

## 에폭사이드 가수분해효소 유전자의 double expression cassette 재조합 *Pichia pastoris*를 이용한 enantiopure styrene oxide의 제조

김 희 숙\*

경성대학교 공과대학 식품생명공학과

Received December 28, 2007 / Accepted January 15, 2008

**Production of Enantiopure Styrene Oxide by Recombinant *Pichia pastoris* carrying Double Expression cassette of Epoxide Hydrolase Gene.** Hee Sook Kim\*. *Department of Food Science and Biotechnology, College of Engineering, Kyungsoo University, Busan 608-736, Korea* - A recombinant *Pichia pastoris* carrying double expression cassette of *Rhodotorula glutinis* epoxide hydrolase(RgEH) gene was developed and used for preparing enantiopure (S)-styrene oxide from racemic mixture of styrene oxide. BglIII restriction site of original RgEH gene (pPICZ B/RgEH #2) of previous report was mutated using PCR technique for the construction of double expression cassette containing promoter ( $P_{AOX1}$ ), EH gene and transcription terminator ( $TT_{AOX1}$ ) in pPICZ C vector. Double expression cassette with RgEH was inserted into the chromosomal DNA of *P. pastoris*.  $V_{max}$  ( $2.2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg dcw}^{-1}$ ) on (R)-styrene oxide of *P. pastoris* with double expression cassette was about 6-fold higher than that ( $0.4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg dcw}^{-1}$ ) of *P. pastoris* with single expression cassette. For the determination of the optimal condition, the effects of detergent and temperature on the enantioselective hydrolytic activity and yield of the enantiomer were investigated. When the reaction was performed at  $10^\circ\text{C}$  for 10 min in the presence of 0.5% Tween 20, enantiopure (S)-styrene oxide with 99.9% ee was obtained as the yield 43.4% from 20 mM racemic substrate.

**Key words :** Epoxide hydrolase, enantiopure, styrene oxide, double expression cassette

### 서 론

광학적으로 순수한 epichlorohydrin (ECH) 또는 styrene oxide (SO)와 같은 광학활성 에폭사이드들은 의약품 산업, 농약산업 및 정밀화학 산업에서 아주 중요한 중간체로 사용되고 있다[5,17]. 특히, 의약품에 있어서 광학이성질체들의 생리활성 차이가 존재함에 따라 광학적으로 순수한 의약품 소재 합성기술 개발연구가 활발히 진행되고 있으며, 이들의 효율적인 제조를 위해 사용되는 광학활성 중간체 제조기술의 개발이 중요시 되고 있다[1,18]. 광학활성 styrene oxide를 제조하는데 있어 주로 화학촉매 합성법이 사용되고 있지만 최근에 들어 epoxide hydrolase (EH) 및 monooxygenase (MO) 등 생촉매를 이용한 합성방법에 대하여도 많은 연구들이 진행되고 있다[3,6,9,15]. EH (EC 3.3.2.3)를 이용한 광학활성 epoxide 제조방법은 라세믹 epoxide를 기질로 사용하여 입체선택적 가수분해를 일으키는 광학분할 가수분해 (hydrolytic kinetic resolution) 방법이다. 다시 말하면, 라세믹 epoxide 혼합물 중 (R)- 또는 (S)-이성질체 중 한쪽만을 선택적으로 가수분해하여 diol로 만들어 제거함으로써 광학적으로 순수한 epoxide만을 제조하는 방법이다. EH의 장점은

NAD 또는 FAD와 같은 보조인자를 필요로 하지 않으며 광범위한 기질에 대하여 입체특이성을 가지며, 비교적 안정된 구조를 가지고 있어 상업적으로 유용한 효소로 평가되고 있다. EH를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조에 대한 연구로는 *Aspergillus niger*, *Agrobacterium radiobacter* 등을 생촉매로 하여 광학활성 epoxide 등을 제조한 연구가 있으며[4, 16], 효모의 일종인 *R. glutinis*, 담수어류인 *Danio rerio* 및 해양어류인 *Mugil cephalus*의 EH 유전자를 재조합한 균주를 생촉매로 하여 광학활성 epoxide를 제조한 연구들이 있다[9,10,14].

이제까지의 연구들을 보면 미생물, 곰팡이, 식물 및 동물 유래의 EH 유전자를 박테리아나 효모에 발현시켜 광학활성 epoxide를 제조한 여러 보고들이 있었으며 발현 vector나 숙주세포에 따라 단백질 발현량과 효소활성이 차이가 있었음을 알 수 있다. 발현 vector나 숙주세포의 종류에 따라 여러 장단점이 있으나 물에는 잘 녹지 않고 유기용매에 잘 녹는 기질을 사용하는 EH나 lipase들을 발현시키는 숙주로는 유기용매에 강한 *Pseudomonas sp.* 또는 효모의 일종인 *Pichia pastoris* 등을 쓰는 것이 고농도 반응에서 이점이 있다. *P. pastoris*는 methanol을 대사할 수 있는 효모 중 하나로 강력하면서 발현조절이 잘 되는 alcohol oxidase (AOX) promoter를 가지고 있어 methanol로 유도하면 30% 이상의 외래단백질을 발현시킬 수 있다고 하였다[7]. 또한 *P. pastoris*는 *E. coli*의 경우와 같은 장점들(저가, 많은 발현량 및 용이한 scale-up)과 함께 단백질 가공, 단백질 folding 및 번역 후 수

\*Corresponding author

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

E-mail : hskim@ks.ac.kr

식 등이 필요한 진핵세포의 유전자들을 활성형으로 얻을 수 있는 좋은 발현 system으로 알려져 있다[19]. *P. pastoris*에 사용하는 vector들은 숙주세포의 염색체에 상동성으로 재조합되기 때문에 재조합단백질의 발현량을 높이기 위한 방법으로 발현 vector를 multiple expression cassette로 제작하는 방법도 있으며 Belousova 등[2]은 *Herpes simplex virus*의 thymidine kinase 유전자를 adenoviral vector에 double expression cassette 방식으로 삽입시켜 효율적인 발현을 유도하는데 성공하였다고 보고하였다.

본 연구자들은 전보[12]에 보고한 바와 같이, 효모인 *R. glutinis*의 EH 유전자를 발현벡터인 pPICZ 벡터에 single expression cassette로 재조합하여 *P. pastoris* GS115균주에 발현시켰으며, *P. pastoris* 재조합균주를 이용하여 광합산도 99% 이상의 (S)-styrene oxide를 높은 수율로 얻은 바 있다. 본 실험에서는 보다 많은 단백질을 *P. pastoris*에 발현시키고자 RgEH 유전자의 시작 codon 앞에 Kozak 염기서열을 넣었으며 *R. glutinis*의 EH 유전자가 두 배로 전사될 수 있도록 pPICZ 벡터에 double expression cassette로 삽입시킨 재조합균주를 제작하였다. *P. pastoris*에 이중발현시킨 RgEH 재조합균주를 이용하여 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 동력학적 가수분해 활성을 측정하였으며 반응온도의 영향분석 및 detergent 첨가 등을 통해 가수분해능 및 광학활성 에폭사이드의 최종 수율을 향상시키고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양

유전자재조합 DNA를 발현시키기 위한 숙주로는 *Pichia pastoris* GS115 균주(Mut<sup>+</sup> his4)를 사용하였으며 DNA 클로닝 숙주로는 *E. coli* DH5a 균주를 사용하였다. 유전자재조합 균주를 선별하기 위한 항생제로는 zeocin을 사용하였으며 유전자재조합 *P. pastoris*를 선별하는 배지로는 YPDS/zeocin 고체 배지(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1 M sorbitol, 100 µg/ml zeocin 및 1.5% agar)를 사용하였으며 유전자재조합 *P. pastoris*를 배양하기 위한 배지로는 1% yeast extract, 1% peptone을 포함하는 BMGY 배지(100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), 1% glycerol, 4×10<sup>-3</sup>% biotin)와 BMMY 배지(100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), 0.5% methanol, 4×10<sup>-3</sup>% biotin)를 사용하였다. 5 ml의 BMGY 배지가 있는 100 ml 플라스크에 고체 배지의 단일 colony를 접종하여 30°C, 250 rpm에서 18-20 시간 배양한 후 이를 25 ml의 BMGY 배지가 함유되어 있는 500 ml 플라스크에 접종하여 배양하였다. 6-8 시간 배양 후 배양액을 원심분리(3,000× g)하여 얻은 세포를 BMMY 배지 25 ml에 다시 접종하여 배양하였다. 24 시간 동안 세포를 배양한 후 EH 발현 유도를 위하여 24 시간 간격으로 1% (v/v) methanol을 3 회 공급하였다.

### *R. glutinis* EH 유전자재조합 *P. pastoris* 제조

Double expression cassette 재조합균주를 얻기 위하여 전보[12]에서 보고한 pPICZ B/RgEH #2 DNA를 주형으로 사용하였으며 발현이 잘 될 수 있도록 시작 codon인 ATG 앞과 뒤의 염기서열이 Kozak sequence ((G/C)NNATGG)를 가지도록 5RgEHF (*EcoRI*) primer를 제작하였다. 또한 원래의 RgEH 염기서열 1076-1081 bp 위치에 *Bgl*III 제한자리가 있어 먼저 PCR 방법을 이용하여 *Bgl*III 제한자리를 돌연변이 시킨 다음 Fig. 2에서와 같이 RgEH 유전자가 두 번 들어가도록 유전자재조합 발현벡터를 제작하였다. *Bgl*III 제한자리를 없애기 위한 1차 PCR의 primer들로는 5RgEHF (*EcoRI*) (5' - gatcgaattcaaaaatggcgacacacacattc - 3')와 3RgEHMR (5' - agtagatttcgcctgggtaaaagcgagagggcacaag - 3') 및 5RgEHMF (5' - ctttgccctctcgtttaccaggcgaaatctact - 3')와 3RgEHR (*Xho*I no stop codon) (5' - tcctcgagcttctcccacatgagcaca - 3')를 이용하였으며 1차 PCR 결과로부터 얻은 약 1.1 kb와 170 bp 정도의 DNA조각을 주형으로 하고 5RgEHF 및 3RgEHR을 primer로 하여 2차 PCR을 행한 다음 pGEM-T easy vector에 삽입하고 염기서열을 확인하였다. *Bgl*III 자리를 돌연변이 시킨 pGEM-T/RgEH mut (AGATCT→AAATCT) DNA를 *EcoRI* 및 *Xho*I으로 제한하여 얻은 RgEH 유전자를 pPICZ C vector에 삽입하였으며 pPICZ C/RgEH mut (single copy)를 얻었다. Invitrogen의 실험지침서 [8]에 따라 *Bgl*III 및 *Bam*HI를 이용하여 pPICZ C/RgEH mutant로부터 P<sub>AOX1</sub>-RgEH-TT<sub>AOX1</sub>가 들어 있는 2.6 kb 정도의 DNA 조각을 잘라낸 다음 *Bam*HI으로 잘라 선형으로 만든 pPICZ C/RgEH mut (single) DNA에 연결하여 double copy 재조합 DNA를 제작하였다. pPICZ C/RgEH (double) DNA를 *P. pastoris* competent cell에 형질전환시켜 광학활성을 가진 에폭사이드를 제조하는데 생축매로 사용하였다.

### SDS-PAGE 전기영동 및 면역학적 검색법

재조합균주를 BMMY 액체배지에서 발현을 유도한 다음 원심분리하여 얻은 세포침전물에 breaking buffer를 넣어 600 nm에서 혼탁도가 100이 되게 현탁한 다음 같은 양의 acid-washed glass bead를 넣어 수 회 vortexing 함으로서 세포를 파쇄하여 상층액을 전기영동 시료로 사용하였다. 12% SDS-PAGE 전기영동을 행하였으며 단백질의 염색은 Coomassie blue R-250를 사용하였다. 발현된 (His)<sub>6</sub>-tag 융합단백질을 검색하기 위하여 SDS-PAGE gel 상에 분리된 단백질들을 nitrocellulose membrane로 전기이동시킨 다음 1차 항체로 (His)<sub>6</sub>-tag antibody (H-15, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), 2차 항체로는 peroxidase가 결합된 anti-rabbit IgG antibody (Jackson Immunoresearch, USA)를 이용하였으며 발색시약으로는 CN/DAB(4-chloronaphthol/3,3'-diaminobenzidine) solution (Pierce, USA)를 사용하였다.

**입체동력학적 가수분해반응**

Styrene oxide 가수분해반응에 대한 동력학적 분할반응을 시험하기 위하여 광학활성 (R)- 및 (S)-styrene oxide를 기질로 하여 초기속도를 측정하였으며 사용한 기질농도는 0-6 mM이었다. 세포 2 mg 건조중량 (dry cell weight, dcw)를 1 ml의 100 mM phosphate buffer (pH 7.5)에 현탁시킨 후 적정농도의 기질을 주입하고 반응시켰으며 초기속도 측정하기 위하여 반응 2분 후 cyclohexane으로 추출하여 GC로 분석하고 초기반응속도를 구하였다. 반응기로는 screw-cap vial을 사용하였으며, 30°C, 250 rpm의 진탕배양기에서 반응을 실시하였다.

**Tween 20 첨가 및 온도의 영향**

유전자재조합 *P. pastoris*의 epoxide 가수분해효소 활성에 대한 Tween 20의 효과를 측정하기 위하여 0, 0.1, 0.5, 1, 및 5% (v/v) 되게 Tween 20을 반응액에 첨가하고 20 mM 농도의 라세믹 styrene oxide를 주입한 다음 초기 가수분해 속도 및 입체선택성을 측정하여 평가하였다. 또한 epoxide 가수분해효소 활성에 대한 온도의 영향을 측정하기 위하여 10°C, 20°C 및 30°C에서 반응을 진행하였으며 기질농도는 20 mM 라세믹 styrene oxide를 사용하였다. 모든 반응에 사용한 재조합균주 *P. pastoris*의 세포중량은 2 mg dcw이었다.

**최적조건에서의 회분식반응**

*R. glutinis* EH 유전자를 double copy로 재조합하여 발현시킨 재조합균주 *P. pastris*를 이용한 회분식반응에서 라세믹 styrene oxide 혼합물로부터 광학순도가 높은 (S)-styrene oxide를 제조하기 위한 실험조건을 수립하였다. 반응액에 Tween 20을 0.5% (v/v) 첨가하고 20 mM 농도의 라세믹 styrene oxide를 주입한 다음 10°C에서 반응을 진행하였으며 초기 가수분해 속도 및 입체선택성을 측정하고 평가하였다.

**입체이성질체의 분석**

Styrene oxide의 광학순도 *ee* 값(enantiomeric excess) 및 수율 결정을 위한 광학이성질체 분석은 불꽃이온 검출기 (FID)가 장착된 가스크로마토그래프를 사용하였다. 분석용 column으로는 silica cyclodextrin capillary β-DEX 120 (30 m length, 0.25 mm ID, and 0.25 μm film thickness, Supelco Inc., USA) column을 사용하였다. 이동가스로 질소를 사용하였으며 split ratio는 1:100, flow rate는 0.5 ml/min으로 1 μl의 시료를 주입하여 분석하였고, column, injector, detector의 온도는 각각 100, 220, 220°C이었다. 광학순도 % *ee* = 100 x [S-R]/[S+R]로 계산하였다. 기질인 라세믹 및 enantiopure styrene oxide standard는 Aldrich Chemical Inc. (USA) 제품을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

***R. glutinis* EH 유전자를 가지는 double expression cassette 발현벡터 제작**

효모 발현에 이용되는 vector에는 숙주세포 내에 plasmid DNA 형태로 존재하는 vector와 숙주세포의 염색체내에 상동성재조합 방식으로 삽입되는 vector들이 있다. 효모 중에서도 *P. pastoris*에 사용되는 발현 vector들은 대부분 숙주세포 염색체의 AOX promoter 부위 (P<sub>AOX1</sub>) 또는 HIS 유전자 부위에 상동성재조합이 일어나 외래유전자가 삽입되도록 제작된 vector들이다. 본 연구에서는 Fig. 1에서와 같이 pPICZ vector DNA 내에 P<sub>AOX1</sub>-RgEH-TT<sub>AOX1</sub> expression cassette가 두 번 들어가도록 벡터를 제작하여, 숙주세포에서 RgEH 유전자가 두 배로 전사될 수 있도록 의도하였다. Double expression cassette를 제작하기 위해서 PCR 방법으로 BglIII 자리를 돌연변이 시켰으며 Fig. 2와 같이 확인하였다. B panel의 lane 2에서와 같이 주형으로 사용하였던 pPICZ B/RgEH #2의 경우[12], BamHI로 절단하였을 때 4.6 kb band가 보였으나 BglIII으로 절단하면 C panel의 lane 2에서와 같이 2.6 kb 와 2 kb band를 볼 수 있었으며 이는 RgEH 유전자내에 BglIII 자리가 있기 때문이다. BglIII 자리를 돌연변이 시킨 pPICZ C/RgEH mut (single)는 C panel의 lane 3에서와 같이 BglIII로 제한하면 4.5 kb의 band만 보여 돌연변이 된 것을 확인할 수 있었다. BglIII 및 BamHI를 이용하여 pPICZ C/RgEH mut로부터 P<sub>AOX1</sub>-RgEH-TT<sub>AOX1</sub>가 들어 있는 2.6 kb 정도의 DNA 조각을 잘라내어 BamHI으로 잘라 선형으로 만든 single copy plasmid DNA (linearized pPICZ

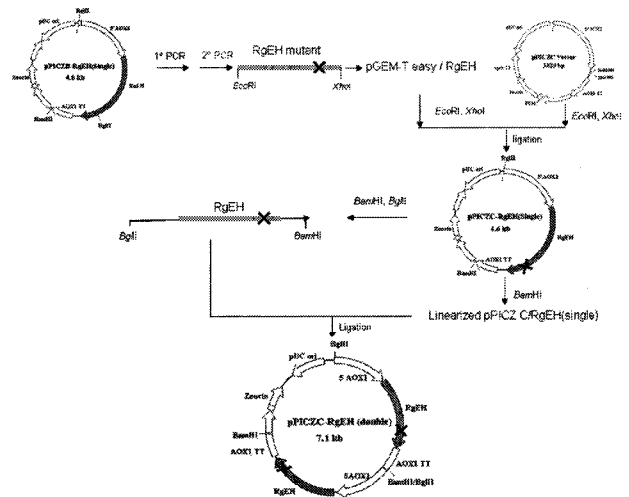


Fig. 1. Construction strategy of double expression cassette of *R. glutinis* EH in pPICZ C vector. BglIII site of original EH gene sequences was mutated by site directed mutagenesis before this construction. The symbol of × represented the mutation site.

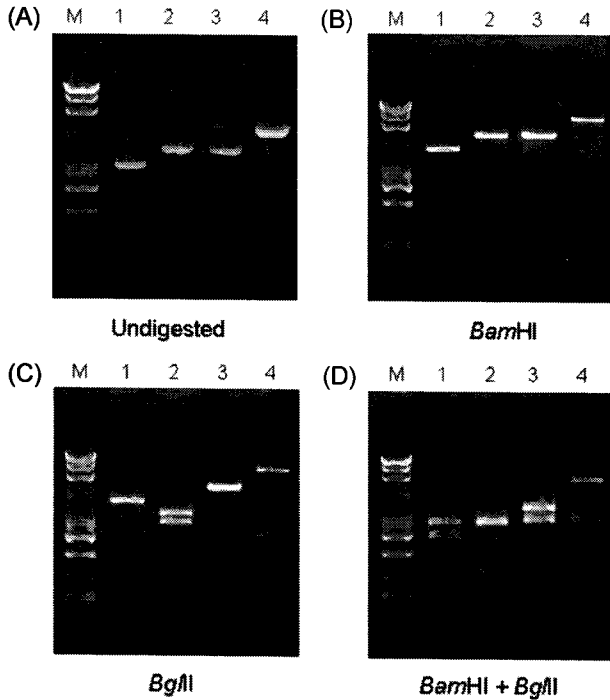


Fig. 2. Confirmation of the subcloned *R. glutinis* EH expression vectors on 0.8% agarose gel. Undigested (A) and digested plasmid DNA (B, C and D) with restriction enzymes, *Bam*HI, *Bgl*II or *Bam*HI+*Bgl*II. M: *Lamda* DNA/*Hind*III plus marker, lane 1, 2, 3 and 4: pPICZ C vector, pPICZ B/RgEH (single), pPICZ C/RgEH (mutated on *Bgl*II site, single), and pPICZ C/RgEH (double). Lane 2 of (D) looked likely two bands but consisted of three bands (2.0, 1.95 and 0.6 kb).

C/RgEH mut (single))에 삽입시켜 얻은 pPICZ C/RgEH (double)의 경우 *Bgl*II 와 *Bam*HI로 제한하였을 때 D panel의 lane 4에서와 같이 5.2 kb 및 1.9 kb 조각으로 절단되었으므로 올바른 방향으로 double expression cassette plasmid DNA가 제작되었음을 확인할 수 있었다.

*R. glutinis* EH 단백질이 제대로 발현되었는지 확인하기 위하여 double expression cassette 재조합 *P. pastoris* 및 single expression cassette 재조합 *P. pastoris*을 배양하고 methanol로 단백질발현을 유도한 후 SDS-PAGE 전기영동 및 면역학적 검사를 실행하였다. Fig. 3A에서와 같이 Coomassie Blue로 염색한 SDS-PAGE 전기영동 gel에서는 pPICZ C vector, pPICZ B/RgEH (single) 및 pPICZ C/RgEH (double)이 삽입된 재조합균주들 사이에서 RgEH 단백질(46 kDA)의 발현의 차이를 확인할 수 없었으나 면역학적 검색법으로는 pPICZ C/RgEH (double) 재조합균주에서 RgEH 단백질이 발현이 되었음을 확인할 수 있었다. *E. coli*를 숙주세포로 사용하는 경우 plasmid DNA의 자가복제로 발현시키고자 하는 단백질을 세포 전체 단백질의 약 30% 이상 발현시킬 수 있으나 불용성으로 발현되는 경우가 많은 반면 염색

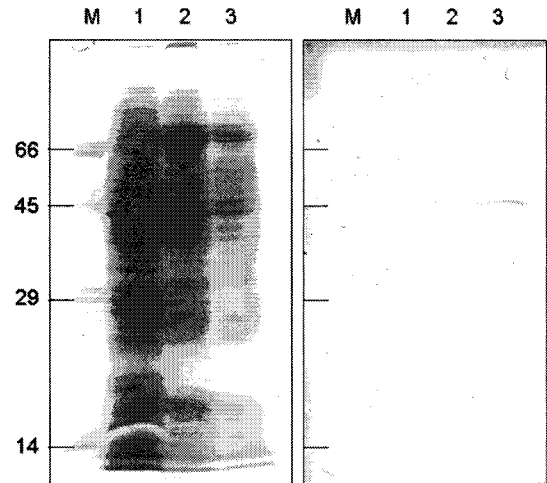


Fig. 3. SDS-PAGE electrophoresis (A) and immunoblotting (B). M: protein marker, bovine serum albumin, ovoalbumin, carbonic anhydrase and bovine alpha-lactalbumin, respectively, lane 1, 2 and 3: recombinants containing pPICZ C vector, pPICZ B/RgEH (single) and pPICZ C/RgEH (double), respectively. The amounts of cell lysate loaded for immunoblotting were six-fold more than those loaded for SDS-PAGE.

체에 상동성재조합으로 삽입되는 *P. pastoris*의 경우 발현량은 적으나 알맞은 접힘으로 인한 활성형 단백질로 발현된다. 적은 양의 단백질 발현을 검색하기 위하여 Fig. 3B에서 각 lane에 사용한 단백질의 양은 Fig. 3A에 사용한 단백질의 양보다 6배가 많은 양이었다. Fig. 3B에서와 같이 double expression cassette로 발현시킨 재조합균주가 single expression cassette로 발현시킨 pPICZ B/RgEH #2 보다 훨씬 더 진한 band를 볼 수 있는 것은 double expression cassette로 제작되어서 이기도 하지만 시작 codon 앞쪽에 Kozak sequence를 넣어서 제작한 것도 발현량을 향상시켰을 것이다.

### Double expression cassette 재조합 *P. pastoris*를 이용한 styrene oxide의 동력학적 가수분해

Fig. 4는 double expression cassette 재조합 *P. pastoris*를 이용하여 광학활성 이성질체인 (R)- 및 (S)-styrene oxide를 분해한 초기가수분해속도를 평가한 결과이다. 두 이성질체에 대한 가수분해속도는 낮은 농도에서 직선으로 높아지다가 점차 일정한 최대속도가 되는 Michaelis-Menten 속도식을 따르는 것으로 나타났다. 최대속도  $V_{max}$ 와 Michaelis 상수인  $K_m$  값은 Lineweaver-Burke plot으로부터 구하였다. Double copy 재조합 *P. pastoris*의 경우, (R)-styrene oxide에 대한  $V_{max}$ 와  $K_m$  은  $2.2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg dcw})^{-1}$  및 3.2 mM이었으며 (S)-styrene oxide에 대한  $V_{max}$ 와  $K_m$  은  $1.3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg dcw})^{-1}$  및 3.7 mM이었다. 전보[9]에 보고한 single copy 재조합 *P. pastoris*의 경우  $358.4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg dcw})^{-1}$

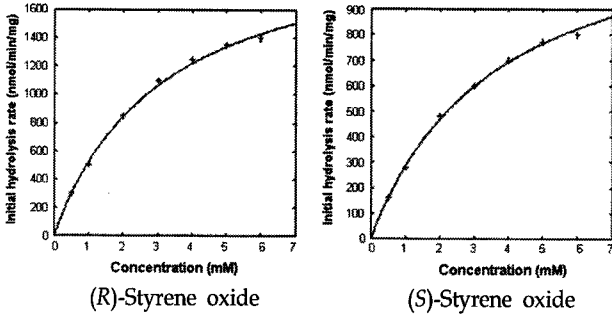


Fig. 4. Degradation of styrene oxides by double expression cassette recombinant *P. pastoris* containing *R. glutinis* EH gene. EH activity was determined using enantiopure (R)- and (S)-styrene oxides at different concentrations from 0 to 6 mM in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Reaction was carried out at 30°C.

와 비교하면 double copy 재조합 *P. pastoris*의 (R)-styrene oxide에 대한  $V_{max}$  값이 약 6배 향상되었다. Single copy 재조합인 경우 (R)- 및 (S)-styrene oxide에 대하여  $K_m$ 이 각각 4.7과 7.3 mM이었으며, double copy 재조합 *P. pastoris*도 (R)- 및 (S)-styrene oxide에 대하여 각각 3.18과 3.65 mM로 single copy 재조합 *P. pastoris*와 유사한 수준을 보였다.  $K_m$ 은 발현된 EH 효소의 고유한 특성이므로 발현량에 관계없이 유사한 값을 보인 반면,  $V_{max}$  값은 생축매의 양에 비례하기 때문에 double expression cassette를 삽입시키므로서 발현효율을 높인 생축매가 보다 높은 값을 보임을 알 수 있다.

**Tween 20 첨가 입체선택적 가수분해 반응속도에 미치는 효과**

Kronenburg 및 Bont [11]는 막-결합형태의 *R. glutinis* EH 효소에 비이온성 detergent를 첨가함으로써 반응속도를 향상시켰다고 보고하였으며 Lee 및 Lee [13]는 *R. glutinis*의 EH 단백질을 *P. pastoris*에 발현시킨 재조합균주를 동결건조시키는 과정에서 Triton X-100, Tween 20 및 Tween 80 등을 첨가하였을 때 epichlorohydrin 초기 가수분해 반응속도가 2배 이상 향상되었다고 보고된 바 있다.

Fig. 5는 Tween 20을 반응액에 최종농도 0.1, 0.5, 1 및 5% (v/v) 되도록 첨가하여 30°C에서 20 mM 라세믹 styrene oxide에 대한 가수분해 반응속도 및 수율을 측정된 결과이다. 세포중량 2 mg (dcw)을 사용하였을 때 Tween 20을 첨가한 모든 실험군에서 10분~15분 사이에 (R)-styrene oxide를 모두 분해시킬 수 있었으며 (S)-styrene oxide은 39.7%~41.7%의 수율로 얻을 수 있었다. Tween 20을 첨가하지 않은 경우 (R)-styrene oxide를 20분 만에 분해하여 (S)-styrene oxide를 30.2%를 얻은 결과와 비교해 볼 때 0.1~5%의 Tween 20의 첨가는 가수분해속도 및 수율을 향상시켰음을 알 수 있었으며, 그 중에서도 Tween 20을 0.5% 첨가한 반응이 가장 우수하였다.

**반응온도가 입체선택적 가수분해 반응속도에 미치는 효과**

Fig. 6는 double expression cassette 재조합 *P. pastoris* 생축매 2 mg dcw를 사용하여 20 mM 라세믹 styrene oxide 혼

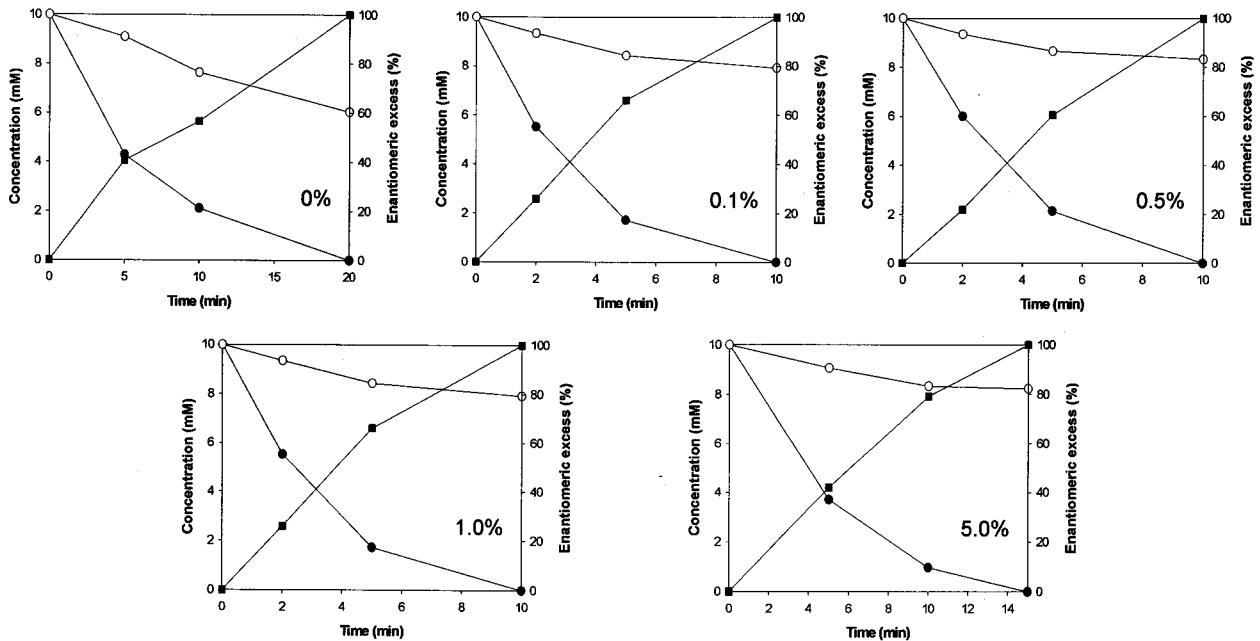


Fig. 5. Effect of Tween 20 on the resolution of racemic styrene oxide by double expression cassette recombinant *P. pastoris*. The substrate concentration was 20 mM racemic styrene oxide and reaction was carried out at 30°C. Symbols: (●) (R)-styrene oxide, (○) (S)-styrene oxide, and (■) enantiomeric excess.

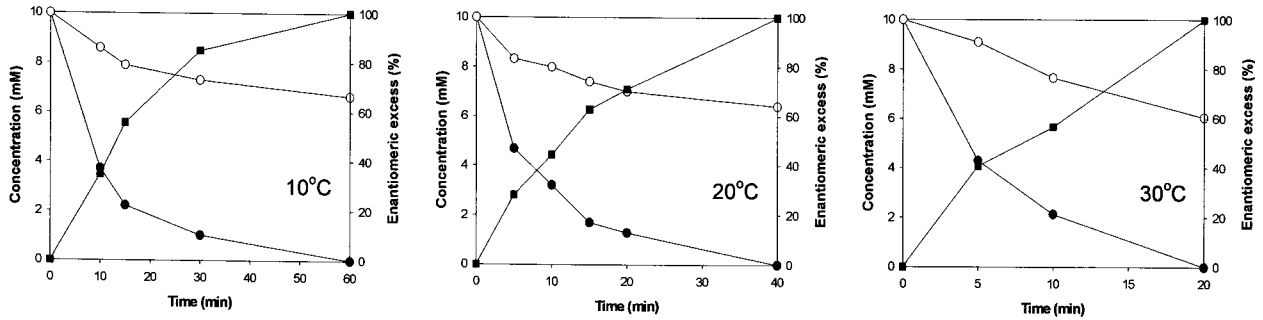


Fig. 6. Effect of the reaction temperature on the resolution of racemic styrene oxide by double expression cassette recombinant *P. pastoris*. The substrate concentration was 20 mM racemic styrene oxide. Symbols: (●) (*R*)-styrene oxide, (○) (*S*)-styrene oxide, and (■) enantiomeric excess.

합물을 가수분해하는데 있어 반응온도가 반응속도 및 광학활성 (*S*)-styrene oxide의 수율에 미치는 영향을 실험한 결과이다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, 반응온도가 30, 20 및 10°C로 낮아질수록 (*R*)-styrene oxide가 입체선택적으로 가수분해되어 제거되는 시간은 각각 20, 40 및 60분으로 반응속도는 낮아졌다. 그러나 생성물인 (*S*)-styrene oxide의 광학순도 및 수율 측면에서 결과를 살펴보면, *ee* 값은 모든 온도에서 99.9% *ee* 이상을 얻을 수 있었고, 수율은 각각 30.2%, 32.0% 및 33.2%로 반응온도를 낮출수록 높은 수율로 광학활성 에폭사이드를 얻을 수 있었다.

**최적조건에서 회분식반응을 이용한 (*S*)-styrene oxide의 제조**

Fig. 5 및 Fig. 6의 결과로부터 생축매 2 mg dcw 및 20 mM 농도의 라세믹 styrene oxide 반응혼합액에 Tween 20을 0.5% (v/v)로 첨가하고, 10°C에서 반응시키면 높은 광학순도의 (*S*)-styrene oxide을 높은 수율로 얻을 수 있음을 알 수 있었다. Fig. 7은 *R. glutinis* EH 유전자를 pPICZ vector에 double expression cassette로 재조합하여 발현시킨 재조합균주

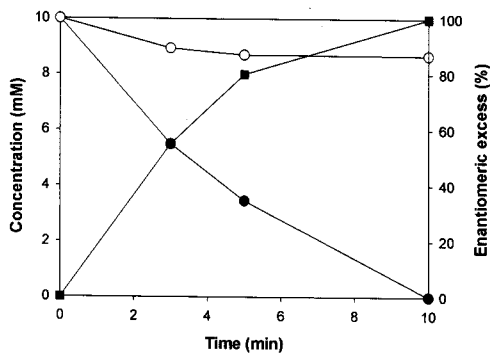


Fig. 7. Effect of Tween 20 and low temperature on the resolution of racemic styrene oxide by double expression cassette recombinant *P. pastoris*. Hydrolysis reaction was carried out in the presence of 0.5% Tween 20 at 10°C. Symbols: (●) (*R*)-styrene oxide, (○) (*S*)-styrene oxide, and (■) enantiomeric excess.

*P. pastris*을 이용한 회분식반응에서 라세믹 styrene oxide 혼합물로부터 광학순도가 높은 (*S*)-styrene oxide를 제조한 실험결과이다. Tween 20을 0.5% 첨가한 반응혼합물을 10°C에서 반응시켰을 때, 온도만 낮추거나 Tween 20만을 첨가했을 때에 비하여 가수분해속도 및 수율이 향상되었음을 알 수 있었다. 20 mM 라세믹 styrene oxide 혼합물을 기질로 사용하였을 때, 10°C에서 (*R*)-styrene oxide가 완전히 분해되는데 60분이 걸렸으나 Tween 20을 0.5%로 첨가하였을 때 10분이면 완전히 분해되어 분해속도가 6배 빨라짐을 볼 수 있었다. 또한 광학순도 >99.9%인 (*S*)-styrene oxide를 제조하는데 있어 Tween 20을 0.5% 첨가하여 30°C에서 반응하였을 때 수율이 41.7%이었으나 Tween 20을 0.5% 첨가하고 반응온도를 10°C로 낮춘 경우 43.4%의 수율로 향상되었다.

**요 약**

*Rhodotorula glutinis* epoxide hydrolase (EH) 유전자를 pPICZ vector에 이중발현 cassette로 재조합하여 발현시킨 재조합균주 *Pichia pastoris*를 제작하였으며 라세믹 styrene oxide 혼합물로부터 고순도 광학활성 (*S*)-styrene oxide를 제조하는데 사용하였다. 본 연구에서 사용된 *R. glutinis* EH 유전자는 전보에서 사용한 pPICZ B/RgEH plasmid DNA를 주형으로 하여 얻었으며 PCR 방법으로 BgIII 제한자리를 돌연변이 시키고 AOX1 promoter ( $P_{AOX1}$ )-RgEH 유전자-전사종결서열( $TT_{AOX1}$ )을 이중으로 가진 이중발현 cassette를 만들어 *P. pastoris*의 염색체 DNA에 삽입시켰다. 반응온도를 30°C로 하였을 때, RgEH를 이중발현 cassette로 발현시킨 재조합균주 *P. pastoris*의 (*R*)-styrene oxide에 대한  $V_{max}$  값은  $2.2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg dcw})^{-1}$ 으로 단일발현 cassette로 발현시킨 *P. pastoris*의  $0.4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg dcw})^{-1}$ 에 비하여 6배 향상되었다. 광학순도가 높은 (*S*)-styrene oxide를 제조하는 최적조건을 찾기 위하여 입체선택적 가수분해 속도 및 수율에 미치는 detergent 및 온도의 효과를 실험하였으며, Tween 20을 0.5% 첨가하고 10°C로 반응시킨 경우 10분 반응을 통해

99.9% ee 이상의 고순도 (S)-styrene oxide를 43.4% 얻을 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 2007년도 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. Belousova, N., R. Harris, K. Zinn, M. A. Rhodes-Selser, A. Kotov, O. Kotova, M. Wang, R. Aurigemma, Z. B. Zhu, D. T. Curie and R. D. Alvarez. 2006. Circumventing recombination events encountered with production of a clinical-grade adenoviral vector with a double-expression cassette. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1488-1493.
3. Besse, P. and H. Veschambre. 1994. Chemical and biological synthesis of chiral epoxides. *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
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. 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: Enzym.* **16**, 217-222.
7. Higgins, D. R. and J. M. Cregg. 1998. Instruction to *Pichia pastoris*, pp. 1-15, In Higgins, D. R. and J. M. Cregg (eds.), *Pichia protocols*. Humana Press, New Jersey, U. S. A.
8. Instruction Manual. 2003. pPICZ A, B, and C. pp 24-30, Invitrogen Corporation, California, U.S.A.
9. Kim, H. S. and E. Y. Lee. 2006. Cloning and characterization of Zebrafish microsomal epoxide hydrolase based on bioinformatics. *Kor. J. Microbiol. Biotech.* **34**, 129-135.
10. Kim, H. S., S. J. Lee and E. Y. Lee. 2006. Development and characterization of recombinant whole-cell biocatalysts expressing epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis* for enantioselective resolution. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **43**, 2-8.
11. 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.
12. 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*. *Enz. Microbiol. Tech.* **35**, 624-631.
13. 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.
14. Lee, S. J., H. S. Kim, S. J. Lee, S. Park, B. J. Kim, M. I. Schuler and E. Y. Lee. 2007. Cloning, expression and enantioselective hydrolytic catalysis of a microsomal epoxide hydrolase from a marine fish, *Mugil cephalus*. *Biotech. Lett.* **29**, 237-346.
15. 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.
16. 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.* **45**, 46810-46817.
17. Schmid, A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts and B. Witholt. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**, 258-268.
18. Steineiber, A. and K. Faber. 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 552-558.
19. Xiong, A.-S., Q.-H. Yao, R.-H. Peng, P.-L. Han, Z.-M. Cheng and Y. Lee. 2005. High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 418-428.