

분자공학 기반의 광학활성 에폭사이드 제조용 epoxide hydrolase 생촉매 개발

김희숙 · 이은열^{1*}

경성대학교 공과대학 식품공학과, ¹해양·극한생물 분자유전체 연구단

Received October 20, 2005 / Accepted November 22, 2005

Molecular Engineering of Epoxide Hydrolases for Production of Enantiopure Epoxides. Hee Sook Kim, Eun Yeol Lee^{1*}. *Department of Food Science and Technology, Kyungsoong University, Busan 608-736 and ¹Marine and Extreme Genome Research Center, Korea* – Enantiopure epoxides are valuable intermediates for the asymmetric synthesis of enantiopure bioactive compounds. Microbial epoxide hydrolases (EHs) are versatile biocatalysts for the preparation of enantiopure epoxides by enantioselective hydrolysis of cheap and easily available racemic epoxide substrates. EHs are commercially potential biocatalysts due to their characteristics such as high enantioselectivity, cofactor-independent catalysis, and easy-to-prepare catalysts. In this paper, recent progresses in molecular engineering of EHs are reviewed to evaluate the commercial feasibility of EH-catalyzed hydrolytic kinetic resolution for the production of enantiopure epoxides.

Key words – Enantiopure epoxide, enantioselective hydrolysis, enantioselectivity, epoxide hydrolase, kinetic resolution

에폭사이드는 oxirane ring의 불안정성 및 산소 원자의 전 기음성도에 기인한 극성 때문에 반응성이 대단히 우수하여 친전자성반응, 친핵성반응, 산·염기반응, 산화·환원반응 등 다양한 반응을 유도할 수 있다. 이러한 다양한 반응성과 함께 광학 성질을 가지는 광학활성 에폭사이드(chiral epoxide)는 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용되는 고부가가치 광학활성 중간체이다[23].

라세믹혼합물에 대한 효소의 입체선택적 가수분해 활성 차이를 이용하여 순수한 광학이성질체를 제조하는 입체선택적 분할(enantioselective resolution) 방법은 저가의 라세믹 기질로부터 고부가가치의 광학활성 물질을 제조할 수 있는 상업적으로 유용한 기술이다[8,9,23]. 사용하는 생촉매가 저렴하기 때문에 고가의 키랄 화학촉매를 활용하는 화학분할 기술에 비해 가격 경쟁력 확보도 가능하다. 광학활성 에폭사이드는 라세믹 에폭사이드 기질로부터 epoxide hydrolase (EH) 생촉매를 사용하여 입체선택적 분할을 통해 제조할 수 있으며, EH 생촉매는 cofactor 재순환이 요구되지 않고, whole-cell biocatalyst로 사용할 수 있으며, 안정된 구조를 가지고 있어 상업적 유용성이 높은 생촉매로 평가되고 있다. 또한, 반응 부산물인 광학활성 vicinal diol도 매우 유용한 고부가가치 합성 중간체라는 부가적인 장점이 있어 상업화를 위한 고기능성 EH 생촉매 개발이 활발하게 진행되고 있다. 본 논문에서는 고기능성 EH 생촉매 개발 관련 분자공학 연구 동향을 분석·평가함으로써 향후 발전 방향을 모색하고자 하였다.

본 론

EH 생촉매 구조 특성

EH에 대한 초기 연구들에서는 주로 인간 및 동물 간의 cytosol에 존재하는 EH에 의하여 독성 물질들이 어떤 식으로 분해 제거되는지에 대하여 주로 진행되었으며, 미생물 유래의 EH에 대한 연구가 진행됨에 따라 생촉매로서의 EH에 대한 연구가 시작되었다. 동물 유래의 EH는 xenobiotics의 비독성화 대사과정에서 중요한 역할을 수행하고, 식물 유래의 EH는 산화적 스트레스로부터 방어하는 기작에서 중요한 역할을 수행한다. 곤충 애벌레에서는 juvenile 호르몬 조절과정에서 애벌레 호르몬을 가수분해하는 역할을 수행하며, 미생물 유래의 EH는 이화대사작용에서 주된 역할을 수행한다[8,15]. 따라서, 동식물 유래의 EH는 기질 특이성이 제한적일 수도 있으나, 다양한 종의 미생물에 존재하는 여러 종류의 EH는 다양한 기질 특이성을 가지며 입체선택성이 높고 가수분해 속도도 높으며 많은 양의 EH를 간편하게 얻을 수 있으므로 광학활성 에폭사이드 제조용 생촉매로서의 산업적 응용가능성이 높다.

최근에 X-ray 결정화 구조 분석 방법을 이용하여 *Aspergillus niger* LCP521 유래의 EH와 *Agrobacterium radiobacter* AD1 유래의 EH에 대한 3차원 결정구조 분석 결과가 보고되었다[3,17]. 다양한 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해능을 가진 *A. niger* 유래의 EH를 중심으로 살펴보면, multi-wavelength anomalous dispersion (MAD) 방법을 기반으로 3.5 Å resolution 수준에서 구조를 분석한 결과 *A. niger* EH는 44 kDa의 동일한 subunit로 구성된 dimer 형태로 존재함이 밝혀졌다[28]. 각각의 EH subunit는 촉매 활성점을 가진

*Corresponding author

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

E-mail : eylee@ks.ac.kr

core α/β domain, 이러한 domain으로부터 돌출되어 있는 lid 영역과 N-terminal meander 등 세부부분으로 구성되어 있다. 이 중에서 subunit의 소수성이 높은 N-terminal meander의 시작과 끝 부위에서, 그리고 lid 영역의 소수성이 높은 부위에서 소수성 상호작용을 통해 dimer를 형성한다. 촉매 활성점은 Asp192, Asp348과 His374 등이 catalytic triad를 이루면서 활성점을 구성하고 있는 것으로 밝혀졌다(Fig. 1). 촉매 활성점 부위의 아미노산 서열을 살펴보면, 다른 종류의 α/β -fold hydrolase처럼 sm-x-nu-sm-sm motif (sm, small residue; x, any residue; nu, catalytic nucleophile)로 구성되어 있어 catalytic nucleophile인 Asp가 보다 효율적으로 작용할 수 있는 공간을 형성하고 있다. 또한, 촉매 활성점 공간에 대한 3차 구조 분석 결과, *A. niger*의 EH는 mono-substituted oxirane 기질의(R)-이성질체에 대해 입체선택적 가수분해능이 우수하며 에폭사이드 링의 less-hindered 탄소부위로 친핵성 공격을 하여 가수분해시키는 것으로 분석되었다[28].

EH는 α/β hydrolase fold family에서 epoxide hydrolase protein으로 분류되어 있다[22]. *A. niger* EH의 생물정보학적 분석 결과를 살펴보면, 대부분의 가수분해효소에 공통으로 보존되는 nucleophile motif sequence인 sm-x-nu-x-sm-sm (sm: small aa, x: any aa, nu: nucleophile)은 GGDIGS로 유지되어 있으며, 그 중 192위치의 aspartic acid(D)가 nucleophile(Nu)로 작용하며 348위치의 acidic amino acid인 aspartic acid와, 374위치의 histidine이 catalytic triad로서 작용하고 있다(Fig. 2). 또한 epoxide를 diol로 만들기 위하여 필요한 oxyanion hole은 HGXP motif sequence로 구성되어 있다. Catalytic triad 중 348위치의 aspartic acid가 glutamic acid로 치환되어 있는 경우도 많은데, *A. radiobacter*, *S. aurantiaca*, *C. crescentus* 등 미생물의 EH, 식물의 soluble EH(sEH)들이나 동물의 sEH는 aspartic acid를 가지고 있고, *C. acetobutylicum*, *M. smegmatis* 등 미생물의 EH, *X. dendrohus*의 EH, *D. melanogaster*의 JHEH1 및 동물의 mEH들은 glutamic acid를 가지고 있다[19]. 이러한 catalytic domain

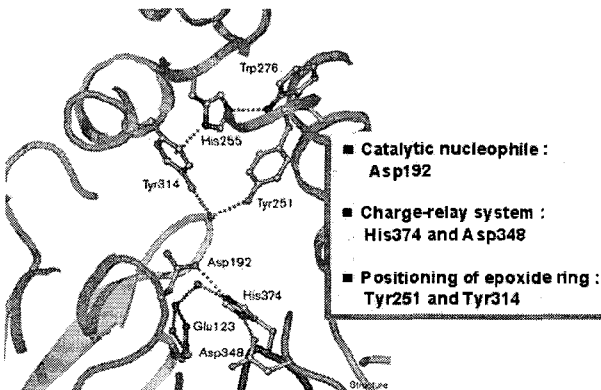


Fig. 1. Catalytic active site of *A. niger* epoxide hydrolase [28].

에 보존된 아미노산들을 치환하여 단백질의 입체구조 및 기질특이성 등을 비교하고 연구함으로써 활성과 기질특이성이 높은 EH 단백질을 개발하는데 좋은 정보를 얻을 수 있을 것이다.

A. niger EH에 의해 4-nitrostyrene oxide의 입체선택적 가수분해 반응 기작을 살펴보면, 우선 기질의 에폭사이드 링이 효소 활성점에 존재하고 있는 두 개의 tyrosine (Tyr251, Tyr314)의 phenolic hydroxyl 기능기와 수소결합을 형성하면서 촉매 활성점 중심부위에 위치하게 된다(Fig. 3). 반응의 첫 번째 단계에서는 nucleophile로 작용할 수 있는 aspartate의 carboxyl기가 에폭사이드 링을 친핵성 공격을 함으로써 에스테르 결합(covalent enzyme-substrate 에스테르 중간체 형성)을 형성하는데, 이 단계가 EH 촉매작용에서의 율속단계로 추정되고 있다. 이 단계에서 두 개의 tyrosine 잔기는 에폭사이드 링과의 수소결합 후 proton donation을 해줌으로써 반응 진행을 촉진시키는 general acid catalyst 역할을 수행한다[26]. 두 번째 단계에서는 물분자가 에스테르 중간체에 대한 가수분해 반응을 진행함으로써 결과적으로 에폭사이드는 반응산물인 diol로 변환된다. 이 때 His374/Asp348 사이의 charge-relay 관계에 의해 물분자에 대해 proton abstraction을 해 줌으로써 가수분해 효율을 높여주게 된다.

최근에 새로운 EH 반응 메카니즘에 대한 연구 결과가 보고되었다. *Rhodococcus erythropolis* DCL14에서 limonene 분해과정에서 발견되는 limonene EH는 기존에 보고된 다른 EH들이 가지는 두 개의 aspartate와 histidine으로 구성된 catalytic triad가 존재하지 않으며, 효소와 기질의 중간체를 형성하지 않고, 촉매 활성점은 Arg99, Asp101, Asp132, Asp101 및 Asp132 등 다섯 개의 아미노산으로 구성되어 있다고 하였다[2]. Limonene EH의 반응 메카니즘을 살펴보면, Asp101에 의해 기질이 protonation이 되고 물 분자가 직접 에폭사이드 링에 친핵성반응을 진행하면서 물 분자의 수소는 Asp132에 의해 제거됨으로써 에폭사이드 기질이 가수분해되는 반응 메카니즘이 제시되었다(Fig. 4)[10]. 이 반응 메카니즘을 가진 EH의 경우, 물 분자 이외에도 친핵성반응을 유도할 수 있는 다른 기질을 이용하면 가수분해 반응 이외의 입체선택적 반응을 유도할 수 있으므로 aminoalcohol 등의 새로운 광학활성 중간체 제조 방법을 개발할 수 있을 것이다.

EH 활성 검색을 위한 colorimetric 및 spectrometric assay

EH 활성을 가진 신규 미생물, 단백질공학 및 directed evolution 기술을 이용한 EH 개량에 있어 대규모의 미생물 라이브러리 또는 genomic variant들로부터 보다 효율적으로 EH 활성을 평가할 수 있는 high throughput screening (HTS) 개발이 중요하다. 기존에는 라세믹 에폭사이드 기질로부터 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있는 EH 활성 분석을 위

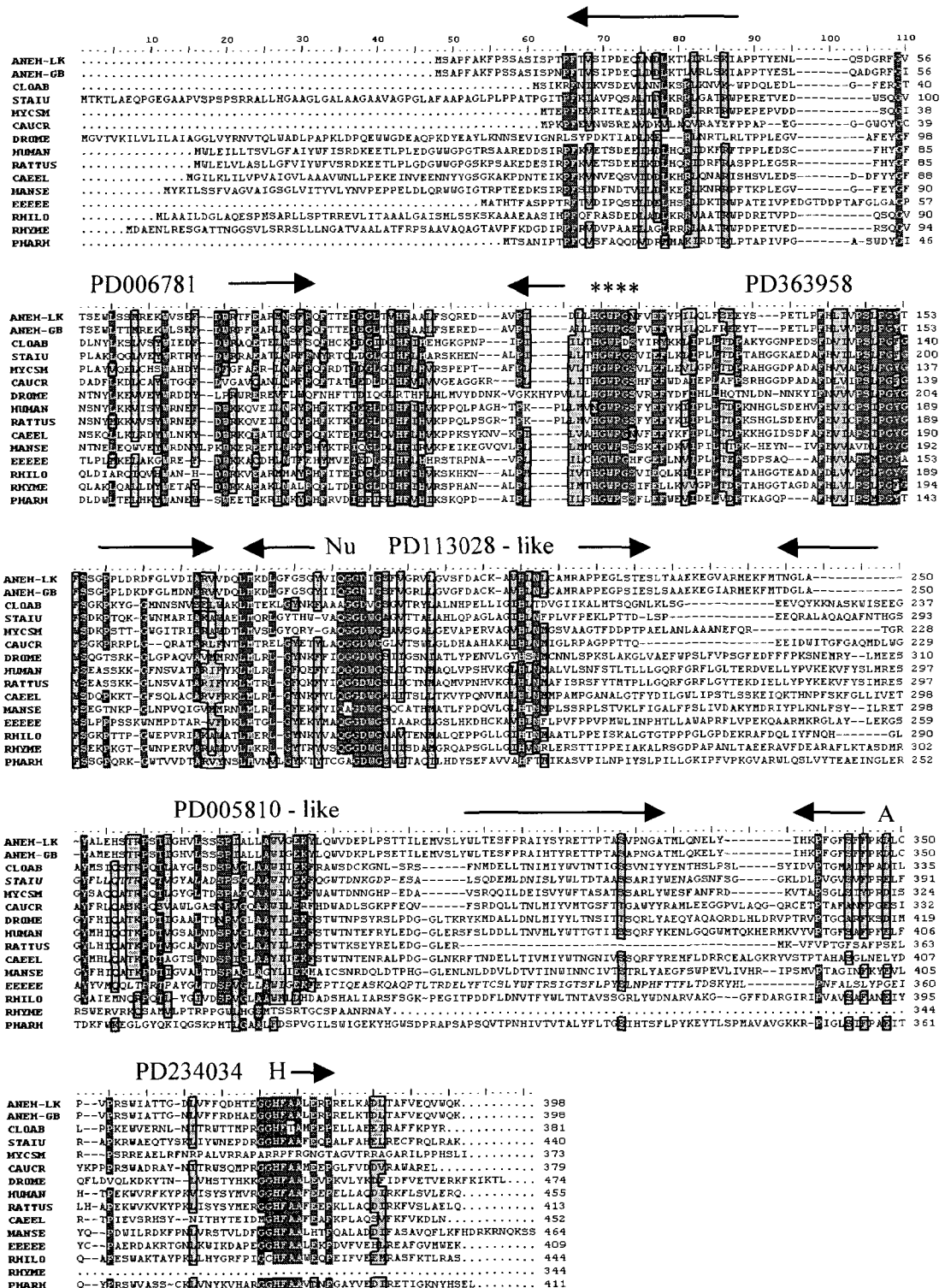


Fig. 2. Comparison of amino acid sequence of epoxide hydrolase protein of *A. niger* LK with those of several organisms extracted from SwissProt/TrEMBL for construction of phylogenetic tree. The results of multiple sequences alignments are displayed in single letter abbreviation after alignment for maximal identity using BioEdit program based on conserved domain search. Conserved domain regions are represented by arrows. The residues that form the catalytic triad are indicated by Nu(nucleophile), A(acidic residue) and H(histidine). The amino sequences corresponding to the HGXP motif are indicated by ****. Conserved amino acid residues are boxed in dark shaded and above 70% consensus amino acid residues are boxed in pale shaded.

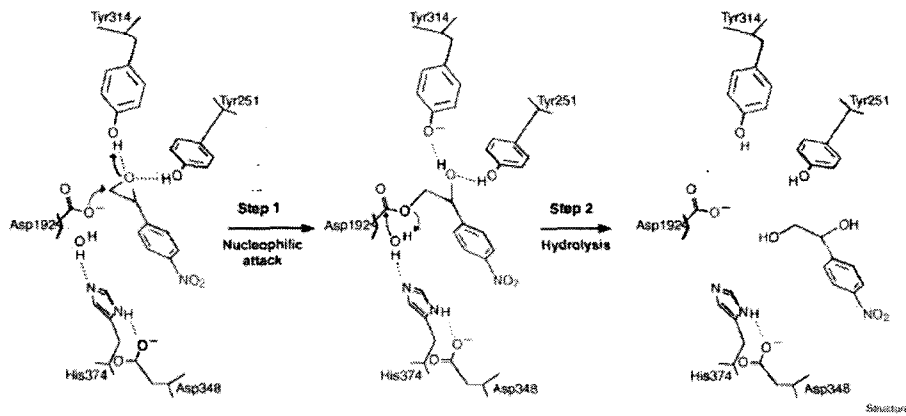


Fig. 3. Reaction mechanism of EH-catalyzed enantioselective hydrolysis by *A. niger* epoxide hydrolase [23].

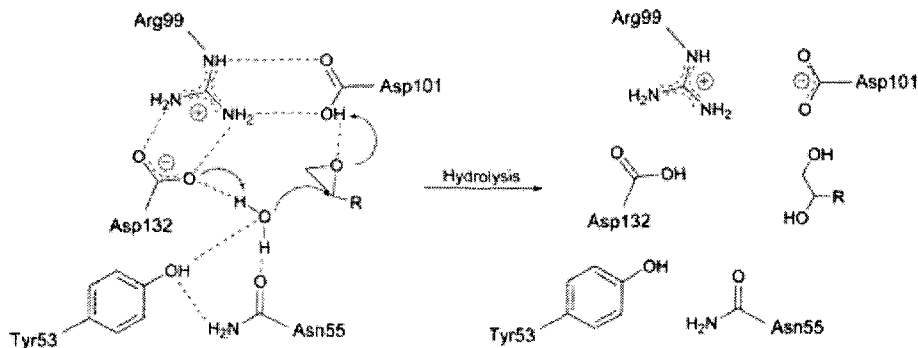


Fig. 4. Proposed reaction mechanism of limonene epoxide hydrolase [2, 10].

하여 수용액 반응액에 있는 에폭사이드 기질을 유기용매로 추출한 다음, 반응수율 및 광학순도를 chiral gas chromatography 또는 HPLC를 이용하여 분석하였다. 이 방법은 광학순도 및 생성물의 chirality를 정확하게 분석할 수 있다는 장점이 있지만, 대용량의 라이브러리로부터 효율적으로 EH 활성을 검색하기에는 적합하지 못한 방법이다.

Chiral GC 및 HPLC를 이용한 EH 활성 검색의 비효율성을 극복하기 위하여 다양한 colorimetric assay 및 chromogenic substrate를 이용한 spectrometric assay 방법이 제시되었다. 이러한 방법에서는 EH를 분리정제하거나, 적어도 crude extract 수준의 효소추출물을 제조하여 EH 활성을 검색하였다. Aromatic terminal epoxide에 대한 활성이 우수한 EH를 검색할 수 있는 HTS 시스템 개발을 위해 chromogenic substrate로 *p*-nitrostyrene oxide 기질을 이용한 cell-based spectrometric assay법을 개발하고 최적화시켰다[5]. 이 방법은 *p*-nitrostyrene oxide ($\epsilon_{310} = 4290/M \cdot cm$)와 *p*-nitrostyrene diol ($\epsilon_{310} = 3300/M \cdot cm$)의 서로 다른 UV extinction coefficient를 이용하는 방법으로 styrene oxide의 vicinal diol로의 전환에 따른 UV 흡광도 변화를 측정함으로써 EH 활성을 손쉽게 평가할 수 있다. 또한, *p*-nitrophenyl glycidyl ether (pNPGE)를 기질로 사용하여 EH 활성을 측정할 수 있

다. 에폭사이드 기질에 대해 alkylation 반응이 가능한 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine을 이용하여 cell-based colorimetric assay를 통해 EH 바이오촉매를 선별할 수 있는 HTS 시스템도 개발되었다[27]. 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine은 반응성이 우수한 epoxide 등에 대해 alkylation 반응을 통해 기질 존재량에 비례하는 색깔을 보여주므로, EH 활성으로 인하여 에폭사이드 기질이 diol로 전환된 경우에서의 색도 저하 정도를 분석하여 EH 활성을 측정할 수 있다. 이 방법에서 예상되는 단점인 기질의 낮은 전환율로 인한 EH 활성 측정 재현성 저하 문제를 극복하기 위하여 반응 조건의 최적화가 반드시 필요하다. EH에 의해 에폭사이드 기질이 diol로 가수분해되면 sodium metaperiodate를 이용하여 반응 산물인 diol을 aldehyde로 변환시켜 UV spectrometer를 이용하여 측정하는 spectrometric assay 방법이 개발되었다[14]. 이 방법을 한 단계 더 진행하여 fluorogenic signal을 줄 수 있는 albumin-catalyzed elimination 반응을 coupling 시킨 HTS 시스템도 개발되었다[4].

유전자 재조합 EH 생촉매 개발

Wild-type의 whole-cell 생촉매를 사용하는 경우 세포내에 발현된 EH 효소량이 근본적으로 적고, 생촉매 제조과정에서

활성 손실이 높아 고효율 생촉매능을 기대하기 어렵기 때문에 수율이 낮았고 반응시간도 지연된 결과들이 보고되었다. *R. glutinis* 등의 wild-type whole-cell 자체를 생촉매로 사용하는 경우, 구성발현 효소인 EH의 전체 단백질 대비 비율이 높지 않아 세포 건조 중량당 활성이 낮아 라세믹 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해 속도 및 수율 향상에 어려움이 있었다. EH 효소를 고순도로 분리, 정제하여 사용하는 경우 고효율의 촉매능을 기대할 수는 있지만, 분리정제 과정에서 비용이 많이 들며, membrane-associated 형태의 EH는 효소 분리과정에서 촉매능 또는 입체선택능 자체를 잃어버리는 경우도 있다.

위에 지적된 문제점을 해결하기 위하여 고효율 유전자재조합 EH 생촉매 개발이 진행되었다. *A. niger*의 EH 유전자를 pYES2 벡터에 삽입시키고, *Saccharomyces cerevisiae*에 형질전환시킨 유전자재조합 생촉매를 개발하여 10 mM 라세믹 styrene oxide을 기질로 하여 24시간 반응시켜(S)-styrene oxide을 제조한 결과가 보고되었다[12]. Aromatic epoxide 기질에 대한 입체선택적 가수분해능이 우수한 *Rhodotorula glutinis* EH 유전자를 효모 발현 vector인 pYD1 vector에 cloning하여 *S. cerevisiae* 균에 형질전환하여 표면발현시키거나, *Pichia* 발현벡터인 pPICZ 벡터에 클로닝하여 *P. pastoris* GS115균에 형질전환시킨 유전자재조합 *Pichia pastoris* 균주도 개발되었다[13,25]. 재조합 *P. pastoris*를 생촉매로 사용하여 50 mM 라세믹 styrene oxide에 대하여 5분 동안 반응시킨 후 chiral GC로 분석한 결과, (R)-styrene oxide가 완전히 분해되고 (S)-styrene oxide만 남아 있어 재조합 생촉매가 우수한 입체선택적 가수분해능을 가지고 있음이 보고되었다[13]. 이러한 유전자재조합 *P. pastoris*의 생촉매 특성을 평가해 본 결과, wild-type *R. glutinis* 대비 약 10 배 정도의 입체선택적 가수분해능이 향상된 고효율 유전자재조합 생촉매로 평가되었다.

EH 단백질 공학

EH의 3차원 구조 및 반응 기작에 대한 연구로부터 얻어진 결과를 응용하여 위치선택적 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 통해 EH의 촉매 활성을 증대시키거나, 기질 선택성을 변화시킨 연구 결과들도 보고되었다. Rat microsomal EH (mEH)의 charge relay system을 구성하는 glutamic acid (Glu404)를 *A. niger* EH에서와 같이 aspartic acid로 변경시킴으로써 V_{max} 를 23 - 39배 증가시킨 결과가 보고되었다[1]. *A. radiobacter* EH의 에폭사이드 링에 대한 proton donation 기능이 있는 두 개의 tyrosine 잔기 모두를 phenylalanine으로 변경한 경우 촉매활성이 저하된 반면에, Tyr215 한 개만을 phenylalanine으로 돌연변이시켜 enantiomeric ratio (E) 값을 2-5배 정도 증가시킨 결과가 보고되었다[19]. 이는 Tyr215가 촉매 활성점내에서 (R)- 및 (S)-이성질체에 대한 chiral

discrimination 역할을 수행하는 것으로 판단되며, Tyr보다 Phe이 보다 우수한 역할을 수행한 것으로 분석할 수 있다. 따라서 특정 EH의 활성점내에 존재하는 chiral discrimination에 중요한 역할을 수행하는 아미노산 잔기를 찾아내어 saturation mutagenesis 방법 등을 통해 보다 우수한 역할을 할 것으로 기대되는 아미노산으로의 변경을 통해 입체선택성을 향상시킬 수 있을 것이다.

최근에는 error-prone PCR 및 DNA shuffling을 이용하여 *A. radiobacter* EH의 기질선택성을 13배 이상 향상시킨 연구 결과가 보고되었다[24]. Agar plate assay 방법을 이용하여 EH 활성을 유지하고 있는 mutant 라이브러리를 일차적으로 선별한 다음, para-nitrophenyl glycidyl ether(pNPGE) 기질의 전환에 대한 spectrophotometric progress curve analysis 방법을 이용하여 향상된 enantioselectivity를 평가하여 우수한 mutant protein을 손쉽게 선별하였다. 이러한 directed evolution 방법을 통해 개발된 EH는 epichlorohydrin, 1,2-epoxyhexane 등의 terminal epoxide 기질에 대하여 향상된 enantioselectivity를 보였다. Oxyanion hole의 구조 변화를 줄 수 있는 돌연변이가 일어난 경우에서도 입체선택성이 향상되는 경우가 많았으며, 기질의 소수성 부위와 상호작용하는 아미노산에 돌연변이가 일어나는 경우 입체선택성이 향상된 결과도 보고되었다. 입체선택성이 증가되는 직접적 이유는 wild-type EH는 두 개의 광학이성질체에 대한 K_m 값이 유사한 반면에 선택성이 향상된 돌연변이 EH는 한 종류의 광학이성질체에 대해서만 K_m 값을 낮추었기 때문이다.

A. niger 유래 EH에 대하여 error-prone polymerase chain reaction (epPCR)을 이용하여 세 개의 아미노산을 변경하였을 때 enantiomeric ratio (E) 값이 4.6에서 10.8로 약 2배 이상 향상되었다[18]. 세 개의 아미노산 중 두 개의 돌연변이는 촉매 활성점과 멀리 떨어져 있는 영역에서 일어났다. 또한, error-prone PCR을 이용하여 random mutagenesis 라이브러리를 구축하고, electron spray ionization-mass spectroscopy (ESI-MS) 분석법을 이용한 HTS로 입체선택성이 향상된 돌연변이 단백질을 선별한 연구 결과도 보고되었다[6]. 기질로 사용한 phenyl glycidyl ether의 (R)-enantiomer에만 deuterium을 labeling하여 (S)-enantiomer의 proton과의 mass 차이를 이용하여, 각각 enantiomer들이 상대적으로 많이 분해되는 정도를 ESI-MS로 분석함으로써 보다 향상된 입체선택성을 가진 돌연변이를 선별하였다.

A. radiobacter EH의 F108, L190, I219, D235 및 C248 등 특정 위치에서의 아미노산 서열에 대한 DNA shuffling 및 saturation mutagenesis 방법을 이용하여 입체선택성과 활성을 높인 연구 결과가 보고되었다[20,21]. I219F 돌연변이의 경우 입체선택성을 5배 정도 향상시킬 수 있었으며, 컴퓨터 모사 결과에 따르면 이러한 돌연변이가 촉매 활성점에서의 기질 결합에 큰 영향을 주었기 때문으로 분석되었다.

결론 및 전망

EH는 키랄화합물들에 비해 높은 촉매 활성 및 turnover number를 가지고 있어 상업적으로 유용성이 높은 생촉매이다. 그러나, EH를 이용한 광학활성 에폭사이드 생산에 있어서, wild-type 균체 자체를 생촉매로 이용하는 경우 전체 단백질 대비 EH가 매우 적은 양으로 존재하고 있어 생산성 향상에 어려움이 있으며, 효소를 분리·정제하여 사용하는 경우 비용 증대의 문제점이 있다. *A. radiobacter* EH의 경우 *E. coli* BL21(DE3) 숙주에서 전체 단백질의 30% 수준까지 효율적으로 발현될 수 있다는 결과가 보고되기는 하였으나, 다양한 에폭사이드 기질에 대한 우수한 입체선택적 가수분해능을 가지고 있는 효모 및 곰팡이, 동·식물 유래의 진핵세포 EH들은 *E. coli* 숙주 시스템에서 고효율로 발현된 결과가 미흡하여 보다 효율적인 진핵세포 EH 발현 시스템 개발이 요구된다.

EH에 대한 3차원 구조 해석을 기반으로 촉매 활성점에 대한 rational design을 통해 촉매 활성도 및 기질 선택성을 증가시키거나 또는 기질 선택성을 변경시킬 수 있을 것으로 기대되며, 이러한 기술 개발은 상업성이 우수한 광학활성 물질을 생산하기 위한 tailor-made 생촉매 제작을 가능하게 할 것이다.

기존의 토양 미생물 유래의 EH를 이용한 광학활성 에폭사이드 생산과 관련된 기존의 선행연구에서 상업적 수요가 높은 광학활성 에폭사이드 제조에 대한 연구는 활발히 진행되지 못했다. 이는 기존에 연구된 많은 EH 바이오촉매의 기질 특이성이 제한적이어서 상업적 수요가 높은 특정 기질에 대한 가수분해 활성이 낮았기 때문이거나, 활성 자체는 높아도 입체선택성이 낮아 상업적 의미가 있는 광학순도 98% ee 값을 얻기 힘들었기 때문이다. 이러한 문제점을 해결하는 방법으로 고려할 수 있는 연구방향으로 다양한 생명현상을 가지고 있는 해양생물체 유래의 EH를 얻는 것이다[11]. 다양한 에폭사이드 기질에 대한 기질선택성을 가지는 해양 유래의 EH 생촉매 개발은 광학활성 에폭사이드 제조기술 상업화에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다.

EH의 가수분해반응 산물인 chiral vicinal diol도 광학활성 중간체로서 중요하다. Kinetic resolution 과정을 통해 라세믹 기질로부터 광학활성 에폭사이드를 제조하는 경우 이론적 수율이 50%로 제한된다는 단점을 극복하기 위하여 광학선택성 및 위치선택성이 서로 다른 EH 효소를 사용하여 광학활성 diol을 제조하는 기술도 상업화 가능성이 높을 것으로 기대된다(Fig. 5)[16]. 유기용매 반응 시스템, 이상계 반응 시스템, enantioconvergent 반응, dynamic kinetic resolution 반응 기술, 중공사막 반응기 기술 등 효율적인 생산 시스템에 대한 연구 개발도 활발히 진행되고 있어 상업화 가능성을 더욱 높여 줄 것으로 기대된다[7].

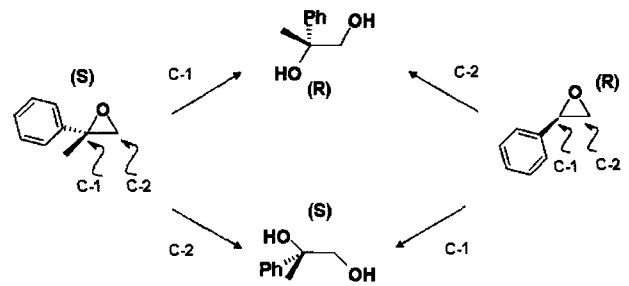


Fig. 5. Possible stereochemical reaction pathway of epoxide hydrolase-catalyzed hydrolysis of epoxides [16].

요약

광학활성 에폭사이드는 다양한 반응성으로 인하여 고부가가치 광학활성 의약품 및 농약 합성용 중간체로 널리 이용되고 있다. 광학활성 에폭사이드는 에폭사이드 가수분해효소(epoxide hydrolase, EH)를 이용하여 저가의 라세믹 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 통해 제조할 수 있으며, EH는 유도과정 없이 발현되고 보조인자가 필요 없으며 비교적 효소 안정성도 높아 상업적으로 유용한 효소이다. EH에 대한 생화학 및 분자생물학 관련 최근 연구 결과를 바탕으로 촉매 활성 증대 및 기질 선택성을 변경시킨 tailor-made형 EH 생촉매 개발이 가능할 것이며, 실규모의 비대칭 광학분할 생물공정 시스템 개발을 통해 EH에 의한 동력학적 가수분해반응을 이용한 광학활성 에폭사이드 생산기술의 상업화가 가능할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Arand, M., F. Muller, A. Mecky, W. Hinz, P. Urban, D. Pompon, R. Kellner, and F. Oesch. 1999. Catalytic triad of microsomal epoxide hydrolase: replacement of Glu404 with Asp leads to a strongly increased turnover rate, *Biochem. J.* **337**, 37-43.
2. Arand, M., B. M. Hallberg, J. Zou, T. Bergfors, F. Oesch, M. I. van der Werf, J. A. de Bont, T. A. Jones and S. L. Mowbray. 2003. Structure of *Rhodococcus erythropolis* limonene-1,2-epoxide hydrolase reveals a novel active site, *EMBO J.* **22**, 2583-2592.
3. 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.
4. Badalassi, F., D. Wahler, G. Klein, P. Crotti and J.-L. Reymond. 2000. A versatile periodate-coupled fluorogenic assay for hydrolytic enzymes, *Angew. Chem.* **112**, 4233-4236.
5. Bhatnagar, T., K. M. Manoj and J. C. Baratti. 2001. A spectrometric method to assay epoxide hydrolase activity, *J.*

- Biochem. Biophys. Methods* **50**, 1-13.
6. Cedrone, F., S. Niel, N. Ait-abdelkader, C. Torre, H. Krumm, S. Roca, T. Bhatnagar, A. Maichele, M. T. Reetz, J. C. Baratti. 2003. Directed evolution of the epoxide hydrolase from *Aspergillus niger*, *Biocatal. Biotrans.* **21**, 357-364.
 7. Choi, W. J., Choi, C. Y., J. A. M. de Bont and C. A. G. M. Weijers. 2000. Continuous production of enantiopure 1,2-epoxyhexane by yeast epoxide hydrolase in a two-phase membrane bioreactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 641-646.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Hopmann, K. H., B. M. Hallberg and F. Himo. 2005. Catalytic mechanism of limonene epoxide hydrolase, a theoretical study. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 14339-14347.
 11. Kim, H. S., S. J. Lee, E. J. Lee, J. W. Hwang, S. Park, S. J. Kim and E. Y. Lee. 2005. Cloning and characterization of a fish microsomal epoxide hydrolase of *Danio rerio* and application to kinetic resolution of racemic styrene oxide, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **37**, 30-35.
 12. Lee, E. Y. and H. S. Kim. 2001. Cloning and molecular characterization of epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* LK, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 562-567.
 13. 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.
 14. Mateo, C., A. Archelas and R. Furstoss. 2003. A spectrophotometric assay for measuring and detecting an epoxide hydrolase activity, *Analytical Biochem.* **314**, 135-141.
 15. Morisseau, C. and B. D. Hammock. 2005. Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 311-333.
 16. Monterde, M. L., M. Lombard, A. Archelas, A. Cronin, M. Arand and R. Furstoss. 2004. Enzymatic transformation. Part 58: Enantioconvergent bihydrolysis of styrene oxide derivatives catalyzed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase, *Tetrahedron: Asymmetry* **15**, 2801-2805.
 17. Nardini, M., I. S. Ridder, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, R. Rink, D. B. Janssen and B. W. Dijkstra. 1999. The X-ray structure of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1, *J. Biol. Chem.* **274**, 14579-14596.
 18. Reetz, M. T., C. Torre, A. Eipper, R. Lohmer, M. Hermes, B. Brunner, A. Maichele, M. Bocola, M. Arand, A. Cronin, Y. Genzel, A. Archelas and R. Furstoss. 2004. Enhancing the enantioselectivity of an epoxide hydrolase by directed evolution, *Org. Lett.* **6**, 177-180.
 19. Rink, R., J. H. L. Spelberg, R. J. Pieters, J. Kingma, M. Nardini, R. M. Kellogg, B. W. Dijkstra and D. B. Janssen. 1999. Mutation of tyrosine residues involved in the alkylation half reaction of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 results in improved enantioselectivity, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7417-7418.
 20. Rui, L., L. Cao, W. Chen, K. F. Reardon and T. K. Wood. 2004. Active site engineering of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 to enhance aerobic mineralization of cis-1,2-dichloroethylene in cells expressing an evolved toluene ortho-monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **279**, 46810-46817.
 21. Rui, L., L. Cao, W. Chen, K. F. Reardon and T. K. Wood. 2005. Protein engineering of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 for enhanced activity and enantioselective production of (R)-1-phenylethane-1,2-diol. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3995-4003.
 22. Smit, M. S. 2004. Fungal epoxide hydrolases: new landmarks in sequence-activity space, *Trends in Biotechnol.* **22**, 123-129.
 23. Steinreiber, A. and K. Faber. 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations, *Current Opinion in Biotechnol.* **12**, 552-558.
 24. van Loo, B., J. H. L. Spelberg, J. Kingma, T. Sonke, M. G. Wubbolts and D. B. Janssen. 2004. Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling, *Chem. Biol.* **11**, 981-990.
 25. Visser, H., C. A. G. M. Weijers, A. J. J. van Ooyen and J. C. Verdoes. 2002. Cloning, characterization and heterologous expression of epoxide hydrolase-encoding cDNA sequences from yeasts belonging to the genera *Rhodotorula* and *Rhodosporidium*, *Biotechnol. Lett.* **24**, 1687-1694.
 26. Yamada, T., C. Morisseau, J. E. Maxwell, M. A. Argiriadi, D. W. Christianson and B. D. Hammock. 2000. Biochemical evidence for the involvement of tyrosine in epoxide activation during the catalytic cycle of epoxide hydrolase, *J. Biol. Chem.* **275**, 23082-23088.
 27. Zocher, F., M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, B. Hauer, W. Wohlleben and R. D. Schmid. 2000. Epoxide hydrolase activity of *Streptomyces* strains, *J. Biotechnol.* **77**, 287-292.
 28. Zou, J., B. M. Hallberg, T. Bergfors, F. Oesch, M. Arand, S. L. Mowbray and T. A. Jones. 2000. Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implication for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases, *Structure* **8**, 111- 122.