

미생물 세포 기반의 에폭사이드 가수분해효소 활성 측정을 위한 분광학적 분석법 최적화

김희숙 · 이은열*

경성대학교 식품공학과

Received January 24, 2005 / Accepted February 4, 2005

Optimization of Microbial Cell-Based Spectrometric Assay for the Analysis of Epoxide Hydrolase Activity. Hee Sook Kim and Eun Yeol Lee*. *Department of Food Science & Technology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea* – Microbial cell-based UV spectrometric assay for the quantitative measurement of epoxide hydrolase activity was evaluated and optimized for the efficient screening of whole cell activity of novel epoxide hydrolase. Epoxide hydrolase activity was determined by measuring the increase of the oxidized product, benzaldehyde. The effects of the concentrations of phenyl-1,2-ethanediol, sodium metaperiodate and cells were optimized for epoxide hydrolase-catalyzed hydrolysis of styrene oxide. The relevant kinetic parameters of K_m and V_{max} for the hydrolysis of (*R*)-styrene oxide by *Rhodotorula glutinis* were determined from Lineweaver-Burk plot as 41.2 nmol/min · mg dcw and 7.5 mM respectively, and coincided well with those from GC analysis.

Key words – epoxide hydrolase, *Rhodotorula glutinis*, styrene oxide, screening

라세믹혼합물에 대한 입체선택적 가수분해 활성 차이를 이용하여 순수한 광학이성질체를 제조하는 비대칭 분할(asymmetric resolution) 방법은 저가의 라세믹 기질로부터 고부가가치의 광학활성 물질을 제조할 수 있는 상업적으로 유용한 기술이다[7]. 기존의 고가 키랄 화학촉매를 활용한 비대칭 분할기술에 비해 바이오촉매는 저렴한 비용으로 제조 가능하므로 가격 경쟁력 확보를 기대할 수 있다[1,4].

광학활성 에폭사이드 중간체는 반응성이 우수하여 다양한 반응을 통해 최종 광학활성 의약품을 합성할 수 있다[2,3]. 라세믹 에폭사이드 기질로부터 epoxide hydrolase (EH) 바이오촉매를 사용하여 특정 이성질체만을 diol로 분해시킴으로써 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있으며, cofactor 재순환이 요구되지 않고, whole-cell biocatalyst로 사용할 수 있으며, 안정된 구조를 가지고 있어 상업적 유용성이 높은 바이오촉매로 평가되고 있다. 또한, 반응 부산물인 광학활성 diol 자체도 매우 유용한 고부가가치 합성 중간체라는 부가적인 장점이 있어 다양한 기질특이성을 가진 epoxide hydrolase 바이오촉매 개발은 의미가 있다.

기존에는 라세믹 에폭사이드 기질로부터 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있는 epoxide hydrolase 활성 분석을 위하여 수용액 반응액에 있는 에폭사이드 기질을 유기용매로 추출한 다음 반응수율 및 광학순도를 chiral gas chromatography 또는 HPLC를 이용하여 분석하였다[8,9,11]. 이 방법은 광학순도 및 생성물의 chirality를 정확하게 분석할 수 있다는 장점이 있지만, 대용량의 library로부터 효율적으로 epoxide hydrolase 활성을 검색하기에는 적합하지 못한 방법이

다. 상업적 특성이 우수한 epoxide hydrolase를 효율적으로 얻기 위해서는 기존의 GC, HPLC 분석법 보다 편리한 활성 측정법 개발이 필요하다. GC 및 HPLC를 이용한 epoxide hydrolase 활성 검색의 비효율성을 극복하기 위하여 다양한 colorimetric assay를 이용한 spectrometric assay 방법이 제시되었다[5,10]. 이들 방법에서는 epoxide hydrolase를 분리 정제하거나, 적어도 crude extract 수준의 효소촉매를 제조하여 epoxide hydrolase 활성을 검색하였다. 이러한 접근 방법 역시 효소 제조 과정에서의 비효율성 등으로 인하여 대용량 · 고효율 활성 검색법으로는 적합하지 못하다. 특히, colorimetric assay의 경우 정확성이 떨어지거나, 낮은 기질 전환율에서는 재현성이 문제가 될 정도로 assay 방법이 최적화되지 못하였다. 본 논문에서는 효소 분리 과정의 불편함을 제거하기 위하여 cell-based spectrometric assay를 개발하고, 최적화하고자 하였다. 미생물 세포를 생촉매로 사용하고, epoxide hydrolase 활성에 의해 styrene oxide로부터 가수분해된 phenyl-1,2-ethanediol의 양을 NaIO_4 를 이용하여 benzaldehyde로 산화시킨 다음 흡광도 측정을 통해 정량화하였다. 이러한 방법을 이용하여 다양한 농도에서 *Rhododorus glutinis*를 세포 생촉매로 사용한 에폭사이드 가수분해반응 동력학을 평가해봄으로써 세포 기반의 신규 epoxide hydrolase 활성 검색을 위한 screening 방법으로써의 가능성을 평가하고자 하였다.

실험재료 및 방법

미생물 균주 및 배양 조건

Rhodotorula glutinis 균주는 0.5%(w/v) yeast extract, 1%(w/v) peptone, 1%(w/v) sodium chloride가 포함된 배지에

*Corresponding author

Tel : +82-51-620-4716, Fax : +82-51-622-4986

E-mail : eylee@ks.ac.kr

접종한 후 진탕 배양기를 이용하여 교반속도 250 rpm, 온도 30°C에서 2일간 배양하였다[11]. 배양액을 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 증류수로 세척하여 생축매로 사용하였다[9].

Epoxide 분해 반응조건과 UV 분석 방법

Epoxide hydrolase 활성을 측정하기 위한 epoxide 기질에 대한 가수분해 반응, NaIO₄를 이용한 phenyl-1,2-ethanediol의 산화반응 및 자외선 분광기를 이용한 분석은 다음과 같이 실시하였다. 우선, 미생물 세포(10 mg/ml)와 반응액의 10% (v/v)에 해당하는 200 μl의 dimethylformamide (DMF)를 첨가한 1,800 μl의 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 정해진 농도의 epoxide를 첨가하고 전체 반응 부피를 1,920 μl로 한 다음, 진탕배양기를 이용하여 교반속도 250 rpm, 온도 30°C에서 15분간 반응시켰다. 위의 반응액에 80 μl의 sodium metaperiodate 용액(stock solution: 100 mM NaIO₄ in DMF)을 첨가하고 약 2분간 vortexing함으로써 반응액내 생성된 diol과의 산화반응을 실시하였다. 반응액내 현탁되어 있는 세포는 원심분리하여 제거시키고, 상등액을 취한 후 희석하여 280 nm에서 흡광도를 측정함으로써 epoxide 분해 활성을 분석하였다.

GC 분석

Epoxide hydrolase 활성에 의하여 분해되는 epoxide와 생성되는 diol의 일치성을 비교, 평가하기 위하여 sodium metaperiodate (NaIO₄)를 첨가하기 전 반응액을 취하여 cyclohexane으로 남은 epoxide를 추출한 후 유기용매층을 GC로 분석하였다[6,8]. 검출기로는 FID를, 분석용 column으로는 silica cyclodextrine capillary β-DEX 120(30 m length, 0.25 mm ID, and 0.25 μm film thickness; Supelco, USA)을 사용하였다. 이동가스로 질소를 사용하였으며 column, injector, 그리고 detector의 온도는 각각 100, 220, 220°C였다.

결과 및 고찰

자외선 분광기를 이용한 epoxide hydrolase 활성 측정

Epoxide hydrolase를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조 관련 상업화 연구에서 선행되어야 할 일이 보다 효율적으로 다양한 기질 특이성을 가진 신규 epoxide hydrolase를 선별할 수 있는 효율적인 epoxide hydrolase 활성 평가법을 개발하는 일이다. 일반적으로 사용되는 GC 및 HPLC 분석법은 정교한 분석기술과 긴 분석시간이 요구되는 반면, 자외선 분광기와 같은 광학적 분석방법은 샘플 다루기가 쉬우며, 짧은 분석시간이 요구되므로 대용량 탐색에 보다 적합한 활성 평가방법이다. 자외선 분광기를 이용한 epoxide hydrolase의 활성을 측정하는 기본원리가 Fig. 1에 제시되어 있다. Epoxide hydrolase 활성의 검색 기질로는 aromatic epoxide인 styrene

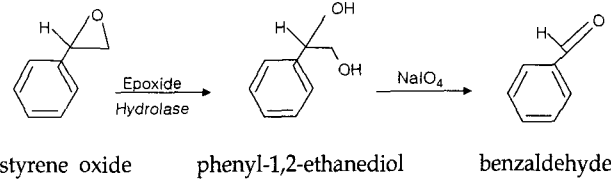


Fig. 1. Principle of UV spectrometric determination of epoxide hydrolase activity.

oxide를 사용할 수 있으며, 두 단계 반응을 거쳐 생성되는 benzaldehyde에 의한 280 nm에서의 흡광도 증가를 측정함으로써 손쉽게 활성을 측정할 수 있다. 첫 단계에서는 기질인 styrene oxide가 epoxide hydrolase에 의해 가수분해되어 phenyl-1,2-ethanediol이 형성되고, 두번째 단계에서는 앞서 형성된 diol과 sodium metaperiodate의 화학적 산화반응에 의하여 benzaldehyde로 전환되며, 최종 산물인 benzaldehyde는 280 nm에서의 흡광도가 우수하기 때문에($\epsilon=1356 M^{-1} cm^{-1}$), 높은 민감도와 정확도로 epoxide hydrolase 활성 측정이 가능하다.

자외선 분광기를 이용한 epoxide hydrolase 활성 분석 연구의 대부분은 분리된 효소를 이용하여 활성을 측정하였다[5,10]. 정제된 효소를 이용하는 경우 효소를 분리하는데 드는 비용이 많아 경제적이지 못하며, 여러 미생물 균주를 다루는 경우 효소 분리정제에 많은 시간이 소요되며, 분리된 효소는 분석 조건에 따라 경우에 따라서는 활성 자체가 심하게 저하될 수 있다는 단점이 있어 신규 epoxide hydrolase 생축매 선별을 위한 탐색방법으로는 적합하지 못하다. 본 연구에서는 미생물 whole cell을 기반으로 자외선 분광기를 이용한 epoxide hydrolase 활성 측정을 위하여 반응조건이 미치는 영향을 분석하고, 분석조건을 최적화하였다. 우선, epoxide hydrolase에 의해 diol이 생성됨과 동시에 NaIO₄에 의해 benzaldehyde로 산화시킴으로써, 두 단계 반응을 한 단계로 줄일 수 있는지를 알아보기 위하여 세포 생축매와 NaIO₄를 함께 넣어 반응을 수행하였다. 효소를 생축매로 사용하는 경우에는 NaIO₄첨가에 의해 활성 저해가 심하게 일어나므로 산화반응을 가수분해 반응과 분리시킨 것인데, 세포 생축매의 경우에서도 NaIO₄에 의한 활성 저해 현상이 관찰되어 두 단계 반응을 분리 수행하기로 하였다(data not shown).

반응조건 분석 및 최적화

먼저 세포 생축매에 의한 epoxide 가수분해반응을 통해 생성되는 diol의 농도에 따라 benzaldehyde로의 산화반응에 요구되는 NaIO₄ 농도를 결정하기 위하여, 세포 생축매가 없는 상태에서 10mM sodium phosphate buffer에 있는 다양한 농도의 phenyl-1,2-ethanediol에 대하여 NaIO₄의 농도를 달리하여 산화반응을 진행한 다음 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fig. 2에서와 같이 2 mM에서 8 mM의 NaIO₄ 농도

범위에서 다양한 농도의 diol에 대하여 산화 반응을 진행한 다음 흡광도를 측정 한 결과, diol 산화에 필요한 NaIO_4 농도 비가 비례적임을 알 수 있었다. Diol의 농도가 증가할수록 비례적으로 흡광도도 증가하는 것을 확인하였고, 흡광도(A)와 diol (D)의 농도 관계식을 결정할 수 있었다($D=1.04A-0.11$). 따라서, epoxide로부터 생성되는 diol의 산화물에 의한 흡광도 변화를 측정함으로써 epoxide hydrolase 활성을 분석할 수 있음을 알 수 있었다. 반응액에 세포 생축매가 있는 경우 정확한 흡광도 측정을 위해 흡광도 측정전에 원심분리를 하여 세포를 제거하는 경우 benzaldehyde가 세포에 흡착되어 제거된다면 흡광도 측정에서 오차가 발생할 수 있다. 이와 같은 오차가 발생하는지를 알아보기 위하여 같은 조건에서 세포를 넣은 다음 산화반응을 시킨 후 세포를 제거하고 280 nm에서 흡광도를 측정 한 결과 세포 없이 수행한 실험과 같은 결과를 얻었으며 세포 사용이 흡광도 측정에 있어서 문제가 되지 않음도 확인하였다(Fig. 2).

NaIO_4 , styrene oxide 및 phenyl-1,2-ethanediol의 반응액상에서의 용해도 향상을 위해 첨가하는 DMF 또는 dimethyl-sulfoxide (DMSO)의 경우, 일정 농도 이상 첨가하면 세포 생축매의 epoxide hydrolase 활성을 저하시킬 수 있다[3,10]. 기존의 연구 결과에 의하면 20%(v/v) 이상을 사용하는 경우 26% 이상의 세포 생축매 활성 저하 현상을 보인다고 하였으며[8], 2~10%(v/v)를 사용한 본 실험의 경우에는 세포 생축매의 epoxide hydrolase 활성에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다(data not shown). 또한 세포 생축매가 없는 경우에서나 *R. glutinis* 세포 생축매를 사용하는 경우에서 모두 10%(v/v) DMF를 첨가해주어도 같은 흡광도 변화를 보여주었다. 따라서, 수용액에 잘 녹지 않는 styrene oxide의 용해도를 향상시키기 위하여 DMF 첨가함으로써, styrene oxide의 수용액상의 용해도인 6 mM 이상의 고농도의 epoxide 기질에서도 미생물 세포 유래의 epoxide hydrolase 활성 측정이 가능함을 알 수 있었다.

4 mM 및 6 mM의 phenyl-1,2-ethanediol이 있는 반응액에 같은 양의 sodium metaperiodate를 첨가하고 산화반응에 필요한 반응시간을 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 diol의 농도에 관계없이 40초 이후에는 흡광도 변화가 포화됨을 알 수 있어, diol의 완전한 산화를 위한 sodium metaperiodate와의 반응 시간을 1분으로 결정하였다. 또한, 에폭사이드 가수분해 반응에 사용하는 세포 생축매의 농도에 따른 흡광도 변화를 살펴보았다(Fig. 4). 2.5에서 25(mg/ml) 농도로 *R. glutinis* 세포 생축매의 농도를 변화시키면서 10 mM styrene oxide에 대하여 초기 10분간 변화된 흡광도를 측정 한 결과, 세포 농도 증가에 따라 생성되는 diol의 농도가 증가되므로 흡광도 역시 증가됨을 알 수 있다. 2.5 mg/ml의 세포 농도에서도 비교적 쉽게 흡광도 변화량을 인식할 수 있는 범위인 0.5 이상을 얻을 수 있어 세포 기반의 epoxide hydrolase 활성 측정에 효과적으로 응용할 수 있음을 알 수 있었다.

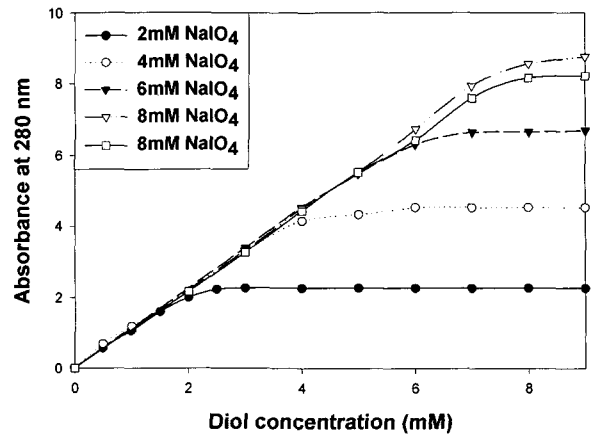


Fig. 2. Effect of the concentrations of sodium metaperiodate at various diol concentrations on the absorbance at 280 nm. Symbols represent the absorbance in the removing of cell biocatalysts by centrifugation (-●-, -○-, -▼-, -▽-) and in the presence of cell biocatalysts (-□-) after reaction.

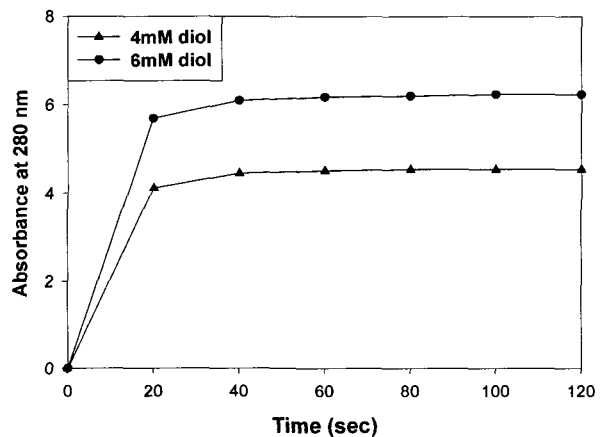


Fig. 3. Time course of the oxidation of phenyl-1,2-ethanediol to benzaldehyde by sodium metaperiodate at different diol concentrations.

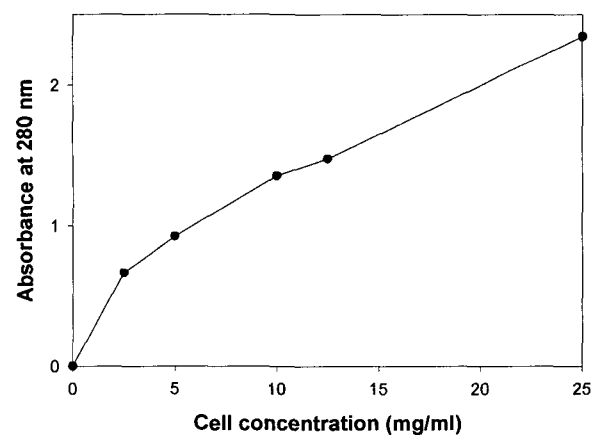


Fig. 4. Effect of cell biocatalyst concentration on the absorbance at 280 nm.

미생물 세포 기반의 자외선 분광기를 이용한 epoxide hydrolase 활성 측정법 평가 및 이를 이용한 에폭사이드 가수분해 동력학 분석

자외선 분광기를 이용하여 미생물 세포의 epoxide hydrolase 활성 측정 결과들이 GC를 이용하여 분석한 결과와 일치성이 있는지를 평가하였다. 30 mM styrene oxide에 대한 *R. glutinis* 생축매의 가수분해 반응을 실시하면서, 반응기간 동안 분해되고 남은 styrene oxide의 농도는 GC를 이용하여 측정하였고, 생성되는 diol은 본 연구에서 얻은 자외선 분광기를 이용한 분석조건에서 측정하였다. Fig. 5에서와 같이 반응 시간에 따라 분해되고 남은 styrene oxide의 양과 생성되는 diol의 양이 서로 보완적인 모습을 보여주었다. 따라서, GC 분석 결과와 자외선 분광기를 이용하여 측정된 결과가 일치함을 알 수 있고, 자외선 분광기를 이용하여 보다 쉽게 미생물 세포 기반의 epoxide hydrolase 활성 측정이 가능함을 알 수 있다.

본 연구에서 개발된 epoxide hydrolase 활성 측정법을 이용하여 *R. glutinis* 세포 생축매에 의한 styrene oxide의 가수분해 반응에 대한 반응 동력학을 분석하고 관련 매개변수를 계산하였다. Epoxide hydrolase에 의한 (*R*)-styrene oxide의 가수분해 반응을 설명하는 속도방정식으로 Michaelis-Menten 식을 적용하였다. Fig. 6에서와 같이 다양한 styrene oxide 농도에서 초기 5분간의 분해 속도를 측정하였고, Lineweaver-Burk plot을 이용하여 기울기 및 y절편으로부터 V_{max} 과 K_m 을 각각 구하였다. (*R*)-styrene oxide에 대한 V_{max} 과 K_m 은 각각 41.2 nmol/min · mg dcw, 7.5 mM로 결정할 수 있었으며 이러한 결과는 기존의 GC 분석법을 이용하여 얻은 결과와 비슷하였으므로 자외선 분광기를 이용한 분석법이 미생물 세포 유래의 epoxide hydrolase 활성을 정확하게 분석하는데 유용함을 알 수 있다[8]. 수십분 이상의 분석시간이 요구되고 유기용매 추출 등의 시료 처리과정도 요구되는 GC, HPLC 등을 사용하는 비효율적인 분석방법에 비해 본 연구에서 최적화시킨 미생물 세포 기반의 자외선 분광기를 이용한 epoxide hydrolase 활성 측정법을 통하여 보다 효율적으로 활성을 측정할 수 있으며, 직접 미생물 세포에 적용할 수 있으므로 미생물 pool로부터 신규 epoxide hydrolase 특성을 가진 미생물 생축매 선별에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

다양한 라세믹 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 촉매하는 epoxide hydrolase 활성을 측정할 수 있는 미생물 세포 기반의 자외선 분광 분석법을 최적화하였다. 2.5 mg/ml의 세포 농도에서도 비교적 쉽게 흡광도 변화량을 인식할 수 있는 흡광도 범위인 0.5 이상을 얻을 수 있고, 반응 동력학 분석에도 응용할 수 있었다. 기존의 GC, HPLC 분석법 보다 분석시간을 줄일 수 있으며, 효소를 별도

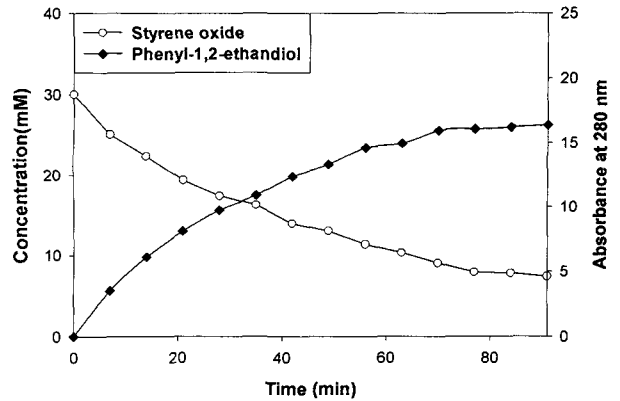


Fig. 5. Hydrolysis of 30 mM styrene oxide and formation of diol by epoxide hydrolase activity of *R. glutinis*. Time course of the hydrolysis of styrene oxide was measured by GC analysis and the formation of phenyl-1,2-ethandiol was measured by UV spectrometer as described in the text.

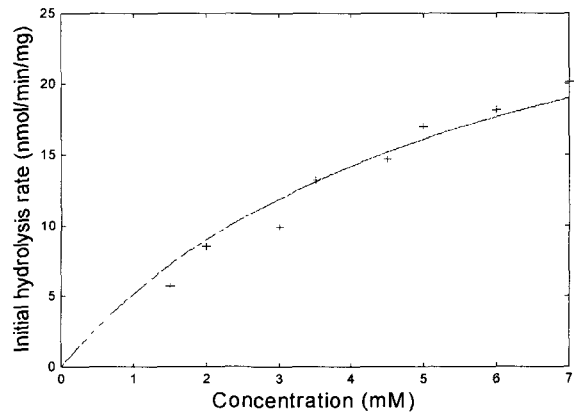


Fig. 6. Kinetics of the hydrolysis of (*R*)-styrene oxide by epoxide hydrolase activity of *R. glutinis*. The saturation curve is the simulated curve using the GC-analyzed Michaelis-Menten kinetics, and experimental data were from UV spectrometric analysis of Michaelis-Menten kinetics.

로 분리·정제하지 않고 미생물 세포 자체의 epoxide hydrolase 활성 분석이 가능하므로 상업적 특성이 우수한 epoxide hydrolase을 가진 미생물을 효율적으로 선별하는데 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

This work was supported by the Marine and Extreme Genome Research Center Program, Ministry of Marine Affairs and Fisheries, Republic of Korea. 연구를 도와준 연구보조원 이수정, 이은정에게 감사드리며, BB21 장학금을 수혜 받았음을 감사드립니다.

Reference

1. Besse, P. and H. Veschambre. 1994. Chemical and biological synthesis of chiral epoxides. *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
2. 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. Tech.* **12**, 225-228.
3. 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.
4. de Vries, E. J. and D. B. Janssen. 2003. Biocatalytic conversion of epoxides. *Current Opinion Biotechnol.* **14**, 414-420.
5. Doderer, K., S. Lutz-Wahl, B. Hauer and R. D. Schmid. 2003. Spectrophotometric assay for epoxide hydrolase activity toward any epoxide. *Anal. Biochem.* **321**, 131-134.
6. Kim, H. S., J. H. Lee, S. Park and E. Y. Lee. 2004. Biocatalytic preparation of chiral epichlorohydrins using recombinant *Pichia pastoris* expressing epoxide hydrolase of *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Biopro. Eng.* **9**, 62-64.
7. Lee, E. Y. 2002. Epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution for the production of chiral epoxides. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 321-325.
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. Lee, J. W., E. J. Lee, S. S. Yoo, S. H. Park, H. S. Kim and E. Y. Lee. 2003. Enantioselective hydrolysis of racemic styrene oxide by epoxide hydrolase of *Rhodospiridium kratochvilovae* SYU-08. *Biotechnol. Biopro. Eng.* **8**, 306-308.
10. Mateo, C., A. Archelas and R. Furstoss. 2003. A spectrophotometric assay for measuring and detecting an epoxide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* **314**, 135-141.
11. Weijers, C. A. G. M. 1997. Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*. *Tetrahedron: Asymmetry.* **8**, 639-647.