

역미셀에서 생촉매제

이 강 민

전북대학교, 자연과학대학

Biocatalysts in Reverse Micelles

Lee Kang min

Department of Molecular Biology

College of Natural Science

Chonbuk National University

Chonju, 560-756

ABSTRACT

The use of watersoluble enzymes for chemical synthesis suffers from several limitations. The solubilization of biocatalyst (Enzymes and Cells) with reverse micelles or microemulsion could be a method for bioconversion of low water soluble substrates. In this review, We will discuss the properties and the potentials of reverse micelle for catalytic bioconversion and biotechnology.

서 론

효소와 세포같은 생촉매제는 유기합성에 이용될 수 있는 매력적인 여러 가지 특이성(입체특이성, 자리특이성, 기질특이성)을 갖고 있다. 최근 의약품 합성에 이와같은 특이성반응을 이용하여 원하는 생체 활성분자를 합성하고 있다(1,2,3). 그러나 생촉매제를 유기합성에 직접 이용하는데에는 극복해야 할 얼마의 문제가 있다. 문제중 하나는 대부분의 기질 물질을 녹일 수 있는 유기용매에서 생촉매제의 비활성화이다. 스테로이드, 지방과 같은 대부분 효소의 기질은 소수성이므로 친수성인 효소가 안정한 수용액에서는 거의 녹지 않고 반대로 효소는 기질을 녹일 수 있는 유기용매에서는 그의 3차 구조가 변하여 촉매 작용을 하지 못한다. 또한 수용액에서 펩타이드 합성과 탄수화물합성같은 물을 만드는 반응은 열역학적으로 가역적이므로 이러한 반응을 위하여 효소를 수용액에서 사용하는데에는 얼마의 문제가 있다. 그러므로 유기합성에 효소를 이용하기 위하여는 유기용매에서 효소와 같은 생촉매제를 안정화시킬 필요가 있다.

유기용매에서 생촉매제를 안정화하기 위하여 고정화(4,5), 이상용매제(6,7) 역미셀, microemulsion

(8,9,10,11,12) 등이 연구되었다. 특히 지난 10여년 동안 유기용매에서 계면활성제를 이용하여 생촉매제를 용해시킨 후 이것을 이용하여 의약품합성, 물질 분석을 위한 연구가 크게 진전되었다(그림 1). 세가

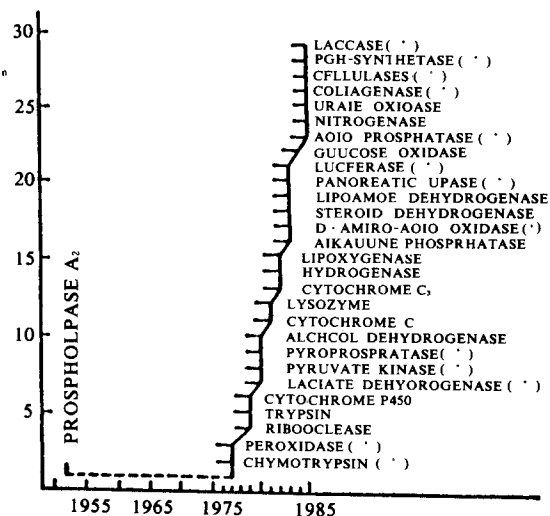


그림 1. 역미셀에서 연구된 효소의 종류. 미셀효소화는 1977년 K. Martinek에 의하여 소개된 이래 계속 연구가 진행되고 있음(12).

지 성분(유기용매, 물, 계면활성제)으로 이루어진 역미셀에서의 효소연구는 순수 수용액에서의 연구와는 크게 달리 얼마의 새로운 문제들, 즉 효소의 용해도 및 안정도 문제가 제기된다.

이 총론에서는 역미셀 또는 microemulsion 에서 효소의 활성도와 물의 관계, 효소의 안정도, 효소반응의 반응속도론, 효소적 합성 등 미셀효소학에 관련된 여러가지 문제와 생명공학에 연관된 여러가지 가능성을 논할 예정이다.

역미셀의 구조와 안정도

역미셀의 구조

유기용매·물·계면활성제의 혼합액은 여러가지 구조를 이룬다. 이것들이 갖을 수 있는 구조는 그림 2에서 볼 수 있는 바와 같이 정상미셀, 역미셀, la-

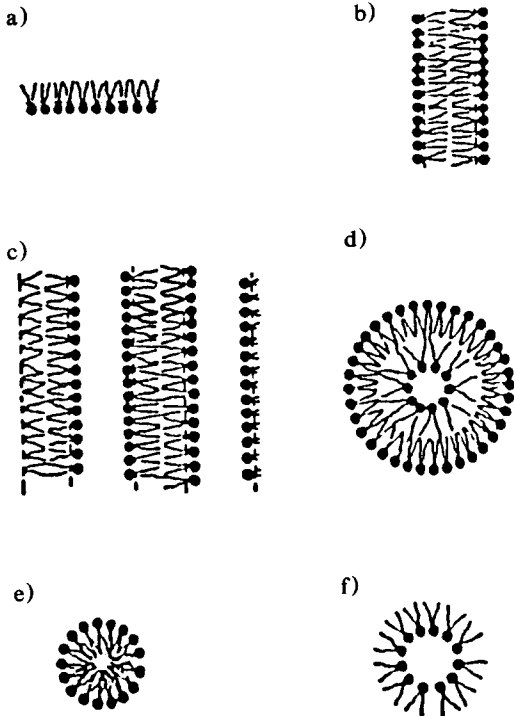


그림 2. 용액에서 계면활성제의 가능한 구조. (a) Monolayer (b) Bilayer (c) Liquid crystalline phase, (d) Vesicle(Liposome) (e) 정상미셀 (f) 역미셀.

•• 계면활성제, • 친수성머리, ~ 소수성꼬리.

mellar, 액정 등의 구조를 갖는다. 계면활성제는 양친성이므로 소수성 부분은 유기용매와 친수성인 극성부분은 수용액과 서로 상호작용을 한다. 역미셀에서 유기용매에 녹아 있는 물은 계면활성제가 만드는 막으로 둘러싸여 미세한 물방울 상태로 존재하게 된다. 막으로 둘러싸인 수용액상에 있는 효소는 계면활성제의 도움으로 유기용매에 의한 비활성화로 부터 보호받을 수 있다.

보통 계면활성제로써는 이온 계면활성제 (SDS : Sodium dodecyl sulfate, CTAB : Cetyl triammonium bromide, AOT : Sodium bis(2-ethyl hexyl sulfosuccinate)와 비이온 계면활성제 (Tween, Triton, Brij계열)로 구별할 수 있다. AOT와 SDS같은 음이온 계면활성제는 단백질과의 강한 상호작용으로 대부분의 단백질을 비활성화시킨다. 반면 양이온 계면활성제인 CTAB는 단백질과 적당히 상호작용하므로 유기용매에 의해서 비활성화 되는 것으로부터 효소를 안정화 시킬 수 있다. 반면 Tween, Triton, Brij계통의 "soft 계면활성제"인 비이온 계면활성제는 효소를 안정화 시키고 더욱 활성화 시킬 수 있다. (17,18,26,39,40). 유기합성에 많이 쓰이는 계면활성제는 양이온 계면활성제이다. 비이온 역미셀에서 효소는 어느정도 안정하나 반응후 미셀로부터 생성물을 분리하기가 어렵다. 그러나 양이온 역미셀은 효소도 어느정도 안정화 시키며 계면활성제는 이온을 가지고 있으므로 반응 후 계면활성제로부터 생성물을 쉽게 분리할 수 있다(53,59).

역미셀은 효소학을 연구하는데 매우 매력적인 system이다. 왜냐하면 그 구조는 열역학적으로 매우 안정하고, 유기용매상과 수용액상의 접촉면이 매우 넓고(100m²/ml), waterpool사이의 교환속도가 매우 빨라 (10⁷sec⁻¹) 효소의 반응성을 크게 할 수 있으며, 용액의 점도가 매우 낮고, 투명하여 분광기기를 사용하여 쉽게 반응속도를 측정할 수 있기 때문이다(19,20). 미셀효소학은 1977년 P. L. Luisi(ETH, 스위스)와 K. Martinek (Moscow. 소련)에 의하여 역미셀에서 효소의 성질이 연구된 이래 현재 20여 실험실 이상에서 연구되고 있다.

단백질의 안정도

역미셀을 효소반응의 매질로 이용하기 위해서는 역미셀에서 효소가 안정하여야 한다. 효소의 안정도는 물의 양, 계면활성제의 종류, 보조계면활성제의 종류에 의존한다(23,24). 효소안정도는 수화물도, Wo (hydrate degree : Wo=[수용액]/[계면활성

제]에 완전히 의존한다. 그림 3에서 볼 수 있는 바와 같이 Horse liver alcohol dehydrogenase의 안정

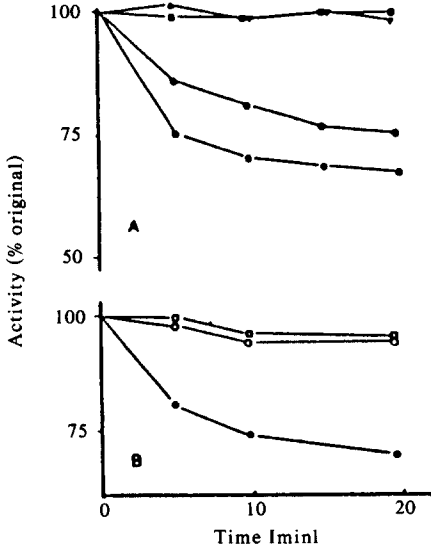


그림 3. 양이온 microemulsion에서 alcohol dehydrogenase의 효소활성의 안정도.(A) (○)8% 물, (●)14% 물, (■)21% 물, (▲)27% 물을 포함한 microemulsion(무계비율). 보조계면활성제로서 (B)(●)1-butanol, (□)1-pentanol, (○) 1-hexanol을 사용한 microemulsion.

도는 물의 양과 보조 계면활성제의 종류에 의존한다. W_o 가 증가하면 미셀 크기는 증가하여, waterpool 크기가 커져서 효소와 유기용매 상호작용을 감소시킬 수 있으며 waterpool에 있는 효소는 그의 3차구조가 변하지 않으므로 안정하다(13). Alcohol dehydrogenase는 21% 이상의 물을 포함하는 역미셀에서는 수용액에서와 마찬가지로 안정하다. 이와 같이 효소의 안정도가 수화물도에 의존하는 현상은 *Thermoanaerobium brockii* alcohol dehydrogenase (25), cholesterol oxidase(16)의 경우에서도 관찰된다.

또한 역미셀에서 효소안정도는 계면활성제 종류에 관계된다. 대부분의 효소는 약한 상호작용을 할 수 있는 Tween, Triton, Brij계열 계면활성제와 같은 "soft계면활성제"인 비이온 계면활성제로 이루어진 역미셀에서 안정하지만 단백질과 강한 상호작용을 하는 SDS로 이루어진 역미셀에서는 쉽게 비활성화되며 CTAB와 같은 양이온 계면활성제인 CTAB로 이루어진 역미셀에서 며칠동안 안정하며 양이온 계

면활성제에서는 많은 효소가 안정하다(13,14,15, 16). Cholesterol oxidase는 양이온 계면활성제를 이용하여 cholesterol로부터 cholestenone을 합성하는데 사용할 수 있다(16). 보조계면활성제를 사용할 경우 alcohol dehydrogenase는 탄소고리가 긴 hexanol (C-6)을 보조계면활성제로 사용하는 경우 butanol (C-4), pentanol(C-5)에서 보다 훨씬 안정하였다(그림 3). 이것은 탄소 길이가 긴 보조 계면활성제를 사용하면 역미셀의 막이 더욱 단단해져 효소와 유기용매의 상호작용을 더욱 감소시킬수 있기 때문이다.

역미셀에서 효소의 성질

효소 반응속도

역미셀에서 액체상 (waterpool)의 성질은 보통 물(bulky water)의 성질과 다르다. 수화물도(hydrate degree : W_o)가 증가하면 waterpool의 물은 대부분 free water가 되어 그의 성질은 bulky water와 유사하지만 낮은 W_o 에서는 많은 물분자는 계면활성제의 표면에 붙어 있게 된다. 이물을 boundary water라 하며 boundary water의 성질은 bulk water와는 다르다. W_o 가 증가하면 역미셀의 크기가 증가하고, water pool의 성질이 bulky water의 성질과 비슷하여 지므로 효소 반응속도는 W_o 가 증가함에 따라서 수용액에서의 반응속도와 같아지는 현상을 나타낸다.

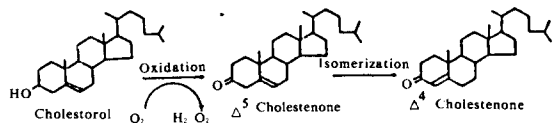


그림 4. cholesterol oxidase의 반응

이와 같이 반응속도가 W_o 에 의존함은 α -chymotrypsin(23,24,27,28), trypsin(29), lysozyme(30), horse liver alcohol dehydrogenase(13,31), cholesterol oxidase(16,25), pyrophosphatase(32), peroxidase(30), steroid dehydrogenase(32,33), bilirubin oxidase(35), tannase(35), lipoxygenase(36), lipase(37), polyphenoxidase(38) glutathione reductase(39)등에서 나타난다.

역미셀에서의 효소 반응 속도는 수용액에서와 같이 고전적인 Michaelis Menten equation에 따른다. 이로부터 결정된 K_m , K_{cat} 는 유기 용매에 대한

water fraction과 기질의 물-유기용매의 분배계수를 고려해야한다($K_m \text{ overall} = K_m \text{ waterpool} \times \text{water fraction}$). 역미셀에서 나타나는 K_m ($K_m \text{ overall}$)은 수용액에서의 K_m ($K_m \text{ waterpool}$)과 water fraction으로 부터 구할 수 있다. Cholesterol oxidase은 microemulsion에서 cholesterol에 대한 K_m 의 28mM이었으나 수용액에서는 0,028mM이며, hydrogen peroxide에 의해 비활성화되는 pattern도 water fraction을 고려하면 비슷해짐을 볼 수 있다. 수용액에서 Cholesterol oxidase가 270mM hydrogen peroxide에 의하여 비활성화되는 pattern은 10% 물을 포함한 microemulsion에서 30mM hydrogen peroxide에 의하여 비활성화 되는 것과 같다(16). 수용액과 microemulsion에서 alcohol dehydrogenase는 그의 기질인 cinnamyl alcohol에 의해 excess substrate inhibition 되는 pattern cinnamyl alcohol의 용매의 분배계수를 고려할 때 이와 일치함을 알 수 있다(13). 수용액에서 cinnamyl alcohol은 8 μ m이 넘으면 반응이 억제되지만 microemulsion에서는 1mM 이상에서 억제된다. Cinnamyl alcohol의 octanol과 물 사이 분배계수 100을 고려하면 거의 같은 농도에서 억제됨을 이해할 수 있다(69).

SDS, CTAB같은 이온 계면활성제를 사용하는 경우 효소에 미치는 pH의 성질(waterpool의 pH)은 bulky water에서 효소에 미치는 pH에 비하여 1-2 unit정도 이동될 수 있다(41,42,43,44). 역미셀에서의 waterpool의 pH는 polyelectrolyte에서 나타나는 것처럼 음이온 역미셀에서는 수용액에서보다 적게, 양이온 역미셀에서는 더 많이 올라갈 수 있다(45,46). 그러므로 pH에 대한 효소반응속도는 수용액에서와 다른 모양을 갖는다.

효소의 초활성도

역미셀에서 α -chymotrypsin의 K_{cat} 은 수용액에서 보다 높은 활성도를 갖는다(47). 또한 peroxidase는 AOT역미셀에서 수용액에서 보다 100배 더 큰 활성도를 갖는다. 이것을 초활성도라고 한다(48). 이러한 현상은 다른 효소의 경우에도 볼 수 있다.

효소의 특이성의 변화

기질 특이성은 주위의 환경에 따라서 변한다. 이것은 유기용매에서 효소와 기질의 결합에너지는 수용액에서와 다르기 때문이다. 기질 친화력은 효소와

물과의 결합 에너지에 관련되므로 물이 다른 용매로 바뀌면 결합 에너지가 바뀌어 기질특이성이 변한다(49,50). Horse liver alcohol dehydrogenase는 수용액에서 최적기질(K_{cat}/K_m)이 butanol인 반면에 역미셀에서는 octanol이 가장 좋은 기질이다(51). 이것은 용매가 더욱 친수성이되면 기질이 효소가 존재하는 waterpool로 확산되어 나와서 효소와 함께 waterpool에 존재하기 때문이다. 효소 반응에서 기질 입체선택성 역시 유기 용매에 의하여 영향을 받는다. N-AC-Ala chloroethyl ether의 α -chymotrypsin에 의한 (K_{cat}/K_m)_D / (K_{cat}/K_m)_L hydrolysis rate는 물에서 보다 butylether에서 10⁴정도 달라진다(52). 또한 제한효소 PvuII는 수용액에서 CAG \downarrow CTG를 절단하지만 알콜(ethanol, isopropanol)혼합물(10% 이상)에서는 CAG \downarrow CAG와 같이 6개중 5만 인식하여 절단하게 된다(53).

역미셀의 유기합성의 응용

효소와 같은 생촉매제를 이용하여 입체특이성이 요구되는 의약품을 합성하는데에는 여러문제가 있다. 첫째, 대부분의 기질 즉, steroids, prostanoids, alkaloids, fats등은 물에 녹지 않으므로 반응시킬 수 없다. 둘째, 보조효소-의존효소(coenzyme-dependant enzymes)는 보조효소의 가격이 너무 비싸므로 보조효소를 당량적으로 이용하는 것은 경제적이 아니다. 셋째, sugar와 amino condensation같은 물을 만드는 반응이라든지, 극성화합물을 반응시킬 때에는 열역학적으로 반응이 가역적이므로 반응물쪽으로 가게 된다. 위의 문제를 극복하는데 역미셀은 이상적인 반응매질이다. 유기물을 합성하는데 역미셀을 이용한다면 유기용매상에 물에 녹지 않는 기질물질을 녹여 반응시킬 수 있으며 생성물 역시 유기용매상에 녹아 생성물에 의한 효소억제나 과량의 기질에 의한 효소억제를 피할 수 있다. NADH를 보조효소로 하는 alcohol dehydrogenase의 경우 보조계면활성제로 사용되는 alcohol은 보조효소를 재생할 수 있다.

역미셀에서 유기물 합성은 alcohol dehydrogenase을 이용한 alkanol의 합성(54), steroid dehydrogenase를 이용한 progesterone(55), lipase를 이용한 glyceride의 합성, lipoxygenase를 이용한 linoleic acid의 합성(56,57), α -chymotrypsin을 이용한 peptide합성(58)등이 연구 되었다. Biellmann

교수는 역미셀에서 cholesterol oxidase를 이용하여 cholesterol로부터 Δ^4 -cholestenone을, 7-OH-cholesterol로부터 7-OH-cholestenone을 합성하였다. Cholesterol은 수용액에는 거의 녹지 않았으나 microemulsion에서는 1M solution을 만들 수 있었다. 500mg cholesterol을 3ml microemulsion에 녹여 25U cholesterol oxidase를 이용하여 3일 반응시킨 후 97%의 수율로 Δ^4 -cholestenone을 합성하였다(59).

Horse liver alcohol dehydrogenase를 이용하여 CTAB microemulsion에서 (\pm)1-formyl-trimethylene methane iron tricarbonyl로부터 (+)1-hydroxy methyl trimethylene methane iron tricarbonyl을 97% 수율(e,e,89%)로 합성하였다(60). 생성물은 60°C 이상의 온도에서 쉽게 racemization되어 일반적인 유기합성 조건에서 순수한 광학활성물을 얻을 수 없으나 효소를 사용하면 낮은 온도와 중성에서 반응을 하므로 순수한 광학 활성물을 합성할 수 있다.

역미셀에서는 역미셀의 크기보다 훨씬 큰 oligomeric enzyme(61), mitochondria, kidney lysosome(62), plant cell(63), yeast(64)등을 용해할 수 있어 이것을 생촉매제로 이용할 수 있다. Fadnavis는 역미셀에 녹아 있는 yeast cell을 이용하여 methylester를 거울상 선택성으로 가수분해하였다(64).

역미셀의 이용

단백질 추출에 이용

막과 관련된 단백질을 분리하고 정제하는 데에는 Tween, Triton등과 같은 비이온 계면활성제가 이용되어 왔다. 역미셀을 이용하여 squalene epoxide cyclase(65), hydrogenase(66), alkaline protease(67), amylase(68)을 추출하는 연구가 되어 왔으며 역미셀에 의한 추출력은 계면활성제의 종류와 salt의 농도에 크게 의존한다. 현재 역미셀을 이용하여 선택적으로 원하는 단백질을 분리, 추출하여 bioreactor로 사용하려는 연구가 진행되고 있다.

역미셀의 분석에 응용

기질 특이성을 갖는 효소를 Biosensor로 이용하여 혈액 중 glucose와 같은 sugar 또는 cholesterol을 정량하는데 이용할 수 있다. 그러나 분석하고자 하는 물질이 pesticides처럼 물에 녹지 않으면 분석이

어려워진다. 그러나 역미셀은 이러한 물에 녹지 않는 물질을 녹일 수 있으므로 검출에 이용할 수 있다. 역미셀은 polarity가 다른 aqueous-interface-organic상으로 이루어져 있으므로 거의 모든 물질을 녹일 수 있기 때문에 이러한 system은 불용성 물질 분석에 이상적인 system이다. Kurganov는 역미셀에서 lipoxygenase를 이용하여 물에 녹지 않는 vitamin B2의 유도체와(70) flyluciferase를 이용하여 ATP를 분석하였다(71).

신 효소학분야에 이용

지금까지 효소학은 수용액에서 수행되어 왔다. 우리는 *in vitro*에서 얻은 연구결과가 *in vivo*에 얼마나 관련되는가 하는 궁극적인 의문을 제기한다. 예를 들어 alcohol dehydrogenase는 수용액에서 butanol이 가장 좋은 기질이지만 역미셀에서는 octanol이 가장 좋은 기질이다. 그러므로 "in vivo에서 가장 이상적인 기질은 무엇인가" 하는 질문이 생긴다. 역미셀은 *in vivo* 효소학을 연구하는 데 좋은 모델로 사용될 수 있다. 자연에서 효소는 순수한 수용액에 존재하지 않고 막, carbohydrate, 알콜 등 많은 물질이 섞인 heterogeneous system에 존재하기 때문이다. 효소가 *in vivo*에서 가장 active하고 가장 안정하다면, 효소는 수용액에서 보다 역미셀과 같은 heterogenoeous system에서 더욱 안정해질 수 있을 것이다(72,73).

역미셀에서 소수성 기질이나 생성물은 waterpool에 존재하는 효소와 분리되어 유기 용매상(organic phase)에 저장된다. 이와 비슷하게 *in vivo*에서는 막에 저장된 소수성물질은 효소가 위치하고 있는 곳으로 확산되어 반응한 후 소수성 생성물은 다시 막으로 돌아가 보관된다. 역미셀에서는 유기용매상이 막 처럼 소수성 물질을 저장 하므로, 수용액에서의 효소반응에서 나타나는 과량의 기질에 의한 효소억제(excess substrate inhibition), 생성물에 의한 효소억제(product inhibition)등을 피할 수 있다. 그러므로 지금까지 수용액에서 연구할 수 없었던 수용액에 녹지 않는 효소억제제(또는 활성제)와 효소의 상호작용에 대한 연구가 역미셀에서는 가능하다. 또한 역미셀은 단백질의 transmembrane mechanism을 연구하는 모델로써 이상적이다. 그림 5에서 보는 바와 같이 Cytochrome C(74), 막 단백질(75), cytochrome p-450(76)등과 같은 막 단백질이 막을 통과할 때 단백질은 막 지질과 electrostatic 상호작용으로 막을 통과하는 과정에서 역미셀과 같은 구조

를 갖는다(그림 5). 이와 비슷하게 ATPase나 lipase역시 막을 통과할 때 non-bilayer구조인 역미셀구조를 갖는다(77,78). 그러므로 미셀효소학은 지금까지 수행된 고전적 효소학과는 달리 효소가 실제적으로 in vivo에서 일어나는 현상을 연구하는데 이상적인 system이다.

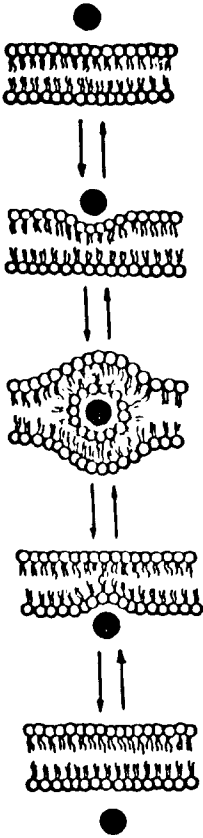


그림 5. 역미셀의 protein carrier로서의 model(79).

결론

역미셀을 이용하여 세포나 효소와 같은 생촉매제를 용해, 추출할 수 있으며 이 생촉매제는 bioreactor로써 여러가지 기질물질을 bioconversion시킬 수 있다. 역미셀을 이용하여 지금까지 할 수 없었던 많은 연구를 가능하게 할 수 있으며 효소를 의약품 합성, 약품분석, 의료진단에 더욱 용이하게 이용할 수 있다.

참고문헌

1. G. M. Whiteside and C. H. Wong (1985),

- Angew. Chem, Int. Ed. Eng., **24**, 617.
2. A. M. Klivanov (1986), Chem. Tech., 354.
 3. J. B. Jones (1986), Tetrahedron, **42**, 3351.
 4. K. Mosbach, (ed.)(1979), Methods in Enzymology Vol 44, Academic press, New York.
 5. L. B. Wingard, E. Katdhalski and L. Goldstein., (ed.)(1979), Applied Enzymology, Voll, Academic Press, New York.
 6. P. Cremonesi, G. Carrea, L. Ferrara and E. Antonini(1974), Eur.J. Biochem., **44**, 401.
 7. E. Antonini, G. Carrea and P. Cremonesi (1981), Enzyme Micro. Tech., **3**, 291.
 8. P. L. Luisi(1985), Angew. Chem. Eng. Int. Ed., **24**, 439.
 9. M. Waks(1986), proteins, **1**, 4.
 10. K. Martinek, A. V. Levashov, L. Khmel'niskiyu, N. C. Klyachko and I. V. Berezin (1982), Science, **218**, 889.
 11. K. Martinek, A. V. Berezin, Y. L. Khmel'niski, N. L. Klyachko and I. V. Levashov (1987), Coll. Cze. Chem. Comm., **53**, 2589.
 12. K. Martinek, A. V. Levashov, N. L. Klyachko, Y. L. Klmelniski and I. V. Berezin (1986), Eur. J. Biochem., **155**, 453.
 13. J. P. Samama, K. M. Lee and J. F. Biellmann (1987), Eur. J. Biochem., **163**, 609.
 14. S. Clark., Biochim. Biophys. Acta (1981), **670**, 195.
 15. K. M. Lee and J. F. Biellmann (1987), New J. Chem., **11**, 775.
 16. K. M. Lee and J. F. Biellmann (1986), Bioorganic Chem., **14**, 262.
 17. A. Helenius and K. Simons (1975), Biochim. Biophys. Acta, **415**, 29.
 18. C. Tanford and J. Reynolds (1976), Biochim. Biophys. Acta, **457**, 133.
 19. C. Haring, P. L. Luisi and F. Heussdoerffer (1985), Biochem. Biophys. Res. Commun., **127**, 911.
 20. T. H. Hoar and J. H Schulmann (1943), Nature, **153**, 103.
 21. P. L. Luisi, F. Henninger, M. Joppich, A. Dossena and G. Casnati (1977), Biochem. Biophys. Res Comm., **74**, 1386.
 22. K. Martinek, A. V. Levashov, N. L. Klyachko

- and I. V. Berezin (1977), *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **236k**, 920.
23. S. Barbaric and P. L. Luisi (1981), *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4239.
 24. P. D. I. Fletcher, R. B. Freedman, J. Mead, C. Oldfield and B. H. Robinson (1984), *Colloids Surf.*, **10**, 193.
 25. K. M. Lee and J. F. Biellmann (1987), *New J. Chem.*, **11**, 775.
 26. J. A. Reynolds and C. Tanford (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5101.
 27. Q. Mao and P. Walde (1991), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **178**, 1105.
 28. N. W. Fadnavis and P. L. Luisi (1989), *Biochem. Bioeng.*, **33**, 1277.
 29. C. Balny, G. Hui Bon Hoa and O. Douzou (1979), *Jerusalem Symp. Quant. Chem. Biochem.*, **12**, 37.
 30. N. L. Klyachko, A. V. Levashov and K. Martinek (1984), *Mol. Biol.*, **18**, 1059.
 31. K. M. Larsson, C. Oldfield and R. B. Freedman (1989), *Eur. J. Biochem.*, **183**, 357.
 32. R. Hihorst, R. Spruijijt, C. Lance and C. Veeger (1984), *Eur. J. Biochem.*, **144**, 459.
 33. V. Alexey, V. Olga, A. Buneeva and G. Winederschain (1991), *FEBS Lett.*, **287**, 219.
 34. C. Oldfield, B. Freedman (1989), *Eur. J. Biochem.*, **183**, 347.
 35. A. Gaathaon, Z. Gross and M. Rozhansk (1989), *Enzyme Micro. Tech.*, **11**, 604.
 36. G. Ayala and G. Mendoza-Hernandez (1990), *Biochem. Int.*, **22**, 717.
 37. D. G. Hayes and E. Gulari (1990), *Biotech. Bioeng.*, **35**, 793.
 38. A. Sanchez-Ferrer, R. Bru and F. Garcia-Carmona (1988), *FEBS Lett.*, **233**, 363.
 39. A. Kumar and S. S. Kataris (1989), *Biochem. Biophys. Acta*, **996**, 1.
 40. A. Helenius and K. Simons (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 29.
 41. F. M. Menger and G. Saito (1980), *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4376.
 42. C. Kumar and D. Balasubramanian (1980), *J. Colloid Interface Sci.* **74**, 64.
 43. L. Goldstein L. (1976), *Methods in Enzymology*, Vol. 44, 397, Academic press, New York.
 44. O. A. El Seoud and A. M. Chimelatto (1983), *J. Colloid Interface Sci.*, **95**, 163.
 45. L. Goldstein, L. Letein and E. Katchalsky (1964), *Biochemistry*, **3**, 1913.
 46. C. Bonfils, F. Nato. R. Bourrillon and C. Balny (1981), *FEBS Lett.*, **123**, 222.
 47. F. M. Menger and K. Yamada (1979), *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 6711.
 48. K. Martinek, N. L. Klyachko, A. V. Levashov and I. V. Berezin (1983), *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **269**, 491.
 49. J. P. Jencks (1975), *Adv. Enzymol.*, **43**, 219.
 50. J. Kraut (1988), *Science*, **242**, 533.
 51. K. Martinek, Y. L. Khmel'nitsk., A. V. Levashov and I. V. Berezin (1982), *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **263**, 337.
 52. T. Sakurai, A. L. Margolin, A. J. Russel and A. M. Klivanov (1987), *J. Am., Chem. Soc.*, **109**, 7885.
 53. K. M. Lee and H. J. Kim (1992), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, (in press).
 54. K. Klyachko, Y. L. Klmelnishi, A. V. Levashov, E. M. Gavrilova, A. M. Egorov, K. Martinek and I. V. Benezin (1987), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **501**, 267.
 55. R. Hihorst, C. Lanne, C. Veeger (1983), *FEBS Lett.*, **159**, 225.
 56. S. Mortlta, H. Martita, T. Matoba and M. Kito (1984), *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **61**, 1571.
 57. D. Han and J. S. Rhee (1985), *Biotechnol. Lett.*, **7**, 651.
 58. P. Luithi and P. L. Luisi (1984), *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7285.
 59. K. M. Lee and J. F. Biellmann (1986), *New J. Chem.*, **10**, 675.
 60. K. M. Lee, D. Martina, C. U. Park and J. F. Biellmann (1990), *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **11**, 472.
 61. V. A. Kabanov. S. Namekin, N. Klyachko and A. V. Levashva (1991), *FEBS Lett.*, **278**, 143.
 62. A. Hochkoeppler and P. L. Luisi (1991), *Biotech. Bioeng.*, **37**, 918.

63. A. V. Pshzetsky, O. A. Buneeva, G. Y. Wiederschain (1989), *FEBS Lett.*, **287**, 219.
64. N. W. Fadnavis, N. P. Reddy and U. T. Bhalerao (1989), *J. Org. Chem.*, **54**, 3218.
65. K. M. Lee, A. Duriatti, F. Schuber and J. F. Biellmann (1989), *FEBS Lett.*, **224**, 347.
66. K. M. Lee and J. F. Biellmann (1990), *Biochimie*, **72**, 285.
67. H. Yun (1990), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 411.
68. K. E. Goklen and T. A. Hatton (1985), *Biotech. Prog.*, **1**, 69.
69. A. Leo. C. Hansch and E. L. King (1971), *Chem. Rev.*, **71**, 525.
70. B. I. Kurganov, L. G. Tsetlin, E. a. Malakhova, V. Z. Lankin, A. V. Lavashov and K. Martinek (1985), *J. Biochem. Biophys. Methods*, **11**, 177.
71. N. L. Klyachko, M. Rubtsova, A. V. Levashov, E. M. Gavrinova, A. M. Egoroy, K. Martinek and I. V. Berezin (1978), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **501**-267.
72. H. Sundermann (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 209.
73. M. Klingenberg (1981), *Nature*, **290**, 449.
74. A. Verkleij (1984), *Biochem. Biophys. Acta* **779**, 43.
75. J. S. Hah, S. W. Hui and C. Y. Jung (1983), *Biochemistry*, **22**, 4763.
76. A. Stier, S. A.9. E. Finch, B. Borsterling (1978), *FEBS Lett.*, **91**, 109.
77. S. W. Hui, T. P. Stewart, P. L. Yeagle and A. D. Albert (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **207**, 227.
78. R. M. C. Dawson (1982), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **59**, 402.
79. B. De Kruijff, A. J. Verklei, C. J. A. Echteld, W. J. Gerritsen, P. C. Noordam, C. Mombers, A. Rievtveld, J. DeGier, P. R. Cullis, M. J. Hope, R. Nayar (1980), in *International cell biology* (H. G. Schweiger) 559, Springer, Berlin, Heidelberg.