

## 메타게놈유래의 저온성 에스테라제 EM2L8의 효소적 특성과 이를 활용한 고지혈증 치료제 키랄소재의 생산

정지혜 · 최윤희 · 이정현<sup>1</sup> · 김형권\*  
가톨릭대학교 생명공학전공, <sup>1</sup>한국해양연구원

**Characterization of a Psychrophilic Metagenome Esterase EM2L8 and Production of a Chiral Intermediate for Hyperlipemia Drug. Jung, Ji-Hye, Yun-Hee Choi<sup>1</sup>, Jung-Hyun Lee, and Hyung Kwoun Kim\*.**  
*Division of Biotechnology, The Catholic University of Korea, Bucheon 420-743, Korea, <sup>1</sup>Marine Biotechnology Research Centre, KORDI, Ansan 425-600, Korea* – Esterase EM2L8 gene isolated from deep sea sediment was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and the esterase activity of the cell-free extract was assayed using *p*-nitrophenyl butyrate-spectrophotometric method. Its optimum temperature was 40-45°C and 45% activity of the maximum activity was retained at 15°C. The activation energy at 15-45°C was calculated to be 4.9 kcal/mol showing that esterase EM2L8 was a typical cold-adapted enzyme. Enzyme activity was maintained for 6 h and 4 weeks at 30°C and 4°C, respectively. When each ethanol, methanol, and acetone was added to the reaction mixture to 15% concentration, enzyme activity was maintained. In the case of DMSO, enzyme activity was kept up to 40% concentration. (S)-4-Chloro-3-hydroxy butyric acid is a chiral intermediate for the synthesis of Atorvastatin, a hyperlipemia drug. When esterase EM2L8 (40 U) was added to buffer solution (1.2 mL, pH 9.0) containing ethyl-(R,S)-4-chloro-3-hydroxybutyrate (38 mM), it was hydrolyzed into 4-chloro-3-hydroxy butyric acid with a rate of 6.8 μmole/h. The enzyme hydrolyzed (S)-substrate more rapidly than (R)-substrate. When conversion yield was 80%, e.e.s value was 40%. When DMSO was added, hydrolysis rate increased to 10.4 μmole/h. The plots of conversion yield vs e.e.s in the presence or absence of DMSO were almost same, implying that the reaction enantioselectivity was not changed by the addition of DMSO. Taken together, esterase EM2L8 had high activity and stability at low temperatures as well as in various organic solvents/aqueous solutions. These properties suggested that it could be used as a biocatalyst in the synthesis of useful pharmaceuticals.

**Key words:** Esterase EM2L8, metagenome, cold-adapted enzyme, chiral drug, organic solvent

### 서 론

에스테라제 효소는 다양한 에스테르 화합물을 가수분해할 수 있고 또한 합성할 수 있는 유용한 효소촉매이다. 많은 에스테라제 효소가 동물, 식물, 미생물로부터 발굴되고 보고되었는데 그중에서도 미생물유래의 에스테라제가 가장 다양한 특성을 갖고 있으며 효소의 종류에 따라서 기질특이성, 위치특이성, 입체특이성 등의 고유한 특성을 지닌 것으로 밝혀졌다[7, 8].

최근에 저온성 에스테라제가 산업적으로 크게 주목을 받고 있다. 저온성 효소는 낮은 온도조건에서도 높은 효소활성을 보이기 때문에 고온에서 불안정한 화합물을 합성하는 공정에서 유용하게 사용될 수 있다[6, 10]. 또한 중온성 및

고온성 효소와는 달리 활성부위가 분자 구조적으로 높은 유연성을 갖고 있기 때문에 수분활성이 낮은 환경(저온, 유기용매)에서도 효소활성을 유지할 수 있다는 장점을 갖고 있다[15]. 이와 같은 이유로 인해서 저온성 에스테라제는 유기합성 분야에서 효소촉매로 개발되고 있다.

산업적으로 유용한 효소를 발굴하기 위한 연구가 오랫동안 진행되어 왔다. 온천, 심해, 남극 빙하지역과 같이 지구상 극한지역에서 사는 극한 미생물로부터 특수기능을 지닌 효소를 찾고자 연구가 활발히 진행되고 있다[3]. 또한, 지구상 극한지역으로부터 DNA를 직접 추출하고 여기에 들어있는 유용 유전자를 발굴하고자 하는 메타게놈 연구도 활발하다[2, 4, 5, 17]. 메타게놈 연구의 장점으로 난배양성 미생물 유래의 유전자를 발굴할 수 있다는 점과 매우 다양한 환경 유전자를 찾을 수 있다는 점을 들 수 있다. 이 방법을 통해서 이미 많은 에스테라제/리파아제 유전자가 발굴되었다[9, 11, 13]. 현재 심해 바닥 또는 빙하지역의 메타게놈으로부터 신규 저온성 효소를 발굴하여 특성을 규명하고 산업적으로

\*Corresponding author

Tel: 82-2-2164-4890, Fax: 82-2-2164-4865

E-mail: hkkim@catholic.ac.kr

활용하는 연구가 진행되고 있다.

Atorvastatin은 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase 저해제 계열의 고지혈증 치료제이며 이 물질을 생산하기 위해서는 키랄소재인 (S)-4-chloro-3-hydroxybutyric acid ((S)-CHBAcid)가 필요하다[1, 14]. 이 물질은 ethyl-(R,S)-4-chloro-3-hydroxybutyrate (rac-ECHB) 기질을 에스테라제 효소를 이용하여 입체 선택적으로 가수 분해함으로써 생산할 수 있다(Fig. 4A).

본 연구에서는 (S)-CHBAcid를 생산하기 위해서 최근 메타게놈 연구를 통해 발굴된 에스테라제 EM2L8을 사용하였으며[13], 효소반응을 최적화하기 위해서 반응액에 유기용매 또는 금속이온을 첨가해주었다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

p-Nitrophenyl butyrate(pNPB)와 p-nitrophenyl caprate (pNPC)는 Sigma사에서 구입하였다. rac-Ethyl-4-chloro-3-hydroxybutyrate(rac-ECHB)는 (주)이쿠스팜에서 공급받았다. 또한, 최근에 파푸아뉴기니의 심해바닥 메타게놈으로부터 발굴된 에스테라제 EM2L8 유전자(GenBank DQ846908)를 사용하였다[13]. 그 밖의 시약은 일반 시약급으로 구입하여 사용하였다.

### 균주, 플라스미드, 배양조건

*Escherichia coli* BL21(DE3)을 재조합 단백질의 발현 숙주로 사용하였고 *E. coli* XL1-Blue를 재조합 플라스미드의 보관 숙주로 사용하였다. 에스테라제 EM2L8 유전자가 삽입되어 있는 pET28 벡터(Novagen, Madison, WI)를 효소발현을 위한 재조합 플라스미드로 사용하였다. 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)균을 카나마이신( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ )이 첨가된 Luria-Bertani 배지( $10 \text{ g L}^{-1}$  트립톤,  $5 \text{ g L}^{-1}$  효모추출액,  $5 \text{ g L}^{-1}$  염화나트륨)에 접종(1%, v/v) 하고  $20^\circ\text{C}$ 에서 배양하였다. 배양액의  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 가 0.5로 되었을 때, IPTG를 1 mM 농도로 첨가하고 20시간동안  $20^\circ\text{C}$ 에서 계속 배양하였다. 배양액 1리터를 원심분리하여 균체를 모은 후, 증류수 25 mL에 현탁하였다. 초음파 파쇄법으로 균체를 파쇄한 후, 원심분리를 통해 상등액을 얻었다.

### 에스테라제 EM2L8의 pNPB 분해활성 측정

합성기질 pNPB를 사용하여 에스테라제 EM2L8의 가수분해 활성을 측정하였다. 기질(10 mM 농도로 아세트니트릴 용매에 녹아 있음), 에탄올, Tris-HCl 용액(50 mM, pH 8.0)을 10:40:950의 비율로 총 1 mL를 제조하였다. 이 혼합액에 효소액 10  $\mu\text{L}$ 을 넣고  $35^\circ\text{C}$ 에서 3-5분간 반응시킨 후, 405 nm 파장의 흡광도를 측정하여 효소반응으로 생성된 p-nitrophenol(pNP) 양을 정량하였다. 효소활성 1 U는 1분 동안 1

$\mu\text{mole}$ 의 pNP를 생성하기 위해 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

### 에스테라제 EM2L8의 온도 및 pH 특성 조사

효소의 반응조건을 확인하기 위해서 pNPB 기질을 사용하여 온도와 pH의 영향을 조사하였다. 먼저 최적 반응온도를 측정하기 위해서  $15^\circ\text{C}$ 에서  $60^\circ\text{C}$ 까지 온도를  $5^\circ\text{C}$ 씩 증가시키면서 효소의 활성을 측정하였다. 이때 반응시간을 15분으로 정하고 효소반응을 수행하였다. 온도 안정성을 구하기 위한 실험에서는  $30^\circ\text{C}$ ,  $35^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  조건에서 효소를 6시간동안 방치하면서 1시간 간격으로 효소의 잔존활성을 측정하였다. 또한, 장기보관 시의 효소안정성을 확인하기 위해서 효소를  $4^\circ\text{C}$ 와 실온( $25^\circ\text{C}$ )에서 4주 동안 보관하면서 1주 간격으로 효소의 잔존활성을 측정하였다.

pH에 따른 효소의 활성을 조사하는 실험에서는 pNPC 기질을 사용하였으며  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  용액(50 mM, pH 6-7.5), Tris-HCl 용액(50 mM, pH 7.5-9), glycine-KCl-KOH 용액(50 mM, pH 9-11)에서 pNPB 기질과 동일한 spectrophotometric assay를 수행하였다. pH에 따른 효소의 안정성을 조사하기 위해서 Tris-HCl 용액(100 mM, pH 8.0, pH 9.0) 및 glycine-KCl-KOH 용액(100 mM, pH 10.0)과 효소액을 1:1로 섞은 후,  $30^\circ\text{C}$ 에서 6시간동안 방치하면서 1시간 간격으로 효소의 pNPB 분해 활성을 측정하였다.

### 유기용매 및 금속이온의 영향 조사

일반적으로 널리 사용되는 유기용매인 메탄올, 에탄올, DMSO, 아세트니트릴, 아세톤을 농도별로 반응액에 첨가한 후, pNPB 기질에 대한 효소활성을 측정하였다. 또한, 많이 사용되는 금속이온인  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ 를 여러 가지 농도(0-100 mM)로 반응액에 첨가한 후, pNPB 기질에 대한 효소활성을 측정하였다.

### 단백질 리폴딩 수행

SDS, Sarcosyl, Tween 40, Tween 80, Triton X-100을 사용하여 inclusion body의 리폴딩을 수행하였다. Inclusion body 현탁액 90  $\mu\text{L}$ 에 여러 농도의 계면활성제 용액 10  $\mu\text{L}$ 을 첨가하여 완전히 섞은 후에 900  $\mu\text{L}$ 의 Tris-HCl 용액(50 mM, pH 8.0)을 넣고 희석함으로써 리폴딩과정을 수행하였다.

### (R,S)-ECHB 가수분해 반응 수행

에스테라제 EM2L8을 이용하여 (R,S)-ECHB 기질에 대한 가수분해 반응을 다음과 같이 수행하였다. 각 효소반응 시, 먼저 pNPB 표준측정법을 수행하고 그 결과에 따라서 40 U에 해당되는 세포추출액을 효소액으로 사용하였다. Tris-HCl 용액(100 mM, pH 9.0)에 (R,S)-ECHB 기질을 0.5%(v/v) 첨가한 후, 40 U의 효소액을 넣고  $30^\circ\text{C}$ 에서 반응시켰다. 반응액의 부피는 1.2 mL이며 1시간 간격으로 100  $\mu\text{L}$ 씩 샘플링

하여 에칠아세테이트 400  $\mu$ L, 포화 탄산칼륨 용액 50  $\mu$ L와 함께 완전히 섞어주었다. 원심분리를 통해 에칠아세테이트 층을 취하고 원심건조농축기로 완전히 건조시켰다. 염화메틸렌 8 mL과 decane 10  $\mu$ L 혼합액을 제조하고 이중에서 400  $\mu$ L를 넣어 재부유한 후, 피리딘 20  $\mu$ L와 염화아세틸 10  $\mu$ L을 첨가하여 상온에서 1시간 동안 방치하면서 (R,S)-ECHB 기질의 아세틸화반응을 수행하였다. 염산용액(1 M)을 200  $\mu$ L 넣고 충분히 섞은 후 하층액 200  $\mu$ L를 취하고, 포화 중탄산나트륨 200  $\mu$ L를 넣고 섞은 후 하층액 100  $\mu$ L를 취하였다. 그 중에서 2  $\mu$ L를 사용하여 기체크로마토그래피 분석을 수행하였다.

기체크로마토그래피 분석에서는 (R)-ECHB와 (S)-ECHB를 분석할 수 있는 Chirasil-dex 컬럼이 장착된 GC장치를 사용하였고 70°C에서 180°C까지 분당 5°C씩 높여준 후 180°C에서 2분간 유지시켰다. 검출기로는 flame ionization detector (FID)를 사용하였다.

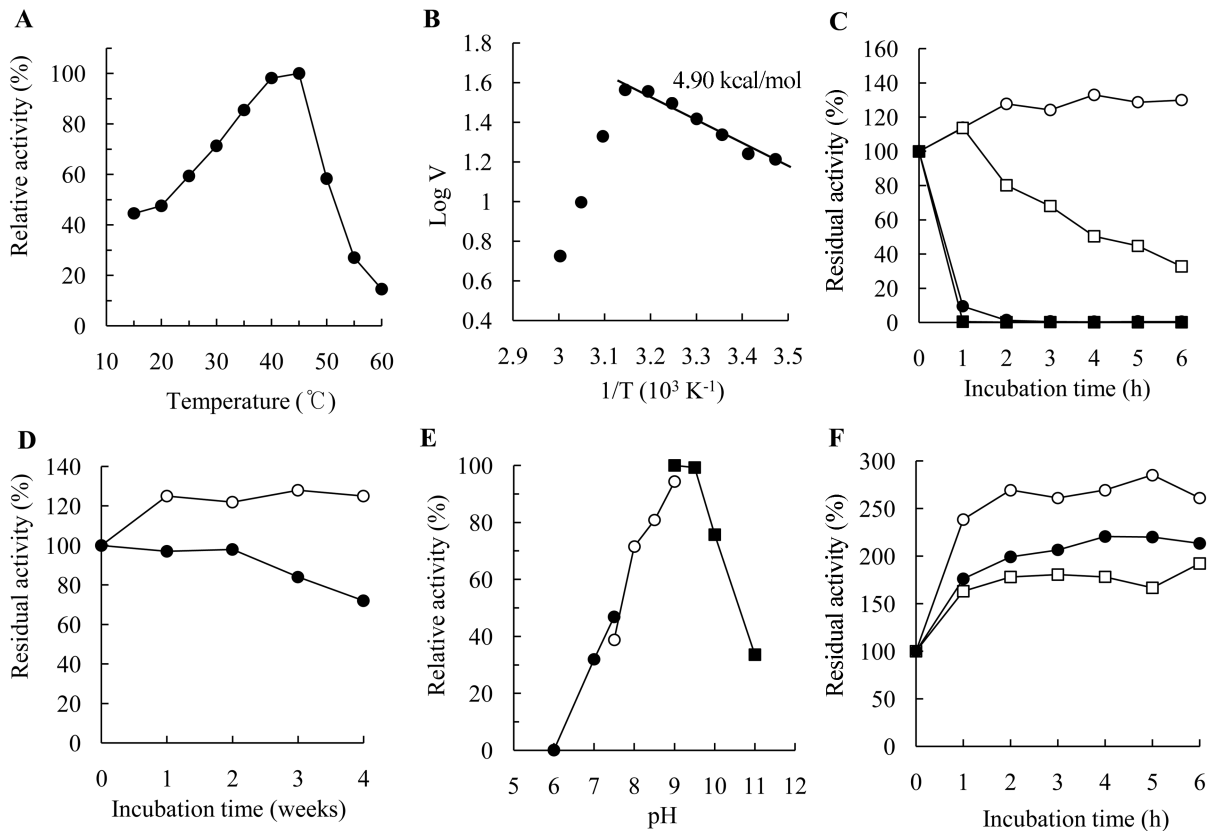
유기용매와 금속이온을 효소 반응액에 첨가하고 반응을 수행한 후, 효소반응속도와 입체선택성의 변화를 측정하였다. 사용한 유기용매로는 메탄올, 에탄올, DMSO, 아세토니

트릴, 아세톤이며 10% (v/v) 농도가 되도록 첨가하여 사용하였다. 금속이온은  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Cu^{2+}$ 를 사용하였고 10 mM 농도가 되도록 첨가하여 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**에스테라제 EM2L8의 온도 및 pH 특성**

파푸아뉴기니의 심해바다에서 발굴된 메타게놈 에스테라제 EM2L8 유전자[13]를 *E. coli* BL21(DE3) 균에서 발현하고 균체를 초음파분쇄법으로 분쇄하여 세포추출액을 제조하였다. 세포추출액의 에스테라제 활성을 pNPB 분석법으로 확인함으로써 에스테라제 효소의 발현을 확인한 후, 이 효소의 최적 반응온도를 측정하였다. 에스테라제 EM2L8의 합성 기질 pNPB에 대한 분해속도를 15분 동안 온도별로 측정한 결과, 최적반응온도는 40-45°C인 것으로 밝혀졌다(Fig. 1A). 최적반응온도가 이전에 보고된 온도(50-55°C)[13] 보다 낮은 이유는 pNPB 분해 과정에서의 반응시간이 15분으로 길어졌기 때문이라고 보인다. 한편, 이 효소는 15°C에서도 최적 온도의 45%에 해당되는 활성을 보이며 15-45°C의 온도범위



**Fig. 1. Effects of temperature and pH on esterase EM2L8.** (A) pNPB hydrolysis was done with esterase EM2L8 at various temperatures. (B) Temperature-activity plot was transformed into 1/T-logV plot to calculate activation energy. (C) Residual activities of esterase EM2L8 were assayed pNPB method at various incubation temperatures for 6 h. ○, 30°C; □, 35°C; ●, 40°C; ■, 50°C. (D) Residual activities of esterase EM2L8 were assayed after long-term storage at 4°C (○) and room temperature (●). (E) pNPC hydrolysis was done at various pHs. (F) Residual activities of esterase EM2L8 were assayed pNPB method at various incubation pHs for 6 h. ○, pH 9; □, pH 8; ●, pH 8.5.

에서 4.9 kcal/mol의 낮은 활성화에너지를 갖는 것으로 계산되었다(Fig. 1B). 일반적으로 활성화에너지가 10 kcal/mol 이하인 효소를 저온성 효소 또는 저온 적응효소로 분류한다. 따라서 이 효소는 전형적인 저온 적응효소인 것으로 확인되었다[12, 16].

온도 안정성 실험의 결과, 40°C 이상의 온도에서는 1시간 내에 효소활성이 완전히 줄어들었으나, 30°C에서는 6시간까지 효소활성이 전혀 줄어들지 않았다(Fig. 1C). 효소를 장기간 보관하는 실험에서도 효소의 높은 안정성을 확인할 수 있었다(Fig. 1D). 실온(25°C)에서 보관하는 경우에는 4주 후에 70% 정도의 활성을 유지하는 것으로 밝혀졌고 4°C에서 보관하는 경우에는 4주 후에도 효소활성이 전혀 줄어들지 않았다. 따라서 이 효소는 25°C이하의 저온에서 매우 안정하며 높은 활성을 보이는 것으로 밝혀졌다.

이 효소의 반응 최적 pH는 9-9.5인 것으로 나타났으며(Fig. 1E), pH 8-10인 조건에서 6시간까지 안정한 것으로 확인되었다(Fig. 1F). 따라서 유용물질을 생산하는 반응에 이 효소를 촉매로 이용하려면 30°C와 pH 8-10의 조건에서 반응을 수행해야 될 것으로 보인다.

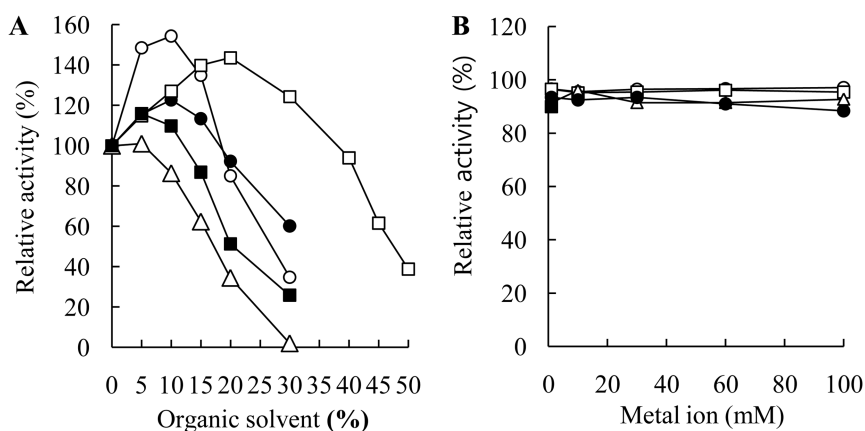
**에스테라제 EM2L8의 유기용매 및 금속이온 특성**

대부분의 저온성 효소는 유기용매에 대한 안정성이 높은 것으로 보고되었다[6, 10, 15]. 여러 가지 유기용매의 농도에 따른 에스테라제 EM2L8의 안정성을 조사하였다(Fig. 2A). 아세토니트릴 용매의 경우, 5%(v/v) 이상의 농도에서 효소활성이 감소하였으나, 아세톤, 에탄올, 메탄올 용매의 경우, 0%에서부터 10-15%의 농도범위에서는 효소활성이 오히려 증가되고 그 이상의 농도에서 효소활성이 감소하였다. DMSO 용매의 경우, 0-40%의 넓은 농도범위에서 효소활성이 증가되고 그 이상의 농도에서 효소활성이 감소하는 것으로 밝혀졌다. 효소활성이 증가되는 현상은 유기용매 첨가에

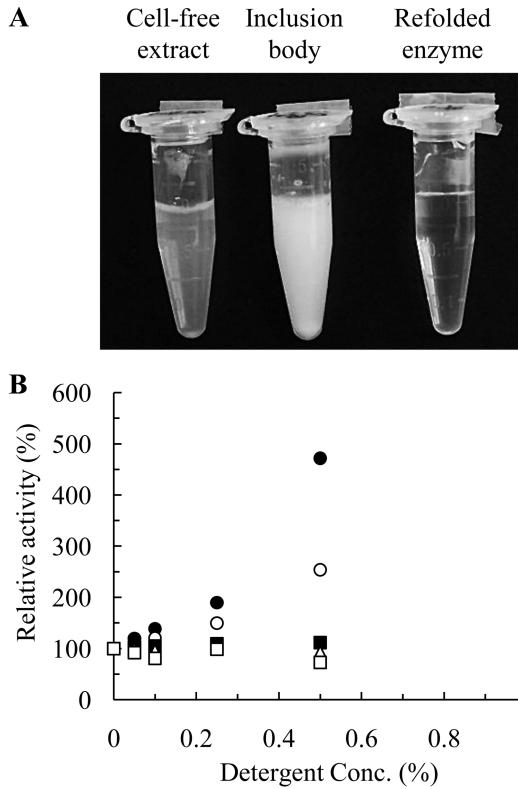
의한 pNPB 기질의 용해도 증가 또는 효소의 분자구조변환 때문이라고 예상된다. 에스테라제 EM2L8이 여러 유기용매에 대해 상당히 높은 농도까지 안정한 것으로 밝혀짐에 따라서 이 효소를 유기합성반응에서 효소촉매로 사용할 수 있을 것으로 보인다.

각종 금속이온의 농도에 따른 에스테라제 EM2L8의 안정성 및 활성을 조사하였다(Fig. 2B). 실험에 사용한 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>에 대해서 0-100 mM의 농도범위에서 효소의 활성이 동일하게 나타났다. 이것은 이들 금속이온들이 효소의 pNPB 가수분해 반응에서 저해제로 작용하지 않음을 보여준다.

이와 같이 이 효소는 저온에서 장기간 보관해도 처음과 동일한 활성을 지니며 유기용매와 금속이온이 고농도로 포함된 용액에서도 높은 활성을 갖는 특성을 보였다. 이러한 특성은 이 효소가 지닌 리폴딩 능력과 관련있는 것으로 보인다. 이 효소를 *E. coli*에서 발현하는 경우, 수용성단백질과 inclusion body가 동시에 만들어지며 이 때 만들어진 inclusion body는 쉽게 리폴딩되어 효소활성을 회복하는 것이 이미 보고되었다[13]. 본 연구에서는 이 점을 자세히 조사하기 위해서 계면활성제의 농도에 따른 리폴딩 수율을 측정하였다(Fig. 3A, 3B). 흥미롭게도 Fig. 3B에 나타난 것과 같이 inclusion body 용액(계면활성제 무첨가)에서도 효소활성(42 U/mL)이 측정되었다. 이 용액에 계면활성제를 첨가하여 inclusion body를 완전히 변성시킨 후, 용액을 10배 희석 시킴으로써 손쉽게 리폴딩을 수행할 수 있었다. 이 때, 음이온계면활성제의 농도를 증가시킴에 따라서 리폴딩 수율이 증가되었으며 SDS를 1% 농도로 첨가했을 때에 최대 5.5배까지 효소활성이 증가되었다. 즉 이 효소는 완전히 변성된 단백질 구조로부터 활성단백질형태(native state)로 쉽게 리폴딩됨을 알 수 있었다. EM2L8 효소의 이러한 특성이 이 효소가 지닌 저온에서의 장기 안정성 및 유기용매에서의 활



**Fig. 2. Effects of organic solvents and metal ions on esterase EM2L8.** (A) pNPB hydrolysis was done with esterase EM2L8 in the presence of various concentration of organic solvents. △, acetonitrile; ■, acetone; ●, methanol; ○, ethanol; □, DMSO. (B) pNPB hydrolysis was done with esterase EM2L8 in the presence of various concentration of metal ions. ○, Mg<sup>2+</sup>; □, Ca<sup>2+</sup>; △, K<sup>+</sup>; ●, Li<sup>+</sup>; ■, Cu<sup>2+</sup>.



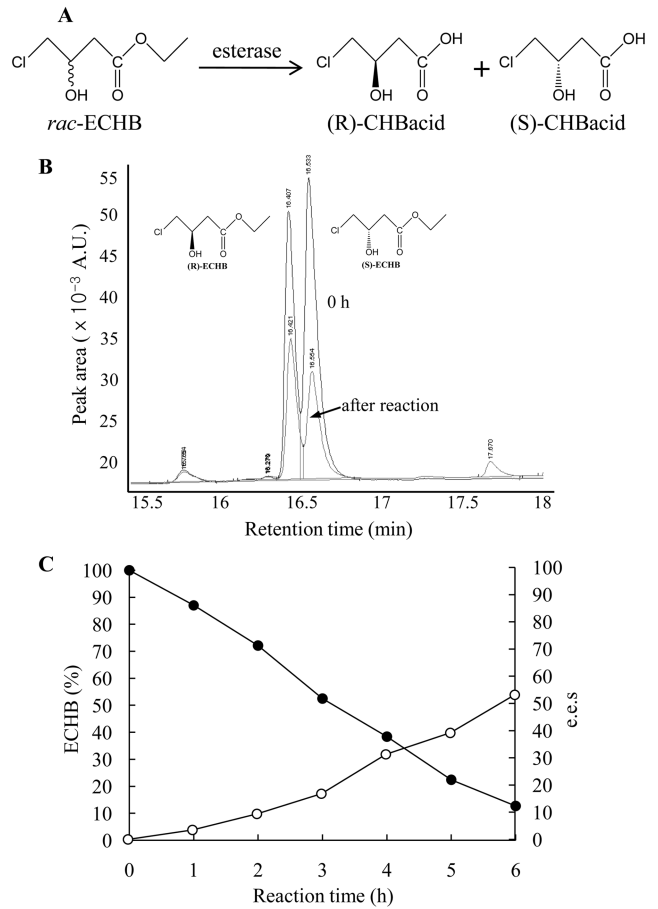
**Fig. 3. Refolding of inclusion body.** (A) Cell-free extract and inclusion body suspension were shown. Refolded enzyme was obtained from inclusion body by SDS treatment and dilution process. (B) Esterase activity were measured after refolding process with various detergents. ●, SDS; ○, Sarcosyl; ■, Tween 40; △, Tween 80; □, Triton X-100.

성과 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다. 향후 효소단백질의 3차구조 연구 및 리폴딩 kinetics 연구가 이런 사실을 명확하게 밝혀줄 것으로 생각된다.

**에스터라제 EM2L8에 의한 ECHB 가수분해**

에스터라제 EM2L8이 낮은 온도에서도 높은 가수분해 활성을 갖고 있으며 여러 가지 유기용매에 대해 높은 안정성을 갖고 있는 것으로 밝혀짐에 따라서 의약품의 유기합성반응에 효소촉매로 사용될 수 있을 것으로 예상되었다.

고지혈증 치료제의 키랄중간체로 사용되는 (S)-ECHB는 입체선택적인 에스터라제를 이용해서 rac-ECHB기질을 가수분해하여 만들 수 있다(Fig. 4A). 본 연구에서는 EM2L8 효소를 이용하여 다음과 같이 (R,S)-ECHB의 가수반응을 수행하였다. Tris-HCl 용액(100 mM, pH 9.0)에 기질(0.5%, 38 mM)과 효소(40 U)를 넣고 30°C에서 6시간 동안 가수분해 반응을 수행하였다. 키랄컬럼을 장착한 기체크로마토그래피를 이용하여 반응액에 남아 있는 (R)-ECHB와 (S)-ECHB의 양을 정량하였다(Fig. 4B). 에스터라제 EM2L8에 의해서 (R,S)-ECHB 기질이 가수분해됨을 확인할 수 있었으며, 분해속도는 6.8 μmole/h로 계산되었다(Fig. 4C). (R)-ECHB

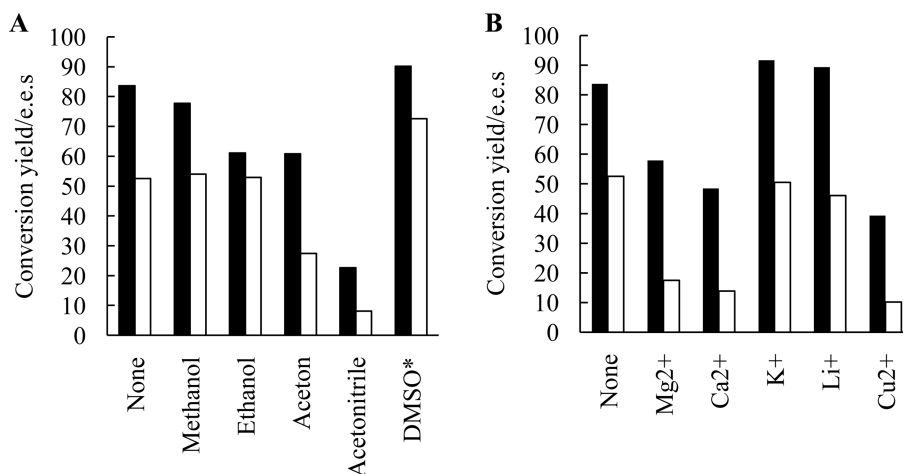


**Fig. 4. Hydrolysis of rac-ECHB with esterase EM2L8.** A. rac-ECHB was hydrolyzed by esterase into (R)- and (S)-CHBacid. B. (R)- and (S)-ECHB were analyzed by a gas chromatography equipped with a chiral column. C. The amount of rac-ECHB (●) and e.e.s values (○) were measured with time course for 6 h.

보다 (S)-ECHB 기질을 빠르게 분해하였으며 전환수율이 80%일 때, e.e.s 값이 40%로 측정되었다. 이 효소는 (S)-형태의 기질에 대해 입체선택성을 갖고 있지만 상업적으로 사용하기 위해서는 반응조건을 개선하거나 입체선택성을 향상시키기 위한 효소분자개량연구가 필요하다.

**ECHB 분해반응에서의 유기용매 및 금속이온의 영향**

에스터라제 EM2L8이 (R,S)-ECHB 기질에 대한 가수분해 활성이 있는 것으로 확인됨에 따라서 유기용매 및 금속이온이 효소반응 속도와 입체선택성에 미치는 영향을 분석하였다. Fig. 2A에 나타난 유기용매의 효소활성에 미치는 영향을 근거로 유기용매의 농도를 10%(v/v)로 정하였다. 유기용매를 첨가하고 앞에서와 동일한 방법으로 6시간 동안 반응을 수행하고 전환수율을 구한 결과, 메탄올, 에탄올, 아세톤의 경우에는 유사한 값을 얻을 수 있었으나, 아세토니트릴의 경우에는 크게 감소하였다(Fig. 5A). 반면에 DMSO를 첨가한 경우에는 4시간 동안 반응을 수행해도 전환수율이 크



**Fig. 5. Effects of organic solvents and metal ions on Hydrolysis of *rac*-ECHB with esterase EM2L8.** (A) Conversion yields (closed bars) and e.e.s values (open bars) were measured after 6 h-reaction in the presence of various organic solvents. \*The values were measured after 4-h reaction. (B) Conversion yields (closed bars) and e.e.s values (open bars) were measured after 6 h-reaction in the presence of various metal ions.

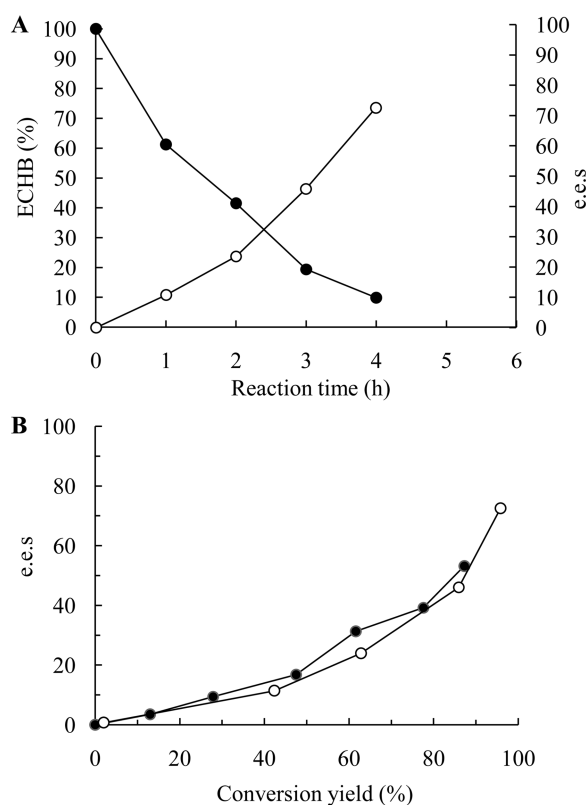
게 증가하였다. 이것은 DMSO 첨가에 의해서 효소의 가수 분해 반응속도가 크게 증가되었음을 보여준다. 효소의 입체 선택성을 보여주는 e.e.s값을 측정한 결과, 아세톤과 아세토 니트릴의 경우에는 상대적으로 e.e.s값이 감소하였으나, DMSO의 경우에는 e.e.s값이 증가된 것으로 나타났다.

금속이온을 10 mM 농도로 첨가하고 동일한 반응을 6시 간 동안 수행한 결과, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>를 사용한 경우에는 전환수율과 e.e.s값이 대조군에 비해 모두 감소하였으나, K<sup>+</sup>와 Li<sup>+</sup>을 사용한 경우에는 전환수율과 e.e.s값이 대조군과 유사한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5B).

**ECHB 분해반응에서의 DMSO의 영향**

각종 유기용매와 금속이온을 첨가한 효소반응에서 얻은 결과로부터 DMSO가 가장 좋은 첨가제인 것으로 밝혀졌다. DMSO를 10% 농도로 첨가하고 동일한 ECHB 분해반응을 수행하였다. DMSO를 첨가하지 않은 반응과 비교할 때, (R,S)-ECHB 기질이 훨씬 빠르게 가수분해됨을 확인할 수 있었으며(Fig. 6A), ECHB의 분해속도는 10.4 μmole/h로 계산되었다. 즉 DMSO 첨가에 의해서 효소반응속도가 1.5배 증가되었음을 알 수 있다. 한편, DMSO 첨가에 의한 입체선택성 변화를 알아보기 위해서 전환수율과 e.e.s 값을 그래프로 구하였다(Fig. 6B). DMSO의 유무와 상관없이 전환수율에 따른 e.e.s 값은 유사하게 나타났다. 따라서 DMSO는 효소의 입체선택성에는 영향을 미치지 않고 ECHB의 분해속도만을 증가시킨 것임을 알 수 있다.

결론적으로 메타게놈에서 발굴한 저온성 에스테라제 EM2L8 효소는 각종 유기용매 하에서도 높은 에스테라제 활성을 지니는 것이 확인되었다. 또한, *rac*-ECHB 기질을 가수분해 할 수 있으며 DMSO 용매를 첨가하는 경우에 효소의 기질 분해속도가 1.5배 빨라지는 것을 확인하였다. 이 효



**Fig. 6. Hydrolysis of *rac*-ECHB with esterase EM2L8 in the presence of DMSO.** A. The amount of *rac*-ECHB (●) and e.e.s values (○) were measured with time course for 6 h-reaction in the presence of DMSO. B. Conversion yield and e.e.s value plot was drawn on the basis of the results of Fig. 4C (●) and Fig. 6A (○).

소는 (S)-ECHB 기질에 대한 입체선택성을 갖고 있지만 그대로 상업적 공정에서 이용하기에는 e.e.s값이 높지 않다. 그러나 분자진화기법을 이용해서 효소의 입체선택성을 증가시

킨다면 상업적으로 이용할 수 있을 것으로 보인다. 에스터라제 EM2L8 효소는 저온에서 높은 활성을 보일 뿐만 아니라 각종 유기용매 하에서도 높은 안정성과 활성을 갖고 있기 때문에 이러한 장점을 이용해서 여러 가지 의약품의 유기합성공정에서 효소촉매로 널리 활용될 수 있다고 기대된다.

## 요 약

에스터라제 EM2L8 유전자를 *E. coli* 균에서 발현하고 에스터라제 활성을 분석한 결과, 40-45°C에서 최적의 효소활성을 보였다. 15°C에서 최대활성의 45% 활성을 보였고 15-45°C 사이의 활성화에너지는 4.9 kcal/mol로 계산됨으로써 전형적인 저온 적응효소인 것으로 밝혀졌다. 또한, 4°C에서 장기보관해도 효소활성이 전혀 줄어들지 않음을 통해서 저온에서 안정한 효소임을 알게 되었다. 반응액에 에탄올, 메탄올, 아세톤을 15% 농도까지 첨가해도 효소활성이 줄어들지 않았으며 DMSO의 경우, 40% 농도까지 첨가해도 효소활성이 유지되는 것으로 나타났다. 이 효소 40 U을 Tris-HCl 용액(1.2 mL, pH 9.0)에 넣고 30°C에서 (R,S)-ECHB(0.5%, 38 mM)의 분해반응을 수행한 결과, 기질이 가수분해되어 CHBAcid가 생성되며 기질의 분해속도는 6.8  $\mu\text{mole/h}$ 로 계산되었다. (R)-ECHB 보다 (S)-ECHB 기질을 빠르게 분해하였으며 전환수율이 80%일 때, e.e.s 값이 40%로 측정되었다. 반응액에 DMSO를 10% (v/v) 농도로 각각 첨가한 결과, 기질의 분해속도는 10.4  $\mu\text{mole/h}$ 로 증가되었다. 하지만 DMSO의 유무와 상관없이 전환수율에 따른 e.e.s 값은 유사하게 나타났다. 결론적으로 이 효소는 저온과 각종 유기용매 하에서도 높은 안정성과 활성을 갖고 있기 때문에 각종 의약품의 유기합성공정에서 효소촉매로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 논문은 경기도지역협력연구센터의 지원과 가톨릭대학교 2007년도 교비연구비의 지원을 받아 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Choi, Y. H., K. N. Uhm, and H. K. Kim. 2008. Biochemical characterization of *Rhodococcus erythropolis* N'4 nitrile hydratase acting on 4-chloro-3-hydroxybutyronitrile. *J. Molecul. Catal. B: Enzym.* **55**: 157-163.
- Daniel, R. 2004. The soil metagenome—a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 199-204.
- Demirjian, D. C., F. Moris-Varas, and C. S. Cassidy. 2001. Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**: 144-151.
- Elend, C., C. Schmeisser, C. Leggewie, P. Babiak, J. D. Carballeira, H. L. Steele, J. L. Reymond, K. E. Jaeger, and W. R. Streit. 2006. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3637-3645.
- Ferre, M., F. Martinez-Abarca, and P. N. Golyshin. 2005. Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**: 588-593.
- Gerday, C., M. Aittaleb, M. Bentahir, J. P. Chessa, P. Claverie, T. Collins, S. D'Amico, J. Dumont, G. Garsoux *et al.* 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* **18**: 103-107.
- Gupta, R., N. Gupta, and P. Rathi. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 763-781.
- Jaeger, K. E. and T. Eggert. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 390-397.
- Jeon, J. H., J. T. Kim, Y. J. Kim, H. K. Kim, H. S. Lee, S. G. Kang, S. J. Kim, and J. H. Lee. 2009. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 865-874.
- Joseph, B., P. W. Ramteke, and G. Thomas. 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnol. Adv.* **26**: 457-470.
- Kim, Y. J., G. S. Choi, S. B. Kim, G. S. Yoon, Y. S. Kim, and Y. W. Ryu. 2006. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expr. Purif.* **45**: 315-323.
- Kulakova, L., A. Galkin, T. Nakayama, T. Nishino, and N. Esaki. 2004. Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of GlyPro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1696**: 59-65.
- Park, H. J., J. H. Jeon, S. G. Kang, J. H. Lee, S. A. Lee, and H. K. Kim. 2007. Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome. *Protein Expr Purif.* **52**: 340-347.
- Park, H. J., K. N. Uhm, and H. K. Kim. 2008. R-Stereoselective amidase from *Rhodococcus erythropolis* No.7 acting on 4-chloro-3-hydroxybutyramide. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 552-559.
- Russell, N. 2000. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles* **4**: 83-90.
- Ryu, H. S., H. K. Kim, W. C. Choi, M. H. Kim, S. Y. Park, N. S. Han, T. K. Oh, and J. K. Lee. 2006. New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is closely related to filamentous fungal lipases. *Appl Microbiol Biotechnol.* **70**: 321-326.
- Streit, W. R., R. Daniel, and K. E. Jaeger. 2004. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 285-290.

(Received March 19, 2009/Accepted May 25, 2009)