

특 집

생물 전환 기술 (Bioconversion)

리파제를 이용한 의약품 합성

유기용매에서 지질가수분해효소를 이용한 유기합성

Lipase를 이용한 곤충 pheromone 합성 응용

생체촉매를 이용한 범용화학제품 acrylamide의 제조

식품신소재의 바이오 생산

생물촉매를 이용한 아미노산의 새로운 제조법

D-p-Hydroxyphenylglycine의 합성물 생산

Cephalosporin acylase의 응용

이 선 복

김 만 주

서영배 · 고영희

김 형 순

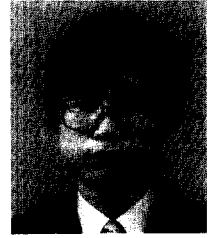
오 태 광

성문희 · 조홍연

김 학 성

성하진 · 윤기홍

리파제(lipase)를 이용한 의약품의 합성



포항공과대학교 화학공학과 이 선 복

1. 서 언

많은 키랄약품(chiral drug)들이 한 에난티오머(enantiomer)만이 치료에 유용하며 반대의 에난티오머는 효과가 없거나 심지어는 독성을 나타냄에도 불구하고¹ 1982년까지 시판되는 에난티오머 약품의 비율은 라세믹(racemic) 약품에 비해 7분의 1밖에 되지 않았으며 현재도 큰 변화가 없는 상황이다. 이는 반합성 약품들 중 95%가 에난티오머로 시판되고 있는 사실과 많이 비교된다. 그러나 최근 FDA (Food and Drug Administration)가 의약품의 chirality가 생물학적 활성에 미치는 특성에 따라 키랄약품의 판매 형태를 결정하겠다는 정책을 발표함에 따라 2000년 까지는 약 80%의 합성 키랄약품들이 에난티오머로 시판될 전망이다². FDA의 정책이 라세메이트(racemate) 약품개발을 금지하는 것은 아니나 승인과정이 매우 힘들 것이라는 것을 예고하고 있다. 제약회사에서 한 라세메이트 약품을 FDA에 승인받기 위해서는 에난티오머에 비해 두배 이상의 경비와 시간이 소요될 것이며 같은 효과를 나타내면서 적은 투약량을 가능케 하는 약품을 개발한다면 FDA가 의사의 처방전을 필요로 하지 않는 약으로 승인할 가능성이 크게 된다. 따라서 대부분의 제약 회사들이 타당하다면 하나의 에난티오머를 개발하는 연구에 박차를 가하고 있는 실정이다.

소위 'chirotechnology'라고 하는 생체활성 에난티오머 합성기술로는 결정화(crystallization), 크로마토그래피, kinetic resolution에 의한 라세메이트로

부터 에난티오머의 분할(resolution), 전키랄(prochiral) 물질로부터 에난티오머의 합성(asymmetric synthesis), chiral building block으로부터 에난티오머의 합성 방법 등이 있다. 이러한 다양한 방법들에 의해 에난티오머를 합성함에 있어서 생촉매(enzyme)가 가장 강력한 기구인 것으로 평가되고 있다. 이는 효소를 이용하여 순도가 높은 에난티오머를 얻을 수 있고, 상온, 중성의 pH, mild condition에서 반응을 진행할 수 있고, 다양한 반응에 적용할 수 있으며 적절한 가격으로 대량의 효소를 구할 수 있기 때문이다. 특히 리파제는 반응에 cofactor를 필요로 하지 않고, 저렴한 가격으로 다양한 효소를 구할 수 있고, 유기용매에 대해 안정하며 우수한 입체선택성(stereoselectivity)을 가지고 있어 에난티오머 합성에 가장 많이 이용되는 효소이다. 본 고에서는 리파제를 이용한 키랄약품의 합성 및 새로운 합성기술을 요약하고자 한다.

2. 리파제를 이용한 키랄약품의 합성

리파제는 지질분해효소로서 Amano, Sigma, Genzyme, Towa Koso, Meito Sangyo 등에서 쉽게 구할 수 있다. 리파제를 이용한 라세믹 카르복실산과 알콜의 입체선택적 분할(resolution) 방법은 가수분해(hydrolysis), 에스테르화(esterification), 트랜스에스테르화(transesterification) 반응으로 나눌 수 있다. 가수분해 반응은 완충용액에서 진행되므로 용해상태의 효소를 사용할 수 있고, 효소반응의 자연환경

이어서 반응속도가 빠른 반면, 에스테르 기질을 사용하므로 기질의 용해도가 떨어지는 경우가 생긴다. 에스테르화 반응은 일반적으로 유기용매에서 효소 반응이 일어나므로 기질의 용해도를 높일 수 있으나, 반응속도가 느리고 유기용매내 수분함량에 따라 반응속도 및 수율에 민감한 반응특성을 보여 조업상 어려운 단점이 있다. 트랜스에스테르화 반응은 생성물의 분리가 어려운 점이 있으나 에스테르화 반응의 단점들을 많이 보완할 수 있어서 최근에 활발한 연구가 진척되었으며, 주로 키랄 알콜의 분할에 이용될 것이라 기대되고 있다. 그동안 리파제를 이용하여 β -adrenergic blocking agent^{3,7}, 비스테로이드계 소염진통제(antiinflammatory drugs)⁸⁻¹¹, serotonin receptor antagonist¹²⁻¹⁴, adenosine receptor agent¹⁵, 기타 다른 약물들을¹⁶⁻¹⁹ 성공적으로 합성하였다. 표 1에 리파제의 가수분해에 의한 에난티오머 합성의 예를 정리하였다.

2-arylpropionic acid 유도체인 비스테로이드계 소염진통제는 관절염과 같은 인체의 연결조직에 관계한 질병치료에 널리 쓰이고 있으며 (S)-에난티오머가 높은 활성을 나타낸다. 예를 들어 이미 에난티오머로 시판되고 있는 나프록센(naproxen)의 경우 (S)-에난티오머가 (R)-에난티오머에 비해 28배의 높은 활성을 보인다. 리파제를 이용하여 나프록센(표 1, 1), 이부프로펜(ibuprofen)¹⁰, 수프로펜(suprofen)¹¹ 등의 (S)-에난티오머를 성공적으로 분할하였다. (S)-propranolol은 β -adrenergic blocking agent 그룹에 속하는 것으로 고혈압, 협심증(angina) 치료에 쓰이는 약품이다. 리파제를 이용하여 (S)-propranolol의 키랄 중간체를 합성하기 위한 다양한 연구가 수행되어 왔는데 대표적인 예로 chloroalcohol ester를 가수분해하여 고순도의 chloroalcohol로 분할한 Terao 등의 연구를 들 수 있다(표 1, 2). 세로토닌(serotonin) antagonist 및 uptake inhibitor는 불안, 정신분열증, 우울증과 같은 정신적, 신경적 병의 원인이 되는 신경전달물질인 세로토닌의 작용을 억제하는 성분이다. 이러한 약물들의 세로토닌 receptor에 대한 친화성 정도에 따라 약의 성능 및 독성을 결정할 수 있다. 입체화학적 특성이 리셉터에 바인딩하는 선택도에 영향을 미치므로 이 약들의 키랄 특성이 매우 중요하다고 할 수 있겠다. 표 1에 예시한 경우(표 1, 3) 외에도 다양한 세로토닌(sero-

tin) antagonist 및 uptake inhibitor가 리파제에 의해 분할되었다^{12,14}.

3. 효소적 에난티오머 합성 기술

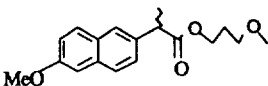
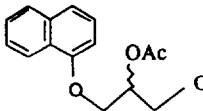
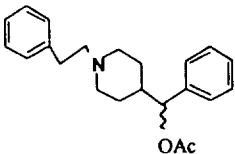
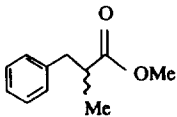
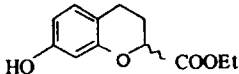
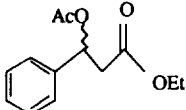
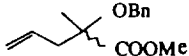
3.1. 선택도 및 반응성 증진기술

효소반응에 의해 키랄약품을 분할 및 합성하고자 할 때 효소의 입체선택도와 반응성은 상호 반드시 필요한 요건이다. 종종 효소의 입체선택도와 반응성은 서로 대치되는 성질인 것으로 나타나는데 이 두가지 조건을 다 만족할 수 있는 최적 조건을 찾는 것이 매우 중요하다. 다음에 선택성과 반응성을 높이기 위한 여러가지 기술들을 정리하기로 하겠다.

입체선택성 및 반응성을 높이기 위한 방법 중 가장 많이 연구되어지는 것은 기질의 구조를 변형시켜 반응특성을 조사하는 것이다. 예를 들어 Koshiro 등이 CCL(Candida cylindracea lipase)을 이용하여 (\pm)-menthol을 여러가지 카르복실산으로 isooctane에서 에스테르화 반응을 한 결과 acyl-donor의 종류에 따라 효소의 활성 및 선택성이 다른 것으로 나타난다(표 2)²⁰. 이 반응에서는 acyl-donor로 5-phenylvaleric acid($R=C_6H_5(CH_2)_4$)를 사용할 때 높은 입체선택성을 유지하면서 적당한 반응성을 보인다. 이와같이 두 조건을 만족하기 위한 기질을 선택하는 것은 필수적이며 어느 반응시스템에서나 선행되어야 할 연구이다. 각각의 효소에 대해 일반적인 기질의 선택도를 예측할 수 있다면 많은 수고를 덜 수 있을 것이다. 보통 키랄 중심 근처에 큰 side chane이 존재할 경우 steric effect에 의하여 효소의 입체선택성이 좋은 것으로 알려져 있다²¹. 한편 전기적(electronic) 효과가 효소의 입체선택성에 영향을 미치는 것으로 나타난다. 키랄중심에 π -system이 존재할 경우 입체선택성이 좋은 몇몇 보고들이 있다²¹. 하지만 아직 효소의 입체선택성을 예측하기에는 어려운 상황이며 반복적인 실험에 의해 적절한 기질을 찾아야 하는 실정이다. 어떤 경우 기질의 종류에 따라 반대의 입체선택성을 나타낸 예도 있다^{22,23}.

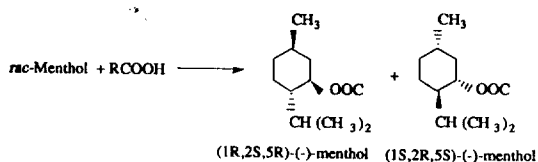
공유결합이나 여러가지 화학적 처리에 의하여 효소의 구조를 변형하여 효소특성을 변화시킬 수 있다. 비수용매에서 반응하는 효소의 경우 건조상태의 pH, 안정화 성분, 수분양에 의해 촉매특성이 변화하는

Table 1. Lipase-hydrolyzed resolution of racemic pharmaceuticals

No	Pharmaceuticals	Substrate of an enzymatic resolution	Lipase	Product yield(%);ee(%)	Ref.
1	Naproxen (Nonsteoidal antiinflammatory agent)		<i>Candida</i> sp.	(S)-acid 25 ; 95	9
2	Intermediate of (S)-Propranolol (anti-hypertention, angina)		Lipase PS	(S)-alcohol 45 ; >95	6
3	Serotonin antagonist		<i>A. niger</i>	(R)-alcohol 26 ; 97	13
4	Intermediate of adenosine receptor agonists and antagonists		<i>Pseudomonas</i>	(S)-acid 50 ; 95	15
5	Intermediate of Ro 23-3544 (leukotriene antagonist)		Lipase PS	(S)-acid 50 ; 75 (R)-ester 45 ; 99.6	16
6	Intermediate of thiazines(antidepressant)		<i>Candida</i>	(S)-ester - ; 95	18
7	Intermediate of α -tocopherol (Vitamine E)		<i>Candida</i>	(R)-ester 40 ; >99	19

것으로 나타난다²⁴. 또한 유기용매에서 효소를 detergent로 처리하여 효소의 원형을 변화시킬 수 있다²⁵. Takahata 등은 흡착에 의한 고정화 효소를 사용할 때 입체선택성이 증가하였음을 보고하고 있다²⁶. *Candida* sp. lipase에 의한 N-protected allylic alcohol의 트랜스에스테르화 반응에서 원형의 효소는 ee (enantiomeric excess)가 86%인데 비해 celite에 고

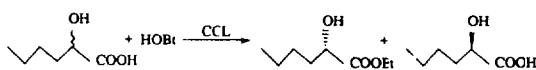
정화한 효소는 99%인 것으로 나타난다. 효소표면을 공유결합으로 처리한 것에 의해 입체선택성이 크게 변화한 예는 Gu 등의 연구에서 잘 알 수 있다²⁷. *Candida* sp. lipase에 의한 α -aryloxypropionic ester의 가수분해에서 원형의 효소를 사용하면 효소의 선택도(E)가 1.5인데 비해 효소의 lysin 부분을 pyridoxal phosphate로 알킬화한 것을 사용하면 선택도가 2.4

Table 2. Effect of acyl donors on menthyl ester formation by gel-entrapped lipase

R	Relative activity	ee(%)
CH ₃	0	—
CH ₃ (CH ₂) ₃	34	100
CH ₃ (CH ₂) ₄	37	84
CH ₃ (CH ₂) ₇	49	88
CH ₃ (CH ₂) ₈	68	60
CH ₃ (CH ₂) ₁₂	100	58
CH ₃ (CH ₂) ₁₄	58	16
CH ₃ (CH ₂) ₁₆	86	2
CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇	100	18
C ₆ H ₅ (CH ₂) ₄	59	100
C ₆ H ₅ (CH ₂) ₁₀	4	100

이고, tyrosine 부분을 tetranitromethane으로 니트로화한 것을 사용하면 선택도가 무려 37로 증가하였다. 효소의 변형에 의한 입체선택성의 증진은 고정화효소를 제외하고는 아직 실험실적 단계에 있으나 앞으로 많은 실험 결과들에 의해 일반적인 효소변형기술이 정립될 것이라 예상된다.

효소반응을 함에 있어서 적당한 반응매질을 선택하는 것이 매우 중요하다. 반응기질의 용해도, 반응의 종류, 효소활성 및 안정성, 효소의 입체선택성을 잘 고려하여 물, 혼수성 유기용매가 첨가된 물, 물-유기용매 이상용액, 물이 미량 첨가된 유기용매 등 적절한 반응매질을 선택할 수 있다. 가수분해 반응시 일반적으로 물에서 반응하는데 소수성의 반응기질을 녹이기 위해 혼수성의 유기용매를 약간 첨가하거나 기질흡착 담체를 사용할 수 있다²⁸. 몇 보고에 의하면 첨가된 혼수성 유기용매가 입체선택성에 큰 영향을 미치는 것으로 나타난다²⁹⁻³¹. 하지만 이러한 결과들로부터 높은 입체선택성과 반응성을 동시에 기할 수 있는 최적 유기용매의 종류나, 유기용매의 농도를 예측할 수는 없으며 현재까지는 'trial error'에 의

Table 3. Catalytic efficiency of CCL catalysis in various organic solvents

Solvent	$10^3(V_{\max}/K_m)_S$, h^{-1}	$10^3(V_{\max}/K_m)_R$, h^{-1}	$(V_{\max}/K_m)_S$ $(V_{\max}/K_m)_R$
dioxane	1.7	0.24	7.1
diethyl ether	6.9	0.82	8.4
toluene	140	0.64	219
cyclohexane	1230	200	6.2

존할 수 밖에 없는 상황이다. 유기용매를 첨가하면 기질, 생성물의 pK값이 변화하여 반응성에 영향을 미칠수 있으며, 효소표면 아미노산의 pK값 변화에 의해 효소의 형태변형을 유도할 수 있다. 그리고 효소의 active site와 기질의 접촉에 유기용매가 영향을 미치면서 입체선택성이 바뀔 수 있음을 예상할 수 있다. 최근에는 완충용액 내에 계면활성제를 첨가한 microemulsion내에서 효소반응을 하여 입체선택성을 높인 결과가 있다. Hedstrom 등의 연구에 의하면 액체기질인 이부프로펜 프로필 에스테르를 DMSO가 미량 첨가된 완충용액과 aerosol OT를 첨가한 microemulsion 상태의 완충용액내에서 각각 CCL로 가수분해할 결과 microemulsion상태에서 반응속도는 떨어졌으나 입체선택성이 크게 증가한 것으로 나타났다³². Microemulsion 내에서의 입체선택성 증가는 소수성의 기질이 완충용액과 효소 active site 사이에 일정한 배열이 이루어지기 때문인 것으로 추정되고 있다.

에스테르화, 트랜스에스테르화 반응은 열역학적인 관점에서 유기용매에서 진행하는 것이 유리한데, 많은 연구자들에 의해 유기용매의 종류에 따른 기질선택성 및 입체선택성에 대한 연구가 수행되어 왔다(참고문헌 21 참조). Parida 등이 실험한 2-hydroxy acid와 일차알코올의 에스테르화 반응에서 반응매질로 사용된 유기용매에 따라 반응속도 및 입체선택성이 영향을 받는 것을 잘 예시하여 준다(표 3)³³. 일반적으로 유기용매내 효소적 에스테르화 반응은 유기용매의 소수성이 클수록 반응성이 좋는데 이 결과에서도 동일한 현상을 보여준다. 하지만 효소의 입체선택성은 유기용매의 소수성과 관련성을 보이지

Table 4. Lipase-catalyzed asymmetrization of diols

R	Lipase	Yield (%)	ee (%)	Reference
CH ₃	<i>P. fluorescens</i>	70	60	38
PhCH ₂	<i>P. fluorescens</i>	96	97	38
Ph	<i>P. fluorescens</i>	—	>94	39
1-Naphthyl	<i>P. fluorescens</i>	93	86	39
PhCH ₂ O(CH ₂) ₂	<i>P. fluorescens</i>	90	81	40
C ₂ H ₅ O(C ₂ H ₅ O)	<i>P. fluorescens</i>	95	98	40
CHCH ₂				
BrPh(CH ₂) ₂	PPL	90	85	41

않는데 추정되는 바로는 친수성의 유기용매(dioxane, diethyl ether)에서는 (S)-에난티오머에 대해 반응성이 낮아 입체선택성이 떨어지며, 소수성의 유기용매(cyclohexane)에서는 (R)-에난티오머에 대한 반응성도 좋아 입체선택성이 떨어지는 것으로 보인다. 한편 유기용매의 종류에 따라 반대의 입체선택성을 나타낸다는 보고도 있는데 특히 전키랄물질로부터 키랄물질로 변환할때 잘 나타난다^{34,35}. *Pseudomonas* sp. lipase에 의해 meso-dihydropyridine dicarboxylate를 수분이 함유된 유기용매에서 가수분해하였을때 diisopropyl ether에서는 (S)-monoester가 cyclohexane에서는 (R)-monoester가 높은 ee로 생성된다³⁵. 효소반응에 미치는 반응매질의 영향을 설명하기 위해 유기용매의 logP, dielectric constant, solubility parameter 등을 도입하였으나 아직 일반화 할 수 있는 결과는 없는 상태이다. 유기용매내의 수분함량이 반응속도와 입체선택성에 영향을 미친다는 점을 고려할 때^{22,36,37} 효소, 유기용매, 기질 및 생성물, 수분의 함량에 대한 종합적인 관계성을 유도하여야 복잡한 효소반응특성을 유추해 낼 수 있을것이라 생각된다.

3.2. 100%의 수율로 에난티오머를 얻는 기술

리파제를 이용한 분할반응은 대부분 이론적으로 50%의 수율을 넘을 수 없다. 경제적인 측면에서 반응하지 않은 에난티오머를 재사용하는 것은 필수적이다. 만일 서로 분리된 두개의 에난티오머가 모두 유용하다면 다행한 일이지만 실제로 대부분 한 에

난티오머만이 유용하므로 반대의 에난티오머를 사용하는 기술이 필요하다.

100%의 수율로 에난티오머를 얻는 가장 쉽고 훌륭한 방법은 전키랄기질로부터 키랄물질을 유도하는 방법이다. 전형적인 예로 알콜탈수소화효소에 의한 케톤의 환원반응과 PLE(pig liver esterase)에 의한 meso-diester의 가수분해반응을 들 수 있다. 리파제에 의한 전키랄 2-substituted-1,3-diol의 입체선택적 아실화 반응을 표 4에 나타내었다^{38,41}. 메틸기외에 큰 기능기가 대치된 diol은 높은 입체선택성을 보이며 50% 이상의 수율로 monoester가 합성된다. 이러한 키랄 monoester는 키랄 의약품의 중간체로 쓰이게 된다. 하지만 이 방법은 제한된 경우에 적용할 수 있으며 많은 경우 원하지 않는 에난티오머를 라세미화(racemization)하여 재사용한다. 라세미화 반응이 효소가 반응할 수 있는 조건에서 가능하다면 효소반응과 라세미화 반응을 동시에 기하여 100%의 수율에 가깝게 반응을 진행할 수 있다. Porcine pancreatic lipase나 *Aspergillus niger* lipase를 이용하여 (±)-hydantoin으로부터 키랄 아미노산을 합성할때 라세미화 반응도 동시에 일어나는 것으로 보고된 바 있다⁴². 라세미화 반응은 알칼리 조건에서 잘 일어나므로 자연분해가 크지 않고 효소가 견딜 수 있는 범위에서 되도록이면 높은 pH에서 반응하는 것이 좋다. 라세믹 기질을 전키랄 유도체와 평형을 유지 하면서 입체선택적 효소와 반응하는 탈라세미화반응(deracemization)에 의해 100%의 수율에 가깝게 순수한 키랄 알콜을 얻을 수 있다. 한 예로 racemic cyanohydrine을 이온교환수지를 이용하여 전키랄 알데히드와 평형을 유지하면서 리파제에 의해 아실화하면 높은 수율로 chiral cyanohydrine ester가 합성된다⁴³. 키랄중심이 하나라면 원하지 않는 에난티오머를 반대쪽의 입체이성질체로 전환하는 inversion방법을 시도할 수 있다. Danda 등은 리파제를 이용하여 라세믹 알콜을 아실화한 후 같은 용액에서 화학적처리를 하여 알콜에스테르의 라세미화가 미미한 가운데 반응하지 않은 알콜 에난티오머를 성공적으로 inversion시켰음을 보고하고 있다⁴⁴.

4. 결 언

라세믹 의약품에 대한 규제 분위기와 순수한 에

난티오머 합성기술의 발전에 힘입어 라세메이트로 판매되고 있는 약품을 다시 에난티오머로 합성하는 라세믹스위치(racemic switch)기술이 곧 제약회사에 도입될 것이라 예상된다. 기존의 라세믹 의약품이 이미 FDA의 승인을 받은 것이므로 그 에난티오머에 대한 승인은 훨씬 용이하며, 새롭게 특허를 갱신할 수 있는 잇점이 있다. 따라서 많은 연구기관에서 독자적인 라세믹스위치 기술을 획득하기 위한 노력들이 이루어지고 있다. 특히 효소의 우수한 입체선택성, 기질선택성에 기인하여 다양한 키랄 의약품 및 키랄 중간체를 합성하는데 강력한 도구인 것으로 평가되고 있다. 그러나 효소적 방법에 의하여 키랄 약품을 제품화 함에 있어서 아직도 해결해야 할 문제점이 많은 것으로 생각된다. 100%에 가까운 고순도의 에난티오머를 얻기위해서 효소의 입체선택성을 더욱 증진시킬 수 있는 기술이 필요하다. 키랄약품의 제품화를 위해서는 고정화 기법 등에 의한 리파제의 재사용, 그리고 반응하지 않은 기질의 재사용이 필요한 상황이다. 앞으로 이러한 문제점들이 해결되면서 아직은 초기단계에 있는 효소적 키랄약품의 합성분야가 화학적 방법을 대체하거나 또는 보완할 수 있을 것이라 기대된다.

참고문헌

1. Federsel, H. -J. (1993) *CHEMTECH December*, 24.
2. Borman, S. (1992) *Chem. Eng. News June 15*, 5.
3. Matsuo, N. and Ohno, N. (1985) *Tetrahedron Lett.* **26**, 5533.
4. Wang, Yi-F., Chen, S. -T. (1989) *Tetrahedron Lett.* **30**, 1917.
5. Bevinakatti, H. S. and Banerji, A. A. (1991) *J. Org. Chem.* **56**, 5372.
6. Terao, Y., Murata, M., Achiwa, K., Nishio, T., Akantsu, M. and Kamimura, M.(1988) *Tetrahedron Lett.* **29**, 5173.
7. Hamaguchi, S., Asada, M., Hasegawa, J. and Watanabe, K. (1985) *Agric. Biol. Chem.* **49**, 166100.
8. Gu, Qu-M., Chen, C. -S. and Sih, C. J. (1986) *Tetrahedron Lett.* **27**, 1763.
9. Battistel, E., Bianchi, D., Cesti, P. and Pina, C. (1991) *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 659.
10. Ahmar, M., Girard, C. and Bloch, R. (1989) *Tetrahedron Lett.* **30**, 7053.
11. Sih, C. J., Gu, Qu-M., Fulling, G., Wu, S. -H. and Reddy, D. R. (1988) *Dev. Ind. Microb.* **29**, 221.
12. Cregge, R. J., Wagner, E. R., Freedman, J. and Margolin, A. L. (1990) *J. Org. Chem.* **55**, 4237.
13. Nieduzac, T. R. and Carr, A. A. (1990) *Tetrahedron: Asymmetry*, **1**, 535.
14. Nieduzak, T. and Margolin, A. L. (1991) *Tetrahedron: Asymmetry*, **2**, 113.
15. Delinck, D. L., Margolin, A. L. (1990) *Tetrahedron Lett.* **31**, 6197.
16. Kalaritis, P., Regenye, R. W., Partridge, J. J. and Coffen, D. (1990) *J. Org. Chem.* **55**, 812.
17. Bovara, R., Carrea, G., Ferrara, L. and Riva, S. (1991) *Tetrahedron: Asymmetry*, **2**, 931.
18. Dike, S., Ner, D. H. and Kumar, A. (1991) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1**, 383.
19. Sugai, T., Kakeya, H. and Ohta, H. (1990) *J. Org. Chem.* **55**, 4643.
20. Koshiro, S., Sonomoto, K., Tanaka, A. and Fukui, S. (1985) *J. Biotechnol.* **2**, 47.
21. Faber, K. (1993) *Biocatalysis*, **8**, 91.
22. Holmberg, E. and Hult, K. (1992) *Biocatalysis*, **5**, 289.
23. Miyazawa, T., Kurita, S., Ueji, S. Yamada, T. and Kuwata, S. (1992) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2253.
24. Stokes, T. M. and Oechschrager, A. C. (1987) *Tetrahedron Lett.* **28**, 2091.
25. Wu, S-H., Guo, Z-W. and Sih, C. J. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1990.
26. Takahata, H., Uchida, Y. and Momose, T. (1992) *Tetrahedron Lett.* **33**, 3331.
27. Gu, Q-M. and Sih, C. J. (1992) *Biocatalysis*, **6**, 115.
28. King, C. R. and Margolin, A. L. (1993) *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 943.
29. Brevet, J. L. and Mori, K. (1992) *Synthesis*, 1007.
30. Guanti, G., Banfi, L. and Narisano, E. (1992) *J. Org. Chem.* **57**, 1540.
31. Watanabe, N., Sugai, T. and Ohta, H. (1992) *Chem. Lett.* 657.
32. Hedstrom, G., Backlund, M. and Slotte, J. P.

- (1993) *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 618.
33. Parida, S. and Dordick, J. S. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2253.
34. Ueji, S., Fujino, R., Okubo, N., Miyajawa, T., Kurita, S., Kitadani, M. and Muromatsu, A. (1992) *Biotechnol. Lett.* **14**, 163.
35. Hirose, Y., Kariya, K., Sasaki, I., Kurono, Y., Ebiike, H. and Achiwa, K. (1992) *Tetrahedron Lett.* **33**, 7157.
36. Kitaguchi, H., Itoh, I. and Ono, M. (1990) *Chem. Lett.* 1203.
37. Van der Lugt, J. P., Elfrink, H., Elvenaar, J. and Doddema, H. J. (1992) *Microbial Reagents in Organic Synthesis*, edited by S. Servi, pp. 261-272.
38. Tsuji, K., Terao, Y. and Achiwa, K. (1989) *Tetrahedron Lett.* **30**, 6189.
39. Atsumi, S., Nakao, M., Koike, Y., Tanaka, S., Ohkubo, M., Yonezawa, T., Funabashi, H., Hashimoto, J. and Morishima, H. (1990) *Tetrahedron Lett.* **31**, 1601.
40. Terao, Y., Akamatsu, M. and Achiwa, K. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 823.
41. Barnett, C. J. and Wilson, T. M. (1989) *Tetrahedron Lett.* **30**, 6291.
42. Kamphuis, J., Boesten, W. H. J., Broxterman, Q. B., Hermes, H. F. M., van Balken, J. A. M., Meijer, E. M. and Schoemaker, H. E. (1990) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **42**, 133.
43. Inagaki, M., Hiratake, J., Nishioka, T. and Oda, J. (1992) *J. Org. Chem.* **57**, 5643.
44. Danda, H., Nagatomi, T., Maehara, A. and Umemura, T. (1991) *Tetrahedron.* **47**, 8701.