

미생물 계면활성제에 있어 유기용매중의 효소반응

남기대 · 김상춘 · 최재효*

충북대학교 공과대학 화학공학과
*미원중앙연구소

Enzyme Reactions in Organic Solvents on the Biosurfactant

Nam, Ki-Dae · Kim, Sang-Chun · Choi, Jae-Hyo

Dept. of Chemical Engineering, Chungbuk National University
**Miwon Ltd. Central Research Institute*

(Received May. 20, 1993)

ABSTRACT

Recent studies on enzyme reactions in organic solvents are revived. The reactions are classified into three categories: heterogeneous, biphasic and homogeneous systems. The following subjects are described and discussed about the heterogeneous system.

- 1) The maximal expression of enzyme activity in organic solvents in terms of water content, hydration of enzyme, and equilibrium of water between enzyme and substrate solution.
- 2) Solvent effect on the catalytic power of enzyme.
- 3) Thermostability and thermoreactivity.
- 4) Applications of the enzyme reactions to synthetic chemistry.

I. 서 론

효소반응은 상온 · 상압 · 중성 부근이라는 극히 온화한 조건하에서, 특정 화합물에 대하여 특이적으로 반응하는 것이 그 특징이다. 따라서 이것을 물질생산에 사용하면 대체에너지 뿐만 아니라 화학적으로 합성이 곤란한 화합물로 응용할 수 있다.^{1~3)} 그러나 일반적인 유기화합물을 포함하여 지방산과 triglyceride 등의 물에 난용성 화합물을 대상으로 하는 효소반응에서는 기질을 용해하기도 하고, 정해진 농도로 반응하기 위해서는 유기용매를 사용할 필요가 있다.⁴⁾ 이러한 관점에서 근년 유기용매중의 효소반응이 연구되어 그 가능성이 발견되고 있다.^{4~9)} 유기용매에

서의 효소반응은 그 반응 형태에 따라서 3종류로 분류할 수 있다.^{7, 10~12)}

1. 불균일계 효소반응

효소 단백질이 본래 유기용매에 용해하지 않는다는 입장에서 효소를 분말상태 그대로 사용하여 기질 용액중에 효소를 현탁하고 물에 난용성 화합물을 유기용매에 용해하여 반응시키므로 고체 촉매를 사용한 고-액 불균일계의 화학반응에 해당한다. 또 고정화 효소에 의한 반응도 이것에 해당한다.⁴⁾ 유리효소를 사용한 경우 그 활성 발현기구는 현재로는 확립되어 있지 않다.

유리효소를 사용한 불균일계 유기용매중에서의 효소반응은 Price 등에 의하여 α -키모트립신¹³⁾과 크산

틴 옥시다제¹⁴⁾에 관하여 그 안정성과 반응성에 관하여 연구된 것이 최초의 보고이며, 그 후 Blain 등¹⁵⁾은 조정제 리파제에 의하여 유지를 가수분해 하였다. 이 계는 더구나 돼지췌장 리파제, protease, peroxydase 등의 효소반응^{8, 9, 16, 17)}에 응용되고, 효소활성이 나타나기 위해서는 미량으로 어느정도 물의 존재가 필요 불가결하고 열안정성은 반대로 수분이 적은 쪽이 좋은 것¹⁶⁾으로 지적되어 있지만 그 상세함에 관해서는 분명하지 않은 점이 많다. 고정화 효소에 대하여는 triglyceride와 지방산과의 에스테르교환이 Yokozeki 등에 의해서 보고¹⁸⁾되어 있고, triglyceride의 1위치에 특이성 치환이 일어나는 것으로 알려져 있다.

2. 서로 다른 상에서 효소반응

효소가 물에 용해하는 성질을 이용하여 물에 난용성인 화합물을 비극성(물에 난용성) 유기용매에 용해하고, 그 계면에서 반응시키기 때문에 계면활성제(역미셀)를 이용한 방법^{19, 20)}이 주류이지만 사용하지 않는 경우²¹⁾도 있다. 후자에서는 용매에 의한 효소 특이성 변화는 기대할 수 없지만, 전자에서는 그 변화가 알려져 있다.^{19, 20)} 또 protease에 의한 peptide 합성과 같이 물에 난용성인 생성물의 제거와 역반응방지를 목적으로 하는 경우도 있다.^{22, 23)} 이 계의 결점으로서 효소가 계면에서 불안정하고 쉽게 활성을 잃기도 하며,¹⁶⁾ 미셀이 불안정하다는 점^{25, 26)}을 들 수 있다.

3. 균일계 효소반응

이 계는 효소 및 기질을 반응용매에 용해하여 수용액 중의 효소반응과 마찬가지로 반응시키는 것이다. 수용성 유기용매(예를 들면, ethanol과 acetonitrile)에 물(일반적으로 완충액)을 가하여 행해지고 있다. 이 계는 보통 이상계와 마찬가지로 효소와 물과의 상호작용이 유기용매와의 상호작용 보다도 강하기 때문에, 용매에 의한 효소의 특이성 변환은 기대할 수 없다.²⁷⁾ 또 수분량이 적으면 효소가 용해하지 않고, 1의 불균일계로 된다.²⁸⁾ 효소를 polyethylene glycol로 수식하면 벤젠 등의 유기용매에 용해되어 본래의 효소활성을 잃지 않는 것으로 알려져 있다.²⁹⁾ 그러나 위의 불균일계와 이상계와는 달리, 활성을 나타내는

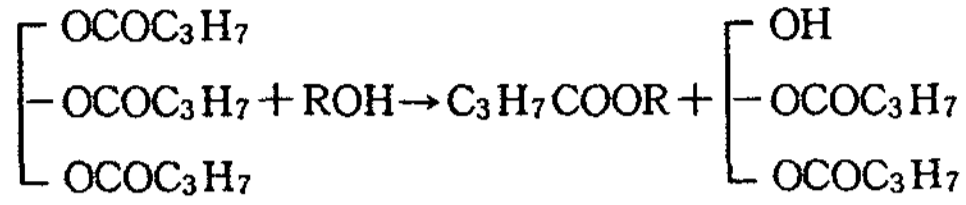
용매에 제약이 있고 활성저하 등의 문제점이 있다.^{17, 30)} 또한 현 단계에서 용매에 의한 특이성 변화는 연구되어 있지 않다.

이상 유기용매를 사용한 3종의 반응형태에 관하여 개설하였으나, 지면 관계상 본고에서는 반응의 편리함 때문에 최근 연구가 많은 불균일계 효소반응에 관하여 물의 효과, 용매 효과, 효소의 내열성, 합성반응에 관하여 서술한다.

II. 물과 효소의 활성

효소가 촉매활성을 나타내기 위해 필요한 입체구조를 유지하기 위해서는 물(수화수: essential water)이 필요하다는 것은 이미 알려져 있다.³¹⁾ 이 수화수의 양과 구조 및 활성과의 상관성을 조사한 효소의 수는 적지만, lysozyme에 관하여는 꽤 상세히 연구^{32~35)}되어 있고, 효소의 수화율과 활성 및 구조변화 사이에 상관성이 있는 것으로 보고되어 있다.³³⁾ 따라서 유기용매에서의 효소반응도 당연히 물이 필요 불가결하다. 가령 반응을 거의 물이 존재하지 않는 용액중에서 행한다 할지라도 보통 효소 단백질 위에 물이 존재한다고 생각하는 것이 타당하다. 이들로 부터 유기용매에서의 효소반응 연구에서 효소의 촉매활성에 미치는 물의 효과를 조사하는 것은 활성발현 기구를 아는 것 이상으로 극히 중요한 것이며, 유기용매에서의 효소 활성발현에 관한 최근 연구도 효소의 수화에 의논이 집중되고 있다.^{8~11, 16, 17, 36~39)}

Klibanov 등은 tributyrin(기질)에서 돼지 췌장 리파제에 의한 에스테르교환에서 물의 존재는 필수적이며 반응속도가 최대가 되는 수분량이(최적 수분량: $(H_2O)_{OP}$ 로 표기) 존재한다는 것을 실험적으로 입증하고 있지만,¹⁶⁾ $(H_2O)_{OP}$ 의 값에 미치는 인자에 관해서는 기술하지 않았다. 또 최근 연구에서 유기용매에서 효소활성 발현기구에 대하여 효소의 수화 관점으로부터 지금까지 불분명한 문제점의 일부는 확실히 해결된 것^{8, 9, 11, 17)}도 있지만, 유기용매에서 효소반응에 관한 연구는 수용액에서의 효소반응에 비하여 아직 초기의 연구단계라고 말할 수 밖에 없다. 그래서 본고에서는 $(H_2O)_{OP}$ 의 값에 미치는 인자를 리파제 촉매에 의한 tributyrin과 지방족 제1급 알코올과의 에스테르교환을 예로서 설명한다.^{7, 10)}



1. 효소의 기원

Fig. 1⁷⁾은 단쇄 지방산 잔기를 갖는 triglyceride의 가수분해능이 높은 6종의 리파제에 의한 에스테르교환에 미치는 첨가 수분량 (H₂O)_{add}의 효과를 나타내었다. 어떠한 경우도 최대 속도를 나타내는 수분량 (H₂O)_{OP}가 존재하고, 그 값은 효소의 기원에 따라 다르다. 또 사용한 리파제는 아래의 3가지 형태로 분류할 수 있다.^{7, 10, 30)}

Type I : 물이 첨가되지 않은 경우 활성(속도)은 극히 낮지만, 첨가 수분량이 증가함에 따라서 급격히 활성이 증대하고 (H₂O)_{add}=(H₂O)_{OP}에서 최대의 활성이 되며 그 이상에서는 활성이 감소하는 경우 [C. c.].

Type II : 물이 첨가되지 않아도 상당한 활성을 나타내며 또한 수분량이 증가하면 더욱 활성이 증가하고 (H₂O)_{OP}에서 최대로 되는 경우[P. f.], [P. s.]

및 [P. p.].

Type III : 물이 첨가되지 않아도 상당한 활성을 나타내며 (H₂O)_{OP}가 존재하는 것은 수분량이 증가하여도 조금 밖에 활성이 증가하지 않는 경우, 즉 수분량에 대하여 활성의 변화가 작은 것 [P. c.] 및 [P. r.].

더구나 type II는 type I과 III의 중간이라고 말할 수 있다. 지금까지 보고된 자료로부터 이 윤곽은 효소와 기질의 농도, 반응용매, 대상반응에 따라 변화하는 것으로 생각되고, type I처럼 활성발현을 위하여 적은 양일지라도 수분 첨가가 필요한 경우와 type II, III처럼 효소의 수화수(결합수)만으로 활성이 충분히 나타나는 것이 있다. 또 어떠한 경우도 미량의 수분이 존재할 때 효소가 작용하기 때문에 이런 종류의 효소 반응은 미수계 효소반응³⁸⁾이라고 한다.

2. 효소 및 기질농도의 효과

(H₂O)_{OP}의 값은 효소농도에 따라서 변화하는 것으로 추정되지만³⁸⁾ 현 단계에서는 그 값의 의미에 관하여 불분명한 점이 많다. 여기서는 반응조건에 따라서 그 값이 변화하는 것으로 나타난다.¹⁰⁾

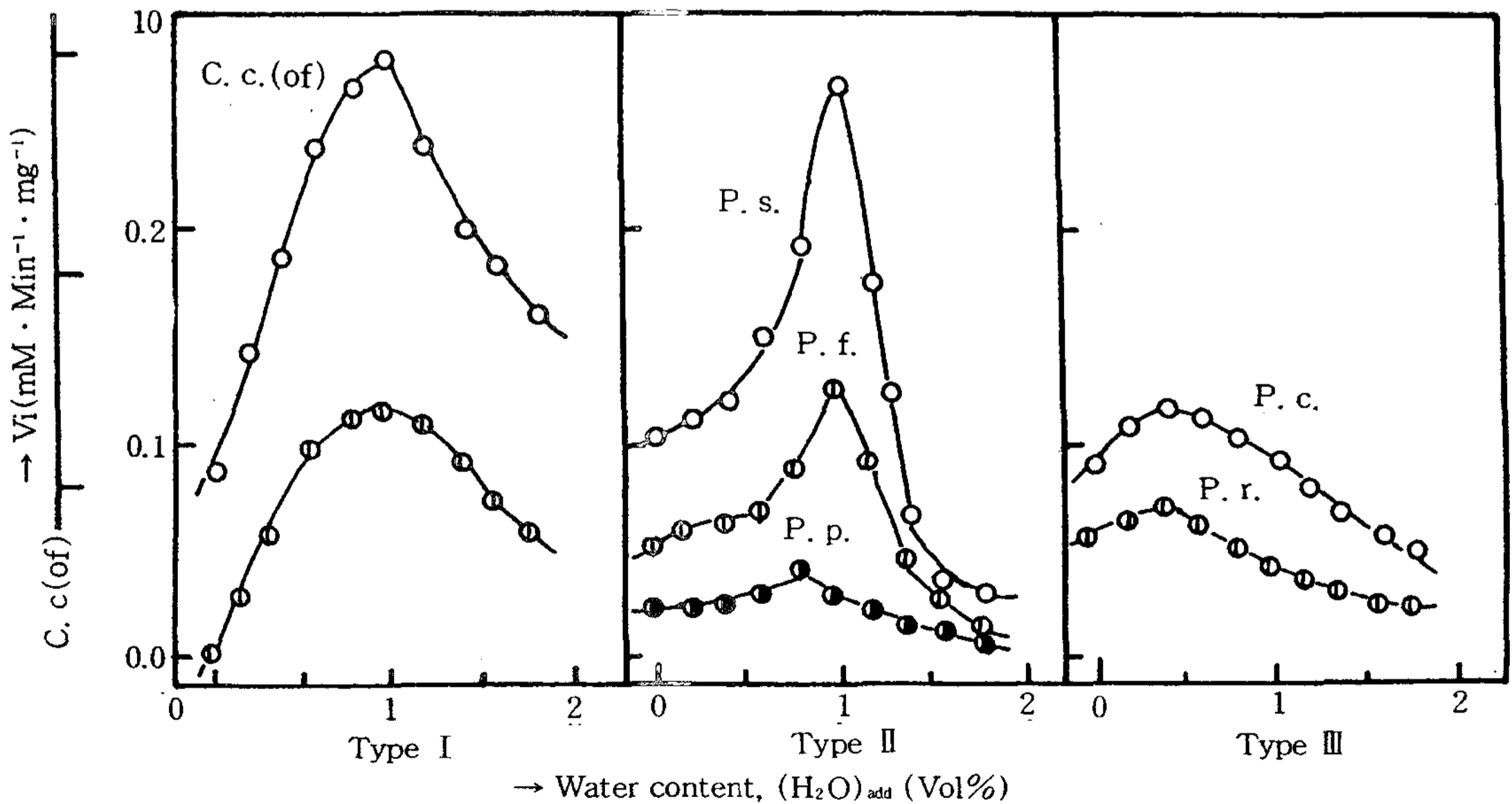


Fig. 1. The effects of the lipase-catalyzed transesterification reaction and addition water between tributyrin and 1-octanol(30°C)

Concentration(reaction time)

Substrate ; Tributyrin containing 2M 1-octanol

Enzyme ; C. c(of) 2mg/ml(30min), etc. 20mg/ml(3hr)

Fig. 2^{7, 10, 37)}는 리파제에 의한 에스테르교환반응에 미치는 효소 및 알코올의 농도 효과를 나타내었다. 이 그림으로 부터 효소활성이 충분히 나타나기 위해서는 소량이지만 수분이 필요하고 그 양은 조건에 따라서 다르다. 즉 효소에서는 활성을 충분히 나타내기 위한 입체구조를 유지하는데에 충분한 수화수가 최소한 필요하다. 동시에 기질도 효소가 작용하기 위한 충분한 수화수가 요구된다.

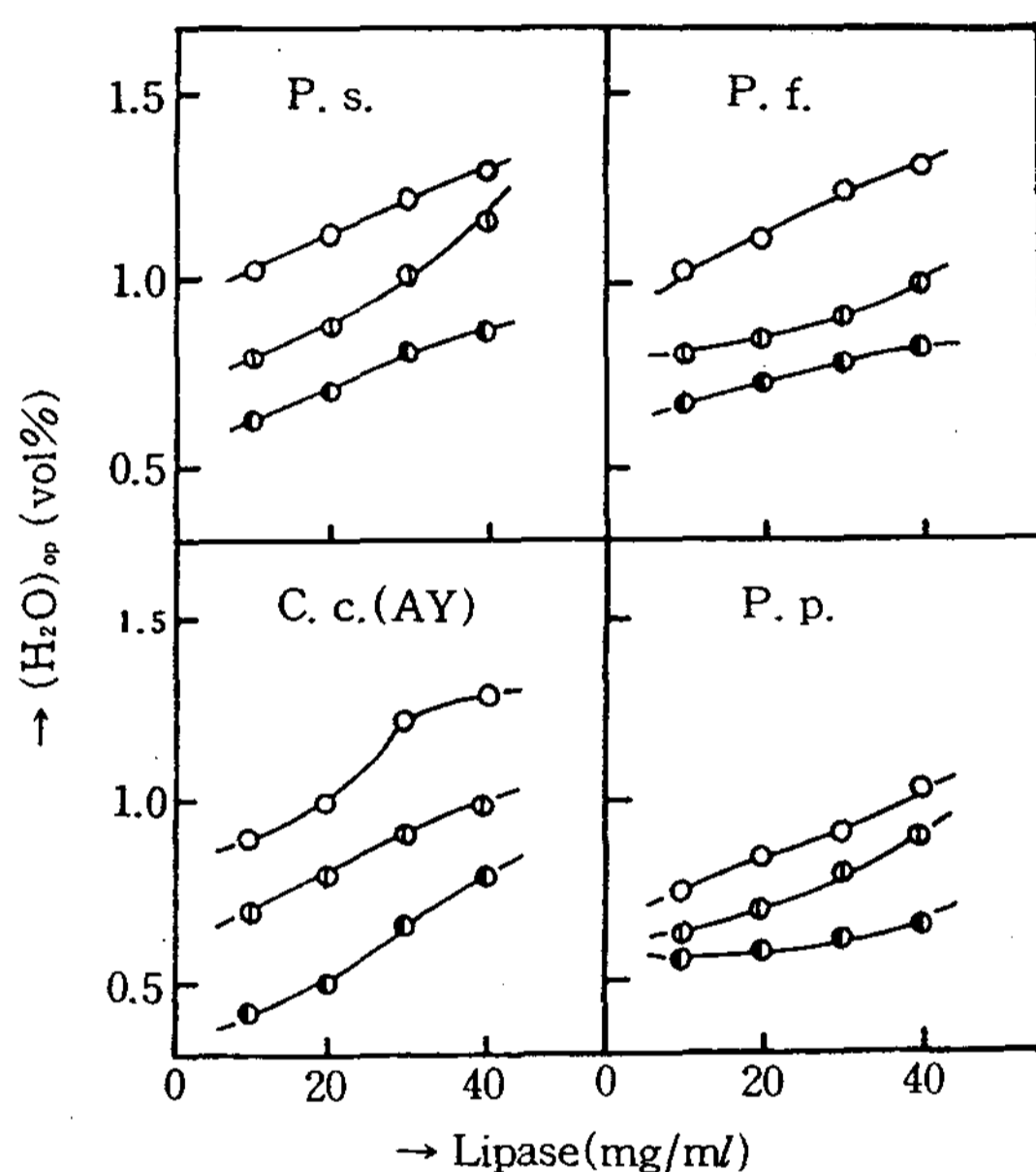


Fig. 2. The effects of the substrate concentration and enzyme in which amount of optimum water $(H_2O)_{\infty}$ the lipase-catalyzed transesterification reaction between tributyrin and 1-octanol.

Concentration of alcohol ; ● : 1.2M : ○ : 0.1M ○ : 2.0M $(H_2O)_{\infty}$ was intercept V_i (initial rate) vs. water content of plot(30°C). The value of $(H_2O)_{\infty}$ was used modification water content $(H_2O)_{add} = 0\text{vol}(\%)$

3. 용매의 영향

Fig. 3⁷⁾ C. c. (of) 리파제에 의한 tributyrin과 1-octanol과의 에스테르교환에 영향을 주는 첨가 수분의 효과를 나타내었다. 이 그림에서 hexane에서는 효소의 농도가 증가하면 $(H_2O)_{OP}$ 의 값은 커지지만, acetonitrile에서는 거의 일정하다는 것을 알 수 있

다. 또 물에 난용성 용매(지방족, 방향족, 염소계 탄화수소용매)에서는 hexane과 같은 경향을 나타내며, 물에 가용인 용매(에테르와 극성용매)에서는 acetonitrile과 같이 $(H_2O)_{OP}$ 의 값은 효소농도에 무관하게 거의 일정하고, diisopropylether에서는 0.70 vol%, dioxane, tetrahydrofuran에서는 1.1~1.2 vol%, methylethylketone, acetone에서는 1.5~1.7 vol%, acetonitrile에서는 2.1~2.2vol%이며, 수용성 용매에서의 $(H_2O)_{OP}$ 값은 물에 난용성인 경우 보다도 크다(Table 1)^{7, 10, 36)}.

Table 1. The effects of solvent offered to $(H_2O)_{\infty}$ the lipase-catalyzed transesterification between tributyrin and 1-octanol

Solvent	$(H_2O)_{\infty}$ (vol%) ^{a)}	
	6.7mg/ml ^{b)}	20mg/ml
Hexane	0.26	0.68
Heptane	0.26	0.62
Isooctane	0.29	0.68
Octane	0.29	0.65
Cyclohexane	0.29	0.65
Carbon tetra chloride	0.29	0.72
Chloform	0.29	0.57
Dichlomethane	0.29	0.39
1, 2-dichloroethane	0.29	0.58
Benzene	0.29	0.57
Toluene	0.26	0.57
1, 2-dichlorobenzene	0.27	0.59
Chlorobenzene	0.29	0.61
Dioxane	1.10	1.10
Diisopropylether	0.70	0.70
THF	1.10	1.20
2-butanone	1.50	1.50
Acetone	1.70	1.70
Acetonitrile	2.10	2.20
N. N-dimethylformamide	0	0
Diethylsulfoxide	0	0

a) Concentration of substate : 0.67M 1-octanol, 0.75M tributyrin, 30°C

b) Concentration of enzyme, lipase : C. C. (OF)

더우기 hexane에서 첨가 수분량이 적을 때에는 반응용액 전체의 수분량(기질용액과 현탁한 효소의 수

분량의 섞임)의 이론치는 검출된 수분량과 거의 1:1의 대응을 나타내고 있지만, 첨가 수분량이 증가하면 검출된 수분량은 이론치보다도 적게 되고 극대치를 갖는다. 이 극대치는 Fig. 3 A로부터 구한 $(H_2O)_{OP}$ 의 값과 일치한다. 또 기질용액의 수분량은 첨가 수분량의 증가와 함께 증가하지만, 첨가 수분량이 높은 경우에는 일정한 값을 나타내고 이 경향은 효소 농도에는 무관하다(Fig. 3 C, 곡선C). 따라서 이 값은 기질용액에서 물의 포화용해도로 결정된 값이라고 생각할 수 있다.

이상의 결과로부터 hexane용매에 물을 첨가하면 그 대부분은 기질용액 중에는 잔류하지 않고 효소의 수화에 사용되며, 효소의 수화가 포화상태가 되면 효소의 응집이 일어나고 반응 기벽상으로의 응집이 일어나 결과적으로 검출된 반응액 전체의 수분량이 감소한다. 따라서 효소 단백질의 확산성이 나빠져서 첨가 수분량이 많은 경우에는 활성이 저하되는 것으로 결론지을 수 있다. 다른 면에서 acetonitrile에서는 반응용액 전체의 이론적 수분량은 검출된 수분량

과 일치하고 첨가 수분량과 직선관계에 있으며, 기질용액 중의 수분량도 또 첨가 수분량과 직선관계를 나타낸다.

효소 단백질과 용매 사이에는 물의 평형이 성립한다. Table 2에서는 탈수한 hexane 중에서 효소의 수화수의 탈리는 전혀 확인되지 않았지만, acetonitrile에서는 수화수가 용매에 의해서 효소 표면으로부터 용매로 추출된다. 또 소량의 물을 함유한 hexane에서는 용매 중의 수분이 효소에 의해서 포착되어 효소의 수화수가 증가하지만 소량의 물을 함유한 acetonitrile에서는 역으로 효소의 수화수는 용매에 의해서 제거된다. 따라서 에테르계와 극성용매 등 수용성 용매에서의 에스테르교환에서 $(H_2O)_{OP}$ 의 값이 지방족 탄화수소, 방향족 탄화수소, 염소계 탄화수소 등의 물에 난용성인 유기용매에서의 경우보다도 큰 값을 나타내는 것은 용매에 의한 효소의 수화수의 추출(혹은 흡수)·탈리, 즉 효소와 용매 사이에서의 물의 평형에 의한 것이라고 말할 수 있다.

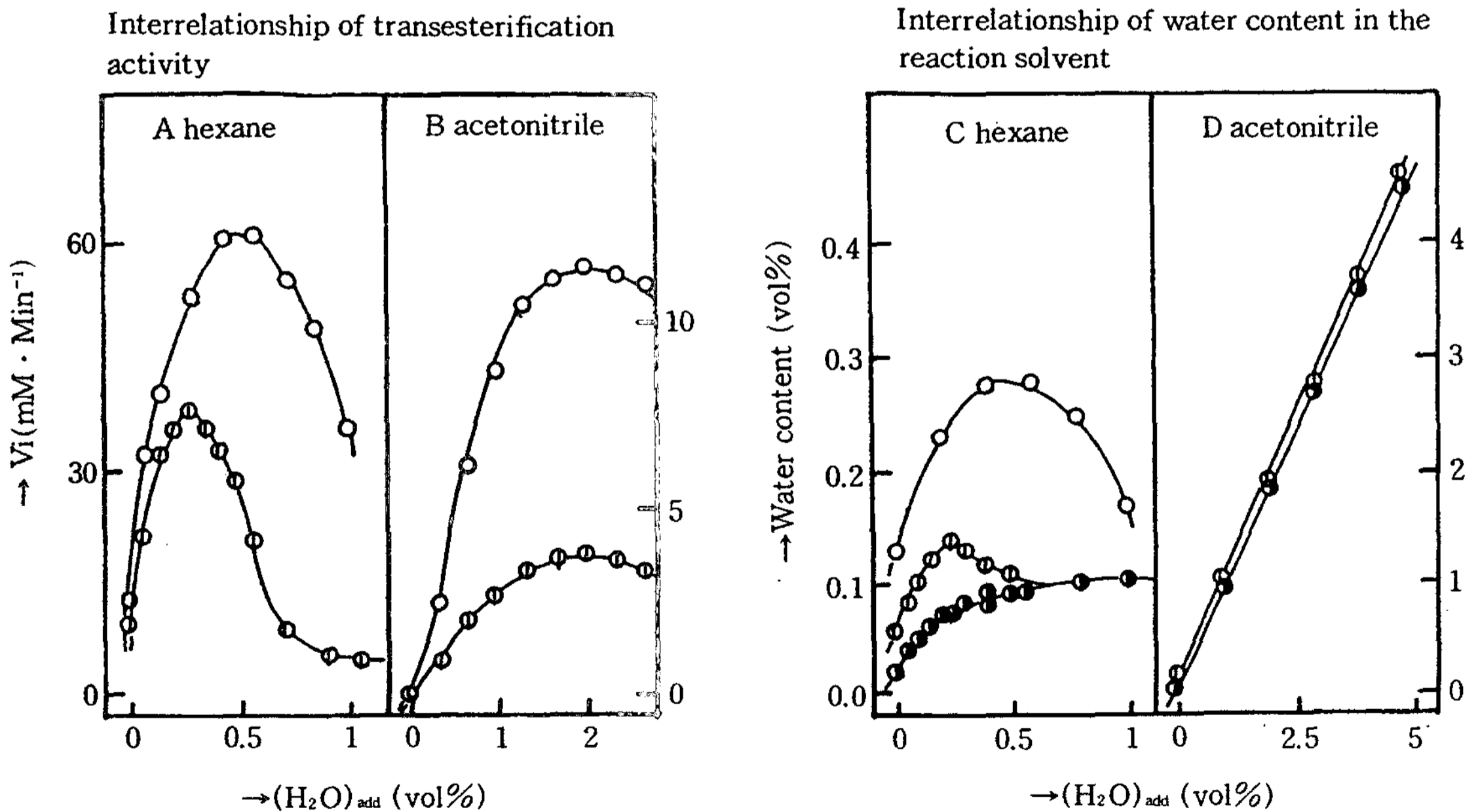


Fig. 3. The effects of water content the C. c.(OF) lipase-catalyzed transesterification between tributyrin and 1-octanol in the organic solvent.

Concentration

Substrate : 0.67M 1-octanol, 0.75M tributyrin

Enzyme : ○ : 6.7mg/ml, ⊙ : 20mg/ml, ● : 0mg/ml (enzyme was removed to centrifuge)

Table 2. Essential water content of lipase in the organic solvent

Solvent(water content, vol%)	Water contents of lipase(wt%) ^{a)}					
	p. s.	p. s. ^{b)}	p. f.	p. f. ^{b)}	p. p.	p. p. ^{b)}
Initial material	3.4	1.3	2.4	0.8	2.0	1.3
Hexane(0.001)	3.4	1.3	2.4	0.8	2.1	1.3
Hexane(0.007)	3.9	2.0	2.9	1.5	2.5	2.0
Acetonitril(0.008)	1.8	1.0	0.6	0.5	0.8	0.7
Acetonitril(0.018)	1.9	—	0.7	—	1.0	—

a) Lipase powder 100mg, solvent 10ml, 25°C, 250rpm, 10min ; configuration 300rpm, 5min

b) Room temp. under the vacuum evaporation

III. 용매 효과

반응용매로 물 대신에 유기용매를 사용할 때, 수용액내의 효소활성의 pH 의존성과 마찬가지로 사용한 용매의 효소활성에 대한 영향을 아는 것은 유기용매 중의 효소반응을 연구하는데 있어서 중요하다. 그래서 본 항에서는 주로 리파제 촉매에 의한 에스테르교환을 예로서 용매효과를 설명한다.

Table 3에 Klibanov¹⁷⁾ 등이 연구한 결과를 나타내었다. 이 표로부터 어떤 리파제에서도 단백질을 용해시킬 수 있는 N,N-dimethylformamide와 dimethylsulfoxide⁴⁰⁾에서는 전혀 반응이 일어나지 않는다. 이들 용매에서는 효소가 용해함에 따라 활성을 갖는 입체구조가 변화하여 활성을 잃는 것으로 생각된다.^{7, 17)}

이들 용매 이외에 리파제의 종류(기원)에 따라 극성용매, 환상에테르, 일부 염소계 탄화수소 용매에서 촉매활성이 극히 낮은 경우도 있지만, 일반적으로 비극성용매가 극성용매 보다도 활성이 높고 지방족 탄화수소, 쇠상에테르, 4염화탄소가 양호하다. Tributyrin과 1-heptanol과의 에스테르교환에서 Klibanov 등¹⁷⁾은 리파제의 촉매활성은 용매의 성질에 따라 다르고, 그 변환율이 [P. p.]는 효모 유래 [C. c.(S)]의 것보다도 적기 때문에 [P. p.]의 결합수는 다른 리파제에 비하여 단단히 결합하는 것으로 보고되어 있지만¹⁷⁾, Table 3에 나타낸 것처럼 촉매활성의 차이가 10²~10³ 만큼 큰 [P. f.] 및 [P. s.]와 마찬가지로 [P. p.] 또한 수용성용매인 acetonitrile에 의하

여 쉽게 단백질 위의 수분이 제거되고, Table 3에서와 같이 리파제의 촉매활성 변화는 용매에 따라 효소 단백질상의 수화수의 유지 및 탈리 뿐 아니라 용매분자와 효소와의 상호작용도 중요한 인자라고 말할 수 있다.

염소계 탄화수소 중에서의 [C. c.(of)]의 촉매활성을 비교하면, 그 반응성 순서는 4염화탄소>클로로포름>염화메틸렌(A>B는 용매 A에서의 속도가 용매 B에서 보다 빠르다는 것을 의미한다) 순이며, 용매분자의 수소원자를 염소원자로 치환하면 속도가 빠르게 되는 것을 알 수 있다. 같은 경향은 다른 리파제에서도 확인되었고, 역시 4염화탄소에서의 반응이 가장 빠르다. 또 [C. c.(of)]는 방향족 탄화수소에서 같은 속도로 증가하는 것으로 확인되었다. 예를들면, 클로로벤젠에서의 속도는 벤젠에서의 약 2.5배이지만, 다른 리파제에서는 반드시 염소원자의 치환에 의하여 속도가 빨라지는 것은 아니다. 앞으로 더욱 검토할 필요는 있지만, 이들 결과는 다소 용매의 극성 이외에 용매의 구조도 효소의 촉매활성에 영향을 주며, 그것은 효소의 종류와 성질(기원)에 좌우된다고 말할 수 있다.

반응용매로 물 대신에 유기용매를 사용하면 효소 기질에 대한 인식능의 변화를 기대할 수 있다. Fig. 4⁷⁾는 유기용매에서의 에스테르교환 리파제가 알코올 쇠장의 인식능이 해당하는 낙산에스테르의 가수분해능의 경우와 완전히 달리 가수분해는 [P. s.], [P. p.] 어느 경우도 CN=18(CN은 알코올 혹은 낙산에스테르의 알코올 잔기의 탄소수를 나타낸다)에서 최대 활성을 보이지만 다른 쇠장에서는 CN=18과 비

Table 3. The effects of the lipase-catalyzed transesterification in tributyrin, 1-octanol with 1-heptanol^{a)}

Solvent	C. c. ^{b)}	C. c. ^{c)}	P. s. ^{d)}	P. f. ^{d)}	P. c. ^{d)}	P. r. ^{d)}	P. p. ^{d)}	P. p. ^{c)}	M. s. ^{c)}
Hexane	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Heptane	123	—	117	92	108	102	109	—	—
Isooctane	127	—	178	139	111	102	105	—	—
Octane	144	—	141	113	120	96	120	—	—
Cyclohexane	85	—	202	165	98	97	99	—	—
Dodecane	—	138	—	—	—	—	—	77	110
Hexadecane	—	158	—	—	—	—	—	56	103
Benzene	35	—	23	17	7	5	29	—	—
Toluene	69	24	20	14	15	12	27	40	26
1, 2-dichlorobenzene	53	—	8	4	6	2	7	—	—
1, 3-dichlorobenzene	—	—	7	6	7	1	11	—	—
Chlorobenzene	92	—	9	6	4	3	12	—	—
Anisole	—	—	11	7	7	4	24	—	—
Pyridine	—	>1	—	—	—	—	—	25	7
Carbon tetrachloride	24	>1	120	81	30	38	31	29	39
Chloroform	10	—	>1	1	>1	>1	2	—	—
Dichloromethane	1	—	>1	>1	0	0	>1	—	—
1, 2-dichloroethane	15	—	3	2	0	0	6	—	—
Diethylether	—	3	—	—	—	—	—	98	39
Diisopropylether	104	14	111	83	43	29	167	98	65
Di-n-butylether	—	63	127	92	52	47	190	90	65
Dioxane	14	>1	25	23	>1	0	32	27	13
Tetrahydrofuran	4	>1	7	5	0	0	13	38	16
2-butanon	8	—	6	4	0	0	34	—	—
2-pentanon	—	1	—	—	—	—	—	42	19
2-heptanon	—	>1	—	—	—	—	—	23	32
Acetone	7	>1	2	2	0	0	36	23	19
Acetonitrile	14	1	4	1	0	0	73	42	13
Nitromethane	—	—	2	1	0	0	20	—	—
Dimethylsulfoxide	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N,N-dimethylformamide	—	—	—	—	—	—	—	—	—

a) Relation rate given rate of 100 in hexane

b) C. c.(OF) 6.7mg/ml, tributyrin 0.75M, 1-octanol 0.67M, 30℃

(H₂O) add = (H₂O)_{op} (Table 1)

c) M. S. (Mucor sp.), lipase 10mg/ml, tributyrin & 1-heptanol 0.3M, 20℃

(H₂O) add = 0 vol%

d) Lipase 10mg/ml, tributyrin & 1-octanol 0.2M, 30℃

(H₂O) add = 0 vol%

교하여 활성이 극히 낮다.

이것에 대하여 유기용매 중의 에스테르교환에서는 가수분해에서 처럼 특정 쇠장만 속도가 빨라지는 것이 아니고 CN에 대하여 느리다. 그러나 차이는 작아 CN에 의한 인식능의 변화를 알 수 있다. 예를 들면 [P. p.]의 경우 acetonitrile에서의 반응은 CN이 큰 만큼 활성은 저하하지만 헥산과 디이소프로필에테르

에서는 다소의 차이는 있지만 CN에 무관하게 일정하였다. 또 cyclohexane에서의 반응은 CN=8에서 최대 속도를 나타낸다. [P. f.]에서는 [P. p.]의 경우와 다른 양상을 보인다. 이상의 결과로부터 효소의 기원은 물론 외적조건인 반응용매를 변화시킴으로서 효소의 쇠장 인식능의 변환이 가능하다고 말할 수 있다.

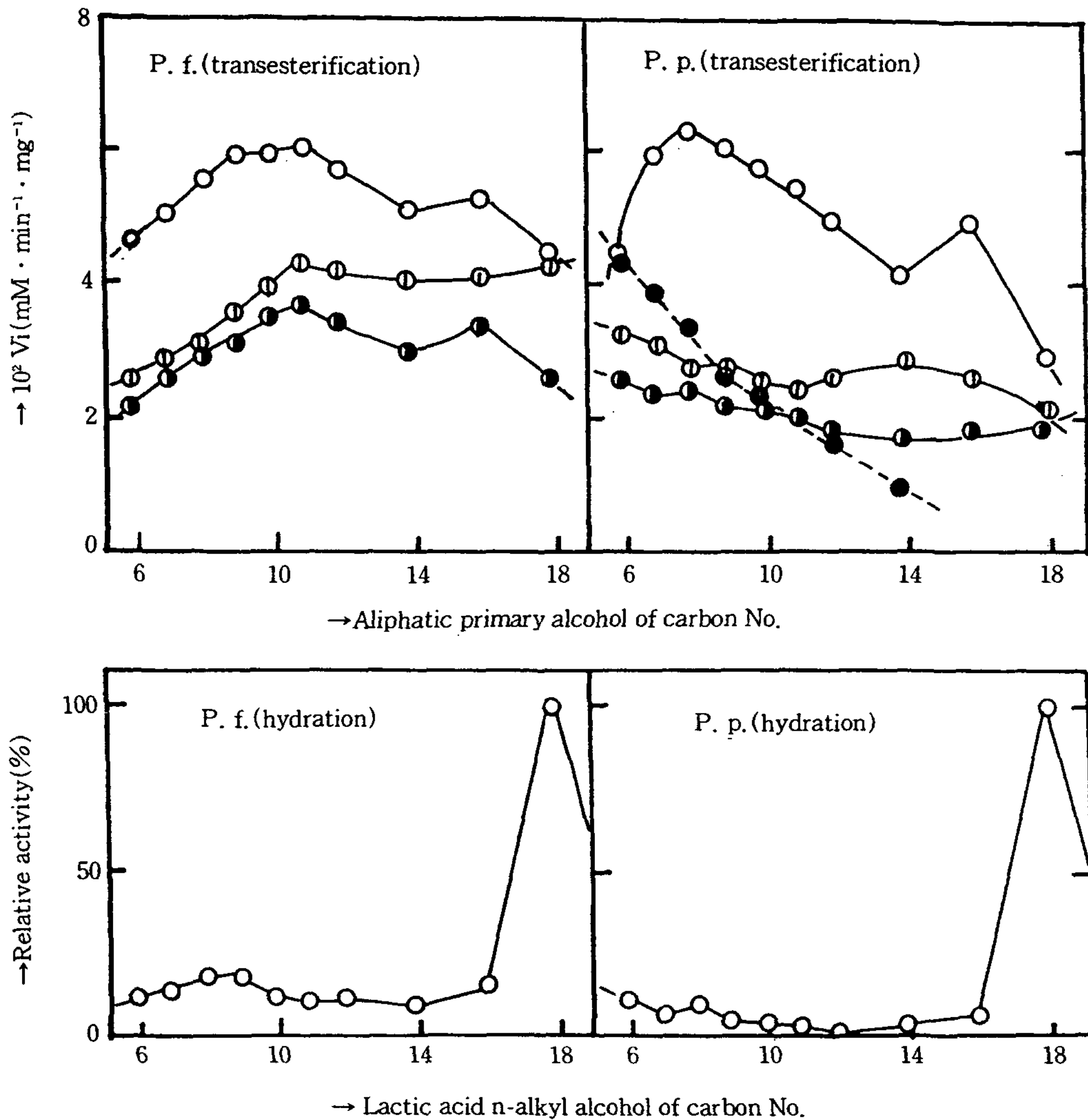


Fig. 4. The effects of solvent the lipase-catalyzed transesterification between tributyrin and aliphatic primary alcohol.
 Solvents : ⊙ : hexane, ○ : cyclohexane, ◐ : diisopropylether, ● : acetonitril concentration (transesterification)
 Enzyme 10mg/ml, tributyrin & alcohol 0.2M, 0.05M phospherate buffer solution (pH 6.9), reaction temp. 30°C.

유기합성 연구에서 더욱더 흥미있는 것은 용매에 의한 효소의 enantio selectivity의 변화일 것이다. Klibanov^{41, 42)}는 subtilisin carlsberg에 의한 N-acetyl alanine의 chloroethyl과 1-propanol과의 에스테르교환에서 용매의 극성이 큰 만큼 enantio 선택성이 높으며 낙산 trifloroethyl에 의한 아실화에 따른 라세미체 알코올의 광학분할은 톨루엔과 cyclohexane 등의 극성이 낮은 용매보다도 3-methyl-2-pentanol과 같은 극성이 큰 용매가 적합하다고 보고하였다. 효소의 enantio 선택성에 미치는 용매의 효과는 효소의 종류에 따라서도 다르다. [P. f.]리파제 촉매에 의한 tributyrin과 2-octanol과의 에스테르교환은 cyclohexane과 4염화탄소에서는 다른 용매보다도 enantio 선택성이 낮은 것으로 알려져 있다.⁷⁾

이상 용매에 의한 효소활성 및 효소의 enantio 선택성의 변화에 관하여 알아보았지만, 현 단계에서는 보고 예가 적기 때문에 합성 목적으로의 예측은 어렵다 앞으로 더욱 이 분야의 연구가 발전되기를 기대한다.

IV. 유기용매에서 리파제의 내열성과 고온반응성

효소반응의 최대 결점은 효소가 열에 대하여 극히 약하다는 점이다. 또 효소가 보통 화학촉매에 비하여 내열성이 낮은 것이 공업 촉매로서의 이용을 제한하고 있다 하여도 좋을 것이다.

유기용매의 효소반응에서 지극히 놀라운 결과를 보고한 것은 Klibanov이다. 그리고 수분을 제어한 조건하에서는 리파제가 100℃에서 수시간 안정하고 더구나 실온에서 보다 수배 활성이 높다고 한다.¹⁶⁾ 또 subtilisin이 dodecane중, 160℃에서 1시간 가열하여도 1% 활성이 남아있는 것으로 보고되고 있다.⁹⁾

본 연구에서 tributyrin에서 (H₂O)_{OP}의 수분량의 존재하에서의 에스테르교환 속도는 *Pseudomonas*속 [P. f.] 및 [P. s.]의 리파제가 90℃로 가장 높고, 다음으로 [P. p.]와 [P. c.]가 60℃이며 [C. c.]가 50℃, [P. r.]은 30℃이고 탈수한 tributyrin에서의(수분량: 0.03vol%) [P. s.]리파제(수분량: 4.65wt%)의 에스테르교환에 대한 잔존활성은 90℃에서 40시

간 가열하면 25% 이상이고 100℃에서 48시간 가열하면 7% 이상인 것으로 알려져 있다.^{7, 10, 39)}

효소 단백질이 열에 대하여 극히 약하다는 것에 관하여는 현재까지 여러가지 연구가 있고^{40, 43, 47)} 우선 열에 의한 효소의 unfolding이 가역적으로 일어나고^{43, 44)} 다음에 아래의 반응이 한개 이상 일어남으로서 활성을 잃는 것으로 알려져 있다.^{8, 45~47)}

① 열에 의한 비가역적인 입체구조의 붕괴(un-corrector scrambled structure의 생성)

② β-탈리에 의한 S-S결합의 해리

③ 아스파라긴(Asn) 및 글루타민(Gln)의 탈아미드화

④ 아스파라긴산 잔기의 펩티드 결합의 가수분해

어떠한 과정도 물이 불가결한^{8, 43, 47)} 것으로 알려져 있고, 유기용매 중 특히 수분을 제어한 조건하에서는 이들의 반응이 억제되기 때문에 수용액에 비하여 열안정성(내열성)이 높게 되는 것으로 생각된다. 위의 예도 이것을 지지하고 있다.

Fig. 5A에서 처럼 에스테르교환 속도는 반응초기에는 100℃ > 75℃ > 30℃(여기서 A > B는 온도 A가 온도 B일때 보다도 반응이 빠른 것을 나타낸다) 순이지만 반응시간이 길어짐에 따라 100℃의 반응은 느려지며, 장시간 반응에서는 75℃ > 30℃ > 100℃로 되고, 30℃의 반응보다도 반응율이 낮다. 또 Fig. 5B와 같이 30℃와 75℃(반응초기에 적은 감소가 확인되지만 이는 오차 범위내를 말한다)의 반응에서 수분량은 거의 감소하지 않지만 100℃의 반응에서는 시간과 함께 급격히 감소한다.

이것은 열로 인해 효소 표면상의 수분이 제거되는 것을 의미한다. 우선 공비에 의하여 용매내의 수분이 제거되고 용매가 거의 무수상태가 되어 이것이 효소의 수분(열에 의해 수화수의 결합이 완화 및 탈리하기 쉽게 된다)을 추출함으로써 일어난다.⁷⁾

유기용매에서 효소가 열을 잃는 과정에 관한 보고는 없지만, 위와 같이 수용액에서는 물이 존재하기 때문에 효소의 가역적인 unfolding이 일어난다.^{43, 44)} 그러나 유기용매에서는 수분이 극히 적기 때문에 효소의 unfolding은 생각하지 않고, 오히려 수분량이 적고 보다 견고한 구조가 된다고 생각하는 것이 타당할 것이다. 따라서 "견고한 상태의 효소를 원래의 상태로 떨어 뜨리기 위해서는 효소의 유연성을 크게 한

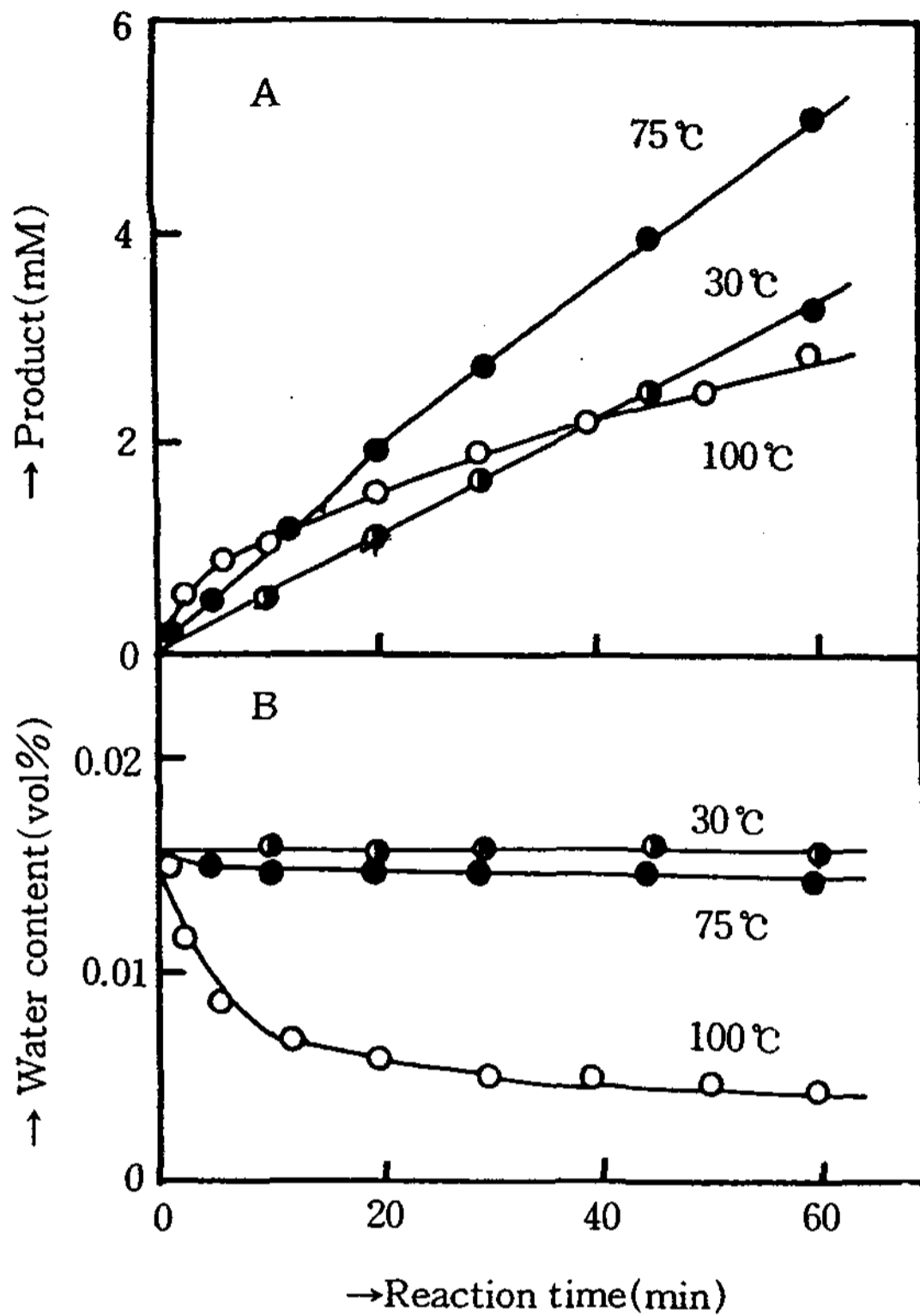


Fig. 5. The effects of temperature of lipase-catalyzed transesterification in toluen, tributyrin with 1-octanol.
Concentration
Lipase(P. f.) 10mg/ml, water content (P. f.) 1.3wt%, tributyrin & 1-octanol 0.2M

다. 다시 말하면 효소에 수분을 보급하면 활성이 복원된다"고 가정할 수 있다. Fig. 6에서 [P. s.]-wet (수분량: 3.3wt%), [P. s.]-dry(수분량: 1.2wt%) 인 모든 경우도 30°C에서는 비활성 저하는 거의 확인되지 않았다. [P. s.]리파제는 톨루엔 중 30°C에서 안정하다는 것을 나타낸다. 또 반응액내의 수분량이 증가하면 촉매활성이 서서히 저하하지만, 100°C로 가열한 [P. s.]에서는 수분량이 증가하면 활성이 증대한다. 즉, 적기는 하지만 $(H_2O)_{add}=0\text{vol}\%$ 인 때의 활성에 비하여 수분량이 많을 경우에는 극적인 활성의 복원이 일어나고, 그 복원 비율은 [P. s.]-dry에서는 70% 이상이고, [P. s.]-wet에서는 30% 이하이며, 수분량이 적은 계가 효소의 열안정성이 높다.

이것은 위의 가정을 증명해 주며 유기용매에서 효소의 내열성이 약한 것은 효소 단백질의 수분이 탈리함에 따라 가역적인 비활성 과정이 포함된다는 새로운 사실을 나타내고 있다.

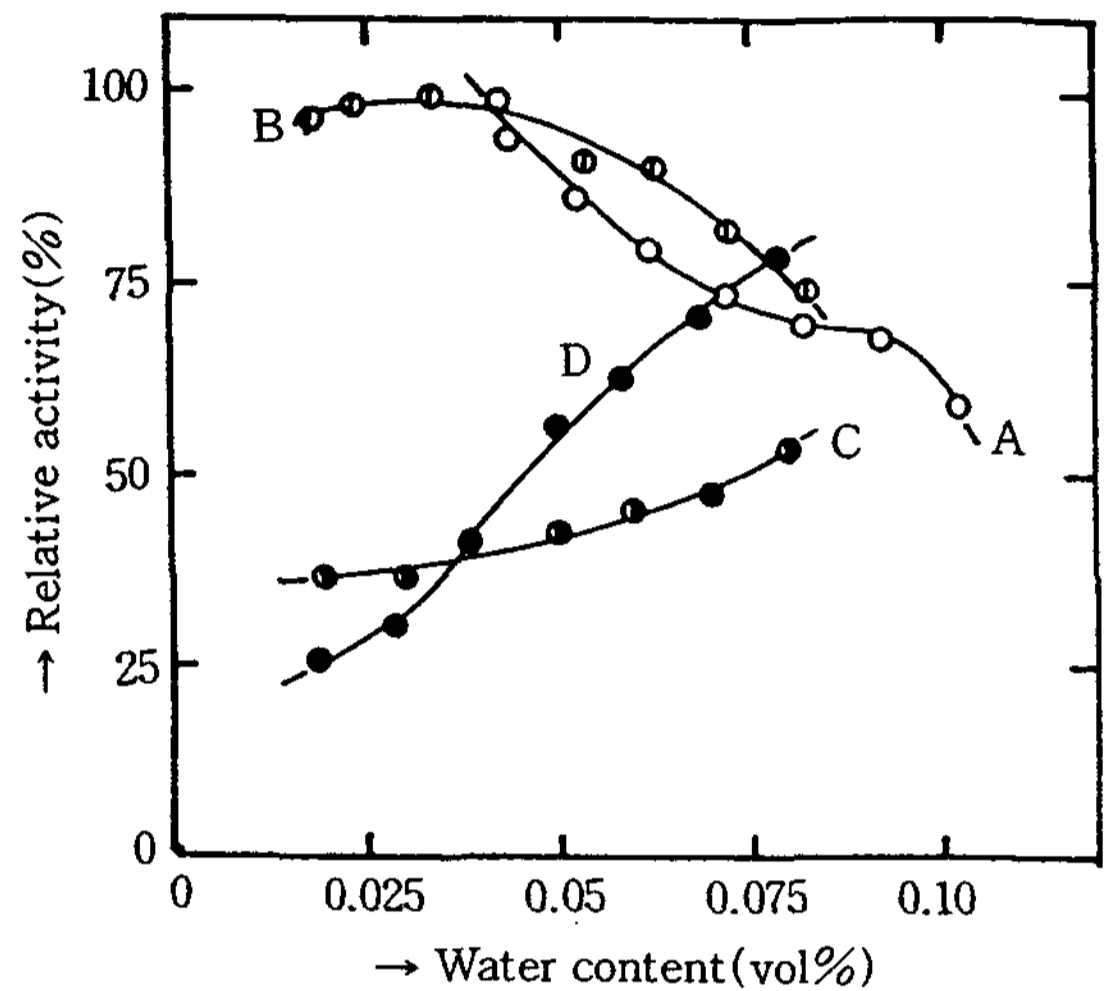


Fig. 6. The effect of water the pseudomonas sp. (P. s.) lipase-catalyzed transesterification (heat treatment by toluene).
○ : P. s.-wet(water 3.3wt%), 30°C, 18h
⊙ : P. s.-dry(water 1.2wt%), 30°C, 18h
● : P. s.-wet(water 3.3wt%), 100°C, 18h
● : P. s.-dry(water 1.2wt%), 100°C, 18h
Activity mesurment
Enzyme 5mg/ml, 30°C, tributyrine & 1-octanol 0.1M
Solvent : toluene : hexane = 1 : 1 vol/vol

V. 합성에의 응용

1. 리파제

리파제^{48, 49)}는 지방산 및 2-알칸올의 광학분할에 이용할 수 있다.⁵⁰⁻⁶⁰⁾ 리파제를 사용한 2-알칸올의 광학활성 에스테르합성법으로 가장 일반적인 방법은 라세미체 에스테르의 선택적 가수분해이며 반응율을 제어(동력학적 광학분할)⁶¹⁾함으로서 광학활성인 에스테르와 알코올이 얻어진다. 또 그 역반응⁶²⁾도 가능하다. 그런데 리파제는 지방산에 의해 반응이 저해되는 것으로 알려져 있다. 이 저해 효과를 피하기 위하여 에스테르교환에 의한 방법이 보고되어 있다.^{7b, 36, 64)}

[P. p.] 존재하에서 낙산 2, 2, 2-trichloroethyl (TCEB)와 2-알칸올과를 유기용매(에테르와 헵탄)에서 반응시키면 enantio 선택적인 교환이 일어나고 R체 알코올의 에스테르로 반응하면 enantio 선택적인 교환이 일어나며 R체 알코올의 에스테르가 얻어진다.⁶⁴⁾ 한편 tributyrin에서 [P. p.]에 의한 2-octanol과의 에스테르교환에서는 R체와 S체와의 반응성은 거의 같은(S체가 R체 보다 조금 빠르다) 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 이 결과는 모순이지만, 최근 연구에서⁷⁾ [P. p.] [P. s.] 및 [P. f.]는 유기용매(혹은 기질)에서 R체 알코올과 우선적으로 반응하여 상응하는 광학활성 에스테르를 생성하고 이 교환은 enantio 선택적으로 일어난다. 또 이 에스테르교환에서 거울상 대칭체 알코올이 얻어짐으로서 2-알칸올의 광학분할도 가능하다.^{7, 63)} 한편 [C. c.]는 chromosorb 등의 다공에 고정화하면 2-알칸올을 선택적으로 에스테르교환하여 R체 알코올 에스테르를 생성한다.⁶³⁾ 그런데 유리효소를 사용한 불균일계에서는 R체 알코올이 S체 보다도 빠르게 에스테르교환되지만 그 차이는 극히 작다.⁷⁾ 전자의 방법으로는 고정화 및 반응성의 재현성이 나쁘고 얻어진 에스테르의 광학 순도는 반응계의 수분량에 의존하는 것⁶⁴⁾으로 지적되어 있지만 확실한 것은 아니다.

2위치의 히드록시기에 한정하지 않고 3위치와 4위치에 히드록시기를 갖는 제2급 알코올로부터 에스테르교환 반응에 의한 광학활성 에스테르 합성과 광학분할은 가능하지만, 현재는 [P. p.]를 사용한 3-octanol의 예⁶⁴⁾가 있을(특이성은 2-octanol의 경우보다도 낮다) 뿐으로 용매에 의한 특이성의 변화와 탄소쇄장에 따른 특이성의 변화와 함께 앞으로의 과제이다.

리파제는 제1급, 제2급 알코올의 어느 것에도 작용하고 그 반응성은 제1급 알코올 > 제2급 알코올 순이며 이 성질을 이용하여 글리콜의 모노에스테르를 합성할 수 있다.^{6, 65)} 당은 많은 관능기를 갖기 때문에 화학합성에서는 보호, 탈보호기라는 조작이 필요하다. 이것을 효소반응으로 하면 합성이 편리하다.⁶⁶⁻⁶⁸⁾ [P. p.] 존재하에서 피리딘에서 당과 TCEB를 반응시키면, 위치 선택적인 에스테르교환이 일어나며 글루코스와 만노스에서는 6위치의 제1급 알코올이 아실화된다.⁶⁶⁾ 또 6위치를 보호(아실화)한 당과의 반

응에서는 아실화된 제2급 알코올은 리파제의 기원에 따라서 다르며, *Chromobacterium viscosum*과 *Aspergillus niger*에서는 3위치이고 [P. p.]에서는 2위치에 우선적으로 반응하고, [C. c.]는 이들의 중간 반응성을 나타낸다.⁶⁷⁾

리파제는 히드록시기 이외에 아미노기와도 반응한다.¹⁷⁾ 이것을 이용하여 펩티드합성이 가능하다.⁶⁹⁻⁷¹⁾ 이 방법의 특색은 D체 아미노산을 반응케 하며 예를 들면, [P. p.] 존재하에서 톨루엔에 N-Ac-L-Ph-OTCE와 D-Leu-NH₂와 반응시키면 상응하는 펩티드를 합성할 수 있다.⁶⁹⁾

2. Protease

Protease는 펩티드결합에서 물의 분해를 촉매화하는 효소이다. 이것을 유기용매에서 작용시키면 펩티드를 합성할 수 있다.²⁸⁾ 또 반응용매를 물 대신에 유기용매를 사용하면 효소와 기질과의 소수성 상호작용에 영향을 받는다. 예를 들면 α -키모트립신에 의한 아미노산 에스테르의 가수분해에서는 소수성이 높은 N-Ac-L-Ph-OEt 및 N-Ac-L-Ser-OMe 보다도 5×10^4 빠르지만 데칸에서의 에스테르교환은 반대로 후자쪽이 전자보다도 3배 빠르고⁷²⁾ 용매에 의한 효소기는 교환이 가능한 것으로 나타난다. 또 유기용매에 의한 부재탄소 인식능 변화도 알려져 있고 *sutilisin carlsberg*에는 그것은 용매의 소수성(log P: 분배계수)^{73, 74)}에 따라 변화하고 친수성 용매쪽이 소수성 용매보다도 인식능이 높은 것으로 알려져 있다.⁴¹⁾ 이것은 리파제의 탄소쇄장 인식능(Fig. 4b)과 일치하여 앞으로의 연구과제이다. 어떤 것에서도 프로테아제는 유기용매에서 특이한 인식능이 저하한다. 이것을 이용하여 천연에 존재하지 않는 펩티드합성이 가능하게 된다. 예로 펜틸알코올에서의 *sutilisin*을 사용한 교환반응은 앞의 리파제⁶⁹⁾의 경우와 마찬가지로 D체아미노산을 갖는 펩티드를 합성할 수 있다.⁷⁵⁾

최근 효소의 활성을 잃게 하는 DMF⁴⁰⁾에서 *sutilisin*이 촉매활성을 나타내고 이당과 TCEB와의 에스테르교환에서 위치 특이성 반응을 일으켜 모노에스테르를 합성하며, 천연물인 당의 히드록시기를 특이적으로 아실화한 것에 관한 연구도 있다.⁷⁶⁾

VI. 결 론

이상 불균일계의 에스테르교환에 대하여 Klivanov의 연구를 중심으로 활성발현, 용매효과, 효소의 내열성, 합성으로의 이용에 관하여 서술하였다. 이외에 이상계^{19~25)}와 균일계^{27~29)} 반응도 논의되고 있다. 이들에 관하여는 아래의 총설 및 보문 및 그 이용문헌을, 또 불균일계에서의 페놀의 위치 특이적 변화⁷⁾, 조효소를 필요로 하는 산화·환원 반응에 대한 부재 합성⁷⁸⁾, 또 산화·환원 효소계의 수분효과, 다관능기 화합물의 효소반응 이용^{79, 80)} 등 더구나 리파제에 의한 멘톨의 광학분할⁸¹⁾, 스테로이드 에스테르의 에스테르 교환⁸²⁾ 및 환상 락톤의 합성^{83~86)}에 관하여는 문헌을 참조하기 바란다.

유기용매에 있어서 효소반응 연구는 역사도 짧고 효소의 입체구조와 하전상태의 변화, 내유기용매성능 기초적인 부문도 해결되지 않았다. 이들의 문제점을 해결하기 위해서는 효소의 입체구조의 해석법^{32, 87)}과 속도론적 연구^{8, 88)} 등이 필요하다. 또 앞으로 연구 진전에 따라서 유기합성 기술 및 기능성 재료의 원료와 생리활성 물질의 제조 기술 등의 분야로의 발전을 기대한다.

문 헌

1. J. B. Jones, *Tetrahedron*, **42**, 3351 (1986)
2. G. M. Whitesides, C. H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**, 617 (1985)
3. 大野雅二編 著, “酵素機能と精密有機合成”, シーエムシー, 東京 (1984)
4. 福井三郎編, 田中渥夫, 松野降一, 경부征夫, 바이오리액터-바이오테크놀로지 시리즈, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1985)
5. 福井三郎編, 田中渥夫, 化學と生物, **19**, 620, 醱酵と工業, **41**, 552 (1983), S. Fukui, A. Tanaka, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **29**, 1 (1984)
6. 北 智也, 化學と工業, **42**, 445 (1989), 油化學, **35**, 608 (1986), 科學, **56**, 531 (1986), *Bio Industry*, **5**, 733 (1988)
7. a) 平田博文, 桶口勝彦, 山科孝雄, 第7回次世代産業基盤技術シンポジウム에 彙集, 바이오테크놀로지, **37** (1989), 日本産業技術振興會, H. Hirata, K. Higuchi, T. Yamashina, *J. Biotechnol.*, **14**, 157 (1990)
b) 平田博文, 桶口勝彦, 山科孝雄, 北技術ニュース, **7**, 5 (1989), “有機合成の新開發-新規反應場の利用”, **75** (1988), 日本産業技術振興會
8. A. M. Klivanov, *Chemtech*, **16**, 354 (1986)
9. A. Zaks, A. J. Russel, *J. Biotechnol.*, **8**, 259 (1988)
10. 平田博文, 바이오サイエンスとイソダストリー, **47**, 271 (1989)
11. A. Zaks, A. M. Klivanov, *J. Biol. Chem.*, **263**, 3194 (1988)
12. A. Zaks, A. M. Klivanov, *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017 (1988).
13. F. R. Dastori, N. A. Musto, S. Price, *Arch. Biochem. Biophys.*, **115**, 44 (1966)
14. F. R. Dastori, S. Price, *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 163 (1966), **122**, 289 (1966)
15. J. A. Blmn, M. W. Akhtar, J. D. E. Patterson, *Pakistan J. Biochem.*, **10**, 41 (1976)
16. A. Zaks, A. M. Klivanov, *Science*, **224**, 1249, (1984)
17. A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3192 (1985)
18. K. Yokozeki, S. Yamanaka, K. Takinami, A. Tanaka, K. Sonomoto, S. Fukui, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 1 (1982)
19. P. L. Luisi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**, 439 (1985)
20. K. Martinek, A. V. Levashov, N. Klyachko, Y. L. Khmelmski, I. V. Berezin, *Eur. J. Biochem.*, **155**, 453 (1986)
21. G. Carrea, *Trends Biotechnol.*, **2**, 102 (1984)
22. K. Martinek, A. N. Semenov, *Biochim. Biophys. Acta*, **658**, 60 (1981)
23. 森原和之, 蛋白質·核酸·酵素, **29**, 49 (1984)
24. 平田博文, 桶口勝彦, 石川一彦, 油化學, **36**, 343, 783 (1987)

25. S. Morita, H. Narita, T. Matoba, M. Kito, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1571 (1984)
26. 中西一弘, バイオサイエンスとインダストリー, **47**, 825 (1989)
27. L. G. Butler, *Enzyme Microb. Technol.*, **1**, 253 (1979)
28. H. Kise, K. Fujimoto, H. Noritomi, *J. Biotechnol.*, **8**, 297 (1988)
29. 安島綾子, 稻田祐二, 油化學, **37**, 1097 (1988), Y. Inada, T. Yoshimoto, A. Matsushima, Y. Saito, *Trends Biotechnol.*, **4**, 67 (1986).
30. T. Nishio, M. Kamimura, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2631 (1988)
31. I. D. Kunz, W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.*, **28**, 239 (1974)
32. J. A. McGrammon, B. R. Gelin, M. Karplus, *Nature*, **267**, 585 (1977)
33. G. Careri, E. Gratton, P. H. Yang, *J. A. Rupley, Nature*, **284**, 572 (1980)
34. J. A. Rupley, E. Gratton, G. Careri, *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 18 (1983)
35. J. E. Schinkel, N. W. Downer, *J. A. Rupley, Biochemistry*, **24**, 352 (1985)
36. H. Hirata, K. Higuchi, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **36**, 643 (1987)
37. H. Hirata, K. Higuchi, T. Yamashina, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **38**, 48 (1989)
38. 山根桓夫, 油化學, **36**, 761 (1987), T. Yamane, *Biocatalysis*, **2**, 1 (1988)
39. 桶口勝彦, 山科孝雄, 石川一彦, 平田博文, 油化學, **36**, 355 (1987)
40. S. J. Singer, *Adv. Protein Chem.*, **17**, 1 (1962)
41. T. Sakurai, A. L. Margolin, A. J. Russel, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7236 (1988)
42. H. Kitaguchi, P. A. Frizpatrick, J. H. Huber, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3091 (1989)
43. W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.*, **14**, 1 (1959)
44. C. Tanford, *Adv. Protein Chem.*, **23**, 121 (1968)
45. T. J. Ahren, A. M. Klivanov, *Science*, **228**, 1280 (1985)
46. S. E. Zale, A. M. Klivanov, *Biochemistry*, **26**, 5432 (1986)
47. S. J. Tomazic, A. M. Klivanov, *J. Biol. Chem.*, **263**, 3086, 3092 (1988)
48. B. Borgstrom, H. L. Brockman, Ed., "Lipases", Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984)
49. H. Brockerhoff, R. G. Jensen Ed., "Lipolytic Enzymes", Academic Press, New York, San Francisco, London (1974)
50. T. Kitazume, T. Sato, T. Kobayashi, J. T. Lin, *J. Org. Chem.*, **51**, 1003 (1986)
51. K. Lauman, M. Schneider, *Tetra. Lett.*, **26**, 2073 (1985)
52. W. E. Ladner, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7250 (1984)
53. F. S. Sariaslani, J. P. N. Rosazza, *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 242 (1984)
54. S. Hamaguchi, M. Asada, J. Hasegawa, K. Watanabe, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2331 (1984)
55. S. Iriuchijima, A. Keiyu, N. Kojima, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1153, 1159 (1982), **45**, 1389 (1981)
56. K. Kawai, M. Imuta, H. Zeffer, *Tetra. Lett.*, **22**, 2527 (1981)
57. K. Mori, H. Akao, *Tetrahedron*, **36**, 91 (1980)
58. 山口雄三, 折谷降之, 田島昇, 小松昭, 諸江辰夫, 農化, **50**, 375 (1976)
59. T. Oritani, K. Yamashita, *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1965 (1974)
60. W. J. Marshek, M. Miyano, *Biochim. Biophys. Acta*, **316**, 363 (1973)
61. C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294 (1982)
62. S. Okumura, M. Iwai, Y. Tsujusaka, *Biochim. Biophys. Acta*, **575**, 156 (1979)
63. B. Cambou, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 2687 (1984)
64. G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 7072 (1985)

65. P. Cesti, A. Zaks, A. M. Klibanov, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **11**, 401 (1985)
66. M. Therisod, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5638 (1986)
67. M. Therisod, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3977 (1987)
68. W. J. Hennen, H. M. Sweero, Y. F. Wang, C. H. Wong, *J. Org. Chem.*, **53**, 4939 (1988)
69. A. L. Margolin, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3802 (1987)
70. A. L. Margolin, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7885 (1987)
71. J. B. West, C. H. Wong, *J. Org. Chem.*, **51**, 2728 (1986)
72. A. Zaks, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2767 (1986)
73. A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, *Chem. Rev.*, **71**, 525 (1971)
74. R. F. Rekker, "The Hydrophobic fragment constant", Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York (1977)
75. A. L. Margolin, D. F. Tai, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7885 (1987)
76. S. Riva, J. Chopineau, A. P. G. Keiboom, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 584 (1988)
77. R. Z. Kazandjian, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5448 (1985)
78. J. Grunwald, B. Wirz, M. P. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6732 (1986)
79. N. Chinsky, A. L. Margolin, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 386 (1989)
80. S. Riva, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3291 (1988)
81. G. Langrand, B. Jacquess, B. Geard, C. Triantaphylides, *Tetra. Lett.*, **27**, 29 (1986)
82. V. C. O. Njar, E. Capsi, *Tetra. Lett.*, **28**, 6459 (1987)
83. G. Zhi-Wei, C. J. Sih., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1999 (1988)
84. A. Makita, T. Nihira, Y. Yamada, *Tetra. Lett.*, **28**, 805 (1987)
85. A. L. Gutman, K. Zoubi, A. Botansky, *Tetra. Lett.*, **28**, 3861 (1987)
86. T. Yamane, Y. Kojima, T. Ichiryu, M. Magata, S. Shimizu, *Biotechnol. Engin.*, **34**, 838 (1989)
87. P. A. Burke, S. O. Smith, W. W. Bachovchin, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8290 (1989)
88. L. T. Kanerva, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6864 (1984)