한국생물공학회지 제20권 제4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 20, No. 4, 311-316(2005)

Bioinformatics를 활용한 토양미생물인 *Gordonia westfalica* Epoxide Hydrolase 생촉매 개발 및 Chiral Epoxides 제조 특성 분석

이 수 정 · 이 은 정 · 김 희 숙 · † 이 은 열
경성대학교 공과대학 식품공학과
(접수 : 2005. 6. 3., 게재승인 : 2005. 8. 23.)

Bioinformatics based Identification and Characterization of Epoxide Hydrolase of *Gordonia westfalica* for the Production of Chiral Epoxides

Soo Jung Lee, Eun Jung Lee, Hee Sook Kim, and Eun Yeol Lee†
Department of Food Science and Technology, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea
(Received : 2005. 6. 3., Accepted : 2005. 8. 23.)

Epoxide hydrolases (EHs) are versatile biocatalysts for the preparation of chiral epoxides by enantioselective hydrolysis from racemic epoxides. Various microorganisms were identified to possess a EH activity by multiple sequence alignment and analysis of conserved domain sequence from genomic and megaplasmid sequence data. We successfully isolated *Gordonia westfalica* possessing EH activity from various microbial strains from culture type collections. *G. westfalica* exhibited *(R)*-styrene oxide preferred enantioselective hydrolysis activity. Chiral *(S)*-styrene oxide with high optical purity (> 99% ee) and yield of 36.5% was obtained from its racemate using whole-cell of *G. westfalica*.

Key Words : Enantioselective hydrolysis, epoxide hydrolase, chiral epoixdes, *Gordonia westfalica*, multiple sequence alignment

서 론

한 가지 이상의 광학이성질체가 존재하는 라세믹 의약품의 경우, 특정 광학이성질체 한가지만이 올바른 생리활성을 보여주고 다른 광학이성질체들은 활성이 없거나 경우에 따라서는 심각한 부작용을 주는 경우가 있다(1). 광학이성질체들의 생리활성 차이가 존재함에 따라 광학적으로 순수한 의약품 소재 합성기술 개발이 활발하게 진행되고 있다. 또한 광학활성물질의 효율적인 제조를 위해 사용되는 광학활성 중간체 제조기술 개발도 중요해지고 있다.

광학활성 중간체로 널리 사용되고 있는 광학활성 에폭사이드 (chiral epoxide)는 불안정한 3개 고리구조와 산소원자의 전기음성도에 기인한 극성 때문에 반응성이 우수하여 친전자성반응, 친핵성반응, 산 · 염기반응, 산화 · 환원반응 등 다양한 반응을 시킬 수 있다(2). 라세믹 에폭사이드 기질의 각 광학이성질체에 대한 에폭사이드 가수분해효소 (epoxide hydrolase, EH, EC 3.3.2.3)의 선택적 분해능 차이를 이용하여 단일 광학이성질체만을 제조하는 입체선택적 동력학적 가수분해 (hydrolytic kinetic resolution, HKR) 기술은 최근 관심의 대상이 되고 있는 방법이다(3-5). EH는 라세믹 에폭사이드 기질로부터 (*R*) 또는 (*S*)-이성질체 중 한 가지 광학이성질체만을 입체 선택적으로 diol로 가수분해시켜 제거시키고 나머지 이성질체만을 남겨 광학적으로 순수한 에폭사이드를 제조하는 공정에 이용할 수 있는 효소이다(6). 또한 EH는 NADH 등과 같은 보조인자 (cofactor)가 필요 없으며, 발현 유도 없이 효소가 발현되며, 비교적 안정된 구조를 가지고 있어 상업적으로 유용한 효소로 평가되고 있다(7).

미생물 유래의 EH는 이화대사작용에서 주된 역할을 수행하기 때문에 동 · 식물 유래의 EH보다 다양한 기질 특이성을 가지며 입체선택성도 높고 가수분해 속도가 높으며 많은 양의 EH를 간편하게 얻을 수 있으므로 광학활성 에폭사이드 제조용 생촉매로써 산업적 응용가능성이 높다

† Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea
Tel : +82-51-620-4716, Fax : +82-51-622-4986
E-mail : eylee@ks.ac.kr

(8-9). 또한, 다양한 환경에 서식하는 미생물들은 다양한 생화학반응을 기반으로 생명현상을 유지하므로 특이성 EH를 얻을 수 있으며, 상업적으로 응용한 다양한 기질에 대하여 입체 선택적 가수분해 활성이 우수한 EH를 선별할 수 있다.

신규 EH를 선별하는 방법으로 bioinformatics를 기반으로 한 genome database로부터 putative EH 유전정보를 찾는 방법이 있다. EH의 catalytic nucleophile residue, His-Asp로 구성된 charge relay system, oxyanion hole 등의 EH 관련 conserved domain의 아미노산 공통 서열을 참고로 하여 새로운 미생물로부터 putative epoxide hydrolase를 선별할 수 있다. 본 연구에서는 게놈 또는 megaplasmid의 전체 염기서열이 밝혀진 주요 미생물 아미노산 염기서열 정보를 대상으로 putative EH를 검색하고, 선정된 미생물들의 wild-type 균주들로부터 EH 활성을 측정하였다. 입체선택성 EH 활성이 검출된 *Gordonia westfalica*의 EH에 대한 입체 구조학적 비교, 분류, 보존영역분석 등을 실시하였다. *G. westfalica*의 균체 성장에 따른 EH 발현 특성, 반응온도와 pH가 *G. westfalica* 생촉매의 입체 선택적 가수분해 반응에 미치는 영향 및 회분식 광학분할 반응 특성을 평가하였다.

재료 및 방법

배양조건

한국생명공학원 생물자원센터에서 구입한 *G. westfalica*는 $CaCO_3$ 0.2% (w/v)가 첨가된 GYM 액체배지 (glucose 0.4% (w/v), yeast extract 0.4% (w/v), malt extract 1% (w/v))를 사용하여 배양온도 28℃, 250 rpm에서 4일간 진탕 배양하였다.

G. westfalica EH의 입체구조학적 비교 및 분류

아직까지 밝혀지지 않은 새로운 EH 서열 정보를 얻기 위하여 먼저 NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/)를 이용하여 GenBank에 등록된 bacterial EH의 염기서열 및 단백질서열을 검색하였다. *G. westfalica* EH 단백질의 입체구조를 비교·분류하기 위하여 2차 구조의 공간배치를 기준으로 한 유사성 검색방법인 SCOP (structural classification of protein, http://scop.ccbb.re.kr/)을 이용하였으며 EH 단백질에 보존된 domain을 검색하기 위해서는 SWISS-PROT과 TrEMBL에 등록된 단백질들로부터 구축된 domain database인 ProDom (http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/)을 이용하였다. 또한 EH 활성에 필요한 catalytic triad, oxyanion hole 및 charge relay system과 관련된 아미노산 잔기들을 예측하기 위하여 domain 검색, motif 검색, 단백질의 상동성 검색 및 2차 구조 예측 등 정보를 제공하는 통합시스템인 PredictProtein server (http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/)를 이용하였고, 그 정보들을 이용하여 상동성을 가진 단백질들 사이의 multiple sequence alignment (MSA)를 행하였다. G. *westfalica* EH 단백질서열 (281 amino acid)이 가질 수 있는 3차 구조를 예측하기 위하여 SwissModel을 사용하였으며 PDB (The Protein Data Bank, http://www.rcsb.org/pdb/)에 등록되어 있는 X-ray 회절 단백질결정구조들과 비교하였다.

입체선택성 가수분해반응

세포 40 mg을 10 ml의 100 mM 인산염완충용액 (pH 7.0)에 현탁시킨 후 20 mM 라세믹 styrene oxide를 주입하였다. 반응기로는 screw-cap vial을 사용하였으며, 30℃, 250 rpm의 진탕배양기에서 반응을 실시하였다. 반응 종료 후 반응액을 cyclohexane으로 추출한 후, 유기용매 층을 GC로 분석하여 초기 가수 분해속도와 광학순도 (enantiomeric excess, *ee* (%)= 100 x [*S*-*R*]/[*S*+*R*])를 결정하였다. 기질인 라세믹 styrene oxide 및 enantiopure epoxide standard는 시약 등급을 구입하여 사용하였다.

반응온도 및 초기 pH의 영향

*G. westfalica*의 에폭사이드 가수분해효소 활성을 이용한 광학분할 속도에 미치는 온도 및 pH 영향을 분석하기 위하여 반응용액의 pH와 온도를 변화시키면서 광학분할 실험을 수행하였다. 입체특이성 가수분해 반응에 대한 온도의 영향을 알아보기 위하여 생촉매량 40 mg, 초기 라세믹 기질 농도를 10 mM, 초기 가수분해반응속도 측정 시간 구간 10 min으로 하여 10~40℃의 온도 구간에서 초기 가수분해 속도를 측정하였다. 완충용액의 pH를 5.0~8.0까지 변화시키면서 30℃, 250 rpm의 진탕배양기에서 30분 동안 가수분해 반응을 실시하면서 pH가 반응속도 및 광학순도에 미치는 영향을 평가하였다.

Chiral GC 분석

Styrene oxide의 *ee* 값 및 수율 결정을 위한 GC 분석은 불꽃이온 검출기가 장착된 가스크로마토그래프를 사용하였다. 분석용 column으로는 silica cyclodextrin capillary β-DEX 250 (60 m length, 0.25 mm ID, and 0.25 ㎛ film thickness) column을 사용하였다. 이동가스로 질소를 사용하였으며 split ratio는 1 : 100, flow rate는 0.5 ml/min으로 1 ㎕의 시료를 주입하여 분석하였고, column, injector, detector의 온도는 각각 100, 220, 220℃이였다.

결과 및 고찰

NCBI를 이용한 bacterial putative EH 검색 및 wild type EH 활성시험

NCBI를 이용하여 bacterial EH로 검색된 정보들 중에서 게놈 또는 megaplasmid의 전체 염기서열이 밝혀졌으나 활성실험이 이루어지지 않은, 즉, 염기서열로부터 유추된 단백질서열의 domain 분석에 의하여 EH 활성이 있을 것으로 추정되는 putative EH 서열정보들을 검색할 수 있었다. Putative EH 유전자를 가질 것으로 기대되는 *Gordonia westfalica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium acetobutylicum*, *Bacillus subtilis*, *Chromobacterium violaceum* 등을 포함하여 한국생명공학원 생물자원센터와 실험실 보유 균주 등 20 여종의 미생물들로부터 EH 활성을 측정하였다. 선정된 미생물의 wild-type 균주들을 가지고 styrene oxide를 기질로 하여

EH 활성을 측정한 결과, *G. westfalica*로부터만 입체선택성 EH 활성을 얻을 수 있었다. *Gordonia* 속은 계통유전학적으로 actinomycetes 중에서 mycolic acid를 합성하는 *Corynebacteriium* 에 속한다. *Gordonia* species들은 다양한 대사 특성을 보이며, 탄화수소, 고무, 황함유 방향족 화합물 등을 분해하는 특성을 가지고 있다. *Gordonia* 속에 포함된 actinomycete들은 흙, 활성 슬럿지, biofilm 및 mangrove rhizosphere 등에 많이 분포되어 있으며, 환경미생물학적 측면에서도 오염된 흙이나 물을 정화하는데 이용되어 왔다(10).

Bröker 등은 *G. westfalica*의 EH 활성을 가지는 유전자로 추정된 염기서열이 염색체외에 존재하는 pKB1 plasmid에 들어있다고 보고하였다(11). 이 plasmid는 총 101,016 염기쌍을 가지는 megaplasmid이며, rubber-degrading bacteria인 *G. westfalica*로부터 분리되었다. Putative EH 활성을 가질 것으로 예측된 유전자는 pKB1 plasmid 염기서열의 4068번 염기부터 4913번 염기까지의 open reading frame (GenBank ID: AJ576039)으로 846 bp 크기로 이루어져 있었으며, 염기서열로부터 유도된 단백질 (Genbank ID: CAE09068)은 281개의 아미노산으로 이루어져있었다. 이렇게 얻어진 단백질서열의 catalytic triad, oxyanion hole, 2차 구조 및 3차 구조를 예측할 목적으로 먼저 domain 검색과 PDB (Protein Data Bank)에 등록되어 있는 결정구조를 비교하였다.

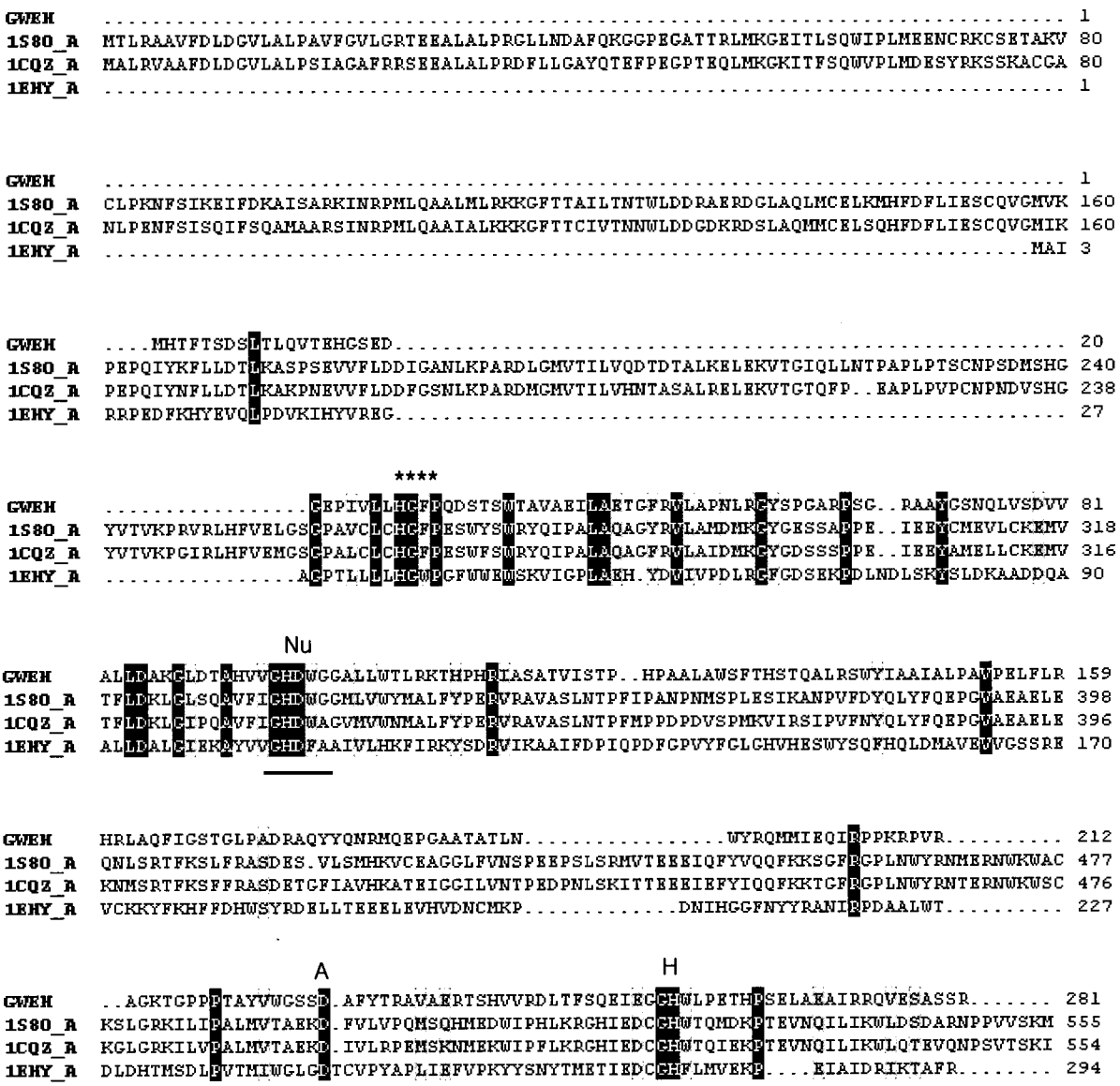

Figure 1. Comparison of amino acid sequences of epoxide hydrolases by multiple sequence alignment: amino acid sequences of *G. westfalica* EH (GWEH), human soluble EH (pdb ID. 1S8O_A), mouse soluble EH (1CQZ_A) and *A. radiobacter* EH (1EHY_A). Conserved amino acid residues are boxed in dark shaded and consensus amino acid residues with similarity more than 80% are boxed in pale shaded. The amino acid residues for the catalytic triad are indicated by Nu (nucleophile), A (acidic residue), and H (histidine). The amino acid sequence for the oxyanion hole motif and the nucleophile motif are indicated by **** and underline, respectively.

G. westfalica Kb1 유래 putative EH 단백질의 입체구조학적 특성분석

*G. westfalica*의 EH 단백질서열을 가지고 domain 분석을 행한 결과, 동물유래의 soluble EH, 세균성 EH 또는 세균 유래 haloalkane dehalogenase 단백질들과 25~36% 정도의 identity를 가지는 것으로 나타났다(Fig. 1). 여러 생물 유래의 EH 단백질들의 진화적 유연관계를 분석한 결과를 바탕으로 EH는 3종류의 subfamily로 나눌 수 있으며, 첫째 class는 동물유래 microsomal EH (mEH), 둘째 class는 모든 식물 유래 EH 들과 동물유래의 soluble EH (sEH), 그리고 마지막 class는 *Agrobacterium radiobacter*나 *Corynebacterium sp.*의 세균성 EH들로 이들은 같은 alpha/beta hydrolase superfamily에 속하는 haloacetate dehalogenase family와 밀접한 상관성이 있다(12). 동물유래의 soluble EH 단백질서열을 microsomal EH와 비교하면, alpha/beta hydrolase fold domain 부분만 유사성이 있으며 오히려 세균 유래 haloalkane dehalogenase와 더 의미 있는 유사성을 보이는 것으로 알려져 있다. 또한 *G. westfalica* EH 단백질의 입체구조를 분류하기 위하여 SCOP를 통한 검색을 행한 결과 alpha/beta hydrolase fold에서 soluble EH family에 가장 가깝고, lipase family나 haloalkane dehalogenase family와도 상동성을 가지는 것으로 나타났다.

Table 1. Homology analysis on the EH of *G. westfalica* with the crystal structures of various EH proteins and other proteins

PDB ID	P(N) value	Identity (pair-wise alignment)	Enzyme	origin
1S8O	1e-17	36.5%	soluble EH	human
1CQZ	2e-16	30.1%	soluble EH	mouse
1EHY	8e-11	34.9%	bacterial EH	*Agrobacterium radiobacter*
1A88	9e-10	30.0%	chloroperoxidase-L	*Streptomyces lividans*
1A7U	6e-09	27.5%	chloroperoxidase-T	*Streptomyces aureofaciens*
1CQW	4e-08	30.8%	haloalkane dehalogenase	*Rhodococcus rhodochrous*
1OIL	7e-08	30.4%	lipase	*Burkholderia cepacia*

G. westfalica EH 단백질의 입체구조 유사성

G. westfalica EH 단백질서열 (a.a. 281)이 가질 수 있는 3차구조를 예측하기 위하여 ExPASy proteomics server (http://kr.expasy.org/)에서 제공하는 SwissModel을 이용하였으며(13), 그 결과는 Table 1과 같았다. *G. westfalica* EH 단백질의 입체구조는 사람의 soluble EH 결정 구조 (PDB ID : 1s8o)와 가장 유사하였으며, 다음은 mouse soluble EH (PDB ID : 1cqz), *A. radiobacter* EH (PDB ID : 1ehy) 순으로 유사한 구조를 가지는 것으로 나타났다. *G. westfelica* EH 아미노산 서열을 기존의 다른 EH 서열들과 pair-wise alignment를 행하였을 때, 사람의 soluble EH와 36.5%로 가장 상동성이 높았으며, *Agrobacterium*의 EH와 34.9%, mouse soluble EH와 30.1%, *Burkholderia cepacia* lipase와 30.7%의 유사성을 보였다. 위의 결과로 볼 때 *G. westfalica*의 EH 단백질의 3차구조는 동물 유래의 soluble EH 또는 *Agrobacterium* 유래의 EH 단백질 결정구조와 가까운 것으로 추정할 수 있었다.

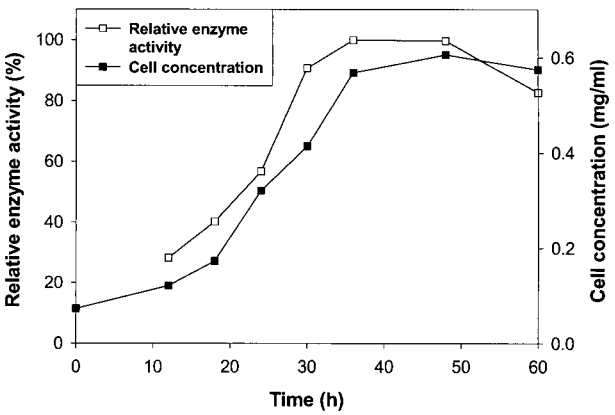

Figure 2. Growth curve of *G. westfalica* and growth-associated expression of epoxide hydrolase activity.

G. westfelica EH 단백질서열의 유사성

G. westfelica EH 단백질서열과 다른 단백질들과의 상동성 검색을 위하여, SwissProt/TrEMBL에 등록되어 있는 모든 단백질들에 대하여 PSI-BLAST 검색을 행하였다. PSI-BLAST 검색 결과 human sEH, mouse sEH. *A. radiobacter* EH, *M. bovis* haloalkane dehalogenase 및 *R. rhodochrous* haloalkane dehalogenase 등의 단백질 내에 *G. westfalica* EH 단백질과 상동성이 높은 domain이 존재하는 것을 알 수 있었다. PSI-blast는 단백질서열 중 상동성이 높은 영역만을 비교한 것이므로 ClustalW를 이용하여 *G. westfelica* EH와 이들 유사 단백질 4종의 전체서열을 비교분석하였다(Fig. 1). 비교한 결과를 보면 human soluble EH (a.a. 555)나 mouse soluble EH (a.a. 554)는 세균인 *G. westfelica* EH (aa. 281), *A. radiobacter* EH (a.a. 294)보다 단백질의 크기가 컸으며 단백질서열상으로 보면 *G. westfelica* EH나 *A. radiobacter* EH는 동물유래의 soluble EH의 N-terminal에 해당하는 258번 아미노산까지는 갖고 있지 않았다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 *G. westfalica* EH는 다른 EH와 마찬가지로 oxyanion hole인 HGXP(****) motif를 가지고 있었으며, catalytic triad 중 nucleophile (Nu)로 작용하는 aspartic acid (98D)를 가지는 Sm-X-Nu-X-Sm (Sm = small amino acid, X = any amino acid, Nu = nucleophile amino acid)서열인 GHDWG motif (underlined)를 가지고 있었다. 또한, acidic residue로 작용하는 229번 aspartic acid와 257번 histidine이 charge relay system으로 보존되어 있는 것을 알 수 있었다. 동물 유래 EH 단백질에서 에폭사이드 기질의 oxirane ring과 수소결합을 하는 tyrosine 아미노산 잔기는 human soluble EH에서 383Y와 466Y이며 mouse soluble EH에서 381Y와 465Y로 알려져 있으나, *G. westfalica* EH 단백질의 상동성검색 결과를 살펴보면 144Y가 관여하는 것으로 추정되며 또 하나의 tyrosine 잔기의 위치는 확실하게 결정할 수 없었다.

G. westfalica 배양 및 EH 발현양식 분석

생물정보학 기반의 putative EH에 대한 정보를 기준으로 *Gordonia*속 미생물에 대하여 EH 활성을 평가하여, 라세믹 styrene oxide를 입체 선택적으로 가수분해할 수 있는 활성을 가진 *G. westfalica*를 선별하였으며 균체 성장에 따른 EH 발현 상관성을 분석하였다(Fig. 2). 대수성장기는 12시간부터 30시간까지 관찰되었으며, EH의 활성은 균체 성장과 함께 비례적으로 증가하였다. EH의 최대 활성을 배양 36시간에서 얻을 수 있었으며, *G. westfalica*의 배양 실험결과로부터 *G. westfalica*의 EH는 균체 성장과 함께 발현되고 있음을 알 수 있었다.

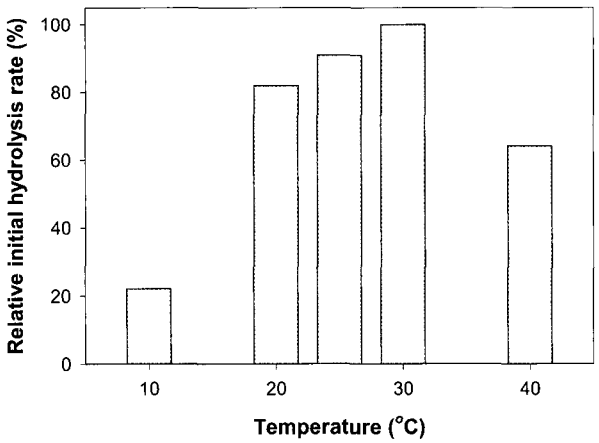

Figure 3. Effect of reaction temperature on the enantioselective kinetic resolution of racemic styrene oxide for preparing (*S*)-styrene oxide by *G. westfalica*.

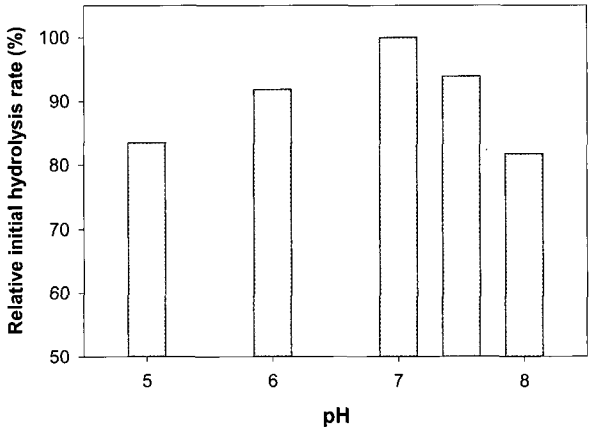

Figure 4. Effect of reaction pH on the enantioselective kinetic resolution of racemic styrene oxide for preparing (*S*)-styrene oxide by *G. westfalica*.

반응온도 및 초기 pH가 *G. westfalica* EH의 입체 선택적 가수분해 활성에 미치는 영향분석

G. westfalica EH의 입체특이성 가수분해 반응에 대한 온도의 영향을 알아보기 위하여 10 - 40℃의 온도 구간에서 초기 가수분해 속도를 측정하였다(Fig. 3). 온도 변화에 따른 (*R*)-styrene oxide에 대한 초기 가수분해 속도를 살펴본 결과, 최적 온도가 30℃ 부근임을 알 수 있었고, 30℃에서의 초기 가수분해속도 대비 10℃에서의 상대 초기 가수분해속도가 가장 낮은 21% 정도임을 알 수 있었다.

100 mM 인산염 완충용액의 pH를 5.0 - 8.0까지 변화시키면서 진탕배양기 (30℃, 250 rpm)에서 30분 동안 가수분해 반응을 실시하여 pH가 반응속도에 미치는 영향을 평가해 보았다(Fig. 4). 반응용매의 pH가 7.0인 경우 가장 좋은 초기반응속도를 나타내어 광학적으로 순수한 (*S*)-styrene oxide를 얻기 위한 최적 pH로 결정하였다.

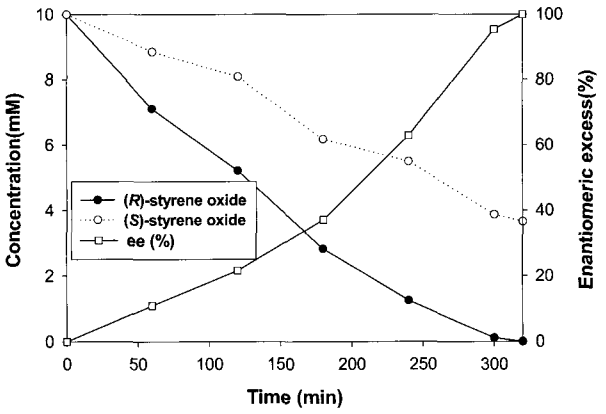

Figure 5. Batch enantioselective kinetic resolution of 20 mM racemic styrene oxide for preparing (*S*)-styrene oxide by *G. westfalica*.

G. westfalica EH 활성을 이용하여 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 회분식 입체선택적 가수분해반응

DNA 염기서열 및 단백질 아미노산 서열에 대한 multiple alignment, EH 생촉매 활성 domain의 보존성 분석 등을 기반으로 스크리닝한 *G. westfalica*의 EH 활성을 이용하여 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 입체 선택적 가수분해 반응을 실시하였다(Fig. 5). 반응용액의 pH가 7.0으로 조절된 100 mM phosphate buffer에 40 mg의 *G. westfalica* 및 20 mM의 라세믹 styrene oxide 기질을 넣은 후 30℃, 250 rpm에서 교반하면서 회분식 입체선택적 가수분해 반응을 수행하였다. Fig. 5에서와 같이 총 5시간 20분 정도의 반응을 통해 *ee* 값이 100%인 광학적으로 순수한 (*S*)-styrene oxide를 이론수율 대비 36.5%의 수율로 얻을 수 있었다.

생물정보학을 이용하여 게놈 또는 megaplasmid 염기서열이 결정되어 있는 미생물들로부터 EH의 특징적인 서열을 검색함으로써 putative EH를 탐색할 수 있었다. 그 결과들을 바탕으로 wild-type에 대한 EH 활성 측정을 통해 EH 활성이 있는 신규 미생물을 선별할 수 있었다. 본 연구를 통해 *G. westfalica*를 포함하여 actinomycetes들도 EH 활성을 가지고 있음을 실험적으로 증명할 수 있었으며, 다양한 대사특성을 가지고 있는 actinomycetes 계열의 *G. westfalica* EH에 대한 단백질수준에서의 특성 분석 및 활성 평가를 위하여 향후에 EH 유전자를 클로닝 및 발현 특성 분석을 진행할 예정이다. Wild-type 균주 자체를 biocatalyst로 이용하는 경우 전체 단백질 대비 EH 발현양이 적어 광학활성 에폭사이드 생산성 향상에 제한이 있으므로, EH 유전자를 도입한 재조합 생촉매 개발을 통해 보다 더 효율적인 광

학활성 에폭사이드 제조를 위한 생촉매 개발이 가능할 것으로 기대할 수 있다.

요 약

EH의 catalytic nucleophile residue, His-Asp로 구성된 charge relay system, oxyanion hole 등의 EH 관련 conserved domain의 아미노산 공통 서열을 참고로 하여 *G. westfalica* megaplasmid로부터 putative EH를 선별할 수 있었다. Bioinformatics를 기반으로 스크리닝한 *G. westfalica*에 의한 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 입체선택성 가수분해 반응에 있어 중요 반응 parameter들인, pH 및 온도 등이 초기 가수분해반응속도에 미치는 영향을 분석하고, 최적 회분식 반응조건을 결정하였다. 최적 반응조건인 pH 7, 반응온도 30℃, 생촉매량 40 mg의 조건에서 약 5시간 20분간 반응을 통해 20 mM 라세믹 기질로부터 광학순도 100% *ee* 인 (*S*)-styrene oxide를 36.5%의 수율로 얻을 수 있었다.

감 사

이 논문은 정부 (교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지역대학우수과학자지원사업 (R05-2004-000-11124-0) 연구비지원을 받아 수행된 연구임을 감사드립니다. 연구를 도와준 박규덕, 김정애, 김재민 연구보조원에게도 감사드립니다.

REFERENCES

1. Sheldon, R. A. (1993), Chirotechnology, Marcel Dekker, New York.
2. Besse, P. and H. Veschambre (1994), Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
3. Archelas A. and R. Furstoss (2001), Synthetic applications of epoxide hydrolases, *Current Opinion in Chem. Biology* **5**, 112-119.
4. Steinreiber, A. and K. Faber (2001), Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations, *Current Opinion in Biotechnol.* **12**, 552-558.
5. Weijers, C. A. G. M., and J. A. M. de Bont (1999), Epoxide hydrolases from yeasts and other sources: versatile tools in biocatalysis, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **6**, 199-214.
6. Lee, E. Y. (2002), Epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution for the production of chiral epoxides, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 321-325.
7. de Vries, E. J. and D. B. Janssen (2003), Biocatalytic conversion of epoxides, *Current Opinion Biotechnol.* **14**, 1-7.
8. 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.
9. Hellström, H., A. Steinreiber, S. F. Mayer, and K. Faber (2001), Bacterial epoxide hydrolase-catalyzed resolution of a 2,2-disubstituted oxirane: optimization and upscaling, *Biotechnol. Letters* **23**, 169-173.
10. Hernandez-Perez, G., F. Fayolle, and J. P. Vandecasteele (2001), Biodegradation of ethyl t-butyl ether, methyl t-butyl ether and t-amyl methyl ether by *Gordonia terrae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 117-121.
11. Bröker, D., M. Arenskotter, A. Legatzki, D. H. Nies, and A. Steinbüchel (2004), Characterization of the 101-kilobase-pair megaplasmid pKB1, isolated from the rubber-degrading bacterium *Gordonia westfalica* Kb1, *J. Bacteriol.* **186**, 212-225.
12. Arand, M., D. F. Grant, J. K. Beetham, T. Friedberg, F. Oesch, and B. D. Hammock (1994), Sequence similarity of mammalian epoxide hydrolases to the bacterial haloalkane dehalogenase and other related proteins. Implication for the potential catalytic mechanism of enzymatic epoxide hydrolysis, *FEBS Lett.* **338**, 251-256.
13. Lewis, D. F. V., B. G. Lake, and M. G. Bird (2005), Molecular modeling of human microsomal epoxide hydrolase (EH) by homology with a fungal (*Aspergillus niger*) EH crystal structure of 1.8 Å resolution: structure-activity relationships in epoxide inhibiting EH activity, *Toxicology in Vitro* **19**, 517-522.
14. Schwede, T., J. Kopp, N. Guex; and M. C. Peitsch (2003), SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server, *Nucleic Acids Research* **31**, 3381-3385.