

초임계 유체에서의 효소활성

장 영 진

이화학부

목 차

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. 서론 | 3.1 Ester Synthesis |
| 2. 초임계 유체를 이용한 효소반응에 영향을 주는 요인 | 3.2 Transesterification |
| 2.1 압력 | 4. 다른 초임계 유체에서의 효소활성 |
| 2.2 수분함량 | 4.1 압력 조절에 의한 물리적 요인이 효소 반응에 미치는 영향 |
| 2.3 용매 | 4.2 초임계 유체에서 lipases와 proteases 의 입체특이성 |
| 2.4 열안정성 | 5. 결론 |
| 2.5 물질이동 | 6. 참고문헌 |
| 3. 초임계 이산화탄소 조건에서의 lipase 활성 | |

초임계 유체에 대한 일반적 인식은 유기용매를 대체하는 추출 농축적인 측면에서 Supercritical Fluid Extraction(SFE)인 것으로 알려져 있었으나, 현재 Supercritical Fluid Reaction (SFR)이라는 초임계 유체를 이용한 효소반응이 새로운 분야로 대두되고 있다. 본 문헌(Kamat, SV, Beckman, EJ, and Russell, AJ (1995) Enzyme Activity in Supercritical Fluids. Critical Rev. in Biotech. 15(1) 41-71)의 저자 Dr. Russell과 그 연구진들은 그동안 초임계 상태에서의 효소반응 분야에 많은 업적을 이루어 왔다. 아직 많은 부분이 확증적으로 밝혀져 있지 않고 상호 상충되는 연구 결과들이 보고되고 있는 초기 연구단계이므로, 우선 각 조건에서의 반응 결과들을 비교 분석할 수 있는 체계적인 실험결과들이 축적되어야 하고 효과적인 효소 반응을 위한 반응기 개발이 요구된다. 이러한 점에서 본 문헌에서 제시한 항목들은 초임계 유체를 이용한 효소반응의 발전에 중요한 문제점들을 제시함으로써 독자들에게 연구동기를 제공하고자 하였다. 이제 공학적 측면에서 이해되어 오던 초임계 유체 분야는 생화학이나 분자생물학 측면에서 효소의 새로운 환경에서의 작용기작에 대한 연구로 초임계 유체라는 본래의 특성을 유지하면서 효소학에 관한 기초 연구 및 응용분야의 확대를 기대하고 있다. 끝으로 본 문헌 소개에서는 비교적 많은 연구가 진행되어온 초임계 이산화탄소에서 Lipase에 의한 효소반응을 중심으로 기술했음을 첨부 한다.

1. 서 론

효소반응에 대한 연구는 주로 물을 용매로 하는 조건이었지만 지난 10년 이와같은 고정관념은 크게 변하여 유기용매 조건에서, 기체상태에서, 그리고 초임계 유체 상태에서의 효소반응으로 점차 연구 범위를 넓혀가고 있다. 특히, 산업현장에서 유기화학 반응의 대부분은 무기물질을 촉매제로 이용하여 왔으나 최근 효소를 이용하려는 움직임은 효소작용이 반드시 물에서만 일어나는 것이 아니라는 새로운 개념이 확산되고 있기 때문이다. 이것은 비수계 매체의 하나인 초임계 유체가 많은 장점들이 있기 때문인데, 특히 효소 촉매반응의 용매(혹은 분산제)로서의 기능과 반응물질의 선택적 분리 추출이라는 점등을 특징으로 한다.

초임계 유체의 물리적 성질은 액체와 기체의 중간적 성질을 갖는데, 밀도는 액체와 유사하여 매우 높은 편이고 점도와 확산계수는 기체와 유사한 수준이므로 물질의 이동속도를 높여 효소반응을 촉진할 수 있다. 더욱이 표면장력이 전혀 없으므로 보통 액체가 침투할 수 없는 기공들에 침투할 수 있어 분말화한 효소들의 접촉면적을 확대하여 효소반응의 촉진에 유리하다. 기타 생명공학 측면에서 초임계 유체의 장점들을 다음에 항목별로 나열했다.

1. 일반 유기용매의 반응에서와 같이 소수성 반응물질들의 완전 용해에 유리하고 일반미생물의 번식을 저해하여 미생물 오염의 위험성이 없다.
2. 압력의 조절에 따라 초임계 유체의 밀도를 변화시킴으로써 밀도 차이에 의한 반응물질의 용해도 및 효소 역가에 대한 영향 등을 살펴볼 수 있다.
3. 물의 활성도가 전혀 없는 조건이므로 가수 분해 반응의 열역학적 평형에 의한 진행방향을 반대 방향인 합성 반응 방향으로 역전시킬 수 있다.
4. 효소가 초임계 유체하에서 용해하지 않으므로 효소반응 후 효소의 회수가 수월하고 따라서

효소의 고정화가 필요하지 않다.

5. 반응기에 연결된 분리구의 일련의 단계적인 압력의 강화로 생성물질의 선별적 분리 및 정제가 가능하다.
6. 효소반응 물질의 초임계 유체에 대한 용해도를 적은 양의 acetone과 methanol등의 조용매(cosolvent)를 넣음으로써 변화시킬 수 있다.

이상과 같은 특징이 있음에도 불구하고 현재 초임계 유체하에서의 효소반응 연구는 1985년 이후 꾸준한 증가를 보이고 있으나 발표된 논문 수효는 매우 적은 편이다. (그림 1)

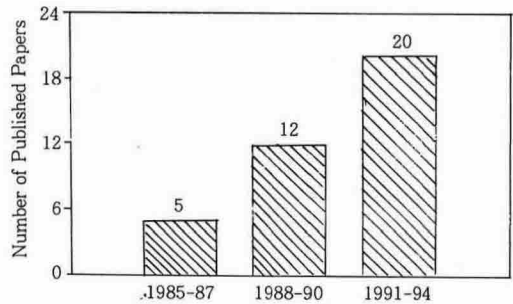


그림 1. 초임계 유체에서 효소의 성질에 관한 연구 논문 편수

2. 초임계 유체를 이용한 효소반응에 영향을 주는 요인

수용액 상태에서의 효소반응 연구는 활발한 진척이 있어 세세한 작용기작들이 밝혀지고 있지만, 비수계 상태에서는 특히 초임계 유체의 경우는 아직 많은 연구 결과가 집적되어 있지 않은 상태이며 수용액 조건에 51의 효소 반응기작이 그대로 적용될 수는 없다.

2.1 압력

초임계유체의 압력이 효소반응에 미치는 영향은 다음 3가지 측면에서 관측되어야 하며 이들의 상

호 유기적 관계는 종합적으로 고려되어야 한다.

2.1.1 효소의 안정성에 미치는 영향^{1, 2, 3)}

초임계 상태를 위한 압력과 온도에서 일반적으로 효소활성은 약화되지 않는다고 보고되었지만 초임계 유체의 효소 안정성에 대한 영향은 일반적으로 설명되어질 수는 없다. 최근 문헌에서 trypsin의 경우 초임계 이산화탄소에서 효소구조의 변화(conformational change)가 있음을 형광분석을 통해 보고한 바 있고, 또한 부분적인 단백질 변성이 일어나기도 하며 이러한 현상은 수분 함량 혹은 hydroxyl(-OH)기를 포함하는 반응물질(ethanol 혹은 2-ethylhexanol)등의 함량이 증가함에 따라 단백질 변성이 급격히 증가한다고 보고하였다.

2.1.2 효소 반응 속도에 미치는 영향

효소반응의 활성화에 따른 부피의 변화(activation volume)는 바로 압력에 의한 반응초기속도 변화의 결정적인 요인이 된다. 일반적으로 공유결합의 분해와 생성은 압력의 영향이 무시할 수 있는 수준이나, 효소의 전체적인 분자구조를 유지하거나 효소 반응의 활성화에 관여하는 비공유성 결합들은 압력의 변화에 매우 민감한 경향이다. 즉, 수소결합의 경우 압력에 대한 영향력이 적은 반면 이온결합의 형성과 분해의 경우 반응물과 생성물은 효소와 특이적으로 결합하므로 효소와 기질 복합체의 밀집 정도(compactness)에 민감하게 변화한다. 일례로 fluoroform조건에서 lipase에 의한 methyl methacrylate와 2-ethylhexanol간에 transesterification반응에서 활성화에 따른 부피변화는 초임계 상태에 도달하는 압력 조건에서 최대에 이르렀고 압력이 더 증가하면 점차 변화가 없었다. 한편 효소반응의 초기속도는 반대로 초임계 상태에까지 감소하다가 그 후에는 압력증가에 따른 반응 속도에 변화가 없었다. (그림 2)

2.1.3 초임계유체의 물리적 성질에 미치는 영향

용매로서의 화학적 구조를 변화시키지 않으면서

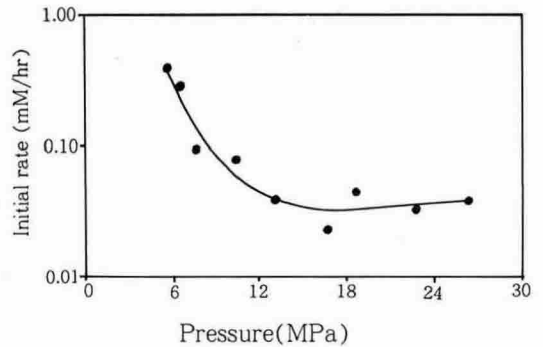


그림 2. 압력이 초임계 유체 fluoroform에서 lipase(*Candida cylindracea*)에 의한 methylmethacrylate과 2-ethylhexanol간의 transesterification의 초기 반응속도에 대한 영향.

초임계유체의 물리적 성질은 압력과 온도에 따라 변화한다. 이러한 물리적 성질의 변화정도는 초임계 유체의 종류에 따라 그 양상이 매우 다르지만 전반적으로 변화폭이 크지 않으며 점진적으로 변화한다. 일례로 propane의 경우 밀도, Hildebrand용해상수, 그리고 dielectric constant 등의 물리적 성질은 압력에 따른 변화가 전혀 없었다. (그림 3)

2.2 수분함량

효소는 수분이 전혀 없는 경우 활성이 없으며 활성에 필요한 수분함량은 약 1% 정도 수준으로 매우 낮은 편이다. 즉, 효소를 한계점으로 둘러쌀만한, 혹은 그 이하의 수분함량이면 비공유성 결합들을 이루는데 지장이 없게되고 효소의 안정적인 구조를 유지할 수 있기 때문이다. 소수성 용매일수록 이러한 필수적인 수분을 효소로부터 제거하는 경향이 낮기 때문에 친수성 용매에 비해서 효소의 활성이 크게 된다. 그러나 최적의 효소활성을 나타내는 수분함량은 각각의 효소에 따라, 어떤 용매를 사용하느냐에 따라, 그리고 효소의 고정화에 사용된 지지물(support)의 종류에 따라 차이를 나타낸다. 다시 말해서, 필수수분함량은 효소의 활성 부위로 물

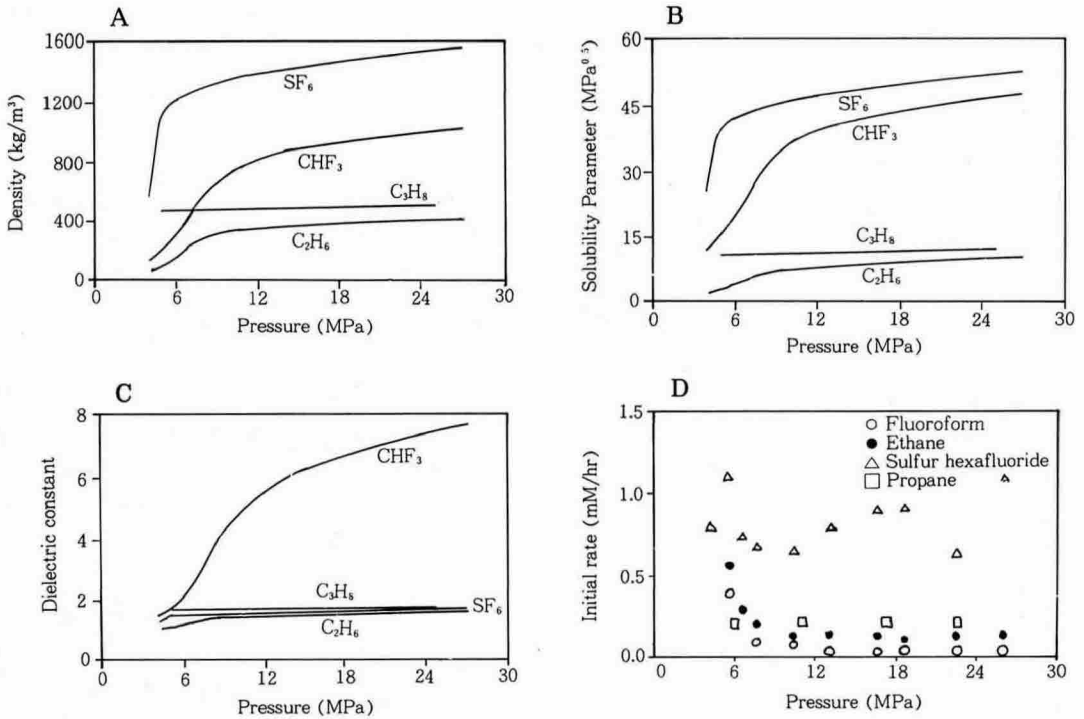


그림 3. 압력이 ethane(C₂H₄), fluoroform (CHF₃), sulfur hexafluoride (SF₆), propane (C₃H₈) 등의 물리적 성질인 밀도(A), Hildebrand 용해상수(B), 그리고 dielectric constant (C) 및 각각의 용매에서 lipase 반응속도(D)에 대한 영향.

분자의 적절한 침투 양상에 따라 결정된다.
 한편, 수분 함량이 너무 많을 경우에는 생합성보다는 분해과정이 주된 화학평형의 방향을 이루어 원하는 생합성 방향의 반응속도는 떨어지게 된다. 또한 초임계 유체에 분산된 효소가 서로 응집하는 현상이 나타나게 되고 효소와 용매의 접촉면적이 줄어들어 효소의 효과적인 반응진행을 막게 된다. 비수계 용매에서 효소의 수화정도를 조정하는 데 두가지 방법이 알려져 있는데 첫째, 반응 혼합물에 직접 물을 넣는 방법과 둘째, 수화된 염(salt hydrates)를 첨가하여 간접적인 수분 공급원으로 이용하는 방법이 있다.



위에 표시한 평형식에서 보듯이 수화된 염은 물

의 활성도를 유지하기 위한 완충제로 작용하는데 온도와 염의 종류에 따라 차이를 보이지만 용매에 따라서는 전혀 영향이 없는 것으로 알려져 있다. (그림 4)

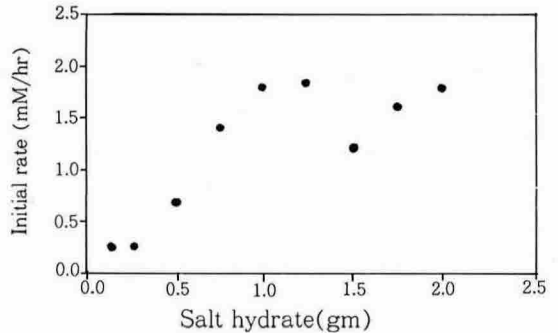


그림 4. 수화된 염이 초임계 fluoroform에서 subtilisin의 초기 반응속도에 대한 영향.

2.3 용 매⁴⁾

사용되는 초임계 용매의 종류에 따라라도 효소활성이 차이를 보인다. 즉, 효소 작용기의 구성요소인 비공유성 결합에 관여하여 효소와 용매와의 상호작용에 영향을 주며, 반응물 및 생성물의 분산 침투 정도가 친수 및 소수성 용매에 따라 차이를 보이기 때문이다. 초임계 이산화탄소의 경우 효소활성이 저해된다는 결과는 아직도 불분명하지만 이에 대한 가설의 하나로 이산화탄소가 효소에 필수적으로 존재하는 수분에 일부 녹아들어 부분적인 pH(microenvironmental pH)를 낮추게 되며 따라서 효소의 활성화에 매우 중요한 구성 아미노산의 결합자의 이온화가 변화하여 효소의 불활성화나 저해 작용을, 비록 가역적이지만, 나타내게 되는 것으로 알려졌다. 비록 부분적인 pH변화를 측정하는 것이 기술적으로 불가능하지만 hexane 등의 유기용매보다 효소활성이 낮은 이유는 국소적인 환경하에서 pH가 산성화되기 때문이다.(그림 5)

하지만 이산화탄소의 압력에 따른 pH변화는 아래 수식에 의해 비교적 큰 편이 아니다. 이산화탄소의 부분압이 100배 상승할 경우 pH는 오직 1만이 떨어진다. 실제로 완충액이 없는 조건에서 이산화탄소의 임계점 부근인 10.14MPa에서는 pH가 3.0이었고 이보다 10배 큰 압력 101.4MPa에서는 pH가 2.5이었다.

$$pH = 4.0 - (\log P_{CO_2}) / 2$$

한편, pH변화에 무관하면서 효소의 활성이 저해되는 기작으로 물에 용해된 이산화탄소가 효소의 아미노기와 반응하여 carbamate를 형성한다는 가설이 있는데, 이같은 carbamate형성은 온도가 높아짐에 따라 평형이 분해되는 방향으로 진행되어 효소의 안정성이 향상되는 경향이 있다. 그러나 이산화탄소에 의한 효소활성의 저해효과는 모든 효소 반응들에 일괄적으로 적용되지 않는데 Dumont et. al. (1992)⁷⁾는 오히려 hexane에서의 lipase반응보

다 초임계 이산화탄소에서 반응속도가 1.5배 증가했음을 보고한 바 있다.

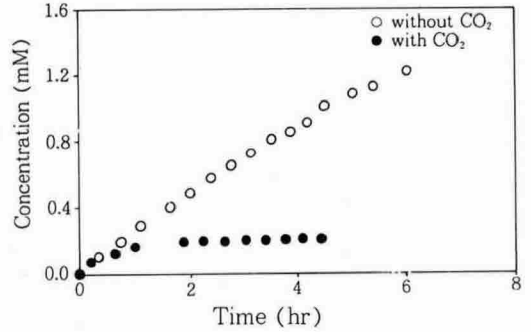


그림 5. 이산화탄소가 methylmethacrylate과 2-ethylhexanol간의 transesterification반응에서 lipase활성에 미치는 영향 : 유기용매 hexane에 이산화탄소를 계속 기포로 공급하였을 경우(●)와 hexane만을 반응조건으로 하였을 경우(○).

2.4 열안정성⁵⁾

대부분의 효소는 수분함량이 절제된 분말상태에서 매우 안정하며 효소의 열안정성은 수용액 상태에서보다 비수계 용매에서 크게 증가한다. 이 경우 수분이 열안정성에 매우 중요한 역할을 하는데 고온에서 물분자는 단백질 분자의 이동성을 증가시키고 이에따라 단백질의 변성속도가 증가하기 때문이다. 또한 수분은 disulfide bridge, glutamine과 asparagine의 탈아미노 반응, 그리고 peptide결합들의 가수분해 반응에서 기질(substrates)로 작용하기 때문이다. 실제로, 초임계 이산화탄소에서 사용되는 온도 범위는 35-60℃로 임계온도의 보통 1.2 내지 2배정도의 구간이다. 이 상태의 온도에서 수분함량이 증가할수록 효소의 활성은 크게 감소하는데 일반적으로 초임계 상태의 온도에서 효소들은 안정성을 보이며 현재까지 알려진 바로는 45℃ 부근에서 최대의 활성을 보인다.

2.5 물질이동^{6,7)}

비수계 상태에서의 효소반응을 수용액 상태와 비교해 보았을 때 뚜렷한 차이는 효소가 용매들과 불균일하게 분산된 상태로 존재한다는 점이다. 즉, 고형성분의 효소는 수용액 상태에서는 완전 용해되어 균일한 상태를 이루지만 초임계 유체 상태에서는 입자마다 각각 다른 확산 한정치(diffusional limitation)를 갖고 불균일한 상태(heterogeneous)를 이룬다. 효소반응을 위해서는 우선 기질이 효소의 표면에 까지 다다르는 외부적 물질이동(external mass transfer)과 기질이 효소분자 내의 활성 부위에 침투하는 내부적 물질이동(internal mass transfer)으로 구분된다. 외부적 물질이동의 속도는 연속 유속계(continuous flow system)의 경우는 유속과 교란상태(disturbance)에 지배되며 일괄처리계(batch system)의 경우는 교반속도가 중요한 인자가 된다. 한편, 내부적 물질이동의 속도는 이들과 관계 없고 다만 분말 효소의 형태에 관계하는데 초임계 유체 내에 효소가 분산되는 과정 중에 효소의 구조적 변화가 일어나며 이것은 효소, 용매, 그리고 반응기 내의 압력 및 온도에 영향을 받는다.

반면, 생성물은 모두 유사한 확산 한정치를 갖고 용매로 분산되므로 문제가 되지 않는다. 따라서 전체적인 물질이동은 용매의 물리적 성질, 분말 효소의 형태, 온도 그리고 교반정도와 유속을 포함하는 유체역학 등에 밀접한 관련을 갖는다. 한 예로, 유기용매의 경우보다 초임계 유체의 경우는 자체의 분산 능력 때문에 교반과정에서 100배 이상의 혼합효과를 나타낸다. 특히 관심을 갖는 것은 교반속도가 과연 lipase의 esterification 속도에 영향을 주는가 하는 점인데 교반 속도의 차이가 반응속도에 변화를 주지 않는다는 실험결과들이 보고되었고 외부적 물질 이동 속도를 지배하는 고정화 분말 효소의 지지체 크기도 반응속에 영향이 없었으며 hexane의 유기용매 보다 초임계 이산화탄소 조건에서 물질이동이 큰 것으로 보고하였다. 반응의 종

류에 따라서도 물질이동이 영향인자로 작용될 수 있는데 transesterification에서는 물질이동이 반응 속도에는 무관함을 보고한 바 있다.

3. 초임계 이산화탄소 조건에서의 lipase활성

3.1 Ester Synthesis

Hexane의 유기용매와 초임계 이산화탄소 조건에서의 효소반응을 비교 연구하였는데 두 경우 모두 ping-pong, bi-bi 효소 반응이었으며 ethanol에 의한 저해작용이 있었고 효소의 안정성도 두 조건에서 서로 비슷하였다고 보고하였다. 효소 활성의 비교는 Marty^{8,9)}, Dumont⁷⁾, Steytler⁵⁾ 등의 논문에서 상반되게 보고하였는데 유기 용매 조건과 초임계 이산화탄소의 조건간에 효소 반응의 비교는 반응 속도에서 뿐만 아니라 기질의 전이율(conversion rate) 측면에서도 관찰하였다.

3.2 Transesterification¹⁰⁾

초임계 유체 상태에서의 transesterification은 hexane의 유기용매 조건보다도 5내지 40배 정도의 낮은 효소반응을 보였다고 보고하였으나 수분에 의한 저해효과와 ping-pong, bi-bi mechanism은 상호 동일하였다.

4. 다른 초임계 유체에서의 효소활성

이산화탄소가 초임계 유체로 가장 널리 사용되는 분산제이지만 다른 종류의 매체를 이용한 초임계 상태에서의 lipase활성을 비교하는 연구가 최근 관심을 끌고 있다. 특히 lipase의 transesterification 반응속도를 각각의 다른 초임계 유체 조건에서 비교하였는데 이산화탄소에서 가장 낮은 반응을 보인 반면 sulfur hexafluoride의 경우 최대의 반응을 보였는데 이것은 sulfur hexafluoride가 밀도(0.75 g/ml)가 높고 소수성(hydrophobicity)이 강하

기 때문인 것으로 추정하고있다. (그림 6)

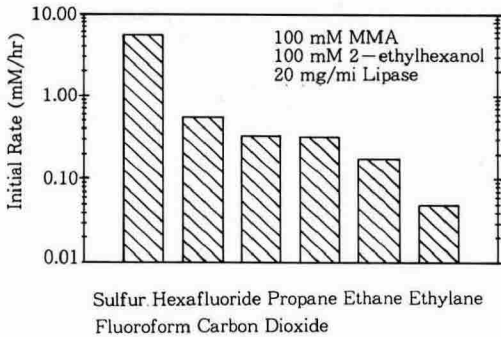


그림 6. 각각의 초임계 유체에서 lipase에 의한 methylmethacrylate과 2-ethylhexanol 간의 transesterification(50°C & 1, 600psi) 반응속도의 비교.

4.1 압력 조절에 의한 물리적 요인이 효소반응에 미치는 영향^{11, 12)}

초임계 유체는 온도와 압력의 조절로 물리적 성질을 이론적으로 예측 가능하게 변화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 실제로는 초임계 유체의 분산계수(partition coefficient)와 압력과의 상관관계가 완전히 이해되고 있지 않으며 압력의 증가에 따라 효소의 활성이 어떻게 변화할 것인가에 대한 연구 결과는 감소하였다는 보고와 변화가 없다는 보고들이 난립하고 있다. 그러나 초임계 유체 내에서 효소가 안정하다는 점과 효소반응이 물질이동에 제한을 받고 있지 않다는 사실은 효소 활성의 결정인자는 반응 자체가 갖고 있는 압력에 대한 영향보다는 초임계 유체의 물리적 성질이 보다 더 중요한 인자임을 증명한다. 따라서 초임계 유체의 압력 조절에 관한 공학측면의 연구(pressure-induced solvent engineering)가 효소 활성의 조절에 선결 연구분야임을 제안하였다. (그림 3)

4.2 초임계 유체에서 lipases와 proteases의 입체특이성¹³⁾

효소의 활성 뿐만 아니라 특이성도 단백질을 구조적으로 변화시키거나(protein engineering)초임계 유체의 물리적 성질을 변화시킴에 따라(solvent engineering)조절될 수 있는 것이 알려졌다. 이러한 연구는 그동안 몇몇의 문헌에서 효소와 기질의 결합 과정이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었는데, 초임계 유체의 극성(polarity)이 압력에 따라 변하면서 효소내의 기질 결합 부위에서 물분자가 외부로 방출되고 각각의 입체 이성질체의 특이적 결합이 결정되기 때문인 것으로 추정하고 있다.

5. 결 론

초임계 유체는 높은 확산력, 낮은 점성도, 그리고 높은 밀도의 특성이 있으므로 효소 촉매반응의 용매로서 최근 선호되고 있다. 또한, 압력에 따른 초임계 유체의 물리적 특성의 변화는 효소의 역가, 특이성, 그리고 안정성을 조절할 수 있으므로 그 전망이 밝다. 현재 초임계 이산화탄소에서 lipase에 관한 연구가 주종을 이루고 있지만 이산화탄소뿐만 아니라 다른 초임계 유체에서의 효소반응 연구도 이산화탄소에서보다 빠른 효소반응 속도로 인하여 관심을 끌고 있다. 그 중에서 fluoroform은 800에서 3,800psi 범위의 작은 압력 변화에 다른 유체의 dielectric constant의 변화가 1에서 8까지 크게 변화하는 특성을 갖고 있어 장치 효소반응의 역가와 특이성을 높이기 위해 유리한 용매로 예상된다.

그러나 초임계 유체에서의 효소반응에 관한 기초 연구는 지난 10년간의 연구에도 불구하고 거의 미진한 형편이다. 우선적으로 용매와 효소간의 상호공유 및 비공유 결합들에 의한 정량, 정성적인 이해가 필요하고 물과 압력에 의한 효소반응의 변화도 아직 예측하기 어려운 실정이다. 특히, 초임계 유체의 압력에 따른 물리적 성질의 변화를 완전히 이해

하게 될 때 효소반응의 주위환경이 효소의 구조와 작용기작에 미치는 영향을 파악할 수 있을 것이다.

6. 참고문헌

1. Zagrobelny J, and Bright FV (1993) In situ studies of protein conformation in SCF : trypsin in carbon dioxide. *Biotechnol. Prog.*, 8, 421
2. Kasche V, Schlothauer R, and Brunner G (1988) Enzyme denaturation in supercritical CO₂ : stabilizing effect of S-S bonds during the depressurization step. *Biotechnol. Lett.*, 10(8), 569
3. Taniguchi M, Kamihira M, and Kobayashi T (1987) Effect of treatment with supercritical CO₂ on enzymatic activity. *Agric. Biol. Chem.*, 51(2), 593
4. Kamat S, Barrera J, Beckman EJ, and Russell AJ (1992) Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 158.
5. Steytler DC, Moulson PS, and Reynolds J (1991) Biotransformation in near-critical carbon dioxide. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 221.
6. Chulalaksananukul W, Condoret JS, and Combes D (1993) Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 691.
7. Dumont T, Barth D, Corbier C, Branlant G, and Perrut M (1992) Enzymatic reaction kinetics : comparison in an organic solvent and in supercritical carbon dioxide. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 329.
8. Marty A, Chulalaksananukul W, Wilemot RM, and Condoret JS(1992) Kinetics of lipasecatalyzed esterification in supercritical CO₂. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 273.
9. Marty A, Chulalaksananukul W, Wilemot RM, Condoret JS, and Durand G (1990) Comparison of lipase catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane. *Biotechnol. Lett.* 12(1), 11.
10. Vermue MH and Tramper J (1992) Enzymatic transesterification in near-critical carbon dioxide : effect of pressure, Hildebrand solubility parameter and water content. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 649.
11. Kamat SV, Iwaskewyz B, beckman EJ, and Russell AJ (1993) Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids : tuning enzyme activity by changing pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2940.
12. Erickson JC, schyns P, and Cooney CL (1990) Effect of pressure on an enzymatic reaction in a supercritical fluid. *AIChE*, 36(2), 299.
13. Ikushima Y, Saito N, Ykoyama T, Hatakeda K, Ito S, Arai M, and Blanch HW (1993) Solvent effects on an enzymatic ester synthesis in supercritical carbon dioxide. *Chem. Lett.* 109.