

Aspergillus niger LK 유래의 epoxide hydrolase 클로닝 및 특성 분석

이은정, 김초희, 송성광, 김희숙, 이은열*

경성대학교 응용공학부 식품공학과

전화 (051) 620-4716, e-mail: eylee@star.ksu.ac.kr

Abstract

Kinetic resolution of various racemic aromatic epoxides by newly isolated *Aspergillus niger* LK has been investigated, and enantioselectivity of whole-cell biocatalyst was analyzed. The epoxide hydrolase (EHase) of *A. niger* LK was cloned using RT-PCR. The sequence homology was compared with that of other microbial EHase and the gene for EHase was characterized at molecular level.

서 론

라세믹 aromatic epoxide 기질의 각 광학이성질체에 대한 EHase의 선택적 분해능 차이를 이용하여 광학활성 중간체인 chiral aromatic epoxide를 제조할 수 있다 (1, 2). 본 연구에서는 라세믹 에폭사이드의 미생물 생촉매를 이용한 입체특이성 가수분해 관련 기존 연구에서의 문제점들을 극복하고, chiral epoxide ring-opening 반응을 근간으로 고부가가치 광학활성 물질 제조를 위한 생물전환공정 개발에 응용하기 위하여, 신규로 스크리닝한 미생물로부터 EHase gene 클로닝 및 특성 분석을 실시하였다. Aromatic epoxide 기질에 대한 입체선택적 가수분해능이 우수한 *Aspergillus* 계열의 신규 생촉매를 선발하였고, EHase의 기질 특이성 등을 분석하였다. *A. niger* LK의 EHase 유전자를 RT-PCR 방법으로 cloning 하고, sequencing을 통해 다른 미생물 유래의 EHase 유전자와의 homology 분석 등을 통해 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

전세포 생촉매로 사용한 *A. niger* LK 배양 및 생촉매 제조 조건, 광학이성질체에 대한 chiral GC 분석조건, 라세믹 styrene oxide에 대한 입체선택적 광학분할, total RNA 분리, cDNA 합성, PCR을 통한 EHase gene cloning 및 recombinant EHase의 발현 및 분석 실험 조건은 문헌치를 이용하였다 (3, 4).

결과 및 고찰

미생물 생촉매 특성 분석

신규 미생물 생촉매인 *A. niger* LK 는 racemic aromatic epoxide derivatives에 대한 입체선택적 가수분해능이 우수한 미생물이다. 우선, *A. niger* LK 유래의 EHase의 기질 특이성을 평가하기 위하여 다양한 styrene oxide 계열의 epoxide 기질에 대하여 입체특이성 가수분해 반응을 실시하였다. 기질 특이성 분석을 위한 생촉매 반응은, 우선 건조분말 형태로 제조된 *A. niger* LK 생촉매 30 mg을 1 ml 의 100 mM phosphate buffer가 들어있는 screw-capped reaction vial에 넣은 후 해당 되는 농도의 racemic epoxide 기질을 첨가해주면서 반응을 시작하였다. 기질의 용해도 및 고농도 기질에 의한 생촉매 활성 저하 현상 등을 고려하여 4 - 10 mM 정도에서 초기농도를 결정하였다. 가수분해 반응 후 남은 epoxide의 absolute configuration은 chiral GC 분석을 통해 결정하였으며, 수율은 racemic epoxide 기질 농도에 대해 남은 chiral epoxide의 농도 백분율로 결정하였다 (이론 수율은 50%). *A. niger* LK 유래의 EHase는 다양한 styrene oxide 계열의 epoxide 기질에 대한 입체특이성 가수분해능이 우수함을 알 수 있었다. 기질 특이성의 경우, benzene ring에 oxirane ring이 직접 연결되어 있는 styrene oxide, *p*-nitrostyrene oxide의 경우 남은 epoxide의 chirality가 (S)형인 반면, benzene ring과 oxirane ring 사이에 ether 등의 연결 chain이 있는 기질에 대해서는 남은 chiral epoxide의 absolute configuration이 (R)형임을 알 수 있었다. 따라서, *A. niger* LK의 EHase의 입체선택성은 기질의 분자 구조에 따라 absolute configuration이 변경됨을 알 수 있었다. 수율의 경우 *p*-nitrostyrene oxide에 대해 약 35% 수준의 가장 높은 수율로 얻을 수 있었으며, 고부가가치 chiral 의약품 등에 널리 사용되는 styrene oxide를 기질로 사용한 경우에는 약 30% 수준(이론 수율 = 50%)의 비교적 높은 수율로 광학적으로 순수한 (S)-styrene oxide를 얻을 수 있었다.

EHase gene cloning 및 molecular characterization

A. niger LK로부터 분리한 total RNA로부터 first strand cDNA를 합성하였으며 PCR을 사용하여 얻은 EHase DNA를 *E. coli* 발현 vector인 pRSET vector에 subcloning하여 pRSET/EHLK을 얻은 방법이 Fig. 1에 제시되어 있다. Bgl II와 KpnI site를 가지는 primer들을 사용하여 PCR을 수행한 후 TA vector에 subcloning하고 다시 pRSET A에 subcloning하여 4개의 positive colony를 얻었다. EHase 단백질을 발현시키기 위하여 pRSET/EHLK DNA를 발현균주로 사용되는 BL21 competent cell에 형질전환시킨 후 SDS-PAGE를 통해 단백질 발현을 확인할 수 있었으며, EHase에 대한 활성도 확인할 수 있었다.

분리한 EHase의 DNA 염기서열을 분석한 후, Arand등이 보고한 *A. niger* LCP521 유래의 EHase와 염기서열을 비교해 본 결과 85.6% 수준의 높은 homology를 가지고 있었다. 또한 yeast, *Corynebacterium* 및 *Agrobacterium* 유래의 EHase 아미노산 서열들과 비교해 본 결과 yeast와는 40% 미만, *Corynebacterium* 및 *Agrobacterium*과는 2.9% 및 2.6% 수준의 homology를 보여주어 특히 원핵세포 유래의 EHase와는 상당히 다른 염기서열을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 진핵세포인 mouse나 사람의 microsomal EHase들과는 40% 수준의 homology를 보이는

부분도 있었다.

클로닝된 *A. niger* LK의 EHase에 대하여 *E. coli*에서의 고효율 발현 연구를 수행중이며, 향후에 개발될 고기능성 재조합 미생물 생촉매 기반의 생물전환공정 시스템을 개발하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단의 선도과제(과제번호 KRF-2000-041-E00373)의 지원으로 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

References

1. E. Y. Lee et al. (1999), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 291-296.
2. A. Archelas and R. Furstoss (1999), *Topics in Current Chem.*, **200**, 159-191.
3. M. Arand et al. (1999), *Biochem. J.*, **344**, 273-280.
4. S. J. Yoon and E. Y. Lee (2000), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 630-634.

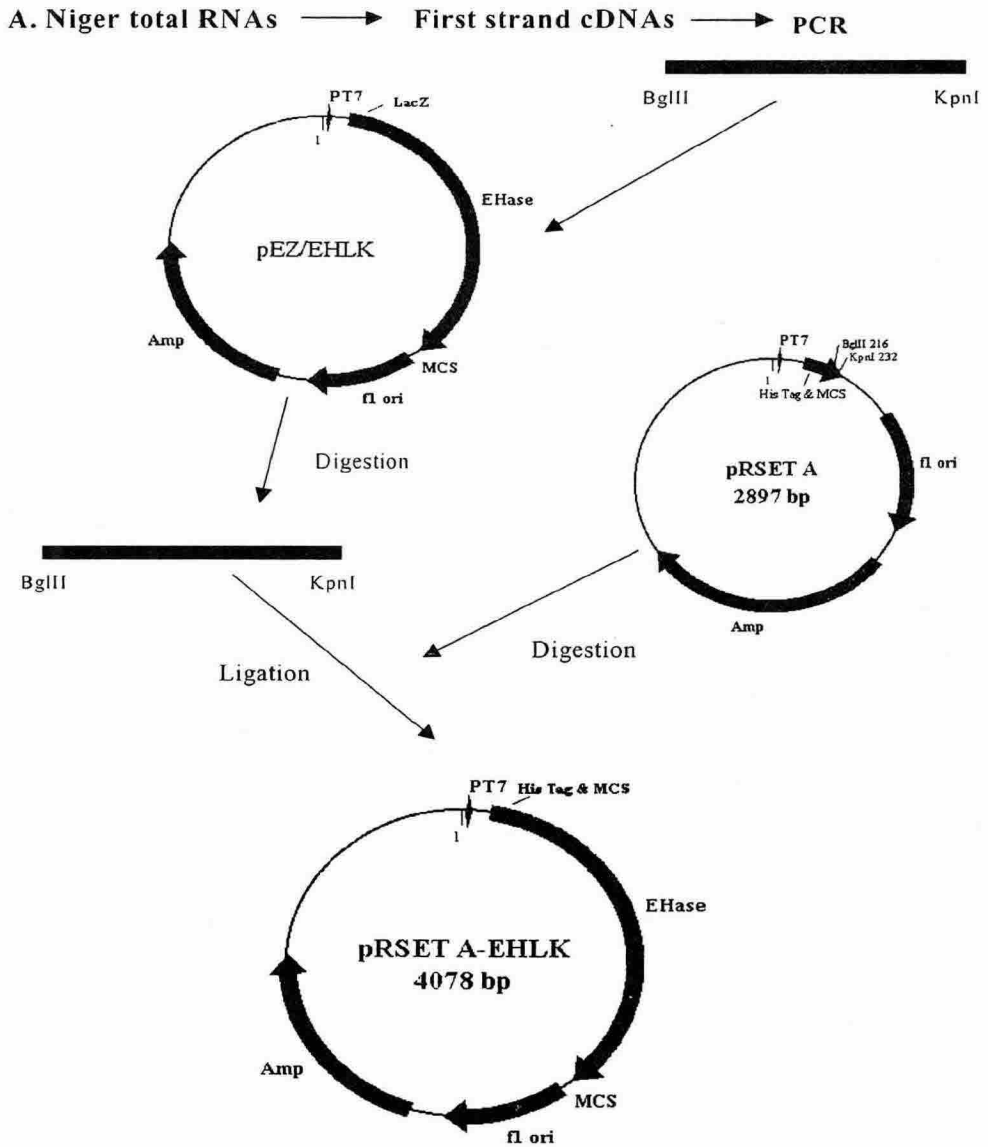


Fig. 1. Subcloning of the *A. niger* LK EHase from total RNAs by RT-PCR in pRSET A expression vector