

## Hsp90을 이용한 유기용매에서의 과산화효소 안정화 연구

정자희 · 최유성\* · 송승훈\*\* · 유영제\*<sup>†</sup>

서울대학교 협동과정 생물화학공학전공, \*화학생명공학부, \*\*생명공학공동연구원  
151-742 서울시 관악구 신림동 산 56-1  
(2006년 1월 3일 접수, 2006년 2월 3일 채택)

### Stabilization of HRP Using Hsp90 in Water-miscible Organic Solvent

Ja Hee Chung, Yoo Seong Choi\*, Seung Hoon Song\*\* and Young Je Yoo\*<sup>†</sup>

Interdisciplinary Program for Biochemical Engineering and Biotechnology,  
\*School of Chemical and Biological Engineering,

\*\*Bio-MAX institute, Seoul National University, San 56-1, Shilim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea  
(Received 3 January 2006; accepted 3 February 2006)

#### 요 약

유기용매에서 효소를 이용하면 다양한 선택적 반응을 쉽게 수행할 수 있어 산업적 적용 가능성이 매우 높지만, 효소의 안정성 저하는 아직까지 큰 문제 중의 하나로 남아있다. 유기용매에서 효소 반응시 효소의 실활 원인과 효소의 안정화 방법 연구를 위하여 단백질의 folding에 관여하는 molecular chaperone의 일종인 heat-shock protein Hsp90을 이용하여, 대표적인 유기용매 반응시스템에서의 과산화효소 HRP 안정성 향상 연구를 수행하였다. 그 결과 Hsp90은 30% DMSO, 30% 및 50% dioxane 완충용액에서 HRP의 실활 방지 효과를 보였고, 실활된 효소의 재생에도 탁월한 효과를 보였다. 그리고 형광분석과 CD(circular dichroism)에 의한 구조분석을 수행하여 Hsp90이 유기용매에 의해 unfolding되어 있는 효소를 다시 refolding하는 데 기여함을 알았다.

**Abstract** – Enzymes in organic media afford many advantages such as chiral synthesis and resolution, modification of fats and oils and production of biodegradable polymers. However, the nature of solvents influences the activity and stability of enzymes, and the presence of organic solvents always constitute a risk of enzyme inactivation. Heat-shock protein Hsp90, one of the molecular chaperone, was applied for understanding of enzyme inactivation and for increasing of enzyme stability in water-miscible organic solvent. Hsp90 showed stabilization effect on HRP in the 30% of DMSO, in the 30% and 50% of dioxane. Hsp90 also showed reactivation effect on the inactivated HRP by water-miscible organic solvent such as dioxane and DMSO. In addition, structural analysis using fluorescence spectrophotometry and circular dichroism showed that exposure of HRP in water-miscible organic solvent caused appreciable conformational changes and enzyme inactivation, and the unfolded HRP by water-miscible organic solvent was refolded by Hsp90.

Key words: Hsp90, HRP, Enzyme Activity, Enzyme Stability, Reactivation, Water-miscible Organic Solvent

#### 1. 서 론

효소는 상온 상압에서 매우 높은 활성과 선택성을 지닌 천연물질이다. 효소를 이용하여 화학제품을 생산할 경우, 광활성을 띠는 제품 생산이 용이하고, 더욱이 화학적으로 아직까지 해결하지 못하는 반응들을 해결할 수 있는 등 산업적으로 매우 높은 잠재력을 지니고 있다. 그럼에도 불구하고 효소는 대부분 반응이 수용액에서 진행되고, 안정성이 낮다는 이유로 아직까지 산업적으로 많이 이용되지 못하고 있는 실정이다. 1980년대 중반 이후 효소가 유기용매 내에서도 특정 조건하에서 높은 활성과 안정성을 보인다는 연구결과

가 발표된 이후, 지금까지의 꾸준한 연구에 의해 효소의 산업적 이용 가능성은 점점 현실화되어 가고 있지만, 아직까지 효소 안정성의 본질에 대한 규명은 이루어지지 않은 상태이며, 이러한 이유로 효소를 산업적으로 이용하는데 제한이 따르고 있다[1, 2].

유기용매를 포함하는 생촉매 반응에서 유기용매의 성질은 효소의 활성과 안정성에 큰 영향을 미친다. 유기용매는 효소와의 상호작용을 통해 수소결합이나 소수성 힘과 같은 비공유성 결합을 파괴함으로써 단백질의 구조를 변화시켜 효소의 활성을 저하시키거나 불안정하게 한다[3, 4]. 단백질의 구조적 변화 이외에 유기용매로 인하여 반응계의 유전율이 낮아지면 전하를 가진 효소의 잔기들 간에 정전기적 상호작용이 커져 효소의 유연성(flexibility)을 감소시켜 효소의 활성을 저하시키기도 한다. 또한, 유전율의 변화는 단백질 표

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: yjyoo@snu.ac.kr

면 잔기의 pKa값을 일부 변화시킴으로써 활성부위(active site)가 기질과 결합하거나 반응하는 환경을 변화시킨다[5, 6].

본 연구에서는 유기용매상에서 효소 반응시 나타나는 실패의 원인을 조사하고, 안정성을 증대시키기 위한 방법으로 Hsp90을 사용하였고, 대상 효소로서 과산화 효소인 horseradish peroxidase(HRP)를 사용하였다. Chaperone은 생물 체내에서 새로 합성된 단백질의 folding을 도와 단백질이 정상적인 3차 구조를 형성하도록 돕는 단백질이며, 대표적인 chaperone으로는 heat shock protein Hsp60, Hsp70, Hsp90이 있다[7-9]. 특히 이들 중 Hsp90은 다른 chaperone과 달리 ATP 없이도 기능 할 수 있다는 장점을 갖고 있으므로, Hsp90을 이용한 유기용매에서의 효소의 안정성 향상 연구는 유기용매에서 효소의 실패 원인을 조사하고 유기용매에서 효소의 안정성 향상을 위한 전략을 수립하는데 의미 있는 접근 방법이다.

특히, 본 연구는 친수성 유기용매에서 효소의 실패가 단백질의 구조적 unfolding에 기인하여 나타나는지, 단백질 표면의 아미노산 잔기와 유기용매와의 상호작용에 의해서 주로 발생하는지를 조사하기 위한 좋은 모델 중의 하나이다. 구체적으로, Hsp90은 unfolding 단백질의 자체의 refolding에 관여하는 것으로 알려졌다. 그러므로 본 연구 결과를 통하여 단백질의 실패 원인을 고찰할 수 있으며 유기용매에서 단백질 안정성 향상을 위한 전략 수립의 가이드를 제시할 수 있다.

효율적인 실험을 수행하기 위하여 본 연구에서는, 대표적 친수성 유기용매인 DMSO(dimethyl sulfoxide)와 dioxane에서 HRP의 실패를 조사하였고, 유기용매 반응에 Hsp90을 적용시켰을 때 효소 반응 및 안정성의 변화를 측정하였다. 또한, 실패된 효소를 수용액과 Hsp90에 의하여 재생하였을 때, 효소 HRP 활성의 변화를 측정하였고, 단백질의 구조 분석을 위하여 Fluorescence spectrometry와 CD(circular dichroism)를 이용하여 유기용매에서 Hsp90 처리에 의한 HRP의 구조 변화 해석을 시도하였으며, 이를 바탕으로 친수성 유기용매에서 HRP의 효소 실패는 단백질의 구조적 unfolding에 기인한다는 점을 보였다.

## 2. 실험

### 2-1. 실험 재료

본 실험에 사용한 HRP와 DMSO 그리고 HRP assay에 사용된 pyrogallol은 Sigma(St. Louis, MO)에서 구입하였다. Buffer 제조에 사용된  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 와  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  용매 dioxane은 Junsei(Tokyo, Japan)에서 구입하였으며 35% 과산화수소는 Showa Chemical에서 구입하였다.

### 2-2. HRP 활성 측정

HRP의 활성도는 pyrogallol을 기질로 한 HRP assay 방법을 토대로, 25 °C 조건에서 pH 7.0, 10 mM phosphate buffer를 사용하여 측정하였다. Assay 방법은 light path 1 cm cell에 0.5%(w/w)  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.16 ml, 5.0%(w/v) pyrogallol solution 0.32 ml, 0.1 mg/ml의 HRP 용액 0.1 ml, buffer 또는 실험에 사용된 것과 같은 농도와 종류의 용매 2.4 ml을 넣어 전체 반응 부피 3 ml로 반응시켰다. 기질인 pyrogallol과 효소의 반응으로부터 형성된 purpurogallin의 변화량을 UV-visible spectrophotometer(UVIKON 930, Tegimenta Co, Switzerland)를 사용하여 420 nm에서 측정하였다. 효소의 활

성을 나타내기 위해 1 unit의 HRP는 pH 7.0, 25 °C에서 1분간 pyrogallol로부터 1  $\mu\text{M}$ 의 purpurogallin을 형성한다고 정의했다[10].

### 2-3. Fluorescence spectrometry and CD(circular dichroism)분석

단백질의 tryptophan을 감지하는 intrinsic fluorescence의 관찰에 의해 단백질의 구조변화를 측정하였다. Fluorescence 측정은 295 nm에서 excitation 시켰으며 사용된 효소의 농도에 따라 excitation/emission band-width는 3 nm에서 10 nm 사이로 조정하여 측정하였다. 효소의 2차 구조 변화는 CD(circular dichroism)을 이용하여 측정하였다. Spectrofluorometer는 Shimadzu사의 RF5000이고, CD 측정은 Jovin-Yvon(France)의 CD6 Dichrograph를 이용하였다.

### 2-4. Hsp90에 의한 효소의 활성 재생

Hsp90에 의한 활성변화를 측정하기 위해 한 개의 반응기에는 0.1 mg/ml의 HRP 0.1 ml 효소용액을 10 mM, pH 7 phosphate buffer 1.4 ml을 넣어 1.5 ml의 HRP 수용액을 만들었다. 또 다른 반응기에는 같은 농도의 HRP 0.1 ml 효소용액과 0.2 mg/ml의 Hsp90 0.1 ml 그리고 10 mM, pH 7 phosphate buffer 1.3 ml을 혼합하여 1.5 ml의 HRP 수용액을 만들었다. 이때 사용된 HRP와 Hsp90의 양은 1:1 몰(mole)비이다. 두 개의 반응기를 25 °C 항온조에서 150 rpm으로 shaking하면서 일정시간 간격으로 0.1 ml씩 샘플을 취하여 시간에 따른 HRP 활성 변화를 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. DMSO와 원충용액에서의 HRP 활성

원충용액, 30% DMSO, 50%(v/v) DMSO에서의 HRP의 활성도를 측정하였다. 최초의 활성도 측정은 각 용매에 효소를 넣은지 2분 내에 측정된 것으로 pH 7.0, 10 mM phosphate buffer, 25 °C에서 측정하였다(Fig. 1). 처음 2분 이내에 30% DMSO의 경우 37.1%, 50% DMSO의 경우 11.3%의 활성도만이 남아 있었다. 또한, HRP는 용매와 접하게 되는 초기의 매우 짧은 순간 동안 급격한 활성 감

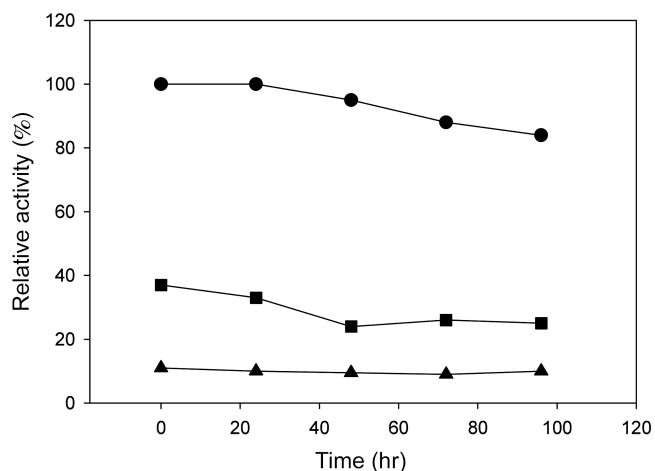


Fig. 1. Relative activity of HRP in 30%, 50% (v/v) DMSO and buffer at pH 7.0, 25 °C. HRP was incubated at 25 °C waterbath with shaking at 150 rpm. HRP concentration was 0.1 mg/ml. ●: buffer, ■: 30% DMSO, ▲: 50% DMSO.

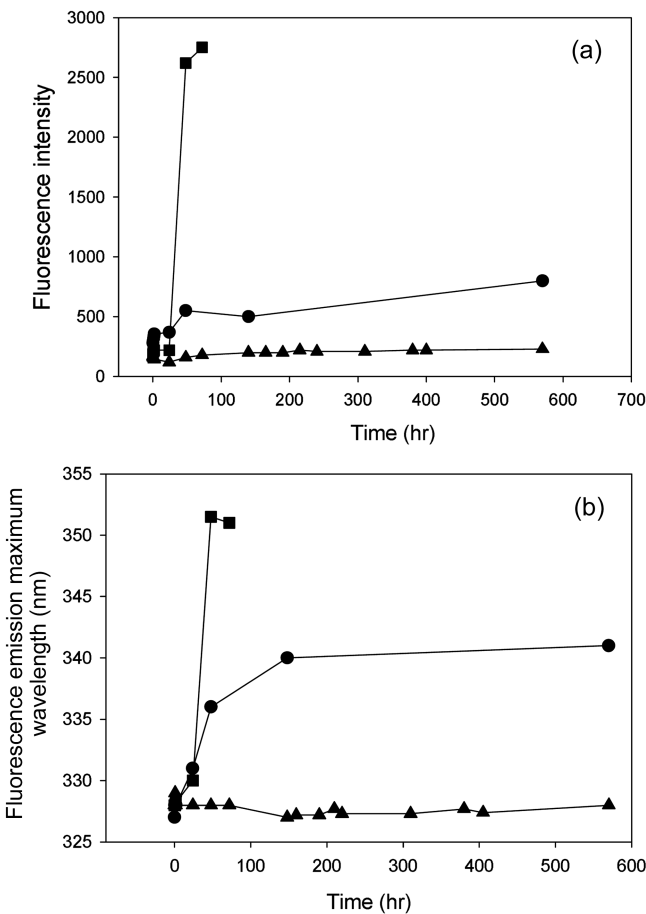


Fig. 2. Fluorescence of Hsp90 in 30%, 50%, 90% concentration (v/v) of DMSO. ●: 90% DMSO, ■: 50% DMSO, ▲: 30% DMSO. Hsp90 was excited at 295 nm. (a) Fluorescence intensity of Hsp90 in DMSO. (b) Fluorescence emission maximum wavelength of Hsp90 in DMSO.

소를 보이고 그 이후로는 완만한 활성 감소를 보이는 실활이 일어난다는 것을 알 수 있었다. 유기용매에서 HRP 구조변화를 알아보기 위하여, 30% DMSO에서 HRP는 용매와 접한 후 초기 2분 내에 fluorescence intensity를 측정하였다. 그 결과 30% DMSO에서 fluorescence emission  $\lambda_{\max}$ 는 330.8 nm이며, 50% DMSO에서 fluorescence emission  $\lambda_{\max}$ 는 341.2 nm이었다. 295 nm에서 excitation시켰을 때, free tryptophan의 emission  $\lambda_{\max}$ 가 350 nm이고 native protein의  $\lambda_{\max}$ 가 328~332 nm 임을 고려한다면 30% DMSO에서 HRP의 구조는 거의 변하지 않았지만, 50% DMSO에서는 구조변화가 있었음을 확인할 수 있었다.

### 3-2. Hsp90을 이용한 효소 안정화

유기용매에서 효소 안정화에 Hsp90을 활용하기 위한 기초 연구로서 우선 본 연구에 사용된 유기용매인 DMSO에서 Hsp90의 안정성을 fluorescence를 이용하여 알아보았다. Fig. 2(a)는 30%, 50%, 90% DMSO에서 Hsp90의 구조 변화에 따른 fluorescence intensity 측정결과이며, Fig. 2(b)는 시간에 따른 emission 최대 파장의 shift를 나타낸 그래프이다. Fig. 2(a)를 볼 때 30% DMSO에서 Hsp90의 fluorescence intensity의 변화는 거의 없었지만, 50%와 90% DMSO

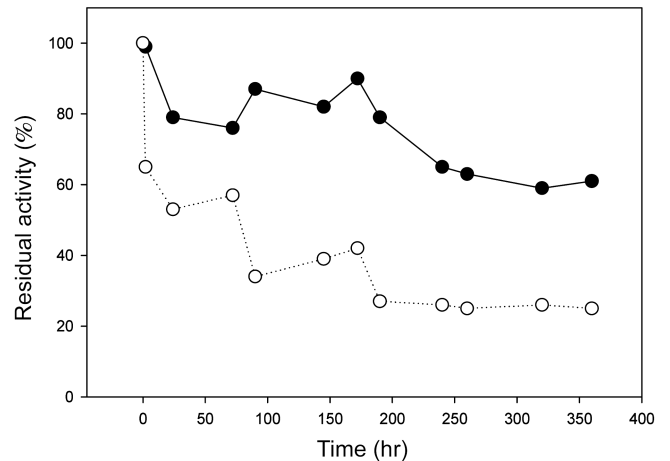


Fig. 3. Effect of Hsp90 on HRP stability in 30% (v/v) DMSO at 10 °C with shaking at 150 rpm. ●: HRP + Hsp90, ▲: HRP only.

에서 Hsp90은 약 2시간까지는 점진적인 fluorescence intensity 증가를 보이다가 약 2시간 후에는 매우 급격한 intensity 증가를 나타내었다. 또한, Fig. 2(b)에 의하면 30% DMSO에서 Hsp90의 최대 emission 파장은 328.4 nm로 거의 구조적 변화가 없다고 볼 수 있었지만, 50%와 90% DMSO에서 최대 emission 파장의 변화를 확인하였다. 이는 Hsp90의 tryptophan residue가 DMSO에 완전히 노출되었음을 의미한다. 따라서, 30% DMSO에서 Hsp90의 구조적 변화가 거의 없음을 바탕으로 30% DMSO에서 HRP의 안정화를 위해 Hsp90의 적용이 가능하지만, DMSO 농도 50% 이상인 경우에는 Hsp90이 구조적 변화를 보이므로 Hsp90의 구조가 대부분 거의 파괴되었다고 판단할 수 있어 50% 이상의 DMSO에 Hsp90을 직접 적용하기는 어렵다고 판단되었다.

HRP의 효소 안정화를 위해 30% DMSO 용매의 효소반응 시스템에 Hsp90을 적용하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, 10 °C, 30% DMSO에서 약 360시간 incubation했을 때 Hsp90과 함께 보관된 HRP는 완충용액에서 초기 활성의 약 60.7%가 남아 있지만, Hsp90을 넣어 주지 않은 HRP는 완충용액 초기 활성도의 약 24.5%만이 남아 있었다. 마찬가지로 30%, 50%의 dioxane에서 실험을 수행하였을 때, Hsp90은 30% DMSO 시스템에서처럼 HRP의 안정화에 효과를 보였다(Fig. 4). 결과적으로 Hsp90이 unfolding 되지 않는 유기용매에서 HRP의 효소 안정화에 기여할 수 있음을 알 수 있었고, 또한 친수성 유기용매와 수용액에 혼합 용매 시스템에서 효소의 실활의 원인으로 효소 자체의 구조적 unfolding을 생각할 수 있었다. 즉 유기용매에서 효소의 안정화를 위해 효소 표면에서의 아미노산 잔기와 용매 그리고 기질과의 상호작용에 대한 연구 이외에, 단백질 자체의 구조적 folding 안정성을 증가시키는 방법은 매우 중요한 효소 안정화 전략 중의 하나라고 판단된다.

한편, Hsp90을 이용하여 실활된 HRP의 활성을 재생하는 실험을 수행하였다. 유기용매에서 효소의 실활이 단백질의 unfolding에 기인한다면 Hsp90에 의해 활성을 잃은 효소가 재생될 것이라 가정하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 Hsp90은 유기용매에서 실활된 HRP의 활성을 효과적으로 재생하였다. 90% DMSO에서 Hsp90이 없는 경우 10% 이내의 활성회복만이 관찰됐지만, 59.3%의 활성이 남아있는 HRP는 Hsp90에 의해 94.6%까지 활성이 회복

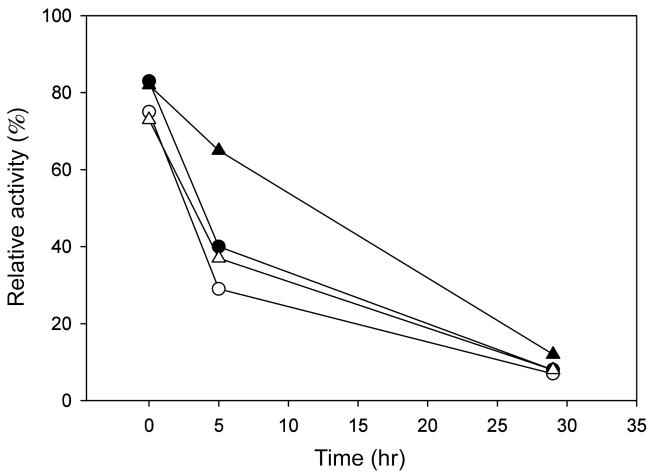


Fig. 4. Effect of Hsp90 on HRP stability in 30%, 50% (v/v) dioxane at 25 °C with shaking at 150 rpm. ▲: HRP with Hsp90 in 30 % dioxane, ●: HRP without Hsp90 in 30% dioxane, △: HRP with Hsp90 in 50% dioxane, ○: HRP without Hsp90 in 50 % dioxane (v/v).

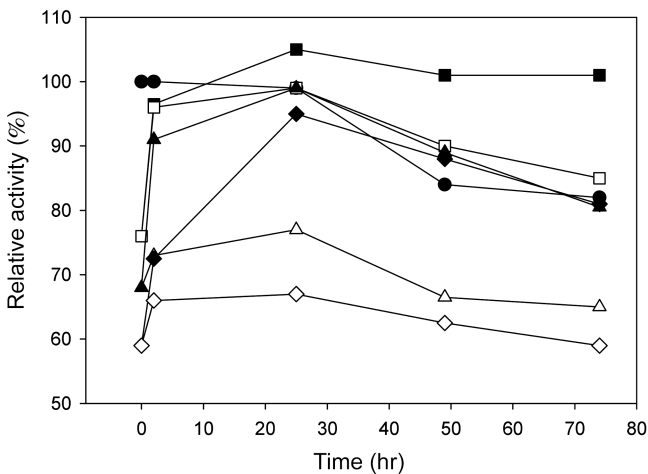


Fig. 5. Reactivation of HRP in DMSO: The symbols represent the HRP inactivated in each concentration of DMSO. Reactivation by Hsp90 is marked as solid line and reactivation without HRP marked as dashed line. ●: buffer, ■: inactivated at 50 % DMSO/reactivated by Hsp90, □: reactivated without Hsp90, ▲: 70 % DMSO with Hsp90, △: 70 % DMSO without Hsp90, ◆: 90 % DMSO with Hsp90, ◇: 90 % DMSO without Hsp90.

되었다. 그러나 잔여활성이 40% 미만일 때는 Hsp90에 의한 재생효과는 미흡한 수준에 그쳤다. 이러한 결과로부터, DMSO 용매 시스템에서 HRP의 실패는 유기용매에서의 단백질의 구조적 unfolding에 기인함을 확인할 수 있었다. 하지만, 심한 구조변화에 의한 inactivation된 상태의 효소는 원래 구조로 회복시키기 힘들다는 사실을 추정할 수 있다. 이러한 측면에서, 효소의 가역적인 unfolding에 의한 실패 이외에 비가역적 구조변화에 의해 야기되는 inactivation이 발생하지 않도록 하기 위한 앞으로 연구가 더 필요할 것으로 판단되며, 앞으로 단백질 안정화 전략수립을 위하여 더욱 정량적인 구조적인 연구가 필요할 것이다.

한편, 1993년까지 Hsp90은 signal transduction에 관여하는 특정

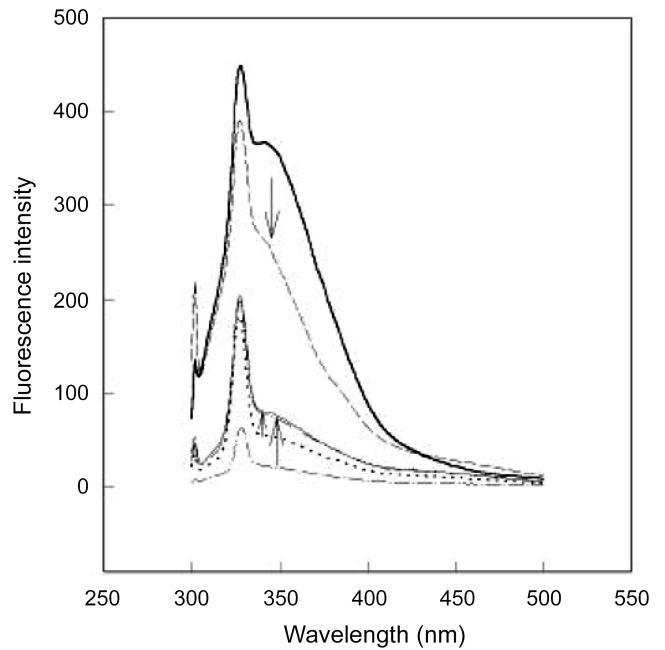


Fig. 6. Spectra of fluorescence change of HRP. (-): initial fluorescence of inactivated HRP+Hsp90, (---): fluorescence of inactivated HRP+Hsp90 after one-day of incubation, (—): initial fluorescence of HRP in buffer, (· · ·): fluorescence of HRP in buffer after one-day of incubation, (·····): initial fluorescence of inactivated HRP without Hsp90, (— · —): fluorescence of HRP without Hsp90 after one-day incubation. HRP concentration is 0.01 mg/ml; molar ratio of HRP:Hsp90=1:1; HRP was inactivated by stocked at 90% DMSO for one day. HRP was incubated at 25 °C with shaking at 145 rpm.

단백질의 구조와 활성을 조절하는 특수한 chaperone이라고 알려졌었다[11]. 그러나 1994년 Jakob, 1996년 Buchner에 의해 Hsp90은 in vitro에서 non-native protein과 선택적으로 반응하여 aggregation을 효과적으로 방지하는 기능도 할 수 있다는 실험결과가 발표되었다 [12, 13]. 본 연구에서 Hsp90의 유기용매에서의 효소안정화 결과도 일부 Jakob과 Buchner의 실험결과와 같이 효소의 aggregation 방지 기작에 의한 것이라 추측할 수 있다. 이를 위해 Hsp90에 의해 HRP가 reactivation될 때 HRP의 구조변화를 조사하였다. Fig. 6은 90% DMSO에서 실패된 효소가 Hsp90에 의해 reactivation될 때의 3차 구조 변화를 나타낸 그래프이다. HRP의 경우 tryptophan residue은 오직 하나만 존재하고 단백질의 내부에 위치하고 있다. 따라서 Fluorescence intensity의 변화를 통하여 단백질의 folding 상태를 간접적으로 확인할 수 있다[10]. 구체적으로 intensity의 증가는 단백질의 구조적 unfolding을 의미하고 증가된 intensity의 감소는 단백질의 refolding을 말해준다. 실험에서 실패되지 않은 효소와 이미 실패된 효소를 24시간 동안 incubation 결과, 변화의 차이는 있지만 fluorescence intensity가 모두 증가하였다. 하지만, 이미 intensity가 증가한 실패된 효소 샘플에 Hsp90을 넣어 주었을 때 fluorescence intensity가 오히려 감소함을 확인하였다. 단백질의 fluorescence intensity 변화가 유기용매 처리 이전의 intensity로 회귀하였다고 하여 단백질이 원래의 구조로 회복하였다고 주장하는데 다소 무리가 있을 수 있다. 하지만, 이러한 3차 구조 변화결과는 효소의 활성 변화 결과와도 일치하는 것으로 HRP가 Hsp90에 의해 reactivation되

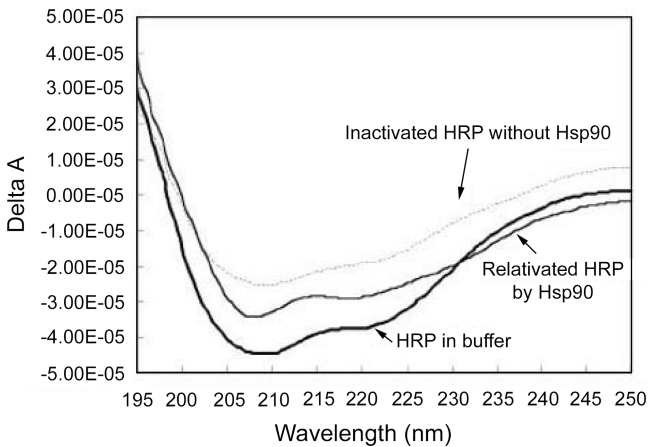


Fig. 7. Far-UV CD spectra of HRP. (-): spectra of HRP in buffer, (- -): spectra of reactivated HRP by Hsp90, (· ·): spectra of inactivated HRP without Hsp90. HRP concentration was 0.2 mg/ml. HRP was incubated with Hsp90 for 24 hours with shaking at 145 rpm at 25 °C. Molar ratio of HRP: Hsp90 is about 5:1.

는 동안 단백질이 구조적으로 refolding 되었음을 알 수 있다. Fig. 7은 90% DMSO에서 실활된 효소가 reactivation되었을 때의 2차 구조 변화에 대한 CD 분석결과를 나타낸 그래프이다. 75.9%로 실활된 효소에 Hsp90과 효소를 1:5의 비율로 반응시켰을 때 24시간 후 HRP의 활성은 85.1%로 reactivation되었으며 이때 HRP의 2차 구조를 100% 활성의 native HRP의 2차 구조와 비교하였을 때, Hsp90에 의한 reactivation된 효소는 native structure에 가까운 구조로 회복됨을 확인하였다.

본 연구를 통하여 water-miscible co-solvent system에서 HRP의 실활이 단백질의 구조적인 unfolding에 기인함을, 단백질 folding에 관여하는 Hsp90에 의해 효소의 활성과 구조가 native 상태의 활성과 구조로 회복되는 결과를 통하여 확인할 수 있었다. 결과적으로, 유기용매에서 효소의 안정성을 향상시키기 위하여 단백질과 기질 그리고 용매와의 상호작용에 대한 이해가 매우 중요하지만, 단백질 자체의 구조적 안정성을 증가시키는 것 또한 매우 중요하다고 할 수 있다. 더욱 많은 연구가 필요하겠지만, Hsp90을 이용한 유기용매에서의 단백질 안정화 연구는 유기용매에서 단백질의 구조적 안정성을 이해하는 연구 방법의 하나라고 할 수 있으며, 이러한 연구는 앞으로 유기용매에서 효소의 안정화 방법을 찾는 데 많은 도움이 될 것으로 판단된다.

## 참고문헌

1. Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger, C., "Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents," *Biotechnol. Bioeng.*, **30**(1), 81-87(1987).
2. Lee, S. M., Yeo, J. S., Park, K. and Yoo, Y. J., "Synthesis of Lignin-phenol Copolymers Using Horseradish Peroxidase," *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**(1), 22-26(2000).
3. Ryu, K. and Dordick, J. S., "How do Organic Solvents Affects Peroxidase Structure and Function?," *Biochemistry*, **31**(9), 2588-2598 (1992).
4. Park, B. J., Lee, C. H. and Koo, Y. M., "Development of Novel Protein Refolding Using Simulated Moving Bed Chromatography," *Kor. J. Chem. Eng.* **22**(3), 425-432(2005).
5. Bell, G., Halling, P. J., Moor, B. D. and Rees, D. G., "Biocatalyst Behavior in Low-water System," *Trends. Biotech.*, **13**(11), 468-473 (1995).
6. Schmitke, J. L., Stern, L. J. and Klivanov, A. M., "Comparison of x-ray Crystal Structures of an Acyl-enzyme Intermediate of Subtilisin Carlsberg Formed in Anhydrous Acetonitrile and in Water," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**(22), 12918-12923(1998).
7. Jaenicke, R. and Buchner, J., "Protein Folding: From Unboiling an Egg to Catalysis of Folding," *Chemtract: Biochem. Mol. Biol.*, **4**, 1-30(1993).
8. Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. and Jakob, U., "Hsp90 Chaperones Protein Folding in Vitro," *Nature*, **358**(6382), 169-170 (1992).
9. Freeman, B. and Morimoto, R., "The Human Cytosolic Molecular Chaperones Hsp90, Hsp70, and Hdj-1 Have Distinct Roles in Recognition of a Non-native Protein and Protein Refolding," *EMBO J.*, **15**(12), 2969-2979(1996).
10. Kim, J. R., Choi, Y. S. and Yoo, Y. J., "Reactivation of Horseradish Peroxidase in Organic Solvent Using Extraction," *Biotechnol. Lett.*, **22**(6), 486-489(2000).
11. Xu, Y. and Lindquist, S., "Heat Shock Protein Hsp90 Govern the Activity of p60 v-src Kinase," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7074-7078(1993).
12. Jakob, U. and Buchner, J., "Assisting Spontaneity-the Role of Hsp90 and Small Hsps as Molecular Chaperones," *Trends in Biochem. Sci.*, **19**(5), 205-211(1994).
13. Buchner, J., "Supervising the Fold: Functional Principles of Molecular Chaperones," *Faseb J.*, **10**(1), 10-19(1996).