

Aspergillus niger LK 유래의 Epoxide Hydrolase 클로닝 및 특성 분석

*이 은 열 · 김 희 숙

경성대학교 공과대학 식품공학과

(접수 : 2001. 11. 5., 게재승인 : 2001. 12. 20.)

Cloning and Molecular Characterization of Epoxide Hydrolase from *Aspergillus niger* LK

Eun Yeol Leet* and Hee-Suk Kim

Department of Food Science and Technology, College of Engineering,

(Received : 2001. 11. 5., Accepted : 2001. 12. 20.)

Aspergillus niger LK harboring the enantioselective epoxide hydrolase (EHase) activity was isolated, and enantioselectivity of EHase was tested for various racemic aromatic epoxides. The gene encoding epoxide hydrolase was cloned from cDNA library generated by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of the isolated total mRNA. Sequence analysis showed that the cloned gene encodes 398 amino acids with a deduced molecular mass of 44.5 kDa. Database comparison of the amino acid sequence reveals that it is similar to fungal EHase, whereas the sequence identity with bacterial EHase is very low. Recombinant expression of the cloned EHase in *Escherichia coli* BL21 yielded an active EHase, which can offer a potential biocatalyst for the production of chiral epoxides.

Key Words : *Aspergillus niger*, chiral epoxide, cloning, enantioselectivity, epoxide hydrolase

서 론

인체 내에서 생리활성 기능이 있는 대부분의 생화학 물질들은 분자구조 내에 비대칭 탄소(chiral carbon)를 가지고 있다. 이러한 비대칭 탄소의 존재로 인하여 여러 가지의 광학 이성질체 (optical enantiomer)가 존재하게 되며, 물리·화학적 성질은 동일하지만 생물학적 작용에 있어서는 상당한 차이를 보일 수 있다(1,2). 이는 신호전달 (signal transduction) 또는 생물학적 작용 과정에서는 올바른 입체구조를 가진 특정 광학 이성질체만이 신호 전달의 매개체 역할을 수행하는 수용체 (receptor)와 정확한 결합을 할 수 있기 때문이다. 그러나, 기존의 화학합성에 의해 생산되는 의약품은 포함한 합성물질 대부분은 여러 가지 광학 이성질체들이 혼합물로 존재하는 라세믹혼합물(racemic mixture) 형태이며, 라세믹혼합물 중 어느 한 가지의 광학 이성질체만이 원하는 생리활성을 가지고 있고 나머지 이성질체들은 활성이 없거나 경우에 따라서는 심각한 부작용을 주기도 한다. 라세믹 의약품의 대표적인 부작용 사례를 살펴보면, 독일에서 판매되었던 라세믹 Thalidomide에 의한 기형아 출산을 들 수 있다. 임상 및 연구결과, Thalido-

mid의 (R)-이성질체는 신경 안정 효과가 있는 반면에 (S)-이성질체는 기형을 유발할 수 있다고 밝혀져 엄청난 사회적 문제와 더불어 판매 조치를 받게 되었다. 따라서 최근에 광학 활성 물질의 중요성이 크게 부각되고 있으며, 광학활성 물질을 합성하기 위해 사용되는 광학활성 중간체(chiral intermediate)의 수요도 급증하고 있다. 특히, 광학활성 에폭사이드(chiral epoxide)는 분자구조상 oxirane ring의 반응성이 우수하여 chiral 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용되는 고부가가치 유기중간체이다(3,4).

라세믹 에폭사이드 기질의 각 광학 이성질체에 대한 에폭사이드 가수분해효소(epoxide hydrolase, EHase)의 선택적 분해능 차이를 이용하여 단일 광학 이성질체만을 분리하는 기술인 입체선택적 광학분할(enantioselective kinetic resolution) 방법은 광학활성 에폭사이드를 제조하는 방법 중 경제성이 우수한 기술로 평가되고 있다(5). EHase는 (R), (S)-이성질체로 혼합되어 있는 라세믹 에폭사이드 기질로부터 특정 광학 이성질체만을 선택적으로 diol로 가수분해시켜줌으로써 궁극적으로 한가지 종류의 광학적으로 순수한 에폭사이드를 제조할 수 있는 매우 유용한 효소이다(6,7). EHase의 커다란 장점은 cofactor 재순환이 요구되지 않고, 세포 자체를 생축매로 이용할 수 있으며, 일반적으로 유도과정을 거치지 않아도 효소가 발현되며 비교적 안정된 구조를 가지고 있어 상업적 유용성이 높은 생축매로 평가 할 수 있다. 또한, 목적 대상물인 고가의 광학활성 에폭사이드 이외에도 반응 부산물인 diol 자

*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

체도 매우 유용한 합성 중간체로 사용될 수 있으므로, 비교적 고가의 라세믹 에폭사이드에도 응용할 수 있다는 장점도 있다(8,9).

EHase를 이용한 고부가가치 광학활성 에폭사이드 생산 관련 연구개발에 있어서, EHase가 발현유도없이 구성적으로 발현될 수 있다는 장점이 있지만 전체 단백질 대비 매우 적은 양으로 존재하고 있어, 기존 연구에서와 같이 wild-type 균주 자체를 이용하는 경우 광학활성 에폭사이드 생산성 향상에는 한계가 있다(10-15). 또한 유전자 재조합 EHase 생축매 개발 연구와 관련하여 지금까지진행되어 온 EHase의 클로닝 및 특성 분석에 대한 연구도 대부분 인간 및 동물 간 또는 cytosol에 존재하는 EHase에 대하여 주로 진행되어 왔으며, 상업적 의미가 있는 미생물 유래의 EHase에 대한 연구는 몇 종의 미생물에 대한 연구만 진행되어왔다(16-19). 따라서, 본 연구에서는 고기능성 유전자 재조합 EHase 생축매 개발 연구의 일환으로 방향족 에폭사이드 기질을 대한 입체선택적 가수분해능이 우수한 *Aspergillus niger* LK 유래의 EHase에 대한 기질 특이성 분석과 더불어 EHase 유전자를 클로닝하고 그 특성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 배양 및 생축매 제조 조건

A. niger LK를 고체배지(glucose 10 g/L, corn-steep liquor 20 g/L, Bacto-Agar 20 g/L)에서 3~4일간 배양한 후 생성된 진은색 포자를 액체배지(glucose 10 g/L, corn-steep liquor 20 g/L)에 접종하여 27°C, 250 rpm에서 3일간 배양한 후 원심분리하고 상등액을 제거하고 균체를 증류수로 두 번 정도 세척하였다. 균체를 4°C에서 3~4일간 건조시켜 얻은 *A. niger* LK 건조분말을 생축매로 사용하였다.

입체선택적 가수분해 및 가스 크로마토그래피(GC) 분석

A. niger LK 건조분말 30 mg을 10 mL의 100 mM 인산완충액 (pH 8.0)에 현탁시킨 후 4~10 mM 농도로 다양한 라세믹 에폭사이드 기질을 주입하였다. 반응기로는 screw-cap 플라스크 또는 jacketed glass 효소반응기를 사용하였으며, 27°C, 250 rpm에서 교반시키면서 반응을 진행시켰다. 반응용액을 pentane 또는 cyclohexane으로 추출한 후, 유기용매 층을 GC로 분석하여 enantiomeric excess (ee = $\frac{(S-R)}{(S+R)} \times 100(\%)$) 값 및 EHase의 활성을 평가하였다. 기질인 라세믹 에폭사이드 및 광학적으로 순수한 에폭사이드 표준물은 시약 등급을 구입하여 사용하였다. 광학활성 에폭사이드의 ee값 및 수율을 계산하기 위하여 (R)-이성질체와 (S)-이성질체에 대한 분리능이 있는 Supelco사(미국)의 β -Dex 120 (0.25 mm ID, 30 m length, 25 μ m film thickness) 컬럼을 사용하였으며, GC 조건은 문헌치를 이용하였다(15).

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

A. niger LK의 total RNA는 Chomczynski와 Sacchi의 방법을 사용하여 분리하였다(20). 분리된 total RNA로부터 cDNA의 합성에 있어서 primer는 random nonamer를 사용하였고 reverse transcriptase를 이용하여 42°C에서 1분간 역전사반응

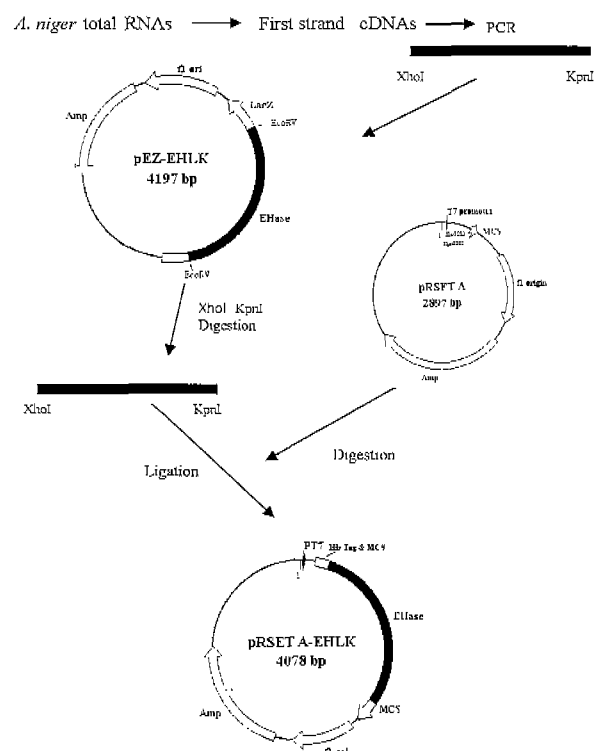


Figure 1. Cloning of *A. niger*'s EHase from total RNAs by RT-PCR in pRSET A expression vector.

을 수행하였으며, 60°C에서 10분간 RNase로 처리한 후 RNAase 및 reverse transcriptase 등은 94°C에서 5분간 실활시켜 *A. niger* LK의 first strand cDNA를 합성하였다.

PCR을 통한 EHase 유전자의 증폭 및 클로닝

A. niger LK의 cDNA library로부터 EHase 유전자를 증폭시키기 위하여 PCR을 사용하였다. PCR에 사용한 primer는 기존 연구들의 mRNA sequence를 참조하였다(18). *E. coli* 발현 벡터인 pETBlue-1(Novagen, USA)에 클로닝하기 위하여 사용한 primer로는 개시코돈인 ATG로 시작하는 5AN(start): 5'-atgccgctccgttcgccaagtccctcg-3' 와 3AN(stop): 5'-ctactcttgccacacctgctcgacaatgc-3' 이었으며, 또 다른 발현벡터인 pRSET A(Invitrogen, USA)에 클로닝하기 위하여 사용한 primer로는 XhoI과 KpnI의 제한효소 위치가 있는 5ANEHF: 5'-cgctcgagatatccgctccgttcgccaagt-3' 와 3ANEHR: 5'-gcbgta-cctactctgcccacacctgctcg-3' 를 사용하였다. pETBlue-1에 클로닝하는 경우, PCR 산물을 end conversion한 다음 ligation하여 competent cell에 형질전환 시켜 X-gal, IPTG 및 ampicillin이 함유된 LB 평판에서 흰색 콜로니를 선별하여 EHase가 들어 있는 플라스미드인 pET/EHase를 얻었다. pRSET A에 클로닝하는 경우에는 먼저 제한효소 부위가 있는 primer들을 사용하여 얻은 PCR product를 TA cloning vector의 일종인 pEZ-T vector(RNA, Korea)에 ligation하여 DH5 α 에 형질전환시킨 후 X-gal, IPTG 및 ampicillin이 첨가된 LB agar plate에서 흰색 콜로니를 따서 여러 종류의 제한효소로 가수분해하여 전기영동하여 EHase 유전자가 삽입되어 있는지 확인하였다(Figure 1). EHase 유전자가 삽입되어 있는 clone을 XhoI과 KpnI으로 분

Table 1. Enantioselective hydrolysis of various aromatic epoxides by *A. niger* LK. Hydrolysis of racemic epoxide was performed in 10 mL 100 mM phosphate buffer (pH 8.0) with 300 mg dried powder of *A. niger* LK.

Epoxide	Initial conc. (mM)	ee(%)	Absolut configuration	Yield(%)
	10	100	(S)	30
	4	100	(S)	35
	10	100	(R)	27
	10	100	(R)	25
	10	100	(R)	18
	10	100	(R)	20
	10	100	(R)	22
	10	100	(R)	3

해하여 전기영동한 다음 1200 bp 정도의 DNA band로부터 추출한 DNA를 pRSET A vector에 subcloning하였다. Ampicillin plate에서 형성된 콜로니들로부터 정제한 plasmid들을 여러 종류의 제한효소로 가수분해하여 확인한 후 pRSET A/EHase를 얻었다.

제조함 EHase의 발현 및 분석

제조함 EHase를 발현시키기 위하여 pET/EHase DNA를 DH5 α 세포로부터 정제한 다음 T7 RNA polymerase 유전자가 있는 발현 host인 *E. coli* BL21(DE3)pLacI competent cell에, pRSET A/EHase는 *E. coli* BL21(DE3) competent cell에 형질전환시켜 ampicillin plate에서 positive 콜로니를 얻었다. 제조함 EHase 유전자가 있는 콜로니를 1% glucose와 50 μ g ampicillin이 포함된 LB배지에 OD₆₀₀값이 0.5가 될 때까지 배양한 후 IPTG를 최종농도 0.4 mM이 되도록 첨가한 후 3시간 더 배양하였다. 배양액을 원심분리한 후 균체를 buffer(10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)에 현탁시켜 파쇄한 후 12% SDS-PAGE를 통해 발현정도를 분석하였다.

결과 및 고찰

A. niger LK 생촉매 특성 분석

A. niger LK는 방향족 에폭사이드 라세믹체에 대한 입체선택적 가수분해능이 우수한 미생물로서, *A. niger* LK 유래의 EHase의 기질 특이성을 평가하기 위하여 다양한 styrene oxide 계열의 에폭사이드 기질에 대하여 입체특이성 가수분해 반응을 실시하였다. 기질 특이성 분석을 위한 생촉매 반응은, 우선 건조분말 형태로 제조된 *A. niger* LK 생촉매 30 mg을 1 mL의 100 mM phosphate buffer가 들어있는 screw-

capped reaction vial에 넣은 후 해당되는 농도의 라세믹 에폭사이드 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 에폭사이드의 absolute configuration은 chiral GC 분석을 통해 결정하였으며, 수율은 라세믹 에폭사이드 기질 농도에 대해 남은 광학활성 에폭사이드의 농도 백분율로 결정하였다 (이론수율은 50%). Table 1을 보면, *A. niger* LK 유래의 EHase는 다양한 styrene oxide 계열의 에폭사이드 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 에폭사이드의 chirality가 (S)형인 반면, benzene ring과 oxirane ring 사이에 ether 등의 연결 chain이 있는 기질에 대해서는 남은 광학활성 에폭사이드의 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 유전자 클로닝 및 특성 분석

A. niger LK로부터 분리한 total RNA로부터 first strand cDNA를 합성하였으며, PCR을 사용하여 얻은 EHase DNA를 pETBlue-1 vector에 subcloning하여 pET/EHase를 얻었다. 흰색 콜로니들의 plasmid DNA를 분리한 뒤 sequencing하여 확인한 결과 upstream의 DNA들이 3~5 bp 씩 제거되어 subcloning된 plasmid들이 많았으며 흰색 콜로니이면서도 agarose 전기영동상으로는 vector의 크기와 같은 plasmid들이 많았다. 이는 PCR 산물의 5' 말단에 인산기가 붙어있지 않아 PCR 산물의 돌출된 염기를 잘라 blunt end로 만들거나 5'에 인산기를 붙여주는 효소들이 들어있는 end conversion mix 때문인 것으로 생각된다.

클로닝된 EHase의 1197 bp에 대한 염기서열을 분석해본 결과, 398개의 아미노산으로 구성되어 있었으며 이는 약 44.5 kDa에 해당되는 단백질임을 알 수 있었다. EHase의 pI 값은 약 4.83 이었으며, 이러한 결과들은 *A. niger* LCP521 유래의 EHase와 유사한 결과를 보여주었다(18). 클로닝된 EHase의 아미노산 서열을 *A. niger* LCP521의 EHase의 서열과 비교해본 결과 89% 수준의 높은 sequence identity를 가지고 있었다. 또한 진핵세포인 *Rhodotorula glutinis* 유래의 EHase 아미노산 서열들과 비교해 본 결과, 32% 수준의 identity를 보였다. *Agrobacterium* 및 *Corynebacterium*의 EHase와는 각각 13% 및 9% 수준의 낮은 identity를 보여주어 특히 원핵세포 유래의 EHase와는 상당히 다른 아미노산서열을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다(Figure 2).

EHase는 α/β -hydrolase 계열의 효소로 분류될 수 있는데, 두 개의 aspartic acid residue와 histidine residue가 catalytic triad를 형성하여 촉매 활성점(active site)을 구성하고 있다.

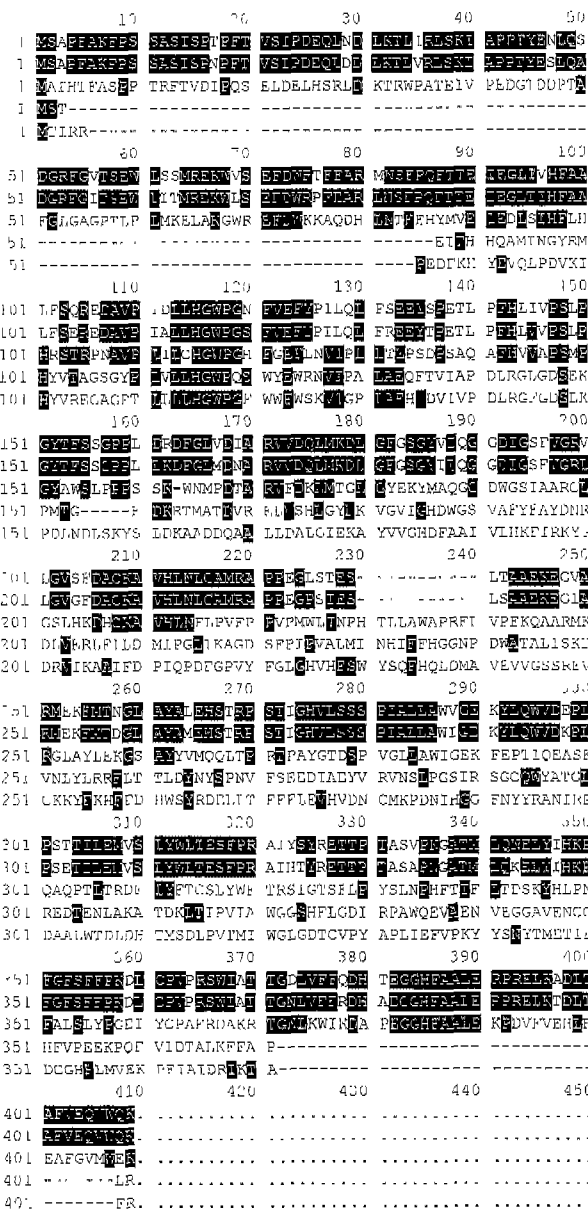


Figure 2. Sequence alignment of the cloned EHase with fungi, yeast and bacterial EHase (Amino acid sequences of *A. niger* LK, *A. niger* LCP521, *R. gluinis*, *Corynebacterium* sp. and *A. radiobacter* are aligned from top to bottom line).

촉매 메카니즘으로는 nucleophilic aspartic acid residue가 에폭사이드 기질의 oxirane ring을 직접 공격하여 입체선택적 개환 반응(enantioselective ring opening reaction)을 일으키며, H₂O의 H⁺가 histidine으로 끌려가면서 나머지 OH가 nucleophilic aspartic residue를 재생하는데 쓰이는 것으로 밝혀져 있다(16). *A. niger* LK의 EHase 아미노산 서열을 분석해 본 결과, *A. niger* LCP521 경우와 마찬가지로 Asp(192), Asp(348) 및 His(374) 위치가 보존되어 있어 이들 아미노산들이 촉매 활성점에서의 catalytic triad를 구성할 것으로 판단된다. *A. niger* LK의 EHase는 LCP521의 EHase들에 비해 특히 방향족 에폭사이드에 대한 활성이 높은 편인데, 이와 같은 기질 특이성은 아미노산 서열이 차이가 나는 부분에서 유래되는 효

소의 구조적 차이로 인한 것으로 예상된다.

EHase 발현시스템 개발

pET/EHase 플라스미드상에 EHase 유전자가 올바른 위치로 삽입되어 있는지를 알아보기 위하여 plasmid를 분리하고 여러 종류의 제한효소로 가수분해하여 1% agarose gel에 전기영동을 실시하였다. *Xba*I로 분해 한 경우 vector는 3476 bp, pET/EHase는 4673 bp 크기에 해당되는 band를 볼 수 있었으며, *Bgl*III로 제한하면 3540 bp와 1139 bp의 fragment를, *Sma*I로 제한하면 3973 bp와 703 bp, *Eco*RI로 제한하면 3800 bp와 900 bp에 해당되는 fragment의 band를 확인할 수 있어 *A. niger* LK의 EHase DNA가 vector에 올바른 방향으로 들어갔음을 알 수 있었다. pET/EHase를 발현시키기 위하여 DNA를 *E. coli* BL21(DE3)pLacI에 형질전환시켜 LB배지에 배양하고 발현정도를 확인하기 위하여 12% SDS-PAGE에 전기영동을 실시하였으나, IPTG로 유도하지 않은 균과 발현정도를 비교하였을 때 차이를 발견할 수 없었다. 그러나, 유전자 재조합 *E. coli*를 생촉매를 이용한 styrene oxide 가수분해 반응을 실시해본 결과 촉매 활성은 존재함을 알 수 있었다 (data not shown). 기존 문헌을 살펴보면, *Agrobacterium radiobacter* 유래의 EHase의 경우 *E. coli* BL21(DE3) 숙주에서 효율적으로 발현될 수 있다는 결과가 보고되기도 하였으나, 진핵세포인 yeast 또는 fungi 유래의 EHase들은 경우에 따라서는 *E. coli* 숙주 시스템에서는 발현이 되지 못하거나, 또는 정확한 구조의 단백질로 발현되지 못해 재조합 효소의 활성이 저하되는 실험 결과가 보고된 바 있어 신규로 클로닝된 *A. niger* LK 유래의 EHase의 발현 시스템 개발이 요구됨을 알 수 있었다(18,19).

A. niger LK의 EHase의 효율적인 발현 및 his tag에 EHase를 발현시킨 후 단백질을 affinity column으로 정제할 수 있는 pRSET A vector에 Figure 1과 같이 다시 클로닝을 하였다. *Xho*I과 *Kpn*I site를 가지는 primer들을 사용하여 PCR을 수행한 후 TA cloning vector에 subcloning하고 다시 pRSET A에 subcloning하여 4개의 positive colony를 얻었다. *A. niger* LK의 EHase가 삽입되었다고 생각되는 pRSET A/EHase DNA를 *Xho*I 및 *Kpn*I으로 가수분해 한 경우 1200 bp 정도의 band와 vector 크기인 2900 bp의 band들이 보여 EHase gene이 삽입되었음을 확인하였다. 또한 *Bgl*III 및 *Eco*RI으로 잘라 1150 bp 및 830 bp의 band가 있었으므로 옳은 방향으로 삽입되었음을 확인하고 EHase 단백질을 발현시키기 위하여 pRSET A/EHase DNA를 발현균주로 사용되는 *E. coli* BL21(DE3) competent cell에 형질전환시켰다. 재조합 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 LB배지에서 배양하면서 IPTG로 발현을 유도한 후 12% SDS-PAGE에 전기영동을 실시한 결과 주목할만한 발현 정도의 차이를 관측할 수는 없었다(data not shown). 올바르게 발현되었는지를 확인하기 위하여 재조합 *E. coli* BL21(DE3)을 생촉매로 사용하여 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 실시하였다. 재조합 *E. coli* 균체 300 mg을 넣은 효소 반응기에서 약 3시간 반응 후 반응액을 cyclohexane으로 추출하고 chiral GC로 분석을 한 결과, wild-type의 *E. coli* 균주는 (R), (S)-이성질체 모두에 대해 분해능이 없는 반면 재조합 *E. coli*는 원 균주인 *A. niger*와

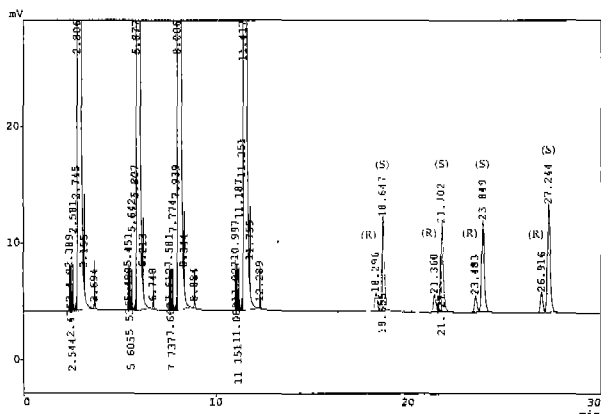


Figure 3. Chiral GC analysis of racemic styrene oxide substrate after the enantioselective hydrolysis using EHase activity of recombinant *E. coli* BL21(DE3) possessing pRSET A/EHase. Peaks area for (R)-, and (S)-enantiomer are different due to the enantioselective hydrolysis by recombinant EHase.

마찬가지로 (R)-이성질체에 대한 분해능이 (S)-이성질체에 비해 높음을 확인할 수 있었다(Figure 3). 이러한 실험 결과들로부터 대장균은 숙주로 하여 *A. niger* LK 유래의 EHase 발현이 가능함을 확인할 수는 있었으나 높은 효율로는 발현되지는 못했다. 이는 *Aspergillus* 또는 *Rhodotorula* 유래의 EHase를 *E. coli*에서 효율적으로 발현시키지 못했던 다른 연구결과들과 함께 보다 효율적인 진핵세포 유래의 EHase 발현 시스템 개발이 필요함을 알 수 있다. 클로닝된 *A. niger* LK의 EHase에 대하여 *E. coli*에서의 고효율 발현 연구가 진행중이며, 향후에 개발될 고기능성 재조합 미생물 생축매는 광학활성 에폭사이드 제조용 생물전환공정 시스템에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

Styrene oxide 계열의 라세릭 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해능이 우수한 *Aspergillus niger* 계열의 생축매를 선발하였고, *A. niger* LK 유래의 EHase의 기질 특이성을 분석하였다. *A. niger* LK의 EHase는 benzene ring에 oxirane ring이 직접 연결되어 있는 styrene oxide, *p*-nitrostyrene oxide 기질에 대해서는 (R)-이성질체, benzene ring과 oxirane ring 사이에 ether 등의 연결 chain이 있는 기질에 대해서는 (S)-이성질체에 대한 입체선택적 가수분해능이 우수하였다. *A. niger* LK의 EHase 유전자를 RT-PCR 방법으로 클로닝하였고, sequencing을 통해 다른 미생물 유래의 EHase와의 sequence identity 분석 등을 통해 특성을 분석하였다. Yeast 유래의 EHase와는 32% 수준의 sequence identity를 보였으며, *Agrobacterium*, *Corynebacterium* 등의 박테리아 유래 EHase와는 identity가 매우 낮은 특성을 보였다. *E. coli* 숙주에서 발현된 재조합 EHase의 활성은 라세릭 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 통해 확인할 수 있었다. 클로닝된 EHase의 보다 효율적인 발현 연구가 필요하며, 이러한 재조합 EHase는 고부가가치 광학활성 에폭사이드 제조를 위한 생물전환공정 시스템의 생축매로 응용될 수 있을 것

로 기대된다.

감 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 선도과제(과제번호 KRF-2000-041-E00373)의 지원으로 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다. 연구보조원으로 실험을 도와 준 박원형과 발현 실험을 도와 준 송성광에게도 감사드립니다.

REFERENCES

- Sheldon, R. A. (1993), *Chirotechnology*, Marcel Dekker, New York.
- Collins, A. N., G. N. Sheldrake, and J. Crosby (1992), *Chirality in industry*, John Wiley & Sons, New York.
- Besse, P. and H. Veschambre (1994), Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrahedron*, **50**, 8885-8927.
- 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.
- Lee, E. Y., W. J. Choi, S. J. Yoon, H. S. Kim, and C. Y. Choi (1999), Biocatalytic production of chiral epoxides, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 259-264.
- Orru, R. V. A. and K. Faber (1999), Stereoselectivities of microbial epoxide hydrolases, *Current Opinion in Chem. Biology*, **3**, 16-21.
- Archelas A. and R. Furstoss (1999), Biocatalytic approaches for the synthesis of enantiopure epoxides, *Topics in Current Chem.* **200**, 159-191.
- 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, *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 2863-2870.
- Lutje Spelberg, J. H., J. E. T. Van Hylckama Vlieg, L. Tang, D. B. Janssen, and R. M. Kellogg (2001), Highly enantioselective and regioselective biocatalytic azidolysis of aromatic epoxides, *Organic Lett.* **3**, 41-43.
- Weijers, C. A. G. M. (1997), Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*, *Tetrahedron: Asymmetry*, **8**, 639-647.
- 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. Techniques*, **12**, 225-228.
- Morcau, S. P., C. Morisseau, J. Zylber, A. Archelas, J. Baratti, and R. Furstoss (1996), Microbiological transformations. 33. Fungal epoxide hydrolases applied to the synthesis of enantiopure *para*-substituted styrene oxides. A mechanistic approach, *J. Org. Chem.* **61**, 7402-7407.
- Moreau, S. P., A. Archelas, and R. Furstoss (1996), Microbiological transformations. 31: Synthesis of enantiopure epoxides and vicinal diols using fungal epoxide hydrolase mediated hydrolysis, *Tetrahedron Lett.* **37**, 3319-3322.
- 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.

15. Yoon, S. J. and E. Y. Lee (2000), Production of chiral styrene oxide by microbial enantioselective hydrolysis reaction, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 630-634.
16. Rink, R., M. Fennema, M. Smids, U. Dehmel, and D. B. Jensen (1997), Primary structure and catalytic mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1, *J. Biol. Chem.*, **272**, 14650-14657.
17. Misawa, E., C. K. C. Chan Kwo Chion, J. V. Archer, M. P. Woodland, N.- Y. Zhou, S. E. Carter, D. A. Widdowson, and D. J. Leak (1998), Characterization of a catabolic epoxide hydrolase from a *Corynebacterium* sp., *Eur. J. Biochem.* **253**, 173-183.
18. 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.
19. 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.
20. Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987), Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.