

# Aspergillus niger의 Epoxide Hydrolase 고효율 발현 및 라세믹 에폭사이드의 입체선택적 가수분해

이수정 · 김희숙 · 이은열<sup>†</sup>

경성대학교 공과대학 식품공학과  
(2005년 8월 25일 접수, 2006년 6월 12일 채택)

## Enhanced Heterologous Expression of *Aspergillus niger* Epoxide Hydrolase and Its Application to Enantioselective Hydrolysis of Racemic Epoxides

Soo Jung Lee, Hee Sook Kim, and Eun Yeol Lee<sup>†</sup>

Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungsoong University,  
Busan 608-736, Korea

(Received August 25, 2005; accepted June 12, 2006)

*Aspergillus niger* LK의 epoxide hydrolase (EH)를 codon usage를 고려한 *Escherichia coli* 균주에서 고효율로 발현할 수 있었다. *E. coli*에서 잘 사용되지 않는 rare codon에 대한 tRNA 유전자 정보가 들어있는 plasmid를 함유한 *E. coli* 균주인 Rosetta (DE3)PLysS를 숙주세포로 사용하였다. *A. niger* EH를 발현시킨 재조합 *E. coli*를 생축매로 사용하여 라세믹 styrene oxide 혼합물과 반응시켰을 때, (R)-styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해활성이 향상됨을 확인할 수 있었다. 또한 라세믹 기질로부터 입체적으로 고순도인 99% ee 값을 갖는 광학적으로 순수한 (S)-styrene oxide를 얻을 수 있었다.

The epoxide hydrolase (EH) of *Aspergillus niger* LK was expressed to high levels in *Escherichia coli* based on codon usage. *E. coli*, Rosetta (DE3)PLysS, containing a large number of tRNAs for rare-codons was employed as a host strain. The recombinant *E. coli* expressing *A. niger* EH showed an enhanced enantioselective hydrolysis activity toward racemic styrene oxide. Enantiopure (S)-styrene oxide with a high enantiopurity of 99% ee was obtained from racemic substrates.

**Keywords:** epoxide hydrolase, *Aspergillus niger*, enantioselective hydrolysis, *Escherichia coli* Rosetta, codon usage

### 1. 서 론

Epoxide hydrolase (EH, EC 3.3.2.3)는 에폭사이드 기질을 diol로 가수분해시키는 효소로써 박테리아, 효모, 곰팡이, 곤충, 식물, 포유류 등에서 다양하게 발견되고 있다[1-3]. EH는 라세믹 에폭사이드 기질로부터 (R)- 또는 (S)-이성질체 중 한 가지만을 입체선택적으로 가수분해시켜 제거함으로써 광학적으로 순수한 에폭사이드를 제조할 수 있다[4]. 광학활성 에폭사이드(enantiopure epoxide)는 분자구조에 있는 epoxide ring의 반응성이 우수하여 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용되고 있다[5].

광학활성 에폭사이드 제조를 위한 미생물 생축매로 라세믹 에폭사이드 기질에 대한 입체선택성이 우수한 *Aspergillus niger* EH가 널리 활용되어 왔다. 분자수준에서 EH 구조 및 반응 메카니즘을 살펴보면, *A. niger* EH는 Asp (192), His (374)와 Asp (348) 등이 catalytic triad를 이루면서 촉매 활성점을 구성하고 있는 것으로 밝혀져 있다[6-8]. 또한, 효소 활성점에 존재하고 있는 두 개의 tyrosine (Tyr251, Tyr314)이 epoxide ring과 수소결합을 형성하면서 기질을 촉매 활성점 부위에 위

치시키면서 기질에 대한 우수한 입체선택성을 보인다[9-13].

입체선택성이 우수한 *A. niger* EH를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조기술 개발에 있어서, 주로 wild-type의 전세포(whole-cell) 자체를 생축매로 사용하거나, 효소를 분리하여 사용하였다. 전세포 생축매의 경우 전체 단백질 대비 EH 발현양이 매우 적어 비특매(specific activity) 활성이 낮다는 문제점이 있으며, 효소를 분리하여 사용하는 경우 분리·정제과정에서의 활성 손실, 비용 증가 등의 문제점이 있다. 따라서 EH 유전자를 클로닝한 후 고효율로 발현시킨 재조합 생축매를 개발하면 광학활성 에폭사이드 제조 공정의 경제성을 향상시킬 수 있다.

외래 단백질 재조합 발현용 숙주로 널리 사용되는 *Escherichia coli*를 이용하여 *A. niger* EH 유전자를 발현한 경우, EH 단백질 발현 효율이 매우 낮았다[14]. 그 이유로 고려할 수 있는 것이 *A. niger*와 *E. coli*의 codon usage에서의 선호도 차이를 들 수 있다. *E. coli*에서 주로 사용되지 않는 codon을 살펴보면, CGG (Arg) 0.3%, CGA (Arg) 0.5%, GGA (Gly) 0.8%, CCC (Pro) 0.5%, CCT (Pro) 0.7% 등이 있다[15]. 만약 *A. niger* EH의 codon usage가 위에 제시되어 있는 *E. coli* rare codon의 사용빈도가 높다면, codon usage 차이에 따라 번역이 제대로 이뤄지지 않아서 발현 효율이 저하될 수 있다.

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: eylee@ks.ac.kr)

Table 1. A List of Rare Codons Used in *A. niger* EH Gene

Amino acid	Rare codon	Fraction in <i>A. niger</i>	Fraction in each
		EH gene (%)	amino acid (%)
Arg	AGA	5.6	0.3
	AGG	11.1	0.5
	CGA	27.8	1.3
	CGG	33.3	1.5
Gly	GGA	26.9	1.8
Leu	CUA	14.6	1.5
Pro	CCC	48.4	3.8
	CCU	22.7	2.3

최근에 본 연구진은 *p*-nitro styrene oxide, styrene oxide, 4-chlorostyrene oxide 등 상업적으로 유용한 방향족 에폭사이드 제조에 활용할 수 있는 고효율 유전자 재조합 생촉매를 개발하기 위하여, *A. niger* LK의 EH 유전자를 클로닝하고 분자수준에서 그 특성을 분석하였으나, EH 유전자를 고효율로 발현할 수는 없었다[16]. 본 연구에서는 codon usage를 고려하여 다양한 방향족 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해능이 우수한 *A. niger* EH를 고효율로 발현하고자 하였다. 또한, 유전자 재조합 EH의 촉매적 특성을 분석하고, enantiopure styrene oxide 제조용 생촉매로서의 가능성을 평가해 보았다.

## 2. 재료 및 실험방법

### 2.1. *E. coli*를 이용한 재조합 EH의 발현 및 분석

*E. coli*에 *A. niger*의 EH 유전자를 발현시키기 위하여 pET21b(+)/AnEH plasmid DNA를 정제하였다[17]. Rosetta competent cell 50  $\mu$ L에 0.1~0.5  $\mu$ g recombinant DNA를 섞은 다음 전기적 충격을 가한 후 1 mL의 LB 배지를 첨가하여 1 h 동안 37  $^{\circ}$ C 항온수조에서 반응을 통해 형질전환체를 얻었다. 재조합 Rosetta 형질전환체를 ampicillin (50  $\mu$ g/mL)과 chloramphenicol (34  $\mu$ g/mL)이 함께 함유된 LB plate에서 16 h 동안 37  $^{\circ}$ C에서 배양하여 positive colony를 얻었다. 선택된 재조합 형질전환체를 50  $\mu$ g/mL ampicillin과 34  $\mu$ g/mL chloramphenicol이 함유된 LB배지에 OD<sub>600</sub>값이 0.5가 될 때까지 배양한 후 IPTG를 최종 농도 1 mM이 되도록 첨가한 후 3 h 30 min 더 배양하였다. 대조군으로는 IPTG를 첨가하지 않고 배양한 균을 사용하였다. 배양액을 원심 분리하여 얻은 cell pellet을 효소활성과 전기영동의 시료로 사용하였다. 발현된 세포현탁액에 Laemmli buffer를 가한 후 변성시켜 12% gel 상에서 SDS-PAGE를 행하고 immunoblotting analysis 및 Coomassie Blue로 염색하여 발현정도를 비교하였으며 GC를 통해 발현정도를 분석하였다.

### 2.2. 입체선택적 가수분해 반응 및 가스크로마토그래피(GC) 분석

유전자재조합 *E. coli* 생촉매를 100 mg (dry cell weight)을 10 mL의 100 mM 인산완충액(pH 8.0)에 현탁시킨 후 0.5~20 mM 농도로 다양한 라세믹 에폭사이드 기질을 주입하였다. 반응기로는 screw-cap 플라스크 또는 jacketed glass 효소반응기를 사용하였으며, 30  $^{\circ}$ C, 250 rpm에서 교반시키면서 반응을 진행시켰다. 반응용액을 cyclohexane으로 추출한 후, 유기용매 층을 GC로 분석하여 enantiomeric excess (ee) =  $\frac{(S-R)}{(S+R)} \times 100(\%)$  값 및 EH 활성을 평가하였다. 기질인 라세믹 styrene oxide 및 광학적으로 순수한 styrene oxide 표준품은 시약 등급

을 구입하여 사용하였다. 광학활성 styrene oxide의 ee값 및 수율을 계산하기 위하여 (R)-이성질체와 (S)-이성질체에 대한 분리능이 있는 Supelco사의  $\beta$ -Dex 120 (0.25 mm ID, 30 m length, 25  $\mu$ m film thickness) 컬럼을 사용하였다. GC 분석조건은 split ratio는 1:100, flow rate는 0.5 ml/min으로 1  $\mu$ L의 시료를 주입하여 분석하였고, column, injector, detector의 온도는 각각 100, 220, 220  $^{\circ}$ C이었다[18].

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. *A. niger* EH 유전자 특성 분석

Arand 등은 *A. niger*로부터 EH 유전자를 클로닝하고 그 특성을 보고하였다. *E. coli*에서 EH 유전자를 발현시킨 결과, 효율적인 발현이 되지 못해서 재조합 *E. coli*의 입체선택적 가수분해 활성이 매우 낮았다[9]. 본 연구진도 방향족 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해능이 우수한 *A. niger* LK를 선별하고 EH 유전자를 클로닝하여 *E. coli*를 숙주세포로 사용하여 얻은 유전자 재조합 *E. coli* 경우에서도 단백질 발현정도 및 그 EH 활성이 매우 낮았다[16]. 일반적으로 고효율로 발현된 유전자 재조합 미생물의 경우, wild-type 균주보다 촉매능이 우수하며, 효소만을 분리·정제하여 사용하지 않아도 생촉매로써의 가능성이 높기 때문에 상업적 가치가 매우 높다. 따라서 고효율 유전자 재조합 *E. coli* 생촉매를 개발하기 위하여 codon usage를 고려하여 *A. niger* EH 유전자를 고효율로 발현시키는 것은 상업적 측면에서 중요한 일이다.

*E. coli*에서 주로 사용되지 않는 codon을 살펴보면, 주로 arginine, glycine, leucine 등에서 주로 rare codon들이 존재함이 알려져 있다[19]. Arginine을 coding하고 있는 여섯 개의 codon 중에서 AGG (2.2%), AGA (3.9%), CGG (9.8), CGA (6.5%)가 rare codon으로 알려져 있다. Glycine은 GGA (10.9%), isoleucine은 AUA (7.3%), leucine은 CUA (3.7%), proline은 CCC (12.4%) 등이 rare codon으로 알려져 있다. *A. niger* EH의 codon usage가 위에 제시되어 있는 *E. coli* rare codon의 사용빈도가 높다면, codon usage 차이에 따라 번역이 제대로 이뤄지지 않아서 발현 효율이 저하될 수 있으므로 *A. niger* EH 유전자에 대한 codon을 조사해 보았다(Table 1). Arginine의 경우 *E. coli*에서 rare codon인 AGA, AGG, CGA, CGG가 높은 비율로 사용되고 있음을 알 수 있었다. EH gene에 있는 총 18개의 arginine 중 rare codon이 14개가 존재하고 있어 77.8%의 높은 비율로 rare codon이 사용되고 있음을 알 수 있었다. Proline의 경우에서도 총 31개 중에서 24개의 rare codon이 있어 77.4%의 높은 비율로 존재하고 있었다. 따라서 *A. niger* EH gene에는 *E. coli*의 rare codon 존재 비율이 매우 높아 고효율로 발현됨이 어려움을 알 수 있었다.

*A. niger* EH gene 전체를 *E. coli* 선호도가 높은 codon으로 변경시키는 것은 시간과 비용이 많이 드는 비효율적인 방법이다. 특정 codon의 usage가 낮은 이유는 그 codon에 해당하는 tRNA의 양이 부족하므로, 이러한 특정 tRNA를 coding하고 있는 plasmid를 host에 넣어주는 경우 rare codon usage 문제를 해결할 수 있다. 따라서 *A. niger* EH gene을 효율적으로 발현하기 위하여 Arg, Ile, Gly, Leu 및 Pro의 rare codon 관련 tRNA를 보충한 *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS 균주를 숙주로 사용하기로 하였다.

### 3.2. *A. niger* EH 유전자 발현 및 특성 분석

라세믹 styrene oxide 기질에 대한 입체특이성 가수분해능이 있는 재조합 EH를 주형으로 하여 PCR을 행한 후 *E. coli* 발현 vector인

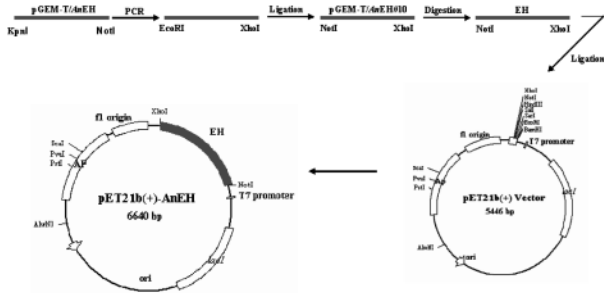


Figure 1. Construction scheme for pET-21b(+)/AnEH plasmid containing *A. niger* EH.

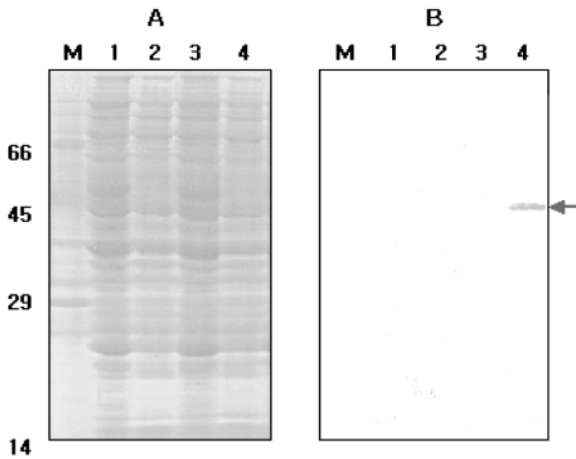


Figure 2. SDS-PAGE and immunoblotting analysis of recombinant *A. niger* EH in *E. coli* Rosetta. EH protein was expressed as the cells were induced with 1 mM IPTG for 3.5 h. (a) Proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. (b) Proteins on 12% SDS-PAGE gel were transferred electrically to nitrocellulose membrane and immunoblotted with polyclonal hexahistidine antibody (Lane 1, 2: Rosetta cell with vector only without induction or with induction, lane 3, 4: recombinant Rosetta without induction or with induction, M : standard protein marker. Arrow indicates *A. niger* EH fused with hexahistidine.

pET-21b(+) vector에 subcloning하는 과정은 Figure 1과 같다. *A. niger* EH 유전자가 들어있는 plasmid DNA를 Rosetta competent cell에 형질 전환시켜 발현정도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE와 immunoblotting 분석을 수행하였다. 12% SDS-PAGE 및 immunoblotting 분석 결과, *E. coli* BL21을 숙주로 사용한 경우와는 달리 Rosetta 형질전환체들은 IPTG로 유도하지 않은 균과 발현정도를 비교하였을 때 SDS-PAGE 상에서는 차이를 확인할 수 없었으나 immunoblotting 분석에서는 IPTG로 유도한 경우에서 45 kDa 근처에 재조합 EH gene이 발현되었음을 확인할 수 있었다(Figure 2).

재조합 *E. coli* Rosetta가 입체선택적 가수분해 활성이 있는지를 확인하기 위하여 재조합 Rosetta 세포를 생축매로 사용하여 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 입체특이성 가수분해 반응을 실시하였다. 재조합 Rosetta 균체 10 mg/mL (dry cell weight)을 100 mM phosphate buffer (pH 8.0) 용액에 넣고 20 mM racemic styrene oxide를 주입한 후 30 °C, 250 rpm에서 반응을 진행하였다. 반응과정 중 일정량을 샘플링하여 cyclohexane으로 추출하고 chiral GC 분석을 통해 입체특이성

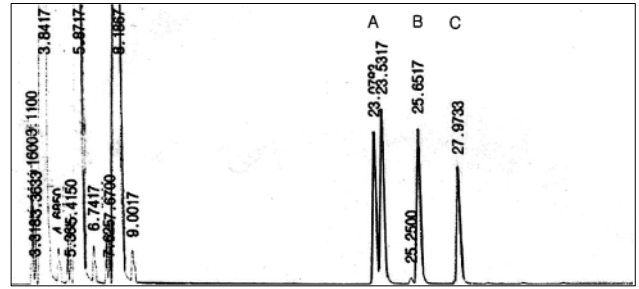


Figure 3. Chiral GC analysis of racemic styrene oxide after the enantioselective hydrolysis using recombinant Rosetta with pET-21b(+)/AnEH. (*R*)-enantiomer peak of B, C is disappeared due to the enantioselective hydrolysis by recombinant EH. A: Rosetta with pET-21b(+) vector only, B: recombinant Rosetta with pET-21b(+)/AnEH (10 min reaction), C: recombinant Rosetta with pET-21b(+)/AnEH (20 min reaction).

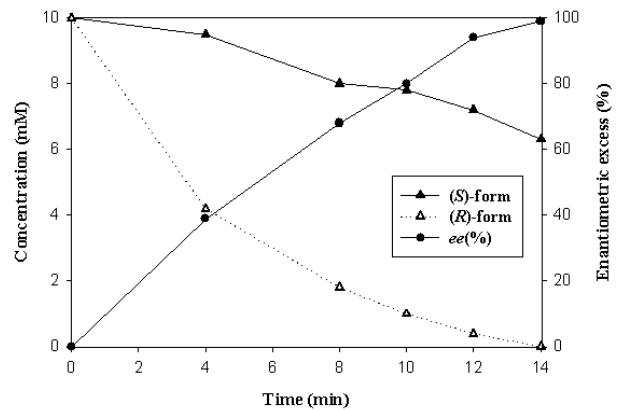


Figure 4. Kinetic resolution of 20 mM racemic styrene oxide by recombinant *A. niger* EH in Rosetta.

가수분해 반응을 모니터링 하였다. 효소 반응기에서 10 min 및 20 min 반응 후 반응액을 chiral GC로 분석을 한 결과, 재조합 Rosetta는 styrene oxide에 대하여 입체특이적인 가수분해활성을 보여주었다 (Figure 3). *A. niger* EH gene을 *E. coli* BL21에 발현한 경우에는 같은 양의 세포를 사용하여 3 h 이상의 반응에서도 (*R*)-styrene oxide를 완전히 분해시키지 못한 반면(data not shown, 16), 재조합 Rosetta의 경우 10 min 이내에 (*R*)-styrene oxide를 완전히 분해시켜 촉매활성이 훨씬 우수함을 알 수 있었다.

### 3.3. 재조합 Rosetta 생축매 특성분석 및 회분식 (*S*)-styrene Oxide 제조

재조합 Rosetta의 촉매적 특성을 알아보기 위하여 동력학적 촉매특성을 분석하였다. (*R*)-, (*S*)-styrene oxide 각각에 대하여 0.5~6 mM의 농도에서 초기 분해 속도를 측정하였다. (*S*)-, (*R*)-styrene oxide 두 경우 모두 농도가 낮을 때는 분해속도가 선형적으로 증가하고, 높을 때는 점차 감소하여 점진적으로 최대치에 도달하는 경향을 보였다. 최대 분해속도( $V_{max}$ )와 포화상수( $K_m$ )는 반응속도( $V$ )와 styrene oxide 농도, (*R*) 및 (*S*)의 역수를 취하여(Lineweaver-Burke plot) 얻은 기울기 및  $y$ 절편으로부터 각각 구한결과, (*R*)-styrene oxide에 대한  $V_{max}^S$ 와  $K_m^S$ 은 각각 288.2  $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ , 9.4 mM로 결정되었다. (*S*)-styrene oxide의 경우  $V_{max}^S$ 와  $K_m^S$ 은 각각 45.6  $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ , 4.9 mM로 결정

되었다.

Figure 4는 재조합 Rosetta를 이용한 racemic styrene oxide의 입체 선택적 가수 분해 반응을 보여 준다. 초기 styrene oxide 농도는 20 mM, 생축매량은 10 mg dcw/mL로 사용하였으며, pH와 온도는 각각 8, 30 °C에서 회분식 분할반응을 실시하였다. Figure 4에서 알 수 있듯이 유전자 재조합 Rosetta를 생축매로 사용한 경우 약 14 min 정도의 반응을 통해 30% 정도(이론수율 = 50%)의 높은 수율로 광학순도 99% 이상인 (S)-styrene oxide을 얻을 수 있었다. BL21의 경우에는 5 h 이상의 반응에도 90% 이상의 광학 순도를 얻을 수 없었다(data not shown). 따라서 codon usage를 고려하여 *A. niger* EH 유전자를 *E. coli*에서 고효율로 발현을 할 수 있었으며, 이러한 고효율 유전자 재조합 생축매를 이용하여 99% 이상의 광학순도를 가지는 (S)-styrene oxide을 회분식으로 제조할 수 있었다.

### 참 고 문 헌

1. A. Archelas and R. Furstoss, *Current Opinion in Chem. Biology*, **5**, 112 (2001).
2. A. Steinreiber and K. Faber, *Current Opinion in Biotechnol.*, **12**, 552 (2001).
3. C. A. G. M. Weijers and J. A. M. de Bont, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **6**, 199 (1999).
4. E. Y. Lee, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 321 (2002).
5. P. Besse and H. Veschambre, *Tetrahedron* **50**, 8885 (1994).
6. M. Arand, F. Muller, A. Mecky, W. Hinz, P. Urban, D. Pompon, R. Kellner, and F. Oesch, *Biochem. J.*, **337**, 37 (1999).
7. M. Nardini, I. S. Ridder, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, R. Rink, D. B. Janssen, and B. W. Dijkstra, *J. Biol. Chem.*, **274**, 14579 (1999).
8. H. Visser, J. A. M. de Bont, and J. C. Verdoes, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5459 (1999).
9. M. Arand, H. Hemmer, H. Durk, J. Baratti, A. Archelas, and R. Furstoss, *Biochem. J.*, **344**, 273 (1999).
10. M. A. Argiriadi, C. Morisseau, M. H. Goodrow, D. L. Dowdy, B. D. Hammock and D. W. Christianson, *J. Biol. Chem.*, **275**, 15265 (2000).
11. R. Rink, J. H. L. Spelberg, R. J. Pieters, J. Kingma, M. Nardini, R. M. Kellogg, B. W. Dijkstra and D. B. Janssen, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7417 (1999).
12. T. Yamada, C. Morisseau, J. E. Maxwell, M. A. Argiriadi, D. W. Christianson, and B. D. Hammock, *J. Biol. Chem.*, **275**, 23082 (2000).
13. J. Zou, B. M. Hallberg, T. Bergfors, F. Oesch, M. Arand, S. L. Mowbray, and T. A. Jones, *Structure*, **8**, 111 (2000).
14. W. J. Choi, E. C. Huh, H. J. Park, E. Y. Lee, and C. Y. Choi, *Biotechnol. Techniques*, **12**, 225 (1998).
15. Y. Nakamura, T. Gojobori, and T. Ikemura, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 292 (2000).
16. E. Y. Lee and H. S. Kim, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 562 (2001).
17. H. Visser, S. Vreugdenhil, J. A. M. de Bont, and J. C. Verdoes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 415 (2000).
18. K. M. Manoj, A. Archelas, J. Baratti, and R. Furstoss, *Tetrahedron*, **57**, 695 (2001).
19. R. Novy, D. Drott, K. Yaeger, and R. Mierendorf, *Newsletter of Novagen.*, **12**, 1 (2001).