자연의 합성 전략을 실험실로 옮겨온 효소 연속단계반응 연구동향

한국화학연구워 송재광 박사

개요

가장 효율적인 화학공장은 생명체이다. 생명체가 발휘하는 최상의 효율은 오랜 시간 진화하며 최적화된 '자연의 합성 전략'에서 비롯된다. 이러한 자연 합성 전략은 다음 3 가지 기본 원리에 바탕을 두고 있다. 촉매(catalyst)로서 효소(enzyme)를 사용하고, 생합성 경로의 효소들이 세포 소기관이나 세포 구획(compartment)에 분리되어 있으며, 복잡한 생합성 경로에서 순차적으로 효소가 사용되고 조정된다는 점이다. 자연에서 발휘되는 정교하고 효과적인 합성 전략을 인공적인 생촉매작용(biocatalysis)으로 구현하려면 이러한 근본적인 양상을 폭넓고 깊게 이해하고 가공할 수 있어야 한다.

수많은 화학반응에서 촉매 작용을 할 수 있는 효소의 적절한 선택, 효소의 생산, 효소 촉매 작용의 특이성, 선택성, 안정성에 관한 공학기술은 화학물질의 인공 생합성을 위한 핵심기술로서 수많은 연구결과가 끊임없이 보고되고 있다 (Reetz, 2013). 생명체에서 발견되는 효소의 구획화는 생촉매 작용에 관한 연구개발 분야에서 다양한 효소고정화, 제제화 기술로 모방되고 있다 (Sheldon & van Pelt, 2013; Barbosa et al., 2015). 이 글에서는 자연 합성 전략의 3번째 근본적 측면이었던, 때로는 매우 복잡한생합성 경로에서 일어나는 순차적 효소 작용을 모방한 인공적인 효소 연속단계반응에 관하여 살펴보고자 한다. 지금도 끝없는 진화 과정에 있는 생명체의 세포에는 효소들의 연속 작용으로 단순한 출발물질에서 복잡한 구조물을 짓고, 에너지를 만들어 사용하거나 저장하고, 주변과 소통하여 생존하고 있다. 수천 개의 화학반응이 수행되는 복잡하고 정교한 '물질 대사 네트워크'는 수많은 효소가 만들어내는 결과물이다. 물질 대사 네트워크에서는 어떤 효소의 촉매 작용으로 생성된 물질은 다음 어떤 효소의 기질이 됨으로써, 필수적인 복잡성의 빠른 달성, 반응 평형의 이동, 작용 억제의 해소가 가능해진다.

효소 연속단계반응의 설계

보고되고 있는 대부분의 연구 결과는 동일 반응기(one-pot)에서 동시에 작용하는

여러 효소들의 반응시스템이지만, 서로 다른 시점에서 순차적으로 투입되는 여러 효소의 촉매 반응(Martín del Campo et al., 2013), 하나의 효소에 의한 물질 변환으로 촉발되는 연속된 자발 반응(Wang et al., 2013)을 효소 연속단계반응의 설계에 고려할 수 있다.

여러 효소 촉매작용들이 동시에 이루어지는가 일시적으로 따로 일어나는가에 관계없 이. 효소 연속단계반응의 'one-pot' 시스템이 제공하는 명백한 장점은 중간체 화합물 의 준비와 정제 단계를 배제핚으로써 화학 용매, 에너지, 설비 및 제조 시간의 소모를 줄이는 제조 공정의 단순화에 있다 (Bruggink et al., 2003). 효소 연속단계반응을 이 용하는 one-pot 화합물 전환에서는 최종 산물의 생성까지 잇따라 일어나는 효소 촉매 작용으로 발생될 수 있는 유독하거나 불안정한 중간체 화합물이 곧바로 다른 효소에 의해 소비됨으로써 더 안전한 제조과정과 원치않는 부산물의 발생 억제가 이루어짐 수 있다. 또한 특정 단계의 효소 촉매작용이 가역적 전환반응을 일으키더라도 열역학적으 로 유리한 뒤따르는 효소 반응으로 물질의 변화이 비가역적으로 완료되어 원하는 산물 을 제조할 수 있다. 본질적으로 서로 다른 많은 효소들은 화학촉매보다 좁은 범위의 작동 조건을 가지고 있고, 때로는 최적 반응 조건까지 공유할 수 있어 연속단계반응에 화학촉매보다 적합한 촉매가 될 수 있다. 또한 꽤 많은 수의 효소 촉매작용에는 보조 인자(cofactor)가 필요한데, 최근 활발히 연구개발되고 있는 보조인자 재생시스템을 효 소 연속단계반응에 포함시킴으로써 몇 개의 반응을 결합할 수 있는 기회가 되기도 하 였다 (Kara et al., 2014), 따라서, 여러 생촉매 작용은 다양한 목적으로 많은 다른 방 식으로 결합되어 왔으며, 그림 1과 같은 연속단계반응의 4가지 원리로 설계되어졌다.

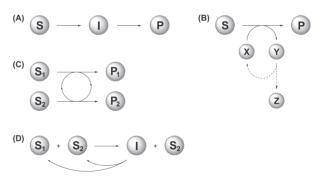


그림 1. 연속단계반응의 일반적인 설계전략

(A) 선형 연속단계반응 (B) 직교 연속단계반응 (C) 병렬 연속단계반응 (D) 순환 주기형 연속단계반응 가장 간단한 방식의 설계는 단일 기질을 하나 또는 여러 중간체를 거쳐 단일 생성물로 전환하는 것이다. 여러 효소 촉매작용 반응, 화학적 작용과 효소 촉매작용이 혼합된 반응, 어떤 효소로 촉발되는 자발 반응이 포함되며, 동적 반응속도론적 분할반응 (dynamic kinetic resolution)도 가능하다. 가역적으로 상호전환되고 있는 거울상 이성질체 기질에서 특정 이성질체만을 입체적으로 안정한 생성물로 전환하는 비가역적 효소 연속단계반응을 설계할 수 있다. 최근 연구의 사례에서도 laccase/TEMPO 반응과 alcohol dehydrogenase(ADH) 촉매작용의 연속단계반응을 설계함으로써 베타-키랄 알코올(rac-1)의 동적 이성질체 분할반응이 one-pot에서 가능하였다 (그림 2).

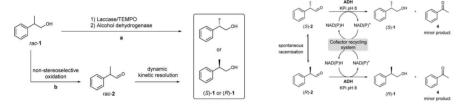


그림 2. 효소 연속단계반응에 의한 rac-2-phenyl-1-propanol의 동적 반응속도론적 분할 (Díaz-Rodríguez et al., 2015)

(a) ADH 환원작용을 촉진하는 pH 변화가 포함되는 2단계 one-pot 반응으로서 ADH의 종류에 따라 특정 이성질체 산물이 생성됨, (b) 알데히드 중간체의 분리가 요구되는 2단계 two-pot 반응.

산화-화원 중립 효소 연속단계반응

병렬적 효소 연속단계반응에서 보조인자 재생단계의 문제점은 여러 방식으로 보고되어 왔다. 원하는 화합물까지 기질이 전환하는 과정에 필요한 반응이지만 합성되는 화합물과는 관련이 없는 보조적 재생반응을 결합하는 대신에, 최근에는 추가적인 이익과합성의 중요성이 기대되는 2차 반응의 설계를 통하여 보조인자 요구성을 충족하는 연구도 활발히 시도되고 있다 (Bisogno et al., 2010). 비대칭 sulfoxidation 또는 거울상이성질체 선택적 Baeyer-Villiger 산화 반응을 알코올의 반응속도론적 분할반응과 결합하였다. NADPH 보조인자의 최소한의 농도로 사용하여도 상당한 수준의 키랄 알코올을 키랄 설폭사이드(sulfoxide), 키랄 케톤과 함께 얻어내었다. 이처럼 보조인자와 2차반응 기질를 효과적으로 사용하는 장점이 있지만, 2종 이상 생성된 산물의 분리와관련된 후속 공정에서 불리한 경우가 있었다 (García-Junceda et al., 2015). 알코올의 산화반응과 후속 단일산소화반응을 적용하여 cyclohexanol로부터 cyclohexanone을 거쳐 카프로락톤을 합성하는 ADH, Baeyer-Villiger 산화효소의 연속단계반응(그림 3)연구가 보고된 것을 비롯하여, 산화-화원 반응의 결합을 통한 유용산물의 제조와 보조

인자의 반응 내 재생에 관한 연구가 계속하여 보고되고 있다 (Köhler and Turner 2015).

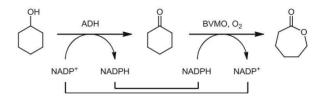


그림 3. 산화-환원 중립형 효소 연속단계반응을 통한 카프로락톤 합성

선형, 병렬 설계의 조합을 통하여 산화-환원 중립적인 선형 연속단계반응이 가능하다. 많은 화합물 합성 전략이 보고되었지만, 보조 인자 NADH의 내부 재생과 함께 에탄올과 CO2로부터 L-lactate를 합성하는 ADH, pyruvate decarboxylase, lactate dehydrogenase의 연속단계반응은 간단한 재생가능형 탄소자원으로부터 유용 화합물을 제조하는 좋은 시도가 되었다 (Tong et al., 2011). 원하는 방향의 물질 변환을 이끌어내기 위하여 과량의 carbonate 사용과 에탄올의 지속적인 첨가가 필요하였지만, 이런 개념의 효소 연속단계반응의 관심이 높아지고 있다.

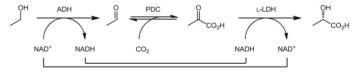


그림 4. 산화-화원 중립형 효소 연속단계반응을 통한 L-latate 합성

효소 연속단계반응을 통한 대사경로 재구성

효소 연속단계반응으로 재구성된 생체외 대사경로는 대사 흐름의 조절이 직접적으로 이루어질 수 있으며, 새로운 목표 화합물로 전환이 용이하다. 세포 추출물의 열 처리만으로 용이하게 얻어낼 수 있는 고온 안정성 효소를 이용하거나 (Liao et al., 2012), 다양한 탄수화물 원료로부터 복잡한 대사경로를 거쳐 수소를 만들어내는 것(Zhu et al., 2012)을 비롯하여 생체외 대사경로반응의 최근 일부 사례는 생명체 세포에서 일어나는 대사 물질의 전환과 비교될 수 있는 수준이다 (Zhang, 2015). 생체외 대사경로 재구성 반응을 포함한 효소 연속단계반응을 미생물 세포의 전환반응과 비교하였을

때, 높은 반응 수율, 빠른 반응속도, 유독 화합물과 생성물에 대한 저항성, 합성 경로 변경의 다양성, 효소들의 구획화와 기질 채널링기법의 용이성 등 다양한 관점에서 전 망이 밝은 기술이다 (Rollin et al., 2013).

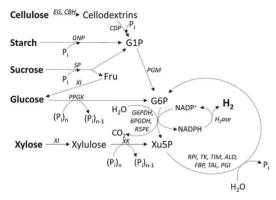


그림 5. 다양한 탄소자원으로부터 효소 연속단계반응을 통한 수소 전환 경로

전화반응에 참여하는 화학종의 in situ 합성이 결합된 연속단계반응

채택된 반응조건에서 불안정하거나 효소 기능과 안정성에 해로운 화학종(chemical species)을 in situ 발생하도록 설계함으로써 유해 화학종을 즉시 다른 기질과 반응하는 수준의 낮은 농도로 유지할 수 있다. 여러 종류의 monoterpene의 에폭시화반응에 필요한 과산화산(peroxyacid)을 반응기 내에서 과산화수소로부터 lipase 효소작용으로 발생시켰으며, 과산화수소도 수소와 팔라듐 금속에 의한 anthraquinone의 환원반응, 광화학 반응, peroxidase 촉매작용에 의하여 in situ 발생하는 화학반응 연계 효소 연속반응이 가능하였다 (Ranganathan et al., 2015). 이와 같이 과산화산을 lipase 촉매작용으로 반응기 내에서 발생시키는 방법은 azoxybenzene, butyrolactone 등 다양한 화합물 합성에 응용되고 있다. 또한 pyrimidine nucleoside diphosphates와 같이 효소 촉매작용에 의한 최종 산물의 합성에 필요한 고가의 화학종을 값싼 원료에서 효소반응으로 얻어낼 수 있을 경우, 필수 화학종의 in situ 합성과 최종 산물 합성이 결합된 효소연속단계반응이 고안될 수 있었다 (Valino et al., 2015).

인공적인 구성된 촉매 연속단계 반응은 화합물 합성에 매우 쓸모가 있는 전략이지만, 실제 적용에 있어 해결해야할 문제들이 남아 있는 경우가 많다. 자연 합성 전략의 반 응촉매인 효소를 사용함에 있어 가장 인상적인 결과들은 공학적으로 개량된 미생물 전 체 세포 단위의 발효와 전환, 더 나아가 연계된 화학반응을 통하여 가시화되어 왔다. 현재 공업적 화학물질 제조에 널리 이용되는 기존 화학반응 전략 또는 미생물 기반 물 질합성 전략과 연계됨으로써 효율성과 실현 가능성이 더 높아질 수 있는 효소 연속단계반응은 수율, 선택성, 비용, 환경 측면의 명백한 장점을 지니고 있다. 최근 화학물질의 생물 합성에 관한 높은 관심과 필요성에 대한 공감대가 더욱 확산되고 있으며, 활발하게 연구되고 있는 효소 연속단계반응기술을 통하여 가장 고도화된 자연 합성 전략이 실험실과 공업적 응용에서 실현될 수 있을 것으로 기대된다.

효소 연속단계반응 연구개발 결과가 최종적으로 효과적인 화합물 제조기술로 활용되기 위해서는 전후방 기술의 발전과 상호연계된 통합기술이 효과적인 구현이 매우 중요하다

review (Muschiol et al., 2015)

참고문헌

Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. Biotechnol Adv. 2015, 33:435-456.

Bisogno FR, Rioz-Martinez A, Rodriguez C, Lavandera I, de Gonzalo G, Pazmino DET, Fraaije MW, Gotor V. Oxidoreductases working together: concurrent obtaining of valuable derivatives by employing the PIKAT method. ChemCatChem 2010, 2:946-949.

Díaz-Rodríguez A, Ríos-Lombardía N, Sattler JH, Lavandera I, Gotor-Fernández V, Kroutil W, Gotor V. Deracemisation of profenol core by combining laccase/TEMPO-mediated oxidation and alcohol dehydrogenase-catalysed dynamic kinetic resolution. Catal Sci Technol. 2015. 5:1443-1446.

García-Junceda E, Lavandera I, Rother D, Schrittwieser JH. (Chemo) enzymatic cascades-Nature's synthetic strategy transferred to the laboratory. J Mol Catal B Enzym. 2015, 30:114:1-6.

Kara S, Schrittwieser JH, Hollmann F, Ansorge-Schumacher MB. Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. Appl Microbiol Biotechnol. 2014.

98:1517-1529.

Köhler V, Turner NJ. Artificial concurrent catalytic processes involving enzymes. Chem Commun (Camb). 2015, 51:450-464.

Liao H, Myung S, Zhang YH. One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphate glucokinase from Thermobifida fusca YX: glucose-6-phosphate generation without ATP. Appl Microbiol Biotechnol. 2012, 93:1109-1117.

Mallin H, Wulf H, Bornscheuer UT (2013) A self-sufficient Baeyer-Villiger biocatalysis system for the synthesis of ε-caprolactone from cyclohexanol. Enzym Microbiol Technol 53:283-287.

Martín del Campo JS, Rollin J, Myung S, Chun Y, Chandrayan S, Patiño R, Adams MW, Zhang YH. High-yield production of dihydrogen from xylose by using a synthetic enzyme cascade in a cell-free system. Angew Chem Int Ed Engl. 2013, 52:4587-4590.

Muschiol J, Peters C, Oberleitner N, Mihovilovic MD, Bornscheuer UT, Rudroff F. Cascade catalysis—strategies and challenges en route to preparative synthetic biology. Chem Commun (Camb). 2015. 51:5798-5811.

Ranganathan S, Gartner T, Wiemann LO, Sieber V. A one pot reaction cascade of in situ hydrogen peroxide production and lipase mediated in situ production of peracids for the epoxidation of monoterpenes. J Mol Catal B Enzym. 2015, 114:72-76

Reetz MT. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. J Am Chem Soc. 2013, 135:12480-12496.

Rollin JA, Tam TK, Zhang YHP. New biotechnology paradigm: cell-free biosystems for biomanufacturing. Green Chem. 2013, 15:1708-1719.

Sheldon RA, van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chem Soc Rev. 2013, 42:6223-6235.

Tong X, El-Zahab B, Zhao X, Liu Y, Wang P. Enzymatic synthesis of L-lactic acid from carbon dioxide and ethanol with an inherent cofactor regeneration cycle. Biotechnol Bioeng. 2011, 108:465-469.

Valino AL, Iribarren AM, Lewkowicz E. New biocatalysts for one pot multistep enzymatic synthesis of pyrimidine nucleoside diphosphates from readily available reagents. J Mol Catal B Enzym. 2015, 114:58-64.

Wang B, Land H, Berglund P. An efficient single-enzymatic cascade for asymmetric synthesis of chiral amines catalyzed by ω -transaminase. Chem Commun (Camb). 2013, 49:161-163.

Zhang YH. Production of biofuels and biochemicals by in vitro synthetic biosystems: Opportunities and challenges. Biotechnol Adv. 2015, 33:1467-1483.

Zhu Z, Sun F, Zhang X, Zhang YH. Deep oxidation of glucose in enzymatic fuel cells through a synthetic enzymatic pathway containing a cascade of two thermostable dehydrogenases. Biosens Bioelectron. 2012, 36:110-115.