

## 바이오촉매 및 생물전환을 이용한 광학활성 에폭사이드 제조

김희숙 · 이옥경 · 이은열<sup>1\*</sup>

경성대학교 공과대학 식품공학과, <sup>1</sup>해양·극한생물 분자유전체 연구단

Received June 10, 2005 / Accepted October 7, 2005

**Biocatalysis and Biotransformation for the Production of Chiral Epoxides.** Hee Sook Kim, Ok Kyung Lee and Eun Yeol Lee<sup>1\*</sup>. Department of Food Science and Technology, Kyungsoo University, Busan 608-736, <sup>1</sup>Marine and Extreme Genome Research Center, Ansan 426-755, Korea – Chiral epoxides are important chiral synthons in organic synthesis for the production of chiral pharmaceuticals and functional food additives. Chiral epoxides can be synthesized by enantioselective introduction of oxygen to double bond of substrate by monooxygenase. Peroxidase also carry out asymmetric epoxidation of alkene in the presence of hydrogen peroxide. Kinetic resolution of racemic epoxides *via* enantioselective hydrolysis reaction by epoxide hydrolase (EH) is a very promising method since chiral epoxides with a high optical purity can be obtained from cheap and readily available racemic epoxides. In this review, various biocatalytic approaches for the production of chiral epoxides with several examples are presented and their commercial potential is discussed.

**Key words** – chiral epoxides, monooxygenase, peroxidase, epoxide hydrolase, halohydrin dehalogenase

미국 FDA에서는 라세믹 신약의 경우 각각의 광학이성질체에 대하여 개별적인 임상을 하도록 규정하고 있어, 선진 제약업체들은 신약 개발단계부터 순수한 광학이성질체를 사용하고 있다[31]. 광학활성 의약품의 세계 시장규모는 2001년에 1393억불, 2002년에 1519억불 규모를 형성하고 있다. 연간 성장률도 15% 수준으로 매우 높아 향후에 지속적인 시장 성장이 기대되고 있다. 미국의 광학활성 화합물(chiral chemicals)의 수요가 2005년까지 매년 9.4%씩 증가하여 151억 달러 규모의 시장을 형성할 것으로 전망되고 있다. 광학활성 물질의 중요성이 크게 부각됨에 따라 광학활성 물질 최종 제품 합성에 사용될 수 있는 광학활성 화합물 및 중간체(chiral chemicals & intermediate) 제조기술 개발의 중요성이 부각되고 있다. Chiral chemicals 관련 수요는 광학활성 중간체의 2000년 세계시장 규모가 19억불 규모이며, 향후 연 10% 이상의 성장률을 보여 2005년에는 30억불 이상이 될 것으로 예상되고 있다. Chiral chemicals 관련 세계시장은 미국이 36%, 유럽이 31%, 일본 26% 및 기타 지역이 7% 정도를 형성하고 있다.

Oxirane ring의 불안정성 및 산소 원자의 전기음성도에 기인한 극성으로 인하여 에폭사이드는 반응성이 대단히 우수하여 친전자성반응, 친핵성반응, 산·염기반응, 산화·환원반응 등 다양한 반응을 유도할 수 있다(Fig. 1)[3]. 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[1,6].

광학활성 에폭사이드는 chiral chemocatalyst를 이용하여 합성할 수 있다. Jacobsen 에폭시화반응법은 알켄 기질을 manganese-based salen 촉매를 이용하여 직접 에폭시화반응을 시키는 기술로서, cis-알켄을 기질로 사용하는 경우 86~98% ee (enantiomeric excess = [(R-S)/(R+S)] × 100%) 정도의 광학선택성을 보이며 반응 속도 또한 빠른 편이다[35]. Cobalt-based salen 촉매를 이용한 화학적 분할법은 단말에폭사이드(terminal epoxide) 라세믹혼합물에서 특정 이성질체만을 광학선택적으로 가수분해시키는 방법으로 촉매를 0.5 mol% 정도의 낮은 농도에서 사용하므로 경제성도 우수하여 현재 일본 Daiso사가 기술을 이전받아 epichlorohydrin 제조용 상업화 공정에 사용되고 있다. 단점으로는 단말에폭사이드 등의 기질에만 제한적으로 적용되며 scale-up이 어렵다는 문제점이 지적되고 있다.

유기합성법의 대안으로 바이오촉매(biocatalyst)와 생물전환(biotransformation) 기술을 이용한 광학활성 에폭사이드 제조기술이 활발히 개발되고 있다[9,29,33]. 세포 및 효소를 바이오촉매로 이용하는 경우, 일반적인 화학합성공정에서 기대하기 어려운 높은 광학선택성(enantioselectivity), 위치선택성(regioselectivity), 화학종선택성(chemoselectivity) 등의 반응특성을 얻을 수 있다. 본 총설에서는 epoxide hydrolase, monooxygenase, peroxidase, halohydrin dehalogenase 등의 바이오촉매를 이용한 광학활성 에폭사이드 상업화 생산 관련 연구 및 향후 전망을 분석해 보았다.

## 본 론

**Monooxygenase를 이용한 에폭시화반응(epoxidation)**  
Monooxygenase를 이용하여 알켄 기질의 이중결합에 광

\*Corresponding author

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

E-mail : eylee@ks.ac.kr

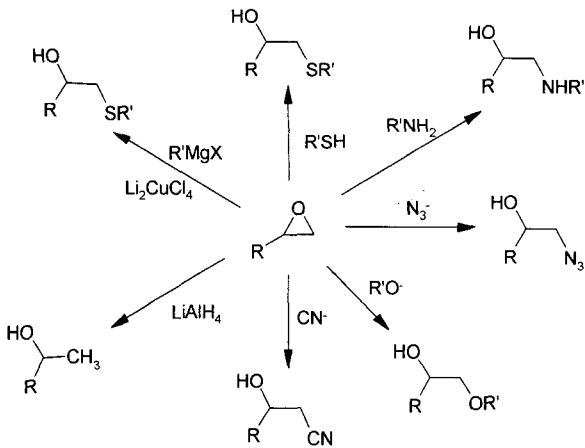


Fig. 1. Versatile reactivity of epoxides.

학선택적으로 oxirane 링을 도입시키는 방법이다(Fig. 2). 직접 에폭시화반응은 높은 광학순도를 얻을 수 있으며, 성장기질을 같이 공급해주는 경우 100%의 이론적 수율로 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있다[23]. 그러나 NAD(P)H의 재생산이 요구되며, 2개 이상의 subunit로 구성된 monooxygenase 효소의 불안정성, 기질 산화와 관계없이 분자산소가 환원되는 uncoupling 현상, fatty acid 등으로의 overoxidation 문제 등은 기술적으로 극복해야 할 부분이다.

Monooxygenase를 이용한 광학활성 styrene oxide 제조 중심으로 기술 개발 동향을 살펴보면, Panke 등은 *Pseudomonas* sp. strain VLB120로부터 styrene monooxygenase (SMO) 유전자들을 클로닝 하였다[22,24]. *StyA* 유전자가 oxygenase를 코딩하고 *styB* 유전자가 reductase를 코딩하고 있으며, styrene oxide isomerase (SOI)와 phenylacetaldehyde dehydrogenase는 각각 *styC* 및 *styD* 유전자에 의해 코딩되었음을

분석하였다. *P. fluorescens* 및 *P. putida* 등 다른 종류의 *pseudomonads* 유래의 SMO 관련 유전자들도 유사한 구조를 가지고 있음이 밝혀졌다(Fig. 3)[13,21,26,28]. *P. oleovorans*로부터 *alkBp* 프로모터에 대해 positive regulation 효과를 주는 *alkS-alkBp* 유전자를 *styAB* 유전자 앞에 연결시켜 SMO를 보다 효율적으로 발현시킨 결과도 보고되었다. *E. coli*를 숙주세포로 이용하는 경우 70 U/g dcw (dry cell weight) 수준의 SMO 활성을 얻었다(Table 1). 또한, *P. putida*의 styrene oxide isomerase (SOI)를 결실시킨 SOI-negative mutant는 80 U/h dcw의 높은 활성을 보여주었으며, *E. coli*와 비교하여 유기용매에 대한 저항성이 우수하다는 장점이 상업화 균주로서 가능성도 우수하다고 할 수 있다[25].

상업화 관련 연구 동향을 보면, 스위스 ETH의 Witholt 팀에서 재조합 *E. coli*의 SMO를 이용한 (S)-styrene oxide 제조용 pilot-scale 결과가 보고되었다[30]. 수용액과 bis(2-ethylhexyl) phthalate (BEHP)를 유기용매로 사용한 2상계 공정에서 약 17 반응시간 동안 12.6 g의 (S)-styrene oxide가 생산되었다. 제조된 (S)-styrene oxide의 광학순도는 99% 이상이었으며, BASF와 공동으로 상업화 평가를 위한 pilot 규모의 테스트가 활발히 진행 중이다.

**Peroxidase를 이용한 에폭시화반응**

해양 곰팡이인 *Caldaryomyces fumago*로부터 분리한 chloroperoxidase는 cytochrome P-450 monooxygenase와 유사한 구조를 보이며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 reducing agent로 제공하는 경우 알켄 기질에 직접 에폭시화반응을 시키는 것으로 보고되었다(Fig. 2) [11,18,37]. 0.1 M 인산염완충용액(pH 5.5)에 50% (v/v) 농도의 styrene 기질을 넣고 110 mM t-butylhydroperoxide (t-BHP)와 분당 0.1 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제공하면서 약 30 분간 산

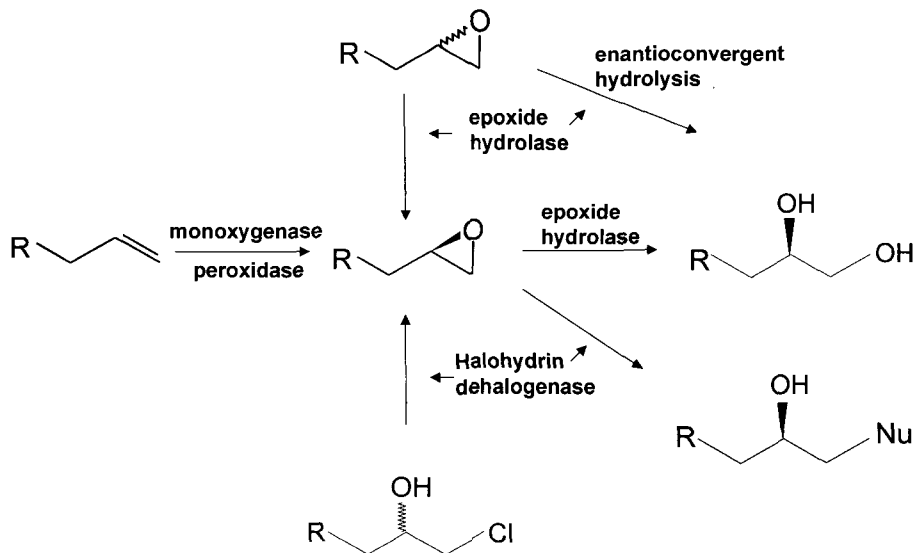


Fig. 2. Various biocatalytic production methods for chiral epoxides.

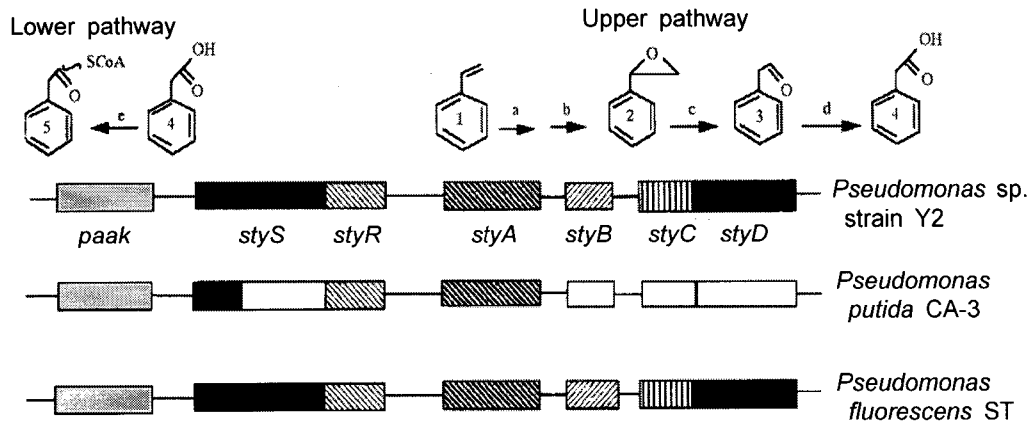


Fig. 3. Comparison of genetic organization of the styrene-degradative genes (*paak*, *stySR* and *styABCD*), from a variety of *Pseudomonas* strains. Individual steps in the upper and lower pathway are shown above the genes responsible for the respective steps. a, SMO A subunit; b, SMO B subunit; c, styrene oxide isomerase; d, phenylacetaldehyde dehydrogenase; e, PACoA ligase. 1, styrene; 2, styrene oxide; 3, phenylacetaldehyde; 4, PAA; 5, phenylacetyl - CoA. Unshaded regions represent sequence data yet to be determined[21].

Table 1. Previous studies for construction of recombinant strains[28].

Host strain	Regulation	Plasmid	Target protein	Max. styrene oxide specific formation rate	Host strain	reference
Recombinant <i>E. coli</i>	<i>AlkS</i> and <i>alkBp</i>	Low copy No.	XMO from <i>P. putida mt-2</i>	91 U/g cell (e.e >95%)	Good regulation	22
Recombinant <i>E. coli</i>	<i>AlkS</i> and <i>alkBp</i>	Low copy No.	SMO from <i>Pseudomonas sp. VLB120</i>	70 U/g cell (e.e >99%)	Good regulation Maintain over 6h	24
Recombinant <i>E. coli</i>	<i>Ptac</i>	Low copy No.	SMO from <i>Pseudomonas sp. VLB120</i>	70 U/g cell (e.e >99%)		24
Recombinant <i>E. coli</i>	<i>AlkS</i> and <i>alkBp</i>	Chromosomal insertion	XMO from <i>P. putida mt-2</i>	0 U/g cell	Low gene dosage	22
<i>P. Putida KT2440</i>	<i>AlkS</i> and <i>alkBp</i>	Chromosomal insertion	SMO from <i>Pseudomonas sp. VLB120</i>	86 U/g cell (e.e >99%)	Good regulation	22

<sup>a</sup> *Alk* system from *Pseudomonas oleovorans* GPo1.

화반응을 수행하면, 10 mol/mol enzyme/sec의 속도로 styrene oxide를 제조할 수 있었으며, total turnover number (TTN)은 약 23,000으로 상당히 높은 결과를 보여주었다. *C. fumago* chloroperoxidase는 epoxidation 반응 이외에도 sulfoxidation, hydroxylation, aldehyde formation 반응을 촉매할 수 있다[27].

### Halohydrin dehalogenase를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조

Halohydrin dehalogenase (haloalcohol dehalogenase, halohydrin epoxides, hydrogen-halide lyase)는 haloalcohol의 halide와 alcohol기 사이에 intramolecular dehalogenation 반응을 촉매시켜 epoxide로 변환시킨다. Janssen 등은 *Agrobacterium radiobacter* AD1의 halohydrin dehalogenase를 이용하여 라세믹 2,3-dichloro-1-propanol을 입체선택적으로 탈할로겐화 반응을 시켜 E>100 이상의 높은 효율로 광학순도 99% 이상의 (S)-2,3-dichloro-1-propanol을 제조하였다[32]. 최근에

는 nitrite를 nucleophile로 사용하고 *A. radiobacter* AD1의 halohydrin dehalogenase를 이용하여 라세믹 에폭사이드의 개환 반응을 최초로 성공함으로써 H<sub>2</sub>O 이외에 다른 종류의 nucleophile을 사용할 수 있음을 보여주었다[14]. 라세믹 *para*-nitrostyrene oxide (*p*-NSO)을 기질로 사용한 경우, (R)-*p*-NSO 기질에 대하여 입체선택적으로 반응을 진행하여 불안정한 hydroxynitrite ester 중간체를 거쳐 diol로 분해되는 결과를 보여주었다. 따라서 nitrite 등을 nucleophile로 사용하는 경우 halohydrin dehalogenase가 epoxide hydrolase 역할을 대신할 수 있음을 보여준 결과라고 할 수 있다(Fig. 2).

Halohydrin dehalogenase를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조관련 Daiso사에 의해 상업화된 기술을 살펴보면, 라세믹 2,3-dichloro-1-propanol 또는 라세믹 3-chloro-1,2-propanediol 기질에 대해 (R)-광학이성질체만을 탈할로겐화 반응을 시킬 수 있는 *Alcaligenes sp.*와 (S)-광학이성질체에만 선택적으로 작용하는 *Pseudomonas sp.*를 이용하여 99.4% ee 및 38% 수율

로 각각의 광학활성 전구체를 일차적으로 제조하였다[15,20,34]. 수용액상에 있는 chiral 2,3-dichloro-1-propanol을 유기 용매를 사용하여 추출하고 분별 증류시켜 얻은 후, aqueous NaOH 상에서 dehalogenation 반응을 시켜 최종 산물인 광학활성 epichlorohydrin을 얻은 후 다시 유기용매를 사용하여 추출·분별 증류하여 분리하는 복잡한 과정을 거쳐 제조하였다. 이 기술은 기질인 halohydrin의 물에 대해 용해도가 낮고 dehalogenase의 활성이 낮아 volumetric productivity가 낮다는 단점이 있다. Daiso사는 이 기술을 이용하여 톤 규모 이상으로 광학활성 epichlorohydrin 제조하다가 최근에는 Jacobsen 촉매를 이용한 공정으로 변경하였다[35].

#### 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조

라세믹혼합물에 대한 입체선택적 가수분해 활성 차이를 이용하여 순수한 광학이성질체를 제조하는 비대칭 분할(asymmetric resolution) 방법은 저가의 라세믹 기질로부터 고부가가치의 광학활성 물질을 제조할 수 있는 상업적으로 유용한 기술이다[1,9]. Epoxide hydrolase (EH)를 이용하여 라세믹 에폭사이드의 특정 광학이성질체만을 입체선택적으로 가수분해한 후 제거하여 광학적으로 순수한 에폭사이드를 제조할 수 있다(Fig. 2). 광학활성 epichlorohydrin에 대하여 기존 halohydrin dehalogenase를 사용하는 기술 대비 EH 기술의 산업화 적용의 난이성을 평가해보면, 기존의 dehalogenase를 이용하여 epichlorohydrin을 제조하는 경우 chiral 2,3-dichloro-1-propanol을 추출·분별 증류하여 분리한 다음 aqueous NaOH 상에서 dehalogenation 반응을 시켜 최종 산물을 얻는 반면, EH 바이오촉매 사용 공정에서는 반응 후 용액 자체를 바로 분별 증류시켜 one-step으로 최종 산물을 얻을 수 있어 기존 바이오공정보다 공정단계를 간소화할 수 있으므로 초기 설비투자 측면에서 우위성이 있고, 사용하는 기질도 저렴한 편이므로 제조원가 측면에서 경제성이 우수하여 산업화 적용에 장점이 있다. 그리고 EH는 NADH 등의 cofactor를 요구하지 않으며, 효소 자체도 안정한 편이므로 산업화 바이오촉매로서의 장점을 가지고 있다. 반면에 kinetic resolution 과정을 통해 라세믹 기질로부터 광학활성 에폭사이드를 제조하므로 이론적 수율이 50%로 제한된다는 단점이 있다.

EH를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조용 공정개발 동향을 살펴보면, 용해도가 낮은 *para*-bromo- $\alpha$ -methyl-styrene oxide 기질을 고농도로 공급하여 기질 자체가 상을 형성하도록 하여 수용액상과 2상계 반응을 저온에서 진행하는 경우, 낮은 온도에서보다 높은 광학순도 및 수율을 얻는 결과가 보고되었다[8,16,17]. 유기용매 및 수용액으로 구성된 2상계 반응시스템에서 바이오촉매를 이용한 비대칭 분할반응을 수행하는 경우 유기용매 사용에 따른 기질 농도 증가 및 기질 안정성 향상이라는 장점이 있지만 유기용매 사용으로 인한 바이오촉매의 활성 감소가 동시에 존재한다. 이러한 상반된 문

제점을 동시에 극복하기 위하여 EH 활성을 가진 미생물 바이오촉매가 있는 수용액 층과 에폭사이드 기질이 녹아있는 유기 용매 층을 막으로 분리한 hollow-fiber membrane을 이용하여 가장 효율적인 에폭사이드 기질의 물질전달을 기대할 수 있는 비대칭분할 시스템이 개발되었다[4,5,7]. Single-stage hollow-fiber membrane을 이용한 고농도 1,2-epoxyhexane의 비대칭분할 시스템과 diol product에 의한 바이오촉매 효율 저해를 줄일 수 있는 two-stage hollow-fiber reactor 시스템을 개발되었다. 이러한 2단계 hollow-fiber 반응기 시스템을 이용하여 1M 이상의 고농도 기질에 대하여 입체선택적 분할반응을 통해 광학적으로 순수한 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있었다.

Kinetic resolution 과정을 통해 라세믹 기질로부터 광학활성 에폭사이드를 제조하는 경우 이론적 수율이 50%로 제한된다는 단점을 극복하기 위하여 광학선택성 및 위치선택성이 서로 다른 두 개의 EH 효소를 사용하여 광학활성 diol을 제조하는 기술이 개발되었다(Fig. 4)[10,19]. 이 경우 최종 산물이 광학활성 vicinal diol이며, 광학활성 diol 역시 널리 사용되는 광학활성 중간체이다. *A. niger* EH와 *Solanum tuberosum* EH를 같이 사용하여 라세믹 *para*-chlorostyrene oxide (*p*-CSO) 기질로부터 Eliprodiol 합성에 사용되는 핵심중간체인 (*R*)-*para*-chlorostyrene diol (*p*-CSD)을 제조 기술 개발이 보고되었다[12]. *A. niger* EH는 (*R*)-*p*-CSO 이성질체의 에폭사이드 탄소 중  $\beta$ 위치에 위치선택적 가수분해 반응을 진행하고, *S. tuberosum* EH는 (*S*)-*p*-CSO 이성질체의 에폭사이드 탄소 중  $\alpha$ 위치에서 위치선택적 가수분해 반응을 진행함으로써 결과적으로 광학순도 96% ee 이상의 (*R*)-*p*-CSD를 93%의 매우 높은 수율로 얻을 수 있었다. 이러한 enantioconvergent hydrolysis 반응을 이용하는 경우 kinetic resolution의 최대단점인 이론수율 50% 문제를 극복할 수 있으며, 광학순도 100% 및 수율 100%를 이론적으로 얻을 수 있는 기술이다.

EH에 관한 중요한 특허 등록내용을 살펴보면, 프랑스의 Furstoss, 네덜란드 Janssen 그룹에서 각각 *fungi* 및 *A. radiobacter*의 EH 효소를 이용하여 광학활성 에폭사이드 제조에 대한 특허를 등록하였다[2]. 특허 범위는 *fungi* 및 *Agrobacterium* 유래의 EH 효소를 이용한 chiral epoxide 제조기술, 유전자재조합 기술을 이용한 recombinant EH 제조 방법 등을 포함하고 있다. 따라서 EH 바이오촉매 개발 및 이를 활용한 키랄 에폭사이드 제조관련에 대한 이 특허는 *A. niger* 및 *A. radiobacter* 유래의 EH를 활용한 키랄 에폭사이드 제조가 주된 특허 내용이므로 특허 청구범위에서 중복되지 않는 신규 고기능성 EH 개발을 기반으로 한 바이오공정 개발이 요구된다. EH를 활용한 유기합성에 대한 연구가 활발히 진행됨에 따라 수요가 발생하고 있는 EH 효소를 판매하기 위하여 연구시약 전문제조회사인 Fluka사에서 현재 *A. niger* 유래의 유전자재조합 EH 단백질을 제조하고 있다. Bayer, DSM

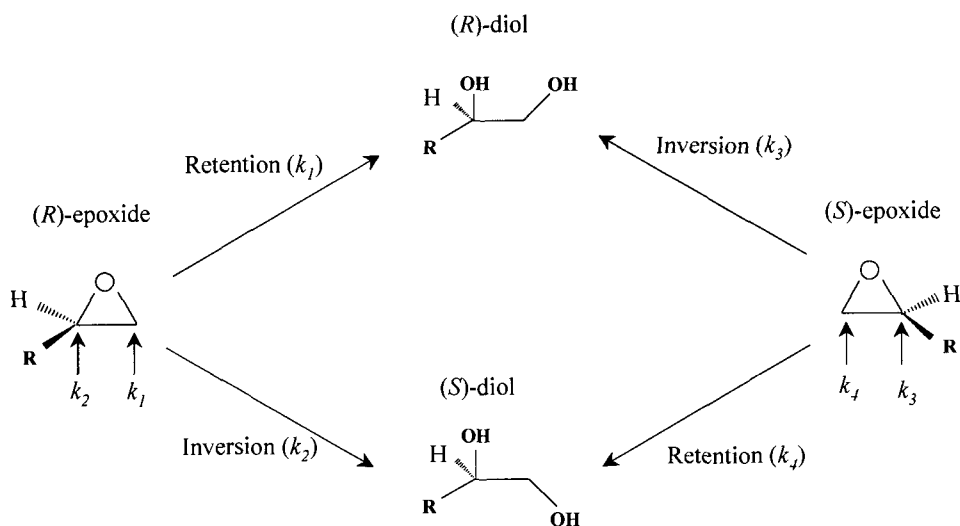


Fig. 4. Possible stereochemical pathways of epoxide hydrolase-catalyzed hydrolysis of epoxides.

Pharma Chemicals 등에서는 광학활성 에폭사이드 제조공정 상업화를 검토 중인 것으로 알려지고 있다.

### 결론 및 전망

광학활성 에폭사이드 중 상업적 유용성이 높은 것으로 예상되고 있는 광학활성 epichlorohydrin의 기질인 라세믹 epichlorohydrin은 이미 전자산업체등으로부터 수요가 있어 관련 국내 화학기업에서 대규모로 생산하고 있어 원재료는 손쉽게 구할 수 있다. 반응성이 우수한 광학활성 에폭사이드 중간체가 기존의 광학활성 중간체 제품에 line-up 되는 경우 제품 portfolio가 보강될 수 있어 관련 산업에 긍정적인 파급 효과가 기대된다. 또한, 라세믹 에폭사이드를 제조하고 있는 국내 화학업체의 경우, 기질 자체를 in-house에서 저렴하게 확보할 수 있으므로 이를 기반으로 부가가치가 높은 광학활성 에폭사이드를 제조하는 기술을 접목시키는 경우 기술 경쟁력 확보가 수월해질 것으로 기대된다. 또한, 광학활성 중간체의 다양한 반응성을 기반으로 한 다양한 유도체 개발 및 network화된 광학활성 중간체 제조 사업 추진이 가능하며, 광학활성 중간체를 출발물질로 사용하는 광학활성 의약품 원제 사업의 경쟁력 강화가 기대된다. 광학활성 바이오촉매 활성 검색을 위한 High throughput screening (HTS) 시스템 개발 기술, 고효율 발현 시스템 개발 및 EH 및 oxygenase 계열의 광학활성 고기능성 바이오촉매 개발 기술, 고속 돌연변이주 제작 기술 등의 핵심 요소기술은 미국, EU 등에 비해 70% 수준 정도로 평가되고 있어 광학활성 바이오촉매 개발 관련 핵심요소기술 확보가 시급하다고 할 수 있다.

유기용매 반응 시스템, 2상계 반응 시스템, enantioconvergent 반응, dynamic kinetic resolution 반응 기술, 중공사막 반응기 기술 등 효율적인 광학활성 에폭사이드 제조 시스템

에 대한 연구 개발도 활발히 진행되고 있어 상업화 가능성을 더욱 높여 줄 것으로 기대되고 있다. 최근에 error-prone PCR 및 DNA shuffling을 이용하여 *A. radiobacter* 유래의 EH 효소에 대하여 directed evolution을 시켜 효소 바이오촉매의 입체선택성을 높인 연구결과가 보고되고 있다[36]. *Para-nitrophenyl glycidyl ether* (pNPGE)를 기질로 사용하여 입체선택성이 향상된 mutant gene을 gene library로부터 선별한 결과가 보고되었는데, 특히 epichlorohydrin 및 1,2-epoxyhexane에 대한 입체선택성이 향상된 결과를 얻었다. EH 효소의 active site에 mutation이 유발되어 epoxide ring의 oxygen 또는 기질의 hydrophobic moiety에 대한 interaction 기능이 있는 active site의 특정 amino acid가 변화되어 입체선택성 향상에 기여한 것으로 보고되었다. 이러한, 효소 개량 연구는 EH 바이오촉매의 상업화에 속도를 더해 줄 것으로 기대되며, 향후 directed evolution 및 site-specific mutagenesis 등을 이용한 광학활성 에폭사이드 제조용 바이오촉매 개량 연구가 활발히 진행될 것으로 기대된다.

### 요 약

광학활성 에폭사이드는 광학활성 의약품, 기능성 식품 제조용 광학활성 중간체로 사용될 수 있다. 바이오촉매를 이용하여 광학활성 에폭사이드를 제조하는 방법으로는, mono-oxygenase나 peroxidase 등을 이용하여 알켄 기질의 이중결합을 비대칭 에폭시화반응을 통해 제조하는 방법이 있다. Kinetic resolution을 이용하는 방법으로는 epoxide hydrolase를 이용하여 특정 이성질체만을 diol로 가수분해하여 제거시켜 광학활성 에폭사이드를 얻는 방법 등이 있다. 다양한 생물전환 기술, directed evolution 및 site-specific mutagenesis 등을 이용한 광학활성 에폭사이드 제조용 바이오촉매

매개량 기술 등 효율적인 광학활성 에폭사이드 제조 시스템에 대한 연구 개발도 활발히 진행되고 있어 향후에 상업화가 가능할 것으로 기대된다.

## 감사의 말

이옥경은 Brain Busan 21 scholarship 수혜자임.

## 참고 문헌

1. Archelas, A. and R. Furstoss. 2001. Synthetic applications of epoxide hydrolases, *Current Opinion in Chem. Biology.* **5**, 112-119.
2. Archelas, A., M. Arand, J. Baratti and R. Furstoss. 1999. French Patent Application No. 9905711; (2000), International Patent Application No. PCT/FR00/01217.
3. Besse, P. and H. Veschambre. 1994. Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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-*o*-methyl-styrene oxide. Occurrence of a surprising enantioselectivity enhancement, *Tetrahedron: Asymmetry* **9**, 1839-1842.
9. de Vries, E. J. and D. B. Janssen. 2003. Biocatalytic conversion of epoxides, *Current Opinion Biotechnol.* **14**, 414-420.
10. Faber, K. and W. Kroutil. 2002. Streoselectivity in biocatalytic enantioconvergent reactions and a computer program for its determination, *Tetrahedron: Asymmetry* **13**, 377-382.
11. Geigert, J., D. J. Dalietos, D. S. Hirano, T. D. Lee and S. L. Neidleman. 1986. Epoxidation of alkenes by chloroperoxidase catalysis, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **136**, 778-782.
12. Genzel, Y., A. Archelas, Q. B. Broxterman, B. Schulze and R. Furstoss. 2002. Microbiological transformation 50: selection of epoxide hydrolase for enzymatic resolution of 2-, 3-, or 4-pyridyloxirane, *J. Mol. Catal. B: Enzy.* **16**, 217-222.
13. Han, J. H. 2004. Production of enantiopure (*S*)-styrene oxide using a mutant of *Pseudomonas putida* lacking styrene oxide isomerase. M. S. Dissertation, Dept. of Chemical Engineering, Pusan National University, Busan.
14. Hasnaoui, G., Spelberg, J. H. L., de Vries, E., Tang, L., Hauer, B. and Janssen, D. B. 2005. Nitrite-mediated hydrolysis of epoxides catalyzed by halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1: a new tool for the kinetic resolution of epoxides, *Tetrahedron: Asymmetry* **16**, 1685-1692.
15. Kasai, N., K. Tsujimira, K. Unoura and T. Suzuki. 1990. Degradation of 2,3-dichloro-1-propanol by a *Pseudomonas* sp, *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3185-3190.
16. 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 Microbial Technol.* **35**, 624-631.
17. Manoj KM, Archelas A, Barati J. and R. Furstoss. 2001. Microbiological transformations 45. A green chemistry preparative scale synthesis of enantiopure building blocks of Eliprodil: elaboration of a high substrate concentration epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution process, *Tetrahedron* **57**, 695-701.
18. Matsunaga, I. and Y. Shiro. 2004. Peroxide-utilizing biocatalysts: structural and functional diversity of heme-containing enzymes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 127-132.
19. Moussou, P., A. Archelas, J. Baratti and R. Furstoss. 1998. Microbiological transformations. Part 39: Determination of the regioselectivity occurring during oxirane ring opening by epoxide hydrolases: a theoretical analysis and a new method for its determination, *Tetrahedron: Asymmetry* **9**, 1539-1547.
20. Nakamura, T., F. Yu, W. Mizunashi and I. Watanabe. 1991. Microbial transformation of prochiral 1,3-dichloro-2-propanol into optically active 3-chloro-1,2-propanediol, *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1931-1933.
21. O'Leary, N. D., K. E. O'Conner, W. Duetz and A. D. W. Dobson. 2001. Transcriptional regulation of styrene degradation in *Pseudomonas putida* CA-3, *Microbiology* **147**, 973-979.
22. Panke, S., A. Meyer, C. M. Huber, B. Witholt and M. G. Wubbolts. 1999. An alkane-responsive expression system for the production of fine chemicals, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2324-2332.
23. Panke, S., B. Witholt, A. Schmid and M. G. Wubbolts. 1998. Towards a biocatalyst for (*S*)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas* sp. strain VLB120, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2032-2043.
24. Panke, S., M. G. Wubbolts, A. Schmid and B. Witholt. 2000. Production of enantiopure styrene oxide by recombinant *Escherichia coli* synthesizing a two-component styrene monooxygenase, *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 91-100.
25. Panke, S., Martin Held, M. G. Wubbolts, B. Witholt and A. Schmid. 2000. Pilot-scale production of (*S*)-styrene oxide from styrene by recombinant *Escherichia coli* synthesizing styrene monooxygenase, *Biotechnol. Bioeng.* **80**(1), 33-41.
26. Panke, S., V. de Lorenzo, A. Kaiser, B. Witholt and M. G. Wubbolts. 1999. Engineering of a stable whole-cell biocatalyst capable of (*S*)-styrene oxide formation for continuous two-liquid-phase applications, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5619-5623.

27. Park, J. B. 2005. The use of oxidative enzymes in organic synthesis, Proc. Bioindustry Education Program 2005, Seoul National University, Seoul.
28. Park, M. S. 2004. Production of chiral styrene oxide in a recombinant *E. coli* containing styrene monooxygenase originated from *Pseudomonas putida* SN-1. M. S. Dissertation, Dept. of Chemical Engineering, Pusan National University, Busan.
29. Schmid, A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts and B. Witholt. 2001a. Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* **409**, 258-268.
30. Schmid, A., K. Hofstetter, H.-J. Feiten, F. Hollman and B. Witholt. 2001b. Integrated biocatalytic synthesis on gram scale: The highly enantioselective preparation of chiral oxiranes with styrene monooxygenase, *Adv. Synth. Catal.* **343**, 1-6.
31. Sheldon, R. A. 1993. *Chirotechnology*, Marcel Dekker. New York.
32. Spelberg, J. H. L., van Hylckama J. Vlieg, E. T., Bosma, T., Kellogg, R. M. and Janssen, D. B. 1999. A tandem enzyme reaction to produce optically active halohydrins, epoxides and diols, *Tetrahedron: Asymmetry* **10**, 2863-2870.
33. Steinreiber, A. and K. Faber. 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations, *Current Opinion in Biotechnol.* **12**, 552-558.
34. Suzuki, T., N. Kasai, R. Yamamoto and N. Minamiura. 1992. Isolation of a bacterium assimilating (R)-3-chloro-1,2-propanediol and production of (S)-3-chloro-1,2-propanediol using microbial resolution, *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 443-448.
35. Tokunaga, M., J. F. Larrow, F. Kakiuchi and E. N. Jacobsen. 1997. Asymmetric catalysis with water: Efficient kinetic resolution of terminal epoxides by means of catalytic hydrolysis, *Science* **277**, 936-938.
36. van Loo, B., J. H.L. Spelberg, J. Kingma, T. Sonke, M. G. Wubbolts and D. B. Janssen. 2004. Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling, *Chem. Biol.* **11**, 981-990.
37. van Rantwijk, F. and R. A. Sheldon. 2000. Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects, *Curr. Opin. Biotech.* **11**, 554-564.