

화학적 변환에 의한 Subtilisin Carlsberg의 극성 유기용매에서의 안정성 향상

류 근 갑

울산대학교 화학공학과

Stabilization of Subtilisin Carlsberg in Polar Organic Solvents by Chemical Modification

Keungarp Ryu

Department of Chemical Engineering, University of Ulsan, Ulsan, Kyungnam 680-749, Korea

ABSTRACT

The effects of chemical modification on the enzymes' stability in polar organic solvents were studied with subtilisin Carlsberg in dimethylformamide-water mixtures as a model system. Three out of nine lysine residues of subtilisin Carlsberg were coupled to either trimellitic or pyromellitic anhydrides thereby, for each lysine residue modified, resulting in the net replacement of one basic amino group by two or three acidic carboxyl groups, respectively. In water at 60°C, both trimellitic and pyromellitic anhydride-modified subtilisin Carlsberg showed increased thermostability by 2.6 times and 1.6 times, respectively, as compared to that of unmodified enzyme. In 70% dimethylformamide at 25°C, however, only pyromellitic acid was shown to enhance the stability of subtilisin Carlsberg by 5.5 times increasing the half life time of irreversible inactivation from 4.9hr for unmodified enzyme to 27.8hr for modified enzyme.

서 론

비수용성 용액에서의 효소반응에 관한 연구는, 1984년 Klivanov에 의해서 porcine pancreatic lipase가 99%의 tributyrin 용액에서 활성이 있음이 발표된 이후로 매우 활발히 수행되어 왔다(1). 비수용성 용액에서의 효소반응은 수용액에서의 반응에 비하여 많은 장점이 있어서 정밀화학 제품 생산을 위한 대체기술 및 청정기술로서 기대되고 있으며(2) 비수용성 용액 중 가장 많은 연구의 대상이 되어온 것은 유기용매이다. 그러나 대부분의 효소는 유기용매에서 안정성이 저하되는 경향이 있어서 효소공정

의 경제성을 떨어뜨리는 원인이 되고 있다. 따라서 유기용매에서 효소의 안정성을 증가시키기 위하여 많은 방법이 연구되어 왔다. 대표적인 예를 들면 polyethylene glycol을 이용한 효소표면의 화학적 변환(3-5), 효소를 구성하고 있는 아미노산의 선택적 치환(6), 동결건조시 알맞은 염의 사용(7), 그리고 새로운 효소고정화 물질의 개발(8,9) 등이 있다. 그러나 이들 대부분의 방법은 포화농도에 가까운 극히 소량의 물을 함유하고 있는 비극성 유기용매에서 효소의 안정성을 향상시키는 효과는 있으나, 극성 유기용매에서의 효소의 안정성을 향상시키지는 못하였다. 비수용성 용액 중 극성 유기용매에서는 pep-

tide, amino acid, carbohydrate 등의 용해도가 높으므로 효소반응에 중요하다(10). Wong 등은 site-directed mutagenesis 방법을 통하여 protease를 극성 유기용매에서 안정화시키는 요인을 찾고자 하였으나 일반적인 법칙을 발견하는 데에는 성공하지 못하였다(6). Navia 등은 효소의 cross-linked micro-crystal을 사용하여 극성유기용매에서 효소안정화에 성공하였으나 oligopeptide, 단백질 혹은 다당류와 같이 분자량이 큰 기질의 반응에는 적합하지 않은 단점이 있다(11, 12).

한편 물의 활성도가 낮은 유기용매의 성질과 가장 유사한 조건을 가지고 있는 자연조건은 염전과 같이 염의 농도가 포화상태에 가까운 지역이다. 이러한 자연조건에서 생존하는 호염성(halophilic) 미생물로부터 얻은 대부분의 호염성 효소는 일반적인 자연조건에서 생존하는 미생물로부터 분리된 효소에 비하여 효소표면에 aspartic acid 또는 glutamic acid 등 산성 아미노산의 함량이 높은 것이 발견되었다(13). 이는 효소표면의 이온화 상태가 물의 활성도가 낮은 조건에서 효소의 안정성을 결정하는 한 요소가 될 수 있음을 보여주는 것이다.

본 연구에서는 호염성 효소의 특징인 carboxyl기를 비호염성 효소의 표면에 화학적 반응에 의해서 인위적으로 부가하고 이것이 극성 유기용매에서의 효소의 안정성에 미치는 영향을 조사하였다. 효소반응체로서는 펩타이드 합성에 주로 쓰이고 있는 dimethylformamide/물 혼합용액에서의 subtilisin Carlsberg를 대상으로 하였다. 본 연구에서는 효소의 화학적 변환을 위하여 α -chymotrypsin(14, 15)과 horseradish peroxidase(16)의 열안정성을 증가시키는 효율이 있음이 밝혀진 anhydride와 효소분자 표면의 lysine과 반응을 시키는 방법을 사용하였다. 이러한 방법은 효소의 안정성을 증가시키기 위한 다른 방법들에 비하여 효소구조에 미치는 영향을 최소화 할 수 있고 반응이 간단하다는 장점을 가지고 있다. 또한 본 방법을 이용하여 극성 유기용매에서 효소의 안정성을 증가시키기 위한 연구는 수행된 예가 없다.

재료 및 방법

사용된 효소 및 시약

본 실험에 사용된 효소인 subtilisin Carlsberg는 Sigma사(St. Louis, MO, U. S. A.)에서 구입하여 투석 및 동결건조 후 사용하였다. DMF는 Aldrich

사(Milwaukee, WI, U. S. A.)에서 구입하여 사용하였으며 기타 실험에서 사용된 시약은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

활성효소 농도의 측정

본 실험에서 사용한 효소인 subtilisin Carlsberg의 활성효소 농도는 Bender 등이 이용한 burst kinetic 방법을 이용하여 다음과 같이 측정 하였다(17). Subtilisin Carlsberg 4.5mg과 *p*-nitrophenyl acetate 20mg을 각각 완충용액(100mM KH_2PO_4 , pH7) 1ml와 acetonitrile 1ml에 용해시켰다. Cuvette에 새로운 완충용액 3ml를 취한 후 *p*-nitrophenyl acetate가 용해되어 있는 acetonitrile을 가하였다. 여기에 순수한 acetonitrile을 다시 첨가하여 총 acetonitrile의 부피가 전체용액의 4% (120 μ l)가 되도록 한 후 spectrophotometer (Hewlett Packard, HP8452A)를 이용하여 400nm에서 시간에 따른 흡광도의 증가를 측정하여 *p*-nitrophenyl acetate의 자발적인 가수분해 속도를 측정하였다. 약 50초 정도 경과한 후 여기에 재빨리 효소용액을 가한 후 400nm에서의 시간에 따른 흡광도의 증가를 측정하였다. 이때 *p*-nitrophenyl acetate는 자발적 및 효소에 의한 가수분해 반응을 하게 된다. 효소를 가하는 동안에도 spectrophotometer를 통한 흡광도의 측정은 계속하였다. 약 1분 후 흡광도의 측정을 종료하고 효소를 가한 순간의 400nm에서의 흡광도의 순간적인 증가인, burst(π)는 효소를 가하기 전의 자발적인 가수분해 속도 및 효소를 가한후의 가수분해속도를 각각 효소를 가한 시점으로 연장하여 그 차이값으로 구하였다. 이와 같은 실험을 효소의 양을 일정하게 유지하고 *p*-nitrophenyl acetate의 농도(S)를 변화시키면서 반복하고 그때마다 burst, π , 값을 구하였다. 최종적으로 $\pi^{-0.5}$ 값을 y축으로 1/S를 x축으로 그래프에 나타내고 1/S가 0이 될때의 burst, π , 값을 linear regression 방법을 이용하여 y축 절편으로부터 구하였다. 활성효소의 농도는 π 값을 400nm에서의 *p*-nitrophenol의 흡광도 계수, 15,156M⁻¹cm⁻¹으로 나누어서 구하였다.

아미노기 농도의 측정

본 실험에서 사용한 효소 및 화학적 변환된 효소의 아미노기(-NH₂)함량은 Snyder와 Sobocinski(18)의 방법을 사용하여 다음과 같이 측정 하였다. 효소가 용해되어 있는 pH조정을 하지않은 100mM sodium borate용액(pH9.4) 3ml에 TNBS용액(5%

w/v in water) 15 μ l를 가한 후 실온에서 30분 간 방치한다. 이때 효소농도는 약 0.2~3.5 μ M의 범위에서 변화시켰다. 아미노기의 농도는 이 혼합물에 대한 420nm에서의 흡광도를 표준물질인 N-acetyl-L-lysine의 흡광도 계수, 13,768 M⁻¹cm⁻¹로 나누어서 구하였다.

효소의 화학적 변환

아미노기를 가지고 있는 효소표면의 lysine을 anhydride와 반응시키기 위하여 Mozhaev 등이 사용한 방법(14, 15)을 이용하였으며 구체적인 방법은 다음과 같다. Anhydride(trimellitic 또는 pyromellitic anhydride)를 농도가 약 1.8M이 되도록 dimethyl sulfoxide에 용해시켰다. Subtilisin Carlsberg 50mg을 10ml의 완충용액(10mM NaH₂PO₄, 0.1mM CaCl₂, pH8.0)에 용해시킨 후 이 효소용액을 ice bath에서 교반시키면서 anhydride가 용해되어 있는 DMSO 1ml를 30분간에 걸쳐서 천천히 가한 후 총 2시간동안 교반하면서 반응시켰다. 반응용액의 pH는 4M의 NaOH용액을 첨가하여 일정하게 유지시켰다. 이때 anhydride의 농도는 subtilisin Carlsberg가 함유한 lysine 농도의 약 100배 정도가 된다. 이는 효소표면의 lysine만을 반응시키기 위하여 필요한 조건이다(14). 반응 후 효소용액을 ultrafiltration cell(Amicon, model 8050)과 투석막(Spectrum, 43mmD, MWCO 10,000)을 사용하여 미 반응된 anhydride를 제거 하였다. 투석 정도는 여과액의 흡광도를 200nm~700nm 사이에서 측정하여 조사 하였다. 미반응된 anhydride가 충분히 제거된 후 효소용액을 농축, 동결건조 하여 실험에 사용하였다.

효소의 활성 측정

Subtilisin Carlsberg의 활성은 이 효소에 의한 Suc-AAPF-pNA의 가수분해 속도를 410nm에서 흡광도의 증가율로서 나타내었다.

효소의 안정성 측정

고온 및 극성 유기용매에서의 subtilisin Carlsberg의 안정성은 다음과 같은 방법에 의하여 측정하였다. Subtilisin Carlsberg 약 10mg을 완충용액(10mM NaH₂PO₄, 0.1mM CaCl₂, pH8) 1ml에 용해 시켰다. 이 효소용액 0.5ml를 취하여 온도 및 DMF의 농도가 조절된 4.5ml의 용액에 가하였다. 일정한 시간마다 이 효소용액 10 μ l를 취하여 1ml

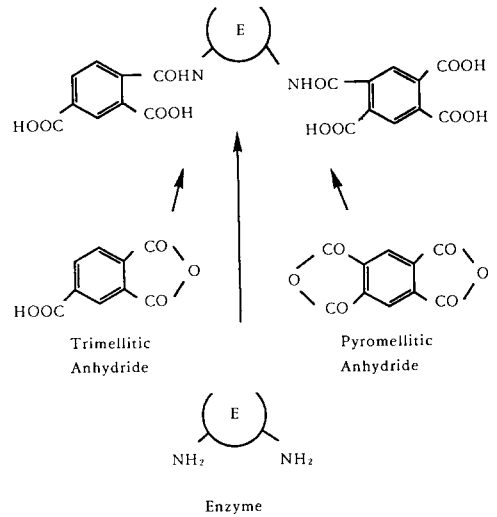


Fig. 1. Reaction scheme of amino groups of an enzyme with trimellitic anhydride or pyromellitic anhydride as proposed by Mozhaev et al(14).

cuvette에 넣고 1ml의 buffer(25 $^{\circ}$ C)를 가한 후 약 10분간 방치하였다. 여기에 Suc-AAPF-pNA가 용해된 DMF(5mg/2ml)를 10 μ l 가한 후 410nm에서의 흡광도의 시간에 따른 증가를 측정 하였다. 각각의 반응조건에서 효소의 안정성은 효소활성의 반감 시간으로 나타내었다.

결과 및 고찰

효소의 화학적 변환 및 반응성 변화

Sigma사에서 구입한 subtilisin Carlsberg의 활성 효소 함량을 burst kinetics방법을 이용하여 측정한 결과 약 48%로 낮았으므로 본 연구에서는 subtilisin Carlsberg를 투석법을 사용하여 분자량 10,000이하의 불순물을 제거한 후 동결건조 시킨 후 사용하였다. 이 방법에 의하여 정제된 subtilisin Carlsberg의 활성효소 함량은 burst kinetics방법을 이용한 측정결과 94.5%로 증가하였다. Subtilisin Carlsberg의 분자표면에 음이온성인 carboxyl기의 함량을 증가시키기 위하여 anhydride 중에서 trimellitic anhydride와 pyromellitic anhydride를 사용하여 효소 분자 표면의 lysine과 반응 시켰다. 이 방법에 의하여 trimellitic anhydride와 pyromellitic anhydride의 경우 한개의 양이온성 아미노기가 각각 두개 및

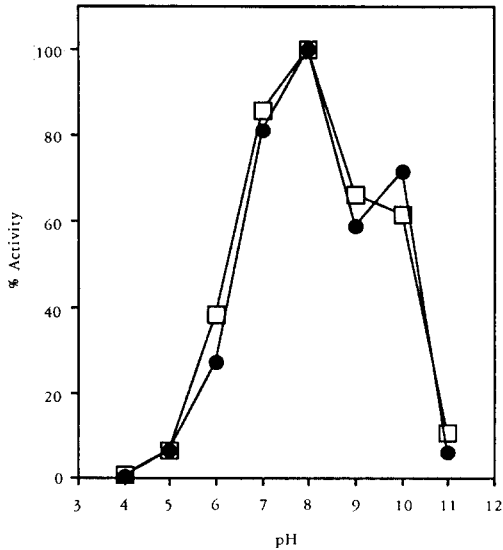


Fig. 2. Dependence on the solution pH of the activity of unmodified(□) and modified subtilisin Carlsberg with pyromellitic anhydride(●). Buffers(10mM) used were sodium acetate for pH 4 and 5, sodium monobasic phosphate for pH 6,7 and 8 and sodium borate for pH 9, 10 and 11. Each buffer contains 0.1mM CaCl₂. Each point was duplicated.

세개의 음이온성 carboxyl기로 치환되며 이러한 반응경로는 Fig. 1과 같다. 효소분자가 가지고 있는 lysine 중 anhydride와 반응한 갯수는 효소분자의 아미노기 농도의 변화를 측정하여 조사하였다. Subtilisin Carlsberg를 trimellitic anhydride 및 pyromellitic anhydride와 반응시킨 결과 이 효소분자가 가지고 있는 총 9개의 lysine(19) 중 3개가 변환된 것으로 밝혀졌으며 효소의 활성은 화학적 변환으로 인하여 크게 손상되지 않았다. 즉 N-acetyl-*para*-nitrophenyl acetate의 가수분해반응에 대하여, 화학변환 되기 전 subtilisin Carlsberg의 경우 K_m 값은 0.719mM, k_{cat} 값은 0.488 sec⁻¹였으며, pyromellitic anhydride에 의하여 화학변환된 효소의 경우에는 K_m 값은 0.395mM, k_{cat} 값은 0.307sec⁻¹이었다.

효소표면의 이온성질이 변화할 경우에는 반응용액의 최적 pH값의 변화가 예측된다. 이러한 현상은

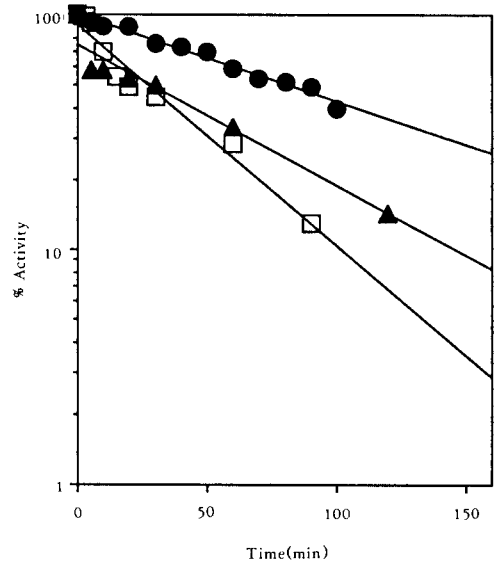


Fig. 3. Effects of chemical modification on the thermal deactivation of unmodified(□) and modified subtilisin Carlsberg with trimellitic anhydride(●) or pyromellitic anhydride(▲) in a sodium phosphate buffer(10mM KH₂PO₄, 0.1mM CaCl₂, pH8) at 60°C.

고정화 효소의 경우 담체물질 표면의 이온성을 변화시킬 경우에 일반적으로 관찰되는 현상이다(20). Subtilisin Carlsberg가 anhydride에 의하여 화학변환 될 경우 역시 효소표면의 이온성질이 변화할 것으로 예상되어서 반응용액의 pH값의 변화에 따른 효소활성의 변화를 화학변환 되기 전의 효소와 pyromellitic anhydride에 의해서 변환된 효소에 대하여 측정하였다. 이때 기질로서는 자발적인 분해속도가 전체반응속도의 1% 이하로 무시할 정도로 적은 Suc-AAPF-pNA를 사용하였다. Fig. 2에서와 같이 화학변환 되기 전과 후의 subtilisin Carlsberg의 활성은 pH값이 8일때 최대값을 보였다. 이러한 결과는 반응용액 중의 양이온인 Na⁺의 농도(10mM)가 효소의 농도(최대 3.5μM)보다 매우 커서 효소표면의 carboxyl 음이온들을 충분히 포화시키고 있기 때문인 것으로 생각된다. 고정화 효소의 경우에는 담체표면의 이온기의 농도가 효소활성의 최적 pH값에 영향을 줄 수 있을 정도로 크기 때문

인 것으로 여겨진다.

Mozhaev 등은 trimellitic, pyromellitic 그리고 mellitic anhydride 등을 사용하여 α -chymotrypsin의 분자표면에 있는 14개의 아미노기를 모두 변환시켰을 경우 60°C 수용액에서 효소활성 반감시간이 약 300배 증가(0.13hr에서 42hr로)하였다고 보고하였다(14, 15). 본 연구에서도 화학변환된 subtilisin Carlsberg의 열안정성이 향상된 것을 보였다. Fig. 3에는 60°C 수용액에서 시간에 따른 각 효소의 활성감소를 나타내었다. 즉 trimellitic anhydride 또는 pyromellitic anhydride에 의하여 화학변환된 효소는 효소활성 반감시간이 각각 81.97min와 50.30min로서 원래효소의 반감시간인 32.02min에 비하여 각각 2.5배와 1.5배의 열안정성 향상을 보였다. 그러나 이러한 열 안정성의 증가정도는 α -chymotrypsin의 경우와 같이 크지는 않았다. 그 이유로서는 subtilisin Carlsberg의 경우 화학변환된 아미노기의 수가 3개로서 14개의 아미노기가 변환된 α -chymotrypsin에 비하여 화학적 변화 효과가 적었기 때문인 것으로 여겨진다.

효소의 DMF용액에서의 안정성

Subtilisin Carlsberg의 유기용매에서의 안정성은 사용하는 완충용액의 종류에 크게 좌우되는 것으로 밝혀졌으며(21) 본 연구에서는 유기용매에서 subtilisin효소의 안정성을 향상시키는 것으로 알려진 sodium phosphate 완충용액(10mM NaH_2PO_4 , 0.1mM CaCl_2 , pH8)을 사용하였다. 25°C의 50% DMF용액에서 효소활성의 반감시간은 subtilisin Carlsberg의 경우 82.5hr였으며 anhydride에 의해서 화학변환된 효소의 경우에는 일주일 이상이었으므로 정확한 효소활성 반감시간을 측정하기 위하여 반응온도를 증가시켜 보았다. 그러나 50°C, 50% DMF에서는 원래의 효소와 화학변환된 효소의 활성 반감시간은 10min 이내로서 효소의 안정성이 급격히 감소하였다. 즉 반응온도를 높일 경우, 화학적 변환된 효소의 극성 유기용매에 대한 안정성 증가효과가 소멸됨을 보였다. 따라서 본 연구에서는 DMF의 함량을 70%로 증가시켜서 각 효소의 안정성을 조사하였다. Fig. 4에는 25°C, 70%DMF에서 각 효소의 시간에 따른 활성변화를 나타내었다. 원래의 subtilisin Carlsberg와 trimellitic anhydride에 의해서 변환된 subtilisin Carlsberg의 경우에는 효소활성 반감시간이 각각 4.9hr와 5.8hr로서 커다란 차이를 보이지 않았으나 pyromellitic anhydride에 의해서

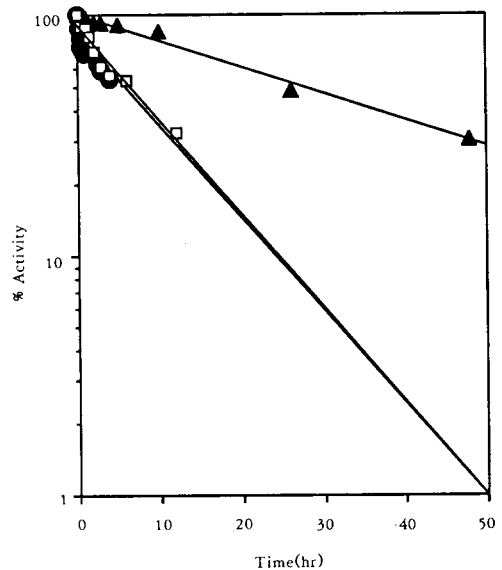


Fig. 4. Effects of chemical modification on the deactivation of unmodified(□) and modified subtilisin Carlsberg with trimellitic anhydride(●) or pyromellitic anhydride (▲) in 70%(v/v) DMF at 25°C.

변환된 subtilisin Carlsberg의 경우에는 효소활성 반감시간이 27.8hr로서 원래의 효소에 비하여 안정성이 약 5.5배 증가하였다.

효소표면에 산성 아미노기를 많이 가지고 있는 호염성 효소의 경우 효소활성은 용액속의 염의 함량에 좌우된다. 즉 용액속의 NaCl함량이 감소하면 효소활성이 급격히 떨어지며 이는 효소의 폴림현상에 기인하는 것으로 관측되었다(22). 이러한 현상은 두 가지의 원인에서 비롯되는 것으로 생각되고 있다. 첫째는 용액 중의 NaCl 농도가 감소함에 따라서 효소표면의 산성 아미노산의 carboxyl 음이온이 Na^+ 이온에 의해서 충분히 포화되지 않음으로서 carboxyl 음이온 간의 반발력에 의한 효소의 구조변화를 예상할 수 있다. 둘째는 호염성 효소의 경우 효소분자 내부에 소수성 아미노기의 함량이 비호염성 효소에 비하여 적기 때문이다(13). 따라서 용액속의 NaCl 농도가 감소하면 효소분자 내부의 hydrophobic force가 약화되어 효소의 폴림현상이 발생할 수 있다. 본 연구에서 사용한 subtilisin Carlsberg는 비호염성 효소로서 효소활성을 위하여 고농도의 NaCl이

Table 1. Effects of the concentration of salt on the half life time of pyromellitic anhydride-modified subtilisin Carlsberg in 70% DMF at 25°C.

NaCl(mM) ^a	half life time(hr) ^b
0	27.8
10	24.5
30	27.9
50	19.0
100	22.6
150	25.1

a: The concentration of NaCl at saturation in 70% DMF was near 150mM.

b: Activity of subtilisin Carlsberg was measured for the hydrolysis of Suc-AAPF-pNA in a sodium phosphate buffer(10mM NaH₂PO₄, 0.1mM CaCl₂, pH8) at 25°C.

필요하지 않다. 그러나 본연구에 의해서 분자표면에 산성 carboxyl기를 갖게되는 화학변환된 subtilisin Carlsberg의 경우에는 호염성 효소의 경우와 같이 효소의 안정성이 NaCl의 농도에 의해서 영향을 받을 가능성이 있다. 그러나 pyromellitic anhydride에 의해서 변환된 subtilisin Carlsberg의 경우 Table 1에서와 같이 70% DMF에서 NaCl 농도가 10mM~150mM범위에서 변화하더라도 효소활성의 반감시간이 19.0hr~25.1hr 범위에서 비교적 일정하게 유지되는 것을 보여주었다. 이는 효소표면의 음이온은 양이온(10mM) 및 물에 의하여 이미 포화되었음을 의미한다. 이와같은 결과는 호염성 효소가 낮은농도의 NaCl용액에서 불활성화 되는 원인은 효소분자 표면의 음이온 간의 전기적 반발력으로 인한 구조변화 때문이기 보다는 효소분자 내부에 소수성 아미노기가 적기 때문인 것으로 생각할 수 있다. 이러한 결과는 호염성 효소의 분자표면의 음이온을 상쇄시키기 위해서는 100mM 이하의 낮은 NaCl농도에서 충분히 이루어 질 수 있다는 주장과도 일치하는 결과이다(23). 효소반응에서 염의 농도가 높은 것은 오히려 문제가 되므로 pyromellitic anhydride에 의해서 변환된 효소의 안정성이 용액 중의 NaCl 농도에 좌우되지 않음은 바람직한 결과라고 할 수 있다.

결론적으로 효소의 아미노기와 anhydride의 반응을 통하여 효소를 화학적으로 변환 시킬 경우 극성 유기용매에 대한 효소의 안정성을 향상시킬 수 있음을 확인 하였으며, 본 연구결과의 일반적인 응용 가

능성을 조사하기 위하여 thermolysin과 같은 다른 peptide가수분해 효소를 대상으로 연구를 계속 수행할 예정이다.

요 약

화학적 변환방법을 이용하여 극성 유기용매에 대한 효소의 안정성을 증가시키기 위한 연구를 dimethylformamide/물 혼합물에서의 subtilisin Carlsberg를 대상으로 시도하였다. Subtilisin Carlsberg 분자가 가지고 있는 총 9개의 lysine중 3개가 trimellitic anhydride 혹은 pyromellitic anhydride와 반응하였으며 반응한 lysine마다 하나의 염기성 amino기가 각각 두개와 세개의 산성 carboxyl기로 치환되었다. 60°C의 수용액에서 trimellitic anhydride 혹은 pyromellitic anhydride와 반응한 subtilisin Carlsberg는 원래의 효소에 비하여 열안정성이 각각 2.6배와 1.6배씩 증가하였다. 25°C의 70%(v/v) dimethylformamide에서는 pyromellitic anhydride와 반응한 효소만이 원래의 효소에 비하여 안정성이 5.5배 증가하였다. 효소활성 반감시간은 원래효소의 경우 4.9hr였으며 pyromellitic anhydride와 반응한 효소의 경우에는 27.8hr였다.

감 사

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

사용기호

DMF	: N,N-Dimethylformamide.
MWCO	: Molecular Weight Cut Off.
Suc-AAPF-pNA	: N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>para</i> -Nitroanilide.
TNBS	: 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid.

참고문헌

1. A. Zaks and A. M. Klivanov(1984), *Science*, **224**, 1249.
2. J. S. Dordick(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 194.
3. K. Takahashi, A. Ajima, T. Yoshimoto, and

- Y. Inada(1984), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **125**, 761.
4. K. Takahashi, H. Nishimura, T. Yoshimoto, Y. Saito, and Y. Inada(1984), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **121**, 261.
 5. A. Matsushima, M. Okada, and Y. Inada (1984), *FEBS Letters*, **178**, 275.
 6. C. H. Wong, S. T. Chen, W. J. Hennen, J. A. Bibbs, Y. F. Wang, J. L. C. Liu, M. W. Pantoliano, M. Whitlow, and P. N. Bryan (1990), *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 945.
 7. Y. L. Khmelnitsky, S. H. Welch, D. S. Clark, and J. S. Dordick(1994), *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2647.
 8. P. Wang, T. G. Hill, C. A. Wartchow, M. E. Huston, L. M. Oehler, M. B. Smith, M. D. Bednarski, and M. R. Callstrom(1992), *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 378.
 9. Z. Yang, A. J. Mesiano, S. Venkatasubramanian, S. H. Gross, J. M. Harris, and A. J. Russell (1995), *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 4843.
 10. K. Chen, A. C. Robinson, M. E. Van Dam, P. Martinez, C. Economou, and F. H. Arnold (1991), *Biotechnol. Prog.*, **7**, 125.
 11. N. L. St. Clair and M. A. Navia(1992), *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7314.
 12. R. A. Persichetti, N. L. St. Clair, J. P. Griffith, M. A. Navia, and A. L. Margolin(1995), *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2732.
 13. M. Kamekura and Y. Semo(1990), *Biochem. Cell Biol.*, **68**, 352.
 14. V. V. Mozhaev, V. A. Siksniš, N.S. Melik-Nubarov, N. Z. Galkantaite, G. J. Denis, E. P. Butkus, B. Y. Zaslavsky, N. M. Mestechkina, and K. Martinek(1988), *Eur. J. Biochem.*, **173**, 147.
 15. V. V. Mozhaev, N. S. Melik-Nubarov, V. Y. Levitsky, V. A. Siksniš, and K. Martinek (1992), *Biotechnology and Bioengineering*, **40**, 650.
 16. N. N. Ugarova, G. D. Rozhkova, and I. V. Berezin(1979), *Biochimica et Biophysica Acta*, **570**, 31.
 17. M. Bender, M. L. Begue-Canton, R. L. Blakeley, L. J. Brubacher, J. Feder, C. R. Gunter, F. J. Kezdy, J. V. Killheffer Jr., T. H. Marshall, C. G. Miller, R. W. Roeske, and J. K. Stoops(1966), *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5890.
 18. S. L. Snyder and P. Z. Sobocinski(1975), *Analytical Biochemistry*, **64**, 284.
 19. D. J. Neidhart and G. A. Petsko(1988), *Protein Engineering*, **2**, 271.
 20. J. E. Bailey and D. F. Ollis(1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., p.185, McGraw-Hill, New York.
 21. P. Sears, M. Schuster, P. Wang, K. Witte, and C. H. Wong(1994), *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 6521.
 22. K. Ryu, J. Kim, and J. S. Dordick(1994), *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 266.
 23. C. N. Pace(1990), *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 14.