

## 생물전환 반응을 위한 효소제제화기술

권 석 준  
(주)제노포커스

### 생물전환 반응을 위한 효소제제화기술

효소제제화 기술이란 효소를 물리 화학적으로 변형시켜 여러 가지 불활성화 요인(열, pH, protease, 유기용매 등의 불활성화제)에 저항성을 갖도록하는 것이다. 이러한 기술을 통해 효소에 다음과 같은 성질을 가지게 하여 효소의 응용성을 높일 수 있다.

- ① 기질 등의 친화성( $K_m$  등), 최대반응속도( $V_{max}$ 치), 동력학적 parameter의 변화
- ② 반응적정온도의 상승과 열안정성의 향상
- ③ 반응에 적합한 pH영역이 넓어짐
- ④ 비수용매 중에서의 안정성의 향상이나 활성의 발현
- ⑤ 기질특이성이나 반응 특이성 및 반응의 위치특이성이나 입체 특이성의 변화
- ⑥ 단백질분해 효소의 작용이나 미생물에 의한 분해에 대한 저항성의 향상
- ⑦ 효소 단백질의 고분자화나 서브 유니트 해리의 제한

이러한 변화로 여러 가지 반응환경에서 효소를 장기간 연속적으로 사용하기 위한 유력한 수단이 되어왔다. 기존의 효소제제화 기술은 효소를 여러 가지 성질의 다양한 담체에 여러 가지 결합으로 고정화하는 연구가 대부분을 차지하고 있었다. 그러나 최근 기존의 화학반응을 효소반응으로 대체하는 연구가 비약적으로 발전함에 따라 더욱 더 극한환경에서 효소반응을 수행해야하고 화학촉매에 비해 상대적으로 비싼 효소의 가격비용을 효소의 수십회 재사용을 통해 감소시킬 필요성이 증가하였으며 이는 기존의 고정화 방법으로는 불가능하였다. 최근 이러한 요구를 만족시키는 새로운 제제화 기술이 개발되었으며 어떤 기술들은 이미 상용화되고 있다.

생물촉매는 초기 식품공업과 세계 첨가물로 이용되어 왔으나 최근 과학기술이 진보되어 약들의 분자수준에서의 기작들이 새로이 발견됨에 따라 의약품, 바이어 센서용, 라세믹 화합물로부터 하나의 에난티오머를 생산하는 광학분할용\* 등 다양한 용도로 개발 되고 있다. 또한, 최근 생물촉매의 기능성과 안정성을 현저하게 증가시킬 수 있는 효소 제제화 방법들이

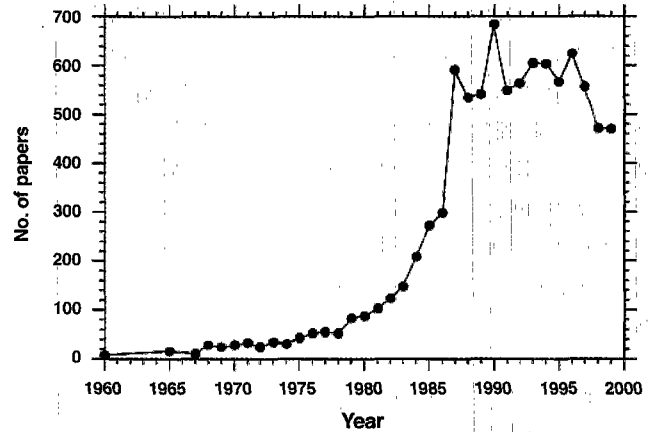


그림 1. 생물전환 방법으로 생산한 화학화합물 생산에 관한 연간 발행한 간행물수.

개발됨에 따라 생물전환반응에 관련된 연구가 폭발적으로 증가하고 있다(그림 1).

효소를 수계에서 뿐만 아니라 유기용매계에서도 다양하게 이용할 목적으로한 연구가 지난 수년동안 수백편 이상 보고되고 있다. 이러한 비전통적 반응계(non-conventional media)에서 효소반응을 수행할 경우 수계에서는 불가능한 다양한 화학반응을 입체특이적, 위치특이적으로 수행할 수 있는 장점이 있다 [1]. 또한, 기존에 화학반응이 고에너지를 요구하고 있고 환경독성물질을 배출하고 있기 때문에 효소를 이용한 생물전환반응은 화학 반응을 대체하는 환경청정기술로 평가된다.

다양한 정밀화학제품이 유기용매내에서 효소반응을 이용하여 생산되고 있으나, 이러한 비전통적 반응계에서의 반응은 효소의 불활성화를 유발하고 반응속도가 느리기 때문에 원하는 물질을 고수율로 합성하지 못하는 단점이 있어 산업화에 제약이 있어왔다. 그러나 최근 개발된 효소제제화 방법들은 이러한 단점을 극복하게 되었고 산업적으로 보다 다양한 물질들을 저렴하게 효소를 이용하여 생산하는 공정이 가능하게 되었다.

최근 개발된 효소제제화 방법으로는 유기용매에 효소를 완전히 녹여 기질의 diffusion limitation 없이 반응을 수행하여 반응속도를 현저히 향상시키기 위한 방법[2-4], enzyme imprinting 방법을 이용하여 유기용매에서의 반응성을 현저히

증가시킬 수 있는 방법[6], 극한조건에서도 효소의 불활성화 없이 반응을 수행할 수 있는 방법, 극한조건에서 효소의 수습 회 재사용을 가능하게 하는 방법 등이 개발되었다[8]. 이 밖에 화학적 수식을 통한 다양한 방법의 효소제제화 방법이 개발되고 있다. 아래에는 최근 개발된 상기 언급한 기술들을 보다 자세히 서술하였다.

### 1. 리피드 코팅(Lipid coating) 방법

유기용매계에서 생물촉매(효소)를 이용한 생물전환반응은 일반적으로 사용되고 있다[1]. 그러나 효소가 유기용매계에서 반응할 때 가장 큰 문제점은 효소의 안정성과 반응속도가 수용계에 비해 매우 낮다는 점이다. 이러한 문제를 해결하기 위해 일본의 Okahata 그룹에서 lipid coating 방법을 개발하였다. Lipid coating 방법은 효소표면에 리피드를 단층막으로 코팅시켜 유기용매계에서 효소들을 완전히 용해시키는 새로운 방법이다. 효소에 리피드 코팅하는 방법은 다음과 같은 순서로 수행된다.

1. 물에 녹아 있는 효소용액을 4°C에서 원심분리하여 불순물을 제거한다.
2. 상기 효소용액에 양친성물질(Amphiphile)을 첨가하여 4°C에서 섞어준 후 정지한다.
3. 생성된 침전물을 4°C에서 원심분리하여 모은 다음 동결건조한다.
4. 물에 녹지 않고 대부분의 유기용매(벤젠, 이소옥탄, 에테르, 에탄올 등)에 녹는 건조된 백색 분말을 얻는다.

위와 같은 방법으로 얻어낸 리피드 코팅된 효소는 다음과 같은 성질을 가지고 있으며 모식도는 아래 그림과 같다(그림 2).

1. 리피드의 친수성 그룹과 친수성 표면의 상호작용으로 결합된다.
2. 리피드의 소수성 그룹은 소수성 유기용매계로 향한다.
3. 리피드 코팅된 효소의 단백질 함량은 8~10wt%이고, 효소 1 분자당 150±50 리피드 분자가 둘러 싸인다.
4. 리피드 코팅된 효소는 유기용매계에서 서로 엉기지 않고 코팅된 리피드가 효소표면으로부터 분리되지 않는다.

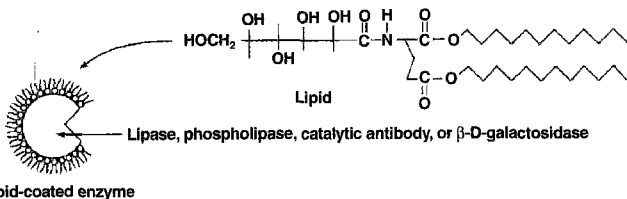


그림 2. 리피드에 코팅된 효소의 모식도.

생물산업

### 1-1. 소수성 유기용매계에서 리피드 코팅된 리파제를 이용한 광학 선택적 에스터 반응

리파제를 촉매로 라세믹 1-phenylethanol과 lauric acid를 이소옥탄내에서 합성하는 반응을 모델반응으로 리피드 코팅된 리파제와 PEG로 수식된 리파제, 분말형태의 리파제를 비교하였다[2] (그림 3).

그림 3의 결과 리피드 코팅된 리파제(a)의 속도는  $V_R=50 \mu\text{Ms}^{-1}(\text{mg of protein})^{-1}$ 이고 R/S 선택성은  $V_R/V_S=250$ 이다. 분말형태의 리파제(d)를 용매에 직접 분산시킨 결과 반응속도는  $V_R=0.5 \mu\text{Ms}^{-1}(\text{mg of protein})^{-1}$ 으로 리피드 코팅된 리파제보다 100배 낮았으며 선택성은  $V_R/V_S=260$ 으로 차이가 없었다. 물과 유기용매 에멀전계(c)에서는 반응속도 ( $V_R < 0.1 \mu\text{Ms}^{-1}(\text{mg of protein})^{-1}$ )와 선택성( $V_R/V_S=80-120$ )이 모두 나빠졌다. PEG로 수식된 리파제 (b)의 경우 리피드 코팅된 리파제보다는 느리고 분말형태의 리파제 보다는 훨씬 빠른 반응 속도 ( $V_R=30 \mu\text{Ms}^{-1}(\text{mg of protein})^{-1}$ )를 보였으며 선택성( $V_R/V_S=280$ )도 차이가 없었다. 그러나 전환율은 40 시간반응에 70%에 그쳤다.

이러한 결과로부터 리피드 코팅된 리파제의 경우, 유기용매계에서 효과적으로 효소의 광학 선택성의 변화 없이 고수율로 에스터 합성을 수행할 수 있는 장점을 가짐을 확인하였다. 이 같은 결과는 다른 형태의 효소들과는 달리 리피드 코팅된 효소는 수분이 없는 유기용매에 균일하게 녹기 때문이다.

### 1-2. 친수성 유기용매계에서 리피드 코팅된 catalytic antibody

Catalytic antibody는 여러 가지 에스터와 아미드의 가수분해, 트랜스 에스테르 반응, Diels-Alder 반응, decarboxylation 반응, sigmatropic rearrangement 등 다양한 반응을 수행할 수 있다. 이러한 반응에 사용되는 기질은 일반적으로 물에 녹지

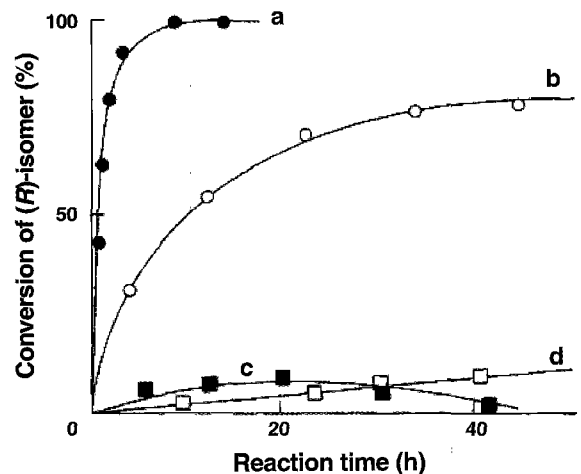


그림 3. 여러 형태의 리파제의 합성반응 비교. a. Lipid-coated lipase, b. PEG-grafted lipase, c. lipase in water-in-oil emulsion, d. direct dispersion of lipase powder.

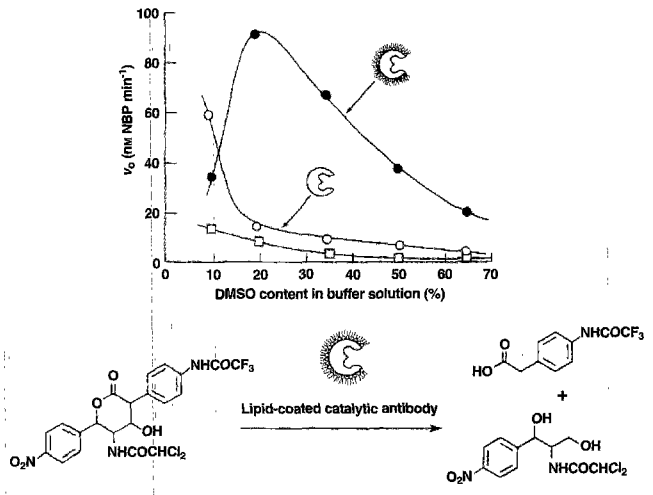


그림 4. Chloamphenicol monoester 가수분해에 대한 DMSO 농도 영향. Lipid-coated catalytic antibody(●); native catalytic antibody(○); spontaneous hydrolysis(□).

않는 소수성이지만, catalytic antibody가 수용계에서 안정하고 녹을 수 있기 때문에 반응은 수용계에서 수행해야만 한다. 이러한 경우, 기질의 용해도를 높이기 위해 DMSO나 에탄올과 같은 친수성 유기용매를 사용한다. 이러한 친수성 유기용매와 완충용액이 혼합된 반응계에서 catalytic antibody와 리피드 코팅된 catalytic antibody를 비교하였다[3]. 모델반응으로 chloramphenicol monoester의 가수분해반응을 수행한 결과 리피드 코팅된 catalytic antibody의 반응 속도가 native catalytic antibody에 비해 현저히 증가하였다(그림 4). 이는 native catalytic antibody가 DMSO에 불활성화가 되기 때문이며 유사한 불활성화는 다른 유기용매, acetone, acetonitrile, DMF 등에서도 관찰되었다. 결과적으로 친수성 유기용매계에서 리피드 코팅 catalytic antibody가 native catalytic antibody 보다 안정하였다.

1-3. 물과 유기용매 이상계에서 리피드 코팅된 β-galactosidase 를 이용한 transgalactosylation 반응

이상계에서 β-galactosidase를 이용한 transglycosylation 반응으로 glycoside 화합물들을 합성할 때 화학적 보호기의 수식 없이 위치특이적, 입체특이적 반응을 수행할 수 있는 장점이 있다. 그러나, 이 경우 가수분해 반응이 transglycosylation 반응보다 현저하게 빠르게 일어나므로 고수율로 glycoside 화합물들을 얻기 어렵다. 고수율로 glycoside 화합물을 얻기 위해서는 효소반응이 수용계가 아닌 소수성 유기용매계에서 효소의 불활성화 없이 transglycosylation 반응이 진행되어야 한다. 이러한 이상계에서 리피드 코팅된 β-galactosidase를 사용할 경우 native β-galactosidase에서 합성되지 않는 glycoside 화합물을 성공적으로 합성할 수 있었다[4].

한 예로 lactose와 5-phenylpentan-1-ol(HOC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>Ph)을 기질

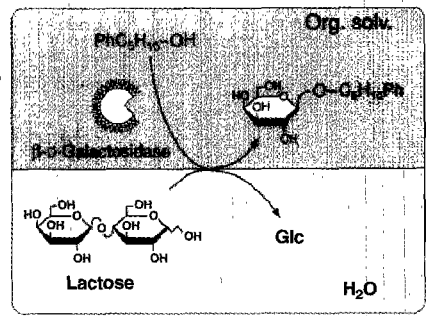
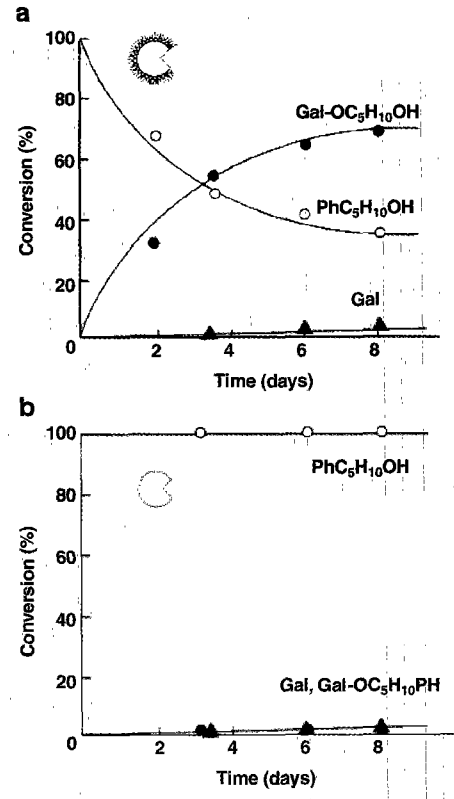


그림 5. 시간에 따른 transglycosylation 반응.

로 사용한 transglycosylation 반응을 수행한 결과, 그림 5 에서처럼 리피드 코팅된 β-galactosidase는 유기용매 계에 녹아 있으며 lactose는 물층에 존재하여 반응이 일어나 66%의 Gal-OC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>Ph를 합성하였으며 락토스는 8일이 지난 후에도 가수분해 되지 않았다(그림 5a). 또한, 합성된 Gal-OC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>Ph는 D-galactose의 β-구조를 유지하였다. 한편 native β-galactosidase의 경우 합성반응이 전혀 일어나지 않았으며 그 이유는 이상계에서 효소가 모두 불활성화가 일어났기 때문이다(그림 5b).

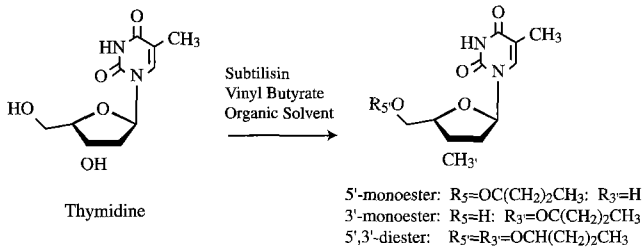
2. Enzyme imprinting 방법

상기 언급한 것처럼 효소는 수용계에서 보다 유기용매계에서 활성이 훨씬 약하다. 따라서 유기용매상에서 효소 활성화

안정성을 증가시키는 것은 중요하다. 또한, 반응의 특이성 (substrate specificity, enantio-, chemo-, regioselectivity)을 조절하는 것도 중요한 목표가 된다. 미국의 Dordick 그룹은 상기 서술한 리피드 코팅방법과 유사하게 효소를 유기용매에 녹이는 방법으로 효소가 포함된 최적의 pH의 완충용액에 surfactant를 넣어 ion pair를 형성시킨 후 유기용매로 효소-surfactant ion pair를 추출하는 방법을 개발하였다. 또한, 반응 기질과 효소를 최적반응조건에서 섞은 후 동결건조 하는 enzyme imprinting 방법을 개발하였는데 이는 유기용매계에서 효소활성을 극대화하고 효소의 선택성을 바꾸는 방법이다[6].

**2-1. Thymidine imprinted Subtilisin을 촉매로한 과 Vinyl butyrate의 아실화 반응**

아래 scheme의 반응을 모델반응으로 enzyme imprinting 방법을 연구하였다. 반응조건으로는 10mM nucleoside와 100mM vinyl butyrate가 포함된 10mL 유기용매계(Tetrahydrofuran)에 1mg의 imprinted enzyme을 넣고 30°C에서 반응하였다.



동결 건조하기 전 물에 녹아 있는 nucleoside농도 영향을 조사한 결과 효소와 기질의 무게 비 1:1로 imprinting한 경우 native 효소에 비해 약 50배의 반응속도 증가를 보였고 그 이상에서는 더 큰 증가가 없었다(그림 6).

이러한 반응속도의 증가는 반응기질의 종류에 상관없이 일어났으며 이는 반응 수율의 증가를 의미하였다(Table 1). 또한

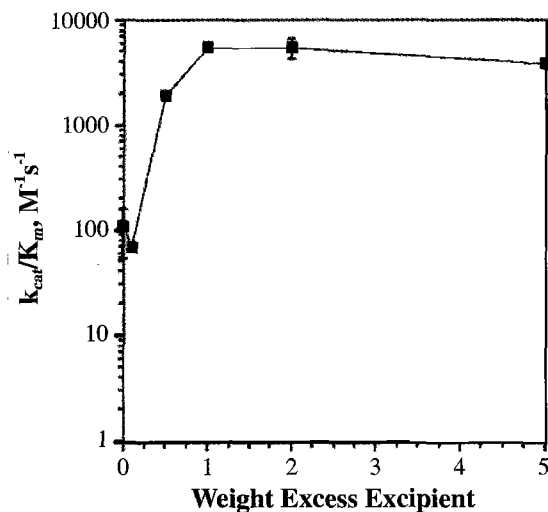


그림 6. 동결건조전 반응기질의 무게비에 따른 반응속도 영향.

생물산업

**Table 1.** Rate Enhancement of the Acylation of Thymidine with Vinyl Butyrate in THF Catalyzed by Different Subtilisin Carlsberg Preparations<sup>a</sup>

excipient	$K_{cat}/k_m$ , $M^{-1}s^{-1}$	$k_{cat}$ , $s^{-1}$	$k_m$ , mM	rate enhancement
none	104	0.694	6.66	1.00
ribose	2090	5.90	2.83	20.1
thymine	2870	13.3	4.63	27.6
thymidine	5390	26.5	4.93	51.8

<sup>a</sup>The concentration of vinyl butyrate was 100mM, the concentration range of thymidine was 0.5~20mM, and the concentration of the enzyme preparation was 0.1mg/mL (containing 0.033mg/mL subtilisin). The reactions were shaken at 300rpm at 30°C.

이러한 반응속도 증가는  $K_m$ 값의 변화와는 무관하고  $k_{cat}$  값의 증가에 따른 결과에 기인하였다. 이는 imprinted enzyme의 active site이 보다 반응성이 높아지도록 주형이 만들어졌으며 수분이 없는 유기용매계에서 그 주형으로 굳어진 상태로 유지되어 반응되기 때문이다.

**2-2. Imprinted Enzyme의 기질 특이성**

Sucrose를 imprinting한 subtilisin과 thymidine을 imprinting한 subtilisin 각각의 기질 특이성을 조사한 결과, sucrose acylation 반응의 경우 반응속도가 native subtilisin에 비해 thymidine-imprinted subtilisin이 4배, sucrose-imprinted

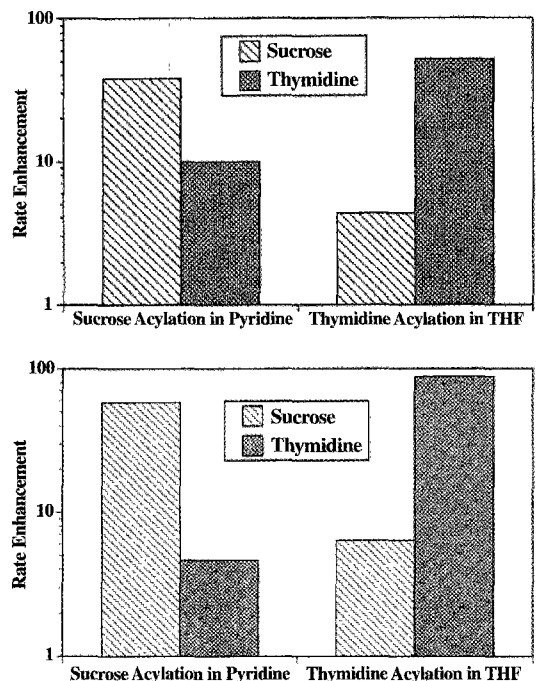


그림 7. 구조적으로 다른 nucleophilic substrate를 subtilisin Carlsberg(top)와 subtilisin BPN(bottom)에 각각 imprinting 함으로서 증가된 기질특이성.

subtilisin이 40배 증가하였다. 반대로 thymidine acylation 반응의 경우 반응속도가 thymidine-imprinted subtilisin이 52배 sucrose-imprinted subtilisin이 9배 증가한 결과를 얻었다(그림 7). 결과로부터, 구조적으로 다른 반응기질을 imprinting함에 따라 효소의 기질특이성을 현저히 바꿀 수 있었다.

**2-3. Imprinted Subtilisin의 분자 모델**

Sucrose와 thymidine 각각에 imprinting된 subtilisin BPN'의 active site의 변화를 그림 8에 나타내었다. thymidine이 결합된 tetrahedral intermediate에 관여하는 활성 잔기인 Asp<sub>32</sub>와 His<sub>64</sub>(녹색)의 위치와 sucrose가 결합된 구조에서 Asp<sub>32</sub>와 His<sub>64</sub>(녹색)의 위치가 현저히 달라짐을 알 수 있다. 그 밖의 oxyanion hole에 관여하는 Asn<sub>155</sub>(흰색)와 S<sub>1</sub>' 위치의 Met<sub>222</sub>(빨간색)의 위치는 거의 변화가 없었다. 이러한 catalytic triad (Asp<sub>32</sub>, His<sub>64</sub>)의 현저한 변화는 Table 1의 결과에서 보듯이 thymidine-imprinted subtilisin의 반응속도 증가가 k<sub>cat</sub>의 증가에 기인되는 결과(K<sub>m</sub>은 큰 변화가 없었다)를 잘 설명해 주고 있다. 따라서, imprinting에 의한 효소활성의 증가는 catalytic triad 구조의 변화에 따른 결과이며 S<sub>1</sub>' binding pocket의 변화에 의한 영향은 크지 않았다.

결론적으로 반응기질(nucleophile) 존재하에서 동결건조한 subtilisin이 유기용매에서 반응속도가 현저하게 증가되었으며 이러한 반응속도의 증가는 catalytic triad의 구조적 변화의

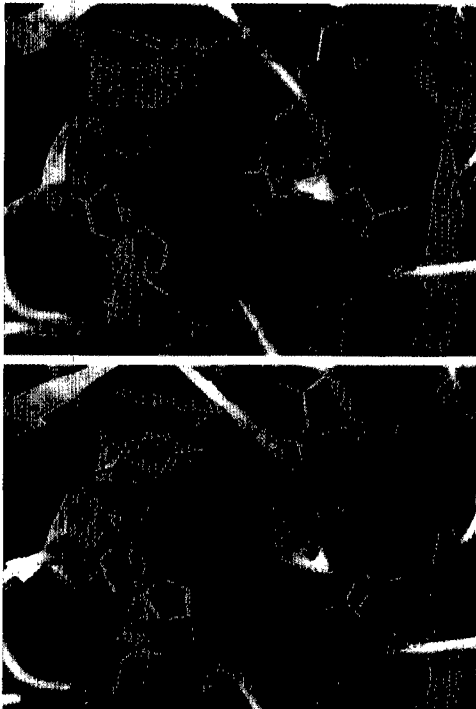


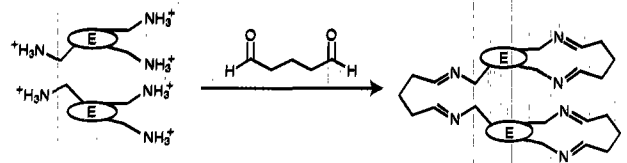
그림 8. Thymidin-imprinted subtilisin BPN' (top)과 sucrose-imprinted subtilisin BPN' (bottom)의 active site의 분자 역학 구조.

결과이며 이는 k<sub>cat</sub>의 증가를 초래하였다. 또한, enzyme imprinting을 통해 기질특이성을 변화시킬 수 있으며 이는 protein engineering, solvent engineering, catalyst engineering에 상보하여 "transition state engineering"이라는 개념으로 설명된다. 그러나 enzyme imprinting은 반응기질(imprinter)이 수용액과 유기용매 모두에 녹는 경우에만 적용되고 모든 반응에 적용되지 않는 단점이 있다.

**3. Covalent chemical Modification**

**3-1. Protein crosslinking**

단백질 바이오촉매의 실제적인 실현이 증가된 것은, 수용계 뿐 아니라 유기용매에서 안정성을 증가시키는 방법의 개발이 점차 발전하였기 때문이다. 이러한 효소의 안정성을 증가시키는 방법중의 하나는 단백질 분자 간 또는 단백질 분자 안에서 crosslinking을 유도하는 방법이다. 효소의 crosslinking을 위한 glutaraldehyde의 사용은 Quioco와 Richards[7]에 의해 첫번째로 시도 되었다(그림 9). 그들은 carboxypeptidase의 X-ray 구조 결정을 위한 효소의 안정화를 목적으로 crosslinking을 사용했다. 이러한 과정으로 생성된 crosslinked enzyme의 활성은 대부분이 손실되어 crosslinking전의 약 5%만이 남아 있게 된다. 그러나 이러한 연구는 불용성 crosslinked enzyme crystal(CLEC) 형태의 thermolysin의 개발을 촉진하게 되었다 [8]. CLEC 형태의 단백질은 미국의 벤처회사인 Altus



Current Opinion in Biotechnology

그림 9. 효소의 inter-, intra crosslinking을 통해 만들어진 CLEC 제조.

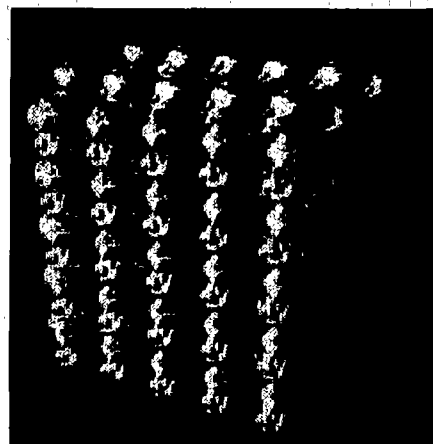


그림 10. CLEC의 구조.

Biologics사가 핵심기술로 보유하고 있다. CLEC 형태의 생물 촉매는 먼저 단백질의 결정을 유도한 후 glutaraldehyde를 처리하여 crosslinking하는 방법으로 제조되며(그림 10), 제조된 CLEC은 극한조건의 온도, pH에 안정하며, 특히, 단백질 분해 효소에 의해 가수분해되지 않으며 다양한 유기용매에서도 안정한 장점이 있다(그림 11). 이러한 장점 때문에 화학촉매보다 값비싼 생물촉매의 단점을 수십회 재사용으로 보완하게 되어 산업적으로 경쟁력있게 사용되어졌다. 실제로 라세믹 Ketoprofen을 광학분할하는 공정에 수십 회 재사용을 입증하였다(그림 12). 한편, scale-up을 위해 *Pseudomonas cepacia* lipase CLEC을 이용한 phenyl acetate(270kg)의 광학분할을 100L 반응기에서 여러 batch로 반응시킨 결과, 우수한 enantiomeric excess를 보이는 반응생성물(99% ee)을 얻을 수 있었으며 남아있는 ester 기질의 enantiomeric excess도 91~95%로 매우 높게 유지 되었다. 또한, CLEC은 단순 여과에 의해 쉽게 분리되므로 재사용시 문제가되는 효소의 손실이 거의 없었다[9].

현재까지 상용화된 CLEC의 종류는 아래 Table 2에 정리하였다. 그러나, 비록 CLEC 제조가 손쉽고 저렴한 방법으로 열, 유기용매, protease에 안정한 생물촉매를 생산하는 방법이지만 실제로 단백질의 어느 부위에 어느정도 화학반응이 일어나는지 분명하지 않으며 어떤 변화로 안정성이 증가되었는지 예측할 수 없다. 더욱이 crosslinking 후에 남아있는 효소의 active site의 수가 어느 정도 되는지 보고되지 않기 때문에 다른 단백질 화학 수식법들과 비교하기 어렵다. 또한, CLEC은 효소를 crosslinking하기 전에 효소 결정을 만들어야 한다는 단점이 있다. 왜냐하면 효소 결정화를 유발하는 조건을 찾는 것은 매우 어렵기 때문이다.

**Table 2.** Altus Biologics사가 개발하여 상용화한 CLEC의 종류.

Catalyst for the resolution of amino acids, amines, and amino acid analogs.
ChiroCLEC™-CR( <i>Candida rugosa</i> lipase) Catalyst for the resolution of alcohols, acids, and esters.
ChiroCLEC™-EC(Penicillin acylase) Catalyst for resolution of amino acids, and amines. Protection/Deprotection.
ChiroCLEC™-PC( <i>Pseudomonas cepacia</i> lipase) Catalyst for the resolution of acids, esters, and alcohols. Good for remote chiral centers.
ChiroScreen™-EH(Screening kit) Find best catalyst for resolution by ester hydrolysis.
ChiroScreen™-TE(Screening kit) Find best catalyst for resolution by acylation of alcohols or amines.
ChiroTool™+(Optimization kit) Optimize the reaction found with ChiroScreen™-EH or ChiroScreen™-TE.
PeptiCLEC™-BL(Subtilisin protease) Catalyst for racemization-free coupling of alpha amino esters to amines, amino acids, or peptides.
PeptiCLEC™-TR(Thermolysin protease) Catalyst for racemization-free coupling of alpha amino esters to amines, amino acids, or peptides.
PeptiScreen™(Screening kit) Find the best catalyst for racemization-free peptide coupling.
PeptiTool™+(Optimization kit) Optimize the peptide coupling reaction found with PeptiScreen™.
SynthaCLEC™-PA(Penicillin acylase) Catalyst for antibiotic synthesis.

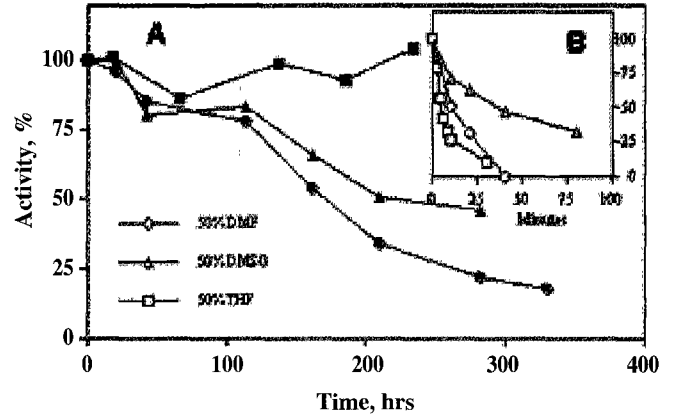


그림 11. 친수성 용매제에서 CLEC-lipase의 안정성, Native lipase(inset).

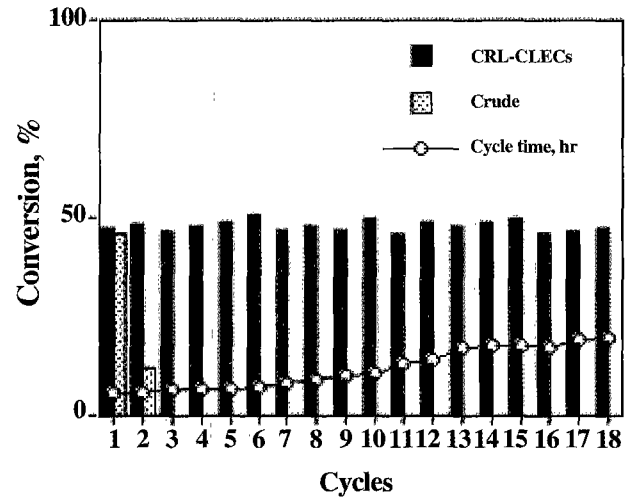


그림 12. Multicycle resolution of (S)-Ketoprofen.

이러한 단점을 보완하기 위해서 최근, 네덜란드의 Sheldon 그룹에서 cross-linked enzyme aggregate(CLEA)를 개발하였다[10]. CLEA는 효소 결정화 대신에 효소의 불활성화 없이 ammonium sulfate, polyethylene glycol, tert-butyl alcohol 등으로 효소를 침전시킨 후 형성된 aggregate에 glutaraldehyde로 crosslinking하여 제조하는 방법이다.

Sheldon 그룹에서 Penicillin acylase의 CLEA를 만들어 같은 효소의 CLEC과 비교한 결과, CLEC과 동일한 ampicillin 합성활성을 얻었으며 부가적으로 합성 반응시 유발되는 반응 기질(donor)의 가수분해가 줄어드는 장점이 있었다[10].

**3-2. Polyethylene glycol(PEG)를 이용한 Chemical modification**

Amphiphilic polymer인 PEG를 단백질에 화학적으로 결합시켜 유기용매에 녹이는 연구, antigenicity를 감소시키고 *in vivo*에서 안정성의 증대로 인한 치료용 활성 단백질의 개발에 관한 연구는 지금까지 활발히 진행되어 왔다[11]. 예를 들어, *Candida rugosa* lipase(CRL)를 4-nitro-phenylchloroformate와 cyanuric acid chloride-activated PEG를 처리한 결과, 이소옥탄에서 안정성을 증가시킬 수 있었다[12](그림 13). 4-Nitro-phenyl-chloroformate로 처리한 경우 cyanuric acid chloride로 처리한 경우보다 활성이 높았으며 두 경우 모두 가수분해 활성은 감소하고, transesterification 활성은 증가하였다.

Horseradish peroxidase(HRP)의 경우 4-nitro-phenylchloroformate-methoxymethyl-PEG(mPEG)로 수식한 결과 극한의 pH와 열에 안정하였다. 이는 mPEG에 의해 HRP 표면의 charge를 감소시킨 결과로 예측되었다[13].

또 다른 PEGylation 방법으로 nonionic amphiphilic polyoxyethylene lauryl ether(Brij35)를 사용하는 것이다(그림 14). 이와 같은 방법을 catalase에 적용시켜 유기용매인 toluene과 1,1,1-trichloroethane에 대한 용해도를 높였다. 활성을 비교했을 때 native 효소에 비해 toluene 존재 하에서 15~20배, 1,1,1-trichloroethane에서 200배의 활성증가를 보였다[14].

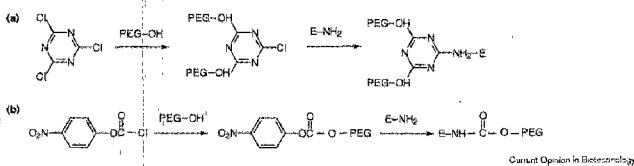


그림 13. Enzyme(E) modification with PEG activated with (a) cyanuric chloride and (b) 4-nitrophenyl chloroformate.

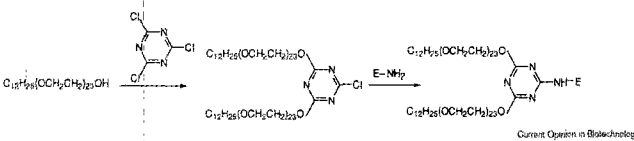


그림 14. Cyanuric chloride activated crosslinking of catalase with Brij35. E, enzyme.

그 밖의 cytochrome C의 PEGylation에 의한 기질특이성을 변화시켜 특정기질에만 적용되는 반응을 다양한 기질에도 반응이 일어날 수 있게 기질특이성을 넓힌 연구도 있었다[15].

**3-3. 여러 가지 기능기의 화학적 수식**

PEG이 외에도 다른 여러 가지 기능기를 단백질에 수식하여 그 기능성을 향상시킬 수 있었다.

**3-3-1. EDC를 이용한 glycosylation**

Prokaryote에 없는 단백질의 glycosylation을 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDC)를 사용하여 인위적으로 부과시킬 수 있다. 그림 15와 같이 unglycosylated nuclease RNase A에 EDC를 사용하여 화학적으로 D-glucosamine을 결합시켜 mono- 또는 di-glycosylated 효소를 만들어 효소활성을 조사한 결과 활성은 80% 감소하였지만 열안정성은 증가된 결과를 얻을 수 있었다[16].

**3-3-2. Diethyl para-nitro-phenyl phosphate(DPNP)를 이용한 화학적 수식**

DPNP를 이용하여 CRL을 화학적으로 수식한 결과 기질특이성을 현저히 변화시킬 수 있었다[17]. 그림 16의 결과, native CRL은 2-thio-4-dithioacetyl butyrate의 oxo-ester 또는 thio-ester 둘다 가수분해가 가능하지만 DPNP-CRL은 thioacetate만 가수분해 하였다[17].

**3-3-3. Seleno-trypsin의 제조**

Trypsin의 nucleophilic Ser195 O<sub>γ</sub>를 화학적으로 selenium (Se)으로 바꾸어 seleno-trypsin으로 만들 수 있었다(그림 17). 이러한 seleno-trypsin은 본래의 가수분해 활성이 없어지고 glutathione peroxidase 활성을 보여 아래의 반응식처럼 glutathione(GSH)의 환원반응을 촉매할 수 있었다[18-19]. Oxido-reductase enzym인 glutathione peroxidase는 매우 불

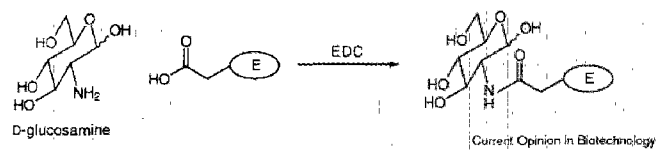


그림 15. Glycosylation using EDC mediated coupling of an enzyme(E) carboxylate of RNase A to D-glucosamine.

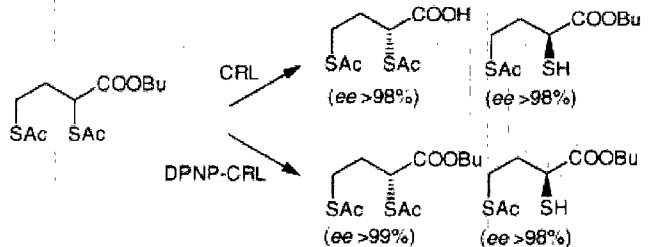
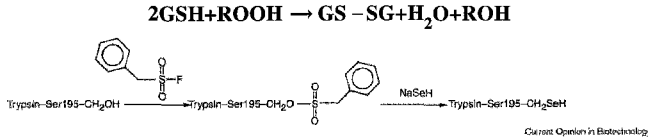


그림 16. CRL hydrolysis of 2-thio-4-dithioacetyl butyrate.



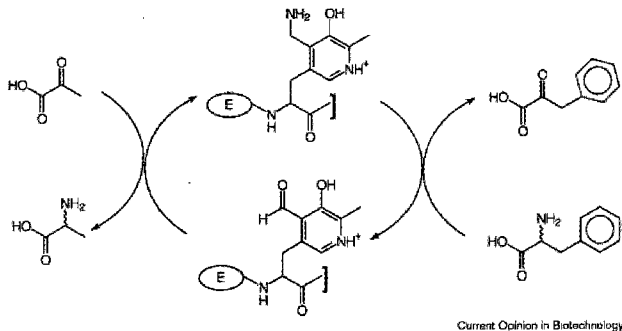
**그림 17.** Trypsin의 catalytic serine을 phenylmethyl sulfonyl fluoride로 활성화 한 후 sodium selenide로 치환시켜 seleno-trypsin을 만드는 방법.

안정하고 쉽게 얻을 수 없기 때문에 값싼 trypsin으로 유사한 반응을 해결할 수 있는 장점이 있다.

같은 방법으로 subtilisin을 seleno-subtilisin으로 만들어 thiophenol 존재 하에 racemic hydroperoxide의 광학특이적 환원을 촉매하여 광학적으로 순수한 hydroperoxide와 alcohol을 생산하였다[20]. 이러한 semisynthetic hydroperoxidase는 native HRP와 유사한 효소활성을 보였지만 반응생성물(R-hydroperoxide, S-alcohol)의 광학 활성은 native HRP로 생산한 생성물(S-hydroperoxide, R-alcohol)의 경우와 반대의 결과를 보였다. 또한, native HRP의 반응기질(hydroperoxide)은 구조적으로 제한을 받지만 seleno-subtilisin의 경우 이러한 기질의 제한이 없다. 실제로 seleno-subtilisin의 large scale 공정이 보고되었으며[21] CLEC형태의 seleno-subtilisin을 이용한 공정으로 10 회이상 반복 사용한 결과도 보고되었다[22].

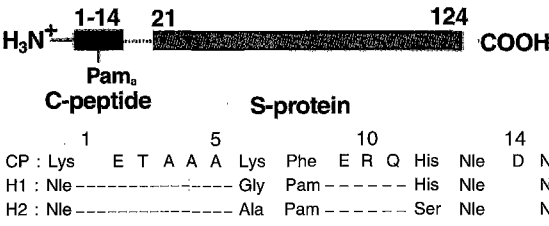
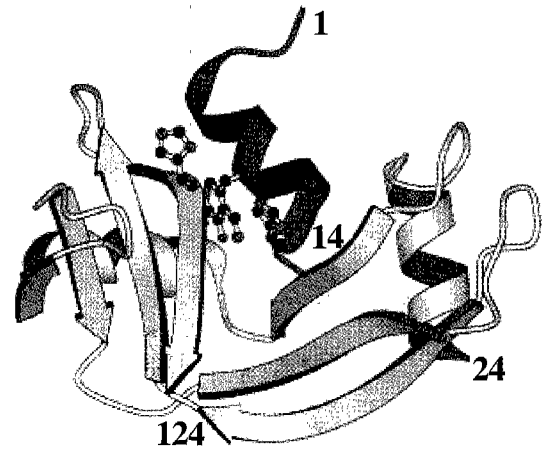
**3-4. Chemical modification에 의한 Cofactor의 도입**

효소의 cofactor를 단백질에 화학적으로 공유결합시키는 방법이 Kaiser[23] 그룹에 의해 보고되어졌다. 최근에는 그림 18에서 보듯이 solid-phase 합성방법에 의해 RNase S로부터 유도된 C-peptide(그림 19)의 Phe8 잔기를 pyridoxamine (Pam) phosphate(vitamin B6) cofactor가 결합된 unnatural 아미노산으로 치환하여 aminotransferase 활성을 모사하였다 [24]. 이렇게 재구성된 Pam-RNAase는 Cu(II)를 넣어주어 transamination 반응을 7배 높일 수 있었다. 유사하게 copper (II)-phenanthroline 복합체(그림 20)를 지방조직의 지질 결합 단백질(adipocyte lipid-binding protein, ALBP)의 cysteine잔기에 disulfide 결합하여 펩타이드 가수분해반응을 수행한 연구도 보고되었다[25].

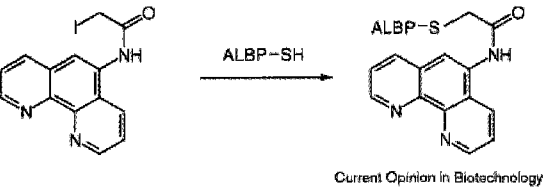


**그림 18.** Pyruvate과 phenylalanine을 반응기질로 Pyridoxamine chimera 촉매의 transamination 반응에 의한 alanine생산.

생물산업



**그림 19.** PRNase S의 구조. native C-peptide(CP)의 1차구조와 Pam-analog(H1, S1)의 1차구조.



**그림 20.** ALBP에 Phenanthroline의 화학적 결합.

**3-5. Combined site-directed mutagenesis chemical modification**

최근, 단백질의 특정부위를 위치특이적 돌연변이(site-directed mutagenesis)방법으로 변위시킨 후, 그 부위를 다시 화학적으로 수식하여 비천연 아미노산을 도입하여 단백질에 독특한 성질을 부여하는 연구가 활발히 진행되고 있다[26-29]. 이러한 위치특이적 돌연변이 방법과 화학적 수식의 조합을 통해 alkaline serine protease인 subtilisin *Bacillus lentus*(SBL)의 효소특성을 바꾼 예가 있다[30]. 위치특이적 돌연변이 방법으로 SBL의 중요한 active site에 하나의 cysteine잔기를 부여한 후 methanethiosulfonate(CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>S-R)로 thioalkylation 반응을 수행하여 화학적으로 수식된 돌연변이 효소(chemically modified mutant enzymes, CMMs)를 만들었다(그림 21). Methanethiosulfonate은 특이적이고 정량적인 결합을 수행할 수 있기 때문에 단백질의 다른 기능기에는 반응하지 않는 장점이 있다[31-32]. 또한, SBL은 natural cysteine을 포함하지 않기 때문에 이상적인 모델이 된다.



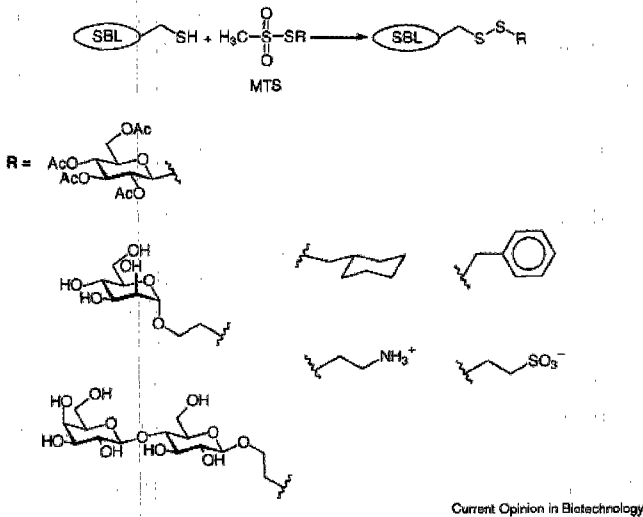


그림 21. SBL cysteine 돌연변이 단백질과 methanethiosulfonate (MTS)의 화학 결합.

이러한 전략을 통해 SBL의 특이성이 조절되었다. 실험결과 R-그룹이 증가함에 따라 효소의  $k_{cat}/K_M$ 이 증가하였다. side chain의 R 그룹이 R =  $-CH_2-c-C_6H_{11}$ 일 때 가장 높은 활성을 보였으며 wild 효소와 비교할 때 3배의 활성이 증가하였다[33].

이러한 CMM에 관한 연구는 단백질에 다양한 glycosylation을 유발하여 CMM 라이브러리를 생성할 수 있으며 이를 통해 효소활성이 가장 높아진 CMM을 탐색할 수 있었다[34-36]. 또한 상기에 언급한 cofactor의 도입도 보다 손쉽게 수행할 수 있다[37].

### 효소 제제화 기술 전망

SRI 컨설팅사에 의하면 1998년 fine chemicals의 전세계 매출액은 \$50 billion이고 그 중에 의약품과 농약용이 각각 \$25 billion과 \$10 billion을 차지한다고 보고하였다. 이러한 의약품 회사가 원하는 화합물은 single-isomer 중간체이며 이러한 중간체는 결국 single-isomer active ingredients 제조에 사용된다. 또한, IMS Health사에 의하면 1998년 의약산업에 신규등록된 화합물 44가지 중 32가지 화합물이 single-isomer이고 11가지가 achiral 화합물이고 나머지 1가지가 racemate으로 보고하였다.

역사적으로, single-isomer 합성은 고비용의 많은 시간을 요하는 공정이었으며 효소의 한계 때문에 fine chemical 생산에 사용되지 않았다. 그러나 최근 유전공학과 효소를 안정화시키는 효소 제제화기술의 발전으로 화학 공정에 요구되는 유기용매 또는 여러 온도와 pH에 안정한 효소가 손쉽게 공급될 수 있게 되었다.

최근 DSM, Lonza, Avecia사는 생물촉매가 가져다 줄 이익을 인식하고 자사에 효소공정을 수행할 설비를 갖추었으며, 또

한 많은 회사들이 화학공정을 효소공정으로 전환하고 있다. Bayer사는 fine chemical의 6~7%를 화학공정에서 효소공정으로 전환할 계획을 세웠으며 BASF사는 세계에서 가장 큰 chemoenzymatic한 방법으로 합성되는 중간체 생산설비를 만들 계획을 수립하였다. 이들 회사들은 초기에는 효소 전문 회사들에 기술용역을 주어 화학 중간체들을 개발하고 있다. 효소 전문 회사로는 Altus Biologics, Diversa, BioCatalytics, Nippon Shokubai, ThermoGen, Maxygen사들이 있다. 이중 Altus Biologics, BioCatalytics, Nippon Shokubai사는 효소제제화 기술을 통한 카이랄 중간체 생산을 전문으로 하는 기업이다.

최근 개발된 효소제제화 기술의 산업적 응용동향으로는 먼저 Altus Biologics사의 CLEC 기술을 들 수 있는데 이 회사는 이미 1996년에 Novartis사, Glaxo사 등의 제약회사와 기술 이전 계약을 체결하였고 최근 정부기관으로부터 100만\$의 자본금을 받았다. 또한, Dordick그룹(Rensselaer Polytechnic Institute)과 Clark 그룹(University of California, Berkeley)에서 공동 개발한 salt-surfactant ion pair를 이용한 유기용매내에 효소를 녹이는 기술은 BioCatalytics사와 기술협약을 체결하였다. 또한, 네덜란드의 Sheldon그룹에서 개발한 CLEA 기술은 ampicillin 합성기술에 성공적으로 응용되고 있다.

### 결론

유기용매에서 효소반응에 관한 연구가 진보함에 따라 새로운 효소제제공정의 진보가 있었으며 이러한 제제 공정은 제노믹스나 프로테오믹스 등 새로운 학문의 진보에 따라 계속적으로 새로운 개발이 이어질 것이다. 상기 언급한 리피드 코팅 효소는 효소의 불활성화 없이 유기용매계에 녹일 수 있으며 다양한 효소반응에 이용할 수 있다. 또한, 유기용매에 녹아 있는 리피드 코팅된 효소를 이용하여 얇은 막의 효소 필름을 만들 수 있으며 이는 수용계에 녹지 않는 바이오 센서막으로 사용될 수 있다[5].

단백질에 crosslinking 또는 다른 monomeric 또는 polymeric 기능기를 부여하여 화학적 수식(chemical modification)을 하는 방법은 신속하고 저렴한 방법으로 효소의 안정성과 반응성을 증가시킬 수 있다. 또한, 이러한 방법의 발전은 전통적인 돌연변이 방법에 의해 얻을 수 없는 기능기들을 단백질에 부여할 수 있는 장점이 있다.

지금까지 화학적 수식방법의 단점은 효소반응의 반응성과 위치특이성의 조절이 자유롭지 못한 점이었으나, 최근 site-directed mutagenesis와 chemical modification의 조합된 다양한 CMM 라이브러리를 만들 수 있게 되었으며 이에 관한 연구가 빠르고 다양한 전략으로 새롭게 개발되고 있다.

## 참고문헌

1. Klibanov, A. M. 2000. *Trends Biotechnol.* **18**: 85-86.
2. Okahata, Y., Y. Fujimoto, and K. J. Ijro. 1995. *Org. Chem.* **60**: 2244-2250.
3. Okahata, Y., M. Yamaguchi, F. Tanaka, and I. Fujii. 1995. *Tetrahedron* **51**: 7673-7680.
4. Mori, T., S. Fujita, and Y. Okahata. 1997. *Carbohydr. Res.* **298**: 65-73.
5. Okahata, Y., T. Tsuruta, K. Ijro, and K. Ariga. 1988. *Langmuir* **4**: 1373-1375.
6. Rich, J. O. and J. S. Dordick. 1997. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 3245-3252.
7. Quioco, F. A. and F. M. Richards. 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **52**: 833-839.
8. St Clair, N. L. and M. A. Navia. 1992. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 7314-7316.
9. Collins, A. M., C. Maslin, and R. J. Davis. 1998. *Org. Process Res. Dev.* **2**: 400-406.
10. Cao, L., F. van Rantwijk, and R. A. Sheldon. 2000. *Org. Lett.* **2**: 1361-1364.
11. Lundbland, R. L. and R. A. Bradshaw. 1997. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **26**: 143-151.
12. Hernaiz, M. J., J. M. Sanchez-Montero, and J. V. Sinisterra. 1997. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 252-260.
13. Garcia, D., F. Ortega, and J. L. Marty. 1998. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **27**: 49-54.
14. Jene, Q., J. C. Pearson, and C. R. Lowe. 1997. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 69-74.
15. Tinoco, R. and R. Vazquez-Duhalt. 1998. *Enzyme Microb. Technol.* **22**: 8-12.
16. Baek, W. O. and M. A. Vijayalakshmi. 1997. *Biochim. Biophys. Acta* **1336**: 394-402.
17. Fadnavis, N. W., R. L. Babu, S. K. Vadivel, A. A. Deshpande, and U. T. Bhalerao. 1998. *Tetrahedron Asymmetry* **9**: 4109-4112.
18. Wu, Z. P. and D. J. Hilvert. 1989. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 4514-4515.
19. Liu, J. Q., M. S. Jiand, G. M. Luo, G. L. Yan, and J. C. Shen. 1998. *Biotechnol. Lett.* **20**: 693-696.
20. Haring, D., E. Schuler, W. Adam, C. R. Saha-Moller, and P. Schreier. 1999. *J. Org. Chem.* **64**: 832-835.
21. Haring, D. and P. Schreier. 1998. *Biotechnol. Bioeng.* **59**: 786-791.
22. Haring, D. and P. Schreier. 1998. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**: 2471-2473.
23. Kaiser, E. T. 1988. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**: 913-922.
24. Sinha Roy, R. and B. Imperiali. 1997. *Protein Eng.* **10**: 691-698.
25. Davis, R. R. and M. D. Distefano. 1997. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 11643-11652.
26. Bech, L. M. and K. Breddam. 1988. *Carlsberg Res. Commun.* **53**: 381-393.
27. Smith, H. B., Larimer, F. W. and F. C. 1988. Hartman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**: 579-584.
28. Foong, L. Y., S. You, D. C. Jaikaran, Z. Zhang, V. Zunic, and G. A. Woolley. 1997. *Biochemistry* **11**: 1343-1348.
29. Gron, H., L. M. Bech, S. Branner, and K. Breddam. 1990. *Eur. J. Biochem.* **194**: 897-901.
30. DeSantis, G., P. Berglund, M. R. Stabile, M. Gold, and J. B. Jones. 1998. *Biochemistry* **37**: 5968-5973.
31. Smith, D. J., E. T. Maggio, and G. L. Kenyon, 1975. *Biochemistry* **14**: 766-771.
32. Kice, J. L., T. Rogers, and A. C. Warheit. 1974. *J. Am. Chem. Soc.* **96**: 8020-8026.
33. Berglund, P., G. DeSantis, M. R. Stabile, X. Shang, M. Gold, R. R. Bott, T. P. Graycar, T. H. Lau, C. Mitchinson, and J. B. Jones. 1997. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 5265-5266.
34. Davis, B. G., R. C. Lloyd, and J. B. Jones. 1998. *J. Org. Chem.* **63**: 9614-9615.
35. Plettner, E., K. Khumtaveeporn, X. Shang, and J. B. Jones. 1998. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **8**: 2291-2296.
36. Lloyd, R., M. Dickman, and J. B. Jones. 1998. *Tetrahedron Asymmetry* **9**: 4099-4102.
37. Kuang, H. and M. D. Distefano. 1998. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 1072-1073.