

미생물 유래 styrene monooxygenase를 이용한 광학활성 styrene oxide 유도체의 비대칭합성

이은열* · 박성훈¹

경희대학교 화학공학과 및 산학협력기술연구원, ¹부산대학교 화학공학과

Microbial styrene monooxygenase-catalyzed asymmetric synthesis of enantiopure styrene oxide derivatives

Eun Yeol Lee* and Sunghoon Park¹

Department of Chemical Engineering & Industrial Liaison Research Institute, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea,

¹Department of Chemical and Biochemical Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea.

Abstract Enantiopure styrene oxide derivatives are versatile building blocks for the synthesis of enantiopure pharmaceuticals. Styrene monooxygenase (SMO) catalyzes an asymmetric addition of an oxygen atom into a double bond of vinylaromatic compounds. SMO is a commercially potential biocatalyst to synthesize a variety of enantiopure epoxides with high enantiopurity and recovery yield. In this paper, development of SMO biocatalyst and commercial feasibility of SMO-catalyzed asymmetric synthesis of enantiopure styrene oxide derivatives are reviewed.

Keywords: enantiopure epoxides, enantiopure styrene oxide, asymmetric synthesis, monooxygenase, styrene monooxygenase

서 론

미국 FDA 규정에 의하면 라세믹 혼합물 형태의 신약은 광학이성질체 각각에 대하여 개별적인 임상결과를 요구하고 있어, 제약업체들은 신약 개발 초기단계부터 순수한 광학이성질체로 개발하고 있다(1). 따라서 광학활성 의약품 합성에 필요한 광학활성 화합물 및 중간체 (chiral chemicals and intermediates)의 중요성이 동시에 부각되고 있다(2, 3). 광학활성 화합물 및 중간체 관련 세계시장 동향을 살펴보면, 미국 Drug & Market Development Publications사의 2003년 4월 공개 자료에 의하면, 미국 시장은 연평균 10.8%의 높은 성장률로 2007년에는 27억불 규모를 형성할 것으로 전망하고 있다(4). 영국 Frost & Sullivan사 자료에 의하

면, 광학활성 화합물 및 중간체 관련 세계시장은 2000년 66.3억불에서 13.2%의 연평균 성장률로 2007년에는 160억불로 확대될 것으로 예상하고 있다(5). 미국 Freedonia사 자료에 의하면, contract manufacturing을 포함한 광학활성 화합물의 미국 시장은 연평균 9.4%로 성장하고 있어 2005년에는 151억불 규모가 된 것으로 추정하고 있다(6).

광학활성 styrene oxide를 포함한 에폭사이드 중간체는 반응성이 우수하고, 친전자성반응, 친핵성반응, 산염기반응, 산화·환원반응 등 다양한 반응을 유도할 수 있어 광학활성 의약품 합성용 중간체로 널리 사용될 수 있다(7). 광학활성 styrene oxide 등의 에폭사이드는 기관지 확장제, 비만치료제, N-methyl-D-aspartate 수용체 길항제, 살선충제, 항암제 등 다양한 광학활성 의약품 합성에 사용될 수 있다(8).

생촉매를 이용하여 광학활성 에폭사이드를 제조하는 방법은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫 번째 방법은 라세믹 에폭사이드 기질의 특정 이성질체에 대한 입체선택적 가수분해활성이 있는 epoxide hydrolase (EH)를 이용한

*Corresponding author

Tel: +82-31-201-3839, Fax: +82-31-202-1946

e-mail: eunylee@khu.ac.kr

입체선택적 분할을 통해 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있다(9, 10). 다른 방법으로는 monooxygenase (MO)를 이용하여 알켄 기질의 이중결합에 비대칭적으로 에폭사이드 링을 도입시켜 제조할 수 있다(11, 12). EH를 이용한 광학 분할법은 이론 수율이 50%로 제한된다는 단점이 있는 반면, MO를 이용한 비대칭합성법은 이론적으로 100%의 수율로 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있다는 장점이 있다. 본 논문에서는 미생물 MO 계열인 styrene monooxygenase (SMO)를 생촉매로 이용하여 의약품 합성 중간체로 사용되는 광학활성 styrene oxide 유도체를 제조하는 기술개발 동향을 분석하고자 하였다. 또한 다양한 광학활성 에폭사이드 제조에 활용할 수 있는 상업적 생촉매로서의 SMO의 가능성을 평가하였다.

본 론

미생물의 styrene 분해 대사과정

미생물의 styrene 대사과정의 첫 단계에서 SMO에 의해 styrene side-chain의 이중결합이 산화되면서 styrene oxide로 전환된 후, styrene oxide isomerase (SOI)에 의해 phenylacetaldehyde로 전환된 후 분해된다(13). 따라서 SMO에 의한 styrene 대사경로를 가지는 미생물들은 styrene 분해 산물인 phenylacetaldehyde나 phenylacetic acid (PAA)를 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있다. 세포내에서 생성된 styrene oxide는 이성화효소 (SOI)에 의해 즉시 aldehyde 형태로 변환된다. 이 반응 속도는 일반적으로 SMO 반응 속도보다 매우 빠른 편이다.

Hartman 등은 농화배양을 통해 styrene 분해 활성이 있는 14종의 박테리아 (S1~S14)를 분리하였고, 세포 추출물에서 SMO 활성을 측정하였다(14). Cox 등은 효모와 유사한 곰팡이인 *Exophiala jeanselmei*로부터 SMO 활성을 측정하였다(15). 미생물에 의한 styrene 분해는 주로 SMO 대사과정에 의한 경우가 대부분이며, styrene dioxygenase (SDO)에 의해 분해되는 경로는 *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259에서 보고되었다. *Pseudomonas fluorescens* ST의 경우 styrene 분해 관련 유전자들은 두 개의 오페론으로 구성되어 있다. 상위경로 (upper pathway)상의 유전자들은 styrene을 phenylacetic acid로 산화시키는 대사와 관련된 유전자들이며, 하위경로 (lower pathway)상의 유전자들은 phenylacetic acid를 대사시켜 Krebs cycle로 보내는 대사과정에 관여하는 유전자들이다(16, 17).

미생물 세포 안으로 styrene이 수송되는 과정에서 중요한 역할을 수행하는 단백질도 발견되었다. *P. putida* CA-3의 *styABCD* operon의 1.5-kb 하부 영역에서 styrene 수송과 관련된 45.9-kDa 크기의 StyE 단백질이 발견되었다(18). BLAST 분석 결과, 방향족탄화수소 수송과 관련된 membrane-associated ATPase-dependent kinase와 33에서

98% 수준의 서열 유사성을 보였다. *styE* 유전자를 제거시킨 *P. putida* CA-3 세포는 styrene에서 성장하지 못했으나, *styE* 유전자를 발현시킨 재조합 균주의 경우 *styA* mRNA 생성량이 약 8배 증가 되었으며 SMO 활성은 4배 이상 증가된 결과를 보여주어 styrene 수송단백질의 중요성을 확인할 수 있었다.

SMO 관련 유전자 클로닝

SMO에 의한 styrene의 산화반응은 기질, 산소, 환원력이 동시에 관계하는 복잡한 생화학반응이다. SMO 반응에는 NADPH 또는 NADH와 flavin adenine dinucleotide (FAD)와 같은 cofactor가 필수적으로 요구된다. 따라서 SMO와 같은 산화효소는 보조적인 단백질 (redox partner)과 결합체로 존재하는 경우가 많다. 이들 단백질은 전자 당량을 NAD(P)H로부터 산화효소에 전달해주는 역할을 한다. 따라서 산화효소는 FAD와 NADPH 또는 NADH 의존적 reductase와 MO, 두 가지 구성체의 결합체로 있는 경우가 대부분이다(19).

Panke 등은 *Pseudomonas* sp. VLB120으로부터 SMO 관련 유전자들을 클로닝하여 염기서열과 특성을 분석하였다(20-23). *StyA* 유전자가 oxygenase를 코딩하고 *styB* 유전자가 reductase를 코딩하고 있으며, styrene oxide isomerase (SOI)와 phenylacetaldehyde dehydrogenase는 각각 *styC* 및 *styD* 유전자에 의해 코딩되어 클러스터를 형성함을 보고하였다. 다른 *Pseudomonas* 종인 *P. fluorescens*와 *P. putida*로부터 SMO 관련 유전자들이 클로닝 되었는데, 모두 유사한 구조를 가지고 있음이 밝혀졌다(24-27). *StyA*는 *PobA*, *NahG*, *MhpA* 등 flavin-type aromatic hydroxylase와 서열 유사성을 보였고, *StyB*는 *SnaC*, *ActRV*, *NtaB*, *NmoB*와 같은 flavin mononucleotide (FMN) oxidoreductase와 유사성을 보였다(28-30). *StyB*는 two-component monooxygenase의 coupling protein과도 높은 유사성을 나타내었는데, coupling-protein은 효소 활성은 없지만 기질 유사체를 구별하는 중요한 역할을 한다(31). Panke 등의 연구결과에 따르면 *styA*만 발현해도 SMO 활성이 있지만, *styB*와 함께 발현시킨 경우보다 훨씬 낮은 활성을 보였다. 반면 *styB*만 발현시킨 경우 SMO 활성이 측정되지 못했다(21). *StyC*와 유사성이 높은 유전자는 아직 알려지지 않았는데, 이는 *StyC*가 드물게 존재하는 기질에 대해 활성을 가지기 있기 때문이다. *StyD*는 원핵 및 진핵세포의 aldehyde dehydrogenase와 높은 유사성을 나타내었다.

Multiple sequence alignment를 이용한 미생물 SMO 유전자 유사성 분석

Park 등은 신규로 분리한 *P. putida* SN-1 유래의 StyAB 단백질 서열에 대하여 탄화수소 대사과정에 관여하는 hydroxylase 및 oxidoreductase 단백질 서열들과의 유사성

을 평가하였다(32). *P. putida* SN1 유래의 StyA 단백질은 *P. fluorescens*의 *p*-hydroxybenzoate hydroxylase (PobA) 등을 포함한 flavin-containing aromatic hydroxylase와 비교적 높은 유사성을 보였다. *P. putida* SN1 유래의 StyAB 단백질 서열은 일반적으로 hydroxylase와는 전체 단백질 서열에서는 낮은 유사성을 보였으나, 특정 부위에서는 높은 서열 상관성을 보였다. 대부분의 monooxygenase와 hydroxylase 단백질 서열에서 특징적인 glycine 잔기 (GXGXGX)가 아미노말단의 β - α - β unit에 잘 보존되어 있으며, 이 서열은 flavin adenine dinucleotide (FAD)의 ADP 부위가 결합하는 영역으로 알려져 있다(3).

P. putida SN1의 StyB 단백질 서열은 다른 *Pseudomonas* 종들의 StyB 또는 StdB 단백질들과 높은 유사성을 보였다. *Agrobacterium tumefaciens*의 nitrilotriacetate 이화 과정에서 작용하는 NADH:FMN oxidoreductase 단백질 과도 높은 유사성을 보였다. 또한, *Klebsiella oxytoca*의 two-component 4-hydroxyphenylacetate-3-monooxygenase에서 flavin:NADH reductase 역할을 하는 coupling protein (HpaC)에 보존된 아미노산 서열과도 유사성을 가지고 있었다. 따라서 StyB 단백질은 에폭시 산화반응에서 촉매활성을 직접 나타내지는 않지만 완전한 monooxygenase 활성을 주기 위해서는 반드시 필요한 단백질을 알 수 있다(21).

Styrene 대사 유전자 전사 조절 시스템

Styrene 대사에 관여하는 유전자들의 전사는 *styS*와 *styR*의 positive regulation에 의해 조절된다. *StyS*는 styrene이 존재할 때 인산화되는 sensor kinase를 코딩하며, 응답 조절자 (response regulator)인 *StyR*을 활성화시킨다. *StyR*은 *styA*의 promotor로부터 -41 위치의 DNA-binding site에 붙어 RNA polymerase가 -10 위치에 쉽게 붙을 수 있도록 유도한다(19). 이러한 styrene 대사 유전자에 대한 전사 조절 기작은 toluene 대사와 관련된 *tod operon*의 응답 조절자 역할을 수행하는 *TodT*에 의한 기작과 유사하다.

O'Leary 등은 *P. putida* CA-3에 의한 styrene 분해에서 최소배지에 styrene, PAA, glucose 또는 citrate를 첨가하여 미생물을 배양한 뒤 효소의 활성과 유전자의 전사 정도를 측정하였다(26). 최소배지에 styrene을 첨가하여 배양한 경우에는 SMO와 PACoA ligase 활성이 모두 나타났고, RT-PCR로 확인한 결과 *stySR*, *styA*, *paaK*의 mRNA가 모두 전사되었다. PAA에서 배양한 경우 SMO 활성이 없었고, *paaK*를 제외한 *stySR*, *styA*의 mRNA가 만들어지지 않았다. Glucose 또는 citrate를 첨가한 경우에도 SMO 활성을 나타내지 않았으며 관련 mRNA가 전혀 발현되지 않았다. Citrate와 styrene이 동시에 존재할 때는 SMO 활성은 검출 한계 이하로 유지되었지만 *paaK*, *styS*, *styR*, *styA*의 mRNA의 전사는 완전히 저해되지 않았다. 한편, styrene을 첨가해서 배양하던 중 대수성장기 중간에 PAA를 첨가하면 상위 경로의 key enzyme들이 전혀 발현되지 않았다. 그러나 *stySR*의 mRNA는 RT-PCR로 검출이 가능할 정도로 남아 있었는데, 그 농도는 styrene만 첨가했을 때보다 훨씬 낮았다. 따라서 PAA는 styrene 분해 상위 경로의 negative regulator로서 작용한다고 볼 수 있다. 그러나 분해 대사 경로의 조절은 균주에 따라서 많은 차이가 있다. *Xanthobacter* 124X는 PAA가 존재해도 상위 경로의 key enzyme를 발현할 수 있었고, *P. fluorescens* ST는 탄소원에 관계없이 *stySR*의 mRNA가 구성 발현된다고 알려져 있다(33).

SMO 유전자 발현 및 광학활성 styrene oxide 제조를 위한 유전자재조합 생촉매 개발

Styrene을 기질로 제공하는 경우 styrene 분해 효소들에 의해 끝까지 대사되어 없어지므로, SMO 유전자만을 styrene 분해능이 없는 숙주에서 발현시키면 저가의 styrene으로부터 고가의 광학활성 styrene oxide를 제조할 수 있다. 광학활성 styrene oxide를 제조하기 위한 유전자 재조합 생촉매를 개발하기 위하여, *Pseudomonads* 종으로부터 클

Table 1. Development of various recombinant whole-cell SMO biocatalysts and their catalytic activities(20, 23, 26)

Host strain	Regulation	Plasmid	Target protein	Max. styrene oxide specific formation rate	Host strain
Recombinant <i>E. coli</i>	^a <i>AlkS</i> and <i>alkBp</i>	Low copy No.	<i>XMO</i> from <i>P. putida mt-2</i>	91U/g cell (ee > 95%)	Good regulation
Recombinant <i>E. coli</i>	<i>T7 promoter</i>	High copy No.	<i>SMO</i> from <i>P. putida SN-1</i>	140U/g cell (ee > 99%)	Good regulation
Recombinant <i>E. coli</i>	<i>AlkS</i> and <i>alkBp</i>	Low copy No.	<i>SMO</i> from <i>P. sp. VLB120</i>	70U/g cell (ee > 99%)	- Good regulation - Maintain over 6h
Recombinant <i>E. coli</i>	<i>P_{tac}</i>	Low copy No.	<i>SMO</i> from <i>P. sp. VLB120</i>	70U/g cell (ee > 99%)	
Recombinant <i>E. coli</i>	<i>AlkS</i> and <i>alkBp</i>	Chromosomal insertion	<i>XMO</i> from <i>P. putida mt-2</i>	0U/g cell	Low gene dosage
<i>P. Putida KT2440</i>	<i>AlkS</i> and <i>alkBp</i>	Chromosomal insertion	<i>SMO</i> from <i>P. sp. VLB120</i>	86U/g cell (ee > 99%)	Good regulation

^a*Alk* system (from *Pseudomonas oleovorans* GP01).

로닝한 SMO 유전자를 *Escherichia coli*에서 효율적으로 발현시킨 연구도 활발히 진행되었다. *Pseudomonas* sp. VLB120의 SMO 유전자를 *P. oleovorans*로부터 분리한 *alk* 발현조절 시스템을 이용하여 효율적으로 발현한 연구 결과가 최초로 보고되었다(Table 1)(20, 26). *AlkS* 유전자 산물인 발현 조절 단백질은 *alkBp* 프로모터에 대해 positive regulation 효과를 보이는데, 이러한 특성을 가진 *alkS-alkBp* 유전자를 *styAB* 유전자 앞에 연결시켜 SMO를 발현시켰다(22). *E. coli* JM101을 숙주세포로 이용하고 dicyclopropylketone (DCPK)을 이용하여 유도 발현시킨 결과, 70 U/g dcw 수준의 높은 SMO 활성을 얻을 수 있었다. 비교 대상인 *tac* 프로모터를 사용한 경우 IPTG로 유도를 하지 않은 상태에서 SMO가 발현되는 반면, *alkBp* 시스템을 사용하는 경우 DCPK로 유도 발현하지 않으면 SMO가 전혀 발현되지 않아 발현 조절이 용이하다는 장점도 있다. 또한, *tac* 프로모터 시스템에서는 세포성장 정지기에서 급격한 SMO 활성 저하 현상이 일어난 반면, *alk* 발현조절 시스템을 사용하는 경우 세포성장 정지기에서도 우수한 SMO 활성이 유지되어 단위부피당 생산성을 향상시킬 수 있었다.

Panke 등은 Tn5를 이용하여 *alk* 발현조절 시스템과 SMO 유전자를 *E. coli* JM101과 *P. putida* KT2440의 chromosome에 삽입시킨 재조합 균주를 개발하였다(Table 1)(23). *E. coli*에 SMO 유전자를 가진 Tn5를 삽입시킨 경우에는 SMO 활성이 매우 낮았는데, 이는 낮은 gene dosage 효과 때문으로 평가할 수 있다. 반면에 *P. putida*에 삽입해서 발현한 경우 86 U/g dcw 수준의 높은 SMO 활성을 얻었는데, *E. coli*에 multi copy number의 플라스미드를 이용해 발현한 SMO의 활성인 70 U/g dcw 보다도 높은 활성을 보여준 결과이다. 이는 *alk* 발현조절시스템이 *Pseudomonas*에서는 전체 단백질의 2% 수준까지 발현시킬 수 있는 강력한 시스템이기 때문이다. 하지만 두 경우 모두에서 wild type 균주의 SMO 활성보다 낮은 재조합 SMO 활성을 얻었다.

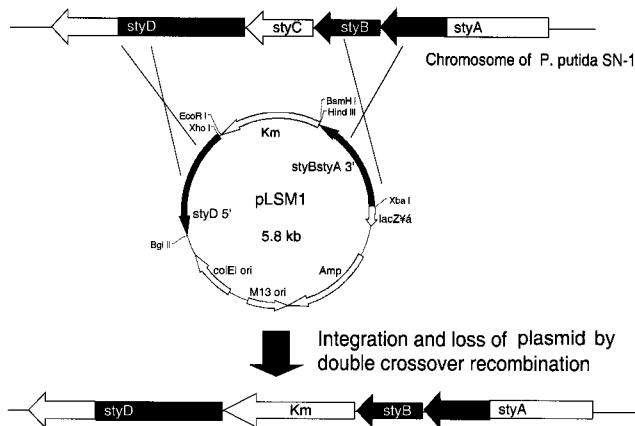


Fig. 1. Schematic drawing of pLSM1 for disruption of *styC* in *P. putida* SN-1. The homologous regions in the circular DNAs and chromosome of *P. putida* are shaded(34).

최근에 Han 등은 styrene oxide를 benzaldehyde로 변환시키는 *styC* gene을 *Pseudomonas* chromosome에서 선택적으로 제거함으로써 광학활성 styrene oxide를 제조할 수 있는 생촉매를 개발하였다(Fig. 1)(34). 돌연변이 균주의 SMO 활성은 160 nmol/min/mg dcw 정도로, wild-type *P. putida* SN-1의 최대 SMO 활성을 얻을 수 있었다. 이 결과는 *Pseudomonas* SMO 유전자를 발현한 재조합 *E. coli*의 활성에 비해 2배 이상 높은 값이다. 돌연변이 균주를 생촉매로 사용하여 광학순도 98%ee (enantiomeric excess) 이상의 높은 광학순도를 가진 (*S*)-styrene oxide를 150 mM 수준으로 제조할 수 있었다.

광학활성 styrene oxide 제조 공정 개발

재조합 SMO를 생촉매로 이용한 광학활성 styrene oxide 제조공정 개발에 있어 수용액과 유기용매로 구성된 이상계 (aqueous/organic two liquid-phase system) 반응시스템을 사용하는 것이 유리하다. 일반적으로 산물인 에폭사이드는 구조가 불안정하여 수용액상에서 자연 분해되는 특성이 있기 때문에 유기용매 사용이 요구된다. 반면에 많은 생촉매들이 유기용매와 접촉 시 불활성화되는 경향이 있기 때문에 수용액을 사용하는 것이 유리하므로, 수용액/유기용매 이상계 반응시스템이 이상적이다. 또한, 이상계에서는 유기용매에 있는 styrene이 수용액으로 낮은 농도로 지속적으로 전달되고, 생성된 styrene oxide는 유기용매로 회수되므로 기질과 생성물에 의한 생촉매 활성저해 현상을 방지할 수도 있다.

Table 2. Comparison of biocatalysts to chemocatalysts in catalytic efficiency for the synthesis of enantiopure styrene oxide(12, 27)

Catalyst	<i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10)	Ru-brucin	Mn-salen
Yield (%)	76.3	64	86
ee ^a (%)	99.5 (S)	43 (S)	n. d. ^b
Catalyst activity ^c (U/g)	14.5	180	91
Product ratio ^d (g/g)	1.8	31.3	3.3
Productivity ^e (g/g·h)	0.10	1.30	0.66

^aee = |(S - R)/(S + R)|

^bn.d. = not determined

^cCatalyst activity = total product × catalyst amount⁻¹ × time⁻¹ [μmol/g · min]

^dProduct ratio = Total product × catalyst amount⁻¹

^eProductivity = Product ratio × time⁻¹

Schmid 등은 SMO 유전자를 재조합한 *E. coli*를 이용하여 styrene으로부터 (*S*)-styrene oxide를 생합성하는 생물공정을 개발하였다(12). 생촉매로 사용한 *E. coli* JM101 (pSPZ10)은 SMO를 코딩하는 *styAB* 유전자와 *alk* 조절 시스템을 구성하는 *alkS*와 *alkBp* 프로모터를 포함하고 있다. 비극성 용매인 bis(2-ethylhexyl)phthalate (BEHP)를 유기용매로 사용한 이상계 시스템에서 17시간 동안 12.6 g의

(S)-styrene oxide를 제조하였다. 생성된 (S)-styrene oxide의 ee값은 99% 이상으로, 화학 촉매를 사용한 경우의 45%에 비해 광학 활성이 월등히 우수한 것으로 나타났다(Table 2). 그러나 비활성은 화학 촉매의 활성 (180 U/g)이 생촉매 (14.5 U/g)의 활성보다 10배 정도 더 높게 나타났다(27).

Panke 등은 SMO 유전자를 재조합한 *E. coli*를 생촉매로 사용하여 광학활성 styrene oxide를 제조하는 파이롯 규모의 생산 공정을 개발하였다(11). 30 리터 수용액/유기용매 이상계 fed-batch 반응기에서 16시간 동안 반응을 수행하여 388 g의 (S)-styrene oxide를 생산하였고, 광학순도는 99%ee 이상이었다. 최종산물의 분리정제를 위하여 fractional distillation 공정도 포함되어 최종 97% ee의 순도로 (S)-styrene oxide를 생산할 수 있었다. 운전 기간 동안 평균 SMO 활성은 140 U/l, 초기 10시간 동안은 170 U/l로 유지되었다. 이 공정의 생산성 향상과 관련하여 제기된 문제점은 기질인 styrene의 물질전달 제한이 있다는 점이다. 또한, *E. coli*가 유기용매에 대한 내성이 약하므로 생촉매 활성 저하 등을 극복하기 위하여 유기용매 내성 유전자를 함께 발현시킬 필요가 있다. 재조합 *E. coli* 대신에 유기용매에 강한 내성을 보이는 *Pseudomonas* (SOI-negative)를 생촉매로 사용할 수 있을 것이다(23). *Pseudomonas*는 유기용매를 세포 밖으로 배출하는 기작 (solvent efflux system)을 가지고 있어서 세포 내의 유기용매 농도를 낮게 유지할 수 있다(35). 이와 같은 일련의 연구 결과들을 바탕으로 광학활성 vinylaromatic 화합물 제조관련 특허가 출원되었다. SMO와 같은 미생물 유래의 산화효소를 이용하여 styrene 유도체 계열의 광학활성 에폭사이드, 특히 고순도 (1S, 2R) indene oxide 제조에 대한 특허가 출원되었다. 현재까지 개발된 생물공정은 기존 화학공정에 비해 환경 친화적이며 SMO의 다양한 기질 특이성을 이용하여 여러 종류의 광학활성 에폭사이드들을 제조할 수 있으므로, 생산성을 더 향상시키는 경우 상업화 가능성이 높은 기술이 될 것이다.

전망 및 결론

향후에는 genomics, metagenomics 등을 기반으로 광학활성 에폭사이드 비대칭합성반응을 촉매할 수 있는 다양한 SMO가 지속적으로 개발될 것으로 기대된다. 최근에 메타게놈으로부터 신규 SMO를 효율적으로 개발한 연구 결과가 보고되었다(36). 산화효소 (oxygenase)를 *E. coli*에 발현시키면 청색 염료인 indigo를 형성할 수 있다는 스크리닝 원리를 이용하여 메타게놈으로부터 얻은 다양한 유전자들로부터 SMO 유전자를 검색하여 새로운 SMO 유전자 (*SmoA*)를 얻었으며, 발현된 재조합 SMO 활성을 이용하여 styrene으로부터 99%ee의 고순도 (S)-epoxides를 제조할 수 있었다. 또한 (R)-ethyl phenyl sulfoxide를 92%ee 수준으로 제조할 수 있었다. 이와 같이 genomics, 토양 및 해양 metagenomics 등을 기반으로 한 새로운 SMO 계열의 유전

자들이 효율적으로 스크리닝되어, 다양한 기질에 적용할 수 있는 SMO 생촉매의 선택 폭이 넓어질 것이다.

SMO를 포함하여 미생물 유래 monooxygenase를 무세포 상태에서 생촉매로 사용하는 경우, NADH 또는 FADH₂ 등의 reducing power를 효율적으로 재생할 수 있는 시스템 개발이 반드시 필요하다. 최근에 유기금속 화합물 또는 전기 화학적인 방법을 이용하여 효율적으로 reducing power를 재생산하는 방법이 개발되었다(Fig. 2)(37, 38). 유기금속 화합물인 [(Cp*Rh(bpy)(H₂O))²⁺]를 이용하면 FAD와 formate 사이의 transhydrogenation 반응을 진행시켜 FADH₂를 재생산할 수 있고, 이 반응을 FADH₂-dependent SMO 반응에 결합시키면 화학효소 결합형 에폭시화 반응을 진행할 수 있다. 이 방법을 이용하면 생체 내에서 필요한 reductase (StyB)나 기존에 사용되던 nicotinamide coenzyme (NAD)와 formate dehydrogenase를 이용한 재생산 시스템을 대신할 수 있다. 이 시스템을 기반으로 6.5 μM SMO를 이용하여 세포내 대비 약 70% 수준인 6.4 mM/h의 활성을 얻었으며, 다양한 종류의 (S)-epoxides (ee > 98%) 제조와 sulfoxidation 반응을 촉매할 수 있었다. Reducing power의 재생산은 전기화학적으로도 해결할 수 있으며, 효율적인 reducing power 재생성 기술을 통해 SMO 등의 monooxygenase 효소 자체를 생촉매로 이용하는 새로운 생전환반응 시스템 개발이 가능할 것이다.

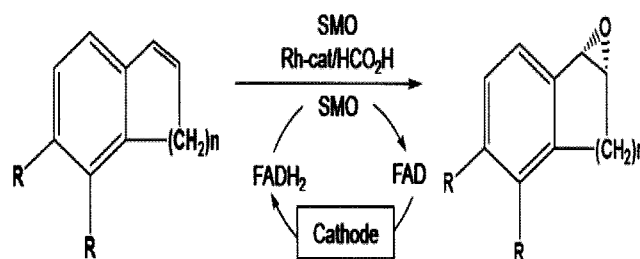


Fig. 2. Direct organometallic and electrochemical regeneration of a FAD-dependent monooxygenase for biocatalytic asymmetric epoxidation(37, 38).

광학활성 styrene oxide를 포함한 광학활성 에폭사이드는 항암제, β-blocker 등과 같은 광학활성 의약품 합성에 널리 사용될 수 있는 핵심 유기중간체이다. SMO를 생촉매로 이용하는 비대칭 에폭시화반응은 높은 광학순도의 광학활성 에폭사이드를 높은 수율로 제조할 수 있는 상업적으로 유용한 방법이다. SMO 재조합 *E. coli*를 생촉매로 이용하여 광학적으로 순수한 (S)-styrene oxide를 제조하는 공정은 분리공정까지 포함하여 pilot 규모까지 scale-up이 되었다(25, 31). 또한, 기질 용해도를 높이기 위한 이상계 반응 시스템, *in situ* 분리 공정, multimeric monooxygenase 효소 발현 및 안정화 기술 개발, NADH 등의 cofactor regeneration 등에 대한 연구개발이 활발히 진행되고 있어 친환경적인 생촉매를 활용한 광학활성 에폭사이드 제조 기술의 상업화 가능성은 지속적으로 높아질 것으로 기대된다.

요 약

광학활성 styrene oxide는 친전자성반응, 친핵성반응, 산·염기반응, 산화·환원반응 등 다양한 반응을 유도할 수 있어 광학활성 중간체로 널리 사용될 수 있다. Styrene monooxygenase (SMO)를 생촉매로 이용하여 styrene의 side-chain 이중결합에 입체선택적으로 에폭사이드 링을 도입시켜 광학활성 styrene oxide 유도체를 제조할 수 있다. 다양한 기질 특이성을 가진 신규 SMO 생촉매 개발, 이상계 반응 시스템, *in situ* 분리 공정, multimeric oxygenase 효소 발현 및 안정화 기술 개발, NADH 등 cofactor regeneration 등에 대한 연구개발이 활발히 진행되고 있어, 미생물 유래의 SMO를 생촉매로 활용하는 광학활성 styrene oxide 유도체 제조 기술의 상업화가 기대된다.

감사의 글

본 논문은 국토해양부 마린바이오21 해양극한 분자 유전체단으로부터 연구비를 지원 받아 수행하였음에 감사드립니다.

접수 : 2009년 2월 18일, 게재승인 : 2009년 4월 17일

REFERENCES

1. F. Jamali (1993), Stereochemical pure drug: an overview, pp375-384, in Wainer, I. W. (eds.), Drug stereochemistry, Marcel Dekker, New York.
2. A. N. Collins, G. N. Sheldrake, and J. Crosby (1992), Chirality in industry, John Wiley & Sons, New York.
3. A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, and B. Witholt (2001), Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* **409**, 258-268.
4. <http://www.drugandmarket.com/>.
5. <http://www.frost.com/>.
6. <http://www.freedoniagroup.com/>.
7. P. Besse and H. Veschambre (1994), Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
8. E. Y. Lee and M. L. Shuler (2007), Molecular engineering of epoxide hydrolase and its application to asymmetric and enantioconvergent hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng.* **98**, 318-327.
9. A. Archelas and R. Furstoss (2001), Synthetic applications of epoxide hydrolases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 112-119.
10. E. J. de Vries and D. B. Janssen (2003), Biocatalytic conversion of epoxides, *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 414-420.
11. S. Panke, M. Held, M. G. Wubbolts, B. Witholt, and A. Schmid (2002), Pilot-scale production of (*S*)-styrene oxide from styrene by recombinant *Escherichia coli* synthesizing styrene monooxygenase, *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 33-41.
12. A. Schmid, K. Hofstetter, H.-J. Feiten, F. Hollman, and B. Witholt (2001), Integrated biocatalytic synthesis on gram scale: The highly enantioselective preparation of chiral oxiranes with styrene monooxygenase, *Adv. Synth. Catal.* **343**, 1-6.
13. <http://umbbd.ahc.umn.edu/>.
14. S. Hartmans, M. J. van der Werf, and J. A. M. de Bont (1990), Bacterial degradation of styrene involving a novel flavin adenine dinucleotide-dependent styrene monooxygenase, *App. Environ. Microbiol.* **56**, 1347-1351.
15. H. H. J. Cox, B. W. Faber, W. N. M. van Heiningen, H. Radhoe, H. J. Doddema, and W. Harder (1996), Styrene metabolism in *Exophiala jeanselmei* and involvement of a cytochrome P-450-dependent styrene monooxygenase, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1471-1474.
16. F. Beltrametti, A. M. Marconi, G. Bestetti, C. Colombo, E. Galli, M. Ruzzi, and E. Zennaro (1997), Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2232-2239.
17. G. Bestetti, P. D. Gennaro, A. Colmegna, I. Ronco, E. Galli, and G. Sello (2004), Characterization of styrene catabolic pathway in *Pseudomonas fluorescens* ST, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **54**, 183-187.
18. A. Mooney, N. D. O'Leary, and A. D. W. Dobson (2006), Cloning and functional characterization of the *styE* gene, involved in styrene transport in *Pseudomonas putida* CA-3, *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1302-1309.
19. Y. Xu, M. W. Mortimer, T. S. Fisher, M. L. Kahn, F. J. Brokman, and L. Xu (1997), Cloning, sequencing, and analysis of a gene cluster from *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600 encoding nitrilotriacetate monooxygenase and NADH: flavin mononucleotide oxidoreductase, *J. Bacteriol.* **179**, 1112-1118.
20. S. Panke, A. Meyer, C. M. Huber, B. Witholt, and M. G. Wubbolts (1999), An alkane-responsive expression system for the production of fine chemicals, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2324-2332.
21. S. Panke, B. Witholt, A. Schmid, and M. G. Wubbolts (1998), Towards a biocatalyst for (*S*)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas* sp. strain VLB120, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2032-2043.
22. S. Panke, M. G. Wubbolts, A. Schmid, and B. Witholt (2000), Production of enantiopure styrene oxide by recombinant *Escherichia coli* synthesizing a two-component styrene monooxygenase, *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 91-100.

23. S. Panke, V. de Lorenzo, A. Kaiser, B. Witholt, and M. G. Wubbolts (1999), Engineering of a stable whole-cell biocatalyst capable of (*S*)-styrene oxide formation for continuous two-liquid-phase applications, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5619-5623.
24. F. Beltrametti, A. M. Marconi, G. Bestetti, C. Colombo, E. Galli, M. Ruzzi, and E. Zennaro (1997), Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2232-2239.
25. A. M. Marconi, F. Beltrametti, G. Bestetti, F. Solinas, M. Ruzzi, E. Galli, and E. Zennaro (1996), Cloning and characterization of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 121-127.
26. N. D. O'Leary, K. E. O'Conner, W. Duetz, and A. D. W. Dobson (2001), Transcriptional regulation of styrene degradation in *Pseudomonas putida* CA-3, *Microbiology* **147**, 973-979.
27. M. Tokunaga, J. F. Larrow, F. Kakiuchi, and E. N. Jacobsen (1997), Asymmetric catalysis with water: Efficient kinetic resolution of terminal epoxides by means of catalytic hydrolysis, *Science* **277**, 936-938.
28. V. Blanc, D. Lagneaux, P. Didier, P. Gil, P. Lacroix, and J. Crouzet (1995), Cloning and analysis of structural genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the conversion of pristinamycin Π B to pristinamycin Π A (P Π A): P Π A synthase and NADH: riboflavin 5'-phosphate oxidoreductase, *J. Bacteriol.* **177**, 5206-5214.
29. B. Galan, E. Diaz, M. A. Prieto, and J. Garcia (2000), Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new flavin: NAD(P)H reductase subfamily, *J. Bacteriol.* **182**, 627-636.
30. H. R. Knobel, T. Egli, and J. R. van der Meer (1996), Cloning and characterization of the genes encoding nitrilotriacetate monooxygenase of *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600, *J. Bacteriol.* **178**, 6123-6132.
31. M. A. Prieto and J. L. Garcia (1994), Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. A two protein component enzyme, *J. Biol. Chem.* **269**, 22823-22829.
32. M. S. Park, J. Bae, J. H. Han, E. Y. Lee, S. G. Lee, and S. Park (2006), Characterization of styrene catabolic genes of *Pseudomonas putida* SN1 and construction of a recombinant *Escherichia coli* containing styrene monooxygenase gene for the production of (*S*)-styrene oxide, *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 1032-1040.
33. P. M. Santos, J. M. Blatny, I. D. Bartolo, S. Valla, and E. Zennaro (2000), Physiological analysis of the expression of the styrene degradation gene cluster in *Pseudomonas fluorescens* ST, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1305-1310.
34. J. H. Han, M. S. Park, J. W. Bae, E. Y. Lee, Y. J. Yoon, S.-G. Lee, and S. Park (2006), Production of (*S*)-styrene oxide using styrene oxide isomerase negative mutant of *Pseudomonas putida* SN1, *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 1264-1269.
35. J. Kieboom, J. J. Dennis, J. A. M. de Bont, and G. J. Zylstra (1998), Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance, *J. Biol. Chem.* **273**, 85-91.
36. E. W. van Hellemond, D. B. Janssen, and M. W. Fraaije (2007), Discovery of a novel styrene monooxygenase originating from the metagenome, *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5832-5839.
37. F. Hollmann, P.-C. Lin, B. Witholt, and A. Schmid (2003), Stereospecific biocatalytic epoxidation: The first example of direct regeneration of a FAD-dependent monooxygenase for catalysis, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8209-8217.
38. F. Hollmann, K. Hofstetter, T. Habicher, B. Hauer, and A. Schmid (2005), Direct electrochemical regeneration of monooxygenase subunits for biocatalytic asymmetric epoxidation, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 6540-6541.