

에폭사이드 가수분해효소에 의한 동력학적 가수분해반응을 이용한 광학활성 에폭사이드 생산

†이 은 열

경성대학교 공과대학 식품공학과
(접수 : 2002. 6. 15., 게재승인 : 2002. 19. .)

Epoxide Hydrolase-catalyzed Hydrolytic Kinetic Resolution for the Production of Chiral Epoxides

Eun Yeol Lee†

Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungshung University, Busan 608-736, Korea
(Received : 2002. 6. 15., Accepted : 2002. 19. .)

Chiral epoxides are valuable intermediates for the asymmetric synthesis of enantiopure bioactive compounds. Microbial epoxide hydrolases (EHs) are newly discovered enzymes and versatile biocatalysts for the preparation of chiral epoxides by enantioselective hydrolysis of cheap and easily available racemic epoxide substrates. EHs are commercially potential biocatalysts due to their characteristics such as high enantioselectivity, cofactor-independent catalysis, and easy-to-prepare catalysts. In this paper, recent progresses in biochemistry and molecular biology of EH and developments of novel reaction systems are reviewed to evaluate the commercial feasibility of EH-catalyzed hydrolytic kinetic resolution for the production of chiral epoxides.

Key Words : Chiral epoxide, enantioselective hydrolysis, enantioselectivity, epoxide hydrolase, kinetic resolution

서 론

고부가가치 의약품들은 대부분 분자구조 내에 비대칭 탄소 (asymmetric carbon)가 존재하여 여러 종류의 광학이성질체 (optical enantiomer)가 있으며, 특정 광학이성질체만 생리활성을 보이며 나머지 이성질체는 심각한 부작용을 줄 수도 있다 (1). 이는 신호전달(signal transduction) 또는 생물학적 작용 과정에서는 올바른 입체구조를 가진 특정 광학이성질체만이 신호 전달의 매개체 역할을 수행하는 수용체(receptor)와 정확한 결합을 할 수 있기 때문이다. 라세믹 의약품의 대표적인 부작용 사례로는 독일에서 라세믹 형태로 판매되었던 Thalidomide 사례가 있다. (R)-이성질체 형태의 Thalidomide의 경우 신경안정제 역할을 수행하나, (S)-이성질체는 기형을 유발함이 임상결과 밝혀져 당시 엄청난 사회적 문제 야기와 더불어 판매 조치를 당하였다. 이러한 문제를 사전에 예방하기 위하여 최근 FDA에서는 라세믹 신약의 경우 각각의 광학이

성질체에 대한 별도의 임상 실험을 규정하고 있어 선진 제약 업체들은 신약 개발단계부터 순수한 광학이성질체 형태로 제조하고 있다. 또한, 기존에 시판 중인 라세믹 의약품도 광학적으로 순수한 이성질체로 다시 제조하여 판매하려는 chiral drug switching business도 중소 벤처 화학기업들에 의해 활발히 진행중이다. 이와 같이 광학활성 물질의 중요성이 크게 부각됨에 따라 광학활성 물질 최종 제품 합성에 사용될 수 있는 광학활성 중간체(chiral intermediate) 제조기술 개발의 중요성 역시 부각되고 있다.

에폭사이드(epoxide)는 불안정한 3개 고리구조와 산소 원자의 전기음성도에 기인한 극성때문에 반응성이 우수하여 친전자성반응, 친핵성반응, 산·염기반응, 산화·환원반응 등 다양한 반응을 시킬 수 있으며(Figure 1), 이러한 다양한 반응성과 함께 광학 성질을 가지는 광학활성 에폭사이드 (chiral epoxide)는 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용되는 고부가가치 광학활성 중간체이다(2). 광학활성 에폭사이드는 여러 종류의 키랄화합물 및 생촉매를 이용하여 제조할 수 있는데, 특히 라세믹 에폭사이드 기질의 각 광학이성질체에 대한 에폭사이드 가수분해효소 (epoxide hydrolase, EH)의 선택적 분해능 차이를 이용하여 단일 광학이성질체만을 제조하는 입체선택적 동력학적 가수분해(hydrolytic kinetic resolution, HKR) 기술은 최근 관심의

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

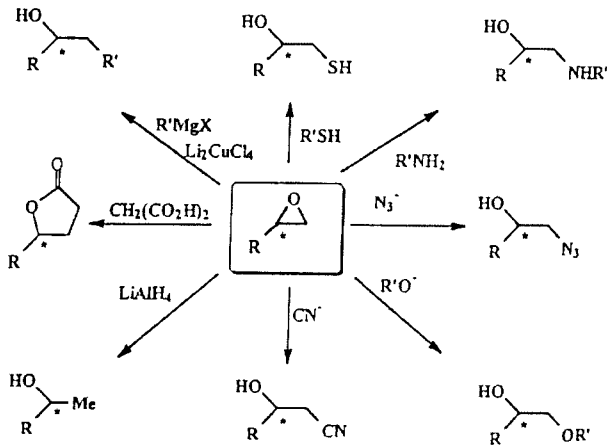


Figure 1. Versatile reactivity of epoxides (2).

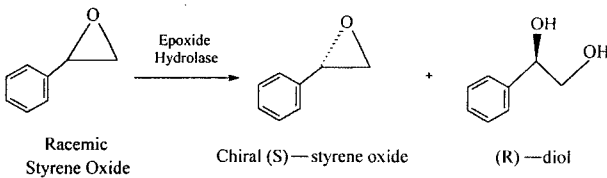


Figure 2. Epoxide hydrolase-catalyzed enantioselective hydrolysis of racemic styrene oxide for the preparation of chiral styrene oxide.

대상이 되고 있는 방법이다(3-5). EH는 라세믹 에폭사이드 기질로부터 (R) 또는 (S)-이성질체 중 한가지 광학이성질체만을 입체선택적으로 diol로 가수분해시켜 제거시키고 나머지 이성질체만을 남겨 광학적으로 순수한 에폭사이드를 제조하는 공정에 사용할 수 있는 효소이다(Figure 2). (R), (S) 이성질체에 대한 EH의 입체선택성은 미생물의 종류 및 기질 구조에 따라 결정된다. EH의 촉매로써의 장점으로는 NADH 등과 같은 보조인자(cofactor)가 필요 없으며, 발현 유도 없이 효소가 발현되며, 비교적 안정된 구조를 가지고 있다. 본 총설에서는 광학활성 에폭사이드 제조용 생촉매로써 우수한 특성을 가진 미생물 유래의 EH 관련 최근 연구 동향을 *Aspergillus niger* EH를 중심으로 분석해보고 상업화 측면에서의 의미를 평가해 보고자 하였다.

미생물 유래의 에폭사이드 가수분해효소

EH에 대한 초기 연구들은 주로 인간 및 동물 간 또는 cytosol에 존재하는 EH에 의하여 독성 물질들이 어떤 식으로 분해 제거되는지에 대하여 주로 진행되어 왔으며, 미생물 유래의 EH를 이용하여 산업적 측면에서의 응용을 목적으로 한 연구는 최근에서야 시작되었다(6). 많은 연구를 통해 박테리아, 효모 및 곰팡이 등으로부터 다양한 기질 특이성이 있는 EH가 발견되었다(7-15). EH 활성이 있는 것으로 보고된 미생물들로는 *Agrobacterium radiobacter*, *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Nocardia* sp., *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus equi*, *Mycobacterium paraffinicum*, *Bacillus sulfurescens*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces antibioticus*, *Aspergillus niger*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula* sp., *Rhodospiridium toruloides*, *Chryseomonas luteola*, *Arthrobacter* sp., *Xantobacter* sp., *Trichosporon mucoids*, *Trichosporon* sp.,

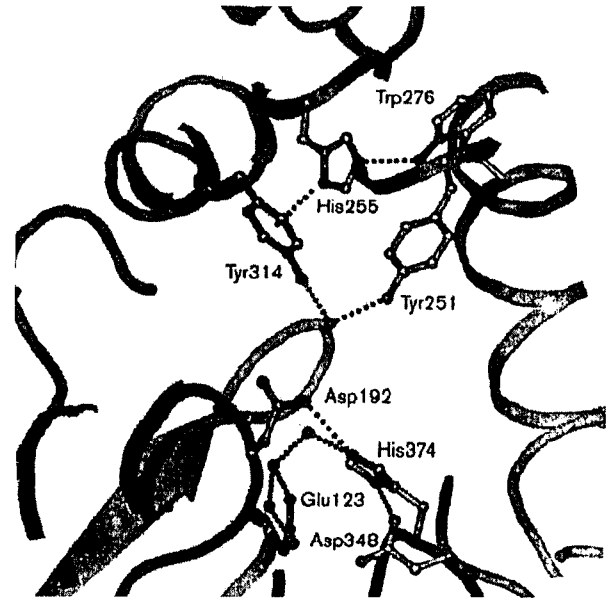


Figure 3. Catalytic active site of *A. niger* EH (17).

Candida parapsilosis, *Beauveria sulfurescens* 등이 있다. 동물 유래의 EH는 xenobiotics의 비독성화 대사과정에서 중요한 역할을 수행하고 식물 유래의 EH는 juvenile 호르몬 조절과정에서 역할을 수행하는 반면, 미생물 유래의 EH는 이화대사작용에서 주된 역할을 수행한다. 따라서, 동식물 유래의 EH는 기질 특이성이 제한적인 반면, 다양한 종의 미생물에 존재하는 여러 종류의 EH는 다양한 기질 특이성을 가지며 입체선택성도 높고 가수분해 속도가 높으며 많은 양의 EH를 간편하게 얻을 수 있으므로 광학활성 에폭사이드 제조용 생촉매로써의 산업적 응용가능성이 높다.

에폭사이드 가수분해 효소 구조 분석 및 반응 기작

X-ray 결정화 구조 분석 방법을 이용하여 *A. radiobacter* AD1 유래의 EH와 *A. niger* LCP521 유래의 EH에 대한 3차원 결정구조 분석 결과가 제시되었다(16,17). 다양한 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해능을 가진 *A. niger* 유래의 EH를 중심으로 살펴보면, multiwavelength anomalous dispersion (MAD) 방법을 기반으로 3.5 Å resolution 수준에서 분석한 결과 *A. niger* EH는 44 kDa의 동일한 subunit로 구성된 dimer 형태로 존재함이 밝혀졌다. 각각의 EH subunit는 촉매 활성점을 가진 core α/β domain, 이러한 domain으로부터 돌출되어 나와있는 lid 영역과 N-terminal meander 등 세부부분으로 구성되어 있다. 이 중에서 subunit의 소수성이 높은 N-terminal meander의 시작과 끝 부위에서, 그리고 lid 영역의 소수성이 높은 부위에서 소수성 상호작용을 통해 dimer를 형성한다. 촉매 활성점은 Asp(192), His(374)와 Asp(348) 등이 catalytic triad를 이루면서 활성점을 구성하고 있는 것으로 밝혀졌다(Figure 3). 촉매 활성점 부위의 아미노산 서열을 살펴보면, 다른 종류의 α/β -fold hydrolase처럼 sm-X-nu-sm-sm motif(sm, small residue; X, any residue; nu, catalytic nucleophile)로 구성되어 있어 catalytic nucleophile인 Asp가 보다 효율적으로 작용할 수 있는 공간을 형성하고 있다. 또한, 촉매 활성점 공간에 대한 3차 구조 분석 결과, *A. niger* 유래의 EH는 mono-substituted

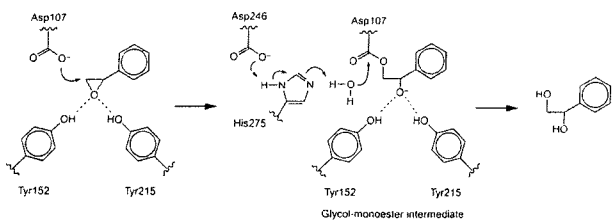


Figure 4. Reaction mechanism of epoxide hydrolase-catalyzed hydrolysis of epoxide compounds (4).

oxirane 기질의 (*R*)-이성질체에 대해 입체선택적 가수분해능이 우수하며 에폭사이드 링의 less-hindered 탄소부위로 친핵성 공격을 하여 가수분해시키는 것으로 분석되었다.

A. niger EH에 의해 4-nitrostyrene oxide의 입체선택적 가수분해 반응 기작을 살펴보면(Figure 4), 우선 기질의 에폭사이드 링이 효소 활성점에 존재하고 있는 두 개의 tyrosine (Tyr251, Tyr314)의 phenolic hydroxyl 기능기와 수소결합을 형성하면서 촉매 활성점 중심부위에 위치하게 된다(17-19). 반응의 첫 번째 단계에서는 nucleophile로 작용할 수 있는 aspartate의 carboxylate기가 에폭사이드 링을 친핵성 공격을 함으로써 에스테르 결합(covalent enzyme-substrate 에스테르 중간체 형성)을 형성하는데, 이 단계가 EH 촉매작용에서의 율속 단계로 추정되고 있다. 이 단계에서 두 개의 tyrosine 부위는 에폭사이드 링과의 수소결합 후 proton donation을 해줌으로써 반응 진행을 촉진시키는 general acid catalyst 역할을 수행한다. 두 번째 단계에서는 물분자가 에스테르 중간체에 대한 가수분해 반응을 진행함으로써 결과적으로 에폭사이드는 반응산물인 diol로 변환된다. 이 때 His374/Asp348 사이의 charge-relay 관계에 의해 물분자에 대해 proton abstraction을 해 줌으로써 가수분해 효율을 높여주게 된다.

EH의 3차원 구조 및 반응 기작에 대한 연구로부터 얻어진 결과를 응용하여 위치선택적 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 통해 EH의 촉매 활성을 증대시키거나, 기질 선택성을 변화시킨 연구 결과들도 보고되었다(20,21). Microsomal EH (mEH)의 경우 촉매활성 부위에 charge relay를 위해 존재하는 glutamic acid (Glu404)를 *A. niger* EH에서와 같이 aspartic acid로 변경시켜 V_{max} 를 23 - 39배 정도 증가시킨 결과가 보고되었다. *A. radiobacter* EH에 대해서는 tyrosine residue(Tyr215)를 phenylalanine으로 치환시킨 경우, enantiomeric ratio(E) 값을 2 - 5배 정도 증가시킨 결과도 보고되었다.

EH를 이용한 광학활성 에폭사이드 생산용 반응시스템 개발

미생물 유래의 EH에 의한 동력학적 가수분해반응을 이용한 광학활성 에폭사이드 생산용 반응시스템 개발에 대한 연구도 활발히 진행되어 왔다(22-25). 인산완충용액에서의 단순 가수분해반응 결과들을 살펴보면, *para*-chlorostyrene oxide의 경우 *A. niger* EH를 이용하여 2 M (306 g/L) 농도에서도 98% ee 수준의 높은 광학순도로 (*S*)-이성질체를 얻었다. 또한, 인산완충용액 대신에 물 자체를 반응 용매로 사용하고 유전자 재조합 *A. niger* EH를 이용하여 98% ee 이상의 광학순도를 가진 (*S*)-2-pyridyloxirane을 생산한 결과가 보고되었는데, 효소 반응 후 분리·정제과정에서 많은 이점을 줄 것으로 판단된다(23). 에폭사이드 가수분해능이 매우 우수한 *R. glutinis* EH

는 membrane-associated 효소로 detergent를 사용하면 세포막으로부터 분리할 수 있는데, non-ionic detergent를 사용하는 경우 미셀 형성을 통해 막구조와 유사한 환경을 제공해줌으로써 EH의 specific activity를 증가시킨 결과도 보고되었다(26).

EH를 이용한 동력학적 가수분해반응을 수행하는 경우 이론적 수율이 50%를 넘을 수 없다는 근본적인 단점이 존재한다. 값이 저렴한 에폭사이드 기질인 경우 큰 문제가 되지 않지만, 고가의 기질인 경우 제조원가를 높이는 단점이 된다. 이러한 한계를 극복하기 위하여 dynamic kinetic resolution (DKR)에 대한 연구 개발이 활발히 진행되고 있다(27-30). 이 기술은 EH에 의해 선택되지 않는 나머지 이성질체를 화학촉매 또는 다른 생촉매를 이용하여 라세믹화 반응을 진행시키면서 계속적으로 diol로 분해시키거나, 다른 위치선택성(regioselectivity)을 가진 두 개의 EH를 사용하여 동일한 광학활성을 가진 diol을 제조하는 방법으로 이론적으로 수율 100%로 광학순도가 높은 diol을 얻을 수 있는 기술이다. 따라서, 생산하고자 하는 최종 목적 산물이 광학활성 에폭사이드가 아니라 광학활성 vicinal diol이 되는데, 광학활성 diol은 광학활성 에폭사이드 못지 않게 합성전구체로서 응용성이 높아 고부가가치의 중간체로 활용된다.

EH를 이용한 preparative-scale의 생물반응기 시스템개발도 활발히 진행되고 있다. 일반적으로 에폭사이드 기질은 구조상 수용액에서의 용해도가 낮으며, 수용액에서 자발적인 분해가 일어나 수율이 떨어질 수 있다(31). 이 경우 에폭사이드 기질을 유기용매에 녹여 사용하고, 유기용매와 생촉매인 EH가 있는 수용액 사이에 친수성 막을 위치시킴으로써 유기용매 사용에 따른 생촉매 활성 저하를 예방하고 고농도의 기질을 사용하기 위하여 중공사막(hollow-fiber membrane) 생물반응기 시스템이 개발되었다(32,33). 유기용매로는 에폭사이드 기질에 대한 분배계수(partition coefficient)가 높고 수용액과 섞이지 않는 dodecane 등의 소수성 유기용매를 주로 사용하였다. 반응 부산물인 diol의 농도가 높아 가수분해 속도가 저하되는 경우, diol을 추출하기 위한 또 다른 중공사막을 연결시켜 생산성을 높인 결과도 보고되었다(32). 이러한 반응기 시스템에서 *R. glutinis* EH 활성을 이용하여 40 nmol/min·mg DCW의 생산성 및 30 % 수준의 수율로 (*S*)-1,2-epoxyhexane을 얻을 수 있었다. 또한, 유기용매를 기준으로 한 단위부피 평균 생산성은 9.7 g/l·h, 생촉매 생산성은 0.49 g/g of DCW·h 수준으로 높은 편이다.

전 망

EH는 키랄화학촉매에 비해 높은 촉매 활성 및 turnover number를 가지고 있어 상업적으로 유용성이 높은 생촉매이다 (Table 1) (34). 그러나, EH를 이용한 광학활성 에폭사이드 생산에 있어서, wild-type 균체 자체를 생촉매로 이용하는 경우 전체 단백질 대비 EH가 매우 적은 양으로 존재하고 있어 생산성 향상에 어려움이 있으며, 효소를 분리·정제하여 사용하는 경우 비용 증대의 문제점이 있다. *A. radiobacter* EH의 경우 *E. coli* BL21(DE3) 숙주에서 전체 단백질의 30% 수준까지 효율적으로 발현될 수 있다는 결과가 보고되기는 하였으나(35,36), 다양한 에폭사이드 기질에 대한 우수한 입체선택적 가수분해능을 가지고 있는 효모 및 곰팡이 유래의 친핵세포

Table 1. Comparison of the specific activities and turnover numbers of microbial epoxide hydrolase and (salen) Co(III) asymmetric chemocatalyst(38).

	Yeast	Fungi	Bacteria	Jacobsen
Catalyst	<i>R. toruloides</i>	<i>A. niger</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.	Jacobsen catalyst
Mr.	54000	45000	35000	652
Specific activity (U/mg)	172	102	27	0.44
Turnover number (mol/mol · min)	9297	4590	948	0.28

EH들은 *E. coli* 숙주 시스템에서 고효율로 발현된 결과가 없어 보다 효율적인 진핵세포 EH 발현 시스템 개발이 요구됨을 알 수 있다(37-39). 유전자 재조합 EH를 이용하여 저가 라세믹 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 통한 고가의 광학활성 에폭사이드를 제조하는 기술은 기초 연구뿐만 아니라 상업적 측면에서도 중요한 연구분야가 될 것이다. EH에 대한 3차원 구조 해석을 기반으로 촉매 활성점에 대한 rational design을 통해 촉매 활성도 및 기질 선택성을 증가시키거나 또는 기질 선택성을 변경시킬 수 있을 것으로 기대되며, 이러한 기술 개발은 상업성이 우수한 광학활성 물질을 생산하기 위한 tailor-made 생촉매 제작을 가능하게 할 것이다. 또한, 유기용매 반응 시스템, 이상계 반응 시스템, enantioconvergent 반응, dynamic kinetic resolution 반응 기술, 중공사막 반응기 기술 등 효율적인 생산 시스템에 대한 연구 개발도 활발히 진행되고 있어 상업화 가능성을 더욱 높여 줄 것으로 기대된다.

요약

광학활성 에폭사이드는 다양한 반응성으로 인하여 고부가 가치 광학활성 의약품 및 농약 합성용 중간체로 널리 이용되고 있다. 광학활성 에폭사이드는 에폭사이드 가수분해효소(epoxide hydrolase, EH)를 이용하여 저가의 라세믹 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 통해 제조할 수 있으며, EH는 유도과정 없이 발현되고 보조인자가 필요 없으며 비교적 효소 안정성도 높아 상업적으로 유용한 효소이다. EH에 대한 생화학 및 분자생물학 관련 최근 연구 결과를 바탕으로 촉매 활성 증대 및 기질 선택성을 변경시킨 tailor-made형 EH 생촉매 개발이 가능할 것이며, 실규모의 비대칭 광학분할 생물공정 시스템 개발을 통해 EH에 의한 동력학적 가수분해반응을 이용한 광학활성 에폭사이드 생산기술의 상업화가 가능할 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Sheldon, R. A. (1993), Chirotechnology, Marcel Dekker, New York.
- Besse, P. and H. Veschambre (1994), Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrah.* **50**, 8885-8927.
- Archelas A. and R. Furstoss (2001), Synthetic applications of epoxide hydrolases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 112-119.
- Steinreiber, A. and K. Faber (2001), Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations, *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 552-558.
- 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: Enzym.* **6**, 199-214.
- Zhang, X. M., A. Archelas, and R. Furstoss (1991), Microbiological transformation. 19. Asymmetric dihydroxylation of the remote double bond of geraniol: a unique stereochemical control allowing easy access to both enantiomers of geraniol-6,7-diol, *J. Org. Chem.* **56**, 3814-3817.
- Botes, A. L., J. A. Steenkamp, C. A. G. M. Weijers, and M. S. van Dyk (1998), Biocatalytic resolution of 1,2-epoxyoctane using resting cell of different yeast strains with novel epoxide hydrolases activities, *Biotechnol. Lett.* **20**, 421-426.
- Cagnon, J. R., A. L. N. Porto, and A. J. Marsaioli (1999), First evaluation of the brazilian microorganisms biocatalytic potential, *Chemosphere*, **38**, 2237-2242.
- 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.
- Krenn, W., I. Osprian, W. Kroutil, G. Braunegg, and K. Faber (1999), Bacterial epoxide hydrolases of opposite enantiopreference, *Biotechnol. Lett.*, **21**, 687-690.
- Moussou, P., A. Archelas, and R. Furstoss (1998), Microbiological transformations 41. Screening for novel epoxide hydrolase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **5**, 447-458.
- 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.
- Van de Werf, M. J., R. A. V. Orru, K. M. Overkamp, H. J. Swarts, I. Osprian, A. Steinreiber, J. A. M. de Bond, and K. Faber (1999), Substrate specificity and stereospecificity of limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14; an enzyme showing sequential and enantioconvergent substrate conversion, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 380-385.
- Zocher, F., M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, B. Hauer, W. Wohlleben, and R. D. Schmid (2000), Epoxide hydrolase activity of *Streptomyces* strains, *J. Biotechnol.*, **77**, 287-292.
- Weijers, C. A. G. M. (1997), Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*, *Tetrah. Asymm.* **8**, 639-647.
- Nardini, M., I. S. Ridder, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, R. Rink, D. B. Janssen, and B. W. Dijkstra (1999), The X-ray structure of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1, *J. Biol. Chem.* **274**, 14579-14596.
- Zou, J., B. M. Hallberg, T. Bergfors, F. Oesch, M. Arand, S. L. Mowbray, and T. A. Jones (2000), Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implication for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases, *Structure*, **8**, 111-122.

18. Yamada, T., C. Morisseau, J. E. Maxwell, M. A. Argiriadi, D. W. Christianson, and B. D. Hammock (2000), Biochemical evidence for the involvement of tyrosine in epoxide activation during the catalytic cycle of epoxide hydrolase, *J. Biol. Chem.* **275**, 23082-23088.
19. Argiriadi, M. A., C. Morisseau, M. H. Goodrow, D. L. Dowdy, B. D. Hammock, and D. W. Christianson (2000), Binding of alkylurea inhibitors to epoxide hydrolase implicates active site tyrosines in substrate activation, *J. Biol. Chem.* **275**, 15265-15270.
20. Arand, M., F. Muller, A. Mecky, W. Hinz, P. Urban, D. Pompon, R. Kellner, and F. Oesch (1999), Catalytic triad of microsomal epoxide hydrolase: replacement of Glu⁴⁰⁴ with Asp leads to a strongly increased turnover rate, *Biochem. J.* **337**, 37-43.
21. Rink, R., J. H. L. Spelberg, R. J. Pieters, J. Kingma, M. Nardini, R. M. Kellogg, B. W. Dijkstra, and D. B. Janssen (1999), Mutation of tyrosine residues involved in the alkylation half reaction of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 results in improved enantioselectivity, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7417-7418.
22. Archelas, A., M. Arand, J. Baratti, and R. Furstoss (1999), French Patent Application No. 9905711; (2000), International Patent Application No. PCT/FR00/01217.
23. Genzel, Y., A. Archelas, O. B. Broxterman, B. Schulze, and R. Furstoss (2001), Microbiological transformations. Part 46 : preparation of enantiopure (*S*)-2-pyridyloxirane via epoxide hydrolase-catalyzed kinetic resolution, *Tetrah. Asymm.* **11**, 3041-3044.
24. Genzel, Y., A. Archelas, O. B. Broxterman, B. Schulze, and R. Furstoss (2001), Microbiological transformations. 47. A step toward a green chemistry preparation of enantiopure (*S*)-2,3 and 4-pyridyloxirane via an epoxide hydrolase catalyzed kinetic resolution, *J. Org. Chem.* **66**, 538-543.
25. Cleij, M., A. Archelas, and R. Furstoss (1998), Microbiological transformations 42. A two-phase preparative scale process for an epoxide hydrolase catalysed resolution of *para*-bromo α -methyl-styrene oxide. Occurrence of a surprising enantioselectivity enhancement. *Tetrah. Asymm.* **9**, 1839-1842.
26. Kronenburg, N. A. E. and J. A. M. de Bont (2001), Effects of detergents on specific activity and enantioselectivity of the epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis*, *Enzyme Microbial Technol.* **28**, 210-217.
27. Krenn, W., I. Osprian, W. Kroutil, G. Braunegg, and K. Faber (1999), Bacterial epoxide hydrolases of opposite enantiopreference, *Biotechnol. Lett.* **21**, 687-690.
28. Lutje Spelberg, J. H., J. E. T. Van Hylckama Vlieg, T. Bosma, R. M. Kellogg, and D. B. Janssen (1999), A tandem enzyme reaction to produce optically active halohydrins, epoxides and diols, *Tetrah. Asymm.* **10**, 2863-2870.
29. Mayer, S. F., A. Steinreiber, R. V. A. Orru, and K. Faber (2001), An enzyme-triggered enantio-convergent cascade-reaction, *Tetrah. Asymm.* **12**, 41-43.
30. Steinreiber, A., S. F. Mayer, and K. Faber (2001), Biocatalytic asymmetric and enantioconvergent hydrolysis of trisubstituted epoxides, *Tetrah. Asymm.* **12**, 1518-1528.
31. 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.
32. 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.
33. Choi, W. J., Choi, C. Y., J. A. M. de Bont, and C. A. G. M. Weijers (2000), Continuous production of enantiopure 1,2-epoxyhexane by yeast epoxide hydrolase in a two-phase membrane bioreactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 641-646.
34. Botes, A. L., J. Lotter, C. H. Pohl, C. A. Yeates, C. A. Hayward, J. C. Breytenbach, and M. S. Van Dyk (2001), Yeast epoxide hydrolases as biocatalysts for the batch and continuous synthesis of enantiomerically pure epoxides and vic diols, In *BioTrans 2001*, W. -D. Fessner Ed.; Proc. The 5th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation, Darmstadt, p196.
35. Rink, R., M. Fennema, M. Smids, U. Dehmel, and D. B. Janssen (1997), Primary structure and catalytic mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1, *J. Biol. Chem.*, **272**, 14650-14657.
36. Lutje Spelberg, J. H., R. Rink, R. M. Kellogg, and D. B. Janssen (1998), Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*, *Tetrah. Asymm.* **9**, 459-466.
37. Arand, M., H. Hemmer, H. Durk, J. Baratti, A. Archelas, and R. Furstoss (1999), Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* that is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase, *Biochem. J.* **344**, 273-280.
38. Visser, H., S. Vreugdenhil, J. A. M. de Bont, and J. C. Verdoes (2000), Cloning and characterization of an epoxide hydrolase-encoding gene from *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 415-419.
39. Visser, H., J. A. M. de Bont, and J. C. Verdoes (1999), Isolation and characterization of the epoxide hydrolase-encoding gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5459-5463.