

니트릴 분해효소 생산균인 *Rhodococcus erythropolis*의 발굴 및 효소 특성 연구

박효정 · 박하주 · 엄기남¹ · 김형권*
가톨릭대학교 생명공학부, ¹(주)이쿠스팜

Characterization of Nitrile-hydrolyzing Enzymes Produced from *Rhodococcus erythropolis*. Park, Hyo-Jung, Ha-Joo Park, Ki-Nam Uhm¹, and Hyung-Kwoun Kim*. Division of Biotechnology, The Catholic University of Korea, ¹Equispharm, Ltd. – Ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrate is a useful intermediate for the synthesis of Atorvastatin, a chiral drug to hypercholesterolemia. In this research, two 4-chloro-3-hydroxybutyronitrile-degrading strains were isolated from soil sample. They were identified as *Rhodococcus erythropolis* strains by 16S rRNA analysis. The nitrile-degrading enzyme(s) were suggested to be nitrile hydratase and amidase rather than nitrilase from the result of thin layer chromatography analysis. The corresponding genes were obtained by PCR cloning method. The predicted protein sequences had identities more than 96% with nitrile hydratase α -subunit, nitrile hydratase β -subunit, and amidase of *R. erythropolis*. The 4-chloro-3-hydroxybutyronitrile-hydrolyzing activities in both strains were increased dramatically by ϵ -caprolactam which was known as good inducer for nitrile hydratase. Both intact cells and cell-free extract could hydrolyze the nitrile compound. So, the intact cell and the enzymes could be used as potential biocatalyst for the production of 4-chloro-3-hydroxybutyric acid.

Key words: Nitrile hydratase, amidase, *Rhodococcus erythropolis*, 4-chloro-3-hydroxy butyronitrile

니트릴 화합물은 동물·식물 체내에 여러 가지 형태로 존재하는 물질이다. 예를 들면 식물체내에서 주로 관찰되어지는 cyanoglycoside, cyanolipid, ricinine, phenylacetoneitrile 은 식물의 대사과정에서 중요한 역할을 수행하는 물질이다 [12]. 화학 산업에 있어서도 많은 종류의 인공 니트릴 화합물이 합성되어 널리 사용되고 있다 [1, 7, 14]. 대표적인 물질로서 polyacrylonitrile과 nylon polymer 등의 고분자 물질과 사료, 용매, 의약품, 살충제의 합성에 사용되는 중간체 물질이 있다.

게다가 니트릴 화합물로부터 만들어지는 각종 아미드와 카르복시산도 제약 산업과 화학 산업에서 널리 사용되고 있다. 이러한 아미드와 카르복시산은 원료물질에 니트릴기를 결합시킨 후 효소촉매를 사용하여 가수분해함으로써 생산된다. 이때의 효소촉매 반응은 두 가지 경로를 통해 진행되는 데, 하나는 니트릴라제(nitrilase, EC 3.5.5.1)가 단독으로 작용하여 카르복시산을 생성하는 것이고, 다른 하나는 니트릴 히드라타아제(nitrile hydratase, EC 4.2.1.84)와 아미다아제(amidase, EC 3.5.1.4)가 순차적으로 작용하여 아미드 화합물과 카르복시산을 생성하는 것이다(Fig. 1)[2].

아직 니트릴 화합물의 다양함에 비해 니트릴 분해효소에 관한 연구가 상대적으로 적게 진행되었다. 현재까지 일부 식

물과 곰팡이(*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*)로부터 분해 효소가 보고되었고, 세균의 경우에는 *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Nocardia*, *Rhodococcus* 균으로부터 관련효소가 밝혀졌다 [5, 10, 15].

그러나 니트릴 화합물의 다양성과 니트릴 분해효소의 유용성에도 불구하고 아직까지 니트릴 분해효소가 상업적으로 개발되지 않아서 이용하는 데 어려움이 있다 [3]. 효소촉매의 개발이 늦은 이유는 대부분의 효소가 불안정하고, 기질 또는 반응산물에 의해 효소활성이 저해받기 때문이다. 또한, 니트릴 기질이 물에 잘 녹지 않아서 반응속도가 떨어진다든 공정상의 문제점도 지니고 있다.

이러한 제약에도 불구하고 효소의 산업화에 성공한 사례가 몇 가지 있다. 예를 들어 *Rhodococcus rhodochrous* J1 균이 생산하는 니트릴 히드라타아제를 이용하여 아크릴아미드와 니코틴아미드의 대량생산에 성공하였으며 [9, 13], 니트릴라제를 이용하여 (R)-만델린산과 (R)-3-염화만델린산 및 (S)-이뷰프로펜을 생산하는데 성공하였다 [16, 17].

최근 들어 ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrate(ECHB)가 고지혈증 치료제인 Atorvastatin 생산에 사용되는 의약품 중간체인 것으로 밝혀졌다. 이 물질을 대량으로 생산하기 위해 반응 특이적인 리파제 또는 니트릴 가수분해효소를 시급히 개발해야 되는 실정이다.

본 연구에서는 토양 분리균과 균주은행으로부터 분양받은 *Rhodococcus* 균 중에서 Fig. 1과 같이 4-chloro-3-hydroxy butyronitrile(CHBN)을 가수분해하여 4-chloro-3-hydroxy

*Corresponding author

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

E-mail: hkkim@catholic.ac.kr

butyric acid(CHBAc)를 생성할 수 있는 균을 선별하고 해당 니트릴 분해효소의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 미생물 및 시약

실험에 사용된 분양균주와 토양 분리균주는 (주)이쿠스팜과 한국생명공학연구원으로부터 제공받았다. 반응 기질인 4-chloro-3-hydroxy butyronitrile(CHBN)과 표준물질로 사용된 4-chloro-3-hydroxy butyramide(CHBAm)와 4-chloro-3-hydroxy butyric acid(CHBAc)는 (주)이쿠스팜으로부터 제공받았다. 그 밖의 시약은 일반 시약급으로 사용하였다.

CHBN 분해효소 생산균의 탐색

분양균과 토양 분리균 중에서 CHBN 분해효소를 생산하는 세균을 다음과 같이 탐색하였다. 균주를 4 mL 부피의 ϵ -카프로락탐(ϵ -caprolactam)이 첨가된 LB 액체배지(1% 트립톤, 0.5% 효모추출액, 0.5% 염화나트륨)에 접종하고 30°C에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 원심 분리하여 모은 균체를 0.4 mL 부피의 10 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.5)으로 현탁하였다. 균 현탁액에 CHBN 기질 10 μ L를 첨가하고 30°C에서 24시간 동안 반응시킨 후, 박막크로마토그래피(TLC) 방법을 통해 CHBN 기질과 분해산물을 분석하였다. TLC 결과로부터 CHBN 기질을 분해하여 산(CHBAc)를 생성하는 균주를 선별하였다.

반응산물의 TLC 분석

균체와 세포추출물의 CHBN 기질에 대한 분해활성을 박막크로마토그래피 방법으로 측정하였다. CHBN 분해반응을 수행하고 원심분리하여 얻은 상등액 20 μ L를 실리카 유리판에 첨가하고 혼합용매(hexane : ethyl acetate : acetic acid = 2 : 3 : 0.5)를 이용하여 물질을 전개하였다. 전개된 유리판에 발색시약(9.2 mL *p*-anisaldehyde, 3.75 mL acetic acid, 338 mL 95% ethanol, 12.5 mL sulfuric acid)을 적시고 가열하면서 발색반점을 관찰하였다.

미생물의 동정

선발된 분리균의 16S rRNA 염기서열을 분석하기 위해서 PCR 반응을 수행하였다. 분리균의 배양액 50 mL을 원심분리하여 균체를 모은 후 염색체 DNA를 분리하고 이것을 주형 DNA로 사용하여 PCR을 수행하였다. 또한, 514F(5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGT-3')와 1492R (5'-TACGGY-TACCTTGTACGACTT-3') 프라이머를 사용하였다.

PCR 반응을 다음 조건에서 수행하였다(열 변성, 95°C, 1분; 냉각, 50°C, 1분; 합성반응, 72°C, 1분). 반응액의 아가로스 전기영동을 수행하고 젤로부터 예상 크기(약 1.0 kb)의 DNA 조각을 추출하여 염기서열을 분석하였다. BLAST

Search 프로그램을 이용하여 분석된 염기서열과 가장 유사한 DNA 염기서열을 찾음으로써 선발된 분리균의 동정을 수행하였다.

효소반응 산물의 GC분석

CHBN 기질의 분해정도를 정량적으로 측정하기 위해서 기체 크로마토그래피(GC) 분석을 수행하였다. 분리균 No. 5와 No. 7을 0.1% ϵ -카프로락탐이 첨가된 50 mL 부피의 LB 액체배지에 접종하고 30°C에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 원심 분리를 통해 모은 균체를 1 mL 부피의 10 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.5)에 현탁하고, 초음파로 분쇄하여 세포추출액을 제조하였다. 각 세포추출액의 단백질 농도를 Bradford 방법으로 정량한 후, 세포추출액 0.1 mL와 인산칼륨완충액(pH 7.5) 0.1 mL를 섞고 CHBN 기질 20 μ L를 첨가한 후, 30°C에서 회전시키며 반응을 수행하였다. 일정한 시간동안(0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6 시간) 반응을 수행하고 1 N 염산 0.1 mL를 넣어줌으로써 반응을 중지시켰다.

진공원심분리기를 이용하여 반응 용액으로부터 물 성분을 완전히 제거하고 염화메틸렌 0.2 mL으로 현탁시켰다. 원심 분리를 통해 얻은 상등액 1 μ L를 GC로 분석하였다.

사용된 GC(HP 5890 Series II) 분석 컬럼은 HP-5 (crosslinked 5% PH ME Siloxane)이며, 70°C부터 220°C까지 분당 10°C의 속도로 컬럼 온도를 증가시키고, 이어서 300°C까지 분당 20°C의 속도로 증가시킨 후, 2분 동안 최종 온도에서 유지하는 조건으로 GC분석을 수행하였다.

니트릴 히드라타아제와 아미다아제의 클로닝

Rhodococcus 속의 세균이 생산하는 니트릴 히드라타아제 α -서브유닛, β -서브유닛과 아미다아제의 서열을[4,8,11] 비교분석하여 얻어진 공통의 염기서열을 이용하여 디자인한 프라이머(니트릴 히드라타아제 α -서브유닛, F-5'-GATCCA-TATGTCAGTAACGATCGAC-3', R-5'-GATCGAATTCGACGGTGGGACCTG-3'; 니트릴 히드라타아제 β -서브유닛, F-5'-GATCCATATGGATGGAGTACACGAT-3', R-5'-GATCGAATTCGGCCGAGGCTCGAG-3'; 아미다아제, F-5'-GATCCATATGGCGACAATCCGACCT-3', R-5'-GATGAA-TTCAAGGCGGGCTGAGTTG-3')를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응을 다음 조건에서 수행하였다(열 변성, 95°C, 1분; 냉각, 43°C, 1분; 합성반응, 72°C, 2분). 합성된 DNA 조각의 아가로스 전기영동을 수행하고 젤로부터 예상하는 크기(α -, β -서브유닛, 약 0.6 kb; 아미다아제, 약 1.5 kb)의 PCR 산물을 추출하여 pGEM-T 벡터 시스템을 이용하여 클로닝하였다. 클로닝된 각 샘플들의 염기서열을 분석하고, 염기서열로부터 아미노산 서열을 읽고 Meg-Alignment 프로그램을 이용하여 기존에 보고된 효소의 아미노산 서열과 비교하였다.

결과 및 고찰

CHBN 분해효소 생산균의 탐색

균주은행으로부터 분양받은 균주 11개와 토양에서 분리된 균주 8개를 ε-카프로락탐이 첨가된 LB배지에서 48시간동안 배양하여 균체를 얻고, 이들 균체가 지닌 CHBN 분해활성을 조사하였다(Table 1). 균체를 이용한 효소반응을 30°C에서 24시간 동안 수행하고 박막크로마토그래피를 이용해서 물질 분석을 수행한 결과, 총 19개의 균주 중에서 3개가 CHBN 기질을 분해하여(CHBAc)을 생성하는 것으로 밝혀졌다(Table 1, Fig. 2). 이 중에서 기질 분해활성이 크고 재현성이 있는 분리균주 No. 5와 No. 7에 대해서 연구를 계속 진행하였다.

분리균주 No. 5와 No. 7의 16S rRNA에 대한 염기서열 (~920 bp)을 분석한 결과, 둘 다 *Rhodococcus* 균의 16S rRNA와 매우 높은 상동성을 나타냈으며, 특히, *R. erythropolis* EPWF의 16S rRNA와 각각 99.9%, 100%의 상동성을 보였다(Fig. 3). 이 결과로부터 분리균주를 각각 *Rhodococcus erythropolis* No. 5와 *Rhodococcus erythropolis* No. 7로 명명하였다.

R. erythropolis 균 유래의 니트릴 히드라타아제와 아마이드아제에 대한 보고가 이미 있었지만[4, 8, 11] 니트릴라제에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없었기 때문에, 분리균의 CHBN 분해활성은 니트릴 히드라타아제와 아마이드아제의 작용에 기인한 것으로 추정하였다.

분리균주의 배양특성

분리균주의 배양시간에 따른 효소 생산량을 확인하기 위

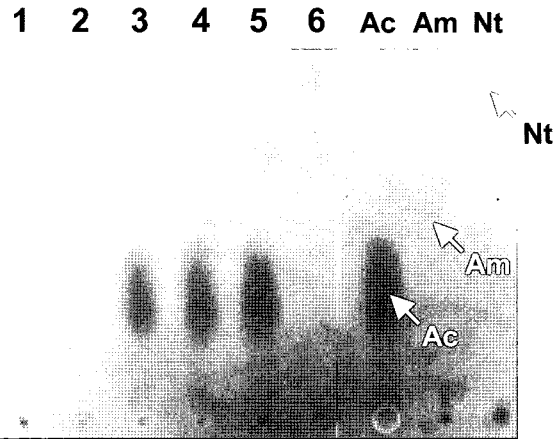


Fig. 2. Screening of CHBN-hydrolyzing bacterial strains. Cultured intact cells were mixed with CHBN substrate and the mixtures were reacted for 24 h at 30°C and analyzed by TLC. Lane 1-6 corresponded the reaction mixtures made by *Rhodococcus* sp. BZN6, *Rhodococcus* sp. BZN34, No. 5, No. 7, PI33, and No. 12-A, respectively. Ac, Am, and Nt mean the standard compounds of CHBAc, CHBAm, and CHBN, respectively.

해서 ε-카프로락탐이 첨가된 LB배지에서 48시간동안 배양하면서 6시간 간격으로 샘플링하여 미생물 균체의 CHBN 기질 분해활성을 측정하였다. 그 결과, 18시간 이상 배양하면 배양된 균체(4 mL 배양액에 해당되는 균체)가 반응에 사용된 기질(10 μL)을 모두 산으로 전환하는 것이 확인되었다(자료 미제시).

분리균주의 유도물질에 따른 효소 발현 정도를 조사하기 위해서 벤조니트릴과 ε-카프로락탐을 첨가하여 분리균을 배

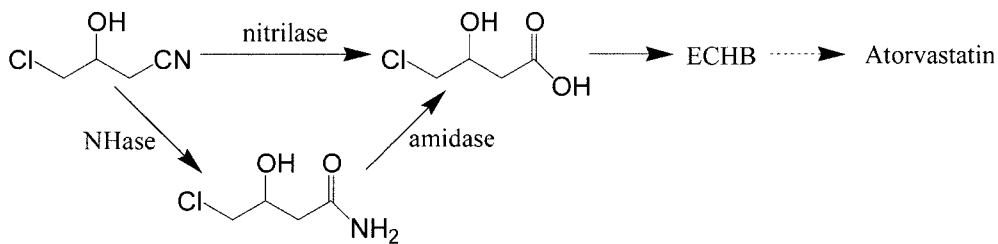


Fig. 1. Two pathway of CHBN hydrolysis. CHBN can be hydrolyzed to CHBAc either by nitrilase or by nitrile hydratase/amidase.

Table 1. Microbial strains converting target nitrile compound.

Strain	nitrile conversion	Strain	nitrile conversion
<i>R. equi</i> KCTC1298	-	<i>Alcaligenes faecalis</i> KCTC2678	-
<i>R. erythropolis</i> KCTC3483/ATCC27854	-	<i>Alcaligenes eutrophos</i> KCTC2669	-
<i>R. rhodochrous</i> KCTC9086/ATCC13808	-	LS31 (Isolated strain, <i>Rhodococcus</i>)	-
<i>Rhodococcus</i> sp. KCTC9141/ATCC21093	-	N'4 (Isolated strain)	-
<i>Rhodococcus</i> sp. KCTC9561/ATCC19070	-	N41 (Isolated strain)	-
<i>Rhodococcus</i> sp. BZN6 ATCC39484	-	PI33 (Isolated strain, <i>Rhodococcus</i>)	+
<i>R. rhodochrous</i> Zopf ATCC33278	-	No. 7 (Isolated strain)	+
<i>Rhodococcus</i> sp. BZN762 ATCC39485	-	12-A (Isolated strain)	-
<i>Rhodococcus</i> sp. BZN34 ATCC39492	-	12-B (Isolated strain)	-
		No. 5 (Isolated strain)	+

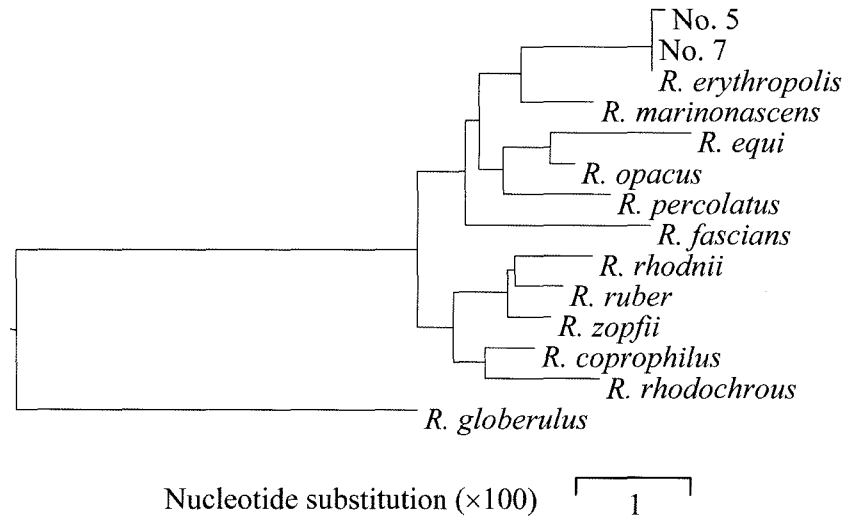


Fig. 3. Phylogenetic tree of isolated strain No.5 and No.7. The 16S rRNA sequence were analyzed and compared with nucleotide sequence database using BLAST program.

양하였다. 분리균을 30°C에서 48시간 동안 배양하고 미생물 균체의 CHBN 분해활성을 측정해본 결과, ε-카프로락탐을 첨가한 경우에는 분해 활성이 나타났으나, 벤조니트릴만 첨가하였거나, 둘 다 배제한 배지에서 배양한 경우에는 분해 활성이 전혀 나타나지 않았다(Fig. 4). 이것은 ε-카프로락탐에 의해서 CHBN 기질 분해 효소의 발현이 유도되어진다는 것을 보여주었다.

니트릴 기질 분해효소의 활성

R. erythropolis No. 5의 경우에는 CHBN 기질이 분해되

면서 산 생성물(CHBAc)과 함께 아마이드 생성물(CHBAm)이 관찰되었는데(Fig. 4, lane 4), 이것은 니트릴 기질의 분해반응이 앞서 추정한대로 니트릴라제가 아닌 니트릴 히드라타아제와 아마디아제의 작용임을 보여주었다(Fig. 1).

분리균주의 균체를 초음파분쇄기로 깨고 원심분리하여 수용성 분획과 불용성 분획으로 나눈 후, 각각의 분획에 대한 CHBN 분해활성을 조사하였다. 균체를 이용한 경우와 마찬가지로 두 분획에서 모두 CHBN 분해활성이 관찰되었으며, 특히, 불용성 분획에서는 CHBAm가 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 5, lane 4 and 8). 이것은 *R. erythropolis* No. 5와 마찬가지로

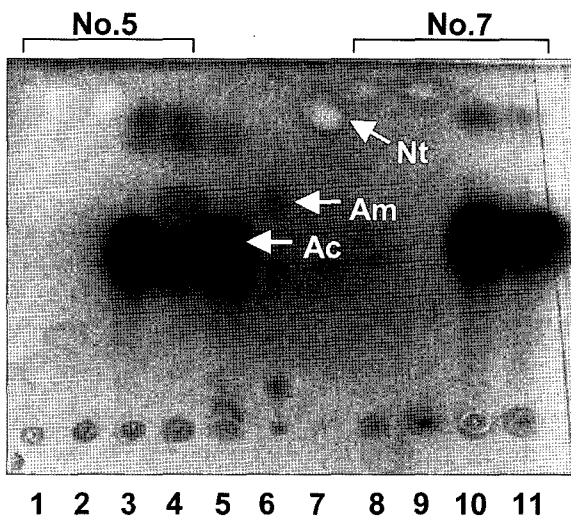


Fig. 4. Enzyme induction by ε-caprolactam. Strain No.5 and No.7 were cultured in the presence of benzonitrile (BN) and/or ε-caprolactam (ε-CL). And then cultured intact cells were tested for their CHBN-hydrolytic activity. Lane 1 and 8, none; lane 2 and 9, BN; lane 3 and 10, ε-CL; lane 4 and 11, both BN and ε-CL; lane 5, 6, and 7 corresponded to CHBAc, CHBAm, and CHBN.

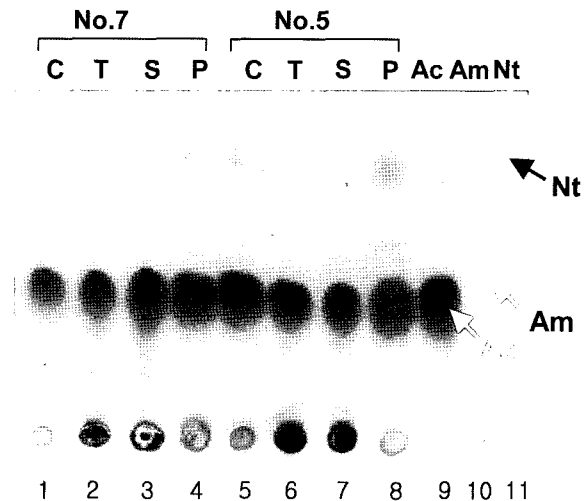


Fig. 5. Enzyme activities after cell lysis. Strain No.5 and No.7 were cultured in the presence of ε-CL. Cultured cells were lysed by sonication, centrifuged and then tested for their CHBN-hydrolytic activity. C, intact cell; T, total fraction after cell lysis; S, soluble fraction after cell lysis; P, insoluble fraction after cell lysis; Ac, Am, and Nt means the standard compounds of CHBAc, CHBAm, and CHBN, respectively.

로 *R. erythropolis* No. 7의 경우에도 니트릴 히드라타아제와 아미다아제에 의해서 니트릴 기질이 분해되어짐을 보여 주었다. 또한, 이러한 결과는 아미다아제가 불용성 분획보다는 수용성 분획에 많이 포함되어 있음을 의미하였다.

또한, GC 분석을 통해서 수용성 분획의 CHBN 기질 분해 정도를 정량적으로 측정하였다(Fig. 6). 분리균 No. 7의 수용성 분획이 분리균 No. 5의 경우에 비해 기질을 상대적으로 빠르게 분해하는 것으로 나타났다. 이것은 분리균 No. 7의 니트릴 히드라타아제의 생산량이 분리균 No. 5에 비해 상대적으로 많거나 효소의 활성이 높기 때문이라 추정되었다.

니트릴 기질 분해효소 유전자 클로닝

R. erythropolis No. 5와 *R. erythropolis* No. 7 균이 CHBN 기질의 분해에 관여하는 것으로 예상되는 니트릴 히드라타아제와 아미다아제 유전자를 지니고 있는지를 확인하고 이들 유전자의 염기서열을 확인하기 위해서 PCR 클로닝을 수행하였다.

R. erythropolis 균으로부터 이미 보고된 니트릴 히드라타아제 α -서브유닛과 β -서브유닛 및 아미다아제 유전자를 비교분석하여 [4, 8, 11] PCR 반응을 수행하기 위한 프라이머를 제작하고 분리균의 염색체에 대한 PCR 반응을 수행한 결과, 예상된 크기의 DNA 조각을 얻게 되었다. 확보된 DNA 조각의 염기서열을 분석하고 기존의 효소와 비교해 본 결과, 분리균 No. 5의 니트릴 히드라타아제 α -서브유닛과 β -서

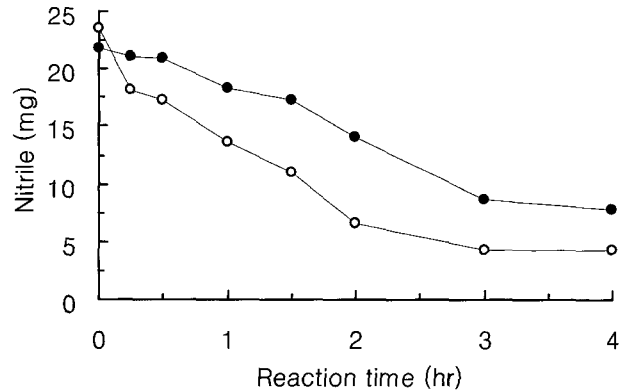


Fig. 6. CHBN degradation with time course. The degradation rate for CHBN by the cell-free extract were analyzed by GC. CHBN (25 mg) was degraded by cell-free extract (17 μ g protein) of *R. erythropolis* No.5 (●) and by cell-free extract (14 μ g protein) of *R. erythropolis* No.7 (○).

브유닛 및 아미다아제는 기존 효소(AAP57640, P22984)와 각각 아미노산이 2개, 1개, 17개씩 차이를 보여서 99.0%, 99.5%, 96.7%의 상동성을 지녔다. 분리균 No. 7의 경우에는 각각 1개, 3개, 16개씩 차이를 보여서 99.5%, 98.6%, 96.9%의 상동성을 보였다(Fig. 7).

현재까지 보고된 니트릴 히드라타아제의 α -서브유닛과 β -서브유닛은 효소기원과 상관없이 유사한 아미노산 서열을 갖고 있다. 특히 α -서브유닛에는 금속이온과 결합하는

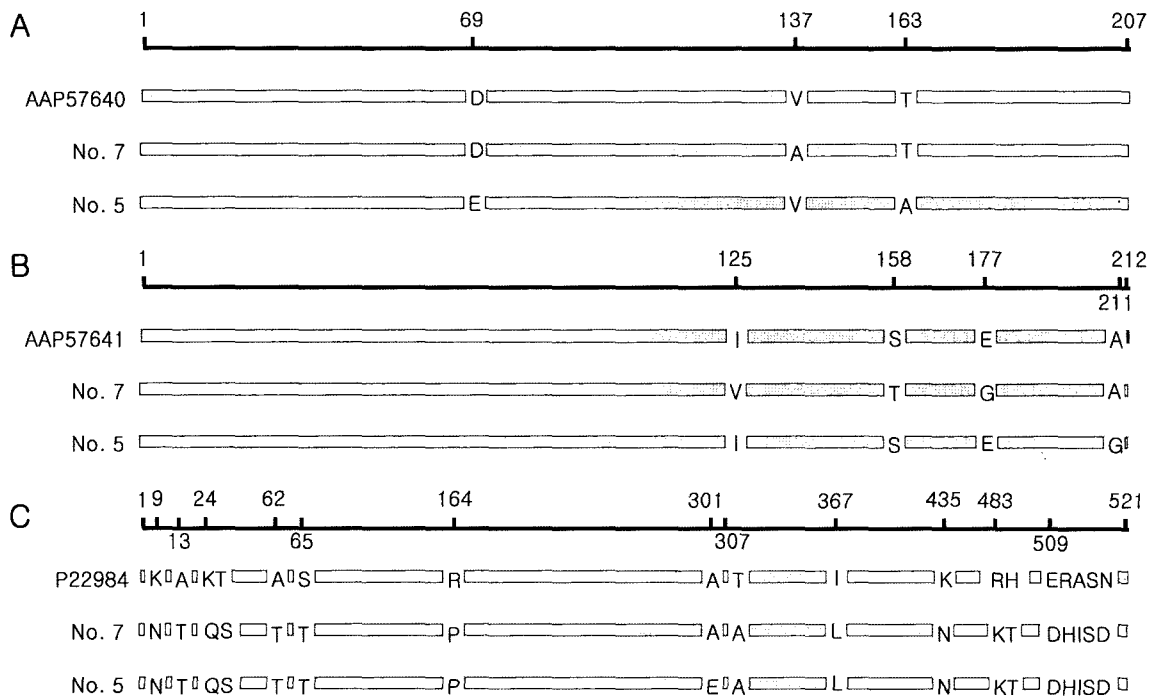


Fig. 7. Protein sequence alignment for NHase α -, β -subunit and amidase. A, NHase α -subunits of *Rhodococcus* No. 5 and No. 7 were compared with that of *R. erythropolis* (AAP57640). B, NHase β -subunits of *Rhodococcus* No. 5 and No. 7 were compared with that of *R. erythropolis* (AAP57640). C. Amidases of *Rhodococcus* No. 5 and No. 7 were compared with that of *R. erythropolis* (P22984).

데 관여하는 Cys-Xxx-Leu-Cys-Ser-Cys의 보존부위를 갖고 있다. 이때 Fe이온이 결합하는 효소는 Xxx 위치에 아미노산 Ser이 오고, Co이온이 결합하는 경우에는 아미노산 Thr이 나타나는 것으로 밝혀졌다[6]. *R. erythropolis* No. 5와 *R. erythropolis* No. 7 균의 α -서브유닛 경우에는 동일한 위치(110번부터 115번까지)에 Cys-Ser-Leu-Cys-Ser-Cys 서열이 나타나고 있는데, 이것은 둘 다 Fe이온과 결합하는 효소임을 보여준다.

결론적으로 본 연구에서는 균주은행에서 분양받은 균과 토양 분리균으로부터 CHBN 분해활성을 지닌 균을 두 종류 찾아내었으며, 이들 균에서 CHBN의 분해과정에 관여하는 것으로 예상되는 니트릴 히드라타아제와 아미다아제 효소유전자를 클로닝하여 확보하였다. 앞으로 추가적인 연구를 통해 재조합 효소의 대량생산과 효소개량을 수행하면, 고지혈증 치료제인 Atorvastatin 생산에 필요한 ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrate의 산업적 생산을 달성할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

각종 니트릴 화합물은 키랄 의약품의 합성에 사용되는 유용한 중간체이다. 본 연구에서는 토양 분리균 중에서 4-chloro-3-hydroxy butyronitrile(CHBN)기질로부터 고지혈증 치료제인 Atorvastatin을 합성하는 데에 필요한 4-chloro-3-hydroxy butyric acid(CHBAc)를 생성하는 균주 2종류를 선발하였다. 16S rRNA 분석을 통해서 균 동정을 수행한 결과, 모두 *Rhodococcus erythropolis*에 속하는 것으로 밝혀졌으며, TLC 분석 결과로부터 CHBN 기질을 분해하는 효소는 니트릴 히드라타아제(NHase)와 아미다아제(amidase)인 것으로 추정되었다. 분리균의 CHBN 분해효소는 ϵ -카프록타탐에 의해서 발현이 유도되었으며, 균체와 세포 추출액에서 모두 기질 분해활성을 나타냈다. 기존에 보고된 효소의 유전자 염기서열로부터 프라이머를 제조하고 PCR을 수행함으로써 분리균으로부터 니트릴 히드라타아제와 아미다아제 유전자를 확보하게 되었다. 발굴된 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 이미 보고된 *Rhodococcus erythropolis*의 니트릴 히드라타아제 α -서브유닛과 β -서브유닛 및 아미다아제와 96% 이상의 상동성을 보였다. 따라서 CHBN기질은 분리균의 니트릴 히드라타아제와 아미다아제 효소에 의해서 아미(CHBAm)를 거쳐 산(CHBAc)으로 전환되는 것을 알게 되었다.

감사의 글

본 연구는 과기부 21세기 프론티어 미생물유전체활용기술 개발사업단의 지원(MG05-0304-1-1)과 2005년도 가톨릭대학교 교비연구비의 지원으로 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Banerjee, A., R. Sharma, and U. Banerjee. 2002. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 33-44.
- Brady, D., A. Beeton, J. Zeevaart, C. Kgaje, F. van Rantwijk, and R. A. Sheldon. 2004. Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase biocatalytic systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 76-85.
- DeSantis, G., Z. Zhu, W. A. Greenberg, K. Wong, J. Chapli, S. R. Hanson, B. Farwell, L. W. Nicholson, C. L. Rand, D. P. Weiner, D. E. Robertson, and M. J. Burk. 2002. An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 9024-9025.
- Duran, R., M. Nishiyama, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1993. Characterization of nitrile hydratase genes cloned by DNA screening from *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 1323-1328.
- Heinemann, U., D. Engels, S. Burger, C. Kiziak, R. Mattes, and A. Stolz. 2003. Cloning of a nitrilase gene from the *Cyanobacterium Synechocystis* sp. strain PCC6803 and heterologous expression and characterization of the encoded protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4359-4366.
- Huang, W., J. Jia, J. Cummings, M. Nelson, G. Schneider, and Y. Lindqvist. 1997. Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold. *Structure* **5**: 691-699.
- Hughes, J., Y. C. Armitage, and K. C. Symes. 1998. Application of whole cell Rhodococcal biocatalysts in acrylic polymer manufacture. *Antonie van Leeuwenhoek* **74**: 107-118.
- Ikehata, O., M. Nishiyama, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1989. Primary structure of nitrile hydratase deduced from the nucleotide sequence of a *Rhodococcus* species and its expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **181**: 563-570.
- Nagasawa, T., H. Shimizu, and H. Yamada. 1993. The superiority of the 3rd-generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 189-195.
- Nagasawa, T., M. Wieser, T. Nakamura, H. Iwahara, T. Yoshida, and K. Gekko. 2000. Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Eur. J. Biochem.* **267**: 138-144.
- O'Mahony, R., J. Doran, L. Coffey, O. J. Cahill, G. W. Black, and C. O'Reilly. 2005. Characterisation of the nitrile hydratase gene clusters of *Rhodococcus erythropolis* strains AJ270 and AJ300 and *Microbacterium* sp. AJ115 indicates horizontal gene transfer and reveals an insertion of IS1166. *Antonie van Leeuwenhoek* **87**: 221-232.
- O'Reilly, C. and P. D. Turner. 2003. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - a comparative study. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 1161-1174.
- Thomas, S., R. DiCosimo, and V. Nagarajan. 2002. Bio-

- catalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends Biotechnol.* **20**: 238-242.
14. Yamada, H. and M. Kobayashi. 1996. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 1391-1400.
 15. Yamamoto, K. and K. I. Komatsu. 1992. Purification and characterization of nitrilase responsible for the enantioselective hydrolysis from *Acinetobacter* sp. AK 226. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1459-1466.
 16. Yamamoto, K., K. Oishi, I. Fujimatsu, and K. Komatsu. 1991. Production of R-(-)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3028-3032.
 17. Yamamoto, K., Y. Ueno, K. Otsubo, K. Kawakami, and K. Komatsu. 1990. Production of S-(+)-ibuprofen from a nitrile compound by *Acinetobacter* sp. strain AK226. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1459-1466.

(Received Aug. 17, 2006/Accepted Sep. 13, 2006)