한국생물공학회지 제 13권 제 6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 13, No. 6, 687-692(1998)

초임계 이산화탄소 유체에서 섬유소의 효소 가수분해

[1]박 창 열 · 김 철 · †유 연 우
[1]서울대학교 농업생물신소재 연구센터, 아주대학교 공과대학 화학·생물공학부
(접수 : 1998. 9. 18., 게재승인 : 1998. 11. 16.)

The Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Supercritical Carbon Dioxide Fluid

Chang Yeol Park[1], Chul Kim, and Yeon Woo Ryu†
[1]Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744
Division of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 442-749, Korea
(Received : 1998. 9. 18., Accepted : 1998. 11. 16.)

Experimental studies were carried out on the use of supercritical fluid in enzymatic hydrolysis of cellulose. In order to effectively perform the hydrolysis the enzyme has to maintain stability and activity in the supercritical carbon dioxide solvent. In the experiment it was found that the stability of cellulase was maintained up to 160 atm for 90 min at 50℃. In the enzymatic hydrolysis of cellulose at supercritical conditions using carbon dioxide at 80 atm and 50℃ for 90 min, the results showed that glucose yield was 100%, which was 1.5 times as compared to that in atmospheric condition when the substrate (Avicel) concentration was 20 g/L. For the substrate concentration of 60 g/L, the glucose yield was increased by 1.2 times as compared to that in atmospheric condition.

Key Words : Cellulase, Supercritical Carbon Dioxide, Enzyme Stability, Cellulose

서 론

19세기말 화학공업은 많은 원료가 biomass에서 생산되었지만 석유화학공업의 발달로 biomass에 의한 생산은 극히 제한되어 왔다. 그러나 유한자원인 석유, 석탄 등을 원료로 하는 화학산업은 언젠가는 다른 원료를 발굴해야만 하는 상황에 처해있기 때문에 미래에는 biomass에 의한 화학원료 생산이 중요한 분야로 등장할 것이 분명하다. 섬유성 biomass는 매년 약 10^{11} tons 가량이 광합성에 의하여 생산되며, 구성은 cellulose, hemicellulose, lignin의 세가지 주요 성분으로 되어 있다(1,2). 이러한 섬유성 물질의 경제적인 이용을 위해서는 세 가지 물질을 모두 이용하는 것이 바람직하다. 섬유성 물질 중에 섬유소는 효소 또는 산 가수분해에 의하여 주성분인 D-glucose 및 cellobiose가 생성된다. 산 가수분해에 의해서도 cellulose로부터 glucose는 55~60%의 수율로 얻을 수 있지만 당을 회수하는 데에는 많은 경비가 요구되며(3), 또한 산 처리에 의한 2차 적인 환경오염 문제를 야기 시키는 문제점 등을 가지고 있어, 공정상의 개선이 요구되어지고 있는 실정이다.

초임계 유체는 기체상과 같은 낮은 점성과 높은 확산성으로 기질에서 효소로의 물질전달 속도를 높여 주고, 액체상과 같은 밀도로 기체 상에서 관찰된 것보다 더 높은 용해도를 가진다. 기체, 액체와는 달리 초임계 유체의 물리적 성질은 압력이나 온도의 적은 변화만으로도 광범위하게 조절할 수 있는 특징을 가지고 있어 최근에는 biocatalysis와 bioseparation 분야에서 새롭게 적용되고 있는 분야이다

초임계 유체에서의 효소반응에 대한 연구는 Randolph 등(4)과 Hammond 등(5)에 의하여 처음 발표한 것을 시작으로 본격적인 연구가 시작되었으나 초임계 유체에서 효소 촉매 반응을 수행하는 효소의 특성 변화 및 작용 기작 등에 대한 기본적인 현상들이 아직까지도 확실하게 규명된 사실은 없다. 단지 90년대에 들어와서야 Randolph 등(6), Aaltonen 등(7), Kamat 등(8)에 의하여 약간의 현상 규명이 이루어지고 있는 실정이다. 최근에는 초임계 유체를 효소반응에 적용한 연구가 활발히 이루어짐에 따라 많은 새로운 사실들이 밝혀지고 있다(9-12). 즉 Nakamura(10)는 초임계 유체에서 효소반응의 가능성을 제시하였으며, Taniguchi 등(13)은 여러 가지 효소들이 대해 초임계 조건에서도 90% 이상 활성이 유지된다고 보고하였다. 또한 Zheng 등(14)은 복잡한 구조를 가지고 있는 물질에 초임계 유체를 처리하는 경우 물질의 구조적 변화가 발생한다고 보고하였다. 이러한 초임계 유체의 특성을 이용하여 Lee 등(15,16)은 초임계 이산화탄소를 이용한 전분의 효소 가수분해에 대한 연구를 수행한 결과 상압에 비하여 더 짧은 반응시간에 97%의 전분을 가수분해시킬 수 있다는 결과를 보고하였다.

따라서 본 연구는 농산물 및 임산자원의 biomass인 섬유소를

† Corresponding Author : Division of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, 442-749, Korea
Tel : 0331-219-2449, Fax : 0331-216-8777
e-mail : ywryu@madang.ajou.ac.kr

효율적으로 가수분해시키기 위하여 초임계 이산화탄소 매질에서 효소의 안정성 및 반응조건들의 확립에 대한 연구를 수행하였다

재료 및 방법

실험재료

Cellulose는 Fluka Co에서 구입한 Avicel과 cellulose fiber는 medum size의 Sigma사 제품을 이용하였는데, Avicel은 비교적 높은 결정구조를 지닌 50㎛ 이내의 microcrystalline cellulosic aggregate로서 non-fibrous powder 이다 Cellulase는 태평양 화학에서 구입한 Bio-blue를 사용하였으며, 이는 곰팡이인 *Trichoderma* sp.로부터 생산한 분말형태로서 endo-1,4-β-D-glucanase(E.C. 3.2.1.4), cellobiohydrolase(E.C. 3.2.91) 및 exo-1,4-β-D-glucosidase(E.C.3.2.1.74)로 이루어져 있으며, enzyme activity는 50℃, pH 4.8에서 80 unit/mg 이었다. 기타 시약은 특급 및 1급 시약을 이용하였다. 사용한 실험장치는 전보(17)의 내용과 동일하다.

초임계 이산화탄소에서 cellulase의 안정성

초임계 반응기내에 일정량의 cellulase를 넣고 각각의 주어진 온도, 압력, 시간에서 방치한 후 vent valve를 통해 이산화탄소를 천천히 빼낸다. 처리된 cellulase를 0.1 M sodium acetate buffer 30 mL에 녹인 후 Avicel 0.6 g을 넣어 상압에서 항온교반 수조를 이용하여 50℃, pH 4.8에서 4시간동안 효소반응을 수행하였다. 효소의 안정성은 상압의 효소반응 최적조건에서 기질과 반응시켰을 때의 효소의 역가를 기준치로 정한 후, 초임계 조건하에서 처리한 효소용액을 상압에서 기질과 반응시킨 후에 효소의 역가를 기준치와 비교하여 *relative activity* (%)로 나타내었다.

초임계 유체에서 Avicel의 효소 가수분해

상압에서의 효소반응은 20 g/L의 Avicel를 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.8)에 넣고 효소용액을 첨가한 다음 50℃의 교반 항온수조에서 초임계 유체에서와 동일한 시간동안 가수분해 반응을 수행하였다. 생성된 glucose의 농도는 Glucose Analyzer (YSI Co., YSI1500, USA)를 이용하여 측정하였다

초임계 유체에서 cellulose의 효소 가수분해 실험은 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.8)에 Avicel을 20 g/L가 되도록 넣고 효소용액을 첨가하여 250 mL의 반응기에 30 mL의 반응용액을 넣은 다음 주어진 반응조건에서 실험을 수행한 후에 이산화탄소를 천천히 제거하고 시료를 채취하여 glucose 농도를 측정하였다.

결과 및 토의

초임계 이산화탄소에서 cellulase의 안정성

초임계 이산화탄소에서는 cellulase의 작용에 영향을 미치는 물리·화학적인 조건들이 상압에서와 매우 다르기 때문에 먼저 본 연구에 사용한 cellulase (Bio-blue)의 안정성에 대한 실험을 수행하였다.

초임계 유체에서 cellulase의 안정성에 미치는 압력의 영향을 검토하기 위하여 초임계 반응기내에 cellulase를 넣고 50℃에서 1시간동안 각각의 주어진 압력에 방치한 후 효소를 꺼내어 상압에서 효소반응을 수행한 결과를 Figure 1에 나타내었다. 실험결과에서 160 atm 까지는 상압에서의 효소활성과 거의 유사하였으나 200 atm 에서는 약간의 효소가 변성되어 효소활성이 약간 감소하였다 이는 높은 압력에 의한 효소구조의 변형에 의한 효소의 변성이나 또는 높은 압력을 유지하기 위하여 주입된 많은 양의 이산화탄소에 의한 반응용액의 pH 감소에 의한 효소의 변성에 의한 것으로 추정된다. 이러한 결과는 Taniguchi 등(13)이 여러 가지 효소들에 대해 초임계 조건하에서 90% 이상의 효소활성이 유지된다는 보고와 거의 일치한 반면, Marty 등(18)의 보고에서는 압력이 증가함에 따라 효소의 표면에 초임계 유체가 직접적인 영향을 주어 효소의 변형을 초래한다는 것과는 다르게 나타났다.

초임계 이산화탄소에서 cellulase의 안정성에 대한 처리시간의 영향을 검토하기 위하여 120 atm과 50℃에서 실험을 수행하여 Figure 2에 나타내었다. 실험결과에서 150분까지는 cellulase의

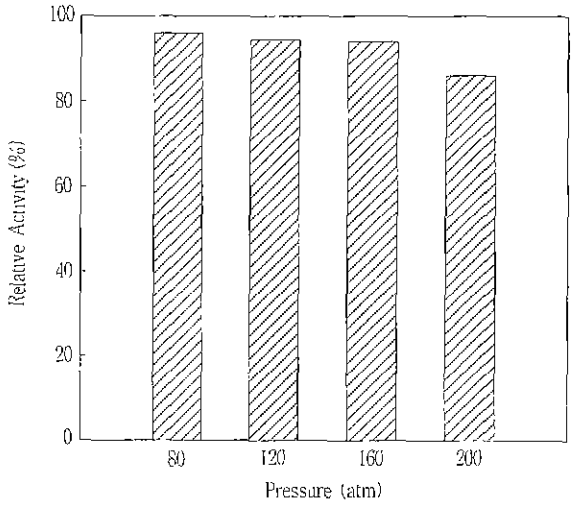

Figure 1. Effect of pressure on cellulase stability under supercritical carbon dioxide at 50℃ for 60 min.

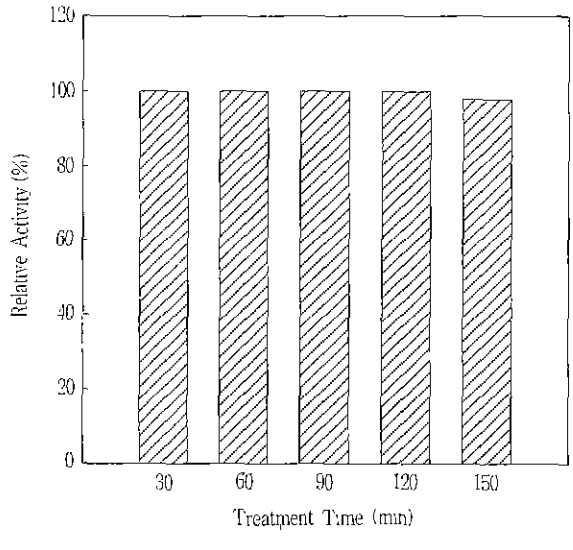

Figure 2. Effect of treatment time on cellulase stability under supercritical carbon dioxide at 80 atm and 50℃.

활성이 거의 그대로 유지되었다. 따라서 cellulase 안정성에 대한 압력의 영향에서 효소의 활성이 200 atm 이상에서 감소하는 것은 이산화탄소에 의한 pH의 감소가 아니라 압력에 의한 효소 구조의 변형에 의하여 효소의 활성이 감소한 것으로 사료된다.

초임계 이산화탄소에서 효소의 안정성에 대한 온도의 영향에 대한 실험결과, Figure 3에서와 같이 상압에서 최적 반응온도인 50℃까지는 효소활성이 그대로 유지되나, 그 이상의 온도에서는 효소의 활성이 급격히 감소하여 70℃의 경우에는 효소활성이 50% 미만에 불과하였다. 이는 Chulalaksananukul 등(19)이 lipase의 열에 대한 안정성을 40℃~100℃에서 검토한 결과 모든 온도에서 효소의 변성에 의하여 효소의 활성이 감소한다는 결과와 상반되는 것이다. 결과적으로 초임계 이산화탄소에서 cellulase는 온도의 경우 50℃까지, 처리 시간은 150분, 그리고 반응압력은 160 atm 까지는 효소의 활성이 거의 그대로 유지됨을 알 수 있었다. 따라서 상기의 조건에서는 초임계 이산화탄소에서 직접 효소반응이 가능함을 알 수 있었다

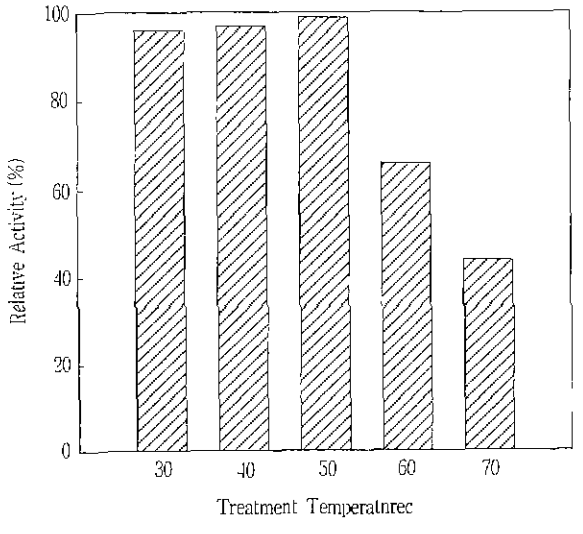

Figure 3. Effect of treatment temperature on cellulase stability under supercritical carbon dioxide at 120 atm for 90 mn.

초임계 이산화탄소에서 cellulose의 효소 가수분해

초임계 이산화탄소의 주어진 조건에서 cellulase가 활성을 유지하고 있는 것으로 확인되었으므로 초임계 이산화탄소에서 cellulose (Avicell)의 효소 가수분해를 위한 반응조건에 대한 연구를 수행하였다.

일정한 조건의 초임계 이산화탄소에서 Avicel의 효소 가수분해 반응에 대한 온도의 영향을 검토한 실험결과를 Figure 4에 나타내었다. 실험결과에서 상압에서와 마찬가지로 온도가 증가할 수록 glucose 수율이 증가하다가 최적 반응온도인 50℃에서 최대치를 나타내었으며 그 이상의 온도에서는 glucose 수율이 감소하였다. 이는 초임계 이산화탄소에서 효소의 안정성에 대한 온도의 영향에서 나타난 바와 같이 (Figure 3) cellulase의 활성이 50℃까지는 그대로 유지되었으나 50℃ 이상에서는 온도상승에 의한 cellulase의 변성에 의하여 glucose 수율이 감소한 것으로 사료된다. 반면 50℃ 보다 낮은 온도에서는 cellulase의 변성에 의한 활성의 감소는 없었지만 반응속도가 낮아 최적 온도인 50℃에서 보다 glucose 수율이 감소하였다 이러한 결과는 초임계 유체에서 효소는 45℃ 부근에서 최적의 활성을 갖는다는 Kamat 등(8)의 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

상압과 초임계 유체에서 가장 큰 차이점은 압력이므로 효소반응에 대한 압력의 영향에 대한 실험을 수행하였다. Figure 5에서와 같이 초임계 최적 반응온도인 50℃에서 90분간 각각 주어진 압력에서 Avicel의 효소 가수분해 반응을 수행한 결과 20 g/L의 Avicel이 160 atm 까지는 완전 가수분해되어 100%의 glucose 수율을 얻을 수 있었다. 그러나 200 atm의 경우는 초임계 이산화탄소에서 효소의 안정성이 어느 정도 유지되었음에도 불구하고 (Figure 1) glucose 수율이 65%로 감소하였는데, 이러한 현상을 분석하기 위해서는 초임계 이산화탄소에서 물질의 성질과 효소의 활성도 사이의 상호작용에 대한 기본적인 이해가 필요하다

즉 초임계 유체에서 효소의 활성에 영향을 미치는 인자는 압력, 초임계 유체내의 물의 농도, 사용된 용매, 효소의 안정성 및

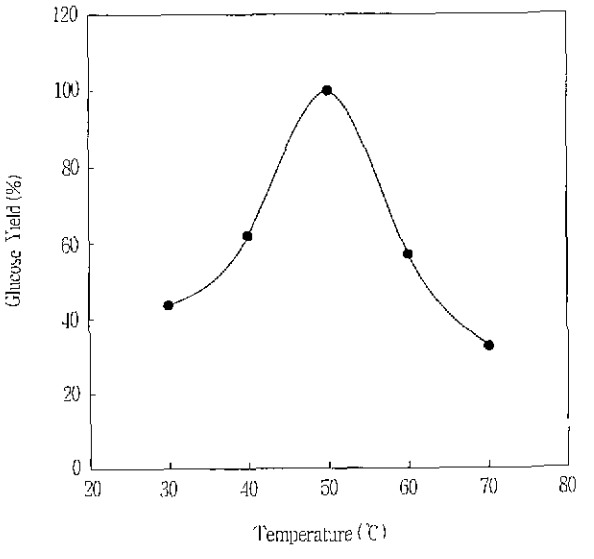

Figure 4. Effect of temperature on Avicel hydrolysis under supercritical carbon dioxide at 120 atm for 90 min.

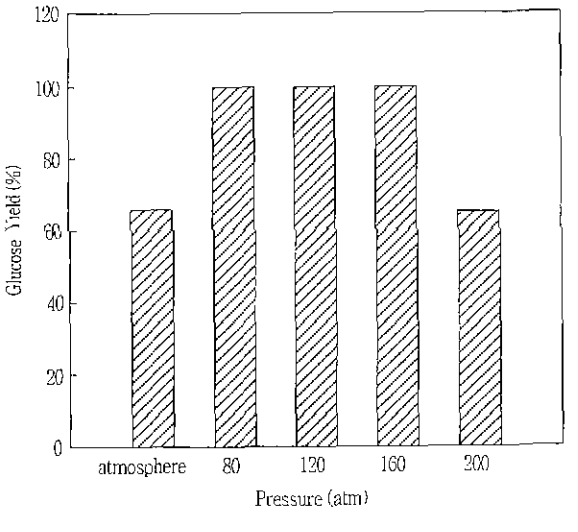

Figure 5 Effect of pressure on Avicel hydrolysis under supercritical carbon dioxide at 50℃ for 90 min.

초임계 유체에서의 물질전달 등으로 크게 나눌 수 있다 초임계 유체에서 효소의 변성에 의한 활성도 저하의 원인은 Lee 등(16)이 보고한 바에 의하면 이산화탄소를 초임계 유체로 이용하여 압력을 높인 경우에는 공기나 질소를 이용하는 경우보다 효소의 활성도가 30% 이상 더 감소하는데, 이러한 결과는 초임계 이산화탄소의 조건하에서 효소의 활성억제 또는 효소의 변성은 압력에 의한 것보다는 낮은 pH에 의해 변하는 요인이 더 크게 작용한다는 것을 알 수 있었다. 위와 같은 결과들은 Dordick 등(20)의 연구에서도 효소의 활성은 pH에 민감하게 작용하여 적정한 pH를 벗어나는 경우에는 효소의 활성과 안정성 모두 급격하게 감소하는 것으로 보고한 바와 일치한다 또한 Marty 등(18)에 의하면 기질, 생성물 및 물은 효소의 활성에 영향을 주고 효소와 기질간에도 직접적인 유체와 효소간의 작용이 있어 효소의 작용에 억제하는 요인으로 작용한다는 보고와 같이 압력이 증가함에 따라 효소의 표면에 직접적인 영향을 주어 효소의 변형을 초래하는 것으로 사료된다. 실제로 Taniguchi 등(13)이 9개의 상업용 효소에 대한 이산화탄소의 영향을 30℃, 20.3 MPa, 0.1% 물 + 3% 에탄올 조건하에서 1시간 동안 실험한 결과 효소의 활성에는 별 영향을 미치지 않았으나 lipase의 경우 물의 함량이 50%까지 증가하면 효소의 활성은 초기 효소의 활성에 비하여 67%까지 감소한다고 보고한 결과와 같이 물의 농도와 효소와의 관계에서 물의 농도가 효소의 활성에 영향을 미치는 것으로 해석된다. Kasche 등(21)은 초임계 이산화탄소를 이용한 monomer와 oligomer 효소의 안정성에 관한 연구에서 monomer 효소는 안정성이 유지되는 반면에 oligomer 효소는 상대적으로 효소의 안정성이 떨어지는 결과를 나타낸다고 보고한 바 있다. 반면 Blanch등(22)은 cholesterol oxidase를 초임계 이산화탄소에서 35℃인 경우 0.1~11.3 MPa 범위에서 효소의 활성 및 안정성이 변하지 않는다고 보고한 바 있다. 그러나 대개 초임계 유체에서의 효소 활성에 관한 연구는 아직까지도 명확하게 규명되어 있지 않고 있으며 예측하기가 어려울 것으로 보고되고 있는 실정이다 이는 초임계 유체에서 효소의 활성에 미치는 압력의 영향은 효소 분자구조에 작용하는 직접적인 영향 (안정성), 본래의 효소 활성도 (intrinsic enzyme activity) 및 초임계 유체에서의 물리적 성질변화에 미치는 압력의 영향 등으로 크게 나누고 있으며, 이러한 성질들이 복합적으로 직접 및 간접적인 영향을 주어 효소의 활성 및 안정성과 특이성에 영향을 주는 것으로 추정하고 있는 실정이다.

Figure 6은 80 atm과 50℃의 초임계 이산화탄소에서 Avicel의 효소 가수분해를 위한 반응시간의 영향에 대한 실험결과이다. 실험결과에서 반응시간이 길어질 수록 glucose 수율이 증가하여 90분 반응에서 100%의 glucose 수율을 얻을 수 있었다 이러한 결과는 초임계 유체에서 효소의 안정성에 대한 처리시간의 영향에서 나타난 결과에서 알 수 있듯이 초임계 유체에서 효소의 안정성이 유지되면서 동시에 효소의 반응속도가 증가되었기 때문으로 사료된다. 이러한 결과는 상압에서 90분 반응시 보다 Avicel의 경우는 glucose 수율이 1.5배 증가하였으며, cellulose의 경우는 1.9배 증가하였다 (Figure 7). 초임계 유체에서 효소의 반응속도 증가는 초임계 유체의 특성에 의한 것으로 생각 할 수 있다. 즉 초임계 유체는 기체상과 같은 낮은 점성과 높은 확산성으로 기질에서 효소로의 물질전달 속도를 높이주고, 액체상과 같은 밀도로 기체 상에서 관찰된 것 보다 더 높

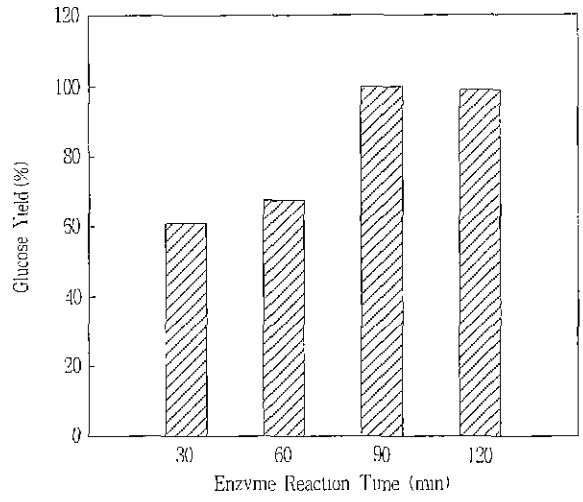

Figure 6. Effect of reaction time on Avicel hydrolysis under supercritical carbon dioxide at 80 atm and 50℃.

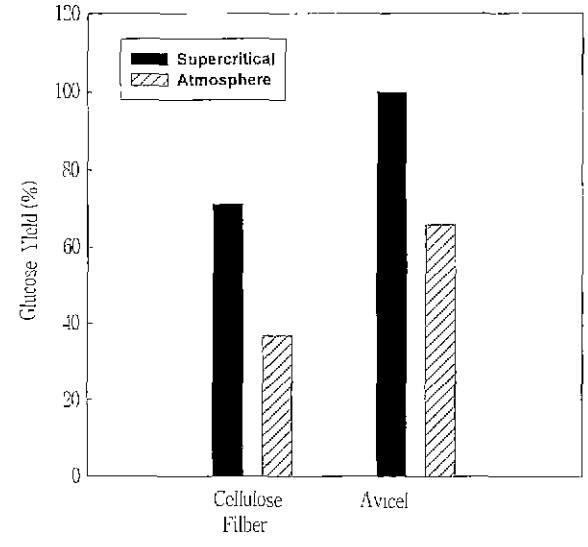

Figure 7. Enzymatic hydrolysis of Avicel and cellulose fiber in supercritical carbon dioxide at 120 atm and 50℃ for 90 min

은 용해도를 가지는데(8), 초임계 유체에 의한 물질전달 속도의 증가에 의해 효소 반응이 증가되었다고 사료된다. 즉 생성물인 glucose에 의한 효소의 억제작용이 감소하여 초임계 유체에서의 효소 가수분해 반응이 더 증가된 것으로 사료되기 때문에 앞으로 enzyme kinetics에 대한 연구를 통하여 이를 확인하리고 한다.

반응 기질인 Avicel의 농도가 20 g/L인 경우 초임계 이산화탄소에서 90분 동안에 100%의 glucose 수율을 얻을 수 있었기 때문에 기질농도를 60 g/L로 높여 실험을 수행하였다. 실험결과 Figure 8에서 보듯이 20 g/L의 Avicel의 경우와 마찬가지로 상압에 비해 glucose 수율은 1.2배 증가하였으나 4시간동안 반응에서 glucose 수율은 55%에 불과하였다. 이러한 현상은 초기 기질농도가 높아서 기질에 의해 효소 반응이 저해되었거나, 또는 생성물인 glucose에 의해 반응이 저해되었기 때문으로 사료된다. 그럼에도 불구하고 초임계 이산화탄소에서 효소 가수분해 반응이 상압에서 보다 향상된 이유는 초임계 유체인 이산화

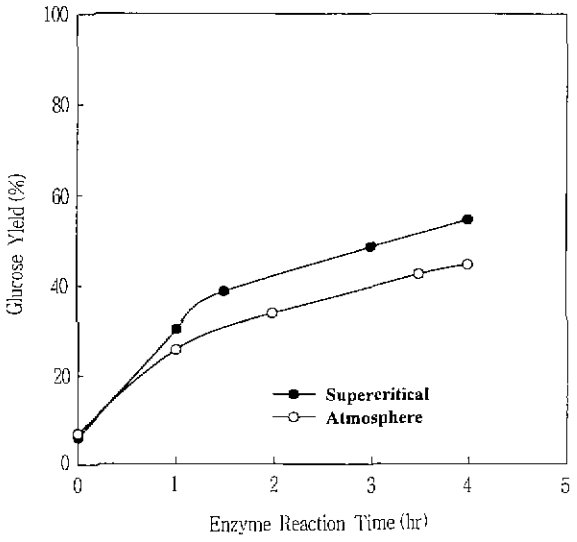

Figure 8. Profiles of glucose yield during the enzymatic hydrolysis of 60 g/L Avicel in supercritical carbon dioxide and atmospheric condition.

탄소에 의해 기질인 cellulose의 표면구조가 변하였거나 enzyme kinetic parameters가 상압의 경우와 다른 경우로 생각되어질 수 있다.

요 약

본 연구는 초임계 이산화탄소를 이용한 섬유소의 효소 가수분해에서 효소의 안정성 및 반응조건에 관한 연구를 수행하였다. 초임계 이산화탄소에서 cellulase의 안정성에 대한 실험결과 압력에 대한 영향에서는 80 atm에서 160 atm까지 효소의 안정성이 유지되었으며 200 atm 에서는 약간 감소하였다. 반응시간의 경우에는 150분까지 효소의 활성이 그대로 유지되었으며, 온도는 상압에서의 최적온도인 50℃까지는 효소의 활성이 유지되었으나 그 이상의 온도에서는 효소의 변성에 의하여 활성이 감소하였다. 초임계 이산화탄소에서 cellulose를 120 atm과 50℃에서 90분간 cellulase로 가수분해 반응을 수행한 결과 20 g/L의 Avicel이 완전히 가수분해되어 100% 수율의 glucose를 얻을 수 있었으며, 이는 상압에서 보다 glucose 수율이 1.5배 증가한 결과이다 반면에 cellulose fiber인 경우는 상압에서 보다 1.9배 증가하였다. 동일 조건에서 Avicel의 농도를 60 g/L로 한 경우에는 glucose 수율이 상압에서 보다 1.2배 증가하였다.

감 사

본 연구는 1996년 교육부 학술연구조성비(생물화학공학)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1 Magaritis, A. (1980), Biomass : A renewable energy resource APEO dimensions, 1, 21-23.

2. Enari, T. M. and M. L Suihko (1984), Ethanol production of pentoses and hexoses from cellulosic materials, *CRC. Crit. Rev Biotechnol.*, 1(3), 229-240.
3. Harris, J. F., H. E. Scott, E. L. Springer, and T. H. Wenger (1983), Progress in Biomass Conversion, Vol 4, pp. 127-131, Academic press, New York.
4. Randolph, T. W., H. W. Blanch, J. M. Prausnitz, and C. R. Wilke (1985), Enzymatic catalysis in a supercritical fluid, *Biotechnol. Lett.*, 7(5), 325-328.
5. Hammond, D. A., M. Karel, and A. M. Klibanov (1985), Enzymatic reactions in supercritical gases, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11, 393-400.
6. Randolph, T. W., H W. Blanch, and D. S. Clark (1991), Biocatalysis in supercritical fluids, In *Biocatalysis for Industry*, pp 219-232, Plenum Press, New York.
7. Aaltonen, O and M. Rantakyla (1991), Biocatalysis in supercritical CO_2, *Chemtech.*, 21(4), 240-248.
8. Kamat, S. V., E. J. Beckman, and A. J. Russell (1995), Enzyme activity in supercritical fluids, *Biotechnology*. 15(1), 41-71.
9. Bernard, P., D. Barth, and R. M. Nicoud (1994), Enzymatic synthesis of glycerides, A comparison between supercritical and liquid operations, *Proc. 3rd international symposium of supercritical fluids*, 3, 137-142.
10. Nakamura, K. (1994), Biological application of supercritical fluids, A comparison between supercritical and liquid operations, *Proc. 3rd international symposium of supercritical fluids*, 3, 121-130.
11 Dumont, T., D. Barth, C. Corbier, G. Branlant, and M. Perrut (1992), Enzymatic reaction kinetics: comparison in an organic solvent and in supercritical carbon dioxide, *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 329-338
12. Nakamura, K., Y. M. Chi, Y. Yamada, and T. Yano (1986), Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide, *Chem. Eng. Commun.*, 45, 207-210.
13. Taniguchi, K., M. Kamihira, and T. Kobayashi (1987), Effect of treatment with supercritical carbon dioxide on enzymatic activity, *Agric. Biol. Chem.*, 51(2), 593-594.
14. Zheng, Y., H M. Lin, J. Wen, N. Cao, N. Yu, and G T. Tsao (1995), Supercritical carbon dioxide explosion as a pretreatment for cellulose hydrolysis, *Biotechnol Lett.*, 17(8), 845-850.
15. Lee, H and H. N. Chang (1993), Starch hydrolysis using enzyme in supercritical carbon dioxide. *Biotechnol. Tech.*, 7(4), 267-270.
16. Lee, H. S., Y W. Ryu, and C. Kim (1994), Hydrolysis of starch by α-amylase and glucoamylase in supercritical carbon dioxide, *J. Microbiol. Biotechnol*, 4(3), 230-232.
17. Park, C. Y., H. S. Lee, C. Kim, and Y. W. Ryu (1997), Effect of explosion pretreatment by supercritical carbon dioxide in the acid hydrolysis of hemicellulose, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 12(4), 371-376.

18. Marty, A., W. Chulalaksanukul, R. M. Wilemot, J. S. Condoret, and G. Durand (1990) Comparison of lipase catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane, *Biotechnol Lett.* 12(1), 11-15.
19. Chulalaksananukul, W., J. S. Condoret, and D. Combes (1993) Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. *Enzyme Microb. Technol*, 15, 691-694
20. Dordick, J. S. (1989), Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 194-198.
21. Kasche, V., R. Schlothauer, and G. Brunner (1988), Enzyme denaturation in supercritical CO_2: stabilizing effect of S-S bonds during the depressurization step, *Biotechnol. Lett.*, 10(8), 569-573.
22. Blanch, H. W., T. W. Randolph, D S Chark, and J. M Prausnitz (1988), Enzymatic oxidation of cholesterol aggregates in supercritical carbon dioxide, *Science*, 238, 387-390