Journal of Life Science **2005**, Vol. 15. No. 3. 332~336 ©JLS

4-(p-Nitrobenzyl)pyridine의 색깔반응을 이용한 미생물 epoxide hydrolase의 활성 평가

김희숙 · 이은열*

경성대학교 식품공학과

Received February 2, 2005 / Accepted April 6, 2005

Evaluation of Microbial Epoxide Hydrolase Activity Based on Colorimetric Assay Using 4-(p-nitrobenzyl) Pyridine. Hee Sook Kim and Eun Yeol Lee*. *Department of Food Science and Technology, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea* – Epoxide hydrolase activities of various microbial cells were analyzed by colorimetric assay based on alkylation of epoxides with 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine (NBP). The epoxide hydrolase activity was determined by measuring the decrease of color intensity at 560 nm due to the decrease of styrene oxide substrate by epoxide hydrolase-catalyzed hydrolysis reaction. The experimental conditions of NBP colorimetric assay were optimized for the efficient measurement of epoxide hydrolase activities from various microbial cells.

Key words – assay, biocatalyst, epoxide hydrolase, 4-(*p*-niteobenzyl)pyridine, styrene oxide

에폭사이드 환구조의 불안정성 및 산소 원자의 전기음성도에 기인한 극성 때문에 에폭사이드는 반응성이 대단히 우수하여 친전자성반응, 친핵성반응 등 다양한 반응을 유도할 수 있다[1]. 이러한 다양한 반응성과 함께 광학적으로 순수한 광학활성 에폭사이드(chiral epoxide)는 광학활성 의약품 합성용 중간체로 사용될 수 있는 고부가가치 광학활성 중간체이다[3]. 에폭사이드 라세믹혼합물에 대한 입체선택적 가수분해 활성 차이를 이용한 순수한 광학활성 에폭사이드 제조법은 저가의 라세믹 기질로부터 고부가가치의 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있어 상업화 가능성이 높은 기술이다[8]. Epoxide hydrolase (EH) 바이오촉매를 사용하면 라세믹 에폭사이드 기질로부터 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있으며, cofactor 재순환이 요구되지 않고, whole-cell biocatalyst로 사용할 수 있으며, 안정된 구조를 가지고 있어 상업적 유용성이 높은 바이오촉매로 평가되고 있다[9].

광학활성 에폭사이드 제조에 활용될 수 있는 미생물 유래의 epoxide hydrolase 효소 활성은 GC, HPLC 및 자외선 분광기를 이용하여 측정할 수 있다[4,6,7]. 현재 가장 널리 사용되고 있는 GC 및 HPLC를 사용한 활성 분석법은 고가의 분석기기가 요구되며, 분석용 샘플 제조가 복잡하며, 분석 시간이 길고, 숙련된 분석기술이 요구된다. 이러한 특성을 가진 GC 및 HPLC 분석법은 대용량의 미생물 후보군집으로부터 유용한 epoxide hydrolase 활성을 가지는 신규 미생물을 효율적으로 선별하기 위한 활성 평가 방법으로 적합하지 못하다. 이에 비해 UV/vis 분광기를 이용한 활성 측정법은 기기 사용법이 간단하고, 별도의 샘플 처리가 요구되지 않아 효율적인 활성 측정이 가능하다[2]. 특히, 색깔 변화를 기준으로 한 colorimetric assay법은 별도의 분석기기 없이도 정성적인 수준에서의 활성 측정이 가능하며, 분석기기를 이용하여 정량적인 측정도 용이하므로 대용량 샘플에 대한 활성 평가 방법으로써 경쟁력을 확보할 수 있다.

Epoxide hydrolase에 의한 가수분해 반응 후 잔존하는 에폭사이드 기질과 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine (NBP)이 alkylation 반응을 하여 푸른색으로 변화하므로 560 nm에서 흡광도를 측정함으로써 생촉매 반응 전후에 존재하고 있는 epoxide 양의 감소를 계산할 수 있고, epoxide hydrolase의 활성을 손쉽게 평가할 수 있다[10,11]. 본 연구에서는 기존에 보고되었던 NBP assay법을 미생물 세포 유래의 epoxide hydrolase 활성 평가에 효율적으로 응용시키기 위하여 활성 측정조건을 분석하였으며, *Rhodosporidium toruloides* SJ-4, *Rhodotorula glutinis*의 epoxide hydrolase 유전자를 재조합시킨 *Escherichia coli* 및 재조합 *Pichia pastoris* 세포를 모델 미생물 세포 생촉매로 선정하여 epoxide hydrolase 활성 평가를 실시하였다.

실험재료 및 방법

미생물 균주 및 배양 조건

Rhodosporidium toruloides SJ-4를 배양하기 위한 배지로는 1%(w/v) yeast extract, 1%(w/v) glucose를 포함하는 최소배지(Peptone 10 g/l, NaCl 2 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.147 g/l, NaH_2PO_4 1.3 g/l, K_2HPO_4 4.4 g/l)를 사용하였으며, 배양온도 27℃, 250 rpm에서 48시간 진탕 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 후 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 두 번 세척 후 생촉매로 사용하였다.

유전자재조합 *P. pastris*를 배양하기 위한 배지로는 1% (w/v) yeast extract, 1%(w/v) peptone을 포함하는 BMGY 배지(10%(v/v) sodium phosphate buffer, 1%(v/v) glycerol, $4x10^{-3}$%(w/v) biotin)와 BMMY 배지(10%(v/v) sodium phosphate buffer, 0.5%(v/v) methanol, $4x10^{-3}$%(w/v) biotin)를

*Corresponding author
Tel : +82-51-620-4716, Fax : +82-51-622-4986
E-mail : eylee@ks.ac.kr

사용하였다[4,5]. 5 ml의 BMGY 배지가 있는 100 ml 플라스크에 고체 배지의 단일 colony을 접종하여 30℃, 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 3회 공급하였다. 재조합 *E. coli* BL21 (DE3)는 ampicillin (50 μg/ml)이 함유된 LB plate에서 OD_{600} 값이 0.5가 될 때까지 배양한 후 IPTG를 최종농도 1 mM이 되도록 첨가하고 3시간 30분 더 배양하여 두 번 세척한 다음 생촉매로 사용하였다.

NBP를 이용한 epoxide hydrolase 활성 측정 방법

Epoxide hydrolase 활성 분석에 사용한 NBP 용액은 methoxyethanol에 녹인 230 mM의 stock solution을 사용하였다. *R. toruloides* 등의 미생물세포 생촉매를 사용하지 않은 대조군 실험에서의 NBP 반응은 다음과 같이 실시하였다. 600 μl의 LB배지에 styrene oxide (stock solution: 60 mM)를 240 μl 첨가하여 최종 농도가 10 mM이 되게 하였다. NBP 용액을 300 μl 첨가하여 최종 농도가 46 mM이 되도록 하고, triethylamine 용액을 300 μl (216 μg) 첨가한 다음, shaking incubator (39℃, 250 rpm)에서 60분간 반응시켰다. 반응액을 UV/vis 분광기를 이용하여 560 nm에서 흡광도 변화를 측정하고, 검량곡선을 이용하여 정량화하였다. *R. toruloides* 등의 세포 생촉매를 사용한 경우에서 가수분해 반응 및 NBP 반응은 다음과 같이 실시하였다. *R. toruloides*, 유전자재조합 *E. coli* 및 *P. pastoris* 세포 0.25~25.0 mg/ml (dry cell weight)을 600 μl의 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)에 현탁시킨 후 10 mM 라세믹 styrene oxide를 주입하고, 35℃, 250 rpm의 진탕배양기에서 20분간 가수분해 반응을 실시하였다. 세포 생촉매를 사용한 경우 NBP assay를 이용한 epoxide hydrolase 활성 측정은 세포에 의한 흡광도 오차를 줄이기 위하여 NBP 반응 후 반응액을 원심분리(13,000 rpm, 5분)하여 세포를 제거한 다음, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 96 well plate에서는 위에 기술한 같은 조건에서 well 부피에 맞추어 비례적으로 부피만을 줄여 NBP를 이용한 epoxide hydrolase 활성 측정을 실시하였으며, 세포를 제거하지 않은 상태에서의 활성 측정도 실시하였다.

결과 및 고찰

NBP alkylatin 반응에 triethylamine 첨가 효과

일반적으로 alkylating 기질인 halogen compounds, carboxylic acid, organic phosphoric compounds, aziridine, 및 epoxides는 NBP와 반응시켜 색깔변화 반응을 유도할 수 있다[10]. 따라서, epoxide hydrolase의 가수분해 활성에 의해 diol로 분해되고 남은 에폭사이드 기질을 NBP와 반응시켜 색깔반응을 유도한 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하고, epoxide hydrolase를 넣지 않은 대조군 실험에서의 흡광도 대비 감소 정도를 측정하면 epoxide hydrolase 활성을 손쉽게 평가할 수 있다. NBP의 alkylation 반응에 의한 색깔 변화로 epoxide hydrolase 생촉매 활성을 측정함에 있어 비교적 쉽게 인식할 수 있는 흡광도 변화량을 효율적으로 얻기 위하여 활성 측정조건을 분석하였다. 우선, 기질로 사용되는 styrene oxide에 의한 NBP의 alkylation 반응 효율을 높이기 위하여 염기인 triethylamine 첨가효과를 살펴보았다. LB 배지에 10 mM의 styrene oxide을 첨가하고, 216 μg의 triethylamine을 첨가한 반응액과 triethylamine을 첨가하지 않은 대조군을 비교하였다. Alkylation 반응을 진행시키면서 560 nm에서 흡광도를 측정한 결과, triethylamine를 첨가한 경우에서 반응시간 경과에 따른 흡광도 변화율이 크게 나왔다 (Fig. 1). 기존 연구에서는 염기의 첨가가 영향이 없거나 오히려 반응을 저해한다는 결과가 나온 반면[10], 본 연구의 실험조건에서는 triethylamine을 첨가하고 NBP alkylation 반응을 수행하는 것이 색깔 변화를 보다 효율적으로 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

Styrene oxide 기질 사용량의 효과

사용하는 styrene oxide 기질양의 변화에 따른 NBP 색깔 반응의 흡광도 변화를 살펴보았다. Fig. 2에서와 같이 세포를 사용하지 않은 대조군 실험에서는, styrene oxide의 농도를 1~20 mM로 변화시킴에 따라 NBP 색깔 반응에 의한 흡광도도 비례적으로 증가하였다. *R. toruloides*를 세포 생촉매(25 mg/ml)로 사용하여 20분간 가수분해 반응을 진행한 경우,

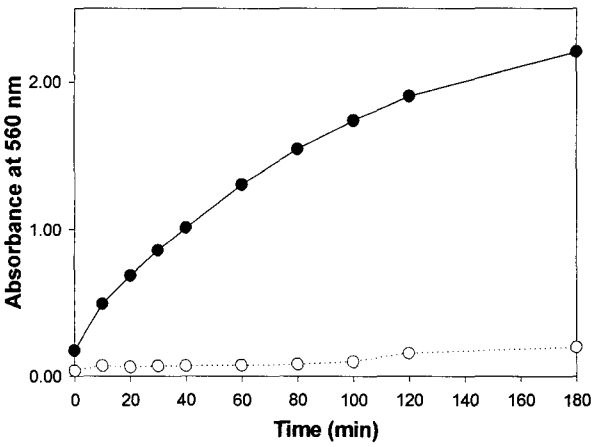

Fig. 1. Effect of the addition of triethylamine on NBP alkylation reaction. The progress of NBP alkylation with 10 mM styrene oxide was measured by the change in absorbance at 560 nm. (-●-: with triethylamine, -○-: without triethylamine).

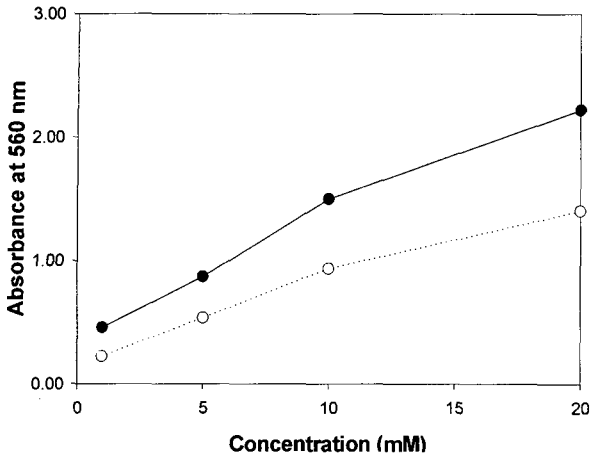

Fig. 2. Effect of styrene oxide concentrations in the absence and presence of cells possessing epoxide hydrolase activity on absorbance at 560 nm. (-○-: in the presence of *R. toruloides* cells, -●-: in the absence of cells).

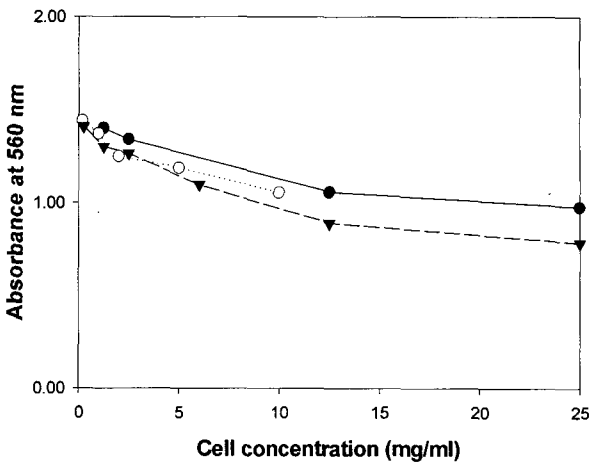

Fig. 3. Effect of cell concentrations on absorbance at 560 nm. (-●-: *R. toruloides*, -○-: recombinant *E. coli*, -▼- : recombinant *P. pastoris*).

세포 유래의 epoxide hydrolase 활성에 의하여 기질로 제공된 styrene oxide가 가수분해되어 NBP의 alkylation 반응에 참여할 수 있는 styrene oxide의 양이 줄어들기 때문에 흡광도도 대조군에 비해 낮게 나왔다. NBP assay는 epoxide hydrolase 활성에 의해 분해되고 남은 에폭사이드 기질에 대한 색깔반응을 유도하는 것이므로, epoxide hydrolase 활성을 가진 생촉매가 있는 반응액에서는 파란 색깔이 옅어지게 된다. 따라서, 세포 생촉매를 사용하지 않은 대조군에 비해 세포 생촉매를 사용하는 경우 흡광도가 감소되므로, 이러한 흡광도 변화량을 측정함으로써 손쉽게 미생물 세포 유래의 epoxide hydrolase 활성을 측정할 수 있음을 확인할 수 있었다.

미생물 세포양이 NBP assay에 미치는 효과

미생물 세포 유래의 epoxide hydrolase 활성을 NBP 색깔반응으로 확인하기 위하여 사용해야 하는 최적의 세포양을 결정하기 위하여 60분간 NBP 색깔반응을 진행했을 때의 사용하는 미생물 생촉매량 사용량에 따른 흡광도 변화량을 측정하였다(Fig. 3). 미생물 세포 생촉매로는 *R. toruloides* 균주와 *R. glutinis*의 epoxide hydrolase 유전자를 재조합한 재조합 *E. coli* 및 재조합 *P. pastoris*를 사용하였다. 10 mM의 styrene oxide 기질에 대하여 0.25~25.0 mg/ml의 세포량을 첨가하고, 20 분간 styrene oxide 기질에 대한 가수분해반응을 진행한 다음, 정확한 흡광도 측정을 위하여 세포 생촉매는 원심분리로 제거한 후 560 nm에서 흡광도 변화량을 측정하였다. 사용하는 세포양이 많을수록 흡광도 변화량도 비례적으로 감소하였는데, 이는 사용하는 세포양이 많을수록 전체 epoxide hydrolase 활성이 증가하기 때문에 흡광도 감소량이 커진 것이다. 또한, 세포 건조중량당 epoxide hydrolase 활성이 높은 재조합 *E. coli*와 재조합 *P. pastoris* 세포를 생촉매로 사용한 경우에서 흡광도 감소가 보다 크게 나왔다. Fig. 3에서와 같이 12.5 mg/ml 세포 농도에서 흡광도 감소량을 손쉽게 측정할 수 있는 변화량인 0.5 정도를 얻을 수 있었고, 그 이상의 세포 농도에서는 흡광도 감소 정도가 줄어들었다. 따라서 NBP assay를 이용한 미생물의 epoxide hydrolase 활성을 확인하기 위한 최적 세포 양으로 12.5 mg/ml 수준으로 사용하는 것이 좋은 것으로 판단되었다.

에폭사이드 가수분해반응과 NBP alkylation 반응의 동시 수행을 통한 assay 효율 향상

일반적으로 epoxide hydrolase에 의한 에폭사이드 가수분해에 요구되는 반응시간은 NBP가 에폭사이드 기질과의 alkylation 반응에 요구되는 반응 시간에 비해 짧으므로, 에폭사이드 가수분해 반응과 NBP 색깔반응을 동시에 수행하는 경우 활성 측정에 필요한 시간과 샘플 처리가 간단해져 NBP assay의 효율성을 높일 수 있다. *R. toruloides* 생촉매 25 mg/ml를 넣은 반응액에 10 mM styrene oxide 기질 이외에 NBP와 triethylamine을 함께 첨가하여 에폭사이드 가수분해 반응과 NBP 색깔반응을 동시에 진행하였다. 대조군 실험으로는 1단계에서 *R. toruloides* 생촉매를 이용하여 10 mM styrene oxide 가수분해 반응을 약 30분간 충분히 진행시킨 다음, 2단계에서 NBP 색깔 반응을 실시하고 흡광도를 측정한 실험 결과를 사용하였다. Fig. 4에서와 같이 반응을 분리시킨 대조군 실험 결과와 동시에 반응을 진행시킨 실험에서의 결과가 유사하게 나왔음을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 epoxide hydrolase 가수분해 반응과정에 NBP 및 triethylamine을 첨가하고 반응을 시켜도 epoxide hydrolase 활성 저하 등의 문제가 크게 유발되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 가수분해 반응과 NBP 색깔반응을 통한 활성 측정반응을 동시에 진행해도 정성적인 epoxide hydrolase 활성 측정은 가능하므로 대용량의 미생물 후보군들로부터 신기능 epoxide hy-

drolase 활성을 가진 신규 미생물을 선별하는 연구에서는 두 반응을 동시에 수행하는 것이 보다 편리할 것으로 기대된다. 지금까지의 실험을 통해 얻은 NBP assay 최적 조건에서 96 well plate에서 미생물 세포 유래의 epoxide hydrolase 활성을 정성적으로 측정해본 결과, epoxide hydrolase 활성이 있는 미생물 세포 생촉매가 존재하는 well의 경우 확연하게 파란색이 감소함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5). 결론적으로 epoxide hydrolase에 의해 가수분해되고 남은 에폭사이드 기질과 색깔반응을 낼 수 있는 NBP를 이용하여 대조군 대비 560 nm에서의 흡광도 감소를 측정함으로써 손쉽게 epoxide

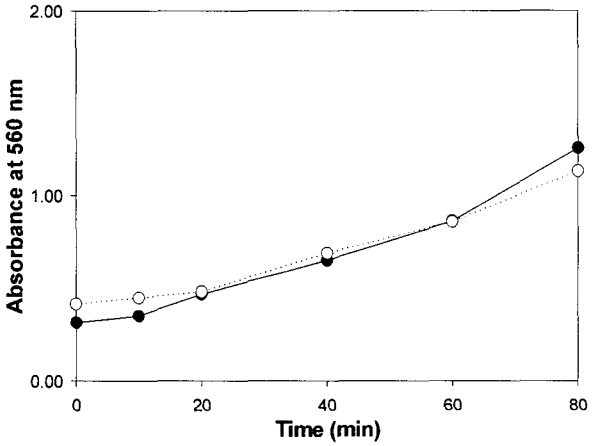

Fig. 4. Comparison of one-pot activity assay and two-step activity assay. In the one-pot activity assay, hydrolysis reaction by epoxide hydrolase was done together with color development reaction using NBP. In the two-step activity assay, hydrolysis of epoxides was done and then followed by color development reaction using NBP. (-○-: one-pot assay, -●-: two-step assay).

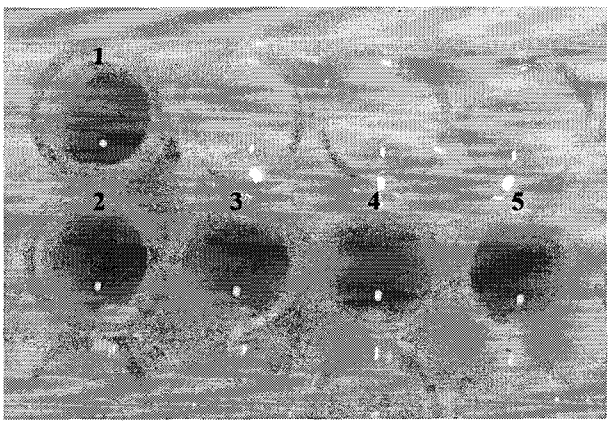

Fig. 5. Photographs of NBP assay of 96 well plate using various concentrations of microbial cell biocatalysts. (Sample 1 and 2; control NBP test in the presence of cells without epoxide hydrolase activity, sample 3-5; NBP test in the presence of 5, 15, 25 mg/ml of *R. toruloides* cells, respectively)

hydrolase 활성을 측정함을 확인할 수 있었다. 이 방법은 미생물 세포 생촉매에 의한 에폭사이드 가수분해 반응과 생촉매 활성을 측정할 수 있는 NBP 색깔 반응을 동시에 수행함으로써 대용량의 미생물 군집으로부터 유용한 epoxide hydrolase 활성을 가진 신규 미생물을 1차 선별하는데 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

4-(*p*-Nitrobenzyl)pyridine (NBP)의 색깔변화를 이용한 epoxide hydrolase 활성 측정법을 사용하여 다양한 미생물 세포 유래의 epoxide hydrolase 활성을 측정하고 평가하였다. Epoxide hydrolase의 가수분해 반응에 의해 분해되고 남은 에폭사이드 기질에 의한 NBP alkylation 반응을 통한 색깔변화로 손쉽게 epoxide hydrolase 활성을 측정할 수 있었다. NBP 반응에서 triethylamine을 첨가하여 색깔반응 효율을 높일 수 있었으며, 10 mM styrene oxide에 대한 최적 세포 사용량은 12.5 mg/ml로 결정하였다. 본 연구에서 얻은 colorimetric assay 조건에서 대용량의 미생물 후보군집으로부터 유용한 epoxide hydrolase를 가지는 신규 미생물을 효율적으로 선별할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Archelas, A. and R. Furstoss. 2001. Synthetic applications of epoxide hydrolases. *Current Opinion in Chem. Biol.* **5**, 112-119.
2. Doderer. K., S. Lutz-Wahl, B. Hauer and R. D. Schmid. 2003. Spectrophotometric assay for epoxide hydrolase activity toward any epoxide. *Anal. Biochem.* **321**, 131-134.
3. Kasai, N., T. Suzuki, Y. Furukawa. 1998. Chiral C3 epoxides and halohydrins: their preparation and synthetic application. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **4**, 237-252.
4. 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*. *Enzym. Microbial Technol.* **35**, 624-631.
5. Lee, J.-H. and E. Y. Lee. 2004. Batch production of chiral epichlorohydrin by enantioselective hydrolysis reaction using *Rhodosporidium toruloides*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 38-41.
6. Mateo, C., A. Archelas, and R. Furstoss. 2003. A spectrophotometric assay for measuring and detecting an epoxide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* **314**, 135-141.
7. Moussou, P., A. Archelas, and R. Furstoss. 1998. Microbiological transformations 41: screening for novel epoxide hydrolase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **5**, 447-458.
8. Steinreiber, A. and K. Faber. 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations. *Current Opinion in Biotechnol.* **12**, 552-558.
9. Weijers, C. A. G. M. and J. A. M. de Bont. 1999. Epoxide hydrolases from yeasts and other sources: versatile tools in

biocatalysis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **6**, 199-214.
10. Zocher, F., M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, B. Hauer and R. D. Schmid. 1999. A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity. *Analytica Chimica Acta.* **391**, 345-351.
11. Zocher, F., M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, B. Hauer, W. Wohlleben and R. D. Schmid. 2000. Epoxide hydrolase activity of *Streptomyces* strains. *J. Biotechnol.* **77**, 287-292.