

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2011-0117829 2011년10월28일
(51)	Int. Cl.	(71)	출원인
	<i>C07D 307/12</i> (2006.01) <i>C07D 307/04</i> (2006.01) <i>C07D 305/04</i> (2006.01) <i>C07D 331/04</i> (2006.01)		경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내
(21)	출원번호	(72)	발명자
(22)	출원일자		정진현
	심사청구일자		서울특별시 동대문구 이문1동 삼성래미안아파트 202동 101호
			심유란
			중국 심양시 심하구 북문취로 22-4, 4-5-2호 (뒷면에 계속)
		(74)	대리인
			안소영

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 알코올 화합물의 광학이성질체 제조방법

(57) 요약

본 발명은 라세미체인 에스테르 화합물과 PPL 효소를 유기용매와 완충액을 포함하는 반응용매하에서 반응시켜 알코올 화합물의 R 또는 S 광학이성질체를 선택적으로 제조하는 방법을 제공한다.

(72) 발명자

담방

서울시 동대문구 이문2동 334-93 1층

장옥연

서울시 동대문구 이문2동 334-93 1층

김정수

서울특별시 양천구 목동 902 13/3 목동신시가지아파트 220동 1405호

김영훈

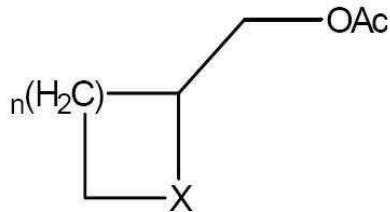
경기도 안성시 공도읍 진사리 우림아파트 102동 504호

특허청구의 범위

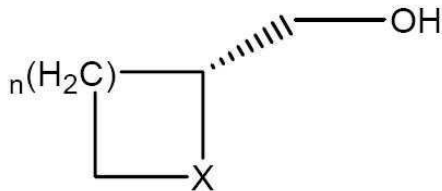
청구항 1

라세미체인 하기 화학식 1로 표시되는 에스테르 화합물과 PPL(porcine pancreatic lipase) 효소를 유기용매와 완충액을 포함하는 반응용매 하에서 반응시키는 단계를 포함하는 광학이성질체인 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물 제조방법.

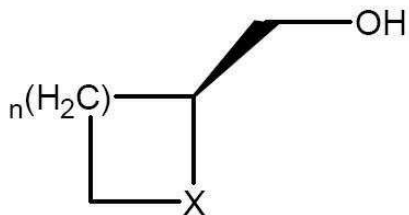
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



상기 화학식 1 내지 3에서

X는 O 또는 S이고,

Ac는 아세틸이며,

n은 2 또는 3이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 에스테르 화합물과 상기 PPL 효소를 1: 0.05 내지 1: 2의 중량비로 사용하는 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 반응용매는 완충액과 유기용매를 1: 10 내지 10: 1의 부피비로 혼합한 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 완충액은 포스페이트, 시트르산(citric acid) 및 소듐 테트라보레이트(sodium tetraborate)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

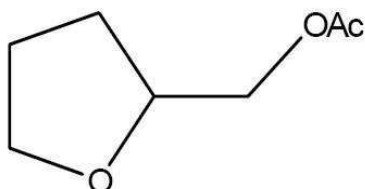
청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유기용매는 옥탄올/물의 분배계수인 P의 상용로그 값($\log P$)이 3 내지 3.5인 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 에스테르 화합물은 하기의 화학식 4로 표시되는 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

[화학식 4]

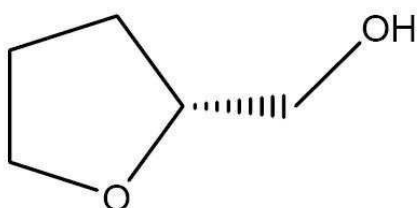


상기 화학식 4에서 Ac는 아세틸이다.

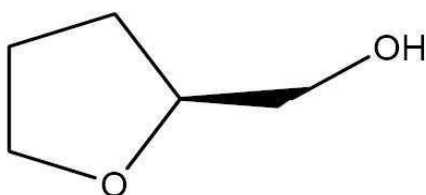
청구항 7

제6항에 있어서, 상기 알코올 화합물은 하기의 화학식 5 또는 화학식 6으로 표시되는 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

[화학식 5]



[화학식 6]



청구항 8

제7항에 있어서, 상기 화학식 5로 표시되는 알코올 화합물은 상기 화학식 4로 표시되는 에스테르 화합물을 톨루엔, 크실렌 및 벤젠으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나와 상기 완충액을 포함하는 상기 반응용매 하에서 제조되는 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 화학식 4로 표시되는 에스테르 화합물은 5℃ 내지 40℃에서 상기 PPL 효소와 반응하는 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 화학식 4로 표시되는 에스테르 화합물과 상기 PPL 효소를 1: 0.06 내지 1: 1.5의 중량비

로 사용하는 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 화학식 6으로 표시되는 알코올 화합물은 상기 화학식 4로 표시되는 에스테르 화합물을 헥산, 디클로로메탄 및 아세톤으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나와 상기 완충액을 포함하는 상기 반응용매 하에서 반응시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 화학식 4로 표시되는 에스테르 화합물은 30℃에서 상기 PPL 효소와 반응하는 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 화학식 4로 표시되는 에스테르 화합물과 상기 PPL 효소를 1:1의 중량비로 사용하는 것을 특징으로 하는 알코올 화합물 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 알코올 화합물의 광학이성질체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 테트라하이드로-2-푸틸메탄올은 약물 등의 측쇄로 사용되거나 생리활성을 가진 유기화합물의 기본구조 또는 이러한 물질을 합성하는 출발물질로 사용되고 있다. 특히 (R)-테트라하이드로-2-푸틸메탄올은 파로페넴(faropenem)과 같은 항생제 등의 측쇄로 사용될 수 있어, 상기 테트라하이드로-2-푸틸메탄올의 광학이성질체를 선택적으로 제조하는 방법은 그 중요성이 날로 더해지고 있다.

[0003] 상기 테트라하이드로-2-푸틸메탄올의 광학이성질체의 수득을 위해 여러 가지 화학적인 방법 및 효소를 이용한 동적분할 방법 등을 이용할 수 있다. 이 중에서도 상기 효소를 이용한 동적분할 방법(kinetic resolution)이 환경적인 측면을 고려할 때 바람직할 수 있다.

[0004] PPL(porcine pancreatic lipase) 효소는 가수분해 및 에스테르 교환반응 효소이며, 리파아제 류 중에서도 순도가 높고 생산단가가 낮다. 또한 크루드한 PPL 효소는 수-유기 용매에서 효소의 표면에 기질이 보다 잘 결합될 수 있다고 알려져 있다(Hazarika, S.; Goswami, P.; Dutta, N.N.; Hazarika, A.K. *Chem. Eng. J.* 2002, 85, 61-68 참조). 그러나 PPL 효소가 테트라하이드로푸란기 또는 테트라하이드로피란기를 포함하는 알코올 화합물의 동적분할에 사용된 예는 거의 없다. 특히, 상기 PPL 효소와 테트라하이드로푸란기 또는 테트라하이드로피란기를 포함하는 에스테르 화합물과의 반응에서 반응 조건을 조절하여 테트라하이드로푸란기 또는 테트라하이드로피란기를 포함하는 알코올 화합물의 R 또는 S 광학이성질체를 선택적으로 제조할 수 있는 방법은 보고된 바가 없다.

발명의 내용

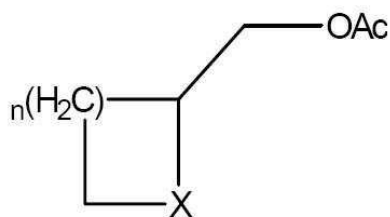
해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 알코올 화합물의 R 또는 S 광학이성질체를 선택적으로 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

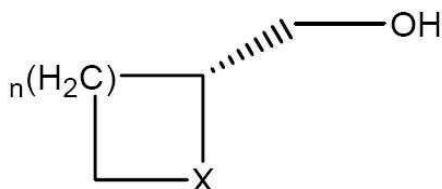
[0006] 본 발명은 라세미체인 하기 화학식 1로 표시되는 에스테르 화합물과 PPL(porcine pancreatic lipase) 효소를 유기용매와 완충액을 포함하는 반응용매 하에서 반응시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물의 제조방법을 제공한다:

[0007] [화학식 1]



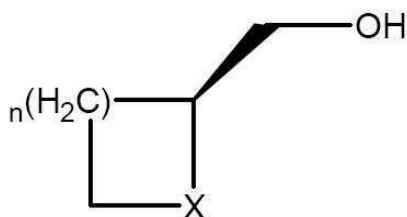
[0008]

[0009] [화학식 2]



[0010]

[0011] [화학식 3]



[0012]

[0013] 상기 화학식 1 내지 3에서, X는 O 또는 S이고, Ac는 아세틸이며, n은 2 또는 3이다.

[0014] 본 발명의 제조방법에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 에스테르 화합물을 상기 PPL(porcine pancreatic lipase) 효소와 반응시켜 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물이 제조될 수 있다.

[0015] 상기 화학식 1로 표시되는 에스테르 화합물을 PPL 효소와 반응시키는 경우, 상기 반응이 수행되는 반응 조건에 따라 생성되는 알코올 화합물의 입체구조와 수득률이 달라질 수 있다. 즉, 반응 조건에 따라 R의 입체구조를 가지는 알코올 화합물 또는 S의 입체구조를 가지는 알코올 화합물이 수득될 수 있다. 상기 수득되는 알코올 화합물의 입체구조 및 수득률은 반응이 수행되는 용매, 온도, PPL 효소와 상기 에스테르 화합물의 반응 중량비, 반응 시간 등에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 상기 반응이 수행되는 용매의 종류에 따라 상기 PPL 효소의 알코올 화합물의 광학 이성질체에 대한 선택성이 변화될 수 있다.

[0016] 상기 화학식 1로 표시되는 에스테르 화합물과 상기 PPL 효소를 1: 0.05 내지 1: 2의 중량비로 사용하여 광학이성질체인 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물을 제조할 수 있다.

[0017] 상기 화학식 1로 표시되는 에스테르 화합물과 상기 PPL 효소를 완충액과 유기용매의 혼합물을 포함하는 반응 용매 하에서 반응시켜 광학이성질체인 상기 화학식 2 또는 3으로 표시되는 알코올 화합물을 제조할 수 있다. 상기 유기용매의 종류에 따라 상기 화학식 2로 표시되는 알코올 화합물과 상기 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물에 대한 선택성이 변화되며, 그 결과, 두 광학이성질체 중 하나가 보다 선택적으로 제조될 수 있다.

[0018] 상기 화학식 1로 표시되는 에스테르 화합물과 상기 PPL 효소의 반응은 완충액과 유기용매를 1: 10 내지 10: 1의 부피비로 포함하는 반응용매 하에서 수행될 수 있다. 상기 유기용매와 완충액의 부피비에 따라 생성되는 알코올 화합물의 수득률 및 광학순도(enantiomeric excess, ee%)가 변화될 수 있다.

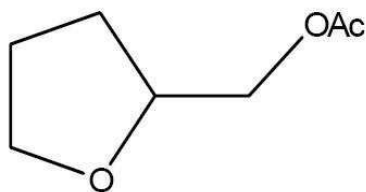
[0019] 상기 완충액은 포스페이트, 시트르산(citric acid) 또는 소듐 테트라보레이트(sodium tetraborate)일 수 있으며, 바람직하게는 포스페이트 일 수 있다. 이들은 단독 또는 혼합하여 사용될 수 있다.

[0020] 상기 유기용매는 옥탄올/물의 분배계수인 P의 상용로그 값(logP)이 3 내지 3.5일 수 있다. 상기 logP의 값이 클수록 극성용매이다. 상기 유기용매의 극성에 따라 생성되는 알코올 화합물의 수득률 및 광학순도(ee%)가 변화될

수 있다.

[0021] 상기 에스테르 화합물은 하기의 화학식 4로 표시되는 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트(tetrahydro-2-furylmethyl acetate)일 수 있다.

[0022] [화학식 4]

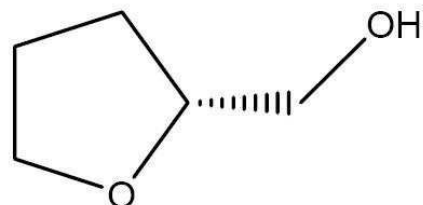


[0023]

[0024] 상기 화학식 4에서 Ac는 아세틸이다.

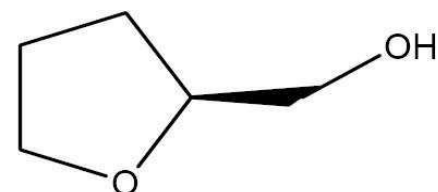
[0025] 상기 알코올 화합물은 하기의 화학식 5로 표시되는 (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올((R)-tetrahydro-2-furylmethanol) 또는 화학식 6으로 표시되는 (S)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올((S)-tetrahydro-2-furylmethanol)일 수 있다.

[0026] [화학식 5]



[0027]

[0028] [화학식 6]



[0029]

[0030] 상기 화학식 4로 표시되는 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소와의 반응 조건에 따라 상기 화학식 5로 표시되는 (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올 또는 상기 화학식 6으로 표시되는 (S)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올을 선택적으로 수득할 수 있다. 바람직하게는 상기 반응용매, 반응온도, 반응시간, 사용되는 물질의 중량비, 반응용매에 포함되는 물질의 부피비 등을 조절하여 (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올을 높은 광학순도 (ee%)로 수득할 수 있다.

[0031] 상기 화학식 5로 표시되는 (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올은 상기 화학식 4로 표시되는 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트를 톨루엔, 크실렌 또는 벤젠에서 선택된 적어도 하나와 완충액을 포함하는 반응용매 하에서 PPL 효소와 반응시켜 제조될 수 있다. 예를 들면, 상기 반응용매는 톨루엔 및 완충액의 혼합물 또는 벤젠 및 완충액의 혼합물일 수 있다.

[0032] 상기 화학식 5로 표시되는 (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올은 상기 화학식 4로 표시되는 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트를 5℃ 내지 40℃에서 PPL 효소와 반응시켜 제조될 수 있다.

[0033] 상기 화학식 5로 표시되는 (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올은 상기 화학식 4로 표시되는 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 상기 PPL 효소를 1: 0.05 내지 1: 2의 중량비로 반응시켜 제조될 수 있다. 예를 들면, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 상기 PPL 효소는 1: 0.06 내지 1: 1.5의 중량비로 반응할 수 있다.

[0034] 상기 화학식 5로 표시되는 (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올은 상기 화학식 4로 표시되는 테트라하이드로-2-퓨

릴메틸 아세테이트 및 상기 PPL 효소를 400mg 내지 1500mg 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 상기 화학식 4로 표시되는 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트 및 상기 PPL 효소를 500mg 내지 1000mg 사용하여 상기 화학식 5로 표시되는 (R)-테트라하이드로-2-푸릴메탄올을 제조할 수 있다.

[0035] 상기 화학식 6으로 표시되는 (S)-테트라하이드로-2-푸릴메탄올은 상기 화학식 4로 표시되는 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트를 헥산, 디클로로메탄 또는 아세톤으로부터 선택된 적어도 하나와 완충액을 포함하는 반응용매 하에서 PPL 효소와 반응시켜 제조될 수 있다. 예를 들면, 상기 반응용매는 헥산 및 완충액의 혼합물일 수 있다.

[0036] 상기 화학식 6으로 표시되는 (S)-테트라하이드로-2-푸릴메탄올은 상기 화학식 4로 표시되는 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트를 30℃에서 PPL 효소와 반응시켜 제조될 수 있다.

[0037] 상기 화학식 6으로 표시되는 (S)-테트라하이드로-2-푸릴메탄올은 상기 화학식 4로 표시되는 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트를 상기 PPL 효소와 1:1의 중량비로 반응시켜 제조될 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명은 에스테르 화합물과 PPL 효소의 반응에 있어, 반응용매, 반응온도, 반응시간, 에스테르 화합물과 PPL 효소의 반응 중량비 또는 용매에 포함되는 물질의 부피비와 같은 반응 조건을 조절하여 알코올 화합물의 R 또는 S의 입체 구조를 가지는 광학 이성질체를 선택적으로 제조할 수 있다. 특히, 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트와 PPL 효소와의 반응조건을 적절하게 조절하여 (R)-테트라하이드로-2-푸릴메탄올을 선택적으로 높은 순도로 제조할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 제조예 및 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 제조예 및 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 제조예 및 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0040] 이하에서 사용된 시료 및 PPL 효소는 알드리치 및 시그마(Aldrich and Sigma)사로부터 구입하였다. THF(Tetrahydrofuran) 및 에틸에테르는 나트륨금속 및 벤조퀴논을 이용하고, 아르곤(Ar) 기체하에서 증류하여 사용하였으며, 디클로로메탄, 아세트니트릴 및 톨루엔은 수소화칼슘(calcium hydride)을 이용하여 증류하였다.

[0041] 다른 용매들을 Aldrich, J. T. Baker 및 Fisher 사로부터 최상급으로 구입하여 사용하였다. 효소를 이용한 가수분해반응은 25℃에서 160rpm으로 JEIO TECH(Korea) incubatory orbital shaker SI-300R에서 수행하였다. 수득률(conversion rate) 및 광학순도(enantiomeric excess)는 Hewlett-Packard 1200, LC(liquid chromatograph, CHIRALCEL OD)을 이용하여 키랄 HPLC(고성능액체크로마토그래피) 분석으로 측정하였으며, 광학회전도(optical rotation)는 JASCO DIP-1000 디지털 편광계(digital polarimeter)로 측정하였다.

[0042] NMR 스펙트럼은 용매로 CDCl₃을 사용하고, Bruker Avance 400 분광기를 이용하여 측정하였다. 화학적 이동값(Chemical shifts)은 TMS(tetramethylsilane)의 값에 대한 상대적인 ppm 값으로 계산하였다. 커플링상수(Coupling constants)는 헤르츠(hertz)로 기재하였다.

[0043] TLC(Thin layer chromatography)는 미리 코팅된 실리카겔 플레이트(Merck 60 F254)를 사용하여 수행하였으며, 프레쉬 컬럼 크로마토그래피(Fresh column chromatography)는 실리카 겔 60(Merck, 0.040-0.063mm, 230-400 mesh)을 사용했으며, 전개 용매로 헥산 및 에틸아세테이트를 이용하였다.

[0044] 순수한 (R)-테트라하이드로-2-푸릴메탄올의 광학회전도는 -14.85(c5.0, nitromethane)이다.

[0045] <제조예> 라세미체인 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트의 제조

[0046] 라세미체인 테트라하이드로-2-푸릴메탄올 15.32g (0.149mol)을 무수 아세트산(acetic anhydride) 30mL(0.320mol)에 용해시킨 후, 상기 용액에 4-디메틸아미노피리딘 (4-methylaminopyridine, DMAP) 1.22g (0.100mmol)을 첨가하였다. 실온에서 3시간 교반하고 포화탄산나트륨용액 150mL을 넣어 반응을 중지시켰다. 유기층을 에틸아세테이트 100mL로 세 번 추출한 후, 포화탄산나트륨용액으로 pH=10이 될 때 까지 세척한 후 브라인(brine) 및 무수 황산 마그네슘(MgSO₄)으로 건조시켰다. 용매를 진공증발시키고 잔류물을 프레쉬(fresh) 컬럼

크로마토그래피(*n*-hexane:EtOAc = 5:1v/v)로 분리하여 라세미체인 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트 10.0g을 95%수율로 수득하였다.

[0047] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 4.13 (qab, 1H, $J=10.94\text{Hz}$, 7.12Hz, 3.44Hz), 4.12 (m, 1H, $J=10.94\text{Hz}$, 3.44Hz), 3.99(qab, 1H, $J=10.94\text{Hz}$, 6.68Hz), 3.89(qab, 1H, $J=15.04\text{Hz}$, 6.68Hz), 3.80(qab, 1H, $J=14.24\text{Hz}$, 6.80Hz), 2.10(s, 3H), 2.02(m, 1H, $J=15.04\text{Hz}$), 1.93(m, 2H, $J=14.24\text{Hz}$), 1.60(m, 1H, $J=14.24\text{Hz}$, 7.12Hz)

[0048] <실시예 1>

[0049] 제조예의 라세미체인 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트 1000mg을 톨루엔과 pH=7.2인 포스페이트 완충액을 1:1의 부피비로 혼합한 용매 30mL에 첨가하였다. 이 후, PPL 효소 1000mg을 첨가하고 30℃에서 약 12시간 반응시켰다. 반응 후, 상기 PPL 효소를 여과하여 제거하고 유기층을 에틸아세테이트 15mL로 7번 추출하였다. 상기 유기층을 모아 용매를 진공증발시키고 잔류물은 프레쉬 컬럼크로마토그래피(*n*-Hexane : Ethyl acetate = 5:1/1:1)로 분리하여 테트라하이드로-2-푸릴메탄올을 얻어 광학회전도를 측정하였다. 광학회전도 측정은 100mg의 수득된 테트라하이드로-2-푸릴메탄올을 니트로메탄(nitromethane) 10mL에 녹여 10cm 셀에 넣고 측정하였다.

[0050] <실시예 2 내지 실시예 4>

[0051] 실시예 2 내지 4는 톨루엔 대신 벤젠, 크실렌, 아세톤 또는 사이클로헥산을 사용한 점을 제외하고, 실질적으로 실시예 1과 동일한 방법으로 테트라하이드로-2-푸릴메탄올을 각각 수득하고 광학회전도를 측정하였다.

[0052] 상기 실시예 1 내지 실시예 4에서 사용된 용매, 반응온도, 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 중량비, 반응시간, 수득된 테트라하이드로-2-푸릴메탄올의 수득률, 광학회전도 및 광학순도(enantiomeric excess, ee%)를 하기 표 1에 나타내었다.

[0053] [표 1]

실시예	반응용매	반응 온도	테트라하이드로-2-푸릴 메틸 아세테이트: PPL (w/w)	반응 시간	수득물(컬럼분리후)	광학회전도	ee%
1	톨루엔/완충액	30℃	1:1	12h	19.72%	-3.4664	23.34
2	벤젠/완충액	30℃	1:1	12h	31.17%	-5.6168	37.82
3	크실렌/완충액	30℃	1:1	12h	19.72%	-2.7131	18.27
4	사이클로헥산/완충액	30℃	1:1	12h	34.70%	-1.1936	8.04

[0054]

[0055] 상기 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 상기 톨루엔, 벤젠, 크실렌 또는 사이클로헥산 중 하나와 완충액의 혼합물하에서 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트를 PPL 효소와 반응시켜 수득된 테트라하이드로-2-푸릴메탄올의 광학회전도가 -의 값을 가졌다. 따라서, 상기 반응에 의해 (R)-테트라하이드로-2-푸릴메탄올이 (S)-테트라하이드로-2-푸릴메탄올보다 많이 제조된 것을 알 수 있다. 즉, 상기 톨루엔, 벤젠, 크실렌 또는 사이클로헥산과 완충액의 혼합액을 반응용매로 사용하는 경우, 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트와 PPL 효소와의 반응에 의해 (R)-테트라하이드로-2-푸릴메탄올이 선택적으로 제조되는 것을 알 수 있었다.

[0056] 또한 상기 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 톨루엔 및 완충액 또는 벤젠 및 완충액을 포함하는 반응용매에서 다른 유기용매 및 완충액을 포함하는 경우보다 테트라하이드로-2-푸릴메탄올이 보다 높은 광학순도(ee%)를 가졌다. 따라서, 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트와 PPL 효소와의 반응이 상기 톨루엔 및 완충액 또는 벤젠 및 완충액을 포함하는 반응용매하에서 수행되는 경우, (R)-테트라하이드로-2-푸릴메탄올을 보다 높은 수득률로 수득할 수 있음을 알 수 있었다.

[0057] <실시예 5 내지 실시예 10>

[0058] 반응온도에 따른 PPL 효소의 테트라하이드로-2-푸릴메탄올의 광학 이성질체에 대한 선택성을 알아보기 위하여 하기 표 2에 기재된 것과 같은 반응조건 하에서 제조예의 테트라하이드로-2-푸릴메틸 아세테이트와 PPL 효소를

반응시켰다. 상기 표 2에서 기재된 반응조건을 제외하고 실시예 1과 실질적으로 동일한 방법으로 실시예 5 내지 10을 수행하였다.

[0059] 상기 실시예 5 내지 실시예 10에서 사용된 용매, 반응온도, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 중량비, 반응시간, 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 수득률, 광학회전도 및 광학순도(ee%)를 하기 표 2에 나타내었다.

[0060] [표 2]

실시예	반응용매	반응 온도	테트라하이드로-2-퓨릴 메틸 아세테이트: PPL (w/w)	반응 시간	수득률(컬럼분리후)	광학회전도	ee%
5	톨루엔/완충액	35℃	1:1	12h	29.90%	-4.6168	31.09
6	톨루엔/완충액	25℃	1:1	12h	32.44%	-4.5984	30.97
7	톨루엔/완충액	20℃	1:1	12h	27.29%	-4.2816	28.83
8	톨루엔/완충액	18℃	1:1	12h	35.26%	-4.6584	31.37
9	톨루엔/완충액	15℃	1:1	12h	34.44%	-4.5816	30.85
10	톨루엔/완충액	10℃	1:1	12h	34.70%	-4.2648	28.72

[0061]

[0062] 상기 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 반응 온도에 따라 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 수득률, 광학회전도 및 광학순도(ee%)가 변화하였다. 반응용매로 톨루엔 및 완충액의 혼합액을 사용하는 경우, 18℃에서 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 광학순도(ee%)가 가장 높았다. 즉, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 반응은 18℃에서 (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올에 대하여 높은 선택성을 가지는 것을 알 수 있었다.

[0063] <실시예 11 내지 실시예 18>

[0064] 반응온도 또는 반응시간에 따른 PPL 효소의 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 광학 이성질체에 대한 선택성을 알아보기 위하여 하기 표 3에 기재된 것과 같은 반응온도 및 반응시간으로 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소를 반응시켰다. 하기 표 3에 기재된 반응조건을 제외하고 실시예 1과 실질적으로 동일한 방법으로 실시예 11 내지 18을 수행하였다.

[0065] 상기 실시예 11 내지 실시예 18에서 사용된 용매, 반응온도, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 중량비, 반응시간, 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 수득률, 광학회전도 및 광학순도(ee%)를 하기 표 3에 나타내었다.

[0066] [표 3]

실시예	반응용매	반응 온도	테트라하이드로-2-퓨릴 메틸 아세테이트: PPL (w/w)	반응 시간	수득률(컬럼분리후)	광학회전도	ee%
11	벤젠/완충액	35℃	1:1	12h	28.91%	-6.2440	42.05
12	벤젠/완충액	25℃	1:1	12h	29.62%	-5.4160	36.47
13	벤젠/완충액	20℃	1:1	12h	27.29%	-5.9504	40.07
14	벤젠/완충액	18℃	1:1	12h	34.64%	-7.6904	51.79
15	벤젠/완충액	15℃	1:1	12h	21.92%	-6.7312	45.33
16	벤젠/완충액	10℃	1:1	12h	29.20%	-5.9840	40.30
17	벤젠/완충액	18℃	1:1	24h	58.07%	-3.6304	24.45
18	벤젠/완충액	18℃	1:1	6h	18.34%	-7.6392	51.44

[0067]

[0068] 상기 표 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 반응온도에 따라 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 수득률, 광학회전도 및 광학순도(ee%)가 변화하였다. 반응용매로 벤젠 및 완충액의 혼합액을 사용하는 경우, 18℃에서 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 광학순도(ee%)가 51.79%로 가장 높았다. 즉, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 반응은 18℃에서 (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올에 대하여 높은 선택성을 가지는 것을 알 수 있었다.

[0069] 한편, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 반응시간에 따라 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 수득률, 광학회전도 및 광학순도(ee%)가 변화하였다. 반응용매로 벤젠 및 완충액의 혼합액을 사용하고 18℃에서

반응을 수행하는 경우, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소를 12시간 동안 반응시켰을 때 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 광학순도(ee%)가 51.79%로 가장 높았다. 즉, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소를 18℃에서 12시간 반응시키는 경우, (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올에 대하여 높은 선택성을 가지는 것을 알 수 있었다.

[0070] <실시예 19>

[0071] 제조예의 라세미체인 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트 500mg을 벤젠과 pH=7.2인 포스페이트 완충액을 1:1의 부피비로 혼합한 용매 30mL에 첨가하였다. 이 후, PPL 효소 500mg을 첨가하고 18℃에서 약 12시간 반응시켰다. 반응 후, 상기 PPL 효소를 여과하여 제거하고 유기층을 에틸아세테이트 15mL로 7번 추출하였다. 상기 유기층을 모아 용매를 진공증발시키고 잔류물은 프레스 컬럼크로마토그래피(n-Hexane : Ethyl acetate = 5:1/1:1)로 분리하여 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올을 얻어 광학회전도를 측정하였다. 광학회전도 측정은 100mg의 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올을 니트로메탄(nitromethane) 10mL에 녹여 10cm 셀에 넣고 측정하고 그 결과를 하기 표 4에 기재하였다.

[0072] <실시예 20 내지 실시예 26>

[0073] 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 반응중량비 및 반응시간에 따른 PPL 효소의 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 광학이성질체에 대한 선택성을 알아보기 위하여 하기 표 4에 기재된 것과 같은 반응조건 하에서 제조예의 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소를 반응시켰다. 상기 표 4에 기재된 반응조건을 제외하고 실시예 19와 실질적으로 동일한 방법으로 실시예 20 내지 26을 수행하였다.

[0074] 상기 실시예 19 내지 실시예 26에서 사용된 용매, 반응온도, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 중량비, 반응시간, 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 수득률, 광학회전도 및 광학순도(ee%)를 하기 표 4에 나타내었다.

[0075] [표 4]

실시예	반응용매	반응 온도	테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트: PPL (w/w)	반응 시간	수득률(컬럼분리후)	광학회전도	ee%
19	벤젠/완충액	18℃	1:1	12h	22.96%	-7.4835	50.39
20	벤젠/완충액	18℃	2:1	12h	26.04%	-7.4800	50.37
21	벤젠/완충액	18℃	2:3	12h	58.94%	-5.0640	34.10
22	벤젠/완충액	18℃	4:1	12h	15.85%	-8.3184	56.02
23	벤젠/완충액	18℃	4:1	18h	15.85%	-8.0320	54.09
24	벤젠/완충액	18℃	4:1	48h	19.66%	-8.4168	56.68
25	벤젠/완충액	18℃	20:3	24h	20.78%	-7.7880	52.44
26	벤젠/완충액	18℃	20:3	48h	23.98%	-12.2880	82.75

[0076] 상기 표 4의 실시예 19에서 볼 수 있는 바와 같이, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소를 각각 500mg 사용하는 경우, 광학순도(ee%)가 50.39%로 동일한 반응 조건하에서 각각 1000mg을 사용한 실시예 14의 51.79%보다 다소 감소하였다. 즉, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 중량비가 동일하여도 실제 사용하는 중량에 의해 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 수득률, 광학회전도 및 광학순도(ee%)가 변화하는 것을 알 수 있었다.

[0078] 한편, 상기 표 4의 실시예 20 내지 26에서 볼 수 있는 바와 같이, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 반응중량비 및 반응시간에 따라 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 수득률, 광학회전도 및 광학순도(ee%)가 변화되었다. 특히 벤젠 및 완충액을 포함하는 혼합물의 반응용매하에서 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소를 20:3의 중량비로 18℃에서 48시간 동안 반응시킬 때, 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올이 82.75%의 높은 광학순도(ee%)를 나타내었다. 즉, 실시예 26의 반응조건하에서 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소를 반응시키는 경우, (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올에 대하여 높은 선택성을 가지는 것을 알 수 있었다.

[0079] <실시예 27 내지 29>

[0080] 반응용매로 톨루엔과 pH 7.2의 포스페이트 완충액 대신 하기 표 5에 기재된 용매를 사용한 점을 제외하고 실시예 1과 실질적으로 동일한 방법으로 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올을 제조하였다.

[0081] 상기 실시예 27 내지 실시예 29에서 사용된 용매, 반응온도, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 중량비, 반응시간, 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 수득률, 광학회전도 및 광학순도(ee%)를 하기 표 5에 나타내었다.

[0082] [표 5]

실시예	반응용매	반응 온도	테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트: PPL (w/w)	반응 시간	수득률(컬럼분리후)	광학회전도	ee%
27	헥산/완충액	30℃	1:1	12h	50.71%	2.1440	14.43
28	아세톤/완충액	30℃	1:1	12h	17.63%	1.3496	9.09
29	디클로로메탄/완충액	30℃	1:1	12h	14.10%	1.1040	7.43

[0083]

[0084] 상기 표 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 상기 헥산, 아세톤 또는 디클로로메탄 중 하나와 완충액의 혼합물하에서 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트를 PPL 효소와 반응시켜 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 광학회전도가 +의 값을 가졌다. 따라서, 상기 반응에 의해 (S)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올이 (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올보다 많이 제조된 것을 알 수 있다. 즉, 상기 헥산, 벤젠 또는 디클로로메탄과 완충액의 혼합액을 반응용매로 사용하는 경우, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소와의 반응에 의해 (S)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올이 선택적으로 제조되는 것을 알 수 있었다.

[0085] <비교예 1 내지 5>

[0086] 하기 표 6에 기재된 것과 같은 반응조건 하에서 제조예의 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소를 반응시켰다. 상기 표 6에 기재된 반응 조건을 제외하고 실시예 19와 실질적으로 동일한 방법으로 비교예 1 내지 5를 수행하였다.

[0087] 상기 비교예 1 내지 5에서 사용된 용매, 반응온도, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 중량비, 반응시간, 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 수득률, 광학회전도 및 광학순도(ee%)를 하기 표 6에 나타내었다.

[0088] [표 6]

비교예	반응용매	반응 온도	테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트: PPL (w/w)	반응 시간	수득률(컬럼분리후)	광학회전도	ee%
1	헥산	25℃	1:1	12 h	4.51%	0.1200	0.81
2	헥산	25℃	1:1	48 h	6.77%	0.7183	4.78
3	에탄올	25℃	1:1	12 h	5.07%	0.1489	1.00
4	테트라하이드로퓨란	25℃	1:1	12 h	3.52%	0.0544	0.36
5	완충액	30℃	1:1	12 h	46.48%	-0.0704	0.47

[0089]

[0090] 상기 표 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 반응용매로 유기용매와 완충액의 혼합물이 아닌 유기용매 또는 완충액만을 사용한 경우, 수득된 테트라하이드로-2-퓨릴메탄올의 광학순도가 모두 5% 미만이었다. 이로부터, 테트라하이드로-2-퓨릴메틸 아세테이트와 PPL 효소의 반응에 있어서, 상기 유기용매 또는 완충액만을 사용하는 경우, (R)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올 또는 (S)-테트라하이드로-2-퓨릴메탄올에 중 어느 하나에 대한 선택성이 높지 않음을 알 수 있었다.