

효소를 이용한 아실화 반응의 최근 동향과 전망

박오진[†]

연변대학 과학기술학원 생물화학부
중국 길림성 연길시 조양가 3458

(2013년 8월 14일 접수, 2013년 10월 11일 수정본 접수, 2013년 10월 17일 채택)

Recent Developments and Prospects in the Enzymatic Acylations

Oh-Jin Park[†]

Department of Biological and Chemical Engineering, Yanbian University of Science and Technology,
3458 Chaoyang St. Yanji City, Jilin Province 133000, China

(Received 14 August 2013; Received in revised form 11 October 2013; accepted 17 October 2013)

요 약

가수분해 효소(혹은 아실전이효소)를 이용한 알콜과 아민의 아실반응은 에스터의 가수분해 반응(hydrolysis, deacylation)과 더불어 효소를 이용한 유기합성 반응에서 이미 잘 확립된 기술로서, 산업체에서 제약의 합성이나 고분자의 합성에서 널리 응용되고 있다. 이러한 효소를 이용한 아실화 반응은 주로 열역학적인 제한으로 인해 그동안 대부분이 주로 유기 용매에서 이루어지고 있다. 최근 들어서, 수용액에서 아실화반응을 전이효소를 이용하여 효율적으로 할 수 있다는 보고와 함께 그 반응 기제에 대한 연구들이, X-ray 구조와 이러한 반응을 가능하게 하는 효소의 단백질 서열 비교 연구, 그리고 계산 화학에 의한 효소의 설계 연구들을 통해 새롭게 밝혀지고 있다. 본 총설에서는 효소를 이용한 아실화반응을 유기용매와 수용액에서의 수행함에 있어서 장단점을 비교해 보면서, 앞으로의 전망도 함께 제시하고자 한다. 특별히 다양한 천연물들의 구조 변화에 아실화 반응 생체촉매를 사용할 수 있는 가능성에 대해 살펴볼 것이다.

Abstract – Enzymatic acylations catalyzed by hydrolytic enzymes, along with enzymatic hydrolysis, are established reactions in the synthesis of fine chemicals such as chiral intermediates and polymerizations in the industry. Those reactions have been carried out mostly in organic media due to the thermodynamic limitations. Recently, there have been reports on enzymatic acylations in aqueous media. They have dealt with the elucidation of reaction mechanisms of hydrolases and acyl transferases based on their X-ray structures, homology comparison of the two kinds of enzymes, substrate engineering of acyl donors and computational design of acyl transferases for enzymatic acylations in aqueous media. Enzymatic acylations play an important role in the combinatorial synthesis of natural products such as polyketides and nonribosomal peptides. In this review, the historic developments of enzymatic acylations and industrial examples are described briefly. In addition, recent developments of enzymatic acylations in the modification of natural products and their prospects will be discussed.

Key words: Enzymes, Biocatalysis, Acylations, Regioselectivity, Natural Products, Combinatorial Biosynthesis

1. 서 론

효소를 이용하여 유용한 화학제품을 합성하는 기술(biocatalysis)은 최근 학계뿐 아니라 산업계에서도 많은 관심을 모으고 있다. 과거 20~30년 동안 화학자들은 효소가 가지는 장점들(상온-상압반응, 다단계의 보호기 도입과 탈리 없이 반응이 가능함, 위치선택성(regioselectivity), 화학기능기선택성(chemoselectivity), 이성질체선택성(enantioselectivity, stereoselectivity))을 이용하여 많은 연구와 노력을 기울인 결과, 이제 생체촉매 기술을 유기 합성의 교과 내용으로

새로이 추가해야 한다는 주장도 등장하고 있다[1-3]. 생체촉매기술은 녹색화학의 조건들을 잘 만족시키는 특징으로 인해 지속가능 성장을 위한 중요한 기술로 인식되고 있으며, 지난 20년간의 발전과 더불어 앞으로 그 성장 가능성이 기대가 되고 있다[4-9]. DNA 재조합기술의 발전으로 heterologous expression에 의한 단백질의 대량 생산이 가능함에 따라, 더 효율적이고 다양하며 값싼 효소들을 얻을 수 있게 되고, 다양한 유기반응에 사용할 수 있는 효소들을 제약회사에서 공급하고 있다. 또한 분자생물학에서의 많은 진보를 통해 *in vitro* protein engineering 기술(*in vitro* directed evolution, 정향진화)과 고속스크리닝기술(high throughput screening, HTS)의 등장으로, 목적에 맞는 효소를 개량할 수 있게 됨에 따라[10-13], 효소를 이용한 합성 기술은 정밀화학제품뿐 아니라 생물연료나 화학제품의 생

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: parkojs@yust.edu or parkojs@gmail.com

[‡]이 논문은 KAIST 양지원 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

산에도 응용할 수 있게 되었다[16].

본 총설에서는 효소를 이용한 아실화 반응의 역사와 응용, 그리고 최근 새롭게 등장하고 있는 수용액에서의 아실화반응의 가능성에 대해 알아보려고 한다. 이러한 유기용매와 수용액에서의 효소의 아실화반응은 특별히 천연물의 구조변화에 의한 신약 개발, 개량 신약등 개발 단계에서 뿐 아니라, 특허가 만료된 제품의 경쟁력 있는 공정의 개발에 이르기까지 다양한 가능성을 갖고 있다고 하겠다. 기존의 가수분해 효소(hydrolase)뿐 아니라 polyketide나 non-ribosomal peptide의 생합성에서 발견되는 효소들을 *in vitro*에서 효율적으로 이용하는 방안에도 살펴보려고 한다. 특별히, 다양한 관능기(functional group)를 가진 천연물의 구조 수식에 있어서, 기존의 가수분해 효소의 아실화 반응의 변천과 새로운 전개에 대해 살펴보고, 천연물의 구조 변화에 있어서 아실전이효소(acyl transferase, AT)의 가능성에 대해서 살펴보려고 한다.

2. 효소의 아실화 반응

효소를 이용한 아실화 반응을 통해 amide 결합과 ester (thioester 포함) 결합을 형성할 수 있다(Fig. 1). 이러한 반응은 가수분해 효소(EC 3분류)의 가수분해 반응의 역반응을 이용하는 것이다.

이러한 반응은 다양한 천연물의 구조에서 발견된다. 생체 내에서는 주로 CoA ester나 N-acetylcysteamine의 thioester 형태의 acyl donor를 사용한다. 때로는 polyketide synthetase (PKS)나 non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)와 같은 거대한 효소 복합체에서는, acyl carrier protein (ACP)과 같은 단백질에 결합된 형태를 취하기도 한다. Thioesterase 또한 thioester를 인식하여 nucleophile (-OH, -NH₂)에 의해 PKS나 NRPS의 마지막 단계에서 macrocyclization에 의해서 amide나 ester를 형성한다. 생체 내에서는, 수용액의 환경으로 물이 대부분을 차지하지만, acylation 반응이 가능하게 된다.

그러나 *in vitro*에서 가수분해 반응의 역반응을 통해 합성 쪽으로 유도하기 위해서는 평형의 이동을 위해서 물을 제거한 환경을 유지해야 하는데, 유기 용매를 사용하거나 반응 중에 생성되는 물을 제거해 주는 방법을 채택한다. 또한 생성물의 침전을 유도하여 수용액 상황이지만 합성반응쪽으로 평형을 이동시키는 것이다. 물이 존재하게 되면 가수분해 효소에 의해 acyl donor와 생성물의 가수분해가 일어나게 되어 수율이 떨어지고 생성물의 분리에 영향을 주게 된다.

후자의 예로는, 1980년대 말 DSM 계열회사인 Holland Sweetener Company 사가 *Bacillus thermoproteolyticus* 유래의 단백질 분해 효소인 thermolysin이 가지는 위치선택성과 이성질체 선택성을 이용하여 dipeptide 인공대체감미료 아스파탐(aspartame)의 합성에 성공한 뒤 현재에 이르고 있다(Fig. 2). D/L-PheOME 가운데 L 형태만 반응하며, D 형태는 생성물 Cbz-APM과 복합체를 형성하여 침전되기 때문

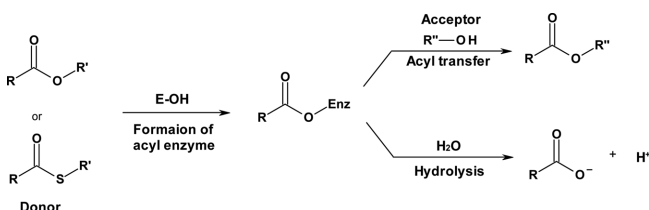


Fig. 1. Enzymatic acylations of alcohols in aqueous and organic media by hydrolytic enzymes.

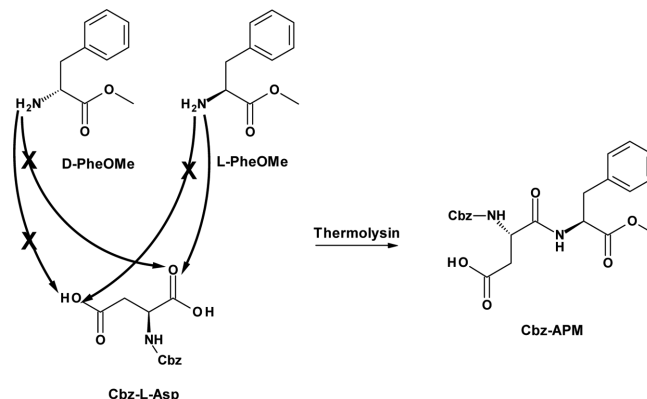


Fig. 2. Biocatalytic synthesis of dipeptide sweetener aspartame precursor by a thermostable protease, thermolysin, in aqueous media (Holland Sweetener Compnay).

에 반응이 수용액에서 수행되지만, 생성물의 합성이 가능하게 된다.

전자의 해결방법으로는 반응매질에서 물을 제거하는 것인데 이를 위한 방법으로 유기용매를 사용하는 것을 생각할 수 있다. 1960~1980년대의 효소의 고정화 연구에 이어서, 1980년대 중반에 들어서 효소공학에 있어서 큰 진전을 이룬 분야는 유기용매에서의 효소반응이라고 할 수 있을 것이다. 물에서는 불가능했던 반응들을 효소의 안정화 기술을 통하여 유기용매에서 수행할 수 있게 되었다[15-17]. 미국 MIT의 Klibanov 교수를 비롯하여 다양한 연구자들이 이 분야에서 개척적인 역할을 함으로써, 효소공학 분야의 국제 학회에서 수여하는 Enzyme Eng. Award를 통해 그 공로를 인정받게 되었다.

3. 유기 용매에서의 효소의 아실화 반응의 역사와 응용

유기용매를 이용한 효소 반응이 acylation 반응에 사용된 것은, 유기용매에 효소가 쓰일 수 있음을 증명한 뒤 얼마 후, 1988년 Riva 등이 유기용매에서 가수분해의 역반응을 이용하여 다양한 당류, 스테로이드, 핵산 등 multihydroxy 화합물의 acylation 반응에 protease와 lipase를 이용하여 선택적으로 hydroxyl기에 아실화 반응을 보고한 것이 었다. 이들은 친수성인 화합물을 녹이기 위해 DMF와 같은 효소의 활성에는 좋지 않은 용매를 사용할 수 밖에 없었지만, 유기용매에서의 acylation 반응의 선구적인 역할을 한 가치를 인정할 필요가 있을 것이다[17].

그 이후에, 이러한 유기용매에서의 아실화 반응을 용이하게 하기 위해, 주로 가수분해 효소(lipase나 procase)를 중심으로 염을 첨가하거나, 동결건조 시에 안정화제를 첨가하는 방법, 유기용매 대신 이온성액체를 첨가하는 방법 등 다양한 연구가 계속되고 있다[18]. 아실화 반응의 다양한 제약 분야에서의 산업적 성공 예들이 최근의 review를 통해 보고되고 있다[7].

최근, Hanefeld 등은 가수분해 효소를 사용하여 유기용매 내에서 다양한 acyl donor를 이용하여 아실화 반응을 수행할 때의 장단점을, 주로 경영학의 전략기획에서 사용하는 SWOT (strength-weakness-opportunities-threats) 분석을 통해, 녹색화학의 관점에서 비교하였다[19]. 단순히 효소 반응 단계만이 아니라, 전체적인 관점에서 공정의 "greenness"를 평가하였다. Atom economy와 E-factor의 인자들을 사용하여 비교한 결과, 자주 사용되는 enol ester (vinyl ester)보다는 carboxylic acid를 사용하되 물을 제거하는 방법이 더 환경친화적임을

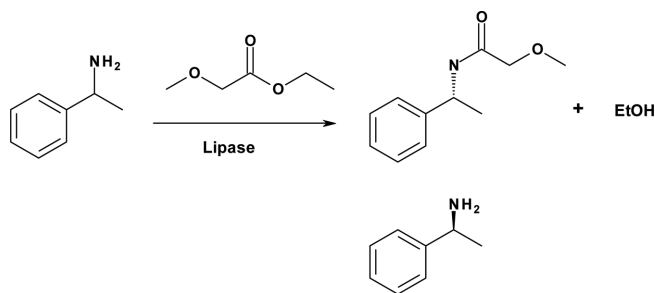


Fig. 3. Lipase-catalyzed acylation for kinetic resolution of racemic amine (BASF) [22].

보고하고 있다[20]. Kostos 등은, 연구 단계에서 생산 단계로 넘어가는 과정에서 우리가 고려해야 할 사항 가운데 전체 공정에서 차지하는 분리와 정제 비용을 고려해야 할 것과, 효소의 재사용을 위한 고정화를 통해 에틸렌 생성의 예방, 전체 공정에 있어서의 생성물의 분리 및 work-up 과정 등 다양한 고려 사항들을, 유기용매에서의 아실화 반응과 가수분해 반응의 관점에서 고찰하였다[21]. 다음으로는 효소의 아실화 반응을 이용하여 합성할 수 있는 몇 가지 예를 통해, 기존의 성공 예들을 살펴보고자 한다.

3-1. Chiral Intermediates

유기용매에서 아실화 반응이나 가수분해 반응을 통해 의약품, 농약 및 향료 등의 중간체를 합성하는 연구는 가장 큰 시장을 차지하는 분야라고 하겠다. 독일 BASF 사는 *Burkholderia* 속 유래의 lipase를 이용하여 농약의 원료인 chiral amine를 합성하는데 성공하였다. 유기용매에서 methoxyethyl ester를 사용하여 효율적으로 한쪽 형태의 이성질체만을 효율적으로 분리해 낼 수 있음을 보고하였다(Fig. 3)[22]. 제약이나 의약품이뿐 아니라 전자산업에서 LCD의 원료물질인 액정 물질의 합성에도 lipase가 사용되고 있다[23].

3-2. Enzymatic Acylations for the Synthesis of Polyesters

효소를 이용한 폴리머의 합성은 지난 몇 년간 많은 연구를 통해 그 가능성을 입증하였다[24]. 폴리에스터는 섬유나 필름, 그리고 플라스틱 음료수병에 쓰이는 Poly(ethylene terephthalate, PET)를 비롯하여, 최근 생물학적 방법으로 monomer가 생산되는 1,4-butanediol과 succinic acid로부터 만들어지는 생분해성 고분자 Poly(butylene succinate, PBS) 등, 우리 주위에 광범위하게 사용되고 있다. Diol과 diacid의 축합반응은 화학적인 방법으로 상업적인 폴리에스터를 생산하는 주된 방법이다. 효소를 이용하여 폴리에스터를 합성하는 방법에서 가장 널리 쓰이는 효소는 Lipase (EC 3.1.1.3)이다. Lipase를 이용하여 폴리에스터를 합성하는 것은 *in vivo*에서 lipase가 지방산을 분해하는 반응의 역반응을 이용하는 것으로서, 크게 lactone의 ring-opening polymerization (RPO)과 diacid와 diol의 축합반응(polycondensation) 두 가지가 있다[25]. 폴리에스터의 양쪽 끝이 alcohol로 끝나는 polyol-polyester는 폴리우레탄의 전구체가 된다. 영국의 Baxenden Chemicals 사는 기존의 폴리에스터의 합성에 쓰이는 titanium이나 tin을 촉매로 고온에서 (200 °C), 유기용매, 무기산을 사용하던 공정을, *Candida antarctica* 유래의 lipase (Novozym 435)를 이용하여 저온에서 (60 °C) 축합반응으로 폴리에스터를 생산하는 공정으로 대체하여, 유기용매와 무기산의 사용이 불필요하게 되었고, 대량생산에서 2000

megawatts의 전력을 절약하게 되었다[26-29]. Lipase로 생산된 polyester는 분자량이 균일하여 녹는 점의 분포가 기존의 금속 촉매로 합성한 것에 비하여 좁아서 고온 성형이 가능한 접착제로 전구체로 사용될 수 있다. 환경적인 측면과 생산된 고분자의 성능면에서의 향상을 통해서 “Green polymerization”의 가능성을 열어 주었다. 의료 분야나 화장품 분야의 응용에서는 효소를 이용한 고분자가 가능성이 있을 것이다. 효소를 이용한 고분자 합성은 다양한 관능기를 가진 monomer의 경우 보호기의 도입과 탈리 없이 가능한 경우, 에너지를 절감할 수 있고, 고온에서 분해가 되거나 부반응을 가져다 주는 반응의 경우, 혹은 이성질체 가운데 특이적으로 반응하는 경우에 화학적 합성에 비해 장점을 가질 수 있다.

Gross 등은 activated ester를 사용하지 않고서도, lipase를 이용하여 폴리에스터를 합성할 수 있음을 보고하면서, 그러나 좀 더 광범위하게 효소를 이용하여 polyester 고분자를 합성하기 위해서 극복해야 할 점들을 지적하였다[30]. 고정화 효소와 기질과의 비율이 1/10 w/w 정도인데 더 낮추어야 하는 점, 재사용이 가능한 고정화 담체 개발의 필요성, 효소의 열안정성을 더 높여야 할 것, 각 고분자 합성의 필요에 맞는 효소를 개발할 것들을 지적하였다. 이러한 장애물들이 극복될 때, 효소가 원가에서 차지하는 비중을 줄여서, 전체 공정의 경제성을 확보할 수 있을 것이다.

3-3. Enzymatic Acylations for the Synthesis of Functional Nanomaterials

유기 분자가 기능성 구조를 가지려면, 단위 구성 building block들이 질서 정연하게 배열되어야 한다. Organogel은 이러한 nano 구조물 가운데 중요한 예라고 할 수 있다. 친수성기와 소수성기를 함께 가지는, 양친성 분자(amphiphile)는, 친수성기는 수소결합에 의해서 그리고 소수성기는 유기용매와 작용하여, 자기 조립에 의하여 규칙적인 배열을 만들 수 있는 물질로서 organogelator로서 기능을 할 수 있다. Multihydroxyl 화합물에 lipase, protease를 이용한 아실화 반응을 이용하여[31], Park 등은 유기용매 내에서 이당류의 탄수화물을 출발물질로 하여, protease와 lipase를 이용하여 아미노산 에스터와 지방산 에스터를 합성하였다[32,33]. 특별히, glucose 두 분자가 대칭 구조를 가지고 1,1 glycosidic bond로 연결된 이당류 trehalose만이 6-OH와 6'-OH에 acylation이 되어 대칭 구조를 가지게 된다(Fig. 4).

Candida antarctica 유래 lipase B (CALB)를 촉매로, divinyladipate를 acyl donor로 사용하여, acetone에서 sucrose diester와 trehalose diester를 합성하였다. 생성물의 분리 과정에서 trehalose-6,6'-diester가 gel을 형성함이 관찰되었다. John 등은 다양한 fatty acid vinyl ester를 사용하여 얻은 trehalose diester (수율 50% 이상)가, 유기용매에서 gel을 형성하고, 그 특성을 고찰하였으며, 이를 이용하여 해양에 유출된 기름을 정화하는데 탄수화물 기반의 organogelator를 사용할 수 있는 가능성에 대하여 보고하였다[34,35]. Trehalose 6,6'-diacetate의 경우, ethyl acetate에서 0.04% (w/v; 0.84 mm)의 농도에서도 gel을 형성하였는데, 이는 sugar ester류의 gelator 가운데 가장 낮은 농도이다. 화학적으로 합성한 여러가지 trehalose ester 혼합물 가운데 유일하게 trehalose-6,6'-diester만이 효과적으로 gel을 형성하는 현상을 통해서, 효소를 이용하여 위치 선택적인 acylation을 통해 nanostructure를 가진 물질을 형성할 수 있음을 통해서, 효소의 선택성과 초분자화학의 결합에 의한 새로운 기능성 물질 합성의 가능성을 열어 주고 있다.

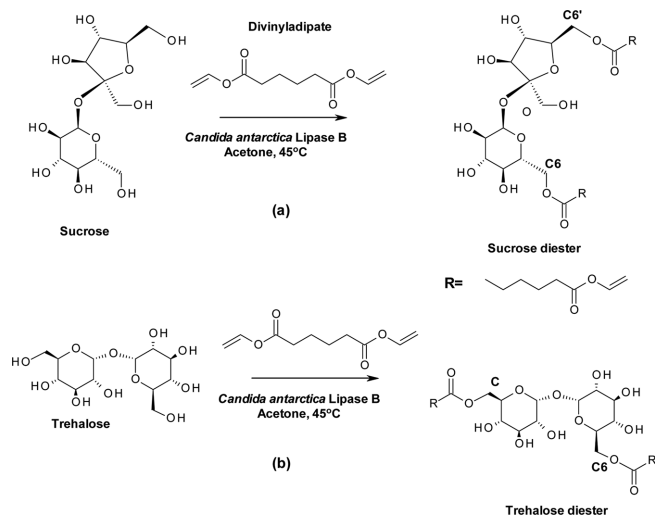


Fig. 4. Enzymatic acylations of disaccharides top sucrose, bottom trehalose with divinyl adipate in organic solvents for the synthesis of organogelators [33].

4. 수용액에서의 효소 아실화반응

연구자들이 오랜 동안 AT와 가수분해 효소의 단백질의 형태가 비슷하며, 촉매반응의 기체가 비슷할 것이라고 여겨져 왔으나, 반응성이 다른 현상의 분자 수준의 설명은 오랜 동안 미스테리로 남아 있었다. 최근, Kazlauskas 등은 *Haemophilus influenza* 유래 homoserine acyl transferase (HiHAT)과 *Pseudomonas fluorescens* 유래의 esterase (PFE)의 X-ray 구조 비교 분석을 통하여, 활성 중심에서 oxyanion loop의 방향이 가수분해 효소(esterase/lipase)에서는 carboxyl oxygen이 활성 중심 쪽으로 향하지만, AT에서는 amide의 NH가 활성 중심으로 향하고 있음을 보고하였다[36]. 두 단백질은 아미노산 서열로는 13% 정도의 상동성을 가지는데, 아미노산의 비교로는 알 수 없는 단백질의 구조를 X-ray 구조 분석을 통해서 분석하였다. Esterase에서는 주쇄의 carboxyl oxygen과 다른 물 분자(bridging water) 사이에 또 다른 물 분자(bridging water)가 있어서 acyl-enzyme (serine) 복합체를 공격할 수 있도록 하지만, AT에서는 bridging water가 attacking water를 불활성화하여 가수분해가 되지 않는다고 보고하였다(Fig. 5). AT가 수용액에서도 물이 대량으로 존재하더라도 물에 의해 acyl donor가 가수분해되지 않고, alcohol (혹은 amine) nucleophile에 의해서 acylation이 되는 기제를 설명한 것이다[36].

한편 Neang 등은, 원래 *Candida antarctica* 유래의 lipase A (CalA)와 30% 정도의 아미노산 서열 유사성을 가진 *Candida parapsilopsis* 유래의 lipase 유사 단백질(CpLIP2)이, 물의 활성도(A_w)가 0.9가 되는 거의 수용액에서, 가수분해보다 alcoholysis를 촉매하는 것을 관찰하였다. 더 나아가, *Candida tropicalis* 유래의 CtrL4 (CpLIP2와 59% 상동성)와 *Aspergillus flavus* 유래의 AflaL (CpLIP2와 35% 상동성)도, CpLIP2와 유사하게 같은 조건에서 가수분해보다 alcoholysis를 촉매하는 것을 관찰하고 세 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 alcoholysis 반응도와 아미노산 homology가 관련성을 맺고 있음을 보고하면서, CpLIP2와 CtrL4는 AT로, CalA와 AflaL는 lipase 분류하였다[37,38]. 이러한 가수분해 효소와 AT의 X-ray 구조와 아미노산 서열 비교를 통해, AT를 이용하여 수용액에서도

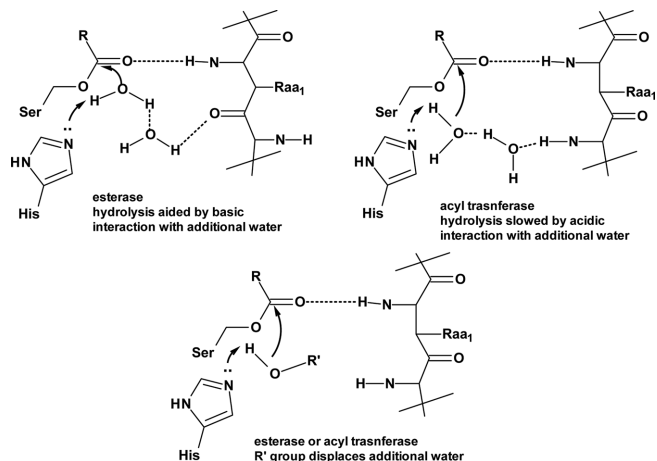


Fig. 5. Hypothesis of how the orientation of the oxyanion loop affects the activation of water [34].

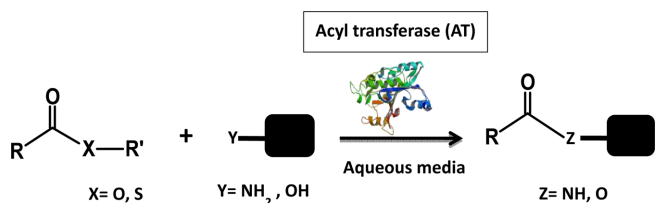


Fig. 6. Enzymatic acylations in aqueous media using AT.

acylation 반응을 수행할 수 있음을 보여주었다(Fig. 6). 기초연구를 통해 기존의 유기용매에서 가능하던 아실화 반응을 수용액에서도 수행할 수 있음을 보여주는 예들이라고 하겠다.

Tang 등은 고지혈증 치료제로 쓰이는 polyketide계 화합물 lovastatin의 생합성 경로의 연구 과정에서, lovastatin의 생합성 마지막 단계, 즉 monacolin J (multihydroxyl 화합물)에 methylbutyryl CoA thioester를 acylation 반응하는 단백질인 LovD를 가지고, 구조가 약간 다른 acyl donor인 α -dimethylbutyryl-S-methyl-mercaptpropionate (DMB-S-MMP, 값이 비싼 dimethyl butyryl CoA thioester대신 사용함)를 이용하여 acylation이 가능함을 *E. coli*를 이용하여 *in vivo*에서 확인하였다[39].

더 나아가서 Tang 등은 LovD를 *in vitro* 단백질 공학 기술인 directed evolution에 의해 개선된 engineered LovD를 통해 촉매활성, 용해도, 열안정성을 증가시켰다[40]. Codexis 사는 이 기술을 license in하여, directed evolution, substrate engineering 등을 통해 *in vitro*에서 대량생산에 성공하여, 2012년 미국 녹색화학 대통령상을 수상하였다[41]. 기존의 화학적 합성에서는 simvastatin을 합성하기 위해서

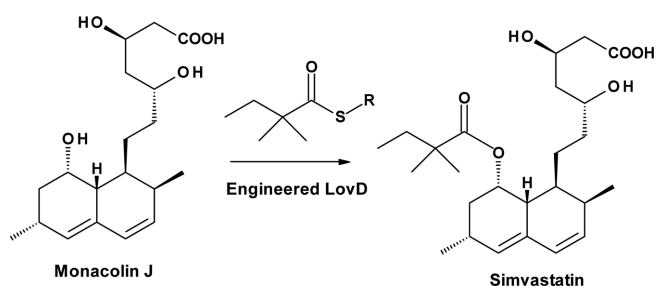


Fig. 7. Engineered AT (LovD)-catalyzed One step synthesis of cholesterol lowering drug, simvastatin [39].

다단계의 보호기의 도입과 탈리의 과정을 거치게 되는데, UCLA의 Tang 교수그룹은 Codexis 사의 연구진들과 함께 한 단계의 효소 반응을 통해 이것을 완성하였다(Fig. 7). 이를 통해 AT를 이용하여, 수용액에서도 위치선택적인 acylation 반응이 산업단계에서 가능함을 보여주었다. 특별히 PKS와 NRPS에서 사용되는 AT는 단백질공학을 이용하여 *in vivo*에서 뿐 아니라 *in vitro*에서도 acylation을 위한 좋은 후보 단백질이 될 수 있을 것이다[42].

5. Regioselective Modification of Natural Products Through Enzymatic Acylations in Aqueous Media-PKS & NRPS

미생물이나 식물로부터 얻어지는 천연물은 시장에 진출한 의약품에서 많은 부분을 차지하고 있으며, 항암제, 면역억제제, 항생제 등 다양한 생물활성을 나타낸다. 이러한 물질들은 기본 구조(scaffold)에 변화를 주어 새로운 약물특성을 갖도록 하거나, 새로운 효능을 갖게 할 수 있다. 과거 20년 동안 등장한 신약의 2/3은 polyketide나 non-ribosomal peptide의 유도체이다[43]. 특별히 PKS나 NRPS를 통해 합성되는 polyketide나 nonribosomal peptide는 구조적 다양성과 약효의 우수성으로 연구가 활발히 진행되고 있으며, 그 생합성 경로가 밝혀짐에 따라 이러한 화합물의 *in vivo* 합성과정에서 사용되는 acyl transferase와 glycosyltransferase 새롭게 밝혀지고 있다[42,44-46]. Tang 등은 이러한 acyl transferase나 glycosyltransferase류의 효소가 polyketides나 nonribosomal peptides에서 천연물의 다양성을 제공하는 기능을 담당하는 주요한 효소라고 여겨, 'decorative enzyme'(수식효소)라고 부르고 있다[47,48]. 최근 들어 이러한 acyl transferase를 *in vivo*에서 대사공학을 통해 다른 균주에 대사경로를 cloning하여 생산량을 늘리거나, modular 형태의 PKS나 NRPS의 성질을 이용하여 hybrid 천연물을 생산하고자 하는 연구가 진행되고 있다[49-51]. 기존의 연구들은 PKS나 NRPS의 전체 assembly 과정의 관점에서 *in*

vivo 합성에 초점이 맞추어져 왔다(combinatorial synthesis). *In vivo*에서 사용되는 acyl donor인 acyl CoA thioester 대신에 simvastatin 합성의 경우와 같이 간단한 구조의 다양한 acyl donor analog를 사용한다면, *in vitro*에서 천연물의 구조 변화를 acyl transferase 혹은 가수분해 효소나 glycosyltransferase를 사용해서 할 수 있을 것이다(combinatorial biocatalysis) [43,52]. 그러나 PKS나 NRPS의 경로를 먼저 밝힘으로서 얻어지는 다양한 정보가 *in vitro* combinatorial biocatalysis에 유용하게 쓰일 것이다. 효소의 아실화 반응이 가장 크게 각광을 받는 응용 분야는 다양한 관능기를 갖고 있는 (multifunctional) 천연물의 변형을 통해 새로운 가능성을 개척하는 것이다[53]. 이를 통해 이미 다양한 천연물의 다양성을 더욱 확대할 수 있을 것이다. 효소를 이용한 아실화반응이 가장 광범위하게 연구되고 있는 분야는 천연물의 구조를 변화시켜 새로운 혹은 더욱 강화된 생물학적 약물 특성이나 약물전달특성을 갖도록 하는 것인데, 이를 통해 약물활성, 안정성, 약물동력학적 특성이 향상되는 결과를 가져오게 된다.

다음은 몇 가지 천연물의 경우에 특별히 acylation의 관점에서 최근 주목을 받고 있는 몇 가지 예를 살펴보고자 한다.

5-1. *In vitro* Acylations with Hydrolases and Acyl Transferases for the Modification of Paclitaxel Analogs

항암제로 사용되는 taxol은 좋은 효능에도 불구하고, 물에 잘 녹지 않음으로 인하여 약물전달의 제한점을 갖고 있다. Dordick 등은 잘 녹지 않는 Paclitaxel의 용해도를 증가시키고자 단백질 가수분해 효소 thermolysin을 사용하여 유기용매에서 divinyladipate를 acyl donor로 사용하여 2' 위치에 위치선택적으로 도입한 뒤 (100% yield), 다시 Novozym 435를 이용하여 deacylation을 통해 1개의 amide, 3개의 ester, 1개의 internal ester 등은 반응하지 않고 adipate의 terminal vinyl ester만 acid 형태로 전환되었다(Fig. 8). 이를 통해 1,700배의 용해가 증가하였다[54].

식물 주목에서 taxol의 생합성 경로는 모두 밝혀져 있다. 한편 식

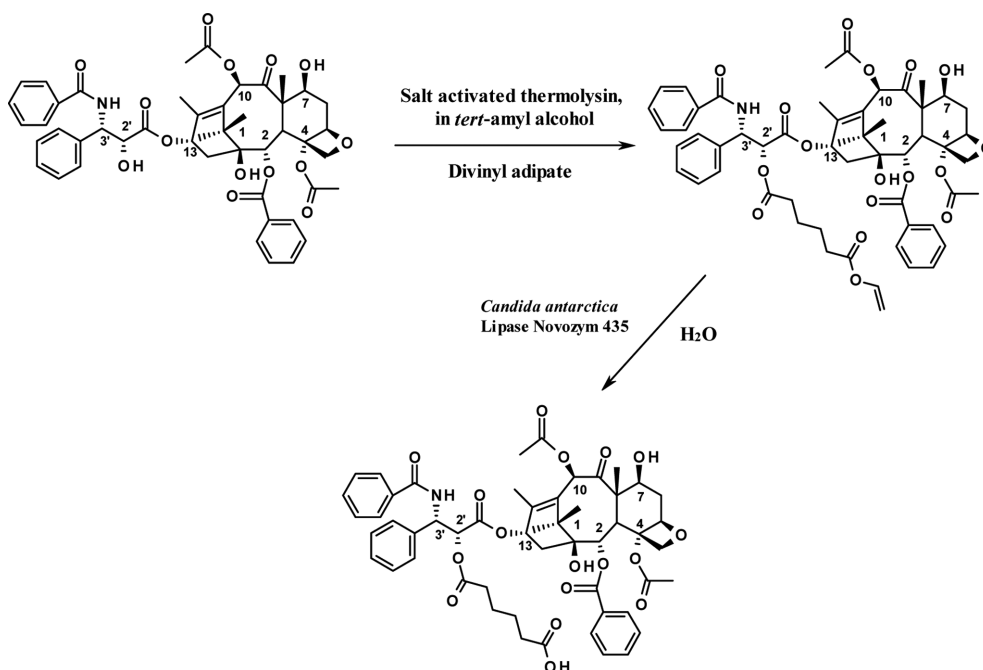


Fig. 8. Regioselective acylation and deacylation of paclitaxel using the combination of protease and lipase [54].

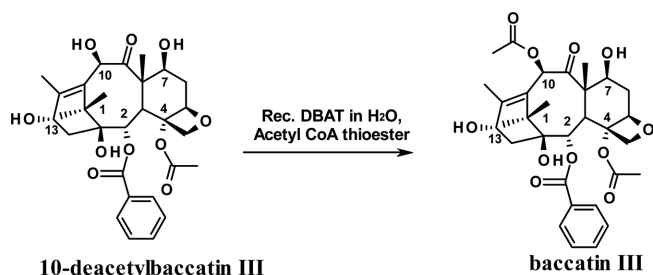


Fig. 9. AT-catalyzed regioselective acylation of 10-deacetylabbacin III in aqueous media [55].

물체에서 Taxol의 생합성 경로를 통해 얻어진 acyl transferase를 이용하여 Taxol analog를 합성하는 연구는, Taxol의 항암 특성을 개선할 수 있는 방법이 될 것이다.

Walker 등은 재조합 *E.coli*에서 10-deacetylabbacin III에 *in vivo*에서 합성된 acetyl CoA thioester를 사용하여 10-OH에 위치 선택적으로 acylation을 할 수 있음을 보고하였다[55]. Croteau 등은 taxol의 *in vivo* 합성 경로에서 가장 마지막 단계에 해당하는 N-acylation에 대해 조사하였다. Aliphatic/aroyl CoA thioester에 대해서 N-acyltransferase의 기질특이성을 조사한 결과, aroyl transferase임을 보고하였다[56]. Walker 등은 N-dearoylpaclitaxel에 다양한 CoA thioester에 대해서 BAHD N-aroyl transferase의 기질특이성을 조사하였다[57]. *Taxus* 식물에서 BAHD family에 속하는 N-benzoyltransferase를 cloning 하여 *E. coli*에서 발현한 뒤, 정제한 단백질을 *in vitro*에서 다양한 acyl (aliphatic/aroyl) CoA thioester (benzoyl; ortho-, meta-, and para-substituted benzoyls; heterole carbonyls; alkanoyls; and butenoyl)에 대해 acylation 활성을 조사하였다. Hexanoyl, acetyl, and butyryl기가 butenoyl, benzoyl기에 비해 우수한 활성을 나타내었다. 물론 각각의 taxol analog에 대해 약효 평가는 하지 않았지만, 이러한 개념을 통하여 다양한 taxol analog에 대한 합성을 통한 선구물질에 대한 조사를 할 수 있을 것이다.

5-2. Regioselective Modification of Rapamycin

Sirolimus라고도 알려진 rapamycin은 31개의 탄소로 이루어진 polyketide 계통의 면역억제제로서, Wyeth 사에 의해 판매되고 있는

macrolide 계통의 약물이다. 최근, 항체 생산을 위해서 다양한 변형약에 대한 연구가 진행 중이다. 특별히 rapamycin의 hemisuccinyl terminal methyl, benzyl ester를 반응물로 *Pseudomonas* sp. 유래의 Lipase Amano LPL-80 가지고 terminal ester와 internal ester의 가수분해 실험을 한 결과 benzyl ester는 internal ester가 가수분해되지 않고, methyl ester는 상당부분이 rapamycin으로 가수분해 되었다[58].

Pfizer 사는 rapamycin 유도체를 항암제로서의 가능성을 조사하는 과정에서, 42번째 위치한 hydroxyl기를 선택적으로 변화시키고자 하였다. 41-desmethoxyrapamycin을 이용한 lipase에 의한 acylation 실험에서, 널리 쓰이던 vinyl ester [19] 대신에 quaternary carboxylic acid monooxime ester를 사용하였는데, 이는 공정에서도 큰 문제 없이 쓰일 수 있는 acyl donor이다(Fig. 9)[59]. 가수분해 반응에서나 acylation 반응에서 lactone ring은 영향을 받지 않았다.

5-3. Tetracycline

Tetracycline은 방향족 polyketide로서 그람 양성, 음성균에 효능을 가진 항생제이다. 내성균의 맞서서, tetracycline이 가지는 2-naphthalene-carboxamide의 구조를 유지하는 2, 3 세대 항생제로서, minocycline, doxycycline, tigecycline등이 등장하게 되었다. 이러한 성공은 tetracycline 중심구조(scaffold)의 수식을 통해 새로운 항생제 개발을 위한 출발점이 될 수 있음을 시사한다[60].

물질 SF2575는 tetracycline계의 천연물로서 방선균 *Streptomyces* sp. SF2575.으로부터 생산되는데, 항암제의 성질을 가진 천연물이다. SF2575를 비롯하여, oxytetracycline, chlortetracycline 등은 방선균의 type II PKS에 의해 malonyl-CoA를 기본 물질로 하여 Claisen-like decarboxylate condensation에 의해 합성된다. SF2575의 생합성 경로에서 거의 마지막 단계에서 salicylic acid를 scaffold의 C4 위치에 아실화 반응을 촉매하는 효소 SsfX3는 다른 PKS의 AT와는 성질이 다르다. SsfX3 단백질은 tetracycline에 작용하는 첫번째로 보고된 AT이다[61]. X-ray 구조분석을 통하여 당에 결합하는 N-말단의 sandwich domain과 촉매부위에 해당하는 C-말단은 가수분해 효소(hydrolase)의 구조를 갖는 GDSL 계열인 것이 밝혀졌다. 돌연변이 실험을 통하여 N-말단 결합부위를 제거하였을 때, 반응성이 사라지는 것이 확인되었다. 고무적인 것은 Taxol의 DBAT와 같이, salicylic acid 이외에도 다양한 acyl group을 전이할 수 있음이 밝혀졌다(Fig. 10). 따라서 다양

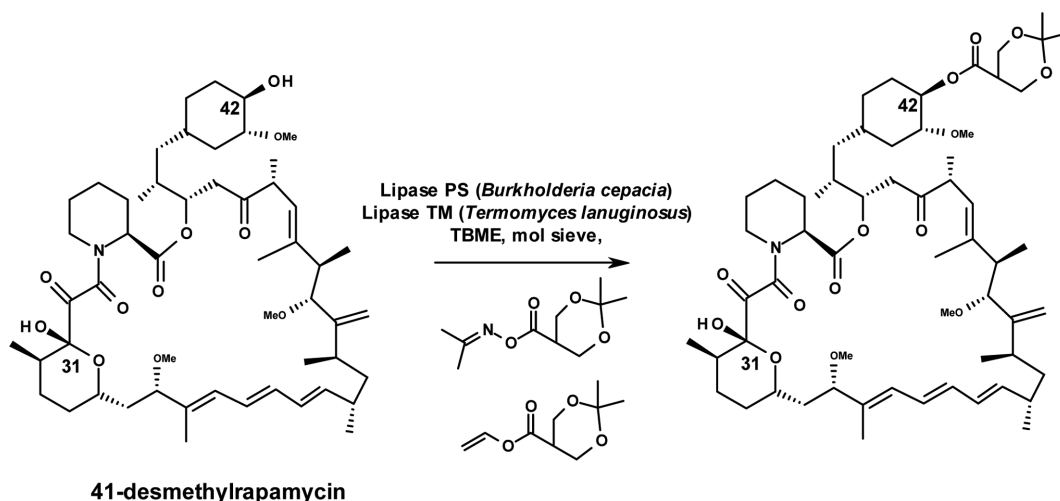


Fig. 10. Lipase catalyzed regioselective acylation of 41-demethoxyrapamycin with two acyl donors [59].

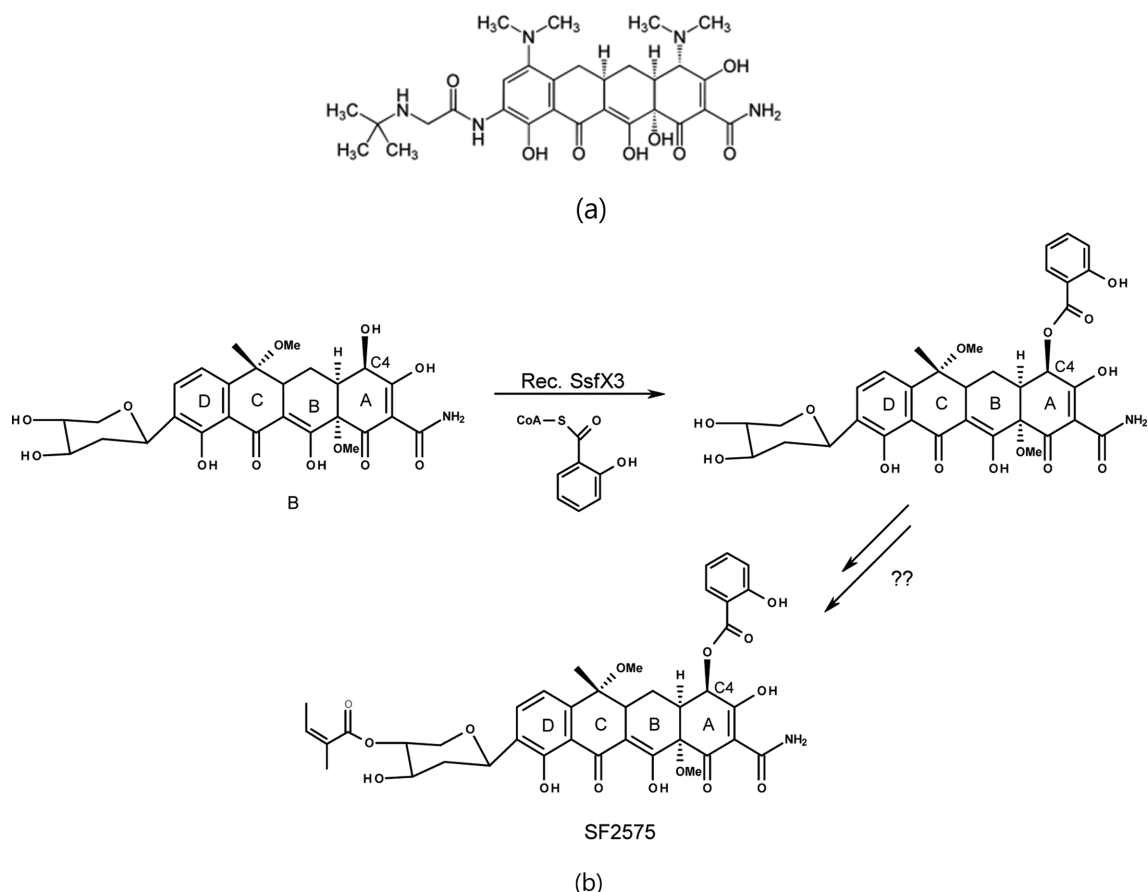


Fig. 11. Structure of Tigecycline (a) and regioselective acylation of SF2575 with SsfX3 (b) [61].

한 SF2575 유도체의 구조-활성 분석에 따라 우수한 항암 활성 혹은 다른 생물학적 활성을 가진 화합물 library의 제조가 가능할 것이다. BLAST 검색을 통하여 SsfX3와 단백질 서열이 유사한 기능이 밝혀지지 않은 단백질들이 검색되는 것을 통해, 천연물 합성(계통은 다르지만)에 관여하는 AT들이 비슷한 구조들을 가지고 있음을 보여 주었다[62].

더 나아가 Tang 그룹은 세 가지 tetracycline (SF2575, oxytetracycline, dactylotetracycline)의 생합성 유전자를 *S. lividans* K4-114에서 발현하여 각 화합물의 생합성 경로에서 불분명한 반응들을 해석하는 데 성공하기도 하였다[63]. 이와 같은 노력들은 heterologous platform을 통해 combinatorial synthesis에 의한 tetracycline 유도체의 합성을 가능하게 하며, *in vitro*에서 이러한 효소들을 사용하여 대량 생산의 가능성을 열어주는 연구라고 하겠다.

5-4. Daptomycin

Daptomycin은 방선균 *Streptomyces roseosporus*에서 유래된 A21878C 인자들 가운데 하나로, 1970년대 Eli Lilly 사가 항생제로 개발하던 중 근육독성으로 인해 개발이 중단되었다가, 2003년 Cubist Pharmaceuticals 사에 의해 다시 정맥주사로 FDA의 승인을 받은 MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) 균을 포함한 그람양성균에 작용할 수 있는 약물로서, 2006년도에는 bacteremia 중에도 승인을 받은 acidic lipopeptide 계열의 항생제이다(Fig. 11) [64,65]. 이미 1988년도에, 장차 daptomycin 내성균의 출현에 대비하여 반합성

daptomycin 유도체를 만들기 위한 노력이 시작되었다고 해도 과언이 아닐 것이다[66-68]. *Actinoplanes utahensis* 균주에서 발견된 deacylase를 이용하여 decaonyl기를 제거하는 효소화학적(chemoenzymatic) 방법을 통하여 daptomycin의 scaffold를 만든 후, 다시 유도체를 합성하기 위해 N-말단을 tert-butoxycarbonyl (tert-BOC)으로 보호하고 다시 아실화 반응(activated acyl donor) 후 탈리하는 과정을 거쳐서 다양한 약물에 대한 구조-활성 실험을 하였다[69,70]. Daptomycin의 생합성 경로에 대한 이해가 증가함에 따라 구조-활성을 통한 다양한 구

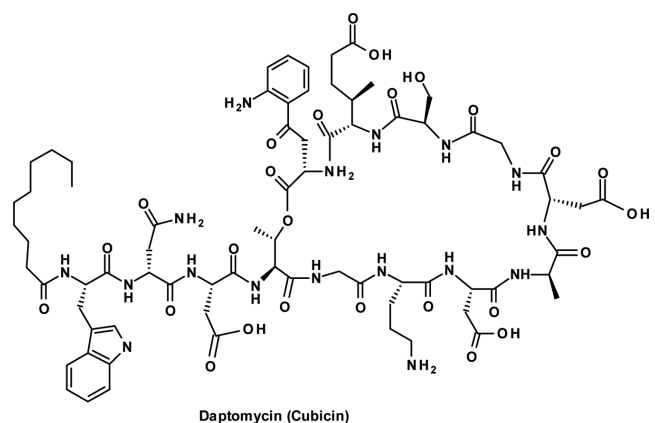


Fig. 12. Structure of antibiotic daptomycin produced from *Streptomyces roseosporus* [64].

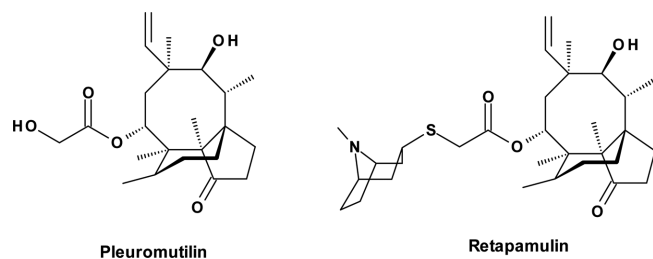


Fig. 13. Chemical Structures of Pleuromutilin and Retapamulin [74].

조를 가진 유도체의 합성을 가능하게 하고 있다. 비슷한 방법으로, 항진균제인 Echinocandin B를 nucleus (scaffold)로 만드는 방법의 하나로, linoleyl기를 제거하는 과정에서 *Actinoplanes utahensis* 균주에서 발견된 deacylase를 사용하였다. Daptomycin과 echinocandin B에서 볼 수 있듯이, scaffold를 변형시키는 것 뿐 아니라, scaffold를 만드는 과정에서도 효소는 기본 구조를 유지하면서 변형시킬 수 있는 *in vitro*에서 유용하게 사용할 수 있는 도구이다[70-73]. 즉 combinatorial biosynthesis에 의해 scaffold를 만드는 과정에서 *in vivo* 반응과 함께, *in vitro*에서 다양한 analog를 합성하는 과정에서 deacylase를 비롯하여 hydrolase, AT등을 사용할 수 있다.

5-5. Retapamulin

Retapamulin은 GSK 사가 개발한 pleuromutilin의 반합성(semisynthetic) 항생제로서, MRSA에 대하여 2007년도에 승인을 받았다[74]. 다른 항생제와는 달리, 항생제의 기체가 달라서 교차저항성의 문제도 없다. Pleuromutilin은 곰팡이 *Clitopilus passeckerianus*에서 유래한 천연물인데, 분자 내에 1개의 internal ester와 2개의 hydroxyl기가 존재한다. 현재 retapamulin은 크림형태나 외용형태로 승인이 되었다. 여러 제약회사에서 이 제품의 유도체를 경구형으로 개발하려고 노력하고 있다[75]. Pleuromutilin은 세 개의 ring으로 구성된 diterpene으로서, 상업적으로는 곰팡이 *C. passeckerianus*의 발효에 의해 생산되거나 농도가 그리 높지 않다. 현재 경구형 개발이 성공한다면, 수요는 급속히 늘어날 전망이다[75].

Taxol의 경구형 개발을 위해 lipase/protease의 조합을 통해 용해도의 개선이 가능했듯이[54], 그리고 pleuromutilin의 구조상 internal ester와 2개의 hydroxyl의 선택적 변형을 위해 cetraxate의 합성에서 사용된 *Microbacterium* sp. 7-1W 유래의 esterase나 *Acinetobacter calcoaceticus* 유래의 hydrolase 등은 이러한 pleuromutilin 유도체의 합성에 유용한 재료가 될 것이다[76,77].

5-6. Enzymatic Macrocyclization & Thioesterases (TE)

PKS and NRPS로부터 유도된 많은 천연물은 8개 혹은 그 이상의 원자를 포함한 macrocyclic ring을 가지는데 유기합성으로는 합성하기 어려운 구조를 가지고 있다. Macrocyclic lactone, lactam을 합성하는데는 다단계의 보호기의 도입뿐 아니라, 3차원적 구조로 인한 엔트로피와 엔탈피 인자, 위치선택성, 분자간의 dimer/oligomer가 형성 등의 문제가 있다[43].

TE는 보통 마지막 PKS 산물이 cyclization이나 외부의 nucleophile의 공격에 의해서 방출될 때 역할을 담당하게 된다. PKS의 한 부분에 해당하는 thioesterase (TE) 또한 acyl 전이 반응의 후보 생체 촉매가 될 수 있다. TE는 보통 serine hydrolases에서 발견되는 serine, histidine,

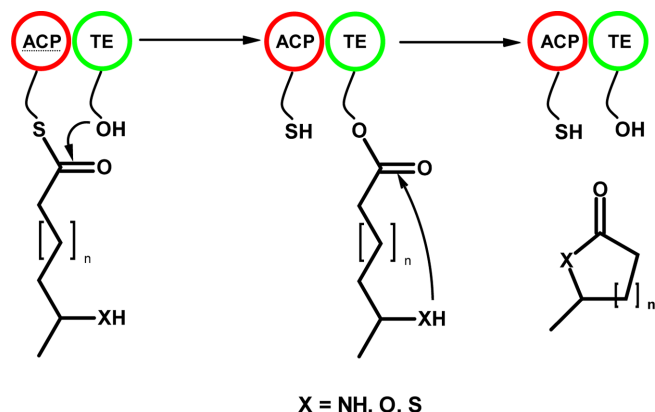


Fig. 14. TE-mediated macrocyclization; 1) transfer of final intermediate to TE active site serine 2) regioselective intramolecular cleavage of the acyl-enzyme intermediate by an internal nucleophile [43].

aspartate catalytic triad를 갖고 있다. 따라서 O-acyl 효소 중간체를 형성하고 아민이나 알콜에 의한 위치선택적 공격으로 lactone 혹은 lactam을 형성한다(Fig. 14).

TE는 macrocyclization 반응 뿐 아니라 cross coupling이 가능함이 보고되고 있다[43,78]. Daptomycin의 경우 TE는 NRPS의 C-terminal 영역에 존재하는데, TE는 activated thioester의 macrocyclization을 담당하는 것으로 알려져 있다[64]. Daptomycin과 유사한 구조의 CDA의 합성에 쓰이는 TE를 재조합 형태로 만든 뒤, daptomycin의 유도체들을 합성하였다[70]. *In vitro*에서 선행의 thioester들을 A54145나 daptomycin의 NRPS의 TE domain으로 cyclization을 하여 hybrid 형태의 분자를 만들기도 하였다[71].

이와 같은 기초연구뿐 아니라 simvastatin의 합성에서 사용된 LovD가 TE의 성격을 가지고 있다는 것을 볼 때, 재조합 TE는 효소 화학적으로 macrocyclic 천연물의 scaffold를 만들 수 있는 유용한 효소가 될 수 있어서 환경친화적이며 유기합성에서 보조적인 도구가 될 수 있을 것이다[77-80].

7. Rational Design and Directed Evolution of Acylation-Related Enzymes

보통 PKS나 NRPS를 통해 합성되는 천연물등의 생합성 경로에서 관여되는 유전자들을 목표를 가지고 재설계하는 것을 일컬어 보통 combinatorial biosynthesis라고 한다[81]. 그러나, coordinated tuning과 만족할만한 수준의 생산량을 위해서는 앞으로는 많은 연구가 필요할 것이다. 이러한 *in vivo*의 목적을 달성하기 위해서뿐 아니라, hybrid 천연물을 만들기 위해서는 목표 반응에 있어서의 기질에 대한 반응성이 향상된 효소가 필요할 것이다. 이를 위해서 뿐 아니라, *in vitro*에서 enzymatic acylation과 관련된 효소(hydrolases, AT, TE)들은 여러가지 특성면에서 개선의 필요성이 있다. 이러한 개선을 위해 최근 컴퓨터를 이용한 계산화학을 통한 rational design [82]과 HTS를 통한 directed evolution 방법은, 기존의 단일반응의 선택성을 개선하는 단계를 넘어서, 필수적인 단계가 될 것이다[83]. 개선된 acylation 관련 효소는 다시 combinatorial synthesis 조립 라인에 투입되어, hybrid 천연물의 제조에 사용되게 될 것이다.

8. 전 망

효소를 이용한 acylation 연구는 90년대의 간단한 chiral intermediate의 합성을 넘어, 구조가 훨씬 복잡한 기능성 구조 물질, 고분자의 합성에도 쓰이고 있다. 특별히 천연물의 변형에서 그 응용을 찾아가고 있는 중이다. 또 다른 한편으로 *in vivo*에서 PKS나 NRPS를 통해 천연물의 조립 라인을 최적화하는 연구가 계속되고 있는데, 천연물의 기본 단위들을 *in vitro*에서 합성하기 어렵기 때문에 combinatorial biosynthesis를 통해 scaffold를 만들고, combinatorial biocatalysis가 혼합된 형태가 앞으로 점점 더 많아질 것으로 전망된다[64]. 또한, PKS나 NRPS에서 밝혀지는 다양한 AT들은, bioinformatics나 metagenomics를 통해서 얻어지는 AT들의 후보군을 더 확장하게 될 것이며, 이를 바탕으로 구조와 아미노산 서열 분석을 통해 AT, TE 효소들의 특성에 대한 이해가 더 늘어나게 될 것이다. 이러한 이해의 증가를 바탕으로, 계산화학에 의한 또는 irrational approach인 *in vitro* protein engineering의 기본적인 정보를 제공하게 될 것이다. 머지 않아서 제약제조회사에서 AT library 제공할 날도 멀지 않을 것으로 예상된다. Combinatorial biosynthesis에서 얻어지는 acylation 관련 효소들의 최적화를 위해 directed evolution은 많은 잠재력을 가지고 있다. 기존의 가수분해 효소, AT, TE의 조합적인 사용에 의한 *in vitro* combinatorial biocatalysis와 combinatorial biosynthesis의 서로 유용한 보조 도구가 될 것이다.

또한 *in vitro*에서 천연물의 아실화 반응을 위해서는, simvastatin에서처럼, 생체 내에서 acyl donor로 사용되는 CoA ester 대신에 *in vitro*에서 간단한 acyl donor로 대체할 수 있는 연구와 반응 시스템에 대한 연구도 필요할 것이다.

Daptomycin과 Simvastatin의 예에서 보았듯이, 가수분해 효소와 AT 및 TE의 응용은, 구조-약효 관계(SAR)를 조사하기 위한 연구 단계에서 뿐 아니라, 기존 약의 변형에 의한 항생제 내성을 방지하기 위한 신약창제[84], 그리고 generic 의약의 경제적 생산을 위한 도구로서도, 앞으로 기대가 되는 방법이라고 할 수 있다. 또한 modular combinatorial biosynthesis를 위해 *in vitro*에서 효소의 최적화를 통해서, 단백질공학과 대사공학을 결합하여, 화학적으로 얻기에는 어려운 compound library를 방선균이나 다른 적절한 균주를 통해 얻게 될 것이다[85].

References

1. Faber, K., "Biotransformations in Organic Chemistry," Springer, 1997.
2. Roberts, S. M., "Preparative Biotransformations : the Employment of Enzymes and Whole-cells in Synthetic Organic Chemistry," *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 157-170(1998).
3. Turner, N. J. and O'Reilly, E., "Biocatalytic Retrosynthesis," *Nature Chem. Biol.*, **9**, 285-8(2013).
4. Liese, A., Seelback, K. and Wandrey, C., *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
5. Strohmeier, G. A., Pichler, H., May, O. and Gruber-Khadjawi, M., "Application of Designed Enzymes in Organic Synthesis," *Chem. Rev.*, **111**, 4141-4164(2011).
6. Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, Wubolts, A. M. and Witholt, B., "Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow," *Nature*, **409**, 258-268(2001).
7. Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C. and Robins, K., "Engineering the Third Wave of Biocatalysis," *Nature*, **485**, 185-194(2012).
8. Park, D. and Lee, J., "Biological Conversion of Methane to Methanol," *Korean J. Chem. Eng.*, **30**(5), 977-987(2013).
9. Min, E.-J. and Lee, E.-S., "Energy Consumption of Biodiesel Production Process by Supercritical and Immobilized Lipase Method," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **50**(2), 257-263(2012).
10. McLachlan, M. J., Sullivan, R. P. and Zhao, H., "Directed Enzyme Evolution and High-Throughput Screening in Directed Enzyme Evolution and High-Throughput Screening," in *Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry : Discovery, Development, and Manufacturing*, eds. Tao, G.-Q. Lin, and A. L., Ch. 3, 45-64 John Wiley & Sons(2009).
11. Boersma, Y. L., Dröge, M. J. and Quax, W. J., "Selection Strategies for Improved Biocatalysts," *FEBS J.*, **274**, 2181-2195(2007).
12. Wang, M., Si, T. and Huimin, Z., "Biocatalyst Development by Directed Evolution," *Biores. Technol.*, **115**, 117-125(2012).
13. Quin, M. B. and Schmidt-Dannert, C., "Engineering of Biocatalysts: from Evolution to Creation," *ACS Catal.*, 11017-1021(2011).
14. Patel, R. N., "Synthesis of Chiral Pharmaceutical Intermediates by Biocatalysis," *Coord. Chem. Rev.*, **252**, 659-701(2008).
15. Zaks, A. and Klivanov, A. M., "Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100 °C," *Science*, **224**, 1249-1251(1984).
16. Zaks, A. and Klivanov, A. M., "Enzyme Catalyzed Processes in Organic Solvents," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3192-3196(1985).
17. Riva, S., Chopineau, J., Kieboom, A. P. G. and Klivanov, A. M., "Protease-catalyzed Regioselective Esterification of Sugars and Related Compounds in Anhydrous Dimethylformamide," *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 584-589(1988).
18. Takashi Kobayashi, Lipase-catalyzed syntheses of sugar esters in non-aqueous media, *Biotechnol. Lett.*, **33**(10), 1911-1919(2011).
19. Paravidino, M. and Hanefeld, U., "Enzymatic Acylation: Assessing the Greenness of Different Acyl Donors," *Green Chem.*, 2651-2657(2011).
20. Sheldon, R. A., "The E Factor: Fifteen Years on," *Green Chem.*, **9**, 1273-1283(2007).
21. Barbayanni, E. and Kokotos, G., "Biocatalyzed Regio- and Chemoselective Ester Cleavage: Synthesis of Bioactive Molecules," *ChemCatChem*, **4**, 592-608(2012).
22. Schoevaart, R. et al., "Chiral Technology: Industrial Biocatalysis with Standard Hydrolytic Bulk Enzymes," *Spec. Chem. Mag.*, **27**(8), 38(2007).
23. Miyazawa, K. and Yoshida, N., "Process for Producing Optically Active α -hydroxyesters Using Lipase PS," UP 5248610 (Chisso, Japan) (1993).
24. Kobayashi, S., "Enzymatic Polymerization," *Encyc. Polym. Sci. Tech.*, 2011.
25. Kobayashi, S., "Recent Developments in Lipase-catalyzed Synthesis of Polyesters," *Macromol. Rapid Comm.*, **30**, 237-266(2009).
26. OECD Primer, "The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability-a Primer," Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), 2001.
27. Binns, F. and Taylor, A., "Enzymatic Synthesis," WO 1994012652

- (Baxenden Chemicals, UK) (1994).
28. Binns, F., Harffey, P., Roberts, S. M. and Taylor, A., "Studies of Lipase-catalyzed Polyesterification of An Unactivated Diacid/diol System," *J. Pol. Sci. Pol. Chem. A*, **36**(12), 2069-2079(1998).
 29. McCabe, R. W. and Taylor, A., "Synthesis of Novel Polyurethane Polyesters Using the Enzyme *Candida antarctica* Lipase B," *Green Chem.*, **6**, 151-155(2004).
 30. Gross, R. A., Ganesh, M. and Lu, W., "Enzyme-catalysis Breathes New Life Into Polyester Condensation Polymerizations," *Trends Biotechnol.*, **28**, 435-443(2010).
 31. Park, H. G., Do, J. H. and Chang, H. N., "Regioselective Enzymatic Acylation of Multi-hydroxyl Compounds in Organic Synthesis," *Biotech. Bioproc. Eng.*, **8**, 1-8(2003).
 32. Park, O. J., Jeon, G. J. and Yang, J. W., "Protease-catalyzed Synthesis of Disaccharide Amino Acid Esters in Organic Media," *Enz. Microb. Technol.*, **25**, 455-462(1999).
 33. Park, O. J., Kim, D. Y. and Dordick, J. S., "Enzyme-catalyzed Synthesis of Sugar-containing Monomers and Linear Polymers," *Biotechnol. Bioeng.*, **70**, 208-216(2000).
 34. John, G., Zhu, G., Li, J. and Dordick, J. S., "Enzymatically Derived Sugar-containing Self-assembled Organogels with Nanostructured Morphologies," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 4772-4775(2006).
 35. Jadhav, S. R., Vemula, P. K., Kumar, R., Raghavan, S. R. and John, G., "Sugar-derived Phase-selective Molecular Gelators as Model Solidifiers for Oil Spills," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 7695-7698(2010).
 36. Jiang, Y., Morley, K. L., Schrag, J. D. and Kazlauskas, R. J., "Different Active-site Loop Orientation in Serine Hydrolases Versus Acyltransferases," *ChemBioChem*, **12**, 768-776(2011).
 37. Brenneis, R. and Baeck, B., "Esterification of Fatty Acids Using *Candida antarctica* Lipase A in Water-abundant Systems," *Biotechnol. Lett.*, **34**, 1459-1463(2012).
 38. Neang, P. M., Subileau, M., Perrier, V. and Dubreucq, E., "Peculiar Features of Four Enzymes of the CaLA Superfamily in Aqueous Media: Differences in Substrate Specificities and Abilities to Catalyze Alcoholysis," *J. Mol. Cat. B: Enz.*, **94**, 36-46(2013).
 39. Xie, X. and Tang, Y., "Efficient Synthesis of Simvastatin by Use of Whole-cell Biocatalysis," *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 2054-2060(2007).
 40. Gao, X., Xie, X., Pashkov, I., Sawaya, M. R., Laidman, J., Zhang, W., Cacho, R., Yeates, T. O. and Tang, Y., "Directed Evolution and Structural Characterization of a Simvastatin Synthase," *Chem. Biol.*, **16**, 1064-1074(2009).
 41. Collier, S., "Commercial Biocatalytic Processes to Simvastatin and Other Molecules," *Org. Proc. Res. Dev.*, Barcelona, Spain, Scientific Update(2010).
 42. Dunn, B. J. and Khosla, C., "Engineering the Acyltransferase Substrate Specificity of Assembly Line Polyketide Synthases," *J. R. Soc. Interface*, 29 May 2013: 20130297.
 43. Mortison, J. D. and Sherman, D. H., "Frontiers and Opportunities in Chemoenzymatic Synthesis," *J. Org. Chem.*, **75**(21), 7041-7051(2010).
 44. Minowa, Y., Araki, M. and Kanehisa, A., "Comprehensive Analysis of Distinctive Polyketide and Nonribosomal Peptide Structural Motifs Encoded in Microbial Genomes," *J. Mol. Biol.*, **368**, 1500-1517(2007).
 45. Zhou, H., Xie, X. and Tang, Y., "Engineering Natural Products Using Combinatorial Biosynthesis and Biocatalysis," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 590-596(2008).
 46. Chooi, Y. H. and Tang, Y., "Navigating the Fungal Polyketide Chemical Space: from Genes to Molecules," *J. Org. Chem.*, **77**, 99339953(2012).
 47. Zabala, A. O., Cacho, R. A. and Tang, Y., "Protein Engineering Towards Natural Product Synthesis and Diversification," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 227-241(2012).
 48. Truman, A. W., Dias, M. V. B., Wu, S., Blundell, T. L., Huang, F. and Spencer, J. B., "Chimeric Glycosyltransferases for the Generation of Hybrid Glycopeptides," *Chem. Biol.*, **16**, 676-685(2009).
 49. Lee, S. Y., Kim, H. U., Park, J. H., Park, J. M. and Kim, T. Y., "Metabolic Engineering of Microorganisms: General Strategies and Drug Production," *Drug Discov. Today*, **14**, 78-88(2009).
 50. Marienhagen, J. and Bott, M., "Metabolic Engineering of Microorganisms for the Synthesis of Plant Natural Products," *J. Biotechnol.*, **163**, 166-178(2013).
 51. Pickens, L. B., Tang, Y. and Chooi, Y. T., "Metabolic Engineering for the Production of Natural Products," *Ann. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, **2**, 211-236(2011).
 52. Michels, P. C., Khmelnitsky, Y. L., Dordick, J. S. and Clark, D. S., "Combinatorial Biocatalysis: a Natural Approach to Drug Discovery," *Trends Biotechnol.*, **16**(5), 210-215(1998).
 53. González-Sabín, J., Morán-Ramallal, R. and Rebolledo, F., "Regioselective Enzymatic Acylation of Complex Natural Products: Expanding Molecular Diversity," *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 5321-5335(2011).
 54. Khmelnitski, Y. L., Budde, C., Arnold, J. M., Usyatinsky, A., Clark, D. S. and Dordick, J. S., "Synthesis of Water Soluble Paclitaxel Derivatives by Enzymatic Acylation," *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 11554-11555(1997).
 55. Loncaric, C., Merriweather, E. and Walker, K. D., "Profiling a Taxol Pathway 10-acetyltransferase: Assessment of the Specificity and the Production of Baccatin III by *in vivo* Acetylation in *E. coli*," *Chem. Biol.*, **13**, 309-317(2006).
 56. Longa, R. M., Lagisetti, C., Coates, R. M. and Croteau, R. B., "Specificity of the N-benzoyl Transferase Responsible for the Last Step of Taxol Biosynthesis," *Arch. Biochem. Biophys.*, **477**(2), 384-389(2008).
 57. Nevarez, D. M., Mengistu, Y. A., Nawarathne, I. N. and Walker, K. D., "An N-acyltransferase of the BAHD Superfamily has Broad Aroyl CoA Specificity *in vitro* with Analogues of N-dearoylpacitaxel," *J. Am. Chem. Soc.*, **131**(16), 5994-6002(2009).
 58. Adamczyk, M., Gebler, J. C. and Mattingly, P. G., "Lipase Mediated Hydrolysis of Rapamycin. 42-hemisuccinate Benzyl and Methyl Esters," *Tetrahedron Lett.*, **35**, 1019-1022(1994).
 59. Storz, T., Gu, J., Wilk, B. and Olsen, E., "Regioselective Lipase-catalyzed Acylation of 41-desmethoxy-rapamycin Without Vinyl Esters," *Tetrahedron Lett.*, **51**, 5511-5515(2010).
 60. Wang, P., Gao, X., Chooi, Y. H., Deng, Z. and Tang, Y., "Genetic Characterization of Enzymes Involved in the Priming Steps of Oxytetracycline Biosynthesis in *Streptomyces rimosus*," *Microbiol.*, **157**(8), 2401-2409(2011).
 61. Pickens, L. B., Kim, W., Wang, P., Zhou, H., Watanabe, K., Gomi, S. and Tang, Y., "Biochemical Analysis of the Biosynthetic Pathway of an Anticancer Tetracycline SF2575," *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 17677-17689(2009).
 62. Pickens, L. B., Sawaya, M. R., Rasool, H., Pashkov, I., Yeates,

- T. O. and Tang, Y., "Structural and Biochemical Characterization of the Salicyl-acyltransferase SsfX3 from a Tetracycline Biosynthetic Pathway," *J. Biol. Chem.*, **286**, 41539-41551(2011).
63. Wang, P., Kim, W., Pickens, L. B., Gao, X. and Tang, Y., "Heterologous Expression and Manipulation of Three Tetracycline Biosynthetic Pathways," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 11136-11140 (2012).
 64. Robbel, L. and Marahiel, M. A., "Daptomycin, a Bacterial Lipopeptide Synthesized by a Nonribosomal Machinery," *J. Biol. Chem.*, **285**, 27501-27508(2010).
 65. Strieker, M. and Marahiel, M. A., "The Structural Diversity of Acidic Lipopeptide Antibiotics," *ChemBioChem*, **10**, 607-616(2009).
 66. Boeck, L. D., Fukuda, D. S., Abbott, B. J. and Debono, M., "Deacylation of A21978C, An Acidic Lipopeptide Antibiotic Complex, by *Actinoplanes utahensis*," *J. Antibiot.*, **41**, 1085-1092 (1988).
 67. Debono, M., Abbott, B. J., Molloy, R. M. *et al.*, "Enzymatic and Chemical Modifications of Lipopeptide Antibiotic A21978C: the Synthesis and Evaluation of Daptomycin (LY146032)," *J. Antibiot.*, **41**, 1093-1105(1988).
 68. Shao, L., Li, J., Liu, A., Chang, Q., Lin, H. and Chen, D., "Efficient Bioconversion of Echinocandin B to Its Nucleus by Overexpression of Deacylase Genes in Different Host Strains," *Appl. Environ. Microb.*, **79**(4), 1126-1133(2012).
 69. D'Costa, V. M., Mukhtar, T. A., Patel, T., Koteva, K., Waglechner, N., Hughes, D. W., Wright, G. D. and De Pascale G., "Inactivation of the Lipopeptide Antibiotic Daptomycin by Hydrolytic Mechanisms," *Antimicrob. Agents Chemo.*, **56**(2), 757-764(2012).
 70. Grünwald, J., Sieber, S. A., Mählert, C., Linne, U. and Marahiel, M. A., "Synthesis and Derivatization of Daptomycin: a Chemoenzymatic Route to Acidic Lipopeptide Antibiotics," *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(51), 17025-17031(2004).
 71. Kopp, F., Grünwald, J., Mählert, C. and Marahiel, M. A., "Chemoenzymatic Design of Acidic Lipopeptide Hybrids: New Insights Into the Structure-activity Relationship of Daptomycin and A54145," *Biochem.*, **45**, 10474-10481(2006).
 72. Miao, V., Coëffet-Le Gal, M. F., Nguyen, K., Brian, P., Penn, J., Whiting, A., Steele, J., Kau, D., Martin, S., Ford, R., Gibson, T., Bouchard, M., Wrigley, S. K. and Baltz, R. H., "Genetic Engineering in *Streptomyces roseosporus* to Produce Hybrid Lipopeptide Antibiotics," *Chem. Biol.*, **13**(3), 269-276(2006).
 73. Nguyen, K. T., Ritz, D., Gu, J. Q., *et al.* Combinatorial Biosynthesis of Novel Antibiotics Related to Daptomycin," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 17462-17467(2006).
 74. Dubois, E. A. and Cohen, A. F., "Retapamulin," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **69**, 2-3(2010).
 75. De Mattos-Shiple, K., Hayes, P., Collins, C., Kilaru, S., Hartley, A., Foster, G. D. and Bailey, A. M., "Biobased Antibiotics from Basidios: a Case Study on the Identification and Manipulation of a Gene Cluster Involved in Pleuromutilin Biosynthesis from *Clitopilus passeckerianus*," *Proc. Of the 7th Int. Conf. Mushroom Biol. Mushroom Prod.* (ICMBMP7), 224-231(2011).
 76. Honda, K., Kataoka, M. and Shimizu, S., "Enzymatic Preparation of D-beta-acetylthioisobutyric Acid and Cetraxate Hydrochloride Using a Stereo- and/or Regioselective Hydrolase," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 288-292(2002).
 77. Honda, K., Sakamoto, K., Kita, S., Kataoka, M. and Shimizu, S., "Biocatalytic Deprotection of a Cetraxate Ester by *Microbacterium* sp. Strain 7-1W Cells," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 192-194 (2003).
 78. Kopp, F. and Marahiel, M. A., "Macrocyclization Strategies in Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthesis," *Nat. Prod. Rep.*, **24**, 735-749(2007).
 79. Wang, M., Zhou, H., Wirz, M., Tang, Y. and Boddy, C. N., "A Thioesterase from An Iterative Fungal Polyketide Synthase Shows Macrocyclization and Cross Coupling Activity and May Play a Role in Controlling Iterative Cycling Through Product Offloading," *Biochem.*, **48**(27), 6288-6290(2009).
 80. Pinto, A., Wang, M., Horsman, M. and Boddy, C. N., "6-Deoxyerythronolide B Synthase Thioesterase-catalyzed Macrocyclization is Highly Stereoselective," *Org. Lett.*, **14**(9), 2278-81(2012).
 81. Walsh, C. T., "Combinatorial Biosynthesis of Antibiotics: Challenges and Opportunities," *ChemBioChem*, **3**, 125-134(2002).
 82. Kiss, G., Celebi-Olcum, N., Moretti, R., Baker, D. and Houk, K. N., "Computational Enzyme Design," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 2-28(2013).
 83. Otten, L. *et al.*, "Enzyme Engineering for Enantioselectivity: from Trial-and-error to Rational Design?," *Trends Biotechnol.*, **28**, 46-54(2010).
 84. Planson, A. G., Carbonell, P., Grigoras, I. and Faulon, J. L., "Engineering Antibiotic Production and Overcoming Bacterial Resistance," *Biotechnol. J.*, **6**, 812-825(2011).
 85. Pirie, C. M., De Mey, M., Prather, K. L. J. and Ajikumar, P. K., "Integrating the Protein and Metabolic Engineering Toolkits for Next-generation Chemical Biosynthesis," *ACS Chem. Biol.*, **8**(4), 662-672(2013).