

Rhodotorula glutinis 유래의 고효율 재조합 Epoxide Hydrolase를 이용한 라세믹 Styrene Oxide의 비대칭 광학분할

박 규 덕 · 최 성 희 · 김 희 숙 · † 이 은 열
경성대학교 공과대학 식품생명공학과, ¹경희대학교 환경·응용화학대학 화학공학과
(접수 : 2008. 7. 30., 게재승인 : 2008. 10. 8.)

Asymmetric resolution of racemic styrene oxide using recombinant *Escherichia coli* harboring epoxide hydrolase of *Rhodotorula glutinis*

Kyu Deok Park, Sung Hee Choi, Hee Sook Kim, and Eun Yeol Lee[†]
Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungsung Univ., Busan 608-736, Korea
¹Dept. of Chemical Engineering, Kyung Hee Univ., Gyeonggi-do 446-701, Korea
(Received : 2008. 7. 30., Accepted : 2008. 10. 8.)

The effects of reaction temperature and the addition of various detergents on the enantioselective hydrolysis activity of the recombinant *Escherichia coli* containing the epoxide hydrolase (EH) gene of *Rhodotorula glutinis* were investigated for the production of enantiopure styrene oxide. The recombinant *E. coli* harboring the EH gene from *R. glutinis* exhibited the enantiopreference toward (*R*)-styrene oxide with the maximum hydrolytic activity of 165.04 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of dry cell weight (dcw). The addition of 0.5% (w/v) Tween 20 at 10°C increased the initial hydrolysis rate and enantioselectivity by 1.45-fold and 2.0-fold, respectively. Enantiopure (*S*)-styrene oxide was prepared with 99% *ee* enantiopurity and 46.0% yield (theoretical yield=50%) from 20 mM racemic styrene oxide.

Key Words : enantioselective hydrolysis, epoxide hydrolase, *Rhodotorula glutinis*, enantiopure (*S*)-styrene oxide

서 론

인체 내에서 생리활성 작용을 하는 대부분의 생화학 물질들은 분자구조 내에 비대칭 탄소 (chiral carbon)를 가지고 있어 여러 가지의 광학이성질체들이 존재할 수 있다. 이러한 광학이성질체들 중에서 특정 광학이성질체 (enantiomer)만이 원하는 생리활성을 가지며, 나머지 이성질체들은 활성이 없거나 경우에 따라서는 심각한 부작용을 주는 경우가 많이 보고되고 있다(1). 이런 라세믹 (racemic) 의약품의 대표적인 부작용 사례로 1950년대 독일에서 개발되어 라세믹 형태로 판매된 탈리도마이드 (Thalidomide)를 들 수 있다. 1960년대에 임신부들을 위한 입덧 (morning sickness) 억제제로 승인을 얻어 유럽과 일본에서 판매가 되었는데, 탈리도마이드를 복용했던 임신부들이 기형아를 출산한 것으로 보고되면서 이 약물이 신생아

에게 치명적인 영향을 준다는 사실이 알려지게 되었다. 이러한 문제의 재발을 사전에 예방하기 위하여 미국 FDA에서는 라세믹 신약의 경우 각각의 광학이성질체에 대하여 별개의 독립적인 임상 진행을 요구하고 있어, 선진 제약업체들은 신약 개발단계로부터 순수한 광학이성질체로 개발하고 있다. 이와 같이 광학활성의 중요성이 커짐에 따라 광학활성 물질 최종제품 합성에 사용될 수 있는 광학활성 중간체 (chiral intermediates) 제조 기술 개발의 중요성이 부각되고 있다(2).

광학활성 물질 합성에 사용될 수 있는 대표적인 합성 중간체인 광학활성 에폭사이드 (chiral epoxide)는 oxirane ring의 불안전성 및 산소원자의 전기음성도에 기인한 극성 때문에 반응성이 우수하여 친 전자성반응, 친 핵성반응, 산·염기반응, 산화·환원반응 등 다양한 반응을 유도시킬 수 있다. 따라서 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 사용될 수 있어 고부가가치 정밀 화학제품으로서의 상업화 가능성이 높을 것으로 기대된다(3). 광학활성 에폭사이드를 화학 비대칭 합성법 (asymmetric synthesis)을 이용하여 제조하는 경우, 이론 수율을 100%까지 얻을 수 있는 장점이 있다(4, 5). 반면에 고가의 화학촉매를 사용하고, 특정구조를 가진 에폭사

† Corresponding Author : Department Of Chemical Engineering,
Kyung Hee University, Gyeonggi-do 446-701, Korea
Tel : +82-31-201-3839, Fax : +82-31-202-1946
E-mail : eunylee@khu.ac.kr

이드에만 한정적으로 적용된다는 단점이 있다. 최근에는 이러한 문제점을 해결하기 위한 대안으로 입체특이성 및 위치선택성이 우수한 생촉매를 이용한 새로운 합성방법 개발의 중요성이 부각되고 있다(6-8).

생촉매를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조방법으로 에폭사이드 가수분해효소 (epoxide hydrolase, EH)를 이용한 입체선택적 광학분할 (enantioselective kinetic resolution) 방법이 있다. EH는 (R), (S)-이성질체로 혼합되어 있는 저가의 라세믹 에폭사이드 기질로부터 특정 광학이성질체만을 선택적으로 가수분해 시켜 제거함으로써 나머지 광학이성질체를 고순도로 제조할 수 있다. 이 기술의 장점을 살펴보면, 10 \$/kg 미만의 저렴한 비용으로 생촉매를 제조할 수 있으므로 고가 (>1,000 - 10,000 \$/kg)인 화학 키랄촉매 대비 가격 경쟁력이 있을 것으로 기대된다. 또한, monooxygenase 등의 산화효소와 비교하여 효소 안전성이 높으며, cofactor 재순환이 요구되지 않는 등 산업용 생촉매로서의 특성이 우수하다(5).

EH를 이용한 동력학적 분할 (kinetic resolution)법은 특정 이성질체를 제거하면서 광학활성 에폭사이드를 제조하기 때문에 이론적 수율이 50%로 제한된다는 단점이 있다. 따라서 이러한 생촉매 공정의 상업화를 위해서는 최종 수율을 높여야 한다. 미생물 세포를 생촉매로 사용한 경우, 세포내에 발현된 EH 효소량이 근본적으로 적고 생촉매 제조과정에서도 활성 손실이 높아 반응 수율이 낮으며 반응시간도 지연된 결과들이 보고되었다(9, 10). 반면에, *Rhodotorula glutinis* EH를 발현시킨 재조합 *Escherichia coli*를 생촉매로 사용하여 라세믹 styrene oxide 기질을 비대칭 분할시켰을 때, wild type *R. glutinis* 대비하여 (R)-styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해활성이 높은 재조합 생촉매를 개발할 수 있었다(11). 본 논문에서는 입체특이적 가수분해 활성이 우수한 *R. glutinis* 유래의 EH 유전자 (RgEH)를 pColdI 및 pET-21b(+) 발현벡터에 재조합시킨 *E. coli*를 제작하고, 이를 생촉매로 사용하여 라세믹 styrene oxide 기질로부터 광학활성 (S)-styrene oxide를 제조하였다. *R. glutinis* EH 유전자를 재조합시킨 *E. coli* 생촉매의 EH 활성에 미치는 배양온도 영향을 분석하였으며, 입체선택적 가수분해 활성을 기준으로 생촉매로서의 특성을 비교·평가하였다. 입체선택적 가수분해 반응과정에서의 반응온도 영향, 계면활성제 첨가 및 초기기질 농도 영향을 분석하여 광학활성 (S)-styrene oxide 제조 조건을 최적화하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

라세믹 styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해능을 가진 *R. glutinis*의 EH를 pET-21b(+) 벡터에 재조합 시켜 pET-21b(+)/RgEH 플라스미드 DNA를 제작하였다(12). pColdI 벡터는 Takara (일본)에서 구입하여 사용하였다. *E. coli* DH5 α 균 (Invitrogen, 미국)은 플라스미드 DNA들의 증폭을 위해 사용하였으며, *E. coli* BL21 (DE3)균 (Invitrogen, 미국)은 발현용 균주로 사용하였다. 제한효소 *Xho* I 과 *EcoR* I 은 New England Biolab사 (영국)에서, T4 DNA ligase는 Invitrogen사 (미국)에서 구입하였다. DNA polymerase는 Takara사 (일본)의 LA TaqTM을 사용하였다.

PCR purification Kit, DNA miniprep Kit 그리고 Qiaquick gel extraction Kit 는 Qiagen사 (Hilden, 독일)에서 구입하였다. 올리고머의 합성과 유전자 염기서열 분석은 제노텍사 (한국)에 주문·의뢰하였다. 발현 유도물질인 IPTG (Isopropyl- β -D-galactoside)는 Merck사 (미국)에서 구입하였고, 항생제로 사용한 ampicillin은 USBiological사 (미국)에서 구입하였으며, 나머지 시약들은 모두 분석용 등급 이상을 사용하였다. 광학 분할반응의 기질인 라세믹 styrene oxide와 (R)-, (S)-styrene oxide는 Aldrich Chemical Co (미국)에서 구입하였으며, GC 분석시 추출용액으로 사용한 cyclohexane은 JUNSEI사 (일본)에서 구입하였다.

pCold I 벡터용 *R. glutinis* EH의 발현 시스템 구축

pET-21b(+)/RgEH 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, PCR 방법으로 *R. glutinis* EH 유전자를 증폭하였다. 발현용 벡터인 pCold I 벡터에 보다 쉽게 클로닝하기 위하여 사용한 specific primer들은 5RgEHF (*Xho* I) : 5'- GACCTCGAGATGGCGACA CACACATTCGCTTC-3'와 3RgEHR (*EcoR* I) : 5'- GAC GAA TTCCTACTTCTCCAGATGACGCC-3'이었다. PCR 조건은 변성 온도 94 $^{\circ}$ C, annealing 온도 60 $^{\circ}$ C, 합성 온도 72 $^{\circ}$ C이었고, 총 30 cycle을 수행하였다. 정제한 PCR product와 pColdI 벡터를 각각 *EcoR* I과 *Xho* I으로 가수분해하여 전기영동한 다음 RgEH band 및 pColdI 벡터를 agarose gel에서 DNA를 추출, 정제하고 T4 DNA ligase를 사용하여 pColdI 벡터와 RgEH를 ligation한 다음 클로닝용 숙주세포인 DH5 α 에 형질전환하여 ampicillin이 함유된 LB 한천배지에서 16시간 배양한 후 colony를 선택하였다. 선택된 colony로부터 플라스미드 DNA를 정제하고 *EcoR* I과 *Xho* I 효소로 가수분해한 후 전기영동으로 pColdI/RgEH가 들어간 형질전환체를 확인하였다. 이렇게 확인된 플라스미드들은 Qiagen miniprep Kit를 이용하여 DNA를 정제하였으며, 염기서열을 확인하기위해 제작한 pCold용 primer인 5ColdF : 5'- CTGTAAAGCACGCCATATCGCCGAAAGG-3'와 3ColdR : 5'- CAAATGGCAGGGATCTTAGATTCTGTG-3'을 이용하여 DNA 염기서열을 확인하였다. 염기서열이 확인된 pColdI/RgEH 플라스미드 DNA를 발현균주인 BL21 (DE3)에 형질전환 시켰다.

세포 배양조건

pColdI 벡터와 pET-21b(+) 벡터에 삽입된 *R. glutinis* EH 재조합 균주들은 40% glycerol 용액을 첨가한 배지에 현탁하여 -70 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관하였다. 저온배양의 경우, pColdI/RgEH와 pET-21b(+)/RgEH 재조합 *E. coli*의 발현 실험을 위하여 ampicillin (50 μ g/ml)이 첨가된 10 ml의 LB배지에 overnight seed culture 하였으며 150 ml의 새로운 LB 배지가 들어있는 500 ml 삼각플라스크에 2.25 ml를 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 진탕 배양하였다. 배양액의 흡광도가 OD₆₀₀에서 0.4-0.5에 이르렀을 때 배양액을 15 $^{\circ}$ C로 냉각하여 30분간 방치 한 후, 단백질의 발현을 유도하기 위하여 최종농도가 1 mM이 되도록 IPTG를 첨가하고 15 $^{\circ}$ C에서 24시간 진탕배양 하였다(13). pET-21b(+)/RgEH 재조합 균주를 37 $^{\circ}$ C 배양의 경우 발현 실험을 위하여 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 $^{\circ}$ C에서 진탕 배양하였다.

흡광도가 OD₆₀₀에서 0.4-0.5가 된 시점에서 배양액에 최종농도가 1 mM이 되도록 IPTG를 첨가하고 37°C에서 3시간 30분 진탕배양 하였다.

R. glutinis EH 유전자 재조합 E. coli의 styrene oxide에 대한 가수분해능 평가

발현벡터 pColdI 및 pET-21b(+)에 *R. glutinis* EH를 재조합한 균주의 입체선택적 가수분해 반응을 수행하였다. 반응에 사용한 가수분해 재조합 균주는 1 ml 당 0.2 mg (dry cell weight, dcw)을 사용하였으며, 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 현탁시켜 반응액의 전체부피를 1 ml로 하고 기질로서 20 mM 라세믹 styrene oxide를 첨가하였다. 반응기로는 screw-cap vial을 사용하였으며 30°C, 230 rpm의 진탕배양기에서 반응을 수행하였다. 적정 시간동안 반응시킨 가수분해 반응액을 동량의 cyclohexane으로 추출하였다. 광학활성 styrene oxide 및 광학순도 (Enantiomeric excess, ee (%)=(S-R)/(S+R)×100) 분석은 불꽃이온 검출기 (FID, flame ionization detector)가 장착 되어 있는 gas-chromatography (GC, Shimadzu, 일본)를 사용하였다. 분석용 column으로는 (R)-과 (S)-styrene oxide에 대한 분리능이 있는 Supelco β-Dex 120 (0.25 mm ID, 30 m length, 25 μm film thickness) column을 사용하였다. 이동가스로는 질소를 사용하였으며, GC 분석조건으로는 split ratio는 1 : 20, flow rate는 0.5 ml/min으로 1 μl의 시료를 주입하여 분석하였고, 컬럼 (column), 주입부 (injector) 및 검출기 (detector)의 온도는 각각 100, 220 및 220°C이었다.

저온 배양한 pET-21b(+)/RgEH 유전자 재조합 E. coli의 광학활성 styrene oxide 생산 조건의 최적화

EH 활성을 이용한 광학분할 반응속도와 광학순도에 미치는 반응온도에 따른 영향을 분석 하기위해 pET-21b(+)/RgEH 유전자 재조합 *E. coli*를 각각 1 ml당 0.2 mg (dcw)씩 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 현탁시킨 후, 20 mM의 라세믹 styrene oxide를 넣어 10, 20, 30, 40 및 50°C에서 반응시키면서 styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해능을 평가하였다.

입체선택적 광학분할 반응속도와 광학순도에 대한 계면활성제의 첨가에 따른 영향을 분석 하기위해 Tween 20, Tween 80, glycerol 및 PEG 200 등의 계면활성제를 농도별로 첨가하고, 기질인 20 mM의 라세믹 styrene oxide를 주입 한 다음, 30°C에서 반응하여 입체선택적 가수분해능을 평가하였다.

기질 농도에 따른 생축매 활성 변화를 분석 하기위해 20 mM, 50 mM, 80 mM, 100 mM 라세믹 styrene oxide를 주입한 다음 반응온도 30°C에서 고농도 styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해반응을 수행하였다.

재조합 E. coli의 광학 분할 속도의 동역학적 상수 결정

광학 분할 속도의 동역학적 상수를 결정하기 위하여 광학적으로 순수한 (R)-styrene oxide와 (S)-styrene oxide를 이용하였다. Styrene oxide의 수용액에 대한 용해도가 약 7 mM이므로 실험에 사용한 styrene oxide의 농도는 0.5~6 mM 을 사용하였다. 반응은 5 ml screw-cap vial에 990 μl의 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 넣고 기질인 (R)-, (S)-styrene oxide를 여러 농도로 용해시킨 후 반응액 내의 세포의 최종 농도가

1 ml 당 0.2 mg (dcw)이 되도록 세포를 주입하여, 230 rpm의 진탕배양기에서 가수분해 반응을 수행하였다. 10°C 및 30°C에서 반응 후 남은 기질인 styrene oxide의 일부를 동량의 cyclohexane으로 추출하여 chiral column이 장착된 GC로 분석하였다.

결과 및 고찰

R. glutinis epoxide hydrolase 유전자의 발현 시스템 구축 및 단백질 발현 특성평가

이전 연구에서 클로닝한 *R. glutinis* epoxide hydrolase (RgEH)의 염기서열을 참고하여 제작한 primer를 이용하여 pET-21b(+)/RgEH 플라스미드 DNA를 주형으로 PCR을 수행하고 RgEH 유전자를 증폭하였다. 먼저 PCR product를 전기영동을 행하여 1200 bp 정도의 band를 확인한 후 제한효소인 *EcoR* I 과 *Xho* I 으로 가수분해하여 pColdI 벡터에 삽입하였다. pColdI/RgEH 플라스미드 DNA가 들어간 DH5a 형질 전환체들로 부터 플라스미드 DNA를 정제한 다음, pColdI 벡터에 RgEH가 올바른 방향으로 삽입되었음을 확인하였다. 새롭게 구축된 재조합 플라스미드인 pColdI/RgEH 및 pET-21b(+)/RgEH 유전자를 발현시키기 위하여 발현균주인 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질 전환시켜 재조합 *E. coli*를 얻을 수 있었다.

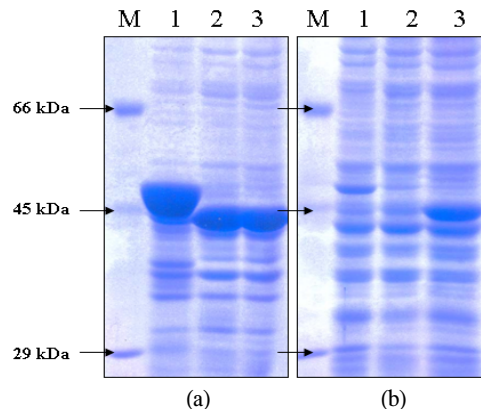


Figure 1. SDS-PAGE analysis of the recombinant *E. coli* containing *R. glutinis* epoxide hydrolase gene. (a) whole-cell extract, (b) supernatant after sonication. The proteins of cell extracts were separated on 12% gel. (a) and (b) lane 1: the recombinant *E. coli* containing pColdI/RgEH with induction (culture temperature: 15°C), (a) and (b) lane 2: the recombinant *E. coli* containing pET-21b(+)/RgEH with induction (culture temperature: 37°C), (a) and (b) lane 3: the recombinant *E. coli* containing pET-21b(+)/RgEH with induction (culture temperature: 15°C).

*R. glutinis*의 EH 유전자를 재조합 한 *E. coli*의 배양온도에 따른 EH 단백질의 발현 결과는 Fig. 1(a)와 같았다. 재료 및 방법에서와 같이 발현온도를 달리하여 배양하였으며 pColdI/RgEH (15°C, 24시간 배양)와 pET-21b(+)/RgEH (15°C, 24시간 배양) 및 pET-21b(+)/RgEH (37°C, 3시간 30분 배양) 플라스미드 DNA를 가진 균주들에 대하여 실행하였다. Fig. 1 (a)에서와 같이 모든 재조합 균주에서 *R. glutinis* EH는 약 45 kDa 크기로 발현되었음을 확인할 수 있었다. pET-21b(+)/RgEH 재조합 균주의 경우 37°C에서 3시간 30분 배양했을 때 보다(a) lane 2), 15°C 저온으로 24시간 배양하였을 때 단백질의 발현이 많음을

알 수 있었다((a) lane 3). 그리고 저온 배양한 pCold I/RgEH 재조합 균주에서 가장 많이 발현되었지만, 세포를 깨서 수용성 단백질 발현 정도를 확인한 경우(Fig. 1(b)), 저온 배양한 pET-21b(+)/RgEH 보다 발현양이 적음을 알 수 있었다((b) lane 1과 3).

R. glutinis EH 유전자 재조합 E. coli의 styrene oxide에 대한 가수분해반응 평가

저온 배양한 pColdI/RgEH의 경우 30분 만에 (R)-styrene oxide가 완전히 분해되었으며, 99% ee 값을 가진 (S)-styrene oxide를 이론수율 50%대비 26.0% 수율로 얻을 수 있었다. 37°C에서 배양한 pET-21b(+)/RgEH는 120분 만에 21.4% 수율로 얻은 반면, 저온인 15°C에서 IPTG로 발현을 유도한 pET-21b(+)/RgEH는 20분 만에 24.0% 수율로 얻을 수 있었다(data not shown).

위의 결과를 종합해 볼 때 단백질의 발현양은 벡터의 종류나 배양온도에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나, 가수분해 활성에서는 많은 차이를 보였다. pColdI 벡터는 cold shock 단백질의 promoter 유전자 (cspA)를 가지고 있어 저온 배양을 통해 재조합한 단백질을 수용성 형태로 발현시키는 벡터이나, pET-21b(+)-벡터는 일반적으로 37°C에서 발현시키는 벡터이다(13). pET-21b(+)-벡터의 경우 37°C와 15°C 모두에서 재조합 단백질이 많이 발현되었으나(Fig. 1(a) lane 2와 3), 배양온도에 따라 가수분해 활성에서 차이가 난 것은 단백질 발현 형태가 달랐기 때문으로 판단된다. 외래 유전자를 숙주인 대장균에 발현하는 경우, 저온에서 발현속도를 낮추어 발현시키면 inclusion body 형성이 적고 올바른 형태로 발현이 잘 일어나기 때문에 높은 활성을 보인 것으로 판단된다. 저온에서 발현시키기 위하여 사용하는 pColdI 벡터의 경우 여러 번의 계대배양 과정에서 EH 활성을 잃어버리는 현상이 관측되어, pET-21b(+)-벡터에 RgEH를 재조합한 균주를 15°C에서 저온 배양하면서 R. glutinis EH를 발현시킨 세포를 생축매로 사용하기로 결정하였다.

저온 배양한 pET-21b(+)/RgEH 유전자 재조합 E. coli를 이용한 광학활성 styrene oxide의 생산

pET-21b(+)/RgEH 재조합 균주를 15°C에서 배양하여 일반적인 반응온도인 30°C에서 가수분해 반응을 수행한 결과, 최종 수율이 24.0%라는 다소 낮은 결과를 얻었다. 수율향상을 위해 pET-21b(+)/RgEH 재조합 생축매의 EH 활성에 미치는 반응온도의 영향을 분석하기 위하여 10~50°C 범위에서 라세믹 styrene oxide에 대한 입체선택성 가수분해 반응을 수행하였다(Fig. 2).

10°C 반응의 경우 반응시간 60분 만에 기질의 광학순도가 99%에 도달하였고, 이때 최종 목적물인 (S)-styrene oxide의 수율은 29.0%였다. 20°C 반응의 경우 반응시간 25분 만에 기질의 광학순도가 99%에 도달하였고, (S)-styrene oxide의 수율은 27.1%였다. 50°C 반응의 경우 25분 이후 48%에서 더 이상 광학순도가 증가하지 않았다. 최종수율은 반응온도 10°C에서 29.0%로 가장 높았지만, 반응시간은 반응온도 30°C에 비해 3배 늦어졌다. 따라서 반응온도가 EH의 입체선택적 가수분해반응에 중요한 영향인자임을 알 수 있었다. 다른 EH를 이용하여 동력학적 분할 반응을 수행한 경우에서도 온도가 낮을수록 높은 E 값을 얻은 결과가 보고된 바 있다(14). Fig. 2에서와 같이 pET-21b(+)/RgEH 재조합 균주의 라세믹 styrene oxide에 대한 동력학적 분할 반응에서 반응속도와 반응생성물의 광학순도 및

수율을 고려하였을 때 반응온도 10°C가 최적조건임을 알았다.

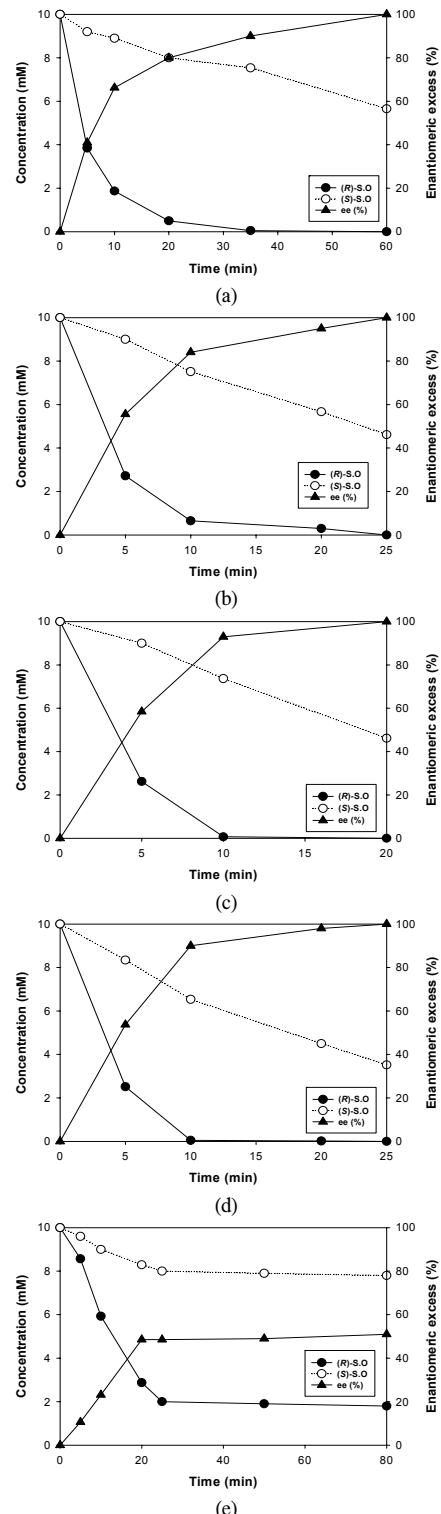


Figure 2. Effects of the reaction temperature on the enantioselective batch kinetic resolution by the recombinant *E. coli* containing pET-21b(+)/RgEH. The substrate concentration of racemic styrene oxide was 20 mM. Recombinant *E. coli* was cultured at 15°C for 24 hours. (a) 10°C (b) 20°C (c) 30°C (d) 40°C (e) 50°C.

Membrane-associated된 단백질인 *R. glutinis*의 EH 효소에 Thesit 및 sucrosemonolaurate 등의 비이온성 detergent를 첨가

하여 생촉매 활성을 향상시킨 결과가 보고되었다. 또한, RgEH를 생촉매로 사용하여 라세믹 styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해반응에서 Tween 20 등의 계면활성제를 첨가하여 EH 활성을 향상시킨 결과도 보고된 바 있다(15). 반응온도 10°C에서 에폭사이드 가수분해 반응 시 (S)-styrene oxide의 수율은 향상되었지만, 광학순도 99% ee 값을 얻기 위해 요구되는 반응시간은 반응온도 30°C보다 3배 길어지는 결과를 보였다. 이를 극복하기 위해 다양한 계면활성제를 사용하여 가수분해 속도, 반응생성물의 광학순도 및 수율을 향상시키고자 하였다.

먼저 Tween 20을 첨가하여 30°C에서 반응을 수행한 결과, 0.5% (w/v) Tween 20 첨가하면, 반응시간 10분에 기질의 광학순도가 99% ee에 도달하였고, 이때 (S)-styrene oxide의 수율은 40.2%였다. 이는 반응온도 30°C에서 계면활성제를 첨가하지 않은 에폭사이드 가수분해반응과 비교해서 99% ee 값을 얻기 위해 요구되는 반응시간은 1/2로 줄었으며, 수율은 약 1.7배 증가한 결과이다. Tween 80 첨가 반응을 수행한 결과 5% (w/v) Tween 80 첨가 시, 반응속도는 40분이었고, 수율은 31.3%이었다. Glycerol을 첨가하고 반응을 수행한 경우, 첨가하지 않았을 때보다 반응속도가 오히려 느려졌으며, 수율도 증가하지 못하였다. PEG 200을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 실험한 결과, 0.5% (w/v) Tween 20 첨가 한 경우와 비교하여 광학순도 99%에 도달하였을 때의 수율이 현저하게 낮았다(data not shown). 결과적으로 15°C에서 배양한 pET-21b(+)/RgEH 재조합 생촉매를 사용한 에폭사이드 가수분해반응에서 가장 적합한 계면활성제로 0.5% (w/v) Tween 20으로 결정하였다.

고농도 라세믹 styrene oxide의 광학분할

일반적으로 미생물에 의한 생물전환 반응에서 기질의 농도가 높아지면 입체선택성이 저하될 수 있다. 특히 생촉매가 존재하는 수용액 상과 분리될 정도의 많은 기질을 첨가하거나, 에폭사이드 기질의 용해도를 증가시키기 위하여 유기용매를 사용한 경우에서 효소활성이 저하된다는 연구결과들이 보고되었다(16). 정제된 효소를 생촉매로 사용하는 경우와 비교하여 whole-cell 생촉매를 사용하는 경우 기대되는 장점은 생촉매 안정성이므로 이를 평가하기 위해 라세믹 styrene oxide 기질 자체가 상분리가 일어나는 고농도 구간, 즉 20 mM에서 100 mM 범위에서 pET-21b(+)/RgEH 재조합 균주를 이용한 광학분할을 실시하였다. 기질의 농도가 20 mM에서 100 mM로 높아짐에 따라 최종반응시간은 20분에서 80분으로 증가하였지만, 100 mM 까지 99% ee값의 광학순도를 얻을 수 있었다. 이론수율 50% 대비 최종수율은 평균 27.1%로 거의 일정하였다(data not shown). Wild-type의 *Rhodospiridium toruloides*를 사용하여 초기농도 100 mM 라세믹 styrene oxide에 대한 kinetic resolution 반응을 수행한 경우에서는 9.3%의 낮은 수율을 얻었다(17).

재조합 R. glutinis EH 생촉매를 이용한 광학활성 styrene oxide 생산을 위한 반응조건 최적화

라세믹 styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해 활성이 우수한 pET-21b(+)/RgEH 플라스미드 DNA를 가지고 있는 재조합 E. coli를 생촉매로 이용하여 수용액상에서 광학순도가 높은 (S)-styrene oxide를 효율적으로 생산하기 위하여 균주 배양법, 반응온도, 계면활성제의 첨가 및 초기 기질 농도

가 반응속도 및 입체선택성에 미치는 영향을 분석한 실험 결과를 바탕으로 최적 반응조건을 결정하였다. 반응온도 10°C, 0.5% (w/v) Tween 20을 첨가하고, 저온배양방법 (15°C, 24시간)으로 배양한 재조합 E. coli를 이용하여 20 mM 라세믹 styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 수행하였다. 입체선택적 가수분해 반응 결과, 반응시간 10분 내에 기질의 광학순도가 99% ee에 도달하였고, 이때 반응 생성물인 (S)-styrene oxide의 수율은 이론 수율 50%에 대하여 46.0%로 매우 높은 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 3). 따라서 반응온도 30°C에서 계면활성제를 첨가하지 않았던 기존의 반응조건과 비교하면, 99% ee 값을 얻기 위해 요구되는 반응시간은 1/2로 줄었으며, 수율은 약 2배가 증가되었다.

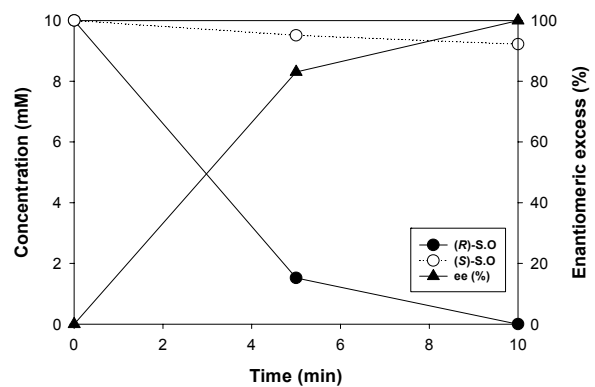


Figure 3. Enantioselective kinetic resolution of racemic styrene oxide by the recombinant *E. coli* containing pET-21b(+)/RgEH in the presence of 0.5% (w/v) Tween 20 at 10°C (culture temperature: 15°C).

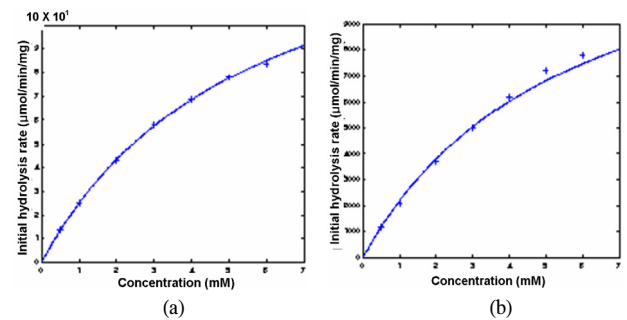


Figure 4. Hydrolysis of racemic styrene oxides by the recombinant *E. coli* containing pET-21b(+)/RgEH. The initial hydrolysis rates were determined for enantiopure (R)-styrene oxide (a) and (S)-styrene oxide (b) at different concentrations in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. The reaction was carried out in the presence of 0.5% (w/v) Tween 20 at 10°C (culture temperature: 15°C).

최적 반응조건에서 광학 분할 속도의 동역학적 상수를 결정하였다. 초기 가수분해 속도 측정 실험값들에 대한 Lineweaver-Burker plot을 통해 구한 V_{max}^R 는 165.04 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, K_m^R 은 9.55 mM 이었고, V_{max}^S 는 14.40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, K_m^S 은 5.57 mM 이었다. 기존 반응조건에서 구한 (R)-styrene oxide에 대한 V_{max}^R 와 K_m^R 은 각각 164.10 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 및 5.57 mM이었고 (S)-styrene oxide에 대한 V_{max}^S 와 K_m^S 은 각각 28.65 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 및 3.30 mM이었으며 초기반응속도비율인 E 값 ($E = (V_{max}^R/K_m^R) / (V_{max}^S/K_m^S)$)이 3.39임을 비교하면 6.68로 약 2배 증가했음을 알 수 있었다(Fig. 4). 반응온도 30°C에서 계면활성제를 첨가

하지 않은 경우와 비교해서 V_{max} 와 K_m 이 비슷하게 나왔는데, 이는 첫 번째 실험 조건에서는 온도가 높아 반응속도가 빠르기 때문에 V_{max} 가 높게 나온 것이고, 온도가 낮은 최적 조건에서는 온도가 낮아 V_{max} 이 낮아야 함에도 불구하고 높게 나온 것은 계면활성제를 넣어주었기 때문으로 판단된다. 결과적으로 최적화 조건에서 E 값이 크게 나와 수율이 증가되었음을 알 수 있다.

최적화 조건에서 초기 기질 농도를 100 mM로 높여 입체선택적 가수분해 반응을 수행한 결과, 99%의 광학순도를 얻기 위한 최종 반응시간은 50분이었으며, 40%의 최종수율을 얻어 기존 조건에 비해 수율이 약 1.48배 향상되었다(Fig. 5).

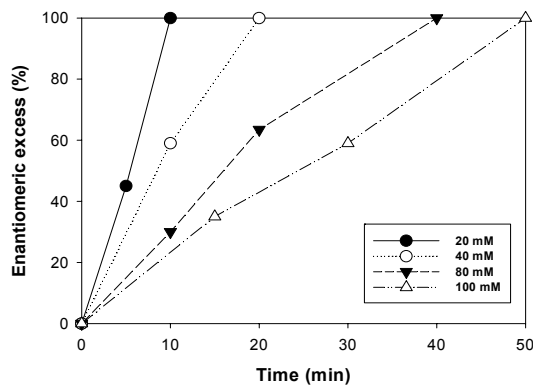


Figure 5. Effects of initial substrate concentration on enantioselective hydrolysis of racemic styrene oxide catalyzed by the recombinant *E. coli* containing pET-21b(+)/RgEH. The reaction was carried out in the presence of 0.5% (w/v) Tween 20 at 10°C (culture temperature: 15°C).

요 약

Rhodotorula glutinis epoxide hydrolase 유전자를 pColdI 벡터와 pET-21b(+) 벡터에 재조합하여 제작한 *E. coli*를 생축매로 사용하여 라세믹 styrene oxide에 대하여 회분식 가수분해 반응을 실시하였다. pET-21b(+)/RgEH 재조합 플라스미드 DNA를 가진 *E. coli*를 15°C에서 저온 배양할 때 수용성 단백질 형태로 가장 많이 발현되었고, 입체선택적 가수분해 활성과 촉매 안정성이 가장 좋았다. 라세믹 styrene oxide 20 mM에 대하여 반응온도 30°C에서는 반응시간 20분 동안에 수율 24.0%로 (*S*)-styrene oxide를 얻은 반면에, 반응온도를 10°C로 낮추고 0.5% (w/v) Tween 20을 첨가하고 반응시키면 광학순도 99.0% ee 이상의 (*S*)-styrene oxide를 46.0%의 수율로 얻을 수 있었다. 최적조건에서 E 값은 6.68이었으며, 100 mM의 라세믹 styrene oxide에 대해서는 반응시간 50분에 이룬 수율 50% 대비 40%의 높은 수율로 (*S*)-styrene oxide를 얻을 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 국토해양부 마린바이오21 해양·극한 분자유전체단으로부터 연구비를 지원 받아 수행하였음에 감사드립니다.

REFERENCES

1. A. N. Collins, G. N. Sheldrake, and J. Crosby (1992), Chirality industry, pp1-66, John Wiley & Sons, New York.
2. A. Archelas and R. Furstoss (2001), Synthetic applications of epoxide hydrolases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 112-119.
3. C. Morisseau, G. Venturi, P. Moussou, and J. C. Baratti (1998), Effect of carbon and nitrogen sources on the production of highly enantioselective epoxide hydrolase from *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Tech.* **12**, 805-809.
4. U. T. Strauss, 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.
5. P. Besse and H. Veschambre (1994), Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrahedron Asymmetry* **50**, 8885-8927.
6. H. Fu, G. J. Shen, and C. H. Wong (1991), Asymmetric epoxidation of allyl alcohol derivatives by omega-hydroxylase from *Pseudomonas oleovorans*, *Recueil Trav. Chim. Pays Bas.*, **110**, 167-170.
7. W. J. Choi, 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.
8. J. Grigert, D. J. Dalietos, D. S. Hirano, T. D. Lee, and S. L. Neidleman (1986), Epoxidation of alkenes by chloroperoxidase catalysis, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **136**, 778-782.
9. Z. Liu, J. Michel, Z. Wang, B. Witholt, and Z. Li (2006), Enantioselective hydrolysis of styrene oxide with the epoxide hydrolase of *Sphingomonas* sp. HXN-200, *Tetrahedron Asymmetry* **17**, 47-52.
10. C. A. Weijers, P. Meeuwse, R. L. Herpers, M. C. Franssen, and E. J. Sudholter (2005), Stereoselectivity and substrate specificity in the kinetic resolution of methyl-substituted 1-oxaspiro[2.5]octanes by *Rhodotorula glutinis* epoxide hydrolase, *J. org. Chem.* **70**, 6639-6646.
11. S. J. Lee and H. S. Kim (2006), Development of recombinant *Escherichia coli* expressing *Rhodotorula glutinis* epoxide hydrolase, *Korean Journal of Life Science* **16**, 415-419.
12. E. Y. Lee, S. S. Yoo, H. S. Kim, S. J. Lee, Y. K. Oh, and M. S. Park (2004), Production of (*S*)-styrene oxide by recombinant *Pichia pastoris* containing epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis*, *Enzyme MicrobTechnol.* **35**, 624-631.
13. G. L. C. Qing, A. Ma, G. V. T. Khorchid, T. K. Swapna, M. M. Mal, B. Takayama, S. Xia, H. Phadtare, T. Ke, G. T. Acton, M. Montelione, Ikura, and M. Inouye (2004), Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*, *Nature Biotechnol.* **22**, 877-882.
14. K. M. Manoj, A. Archelas, J. Baratti, and R. Furstoss (2001), Microbiological transformations. Part 45: A green chemistry preparative scale synthesis of enantiopure building blocks of Eliprodiol: elaboration of a high substrate concentration epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution process, *Tetrahedron Asymmetry* **57**, 695-701.
15. N. A. E. Kronenburg and J. A. M. de Bontn (2001), Effects of detergent of specific activity and enantioselectivity of the epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis*, *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 210-217.
16. W. J. Choi, 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.
17. J. H. Lee and E. Y. Lee (2004), Batch production of chiral epichlorohydrin by enantioselective hydrolase reaction using *Rhodospiridium toruloides*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 38-41.