

## 광학활성 Styrene Oxide 제조를 위한 고기능성 유전자 재조합 Epoxide Hydrolase 생촉매 개발

이수정, 이지원, 이은정, 김희숙, 이은열  
경성대학교 식품공학과  
전화 (051) 620-4716, FAX (051) 622-4986

### Abstract

Epoxide hydrolase(EH) catalyze the enantioselective hydrolysis of racemic epoxides to corresponding diols. A recombinant *Pichia pastoris* with EH from *Rhodotorula glutinis* has been constructed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR). The recombinant biocatalyst enantioselectively hydrolyze (*R*)-styrene oxide faster than (*S*)-enantiomer. The catalytic activity of recombinant biocatalyst was 7-fold higher than that of wild-type strain. The recombinant EH biocatalyst can be used for kinetic resolution for the production of enantiopure styrene oxide.

**Key Words** : epoxide hydrolase, chiral styrene oxide, recombinant biocatalyst

### 서론

광학적으로 순수한 카이랄 에폭사이드(chiral epoxide)는 반응성이 우수하여 다양한 화학반응을 일으킬 수 있어 고부가가치 광학활성 의약품 및 기능성 식품의 합성에 중간체로 폭넓게 이용할 수 있다.<sup>1)</sup> 많은 연구를 통해 동식물 유래의 epoxide hydrolase(EH)에 비해 미생물 유래의 EH가 기질 특이성도 다양하며 입체선택성도 높고 가수분해 속도가 빠르며 많은 양의 EH를 간편하게 얻을 수 있다는 장점이 있어 광학활성 에폭사이드 제조용 생촉매로써의 산업적 응용가능성이 높음이 밝혀져 있다.<sup>2-6)</sup> *Agrobacterium radiobacter*, *Aspergillus niger*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis* 등 미생물 유래의 EH를 이용하여 라세믹 에폭사이드(racemic epoxide)로부터 특정 이성질체만을 입체선택적 가수분해 반응을 통해 제거함으로써 순수한 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있다.<sup>7, 8)</sup> 그러나, 일반적으로 whole-cell 자체는 EH 활성이 제한되므로 생산성 향상이 어려워 EH 유전자를 클로닝하여 고효율로 발현시킨 재조합 생촉매를 개발함으로써 광학활성 에폭사이드

드 제조공정의 경제성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서는 방향족 에폭사이드 기질에 대한 입체선택성 가수분해능이 우수한 *R. glutinis*로부터 epoxide hydrolase 유전자를 클로닝하고 *Pichia pastoris*를 숙주세포로 발현시킨 유전자 재조합 EH 생축매를 개발하고자 하였다.

### EH gene 클로닝 및 단백질 발현

RT-PCR 방법을 이용하여 cDNA library를 제작한 다음 EH-specific gene primer를 이용하여 EH gene을 클로닝하였다. EH gene이 들어있는 플라스미드인 pGEM/RgEHY<sub>2</sub>를 얻은 후 pGEM/RgEHY<sub>2</sub>를 EcoR I 과 Xho I 으로 가수분해하여 EH gene을 얻은 다음 같은 제한효소로 절단한 pPICZ B vector에 ligation하였다. Zeocin(Invitrogen, USA)이 첨가된 LB plate에서 형성된 colony들로부터 plasmid DNA를 정제하여 여러 종류의 제한효소로 가수분해하여 확인한 후 EH gene이 들어간 pPICZ B/RgEHY<sub>2</sub> #2 DNA를 얻었다. pPICZ B/RgEHY<sub>2</sub> #2 DNA를 *Pichia EasyComp Kit*(Invitrogen, USA)를 이용하여 만든 Competent cell에 형질전환 시켜서 pPICZ B/RgEHY<sub>2</sub> #2-1, 2 및 3을 얻었다. Epoxide Hydrolase 단백질을 발현시키는 동안 methanol을 inducer로 사용하였으며 1% methanol 농도에서 60시간 동안 생축매로 사용하였다.

재조합 생축매 건조분말 50 mg을 1 ml의 100 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0)에 현탁시킨 후 50 mM의 농도로 styrene oxide 기질을 주입하여 반응시켰다. 30°C, 250 rpm에서 5분 동안 교반시키면서 반응시킨 다음 반응액 1ml를 cyclohexane으로 추출하고 유기용매층을 GC로 분석하여 enantiomeric excess ( $ee = \frac{(S-R)}{(S+R)} \times 100(\%)$ ) 값 및 EH의 활성을 평가하였다.<sup>9)</sup>

### 결과 및 고찰

*R. glutinis*의 epoxide hydrolase gene을 pGEM-T Easy vector에 subcloning하고 *P. pastoris* 발현 vector인 pPICZ B vector에 cloning하는 과정은 Fig. 1과 같았다.

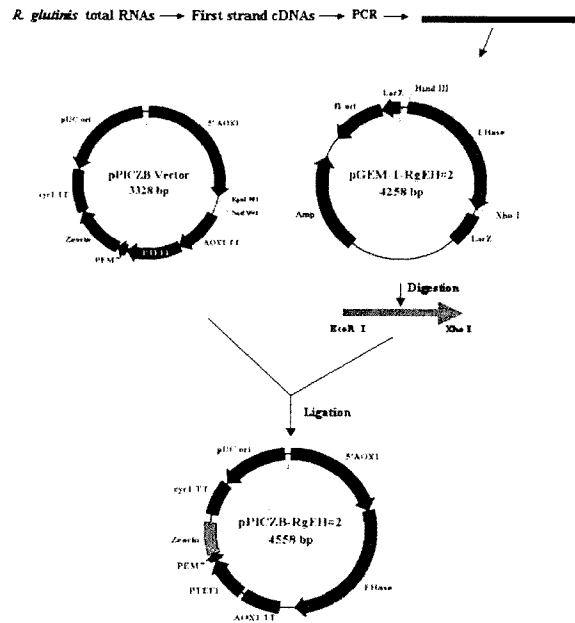
*R. glutinis*의 EH 유전자를 재조합한 pPICZ B/RgEHY<sub>2</sub> #2 plasmid를 linearization을 시킨 후 *P. pastoris*에 형질전환을 시켜 얻은 positive 콜로니들을 zeocin 선택 한천배지에서 선별하였다. 선별된 콜로니들로부터 genomic DNA를 분리하고 AOX gene primer를 사용하여 PCR을 수행하여 EH gene이 integration 되었음을 확인할 수 있었다. 2000bp 와 2300bp 각각의 위치에 하나씩의 band가 확인된 것으로 보아 single-crossover 과정을 통해 genomic DNA에 integration되었음을 알 수 있었다.

Inducer로 1% methanol 농도를 유지하면서 재조합 EH를 발현시킨 균체 50mg(dry cell weight)을 50 mM styrene oxide와 반응시켰다. 반응시작 5분 후 반응액 1mℓ를 cyclohexane으로 추출하고 chiral GC 분석을 통해 입체특이성 가수분해 반응을 확인한 결과는 Fig. 2와 같았다. *R. glutinis*의 EH 유전자를 재조합시킨 *P. pastoris*는 racemic styrene oxide를 기질로 사용한 경우 wild-type 대비 약 7배 이상의 입체선택적 가수분해능을 보였다.

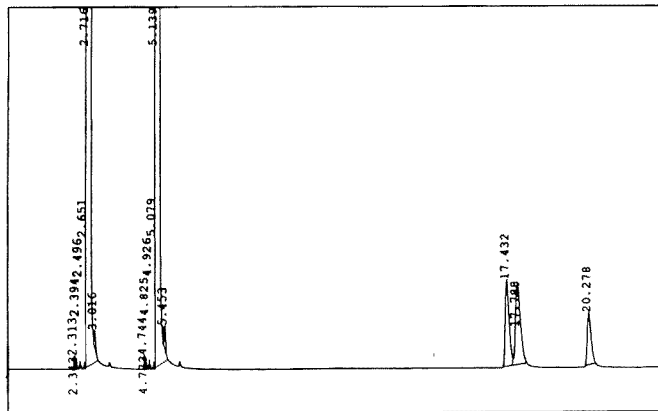
결과적으로 유전자 재조합 *P. pastoris*는 styrene oxide 기질에 대해 우수한 입체선택적 가수분해능을 확인할 수 있었으며 재조합 EH는 chiral epoxide 제조용 생물전환공정의 생촉매로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

#### 참고문헌

1. Besse, P. and H. Veschambre, "Chemical and biological synthesis of chiral epoxides" (1994), *Tetrahedron*, 50, 8885-8927.
2. Cagnon, J. R., A. L. N. Porto, and A. J. Marsaioli, "First evaluation of the brazilian microorganisms biocatalytic poteneial" (1999), *Chemosphere*, 38, 2237-2242.
3. Krenn. W., I. Osprian, W. Kroutil, G. Braunegg, and K. Faber, "Bacterial epoxide hydrolases of opposite enantiopreferece" (1999), *Biotechnol. Lett.*, 21, 687-690.
4. Tang, Y.-F., J.-H. Xu, Q. Ye, and B. Schulze, "Biocatalytic prepatation of (*S*)-phenyl glycidyl ether using newly isolated *Bacillus megaterium* ECU1001" (2001), *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 13, 61-68.
5. Zoicher, F., M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, B. Hauer, W. Wohlleben, and R. D. Schmid, "Epoxide hydrolase activity of *Streptomyces* strains" (2000), *J. Biotechnol.*, 77, 287-292.
6. Weijers, C. A. G. M., "Enantioselective hydrolysis of arylalicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*" (1997), *Tetrah. Asymm.*, 8, 639-647.
7. Steinreiber, A. and K. Faber, "Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations" (2001), *Current Opinion in Biotechnol.*, 12, 552-558.
8. Weijers, C. A. G. M., and J. A. M. de Bont, "Epoxide hydrolases from yeasts and other sources: versatile tools in biocatalysis" (1999), *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 6, 199-214.
9. Lee, E. Y., W. J. Choi, S. J. Yoon, H. S. Kim, and C. Y. Choi, "Biocatalytic production of chiral epoxides" (1999), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 14, 259-264.



**Fig. 1.** Cloning strategy of *R. glutinis* by Epoxide Hydrolase(EH) in pPICZ B expression vector. EH DNA was obtained from *R. glutinis* total RNAs by RT-PCR.



**Fig. 2.** Chiral GC analysis of racemic styrene oxide substrate after the enantioselective hydrolysis using recombinant *P. pastoris* with pPICZ B/RgEHY<sub>2</sub> #2. Peak area (R)-enantiomer is completely disappeared due to the enantioselective hydrolysis by recombinant EH.