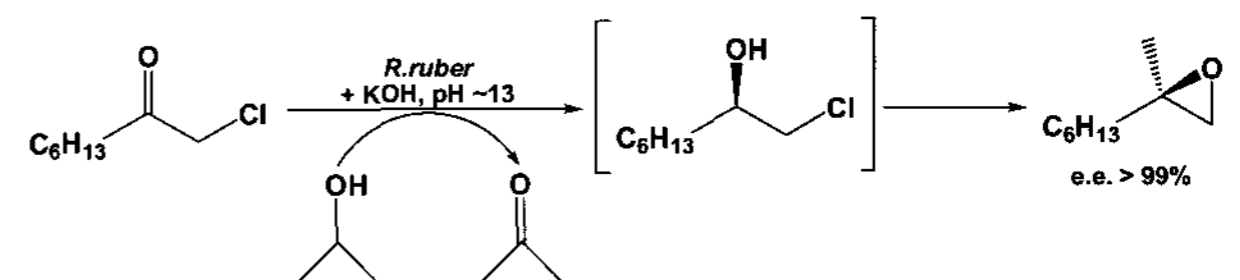


Figure 7. Alcohol dehydrogenase-catalyzed asymmetric reduction of α-chloro ketone to the corresponding epoxide(25).

에폭사이드 가수분해효소 이외에 다른 생촉매를 활용한 cyclization 반응을 이용하여 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있다. 2-Propanol을 수소 공여체 (reducing agent)로 제공하고, alcohol dehydrogenase (ADH)를 이용하여 prochiral ketone 기질을 hydroxy기로 환원 반응을 시킨 다음, 생성된 halohydrin이 염기 조건에서 자발적인 cyclization 반응이 일어나 광학활성 에폭사이드로 전환되는 합성방법이 보고되었다(25) (Fig. 7). *R. ruber* DSM 44541을 생촉매로 사용하여 pH 12 이상의 조건에서 위 반응을 진행한 경우, benzyl chloro ketone 기질로부터 99%ee의 높은 광학순도를 가진 styrene oxide를 제조할 수 있었다.

생촉매와 화학적 방법을 사용한 2단계 광학수렴반응

에폭사이드 가수분해효소와 화학합성법을 연계한 2단계 광학수렴반응을 이용하여 광학활성 vic-diol을 제조할 수 있다. *Nocardia* 유래의 에폭사이드 가수분해효소를 사용하여 라세믹 (±)-2,2-disubstituted 에폭사이드기질의 (S)-이성질체를 (S)-diol로 전환시키고, 남은 (R)-이성질체는 dioxane/H₂O가 97:3로 있는 조건에서 H₂SO₄ 산 촉매를 사용하여

inversion시켜 (S)-diol로 전환시켰다(26, 27) (Fig. 8(a)). 이 반응을 통해 99%ee의 광학순도를 가진 (R)-diol을 98%의 수율로 얻을 수 있었다.

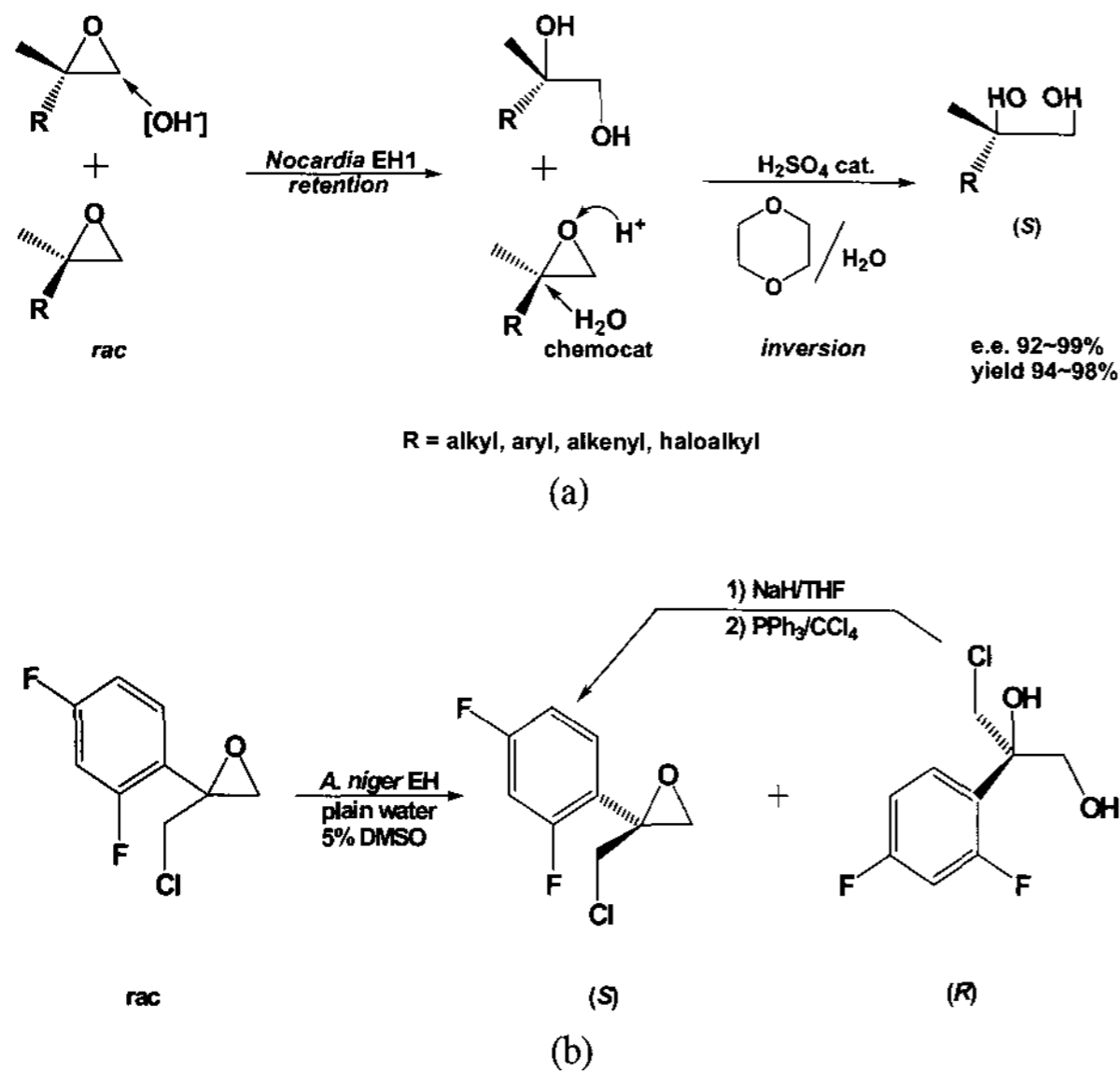


Figure 8. Chemoenzymatic preparation of various enantiopure epoxides and vic-diols(26-28). (a) Preparation of 2,2-disubstituted (S)-diol, (b) preparation of an azole antifungal key synthon.

A. niger 에폭사이드 가수분해효소와 화학촉매를 사용하여 2.5 M의 고농도에서 azole 계열의 항진균제 합성에 사용되는 에폭사이드 중간체를 제조한 결과가 보고되었다(28). 첫 단계에서 500 g/L의 고농도 라세믹 1-chloro-2-(2,4-difluorophenyl)-2,3-epoxypropane 기질에 대하여 *A. niger* 에폭사이드 가수분해효소를 이용하여 (R)-이성질체를 (R)-diol로 가수분해하였다(Fig. 8(b)). (R)-diol을 다시 NaH/THF 및 PPh₃/CCl₄ 촉매로 화학적으로 환형성 반응을 진행하면 (S)-1-chloro-2-(2,4-difluorophenyl)-2,3-epoxypropane이 생성되어 광학수렴반응이 된다. 이 반응을 통해 라세믹 기질로부터 98%ee의 광학활성 (S)-1-chloro-2-(2,4-difluorophenyl)-2,3-epoxypropane을 제조할 수 있었다.

결론

에폭사이드 가수분해효소의 입체선택적 가수분해 활성을 이용한 동력학적 분할법의 50% 이론 수율 문제점을 극복하기 위하여, 100% 이론수율로 광학활성 에폭사이드 및 vic-diol을 생합성할 수 있는 다양한 방법들이 개발되고 있다. 서로 상보적인 입체선택성 및 위치선택성을 가진 두 종류의 에폭사이드 가수분해효소 또는 단일 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 광학수렴 반응을 통해 광학활성 vic-diol을 높은 수율로 제조하는 기술, 에폭사이드 가수분해효소가 촉발시키는 cascade 반응을 이용하여 광학활성 에폭사이드 또는 광학활성 THF를 이론수율 100%로 제조하는 기술, alcohol dehydrogenase 효소를 이용하여 haloketone 기질의 ketone기를 hydroxy기로 환원시킨 다음 자발적인 cyclization

반응을 진행시켜 광학활성 에폭사이드를 높은 수율로 제조할 수 있는 기술들이 개발되고 있다. 간단한 형태의 화학촉매와 연계해서 에폭사이드 가수분해효소를 사용하여 광학활성 에폭사이드 및 vic-diol을 생합성할 수도 있다. 이러한 방법들은 높은 광학순도 뿐만 아니라 높은 수율을 얻을 수 있으므로 상업화 가능성이 우수하다. 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 광학수렴 반응의 상업화 과정에서 극복해야 할 문제점들로는, 우선, 기존의 연구들은 반응 스케일이 작은 실험실 규모의 결과들이므로 scale-up 과정에서 문제점들이 발생할 수 있다. 예를 들어 에폭사이드 가수분해효소를 이용하여 광학활성 vic-diol을 제조하는 과정에서 높은 광학순도를 얻기 위하여 반응을 낮은 온도에서 진행하는 경우가 있는데, 대량생산에서는 부적합할 수도 있다. 또한 낮은 기질 농도에서 얻은 결과들은 volumetric productivity가 낮아 경제성이 문제가 되므로 산물 저해 현상을 극복할 수 있는 새로운 에폭사이드 가수분해효소 개발이 필요하다. 화학촉매를 같이 사용하는 경우 생촉매와 화학촉매 모두를 제거해주어야 하는데, 특히 화학촉매가 적은 양이라도 잔류하면 광학활성 에폭사이드 및 vic-diol의 품질이 저하된다. 효소 생촉매는 가격 자체가 높을 수 있으므로, 에폭사이드 가수분해효소를 분리하여 재활용하는 공정 개발을 통해 경제성을 확보하는 것도 중요하다. 마지막으로 광학수렴 반응이 동력학적 분할 반응보다 복잡하므로 반응조건 최적화가 쉽지 않으며, 대량생산에서 최종 결과의 재현성에서 문제가 있을 수 있으므로 이에 대한 보완이 필요하다. 이러한 문제점들은 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 광학수렴 반응에만 국한되는 문제가 아니므로, 기존의 키랄 화학촉매 등을 이용한 고 수율 반응에 활용된 여러 가지 기술들을 에폭사이드 가수분해효소 반응시스템에 응용하는 것 자체도 의미가 충분하다. 재현성 있는 scale-up 기술 개발을 확보하면, 에폭사이드 가수분해효소에 의한 광학수렴 반응을 통한 광학활성 에폭사이드 및 vic-diol 제조법은 가까운 미래에 상업화가 본격화될 것으로 기대된다.

요약

에폭사이드 가수분해 효소를 이용하여 라세믹 에폭사이드 기질로부터 광학활성 에폭사이드 또는 vic-diol을 제조하는 동력학적 분할법은 이론 수율이 50%로 제한된다는 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 이론 수율 100%를 얻을 수 있는 다양한 생물전환 방법들이 최근에 개발되고 있다. 서로 상보적인 입체 및 위치특이성을 가진 에폭사이드 가수분해효소에 의한 광학수렴반응을 이용한 광학활성 vic-diol 제조법, 에폭사이드 가수분해효소가 촉발하는 cascade 반응을 통해 라세믹 haloalkyl 에폭사이드로부터 광학활성 epoxy alcohol 또는 THF를 제조하는 방법, ADH를 이용하여 haloketone을 환원시킨 다음 자발적인 cyclization 반응을 통해 광학활성 에폭사이드를 제조하는 방법들이 개발되었다. 이러한 방법들은 높은 광학순도를 가진 광학활성 물질들을 이론수율 100%로 제조할 수 있으므로 향후에 상업화 사례가 많아질 것으로 기대된다.

감 사

이 논문은 2007년도 경성대학교 학술연구비지원에 의하여 연구하였으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Besse, P. and H. Veschambre (1994), Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
- Lee, E. Y. and M. L. Shuler (2007), Molecular engineering of epoxide hydrolase and its application to asymmetric and enantioconvergent hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng.* **95**, in press.
- Orru, R. V. A. and K. Faber (1999), Stereoselectivities of microbial epoxide hydrolases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 16-21.
- Kim, H. S., S. J. Lee, and E. Y. Lee (2006), Development and characterization of recombinant whole-cell biocatalysts expressing epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis* for enantioselective resolution of racemic epoxides, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **43**, 2-8.
- Archelas, A. (1998), Fungal epoxide hydrolases: new tools for the synthesis of enantiopure epoxides and diols, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **5**, 79-85.
- Lee, E. Y., S. S. Yoo, H. S. Kim, S. J. Lee, Y. K. Oh, and S. Park (2004), Production of (S)-styrene oxide by recombinant *Pichia pastoris* containing epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis*, *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 624-631.
- Han, J. H., M. S. Park, J. W. Bae, E. Y. Lee, Y. J. Yoon, S.-G. Lee, and S. Park (2006), Production of (S)-styrene oxide using styrene oxide isomerase negative mutant of *Pseudomonas putida* SN1, *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 1264-1269.
- Turner, N. J. (2003), Controlling chirality, *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 2003, 401-406.
- Strauss, U. T., U. Felfer, and K. Faber (1999), Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess, *Tetrahedron: Asymmetry* **10**, 107-117.
- Faber, K. and W. Kroutil (2002), Stereoselectivity in biocatalytic enantioconvergent reactions and a computer program for its determination, *Tetrahedron: Asymmetry* **13**, 377-382.
- Pedragosa-Moreau, S., C. Morisseau, J. Zylber, A. Archelas, J. Baratti, and R. Furstoss (1996), Microbiological transformations. 33. Fungal epoxide hydrolases applied to the synthesis of enantiopure para-substituted styrene oxides. A mechanistic approach, *J. Org. Chem.* **61**, 7402-7407.
- Manoj, K. M., A. Archelas, J. Baratti, and R. Furstoss (2001), Microbiological transformations 45. A green chemistry preparative scale synthesis of enantiopure building blocks of Eliprodiol: elaboration of a high substrate concentration epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution process, *Tetrahedron* **57**, 695-701.
- Genzel, Y., A. Archelas, Q. B. Broxterman, B. Schulze, and R. Furstoss (2002), Microbiological transformations 50: selection of epoxide hydrolases for enzymatic resolution of 2-, 3- or 4-pyridyloxirane, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **16**, 217-222.
- Rui, L., L. Cao, W. Chen, K. F. Reardon, and T. K. Wood (2005), Protein engineering of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 for enhanced activity and enantioselective production of (R)-1-phenylethane-1,2-diol, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3995-4003.
- Cao, L., J. Lee, J. W. Chen, and T. K. Wood (2006), Enantioconvergent production of (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol from styrene oxide by combining the *Solanum tuberosum* and an evolved *Agrobacterium radiobacter* AD1 epoxide hydrolases, *Biotechnol. Bioeng.* **94**, 522-529.
- Kroutil, W., M. Mischitz, P. Plachota, and K. Faber (1996), Deracemization of (\pm)-cis-2,3-epoxyheptane via enantioconvergent biocatalytic hydrolysis using *Nocardia* EH1-epoxide hydrolase, *Tetrahedron Lett.* **46**, 8379-8382.
- Steinreiber, A., S. F. Mayer, R. Saf, and K. Faber (2001), Biocatalytic asymmetric and enantioconvergent hydrolysis of trisubstituted oxiranes, *Tetrahedron: Asymmetry* **12**, 1519-1528.
- Edegger, K., S. F. Mayer, A. Steinreiber, and K. Faber (2004), Chemo-enzymatic enantio-convergent asymmetric synthesis of (R)-(+)-Marmin, *Tetrahedron* **60**, 583-588.
- Bellucci, G., C. Chiappe, A. Cordoni, and G. Ingrosso (1996), Enantioconvergent transformation of racemic cis-dialkyl substituted epoxides to (R,R) threo diols by microsomal epoxide hydrolase catalysed hydrolysis, *Tetrahedron Lett.* **37**, 9089-9092.
- Chiappe, C., A. Cordoni, G. L. Moro, and C. D. Palese (1998), Deracemization of (\pm)-cis-dialkyl substituted oxides via enantioconvergent hydrolysis catalysed by microsomal epoxide hydrolase, *Tetrahedron: Asymmetry* **9**, 341-350.
- Bellucci, G., C. Chiappe, and A. Cordoni (1996), Enantioconvergent transformation of racemic cis- β -alkyl substituted styrene oxides to (R,R) threo diols by microsomal epoxide hydrolase catalysed hydrolysis, *Tetrahedron: Asymmetry* **7**, 197-202.
- Monterde, M. I., M. Lombard, A. Archelasa, A. Croninb, M. Arandb, and R. Furstoss (2004), Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent bihydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase, *Tetrahedron: Asymmetry* **15**, 2801-2805.
- Mayer, S. F., A. Steinreiber, R. V. A. Orru, and K. Faber (2001), An enzyme-triggered enantio-convergent cascade-reaction, *Tetrahedron: Asymmetry* **12**, 41-43.
- Glueck, S. M., S. F. Mayer, W. Kroutil, and K. Faber (2002), Advances in biocatalytic synthesis. Enzyme-triggered asymmetric cascade reactions, *Pure Appl. Chem.* **74**, 2253-2257.
- Poessl, T. M., B. Kosjek, U. Ellmer, C. C. Gruber, K. Edegger, K. Faber, P. Hildebrandt, U. T. Bornscheuer, and W. Kroutil (2005), Non-racemic halohydrins via biocatalytic hydrogen-transfer reduction of halo-ketones and one-pot cascade reaction to enantiopure epoxides, *Adv. Synth. Catal.* **347**, 1827-1834.
- Orru, R. V. A., S. F. Mayer, W. Kroutil, and K. Faber (1998), Chemoenzymatic deracemization of (\pm)-2,2-disubstituted oxiranes, *Tetrahedron* **54**, 859-874.
- Orru, R. V. A., W. Kroutil, and K. Faber (1997), Deracemization of (\pm)-2,2-disubstituted epoxides via enantioconvergent chemoenzymatic hydrolysis using *Nocardia* EH1 epoxide hydrolase and sulfuric acid, *Tetrahedron Lett.* **38**, 1753-1754.
- Monfort, N., A. Archelas, and R. Furstoss (2004), Enzymatic transformations. Part 55: Highly productive epoxide hydrolase catalyzed resolution of an azole antifungal key synthon, *Tetrahedron* **60**, 601-605.