

재조합 *Caulobacter crescentus* 에폭사이드 가수분해효소를 이용한 광학활성 Diol 제조 조건의 최적화

이옥경 · 김희숙*

경성대학교 공과대학 식품생명공학과

Optimization of the Reaction Conditions for (*R*)-Phenyl-1,2-ethanediol Preparation by Recombinant Epoxide Hydrolase from *Caulobacter crescentus*. Lee, Ok Kyung and Hee Sook Kim*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyungsoo University, Busan 608-736, Korea – Enantioconvergent hydrolysis process for the preparation of chiral diol from racemic epoxides by using the recombinant *Caulobacter crescentus* epoxide hydrolase (CcEH) in *Escherichia coli* BL21 (DE3) was optimized. For the optimization, the effects of detergent, temperature and product inhibition on the enantiopurity and the yield of diol were investigated. (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol with 92% enantiomeric excess and 56% yield from 20 mM racemic styrene oxide was obtained by using the recombinant CcEH at the optimal condition of 10°C and the addition of 2% (w/v) Tween 80. At 50 mM racemic styrene oxide was used as a substrate, (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol was obtained with 87% enantiomeric excess and 77% yield. Racemic phenyl-1,2-ethanediol, (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol and (*S*)-phenyl-1,2-ethanediol dramatically inhibited the hydrolytic activity of the recombinant CcEH. These results suggested that another EH with the regioselectivity on β -position of (*R*)-enantiomer and without feedback inhibition by products would be needed as the partner EH of *C. crescentus* EH.

Key words: Epoxide hydrolase, *Caulobacter crescentus*, (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol, enantioconvergent hydrolysis, optimization

서 론

에폭사이드는 oxirane ring의 불안정성과 산소 원자의 전 기음성도에 기인한 극성 때문에 반응성이 대단히 우수하여 친전자성, 친핵성반응, 산염기반응, 산화환원반응 등 다양한 반응을 유도할 수 있다. 이러한 다양한 반응성과 함께 광학 활성을 가지는 에폭사이드는 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용되는 고부가가치 광학 활성 중간체이다[5, 18, 19].

에폭사이드 가수분해효소(epoxide hydrolase, EH, EC 3.3.2.3)는 라세믹 에폭사이드 혼합물을 기질로 사용했을 때 입체선택적으로 가수분해하는 특성을 가지고 있다[4]. 이러한 입체특이성의 차이를 이용하여 단일 이성질체만을 얻을 수 있는 기술인 입체선택적 광학분할방법은 저가의 라세믹 기질로부터 고부가가치 광학활성 물질을 제조할 수 있어 상업적으로 유용한 기술로 평가되고 있다[1, 2]. EH 생축매는 NAD나 FAD와 같은 보조인자를 요구하지 않고, 세포 자체를 생축매로 사용할 수 있으며, 안정된 구조를 가지고 있어 상업적 유용성이 높은 생축매로 평가받고 있다. 또한 반응

생성물인 광학활성 diol 역시 광학활성 에폭사이드와 마찬가지로 다양한 키랄 의약품 합성에 사용되는 중요한 광학활성 합성 중간체이다[3].

EH를 이용하여 광학활성 에폭사이드를 얻는 동력학적 분할(kinetic resolution) 법은 특정 이성질체를 입체선택적으로 제거하기 때문에 이론적 최대수율이 50%로 제한된다(Fig. 1a). EH를 이용하여 광학활성 diol을 생산할 때 Fig. 2b와 같이 광학선택성 및 위치선택성이 서로 상호보완적인 두 개의 EH 효소들을 사용하면 이론수율 100%의 광학활성 diol을 제조할 수 있음이 보고되었다[6, 7, 15]. *Aspergillus niger* EH와 *Solanum tuberosum* EH를 같이 사용하여 라세믹 *p*-chlorostyrene oxide 기질로부터 β 3-adrenergic receptor agonist들인 SR58611A 및 AJ-9677 또는 뇌질환치료제인 Eliprodil 등의 합성에 사용되는 핵심중간체인 (*R*)-*p*-chlorostyrene diol을 제조한 기술의 개발이 보고되었다[13]. *Aspergillus niger* EH는 (*R*)-*p*-chlorostyrene oxide 이성질체의 에폭사이드를 구성하는 탄소 중 β 위치에 대해 위치선택적으로 가수분해 반응을 주로 진행하여 (*R*)-*p*-chlorostyrene diol을 생성하고, 반면에 *Solanum tuberosum* EH는 (*S*)-*p*-chlorostyrene oxide 이성질체의 에폭사이드 구성탄소 중 α 위치에서 위치선택적으로 가수분해 반응을 진행하여 입체구조가 반전된 (*R*)-*p*-chlorostyrene diol을 생산함으로써 결과적으로 4 mM 라세믹 *p*-chlorostyrene oxide로부터 광학순도

*Corresponding author

Tel: 82-51-620-4713, Fax: 82-51-622-4986

E-mail: hskim@ks.ac.kr

96% ee 이상의 (*R*)-*p*-chlorostyrene diol을 93%의 매우 높은 수율로 얻을 수 있었다고 보고하였다[14]. 이러한 enantioconvergent hydrolysis 반응을 이용하는 경우 동력학적 분할법의 최대단점인 이론수율 50% 문제를 극복할 수 있다. 위의 연구결과에서 활용된 *S. tuberosum* EH는 흥미롭게도 단일 효소 자체가 Fig. 1c와 같이 라세믹 기질 각각에 대하여 서로 상호보완적인 입체선택성 및 위치선택성을 가지고 있음이 밝혀져, 단일 효소만을 사용하여도 라세믹 styrene oxide 기질로부터 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol을 생성시킬 수 있다고 하였다[14]. 미생물 중에서는 *Caulobacter crescentus*의 EH가 식물유래인 *S. tuberosum* EH와 같이 단일 EH 효소 자체가 라세믹 styrene oxide에 대해 서로 상호보완적인 입체선택성 및 위치선택성을 가지고 있어 광학활성 diol을 생산하는데 적당하다고 하였다[12]. 본 연구에서는 광학활성 diol을 높은 수율로 제조하기 위하여 *C. crescentus* 유래의 EH 유전자(CcEH)를 cold shock protein의 promoter가 들어 있어 저온에서 활성형 단백질을 고효율로 발현시킬 수 있는 pColdI 벡터에 삽입하여 만든 유전자재조합균주를 생축매로 사용하였다. 기질인 라세믹 styrene oxide와 생축매가 들어 있는 반응혼합물의 반응온도 변화 및 다양한 detergent의 첨가가 제조하려 하는 광학활성 에폭사이드와 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol의 광학순도 및 수율을 향상시키는데 미치는 영향을 분석함으로써 광학수렴 반응 조건을 최적화하고자 하였다.

실험 및 방법

재조합 *E. coli* 배양조건

*C. crescentus*의 에폭사이드 가수분해효소(CcEH)를 대장균에 발현시키기 위하여 *E. coli* DH5 α 세포로부터 정제한 pColdI/CcEH 재조합 플라스미드 DNA를 정제한 후 발현 숙주인 *E. coli* BL21(DE3) competent cell에 형질전환시켰다[12]. 선별된 유전자재조합 형질전환체를 ampicillin (50 μ g/ml)이 첨가된 10 ml의 LB 배지에 overnight seed culture 하였으며 150 ml의 새로운 LB 배지가 들어있는 500 ml 삼각플라스크에 2.25 ml를 접종하여 37°C에서 진탕 배양하였다. pColdI vector[16]는 cold shock protein(*cspA*) promoter와 lac operator 염기서열이 삽입되어 있는 vector이므로 배양액의 혼탁도가 OD₆₀₀에서 0.4-0.5로 될 때까지 37°C로 배양한 다음 배양액을 15°C로 냉각하여 30분간 방치함으로써 낮은 온도에 적응시켰다. 단백질의 발현을 더욱 유도시키기 위하여 최종농도가 1 mM이 되도록 IPTG를 첨가하고 15°C에서 24시간 진탕배양하였다.

C. crescentus EH를 이용한 enantioconvergent 가수분해 반응

재조합 CcEH 생축매 10 mg 건조중량(dry cell weight, dcw)을 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)에 현

탁시켜 반응액의 전체부피를 1 ml로 하고 기질로서 최종농도 20 mM이 되도록 라세믹 styrene oxide를 첨가하였다. 반응기로는 screw-cap vial을 사용하였으며 30°C, 250 rpm의 진탕배양기에서 반응을 수행하였다. 반응 후 남은 기질인 styrene oxide의 광학순도와 수율을 분석하기 위하여 반응액의 일부를 동량의 cyclohexane으로 추출하여 chiral column이 장착된 GC로 분석하였고 생성물인 phenyl-1,2-ethanediol의 광학순도와 수율은 동량의 ethyl acetate로 추출하여 chiral HPLC로 분석하였다. 기질인 라세믹 styrene oxide와 표준물질로 사용한 (*R*)- 및 (*S*)-phenyl-1,2-ethanediol은 Aldrich Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

온도 및 계면활성제 첨가의 영향 및 diol의 저해효과 평가 에폭사이드 가수분해 효소를 이용한 광학분할 반응속도와 광학순도에 미치는 온도의 영향을 분석하기 위하여 5~30°C의 다양한 온도에서 반응을 수행하였으며 20 mM 라세믹 styrene oxide를 기질로 하는 반응액에 glycerol, Tween 20 및 Tween 80 등의 계면활성제를 첨가하여 반응속도 및 광학순도에 미치는 영향을 분석하였다.

또한, 생성물에 의한 feed back 저해를 평가하기 위하여 에폭사이드 가수분해효소로 라세믹 styrene oxide를 가수분해할 때 생성되는 phenyl-1,2-ethanediol을 반응혼합물에 미리 첨가하여 반응속도를 측정하였다. CcEH 재조합균주 10 mg dcw를 100 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0)에 현탁시킨 후 기질로 10 mM 농도의 라세믹 styrene oxide를 첨가하였으며 저해물질로는 0~200 mM 농도의 라세믹 phenyl-1,2-ethanediol, 순수한 (*R*)- 및 (*S*)-phenyl-1,2-ethanediol을 각각 사용하여 1 ml 반응액에서 EH 활성을 평가하였다. 30°C, 250 rpm의 진탕배양기에서 10분 동안 가수분해 반응을 실시하였으며, 반응 종결 후 반응액을 동량의 cyclohexane으로 추출하여 키랄(chiral) GC로 남아있는 styrene oxide를 분석하여 반응속도를 계산하여 저해정도를 평가하였다.

광학활성 styrene oxide 및 phenyl-1,2-ethanediol의 분석방법

유기용매 상의 styrene oxide 및 광학순도(enantiomeric excess, ee (%)) = $[S-R]/[S+R] \times 100$ 분석은 불꽃이온 검출기(flame ionization detector, FID)가 장착된 gas chromatography (GC, M600D, Young-Lin, Korea)를 사용하였다. 분석용 column으로는 (*R*)-과 (*S*)-styrene oxide에 대한 분리능이 있는 Supelco β -Dex 120(0.25 mm ID, 30 m length, 25 μ m film thickness, USA)칼럼을 사용하였다. 이동가스로는 질소를 사용하였으며, GC 분석조건으로는 split ratio는 1:20, flow rate는 0.5 ml/min으로 2 μ l의 시료를 주입하여 분석하였고, column, injector, detector의 온도는 각각 100, 220, 220°C이었다.

라세믹 styrene oxide가 가수분해되어 생성된 phenyl-1,2-ethanediol의 광학순도 및 수율의 분석은 chiral HPLC를 사용하였다. 반응액을 동량의 ethyl acetate로 추출한 후 유기용매 층을 chiralcel OD column(25 cm length, 0.46 cm ID, Daicel Inc., Japan)를 사용하여 254 nm의 UV detector로 분석하였다. HPLC의 이동상으로는 hexane : 2-propanol (92 : 8, w/v)을 사용하였으며 표준물질로 사용한 (R)- 및 (S)-phenyl-1,2-ethanediol의 머무름 시간은 각각 23분과 25분이었다. 광학순도 (ee , %) = $([(R)\text{-diol}] - [(S)\text{-diol}]) / ([(R)\text{-diol}] + [(S)\text{-diol}]) \times 100$, 전환율(C, %) = $(1 - [\text{residual styrene oxide}] / [\text{initial styrene oxide}]) \times 100$, 수율(Y, %) = $([(R)\text{-diol}] / [\text{initial styrene oxide}]) \times 100$ 으로 각각 계산하였다.

결과 및 고찰

CcEH를 이용한 enantioconvergent 가수분해반응에서 반응온도의 영향 분석

에폭사이드의 oxirane ring은 2개의 탄소와 1개의 산소를 가진 three-membered ring으로 EH에 의해 가수분해 된다. 라세믹 styrene oxide를 기질로 사용하였을 경우 4가지의

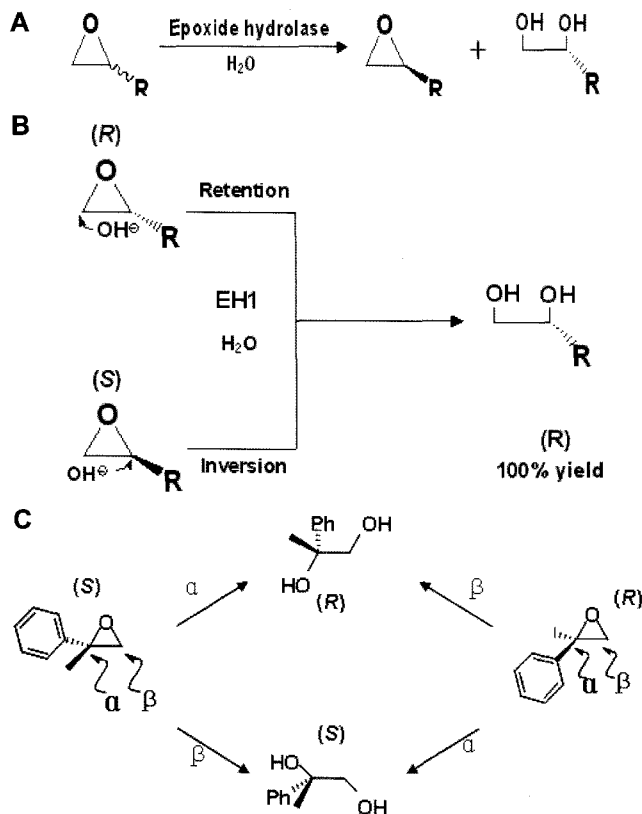


Fig. 1. Reaction schemes of the kinetic resolution and enantioconvergent hydrolysis of racemic epoxides by using EHs. A: Kinetic resolution, B: enantioconvergent hydrolysis by using EH, C: possible reactions from racemic styrene oxide by using EH [2]. Given yields are theoretical values.

다른 입체화학적 분해경로가 가능하다(Fig. 1C). 기존에 보고된 *Aspergillus niger*, *Agrobacterium radiobacter* 및 *Rhodotorula glutinis* 등의 EH들은 90% 이상 (R)-form 입체 이성질체의 β -carbon을 공격하여 입체구조가 유지되는 반응인 retention 반응이 일어나 (R)-enantiomer로부터 (R)-diol이 생성되지만[3], 식물 유래인 감자로부터 분리된 *Solanum tuberosum* EH의 경우 (R)-enantiomer의 β -carbon을 공격하는 retention 반응(92%)에서 (R)-diol이 생성되고 (S)-enantiomer의 α -carbon을 공격하여 입체구조가 반전되는 inversion 반응(97%)도 함께 일어나 (S)-enantiomer로부터도 (R)-diol이 생성되어 라세믹 에폭사이드로부터 광학활성 diol을 수율 100% 생산이 가능하다[12]. *S. tuberosum* EH의 경우와 같이 retention 반응과 inversion 반응이 함께 일어남으로서 한 가지 생성물을 주로 생성하는 반응기전을 enantioconvergent hydrolysis (광학수렴가수분해) 반응이라고 부르며 본 실험에서 사용한 재조합 CcEH 생축매의 경우 역시 Fig. 1c와 같이 (R)-styrene oxide의 β -carbon을 공격하여 (R)-phenyl-1,2-ethanediol을 생성하는 동시에 (S)-styrene oxide의 α -carbon을 공격하여 (R)-phenyl-1,2-ethanediol을 생성함으로써 기존의 동력학적 분할반응의 이론수율 50%의 한계를 극복할 수 있었다[12].

일반적인 효소 반응온도인 30°C에서 재조합 CcEH 생축매를 사용하여 가수분해 반응을 수행한 결과 이론수율 50%의 한계는 극복할 수 있었으나, 20 mM 라세믹 styrene oxide 기질에 생축매 10 mg dcw ml⁻¹을 사용하였을 때 30°C에서 20분 반응시 85% ee 값의 (R)-phenyl-1,2-ethanediol을 69% 수율로 얻을 수 있었다[12]. 광학순도와 수율을 향상시키기 위하여 온도를 낮추어 반응을 수행한 결과는 Fig. 2와 같았다. 20 mM 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 5°C 반응의 경우 40분에 기질 중 (R)-styrene oxide의 광학순도가 99%에 도달하였으나 수율은 20%이었으며 이때 반응 생성물인 (R)-phenyl-1,2-ethanediol의 광학순도는 91%로 향상되었으며 수율은 68%였다. 10°C에서 반응시킨 경우 20분에 기질의 광학순도가 99%이었으며 이때 반응 생성물인 diol의 광학순도는 90%, 수율은 77%였고 20°C 반응의 경우 10분에 기질의 광학순도가 99%에 이르렀으며 이때 생성물인 (R)-phenyl-1,2-ethanediol의 광학순도는 89%로 수율은 72%였다. 위의 결과는 반응온도가 EH를 사용하여 라세믹 에폭사이드를 입체 선택적으로 가수분해하는데 요한 영향인자임을 증명해 준다. 입체선택성(E value)에서 온도의 영향은 이미 lipase를 사용하여 입체선택적 에스테르 교환반응에서 이미 증명되었으며[17], Manoj 등 [13]은 *A. niger*의 EH를 사용하여 *p*-chlorostyrene oxide를 EH로 가수분해반응을 행하였을 때 27°C에서 ~40% 정도였던 E value가 0°C에서 반응시켰을 때 ~100%의 E value로 향상되었으며 이는 동력학적 분할반응의 열역학적 현상 때문이라고 하였다. CcEH를 사용하여 라세믹 styrene oxide로부터 (R)-phenyl-

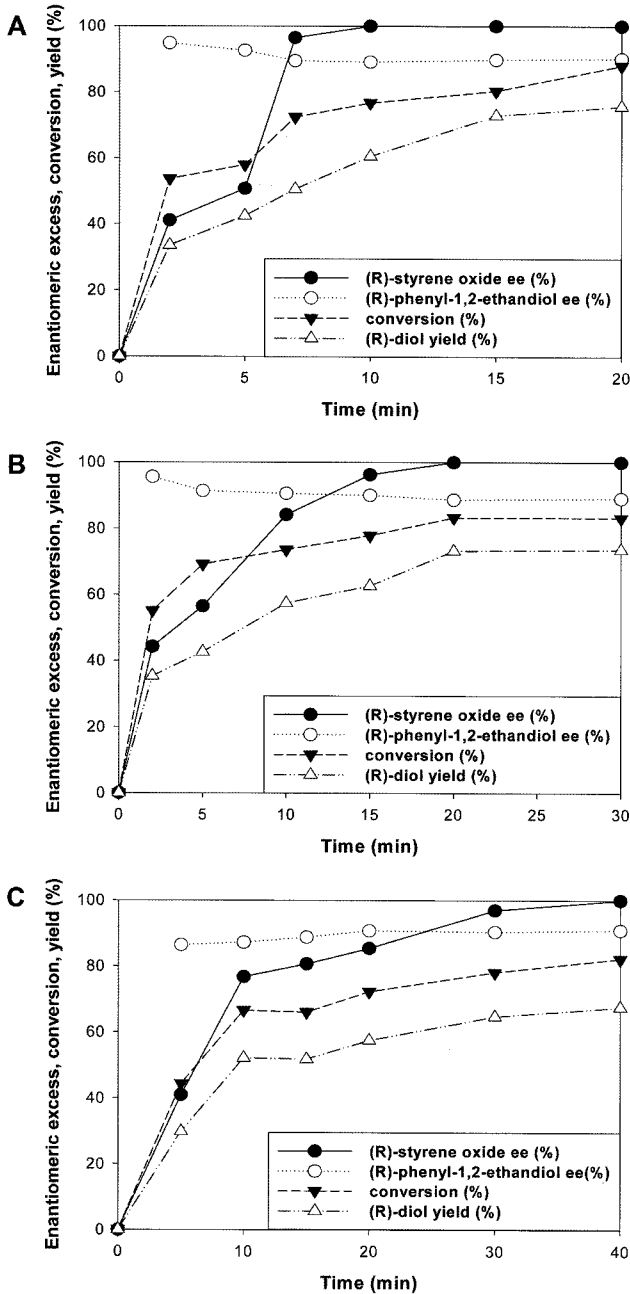


Fig. 2. Effects of the reaction temperature on the enantiopurity and yield of (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol in the enantioconvergent hydrolysis reaction catalyzed by CcEH. A: 20°C, B: 10°C, C: 5°C.

1,2-ethanediol을 생성하는 enantioconvergent 가수분해 반응을 행하는 경우, 반응속도와 반응생성물의 광학순도 및 수율을 고려하여 가장 최적의 반응온도는 10°C로 결정하였다 (Fig. 2).

CcEH를 이용한 enantioconvergent hydrolysis 반응에서 detergent 첨가의 영향 분석

EH를 이용한 epoxide의 입체선택적 가수분해반응에서 광

학활성 에폭사이드를 제조하는데 계면활성제의 첨가가 가수분해속도, 광학순도 및 수율을 향상시킨 바 있다[10, 11]. 따라서 EH의 광학수렴 반응을 이용한 광학활성 diol 생합성에 있어서도 detergent 첨가가 광학순도 및 수율을 향상시킬 수 있는지를 분석하였다. 먼저 10%(w/v) glycerol 을 반응액에 첨가하여 10°C에서 반응을 수행한 결과 glycerol을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 순수한 (*R*)-styrene oxide를 얻을 수 있는 광학분할 반응속도가 빨라졌으나 수율은 13% 밖에 얻을 수 없었으며 광학수렴반응 결과 얻어지는 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol의 수율은 80%로 증가하였으나 광학순도는 87%로 감소하였다. 10%(w/v) Tween 20을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 반응을 수행한 결과 광학분할반응 결과물이 광학활성 에폭사이드의 수율은 25%로 증가하였으나 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol 생성물의 광학순도 및 수율은 향상시키지 못하였다. Tween 80의 경우 10%(w/v)으로 반응을 수행하고자 하였으나 추출상의 상분리의 어려움으로 인하여 소량만을 사용하였다. 1~3%(w/v) Tween 80을 반응액에 첨가하여 반응을 수행한 결과 3% 첨가는 여전히 상분리에 어려움이 있었으며, 2% 첨가는 광학분할반응에 의해 생성되는 (*R*)-styrene oxide의 광학순도(99%)와 수율(31%) 및 반응속도를 향상시켰으며 광학수렴반응에서도 생성물 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol의 광학순도를 92%로 향상시켰으며 56% 얻을 수 있었다(Fig. 4). 1%(w/v) Tween 80의 첨가는 광학분할반응에서의 수율은 낮았으나 광학수렴반응에서는 무첨가보다 높은 광학순도 90%의 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol를 66% 얻을 수 있었다. 위의 결과로부터 광학수렴반응의 생성물인 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol의 광학순도를 높이기 위하여 Tween 80을 2%(w/v) 첨가하는 것이 10%(w/v) glycerol 및 10%(w/v) Tween 20의 첨가하는 것보다 최적조건임을 알았다. Gong 등[8]은 *Bacillus megaterium*의 EH를 이용한 입체선택적 가수분해 반응에서 광학활성 에폭사이드를 제조하는데 반응혼합물에 Tween 80을 첨가하면 효소활성이 향상된다고 보고하였으며, Lee와 Lee[11]는 *Rhodotorula glutinis* EH를 재조합한 *Pichia pastoris*를 동결건조시켜 생축매로 사용할 때 계면활성제인 Triton X-100, Tween 20 및 Tween 80 등을 첨가하여 동결건조 시켰더니 광학활성 epichlorohydrin 생합성에 있어 가수분해 속도는 1.7~2.4배 빨라지고 입체선택성은 1.2~1.8배 향상되었다고 보고한 바 있다. Kronenburg 및 Bont [9]는 *R. glutinis* EH 가수분해에서 기질로 styrene oxide를 사용하였을 때 비이온계 계면활성제인 Thesit이 E-ratio를 높여주었으며 기질로 1,2-epoxyhexane을 사용한 경우 비이온계 계면활성제인 octyl-glucoside, dodesyl-maltside, sucrosemonolaurate 및 Thesit 등이 E-ratio를 10배 이상 향상시켰고 Tween 20 역시 약간의 효과를 보였으며, 음이온계 계면활성제는 아무런 효과가 없었다고 하였다. 본 실험에서 사용한 CcEH 생축매의 경우, enantioconvergent hydrolysis 반응에서의 가장 적합한 계면활성제로는 Tween 80으로

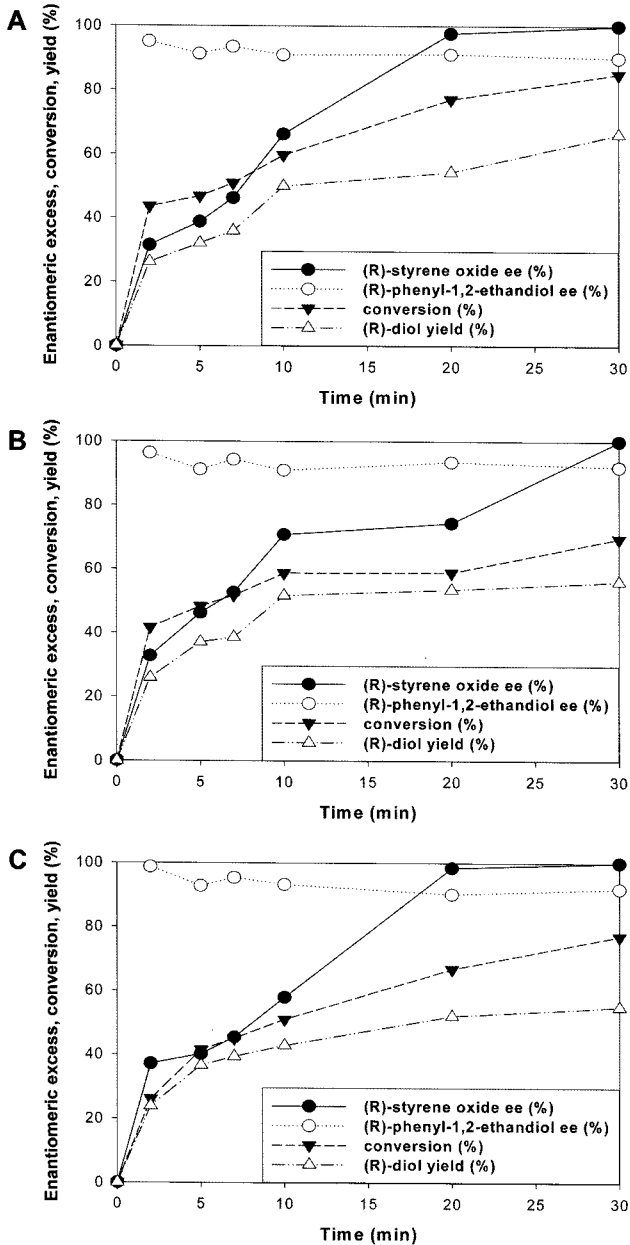


Fig. 3. Effects of Tween 80 on the enantiopurity and yield of (R)-phenyl-1,2-ethanediol in the enantioconvergent hydrolysis reaction catalyzed by CcEH. A: 10°C in the presence of 1%(w/v) Tween 80, B: 10°C in the presence of 2%(w/v) Tween 80, C: 10°C in the presence of 3%(w/v) Tween 80.

2%(w/v) 첨가가 최적인 것으로 결정하였다.

CcEH를 이용한 enantioconvergent hydrolysis 반응에서 반응생성물인 diol의 저해효과 평가

CcEH 재조합균주를 이용하여 광학적으로 순수한 (R)-diol을 제조하는 반응에 있어 반응 생성물인 diol에 의한 EH 활성 저하를 예상할 수 있다. 생성물인 phenyl-1,2-ethanediol의 농도가 초기 가수분해 속도에 영향을 미치는지 알아보고

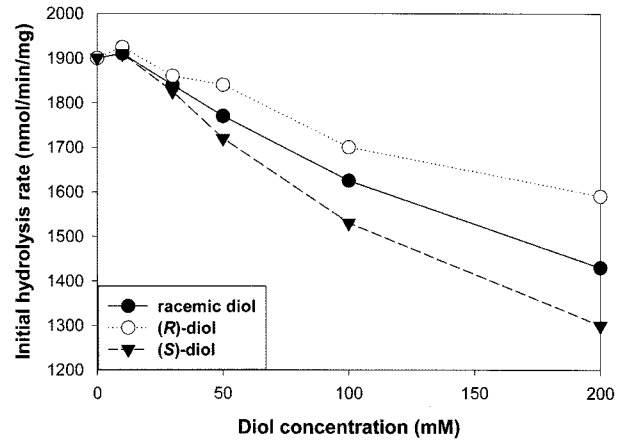


Fig. 4. Inhibition effects of enantiopure and racemic phenyl-1,2-ethanediol concentrations on the initial hydrolysis rate of CcEH. The used substrate was 20 mM racemic styrene oxide. The reactions were carried out at 30°C for 10 min.

자 라세믹 phenyl-1,2-ethanediol 또는 순수한 (R)- 및 (S)-phenyl-1,2-ethanediol의 농도를 0~200 mM까지 다양한 농도로 첨가하여 10분간 반응시키고 남아있는 (R)- 및 (S)-styrene oxide의 농도를 GC로 분석하여 EH의 가수분해 활성을 측정하였다. 실험 결과, CcEH의 경우 라세믹 phenyl-1,2-ethanediol을 첨가하면 10 mM 라세믹 diol 농도부터 가수분해 반응속도가 저하되기 시작하여 100 mM 농도 이상에서는 반응속도가 1.91 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 에서 1.53 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 현저히 저하됨을 알 수 있었다(Fig. 4). 또한 순수한 광학활성 diol을 첨가한 경우도 라세믹 diol의 경우와 같이 효소활성을 저해하였으며 (R)-phenyl-1,2-ethanediol보다 (S)-phenyl-1,2-ethanediol로 인한 반응속도가 현저히 저하됨을 알 수 있었다. 따라서 enantioconvergent 가수분해 반응의 경우 반응이 진행될수록 생성되는 diol의 농도가 높아지기 때문에 기질의 농도 10 mM 이상에서 반응을 수행하면 생성물인 phenyl-1,2-ethanediol의 저해 현상으로 인한 반응속도 및 광학순도의 저하가 예상된다. 따라서 diol의 저해를 받지 않으면서 (R)-styrene oxide에 대하여 우선적으로 가수분해 반응을 수행하는 생촉매를 선별하여 CcEH와 함께 combination 반응을 수행한다면 반응속도와 광학순도 및 수율 향상이 가능할 것이다.

최적조건에서 CcEH를 이용한 enantioconvergent 가수분해 반응

재조합 CcEH 생촉매의 경우 초기 가수분해 속도가 기준에 보고된 EH들에 대비하여 현저히 빠르며 광학분할반응에서 순수한 (S)-styrene oxide를 얻을 수 있으나 입체선택성이 높은 편이 아니어서 최적조건에서 광학순도 99% 이상의 (S)-styrene oxide를 이론수율(50%) 대비 낮은 수율인 20% 밖에 얻을 수 없었다. 반면에 입체선택성이 높은 *R. glutinis*나 *A. niger*의 EH와는 달리 입체선택성은 조금 낮지만 위치선택성

과 서로 상호보완적인 CcEH를 사용하면 (*R*)-styrene oxide 및 (*S*)-styrene oxide로부터 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol를 이론수율 100%로 얻을 수 있는 장점이 있다(Fig. 1C). 재조합 CcEH 생축매 10 mg을 사용하여 일반적인 반응온도인 30°C에서 20 mM 라세믹 styrene oxide에 대하여 반응을 시작한 지 20분만에 기질의 광학순도 >99%에 도달하였으며, 광학순도 85%의 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol를 69% 수율을 얻을 수 있었다. 그러나 반응산물의 광학순도 90% 이하는 상업적 유용성에 적합하지 못하므로 이를 극복하고자 반응온도 10°C, 2% Tween 80을 첨가하고 반응을 수행하여 반응산물의 광학순도 92%, 수율 56%로 광학순도를 향상시킬 수 있었다(Fig. 5A). 고농도 반응을 수행하고자 50 mM 라세믹 styrene oxide을 기질로 하고 세포를 30 mg dcw 사용하여 동일한 조건에서 반응을 수행한 결과 반응시작 2분에서부터 광학순도가 87%로 현저히 저하되었으며 20분 후 수율은 77%였다(Fig. 5B). 이러한 CcEH의 광학수렴 가수분해반응에서 생성물 diol의 낮은 광학순도 결과는 CcEH 효소활성

에 대한 생성물 diol의 저해 때문에 일어나는 것으로 설명할 수 있으며(Fig. 4) 고농도 기질에서 높은 광학활성 diol을 높은 수율로 얻기 위해서는 CcEH만을 사용하는 것 보다는 (*R*)-styrene oxide의 β위치를 선택적으로 공격하면서(Fig. 1C) 동시에 diol에 의해 저해를 받지 않는 partner EH를 개발하는 것이 중요하다고 생각된다.

본 연구에서는 박테리아인 *Caulobacter crescentus* 유래의 재조합 EH가 가지고 있는 상호보완적인 입체선택성과 위치선택성을 이용하여 기존의 동력학적 분할반응의 최대 단점인 이론적 광학수율 50%의 한계를 극복하였다.

요 약

대장균 BL21(DE3)에 *Caulobacter crescentus* epoxide hydrolase (CcEH)를 발현시킨 재조합균주를 이용하여 광학수렴 가수분해(enantioconvergent hydrolysis) 반응을 수행하였으며 라세믹 에폭사이드 기질로부터 광학활성 diol을 생합성하는 조건을 최적화하였다. 반응최적화를 위하여, 계면활성제의 첨가와 반응온도가 생성물인 diol의 광학순도 및 수율에 미치는 영향을 분석하였으며 또한 생성물인 diol에 의한 EH의 가수분해활성 저해효과를 측정하였다. 재조합 CcEH를 생축매로 사용한 광학수렴 반응에서 Tween 80을 2%(w/v) 첨가하여 10°C로 반응시켰을 때 20 mM 라세믹 styrene oxide로부터 광학순도 92%의 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol을 수율 56%로 얻을 수 있었다. 기질인 라세믹 styrene oxide를 50 mM 농도로 사용한 경우, 광학순도 87% (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol을 77% 얻을 수 있었다. 생성물인 diol의 저해효과를 실험한 경우, 라세믹 phenyl-1,2-ethanediol, (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol 및 (*S*)-phenyl-1,2-ethanediol은 10 mM 농도에서부터 재조합 CcEH의 가수분해활성을 현저하게 저해하는 것으로 나타났다. 위의 결과들로 볼 때 CcEH를 사용하여 높은 광학순도의 (*R*)-phenyl-1,2-ethanediol을 생성하기 위해서는 (*R*)-styrene oxide의 β위치를 선택적으로 공격하는 동시에 생성물에 의해 저해를 받지 않는 partner EH를 개발하는 것이 중요할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 경성대학교 학술연구비 지원으로 연구되었음에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Archelas A. and R. Furstoss. 2001. Synthetic applications of epoxide hydrolases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**: 112-119.
2. Besse, P. and H. Veschambre. 1994. Chemical and biological synthesis of chiral epoxides. *Tetrahedron*. **50**: 8885-8927.

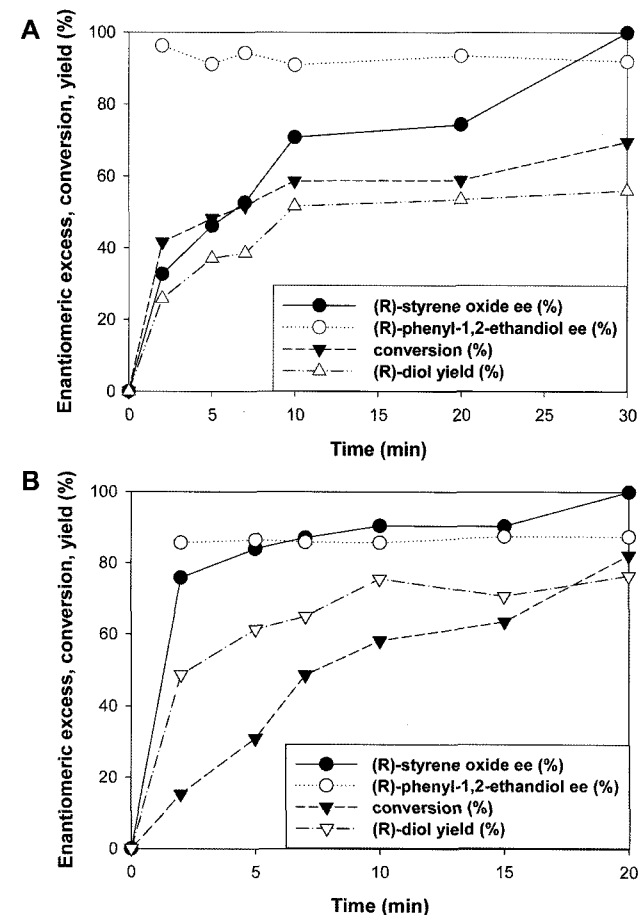


Fig. 5. Enantioconvergent hydrolysis reaction racemic styrene oxide by recombinant *E. coli* expressing the *C. crescentus* epoxide hydrolase. A: 20 mM racemic styrene oxide as a substrate, B: 50 mM racemic styrene oxide as a substrate. The reactions were carried out at 10°C after adding 2% (w/v) Tween 80.

3. Cao, L., J. Lee, W. Chen, and T. K. Wood. 2006. Enantioconvergent production of (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol from styrene oxide by combining the *Solanum tuberosum* and an evolved *Agrobacterium radiobacter* AD1 epoxide hydrolases. *Biotechnol. Bioeng.* **94**: 522-529.
4. 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.
5. Collins, A. N., G. N. Sheldrake, and J. Crosby. 1992. *Chirality in industry*. pp. 1-66, John Wiley & Sons, New York, U.S.A.
6. Faber, K. and W. Kroutil. 2002. Streoselectivity in biocatalytic enantioconvergent reactions and a computer program for its determination. *Tetrahedron: Asymmetry* **13**: 377-382.
7. Genzel, Y., A. Archelas, Q. B. Broxterman, B. Schulze, and R. Furstoss. 2002. Microbiological transformation 50: selection of epoxide hydrolase for enzymatic resolution of 2-, 3-, or 4-pyridyloxirane. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **16**: 217-222.
8. Gong, P. F., J. H. Xu, Y. F. Tang, and H. Y. Wu. 2003. Improved catalytic performance of *Bacillus megaterium* epoxide hydrolase in a medium containing Tween 80. *Biotechnol. Prog.* **19**: 652-654.
9. Kronenburg, N. A. E. and J. A. M. de Bont. 2001. Effects of detergents on specific activity and enantioselectivity of the epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis*. *Enz. Microbiol. Tech.* **28**: 210-217.
10. Lee, E. Y. and H. S. Kim. 2004. Epoxide hydrolase-catalyzed asymmetric enantioselective resolution for the production of chiral epichlorohydrin. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **15**: 528-532.
11. Lee, J.-H. and E. Y. Lee. 2004. Enhancement of biocatalytic activity of recombinant *Pichia pastoris* for the production of chiral epichlorohydrin by lyoprotectant and detergent. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **15**: 150-152.
12. Lee, O. K. and E. Y. Lee. 2007. Biosynthesis of (R)-phenyl-1,2-ethanediol by using single recombinant epoxide hydrolase from *Caulobacter crescentus*. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **18**: 279-283.
13. Manoj, K. M., A. Archelas, J. Baratti, and R. Furstoss. 2001. Microbiological transformations. Part 45: A green chemistry preparative scale synthesis of enantiopure building blocks of Eliprodil: elaboration of a high substrate concentration epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution process. *Tetrahedron.* **57**: 695-701.
14. Monterde, M. I., 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.
15. Moussou, P., A. Archelas, J. Baratti, and R. Furstoss. 1998. Microbiological transformations. Part 39: Determination of the regioselectivity occurring during oxirane ring opening by epoxide hydrolases: a theoretical analysis and a new method for its determination. *Tetrahedron: Asymmetry* **9**: 1539-1547.
16. Qing, G. L. C. Ma, A. Khorchid, G. V. T. Swapna, T. K. Mal, M. M. Takayama, B. Xia, S. Phadtare, H. Ke, T. Acton, G. T. Montelione, M. Ikura, and M. Inouye. 2004. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* **22**: 877-882.
17. Sakai, T., I. Kawabata, T. Kishimoto, T. Ema, and M. Utaka. 1997. Enhancement of the enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolution of 3-phenyl-2H-azirine-2-methanol by lowering the temperature to -40°C. *J. Org. Chem.* **62**: 4906-4707.
18. Schmid, A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, and B. Witholt. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature.* **409**: 258-268.
19. Strauss, U. T., U. Felfer, and K. Faber. 1999. Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess. *Tetrahedron: Asymmetry* **10**: 107-117.

(Received Aug. 23, 2007/Accepted Nov. 22, 2007)