

에폭사이드 가수분해효소를 갖는 *Rhodosporidium* sp. SJ-4를 이용한 광학활성 (S)-styrene Oxide의 생산

Production of Chiral (S)-styrene Oxide by *Rhodosporidium* sp. SJ-4 which has an Epoxide Hydrolase Activity

유 승 식, 이 은 열, 김 희 숙, 김 정 선, 오 유 관, 박 성 훈*

(Seung-Shick Yoo, Eun Yeol Lee, Hee Sook Kim, Jung Sun Kim, You-Kwan Oh, and Sunghoon Park)

Abstract : A yeast strain utilizing styrene epoxide as a sole carbon and energy source was isolated from soil samples for the production of enantiopure of styrene epoxide by kinetic resolution. The strain, identified as a *Rhodosporidium toruloides* SJ-4, expressed an epoxide hydrolase which preferentially converted (R)-styrene epoxide into the corresponding diol. A maximum activity of 135 U/L was observed when biomass (dry cell mass) reached 6.7 g/L at 21 h of batch culture. Under the partially optimized reaction conditions (35°C and pH 8.0), the optically pure (S)-styrene epoxide was obtained with the yield of 21% when the initial substrate concentration was 100 mM. The reaction was completed at 9 h.

Keywords : epoxide hydrolase, *Rhodosporidium toruloides* SJ-4, styrene epoxide, kinetic resolution

I. 서론

에폭사이드(epoxide)는 oxirane ring의 불안정성 및 산소원자의 전기음성도에 기인한 극성때문에 반응성이 대단히 우수하여 친전자성 반응, 친핵성 반응, 산·염기반응, 산화·환원 반응 등 다양한 반응을 유도할 수 있다. 이러한 다양한 반응성에 기인하여 광학활성 에폭사이드(chiral epoxide)는 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용된다[1].

광학활성 에폭사이드는 monooxygenase나 epoxide hydrolase (EH) 등의 생촉매를 이용하여 제조할 수 있다. 이 중 EH는 epoxide의 racemic 혼합물 중 한가지 enan-tiomer에 대해 상대적으로 높은 분해능을 가지므로 반응속도가 느린 enantiomer를 선택적으로 생산할 수 있다. EH는 산화 효소인 monooxygenase와 비교하여 cofactor가 요구되지 않고, cosubstrate로서 산소를 사용하지 않는다는 장점이 있다. 또한 일반적으로 유도(induction) 과정을 거치지 않아도 효소가 constitutive하게 발현되며, 정제 시에도 안정된 활성을 보이는 경우가 많다[2,3].

반면, kinetic resolution의 특성상 이론 수율이 50%로 낮고 실제 수율은 대개 30% 이하라는 단점이 있다.

에폭사이드 가수분해효소는 동물, 식물, 곰팡이, 박테리아 등 다양한 종에서 발견된다. 이중 *Aspergillus niger*[4], *Rhodotomula glutinis*[5,6], *Agrobacterium radiobacter*[7] 유래의

EH를 통한 광학 선택적 가수분해 연구 결과가 보고 되고 있다.

대부분의 연구에서 입체선택적 가수분해반응은 부분 정제된 EH를 사용하고 있다. 정제 효소는 whole-cell EH와 비교하여 기질의 세포내 전달시 존재하는 물질전달저항(mass transfer resistance)이 없으므로 효소 생촉매의 기질 전환 속도가 높은 반면 기질이나 유기용매에 의해 효소 활성이 저하되는 단점을 갖는다. 특히 용해도가 낮은 액상의 기질은 고농도를 사용할 때 기질에 의해 2-phase가 형성되며 이 기질에 의해 빠른 속도로 EH 효소가 실활 된다고 보고 된 바 있다[8].

본 논문에서는 입체 특이성이 있는 whole-cell EH를 생촉매로 사용하는 광학분할을 실험적으로 그리고 이론적으로 연구하였다. 광학분할 대상으로는 라세믹 styrene oxide를 선택하였고 (R)-styrene oxide만을 입체 선택적으로 가수분해시켜 제거함으로써 여러 의약품 합성의 중간체로 사용되는 (S)-styrene oxide를 얻고자 하였다[9]. 이를 위해 먼저 토양 지표수로부터 styrene oxide를 탄소원으로 성장하는 미생물을 분리하였고 이 중 상대적으로 높은 입체 특이성을 보이는 종을 선별/동정 하였다. 그리고 미생물 배양 조건에 따른 EH 발현, pH, 온도 등 반응조건에 따른 EH 활성을 조사 하였다. 또한 광학분할 가수분해과정의 정량적 이해를 위해 가수분해동역학 식을 도입하고 매개변수를 실험적으로 측정하였으며 실험치와 속도식을 비교하였다. 또한 고농도 styrene oxide 용액에서 광학분할 가능성을 조사하였다. 이러한 일련의 연구를 통하여, (S)-styrene oxide의 생산과 관련하여 whole-cell *Rhodosporidium* sp. SJ-4의 성능을 판별 하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. Styrene oxide 가수분해 균주 분리 및 형태학적 분석

* 책임저자(Corresponding Author)

논문접수 : 2005. 8. 25., 채택확정 : 2005. 9. 12.

유승식, 오유관, 박성훈 : 부산대학교 응용화학부

(surfonic@hanmail.net/yksh@pusan.ac.kr/parksh@pusan.ac.kr)

이은열, 김희숙 : 경상대학교 식품공학과

(eylee@star.kyungsu.ac.kr/hskim@star.kyungsu.ac.kr)

김정선 : 동서대학교 생물공학과(jsk@gdsu.dongseo.ac.kr)

※ 본 연구는 부산대학교 자유과제학술연구비에 의하여 연구되었음.

Styrene oxide을 유일 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 균주를 선별하기 위하여 M9 최소 배지조성에 agar 15 g l⁻¹를 첨가한 고체배지를 사용하였으며[10] styrene oxide는 기상으로 공급하였다. 토양지표수(B사, 울산소재)에서 채취한 시료를 희석하여 한천평판에 도말한 뒤, styrene oxide 증기로 포화된 air-tight 용기 내에 넣고 30°C에서 5일 동안 배양하였다. 세포농도를 높이기 위하여 24시간 마다 개봉하여 산소와 styrene oxide를 추가 공급하였다. 고체 배지에 자란 균집 중 형태가 다른 11종을 선정하여 각각을 LB 고체 배지(yeast extract 5 g l⁻¹, peptone 10 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹)에 streaking하여 순수하게 분리하였다. 분리된 균주에 대해 styrene oxide의 분해속도와 enantioselectivity를 조사하였고 이중 활성이 우수한 한 가지 종을 선정하였다. 선정된 균주는 API kit(bioMerieux, France)를 통하여 동정하였고, *Rhodospiridium* sp. SJ-4로 명명하였다. 또한 여러 조건에서 광학활성 실험에 이용하였다.

2. 균주 및 배양 방법

분리된 균주의 액체 배양을 위해 10 g l⁻¹ yeast, 10 g l⁻¹ glucose, 10 g l⁻¹ peptone를 포함하는 최소배지 (NaCl₂ 2 g l⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 0.147 g l⁻¹, NaH₂PO₄ 1.3 g l⁻¹, K₂HPO₄ 4.4 g l⁻¹)를 사용하였다. 플라스크 배양의 경우, 배양온도 30°C, 250rpm에서 48시간 진탕 배양하였다. 배양된 세포는 원심 분리 후 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척 후 4°C 냉장보관 하면서 생축매로 사용하였다. *Rhodospiridium* sp. SJ-4의 경우 5 l 규모의 생물 반응기 배양을 실시하였다. 배양조건은 30°C, pH 8.0, 공기 공급속도 1vvm 등이었고, 배양 시간은 30시간 이었다. 배양 후 역시 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척 후 4°C에 냉장 보관하였다. 냉장 보관 시 1달 이상 활성이 유지 되었다.

3. 입체선택적 광학분할(enantioselective resolution)

Epoxide 분해반응은 rubber septum으로 밀봉된 5ml 혹은 30 ml screw-cap vial을 사용하여 실시하였다. 반응액은 5 ml 용기의 경우 1 ml이었고 30 ml의 용기의 경우 10 ml 이었다. 먼저 세포 현탁액을 첨가하고 pH 8.0, 100 mM의 phosphate buffer를 첨가하였다. 이후 반응 vial을 진탕배양기에 넣고 epoxide를 첨가함으로써 반응을 개시하였고, 적절한 시간 간격으로 액상에서 시료를 취하여 epoxide의 분해 정도를 측정하였다. 온도, pH, 반응 용매의 영향은 5 ml vial을 사용하였고 건조세포농도 23 mg/ml, racemic epoxide 초기 농도 20 mM에서 30 분 이내에 반응을 종결하여 초기 반응속도를 측정하였다. 온도의 영향은 pH 8.0에서 온도범위 10~40 °C에서 실시하였다. pH의 영향은 35 °C에서 각각 다른 원충 용액 (0.1 M)을 이용하여 실시하였다. 사용한 원충용액은 citrate-phosphate(pH 5~6), phosphate (pH 7~8), glycine-NaOH (pH 9) 등이었다. 용매의 영향과 세포파쇄액의 EH 활성은 pH 8.0, 온도 35 °C에서 측정하였다. phosphate buffer 이외의 용매를 사용할 경우 세포현탁액을 해당용매로 2 차례 세척하여 phosphate를 제거하였다. 한편 광학분할속도의 동역학적 변수를 결정하기 위해 styrene oxide 초기 농도의 영향과 생성물 저해현상을 정량적으로

측정할 때는 광학적으로 순수한 (*R*)-styrene oxide 와 (*S*)-styrene oxide을 이용하였다. styrene oxide의 수용액에 대한 용해도가 약 7 mM이므로 실험에 사용된 styrene oxide의 농도는 0.5~5 mM이었다. 반응기로는 30 ml screw-cap vial을 사용하였다. 9.5 ml 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0)에 적절한 양의 styrene oxide를 용해시킨 후 반응액 내 최종 세포 농도가 2.7~8.2 mg ml⁻¹이 되도록 세포 농축액 0.5 ml을 주입하고, 35 °C, 250 rpm의 진탕배양기에서 가수분해 반응을 실시하였다. 생성물에 의한 저해상수를 구할때는 styrene oxide의 농도를 5 mM로 고정하고 (*S*)- 혹은 (*R*)-phenyl-1,2-ethaned-iol을 0~80 mM이 되도록 첨가한 후 styrene oxide 분해속도를 측정하였다.

4. Crude enzyme extract 제조

세포 5g (wet cell 기준)을 단백질 가수 분해 효소 저해제인 10mM PMSF(phenylmethanesulfonylfluoride)와 50 g의 유리구슬(직경 0.5 mm)이 함유된 5 ml의 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)에 현탁시켜 vortex로 처리 (3000 rpm)하여 균체를 파괴하였다. 균체 파괴 시 온도에 의한 단백질 변성을 방지하기 위하여 현탁액을 2분 vortex 후 3분 동안 얼음물에 담그도록 하였고 이 과정을 1시간 동안 반복하였다. 이후 세포파쇄액을 5,000 g에서 10 분간 원심분리하여 핵 및 미파쇄부분(debris fraction)을 제거하고 18,000 g에서 20 분간 원심분리 하여 침전물(mitochondria fraction)과 상등액(cell free extract)을 얻었다. 이 상등액을 105,000 g에서 120 분간 초원심 분리하여 침전물(microsomes)과 상등액 (cytosol fraction)을 얻었으며 각 단계에서 얻은 침전물과 상등액을 EH활성 측정을 위한 효소원으로 사용하였다.

5. 키랄 가스크로마토 그래프(GC)의 분석

반응액의 styrene oxide 분석을 위해 0.5 ml의 반응액을 취한 후 1 ml cyclohexane으로 추출하고 유기 용매층을 GC로 분석하였다. 이때 검출기로는 FID를, 그리고 분석용 column으로는 silica cyclodextrin capillary β-DEX 120 (길이 60 m, ID 0.25 mm, 그리고 film thickness 0.25 μm; Supelco, USA)를 사용하였다. 이동가스로 질소를 사용하였으며 split ratio는 1:100, 기체유량은 0.5 ml min⁻¹이며, 시료 주입량은 1 μl이었다. column, injector, 그리고 detector의 온도는 각각 100, 220, 220 °C이었다[10].

III. 결과 및 토론

1. 신규 미생물 태 활성 분석 및 동정

토양지표수에서 신규로 분리한 11종의 미생물을 대상으로 라세틱 styrene oxide에 대한 입체 선택적 가수 분해능을 평가하였다 (Table 1). Isolate SJ-4, SJ-8, SJ-11에서 높은 EH 활성을 얻을 수 있었다. 특히 SJ-4의 반응속도 및 광학 선택성이 가장 높았다. API kit을 통해 EH 활성이 가장 우수한 SJ-4 균주를 *Rhodospiridium* sp.로 동정하였고 *Rhodospiridium* sp. SJ-4로 명명하기로 하였다. 분리한 균주의 형태학적 특성을 살펴보기 위하여 transmission electron microscope (TEM)로 촬영한 결과, 타원형의 전형적인 효모 모습을 보이고 있음을 알 수 있었다(그림 생략).

표 1. 분리된 균주들의 epoxide hydrolase 활성.

Table 1. Epoxide hydrolase activity of various isolates¹.

Strains	Hydrolytic activity ²	Enantioselectivity ³
SJ-1	++	++
SJ-2	-	-
SJ-3	-	-
SJ-4	+++	+++
SJ-5	+	+
SJ-6	-	-
SJ-7	-	-
SJ-8	+++	+++
SJ-9	+	+
SJ-10	+	+
SJ-11	+++	+++

¹The relative hydrolytic rate and ee value were compared with those of SJ-4.

²Hydrolytic activity: (+++), excellent [hydrolysis = 100%]; (++) , good [hydrolysis = 80 ~ 100 %]; (+), moderate [hydrolysis = 50 ~ 80%]; (-), low [hydrolysis = 0~ 50 %].

³Enantioselectivity: (+++), excellent [ee = 100%]; (++) , good [ee = 80~100 %]; (+), moderate [ee = 50~80%]; (-), low [ee = 0~50 %].

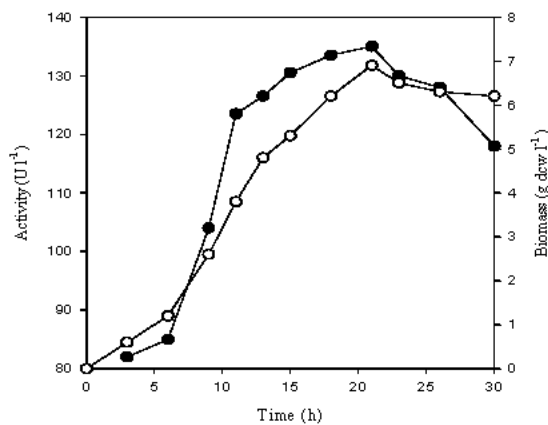


그림 1. SJ-4 균주의 성장곡선과 효소활성. Biomass (○); epoxide hydrolase activity on racemic styrene oxide (●).

Fig. 1. Growth of *Rhodosporidium* sp. SJ-4 and whole-cell epoxide hydrolase activity. Biomass (○); epoxide hydrolase activity on racemic styrene oxide (●).

2. Bioreactor 배양과 EH 발현

Rhodosporidium sp. SJ-4를 5 l 발효조에서 배양하면서 균체 성장과 EH 발현을 조사하였다 (Fig. 1). 균체성장은 21 시간까지 관찰되었으며, 최대 0.23 h⁻¹의 비성장속도(specific growth rate)를 나타내었다. 최대 세포농도는 건조질량으로 6.8 g l⁻¹이었다. EH의 활성은 균체 농도와 동일한 경향으로 증가하였으며, 35°C, pH 8.0에서 측정된 racemic styrene oxides에 대한 최대 활성은 배양 21시간에 135 U l⁻¹로 나타

났다. 이 결과는 *Rhodosporidium* sp. SJ-4에서 EH 발현은 발현유도(enzyme induction) 과정 없이 균체 성장과 함께 생산되는 (growth-associated) 본성적 발현(constitutive) 효소임을 의미한다.

EH를 갖는 균주의 성장과 효소 활성 발현에 대한 결과는 많지 않다. 최근에 EH 활성이 높은 whole-cell을 제조하기 위해 에폭사이드 기질을 발현 촉진제로 사용하여 *Trichosporon loubierii* ECU1040의 EH 발현 효율을 12배까지 향상시킨 결과가 보고되었다[11]. Phenyl glycidyl ether(PGE) 5 mM를 발현 촉진제로 사용할 경우 8.1 U l⁻¹의 EH 활성을 얻을 수 있었으며, 배지 조성 최적화 및 유가배양을 통하여 최종적으로 32시간의 배양을 통해 15 g l⁻¹의 세포와 300 U l⁻¹의 EH 활성을 얻었다고 보고되었다. 이러한 결과와 비교할 때, SJ-4는 기질을 이용한 발현 촉진 및 배지최적화를 하지 않은 상태에서도 21시간의 배양을 통해 6.8 g l⁻¹의 세포량과 136 U l⁻¹의 EH 활성을 얻어 최적화된 조건에서 *T. loubierii* ECU1040로부터 얻은 결과와 비슷한 수준이었다. 이는 *Rhodosporidium* sp. SJ-4가 우수한 EH 활성을 가진 균주임을 의미한다.

3. 온도, pH, 용매의 영향

Rhodosporidium sp. SJ-4의 EH 활성에 미치는 반응온도의 영향을 10 ~ 40°C 범위에서 조사 하였다(Fig. 2). 초기농도 20 mM의 racemic styrene oxide를 사용하였고 pH는 8.0이었다. 실험 온도 범위에서 (S)-enantiomer에 대한 분해 속도는 거의 비슷하였으나, (R)-enantiomer에 대한 분해속도는 35°C가 가장 높았으므로 이를 최적 온도로 결정하였다. Fig. 3은 광학적 분할 분해반응 속도에 대한 pH의 영향을 보여준다. 35°C에서 완충용액의 pH를 5.0~9.0까지 변화시켰고 racemic styrene oxide의 초기농도는 20 mM이었다. (S)-enantiomer의 분해 속도가 감소할수록 (R)-enantiomer의 분해 속도는 증가되는 경향을 보였고, 최적값은 pH 7.5 ~ 8.0으로 얻어졌다. 반응용매의 영향을 살펴보기 위하여 35°C, pH 8.0에서 100 mM Tris-HCl, 100 mM phosphate buffer 그리고 pH만 8.0으로 조정된 증류수에서 초기 가수 분해 속도를 측정하였다. 3가지 모두 비슷한 EH 활성을 얻을 수 있었다 (결과 생략). 특히 증류수에서도 완충용액과 비슷한 수준의 EH 활성을 얻을 수 있었는데 증류수만을 사용할 경우 분리정제 과정에서 많은 이점이 예상된다.

4. 세포내 효소의 위치

균체를 파쇄한 후 분별원심분리법을 통하여 세포 내 분획을 얻어 분획 별 EH 활성을 측정하였다(Table 2). 전체 EH 활성의 약 51%정도가 mitochondria fraction과 microsomes fraction에 존재함을 알 수 있었다. 또한 단위 단백질 당 EH 활성(specific activity)은 mitochondria fraction에서 100 nmol min⁻¹ mg⁻¹로 가장 높은 수치를 보였는데 이는 대조군 (동량의 단백질을 가진 파괴하지 않은 균체의 EH 활성) 대비 약 3 배에 해당한다. Mitochondria fraction과 microsomes fraction에서 높은 활성이 얻어진 이유는 이 fraction에 EH가 고농도로 존재하기 때문으로 추정된다. 또한 세포파쇄로 인해 mass transfer barrier인 cell wall의 제거도 중요한 원인으로 판단된다.

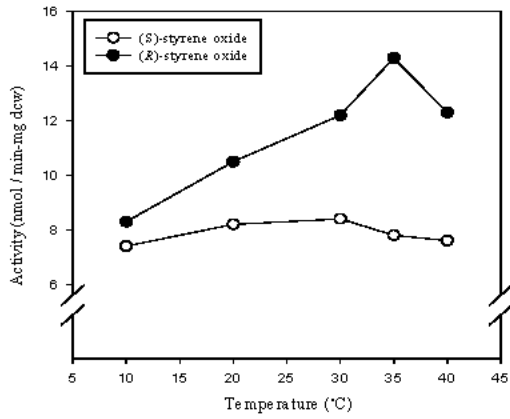


그림 2. (R)- and (S)-styrene oxide 분해에 미치는 온도의 영향. (R)-styrene oxide (●); (S)-styrene oxide (○).

Fig. 2. Effect of temperature on specific (R)- and (S)-styrene oxide degradation rate by *Rhodospiridium* sp. SJ-4. (R)-styrene oxide, (●); and (S)-styrene oxide, (○).

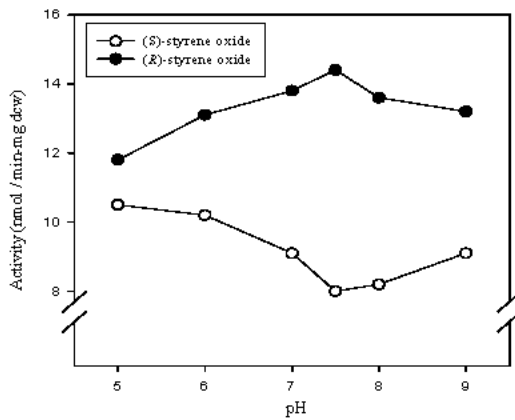


그림 3. (R)- and (S)-styrene oxide 분해에 미치는 pH의 영향. (R)-styrene oxide (●); (S)-styrene oxide (○).

Fig. 3. Effect of pH on specific (R)- and (S)-styrene oxide degradation rate by *Rhodospiridium* sp. SJ-4. (R)-styrene oxide (●); (S)-styrene oxide (○).

표 2. *Rhodospiridium* sp. SJ-4¹의 각 분획에서 epoxide hydrolase 활성.

Table 2. Epoxide hydrolase activity in various fractions of *Rhodospiridium* sp. SJ-4¹.

Fraction	Total protein (mg ml ⁻¹)	Total activity (μmol min ⁻¹)	Specific activity (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	ee (%)
Debris	4.34	0.275	62.55	26
Mitochondria	3.27	0.327	100.00	40
Cell free extract	6.34	0.280	44.16	10
Microsomes	2.67	0.225	84.20	9
Cytosol	4.02	0.225	55.99	2

¹Specific activity represents the degradation rate of (R)-styrene oxide.

EH의 세포내 위치는 비교적 잘 알려져 있다. *Agrobacterium radiobactor* 등의 박테리아와 *Aspergillus niger* 등의 곰팡이는 주로 세포질에 soluble EH를 갖는다. 반면, 포유동물에서는 soluble 및 microsomal 두 가지 종류의 EH가 존재하며, 효모는 membrane-associated EH를 주로 가지고 있다. 따라서 효모의 경우, 계면활성제 등을 이용하여 순수한 형태로 최종 분리하였을 때 입체특이성 및 촉매 활성이 소실된다[12]. 그러나, 효모 유래 EH를 순수한 형태로 분리한 후 비이온성 계면활성제를 이용하여 세포막 역할을 수행할 수 있는 micelle을 형성시켰을 때 활성이 회복되었다. 이는 효모유래 EH의 경우 순수 분리된 효소 보다는 세포막에 결합된 형태로 사용되어야 함을 의미한다. 즉, whole-cell 자체를 사용하거나, 또는 EH가 존재하는 mitochondria fraction과 microsomes fraction을 분리하여 사용하는 것이 좋을 수 있다. Table 2의 결과도 SJ-4의 EH가 membrane-associated임을 보여주며, 기존에 알려진 효모 유래 EH와 비슷한 문제점을 가질 수 있음을 시사해 준다.

5. Styrene oxide의 분해 동력학

광학분할에서 EH의 성능은 서로 다른 광학 이성질체를 분해하는 최대속도와 각 이성질체에 대한 affinity에 의해 결정된다. 이러한 생촉매의 성능을 정량적으로 파악하기 위해 동력학적 거동이 연구되었다. 대표적으로 EH를 styrene oxide의 분해에 적용할 때 다음과 같은 competitive Michaelis-Menten Kinetic equation (Eq. (1), Eq. (2))이 제안되었다[8].

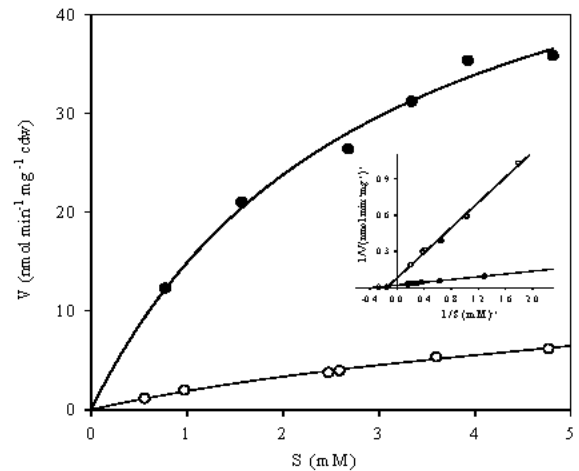


그림 4. 광학적으로 순수한 styrene oxide의 분해속도. Insert는 Michaelis-Menten 식의 동역학 상수 결정을 위한 Lineweaver-Burke plot. (R)-styrene oxide (●); (S)-styrene oxide (○).

Fig. 4. Degradation of enantiopure styrene epoxides by *Rhodospiridium* sp. SJ-4. EH activity on enantiopure (R) and (S)-styrene oxides were determined at different concentrations from 0.5 to 5 mM in 0.1 M potassium phosphate (pH 8.0). Inset shows Lineweaver-Burke plot to determine kinetic constant of Michaelis-Menten equation. (R)-styrene oxide (●); (S)-styrene oxide (○).

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{V_{max}^S \cdot S}{S + \left[\frac{R}{K_m^S} + \frac{D_S}{K_i^{DS}} + \frac{D_R}{K_i^{DR}} + 1 \right] K_m^S} - k_d \cdot S \quad (1)$$

$$\frac{dR}{dt} = - \frac{V_{max}^R \cdot R}{R + \left[\frac{S}{K_m^R} + \frac{D_S}{K_i^{DS}} + \frac{D_R}{K_i^{DR}} + 1 \right] K_m^R} - k_d \cdot R \quad (2)$$

여기서, S 와 R 은 (S)-와 (R)-styrene oxide의 농도(mol m^{-3}), V_{max}^S 와 V_{max}^R 은 (S)- 및 (R)-styrene oxide의 최대 분해속도 ($\text{mol min}^{-1} \text{mg cell}^{-1}$), D_S 와 D_R 은 (S)- 및 (R)-phenyl-1,2-ethanediol의 농도(mol m^{-3}), K_i^{DS} 와 K_i^{DR} 은 (S)-와 (R)-phenyl-1,2-ethanediol의 저해 상수(mol m^{-3})를 나타내며, k_d 는 styrene oxide의 수용액상에서 자발적 가수분해 상수 (s^{-1})를 나타낸다. 이 모델식은 광학적으로 순수한 enantiomer의 가수 분해 반응속도는 그것의 분해산물 뿐 아니라 반대쪽 enantiomer 및 그 분해산물의 존재에 의해서도 저해 받는다는 것을 가정하고 있다.

Styrene oxide 농도에 따른 분해 속도를 Fig 4에 나타내었다. 분해속도는 (R)-styrene oxide의 분해 속도가 (S)-styrene oxide의 분해속도 보다 3배 가량 빨랐다. 또한 (S)-, (R)-styrene oxide 모두 농도가 낮을 때는 분해속도가 선형적으로 증가하지만, 높을 때는 점차 감소하여 점진적으로 최대치에 도달하는 경향을 보였다.

최대 분해속도(V_{max})와 포화상수(K_m)은 반응속도(V)와 styrene oxide 농도, (R) 및 (S)의 역수를 취하여 (Lineweaver-Burke plot) 얻은 기울기 및 y절편으로부터 구하였다. (S)-styrene oxide에 대한 V_{max}^S 와 K_m^S 은 각각 $14.2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg cell}^{-1}$, 5.7 mM 이었고 (R)-styrene oxide에 대한 V_{max}^R 와 K_m^R 은 $49.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg cell}^{-1}$, 2.8 mM 이었다. (Table 3)

생성물에 의한 저해상수(K_i)를 구하기 위하여 (S)-, (R)-styrene oxide 농도를 5 mM 로 고정하고 생성물인 (S)-, (R)-phenyl-1,2-ethanediol의 농도를 $0\sim 80 \text{ mM}$ 변화시키며 styrene oxide 분해속도를 조사하였다. Eq. (1)과 Eq. (2)로부터 변환한 Eq. (3) 과 Eq. (4)를 이용하여, 즉 $\frac{V_{max}^S}{V}$ vs. I plot의 기울기로부터, 생성물 저해상수 (K_i)를 구할 수 있었으며, K_i^{DS} 와 K_i^{DR} 은 각각 27.3 과 24.5 mM 이었다 (Table 3).

$$\frac{V_{max}^S}{V} = \left[\frac{K_m^S}{S} + 1 \right] + \frac{K_m^S}{K_i^{DS} \cdot S} \cdot I \quad (3)$$

$$\frac{V_{max}^R}{V} = \left[\frac{K_m^R}{R} + 1 \right] + \frac{K_m^R}{K_i^{DR} \cdot R} \cdot I \quad (4)$$

Fig. 5은 초기농도 4 mM 의 라세릭 styrene oxide의 동역학적 광학분할의 경시적 변화에 대한 실험치와 이론치를 동시에 보여준다. 반응 80분 경과 후, (R)-styrene oxide는 완전히 분해 ($ee > 99\%$) 되었으며 25% 정도(이론수율 = 50%)의 (S)-styrene oxide을 얻을 수 있었다. Fig. 5에서 실선은 Table 3에 주어진 kinetic parameters 값을 통한 competitive Michaelis-Menten Kinetic model의 이론값을 나타내며 이는

표 3. 전세포 *Rhodospiridium* sp. SJ-4과 *A. radiobacter* AD1 유래의 정제된 EH를 이용한 styrene oxide 분해반응의 동역학적상수.

Table3. Kinetic constants for the conversion of styrene oxide by whole-cell *Rhodospiridium* sp. SJ-4 and purified EH from *A. radiobacter* AD1.

Parameters*	Whole-cell EH from <i>Rhodospiridium</i> sp.	Partial-purified EH from <i>A. radiobacter</i> AD1
V_{max}^S ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg cell}^{-1}$)	14.2	$18.5 \times 10^3 \pm 1.7 \times 10$
V_{max}^R ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg cell}^{-1}$)	49.5	$7.4 \times 10^3 \pm 5$
K_m^S (mM)	5.7×10^3	25 ± 5
K_m^R (mM)	2.8×10^3	0.6 ± 0.2
K_i^{DS} (mM)	24.5	29 ± 5
K_i^{DR} (mM)	27.3	42 ± 10
k_c^S (s^{-1})	2.7×10^{-5}	9.54×10^{-6}
k_c^R (s^{-1})	2.7×10^{-5}	9.54×10^{-6}
E-value	7.1	13
Reference	This study	Baldascini, 2001

*Symbols are given in the text.

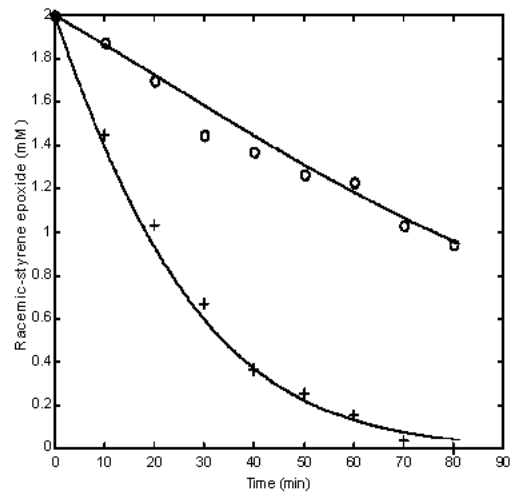


그림 5. *Rhodospiridium* sp. SJ-4를 이용한 (R)-styrene oxide (+)와 (S)-styrene oxide (O)의 광학분할. 심볼은 실험데이터이고 실선은 전산모사결과임

Fig. 5. Degradation of (R)- (+) and (S)-styrene oxide (O) by whole cell *Rhodospiridium* sp. SJ-4. Symbols represent experiments and lines the simulation results with the kinetic constants summarized in Table 3.

실험치와 일치하였다. 이는 purified EH에 대해 제안된 동역학 (1)과 (2)가 cell wall을 통과하는 mass transfer barrier가 존재하는 whole cell에 대해서도 잘 적용될 수 있음을 의미한다. Table 3은 *Rhodospiridium* sp. SJ-4의 whole-cell EH의 동역학적 상수들을 요약한 표이다.

Whole cell에 대한 동역학적 상수는 아직 보고 된 바가 없으므로 *Agrobacterium radiobacter* AD1으로 부터 분리한

EH의 동역학적 상수들과 비교하였다. 효소의 선택성을 비교하는 계수로 E-value는 다음과 같이 정의 하였다[13].

$$E = \frac{V_{max}^R / K_m^R}{V_{max}^S / K_m^S} \quad (5)$$

최대분해속도의 경우, *Rhodospiridium* sp. SJ-4는 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg cell}^{-1}$ 로 표현하였고 반면 *A. radiobacter* AD1 정제 효소의 분해속도는 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg enzyme}^{-1}$ 으로 나타내었다. Whole-cell EH와 정제효소 EH의 최대분해속도(V_{max})를 직접적으로 비교하는 것은 불가능하지만 단위 생축매 무게 당 최대 분해속도는 약 10^3 배 차이가 난다고 할 수 있다. 또한, *Rhodospiridium* sp. SJ-4의 포화상수(K_m)는 *A. radiobacter* AD1 유래 EH의 값 보다 103배 높았다. 이는 whole cell EH경우 기질이 효소와 결합하기 위해서는 세포막을 통과하여야만 하는 높은 물질전달 저항(mass transfer resistance)에 반영한 것으로 보인다. 이와 같이 낮은 V_m 와 높은 K_m 은 whole-cell의 산업적 적용 측면에서 주요한 단점이 된다.

한 가지 흥미로운 점은 *Rhodospiridium* sp. SJ-4 와 AD1 유래 정제 EH의 선택적 분해속도에는 매우 다른 점이 있다는 것이다. *Rhodospiridium* sp. SJ-4의 경우 (R)-styrene oxide의 최대분해 속도가 (S)-styrene oxide의 최대분해속도가 3 배 정도 높은데 반하여 *A. radiobacter* AD1 유래 EH의 경우 (R)-styrene oxide의 최대분해속도가 (S)-styrene oxide의 최대 분해속도의 2.5 배 낮다. 이로 인해 whole-cell SJ-4가 낮은 V_{max} 와 높은 K_m 을 갖고 있음에도 불구하고 E-value는 AD1 유래 정제 EH 효소와 매우 비슷하였다.

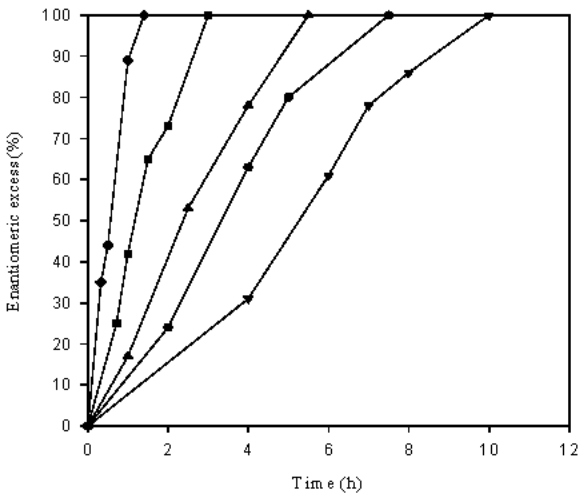


그림 6. *Rhodospiridium* sp. SJ-4를 이용한 라세믹 styrene oxide의 광학분할. 20 mM (◆); 40mM (■) ; 60mM (▲); 80mM (●); 100mM (▼).

Fig. 6. Effect of initial substrate concentration on enantioselective hydrolysis of racemic styrene oxides by *Rhodospiridium* sp. SJ-4. 20 mM (◆); 40mM (■) ; 60mM (▲); 80mM (●); 100mM (▼).

6. 고농도 racemic styrene oxide의 광학분할

일반적으로 미생물에 의한 생물전환 반응은 기질의 농도가 높아짐에 따라 입체선택성이 저하될 수 있다. 또한 생축매가 존재하는 수용액 상과 분리될 정도의 많은 기질을 첨가하거나, 에폭사이드 기질의 용해도를 증진시키기 위하여 유기용매를 사용한 경우에서의 효소 활성이 저하된다는 연구결과들이 보고되었다[14]. 정제효소에 비해 whole-cell 생축매의 장점은 이러한 가혹한 조건에서의 안정성이므로 이를 조사하기위해 racemic styrene oxide의 상분리가 일어나는 고농도 구간, 즉 20 mM에서 100 mM 범위에서 SJ-4를 이용한 광학분할을 실시하였다(Fig. 6). 세포농도는 23 mg ml^{-1} 로 고정하였다. 기질의 농도가 20 mM에서 100 mM로 높아짐에 따라 최종 반응시간은 1 h에서 10 h 으로 크게 증가하였지만 100 mM까지 95 % ee 이상의 광학순도를 얻을 수 있었다. 수율은 20%(이론수율 50%)로 거의 일정하였다.

고농도 기질에 대한 반응은 문헌에 거의 보고 되지 않고 있다. *A. niger*, *R. glutinis* 등의 wild-type 균주들을 whole-cell 생축매를 이용한 기존 연구 결과들은 대부분 20 mM 수준의 저농도에서의 반응 결과만을 보고하고 있다. 최근 wild-type의 *B. megaterium*에 의한 초기농도 60 mM phenyl glycidyl ether에 대한 kinetic resolution 반응이 보고되었는데 25% 정도의 수율이 얻어졌다.[15] 다른 균주와의 비교에는 더 많은 자료가 필요하지만 Fig. 6이 결과로부터 본 연구에서 분리된 *Rhodospiridium* sp. SJ-4가 고농도 styrene oxide의 가혹한 조건에서도 안정된 활성을 지닌 우수한 균주임을 알 수 있었다.

IV. 결론

본 연구에서는 racemic styrene oxide로부터 고순도 (S)-styrene oxide을 생산하기 위해 고효율성 epoxide hydrolase를 갖는 균주를 획득하고 생축매로서의 가능성을 조사하였다. 토양 및 지표수로부터 분리한 EH 활성을 보이는 11종의 미생물 중 상대적으로 높은 활성과 입체 특이성을 보이는 *Rhodospiridium* sp. SJ-4를 얻었다. SJ-4에서 EH는 constitutive하게 발현되었고 styrene oxide 분해 최적온도와 pH는 각각 35 °C와 8.0 이었다. 또한 광학 분할 반응을 정량적으로 해석하기 위해 정제 효소에 대해 제안된 수확식을 whole-cell catalyst에 적용하고 관련 상수를 측정하였다. 제안된 속도식은 styrene oxide의 광학 분할 반응을 잘 묘사하였고 반응의 선택성을 나타내는 E값은 *Agrobacterium radiobacter* AD1 으로부터 분리한 EH와 비슷한 7.1이었다. 또한 SJ-4를 이용하여 물에 대한 styrene oxide의 용해도를 초과하는 20 ~ 100 mM의 높은 농도에서 광학분할을 실시한 결과 광학순도 99%이상의 chiral (S)-styrene oxide를 얻을 수 있었다. 반응시간은 농도의 증가에 따라 증가하였으나 수율은 농도에 관계없이 20% (이론수율 50 %)가 얻어졌다. 이 결과는 whole-cell SJ-4의 경우 비록 세포벽을 통과하는데 따르는 mass transfer barrier가 있다하더라도 별도의 organic solvent 사용 없이 고농도의 액상기질을 전환하는 생축매로 사용할 수 있는 장점이 있다는 뜻이다.

참고문헌

- [1] R. A. Sheldon, *Chirotechnology*. Marcel Dekker, New York, 1993.
- [2] C. Morisseau, G. Venturi, P. Moussou, J. C. Baratti, "Effect of carbon and nitrogen sources on the production of highly enantioselective epoxide hydrolase from *Aspergillus niger*," *Biotechnol. Tech.* 12, 805-809, 1998.
- [3] K. Faber, M. Mischitz, W. Kroutil, "Microbial epoxide hydrolase," *Acta Chem. Scand.* 50, 249-258, 1996.
- [4] C. Morisseau, H. Nellaiah, A. Archelas, R. Furstoss, J. C. Baratti, "Asymmetric hydrolysis of racemic par-nitrostyrene oxide using an epoxide hydrolase preparation from *Aspergillus niger*," *Enzym. Microb. Technol.* 20, 446-452, 1997.
- [5] C. A. G. M. Weijers, "Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*," *Tetrahedron Asymmetry* 8, 639-647, 1997.
- [6] C. A. G. M. Weijers, J. A. M. de Bont, "Epoxide hydrolases from yeasts and other sources: versatile tools in biocatalysis," *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 6, 199-214, 1999b.
- [7] J. H. L. Spelberg, R. Rink, R. M. Kellogg, D. B. Janssen, "Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*," *Tetrahedron: Asymmetry* 9, 459-466, 1998.
- [8] H. Baldascini, K. J. Ganzeveld, D. B. Janssen, A. C. M. Antonie, "Effect of mass transfer limitations on the enzymatic kinetic resolution of epoxides in a two-liquid-phase system," *Biotechnol. Bioeng.* 73, 44-5, 2001.
- [9] A. N. Collins, G. M. Sheldrake, J. Crosby, *Chirality in industry*, John Wiley & Sons, New York, 1992.
- [10] W. J. Choi, E. C. Huh, H. J. Park, E. Y. Lee, C. Y. Choi, "Kinetic resolution for optically active epoxides by microbial enantioselective hydrolysis," *Biotechnol. Techniq.* 12, 225-228, 1998.
- [11] J. Pan, J. H. Xu, "Marked enhancement of epoxide hydrolase production from *Trichosporon loubierii* ECU1040 by substrate induction and fed-batch fermentation," *Enzym. Microb. Technol.* 26, 1-7, 2003.
- [12] N. A. E. Kronenburg, J. A. M. de Bont, "Effects of detergents on specific activity and enantioselectivity of the epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis*," *Enzym. Microb. Technol.* 28, 210-217, 2001.
- [13] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, "Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers," *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7294-7299, 1982.
- [14] W. J. Choi, E. Y. Lee, S. J. Yoon, C. Y. Choi, "Biocatalytic production of chiral epichlorohydrin in organic solvent," *J. Biosci. Bioeng.* 88, 339-341, 1999.
- [15] Y. F. Tang, J. H. Xu, Q. Ye, B. Schulze, "Biocatalytic preparation of (*S*)-phenyl glycidyl ether using newly isolated *Bacillus megaterium* ECU1001," *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 13, 61-68, 2001.



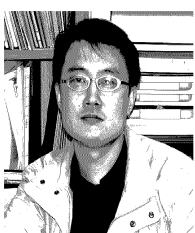
유 승 식

2001년 동아대 화학공학과 졸업. 2003년 부산대학원 석사. 2003년~현재 PPG 동주산업 근무. 관심분야는 유기합성.



김 희 숙

1972년 서울대 화학교육학과 졸업. 1981년 부산대 식품영양학과 석사. 1981년 부산대학원 석사. 1987년 부산대 박사. 1997년~현재 경성대 식품공학과 교수. 관심분야는 영양생화학.



오 유 관

1995년 부산대 화학공학과 졸업. 1997년 동 대학원 석사. 2004년 동 대학 박사. 2005년~현재 UC sandiego Post-Doc. 관심분야는 생물학적수소생산.



이 은 열

1989년 서울대 응용화학부 졸업. 1991년 동 대학원 석사. 1995년 동 대학 박사. 1998년~현재 경성대학교 식품공학과 부교수. 관심분야는 분자생명공학, 바이오공정공학.



김 정 선

1988년 이화여대 제약학과 졸업. 1990년 동 대학원 석사. 1997년 Rutgers-The State University of New Jersey 박사. 2001년~현재 동서대학교 조교수. 관심분야는 생리약학.



박 성 훈

1980년 서울대 응용화학부 졸업. 1982년 동 대학원 석사. 1988년 미국 California Davis 대학 박사. 1991년~현재 부산대 응용화학공학부 교수. 관심분야는 생물공학, 화학공학.