

## 2. 방향적 진화(Directed evolution; Appl. Microbiol. Biotechnol., 55, 519(2001))

### <요약>

생명공학 산업에서 매우 중요한 분야로서 새롭고 향상된 특성을 갖는 효소를 만들기 위한 핵심기술인 방향적 진화가 나타났다. 방향적 진화를 이용한 접근은 최적화되어야 할 목표 효소의 확인과 관계된 유전자의 클로닝으로부터 시작된다. 효율적인 발현시스템은 목표 유전자의 무작위 돌연변이(random mutagenesis)나 생체의 재조합(in vitro recombination) 전에 요구되며, 따라서 분자의 다양성을 만들어 낸다. 그래서 바람직한 특성을 갖는 효소를 스크리닝하거나 선별하여 향상된 효소의 변이체들을 확인하는데, 이 작업은 배양액에 분비된 후에 하는 것이 유리하다. 이러한 향상된 효소를 인코딩하는 유전자들은 다음 단계의 방향적 진화를 위한 모체로 사용된다.

### <서론>

광학적으로 순수한 성분들의 생산은 화학 및 제약산업에 있어서 그 중요성이 계속 증가하고 있으며, 키랄성 정밀화학 제품, 제약, 농업 화학제품, 향 성분등의 세계시장이 급속도로 팽창하고 있다. 2000년도에 키랄성 약물들에 대한 세계시장은 처음으로 1000억달러가 넘었다(Chem. Eng. News, 78, 55(2000)). 키랄성 약물들에 대한 요구는 세포 표면의 수용체들이 키랄성의 생물분자들이고, 효율적인 약물 분자들은 수용체의 비대칭성과 조합되어야 한다. 더구나 FDA(US Food and Drug Administration)는 회사들에 이러한 약물분자가 단일 이성질체로서 생산될 수 있는지 또는 없는지에 대한 엄격한 평가를 요구하고 있다.

광학활성 성분들의 합성에 대한 이러한 요구들에 어떻게 대처할 수 있을 것인가? 기본적으로 화학 촉매 또는 효소에 의한 두가지 방법이 가능하다. 효소에 의한 방법의 경우 입체 선택성 반응을 촉매하는 능력을 갖는 많은 효소들이 광범위한 스크리닝 프로그램에 의해 밝혀졌다. 그러나 대부분의 경우 주어진 효소의 입체 선택성은 바람직한 반응에 충분치는 않다. 그래서 입체 선택성 효소들을 만들 수 있는 좋은 방법들을 개발하는 것이 필요하다.

오늘날의 효소들은 수백만년이 걸리는 생물학적 진화의 산물이다. 이들 효소들은 보통 주어진 반응을 높은 특이성과 입체 선택성을 갖고 촉매한다. 그러나 효소들은 그들의 생리학적 역할에 완전하게 적응되었기 때문에 활성이나 안정성은 종종 유기 화학자들이 필요한 것과는 거리가 먼 경우가 있다. 이러한 경우는 유기용매들에 대한 효소들의 안정성을 볼 때 실제로 나타나는 일이며, 특히 산업적으로 중요한 성분들을 생산하는 반응들의 입체 선택성에 대해서도 나타난다.

자연적인 진화는 돌연변이에 의해 수많은 변이체를 만들어 내며, 이어서 적합한 변이체를 선별한다. 이러한 과정은 현대의 분자생물학적 방법들인 돌연변이와 재조합 기술을 이용하여 시험관에서 수행될 수 있다. 이러한 방법들을 방향적(directed) 또는 생체의(in vitro) 진화라고 하며, 효소의 구조들이나 촉매하는 메카니즘을 알지 못해도 특수한 성질들을 갖는 생체촉매들을 개발하기 위한 강력한 도구로서 이용된다(Curr. Opin. Chem. Biol., 4, 68(2000); Curr. Opin. Biotechnol., 11, 325(2000)). 이러한 방향적 진화는 변형된 기질 특이성(Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 10747(1994) & 94, 4504(1997) & 95, 5511(1998); Nature, 403, 617(2000)), 내열성(Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 12809(1998); Protein

Eng., 12, 47(1999)), 유기용매에 대한 저항성(Protein Eng., 9, 77(1994); Nature Biotechnol., 14, 458(1996))을 갖는 효소들을 생산할 수 있다. 그러나 현재 어떠한 전략이 바람직한 특성을 위한 진화 또는 주어진 단백질에 대해 가장 효율적인가는 명확치 않다. 본문에서는 방향적 진화를 위한 현재의 방법들을 요약하기로 한다.

#### <효소의 방향적 진화를 위한 일반적인 전략>

방향적 진화에 의해 새로운 특성을 갖는 효소들을 분리하는 일반적인 전략은 다음과 같다.

---

#### ● 생체축매의 방향적 진화를 위한 실험적 전략

- 1) 비재조합 또는 재조합 기술을 이용하여 무작위 돌연변이를 발생시켜 변이체 library 들을 얻는다.
  - 2) 돌연변이 유전자들을 적절한 박테리아를 숙주로 하여 발현시킨다.
  - 3) 효소 변이체들중 향상된 특성을 갖는 변이체를 선별하거나 스크리닝한다.
  - 4) 이러한 효소 변이체들을 인코딩하는 유전자들을 다음 단계의 방향적 진화를 위해 template로 사용한다. 예를들면 *epPCR* (error-prone polymerase chain reaction), *StEP* (staggered extension process), *ITCHY* (incremental truncation for the creation of hybrid enzymes)등이 있다.
- 

분자의 다양성은 목표 유전자 또는 일련의 관련된 유전자들의 무작위 돌연변이나 재조합 기술에 의해 만들어진다. 더 향상된 변이체들을 스크리닝하거나 선별하기 위해 높은 농도의 변이 단백질이 발현되는 강력한 발현시스템이 요구된다. 많은 경우에 흥미있는 단백질이 박테리아 배양액에 분비되면 스크리닝 작업이 상당히 쉬워지고, 특히 microtiter plate를 이용할 때 더욱 그렇다. 향상된 특성들을 갖는 효소 변이체들이 확인되면 상응하는 유전자들은 다음 단계의 진화를 위한 모체로 사용한다.

생체축매의 핵심적인 특성을 향상시키기 위한 다양한 방향적 진화에 대한 여러 우수한 고찰이 있었고(Curr. Opin. Biotechnol., 11, 325(2000); Curr. Struct. Biol., 10, 421(2000)), 여러 단계의 방향적 진화에 관련한 실험에 대해 간단히 설명하기로 한다.

#### ● 유전자들의 overexpression과 효소들의 분비

성공적인 방향적 진화 프로토콜의 확립에 필요한 첫번째 단계는 빈번히 사소한 것으로 간주되기도 한다. 다행히도 일부 단백질들은 상업적으로 이용가능한 시스템을 사용해 쉽게 발현되어 분비될 수 있는데(Curr. Opin. Biotechnol., 6, 517(1995) & 8, 547(1997) & 10, 411(1999)), 이 중 잘 알려진 한 예로서 *Bacillus subtilis*의 subtilisin이 있다(Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 597(1998)). 그러나 흥미있는 많은 효소들은 그러한 시스템에 맞지 않는데, 예를들면 다양한 많은 리파아제(lipase)의 경우가 그렇다. 이러한 경우에 목적하는 효소변이체가 생산될 수 있도록 클로닝 및 overexpression 시스템을 개발하여야 한다. 다음은 유전자 발현과 효소분비에 대한 적절한 시스템을 요약하였다.

---

● 유전자 overexpression과 효소분비에 대한 적절한 시스템  
(*Pseudomonas aeruginosa*의 리파아제)

- 1) 흥미있는 유전자를 발현벡터에 클로닝한다.
  - 2) 플라스미드를 transformation에 의해 박테리아 세포에 도입한다.
  - 3) 유전자 발현은 cytoplasmic membrane을 통해 분비되는 preprotein의 합성을 유도한다. 여러 다른 촉매들이 periplasm에서 성숙된 효소의 폴딩을 돕는다. 성숙된 효소는 분비경로를 통하여 외막을 가로질러 전달된다.
  - 4) 활성 효소를 포함하는 배양여액은 적절한 생물전환반응을 촉매하는데 이용된다.
- 

예로서 다양한 생물전환반응에 많이 쓰이는 *Pseudomonas* 종들로부터 생산된 리파아제를 들 수 있다(Trends Biotechnol., 16, 396(1998)). 이 효소들은 배양여액에서 효소학적으로 활성상태로 회수되기 전에 약 30종류의 다른 세포 단백질들의 기능적 도움이 필요하다(Biochimie, 82, 1(2000)). 더구나 많은 효소들은 유사한 숙주에서는 발현이 되지 않아 상이한 숙주 생물에서 발현을 시켜야 하는 복잡성이 있을 수 있다. *Pseudomonas* 효소들에 있어서 폴딩과 분비는 매우 특정한 과정들에 의해 수행되며, 보통 상이한 숙주들에서는 적절한 기능이 일어나지 않는다는 사실이 알려져 있다.

<입체선택성 생체촉매들을 확인하는 방법들>

무작위 돌연변이나 재조합 기술의 응용은  $10^6 - 10^{10}$ 의 유전자들로 구성되는 돌연변이 유전자들의 커다란 library를 만들어 낸다. 300개의 아미노산 잔기들로 구성되는 효소는 이론적으로 20개 아미노산 각각의 위치에서  $20^{300}$ 의 가능한 조합을 갖고 존재할 수 있다. 이러한 크기의 library가 주어졌을 때 향상된 입체선택성을 갖는 효소들을 확인하는 작업은 쉽지 않다. 일반적으로 더 나은 또는 가장 뛰어난 변이체를 선별하는 것은 방법의 선택에 대한 문제이다. 지난 수년동안 새로운 선별시스템에 관련한 논문들이 많이 출판되었다(Science, 269, 1835(1995); Bioorg. Med. Chem. Lett., 6, 789(1996) & 7, 479(1997); Proc. Natl. Acad. Sci., 94, 4937(1997) & 95, 14130(1998); Nature Biotechnol., 16, 955(1998)). 비록 성분들이 phage display에 의해 입체선택성 리파아제를 확인할 수 있도록 합성되었지만(Bioorg. Med. Chem., 8, 507(2000); Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 2027(2000)), 어떠한 방법도 현재까지 입체선택성 효소들을 직접적으로 선별할 수는 없었다. 그러므로 입체선택성에 대한 스크리닝은 현재 어떠한 방법을 선택하느냐에 대한 문제이다. Reetz는 많은 효율적인 스크리닝 시스템을 개발하였고(Appl. Microbiol. Biotechnol., 55, 531(2001)), high-throughput screening(HTS)을 위한 방법으로 spectrophotometric assay (Angew. Chem. Int. Ed., 36, 2830(1997)), IR-thermography(Angew. Chem. Int. Ed., 37, 2647(1998)), electrospray ionization mass spectrometry(ESI-MS)(Angew. Chem. Int. Ed., 38, 1758(1999)), 그리고 capillary array electrophoresis on chiral columns(Angew. Chem. Int. Ed., 39, 3891(2000))등이 있다. 이러한 방법들에 대한 자세

한 고찰에 관한 논문도 출판되었다(Angew. Chem. Int. Ed., 40, 1000(2001)).

<비재조합 방법들에 의한 library의 제작>

● Error-prone polymerase chain reaction(ep-PCR)

중합효소연쇄반응(PCR)의 개발과 내열성이 있는 DNA 중합효소를 사용함으로써 효율적인 방향적 진화를 위한 방법을 개발할 수 있는 길이 열렸다(Science, 230, 1350(1985) & 239, 487(1988); Methods Enzymol, 55, 335(1987)). 수많은 내열성 DNA 중합효소가 상업적으로 이용가능한데, 그 예로서 *Taq*- (Roche Diagnostics, Gibco-BRL, Fermentas), *Tth*- (Roche Diagnostics, Perkin-Elmer), *Pwo*- (Roche Diagnostics), *Pfu*-polymerase (Stratagene)등이 있다. 고온성 박테리아인 *Thermus aquaticus* (J. Bacteriol., 127, 1550(1976))로부터 분리된 *Taq*-polymerase는 소위 생체의 반응에서 교정 활성이 부족하여  $0.1 - 2 \times 10^{-4}$ 의 빈도로 잘못된 뉴클레오티드를 결합시킨다(Biochemistry, 27, 6008(1988); Nucleic Acids Res., 18, 3739(1990)). 보통 복제하는 동안 잘못된 뉴클레오티드가 DNA에 결합이 되면 바뀐 환경에 대처할 수 있는 새로운 변이 단백질을 생산할 수 있게 하는 중요한 추진력이 될 수 있다. 따라서 여러 프로토콜들이 *Taq*-polymerase의 실수 빈도를 높이려는 목적으로 개발되었는데, 다음의 대표적인 4가지 예를 들 수 있다(Nucleic Acids Res., 19, 6052(1991); PCR Methods Appl., 2, 29(1992); PCR primer: a laboratory manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, p 583(1995); J. Mol. Biol., 255, 589(1996)).

- 1)  $MgCl_2$  농도의 증가
- 2)  $MnCl_2$  의 첨가
- 3) 불균형의 뉴클레오티드 농도 이용
- 4) triphosphate nucleoside 유사물질 이용

이밖에도 표준 PCR 프로토콜을 변형시킴으로서 더 높은 실수 빈도를 얻을 수 있다

● Site-specific saturation mutagenesis

error-prone PCR에 의한 무작위 돌연변이는 point mutation을 유도한다. 그러나 특정 목표 단백질의 모든 아미노산들이 같은 비율로 교환이 되지 않는데, 이러한 이유로는 20개의 아미노산을 인코딩하는 61개의 코돈과 stop 코돈으로서 사용되는 3개의 코돈을 갖는 유전자 코드의 퇴화 때문이다. 20개 아미노산중 오직 2개의 아미노산이 단일 코돈에 의해 지정이 되는데, 그 예로서 UGG에 의한 Trp 그리고 AUG에 의한 Met가 그것이다. 반면에 다른 아미노산인 Leu, Ser, Arg는 각각 6개의 다른 코돈들에 의해 인코딩된다. 이러한 결과로서 ep-PCR에 의해 유도되는 모든 염기치환의 약 1/3은 아미노산 치환이 되지 않는다. 더구나 단일코돈에서 2-3개의 염기치환의 경우는 낮다. 트리플렛(triplet)에서 1 염기쌍을 바꿈에 의해 9개의 다른 코돈이 생길 수 있는데, 예를들면 오직 적은 수의 아미노산만이 효소의 주어진 위치에서 유도될 수 있다. *Pseudomonas aeruginosa* 리파아제(285-아미노산 단백질

질)에 유도될 수 있는 아미노산 교환은 단일염기 치환에 의해 생산될 수 있는 변이체의 실제 수는 이론적으로 34%밖에 되지 않는다(Chem. Biol., 7, 709(2000)). 이러한 문제는 부분적으로 site-specific saturation mutagenesis를 응용함으로써 보완이 될 수 있는데, 유전자에 미리 정해진 위치에 모든 가능한 아미노산을 도입하는데 이용될 수 있다. 무작위 돌연변이, 스크리닝, DNA서열분석의 첫단계에서 흥미있는 특성을 향상시키기 위해 중요한 위치들이 확인될 수 있다. 그러한 hot spots는 최적의 아미노산이 이전 단계의 무작위 돌연변이에 의해 도입이 제대로 되었는지 알아내기 위해 site-specific saturation mutagenesis에 필요하다.

여러 가지 기술들이 site-specific saturation mutagenesis을 위해 이용될 수 있다. Cassette mutagenesis는 전체의 목표 유전자 서열의 합성과 목표 유전자의 2곳의 독특한 제한 위치(restriction site)들에 ligation됨으로서 수행될 수 있다. 합성동안 모든 뉴클레오티드(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)는 주어진 위치에서 같은 비율로 결합이 되며, 이 과정동안 각각의 뉴클레오티드의 25%가 이용된다. 만약 적절한 제한 위치가 없다면 site-specific saturation mutagenesis는 site-directed mutagenesis를 위해 사용되는 PCR방법에 의해 수행될 수도 있다(Nucleic Acids Res., 17, 5405 & 22, 541(1993); Gene, 96, 125(1990)). 이러한 목적으로 one-step overlap extension PCR이라 불리는 간단하고 효율적인 PCR기술이 개발되었다(Nucleic Acids Res., 25, 2227(1997)).

site-specific saturation mutagenesis는 특정한 코돈 위치에서 같은 몰농도의 뉴클레오사이드 phosphoramidites(dA, dC, dG, dT)를 이용하여 mutagenic primer a와 b를 합성함에 의해 수행된다. 그러나 이러한 변이체 군들은 원래의 뉴클레오티드에 치우치는 경향을 보여 주는데, 이것은 올리고뉴클레오티드를 합성하는 동안 뉴클레오사이드 phosphoramidites의 농도들을 변화시킴으로서 없앨 수 있다(Nucleic Acids Res., 26, 576(1998)).

## ● Cassette mutagenesis

이 방법은 제한적이고 정의된 유전자 일부분에 대한 돌연변이가 필요할 때 사용된다. 그러한 유전자 조각은 기능적으로 효소의 중요한 도메인을 인코딩할 수도 있는데, 이러한 유전자 조각들은 이전에 3차원 구조 데이터를 이용하여 합리적인 설계에 의한 접근이나 ep-PCR library의 스크리닝에 기초를 두고 hot spot을 정의함에 의해 확인될 수 있었다. 그러한 유전자 조각들은 무작위로 돌연변이된 DNA cassette에 의해 대체될 수 있다. 작은 크기의 cassette는 무작위 point mutation을 이용하여 올리고뉴클레오티드를 합성해 이용할 수 있고, 50개의 염기쌍보다 큰 cassette를 위해서는 전통적인 ep-PCR방법을 이용할 수 있다.

Cassette mutagenesis 방법은 높은 실수 빈도를 유도하는 돌연변이를 이용하므로, 미리 정해진 위치에서 많은 다양성을 갖는 library를 만들며, 스크리닝해야 할 변이체 library들의 크기를 최소화한다.

### <재조합 방법들에 의한 library의 제작>

DNA shuffling은 생체의 재조합 기술로 생체촉매들의 방향적 진화를 위한 중요한 도구로 증명되었다(Nature, 370, 389(1994); Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 10747(1994)). 최근

에 변이체 library들을 만들기 위해 다른 효율적인 재조합 방법들이 개발되었는데, PCR에 기초를 둔 staggered extension process(*StEP*; Nat. Biotechnol., 16, 258(1998)), random-priming recombination(Nucleic Acids Res., 26, 681(1998)), heteroduplex recombination(Nucleic Acids Res., 27, 18(1999)), incremental truncation for the creation of hybrid enzymes(*ITCHY*; Bioorg. Med. Chem., 7, 2139(1999))등이 그것이다. 이들 방법들을 간단히 설명한다.

#### ● DNA shuffling

Homologous DNA 서열들을 유전자 단편들로 자르고 DNA중합효소에 의해 촉매되는 self-priming chain extension method에 의해 재결합하는 방법으로 시험관에서 재조합된다. 관련된 유전자들은 10 ~ 50 bp 길이의 double stranded DNA 단편을 생산하기 위해 DNase I으로 처리한다. 이 단편들은 모체 template를 annealing하는 반복된 싸이클과 DNA중합효소에 의한 중합반응으로 구성된 PCR과 비슷한 반응에 의해 완전한 길이의 유전자로 재결합된다. 재조합은 template switching에 의해 일어나는데, 한 유전자로부터 잘린 단편은 다른 유전자로부터 잘린 단편과 annealing된다. 이러한 과정동안 추가적인 point mutation들이 무작위로 0.7%의 비율로 DNA에 도입되는데, 이 비율은 ep-PCR에 의해 얻는 빈도와 비슷하다(Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 10747(1994)). 더 높은 신뢰를 갖는 DNA 복제(예를들면, 더 낮은 비율의 잘못된 뉴클레오티드의 결합등)를 유도하는 변형된 shuffling 프로토콜도 이용 가능하다(Nucleic Acids Res., 25, 1307(1997)).

원래의 DNA shuffling 방법의 연장으로 다른 종들로부터 온 같은 유전자의 변이체 또는 유사한 유전자들을 재조합할 수도 있다. Molecular breeding이라고 부르는 이 방법은 Family Shuffling기술로서 Maxygen회사(Redwood City, Calif., USA)가 소유하고 있으며, 현재 중요한 효소들을 만들거나 향상시키는데 널리 사용되고 있다(Nature, 391, 2889(1988); Nat. Biotechnol., 17, 259(1999) & 17, 893(1999)).

#### <Staggered extension process(StEP)>

StEP는 변형된 PCR방법에 기초를 두고 있다. 2개 또는 그 이상의 DNA template 서열들이 특정한 올리고뉴클레오티드로 annealing된다. template 서열들의 priming은 denaturation의 반복된 싸이클, 극도로 단축된 annealing 시간, 산물의 DNA중합효소로 촉매되는 extension이 포함된다. 이 과정은 완전한 길이의 유전자가 생성될 때까지 계속된다. denaturation과 annealing phase동안 일어나는 template switching은 결국 무작위로 재조합된 모체 서열들을 운반하는 완전한 길이의 유전자를 생산한다.

#### <Random-priming recombination>

PCR에 기초를 둔 또 다른 재조합 방법은 수많은 짧은 DNA 단편들을 만들기 위해 무작위로 올리고뉴클레오티드 primer들을 사용한다(Nucleic Acids Res., 26, 681(1998)). 이 단편들은 denaturation의 반복, annealing, 효소에 의한 DNA 중합에 의해 완전한 길이를 갖는 변이체의 library에 재결합된다. 이 과정동안 random-sequence primer들의 잘못된

priming으로 인해 추가적인 point mutation이 유도된다. 재조합 빈도 뿐만 아니라 개개의 실수 빈도는 random primer의 길이나 농도를 조절하거나 annealing 온도나 반응시간을 선택함에 의해 변화시킬 수 있다.

#### <Heteroduplex recombination>

생체의 heteroduplex 형성과 생체내 복구(repair)에 대한 방법은 크기가 큰 유전자들 또는 전체 오피론들의 효율적인 재조합을 위한 도구가 된다. 2개의 밀접하게 관계된 DNA서열들로 구성된 heteroduplex가 시험관에서 형성되고, 이어서 박테리아에 transformion되는데, 여기에서 부적절한 조합이 자연적인 DNA 복구 메커니즘에 의해 확인된다. 재조합 과정은 double-stranded DNA분자들 사이에 물리적 교환은 없지만, 여러 돌연변이들이 조합된 일련의 서열들이 생긴다(Nucleic Acids Res., 27, 18(1999)).

#### <Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes(ITCHY)>

지금까지 언급했던 모든 생체의 재조합 방법들은 상대적으로 목표 유전자 서열들에 있어서 높은 DNA 유사성을 필요로 했는데, 이러한 유사성이 부족하면 재조합이 유사한 부분에서만 일어나던지 또는 전혀 일어나지 않을 수도 있다. 서열 유사성과 관계없는 융합된 유전자 단편들의 library를 만드는 방법이 개발되었고, 이를 Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes(ITCHY)라고 부른다(Bioorg. Med. Chem., 7, 2139(1999); Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 3562(1999); Nat. Biotechnol., 17, 1205(1999)). 2개의 모체 유전자들을 1개의 염기쌍을 삭제한 유전자 library로 만들기 위해 매우 잘 조절된 방법하에 exonuclease III 로 처리한다. 한 유전자의 잘린 5'-단편들과 다른 유전자의 3'-단편들이 키메라(chimeric) 서열의 library를 만들기 위해 융합되는데, 이것이 발현되고 향상된 효소 활성을 위해 스크리닝하거나 선별된다. 이 방법은 DNA서열의 유사성과 관계없는 amino- 또는 carboxy-terminal 유전자 단편들을 겹치게 함으로서 유전자들의 기능적 융합을 유도한다. 현재의 단점은 실험당 오직 2개의 유전자만 융합을 시킬 수 있고, 2개의 단편들 사이에 단일 crossover만이 만들어져 library의 다양성에 부족함이 있다(Curr. Opin. Biotechnol., 11, 319(2000)). 그러므로 ITCHY와 DNA shuffling을 조합시킴으로서 단백질 서열에 대한 최적화된 시료를 얻을 수 있을지도 모른다(Nat. Biotechnol., 17, 1205(1999)).

#### <최근의 참고문헌>

1. Nature, 417, 468(2002)
2. Biotechnol. Prog., 18, 413(2002)
3. ChemBioChem, 4, 34(2003)