

고압에서 β -glucosidase 반응속도론 및 평형에 관한 연구

한진영 · 이승주*

동국대학교 식품생명공학과

Kinetics and Equilibrium Study on β -Glucosidase under High Hydrostatic Pressure

Jin Young Han and Seung Ju Lee*

Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University

Abstract

β -Glucosidase enzyme reaction under high hydrostatic pressure was investigated in terms of physical chemistry. A model substrate (p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG)) was used, and the pressure effects on the enzymatic hydrolysis (pNPG \rightarrow pNP) at 25 MPa, 50 MPa, 75 MPa, and 100 MPa were analyzed. Two parts of the reaction such as kinetic and equilibrium stages were considered for mathematical modelling, and their physicochemical parameters such as forward and inverse reaction constants, equilibrium constant, volume change by pressure, etc. were mathematically modeled. The product concentration increased with pressure, and the two stages of reaction were observed. Prediction models were derived to numerically compute the product concentrations according to reaction time over kinetic to equilibrium stages under high pressure condition. Conclusively, the β -glucosidase enzyme reaction could be activated by pressurization within 100 MPa, and the developed models were very successful in their prediction.

Key words: high hydrostatic pressure, enzyme reaction, equilibrium constant, kinetics, β -glucosidase

서 론

효소 β -glucosidase [β -D-glucoside glucohydrolase (EC. 3.2.1.21)]는 cellulose hydrolysis 효소로, intermediate cellobiose를 2 분자의 glucose로 가수분해하는 효소이다 (Flachner et al., 1999). β -Glucosidase는 미생물, 곰팡이를 비롯한 대부분의 생물체에서 직접 에너지를 내는 데 이용하지 못하는 cellulose 등을 분해한다는 점에서 필수적인 효소이며, 주스 추출시 쓴 물질의 가수분해와 wine grapes에서 향기 성분을 추출할 때 주로 사용된다 (Gueguen et al., 1996). 또한, 인삼 및 홍삼에서의 β -glucosidases (ginsenoside-b-glucosidase)는 ginsenoside R_g, 물질의 β -(1 \rightarrow 2)-glucoside를 가수분해하여 Rh₂로 변환하는 데 사용되며 (Zhang et al., 2001), 인삼 및 홍삼에서 Rh₂는 항종양성분으로 작용한다.

최근 들어, 효소 반응에의 중고압 처리에 따른 효소의 활성이나 반응속도 증진에 대한 연구가 활발히 진행되고

있다. 효소 반응에의 압력 처리는 효소의 안정성과 활성을 유도하며, 고압에서의 효소 안정성 또는 활성을 연구한 효소는 25 개 넘는 것으로 보고되었다 (Eisenmenger & Reyes-De-Corcuera, 2009). Dallet & Legoy (1996)은 *Thermoanaerobium brockii*의 dehydrogenase 효소반응에 압력을 주었을 때, 100 MPa일 때까지 효소의 활성이 증가함을 관찰한 바 있다. 또한, *Rhizomucor miehei*의 lipase는 10 MPa의 압력까지 올렸을 때, 효소의 촉매 활성이 개선되었고, 그 이상의 압력에서는 그 활성이 감소함을 나타내었다 (Knez et al., 2007). Michels & Clark (1997)은 *Methanococcus jannashii*의 protease에 중고압 처리를 한 결과, 약 50 MPa에서 효소-기질간 반응속도가 가장 빨랐음을 보고한 바 있다.

효소 반응의 kinetic을 연구하고, kinetic 상수, 활성화 에너지, 온도, pH, 수분 활성도와 같은 효소의 특성을 결정하는 것의 중요성은 효소의 usability와 productivity를 알아내는 데 있다 (Boyaci, 2005). Polynomial model의 예측 방법에 대한 전통적인 접근으로서, 효소 반응 속도는 기질의 농도와 다른 독립변수들의 함수로 나타내어진다. 이 방법은 kinetic 상수를 결정하는 데에 있어 non-linear regression이나 Lineweaver-burk plot 방법을 이용할 수 있다. Kokova et al. (2009)은 thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzymes, benzaldehyde lyase (BAL), benzoylformate decarboxylase의

*Corresponding author: Seung Ju Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University, Seoul, 100-715, Korea
Tel: +82-2-2260-3372; Fax: +82-2-2260-3372
E-mail: Lseungju@dongguk.edu
Received April 5, 2011; revised July 19, 2011; accepted July 21, 2011

반응에서 mechanistic kinetic model을 이용하여 kinetic 변수들과 미세 속도 상수들을 결정하였고, 이를 통해 반응의 속도 제한 단계를 결정한 바 있다. Mishra & Kumar(2009)은 laccase 효소-기질의 반응성을 보기 위해 kinetic analysis를 통해 K_m 과 V_{max} 값을 분석하였다. 효소 반응에서의 kinetic study는 효소의 성질 및 반응을 구체화할 수 있다는 장점을 지니고 있기 때문에 특정 반응의 kinetic 연구에 있어 다양한 접근 방법들이 시도되고 구체화되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 아몬드에서 추출한 β-glucosidase의 효소-기질 반응에 hydrostatic pressure(25-100 MPa)을 가하여, 가압에 의한 효소 활성에서의 변화를 연구하고, FT-IR을 통해 가압 전후의 β-glucosidase의 구조적 안정성을 살펴본다. Gibbs free energy function을 이용하여 가압에 따른 부피변화를 연구하고, 임의의 압력에서 평형에 도달했을 때 평형상수(K)를 알 수 있는 모델링을 개발하였다. 또한, β-glucosidase 효소반응의 kinetic analysis를 통해 시간과 생성물의 관계를 연구하여 반응시간을 예측할 수 있는 모델링을 개발하였고, 실제 반응 관찰을 통해 본 모델의 정확성과 유용성을 평가하였다.

재료 및 방법

가압실험

효소 반응의 가압 실험은 수압식(hydrostatic) 압력장치(TFS-0.5L, Dima Puretech Co. Ltd., Incheon, Korea)를 이용하였다. 효소와 기질의 혼합물을 비닐용기에 넣고 진공포장한 후 압력장치의 가압실 수조에 넣고 압력을 25, 50, 75, 100 MPa의 조건으로 각각 부가하였다. 목표 압력에 도달하는데 약 3분, 압력을 해제하는데 약 1분이 소요되었다. 시료 진공포장 백을 가압실의 수조에 넣기 전에 사전에 물의 온도는 50°C로 맞춰 놓았다.

효소반응

가압 처리된 효소반응은 Orruno et al.(2001)의 방법에 따라 측정하였다. 효소반응에 대한 가압효과를 측정하는데 사용한 아몬드 유래 β-glucosidase(6unit/mg)를 구입하여 사용하였고(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNPG) (Sigma-Aldrich, USA)를 기질로 사용하였다. Reaction mixture는 acetate buffer(pH 5.0) 0.4 mL, 20 mM pNPG-acetate buffer 용액 0.5 mL로 구성하고, 0.1 mg/mL의 농도를 가진 β-glucosidase 0.1 mL를 첨가하여 최종부피를 1 mL로 하였고, 효소를 첨가한 즉시 진공포장을 하여 압력처리를 하였다. 주어진 압력처리시간이 경과하면, 압력기에서 꺼내어 3M Na₂CO₃를 넣어 반응을 종료하였다.

기질인 pNPG의 양은 β-glucosidase assay를 다룬 연구

중 가장 많은 기질농도를 넣은 경우(Orruno et al., 2001)를 따랐다. 이는 식물 및 미생물 유래 β-glucosidase에 대한 일반 기질농도를 고려하는 동시에, 효소-기질 반응에서 충분히 반응이 일어난 뒤 평형에 도달하도록 하기 위함이었다.

생성물의 농도는 UV/Vis Spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 405 nm의 파장에서 3회 반복 측정하였다. 생성물의 농도는 p-nitrophenol(Sigma-Aldrich, USA) 표준용액의 흡광도 측정으로부터 얻어진 extinction coefficient(ϵ)(19,500 M⁻¹cm⁻¹)를 사용하여 계산하였다.

효소 안정성

효소가 가압처리되었을 때 변성되는 여부를 FT-IR(Nicolet Magna 550 Series, GMI Inc., Ramsey, MN, USA)로 측정하였다. 액상 시료를 KBr 판에 주입하였으며, 측정 wave number 범위는 단백질의 구조를 반영할 수 있는 650-4000 cm⁻¹로 설정하였다.

가압에 따른 효소 안정성 변화 여부를 측정하기 위해 β-glucosidase-acetate buffer(pH5.0) 용액을 가압처리 한 것과 처리하지 않은 것 모두 FT-IR 측정함으로써, 효소의 단백질 변성 여부를 측정하였다.

효소반응 모델링

효소에 의한 가수분해 반응은 식 (1)과 같이 나타낼 수 있다(Bruins et al., 2006).



여기서 S는 기질, W는 물, P는 생성물이며, k와 k'는 각각 정반응과 역반응의 반응속도 상수를 의미한다.

식 (1)로부터 시간에 따른 반응속도는 다음의 식 (2)로 나타낼 수 있다.

$$\frac{dp}{dt} = k \cdot s \cdot w - k' \cdot p \quad (2)$$

여기서 s, w, p는 S, W, P의 농도를 의미하며 는 반응시간을 나타낸다. 이때 는 와 동일할 것으로 간주한다(Bruins et al., 2006).

일반적으로 기질-효소의 반응은 시간에 따라 반응속도가 다른 kinetic 구간과 반응속도가 일정한 평형 구간으로 나누어진다(Fig. 1). 본 연구에서는 평형 구간과 kinetic 구간으로 나누어 각 단계에 맞는 모델링을 행하였다.

(1) 평형단계 모델링

반응이 평형에 도달하면 이 되므로 식 (2)는 식 (3)로 전개된다.

$$\frac{k}{k'} = \frac{p}{s \cdot w} = K \quad (3)$$

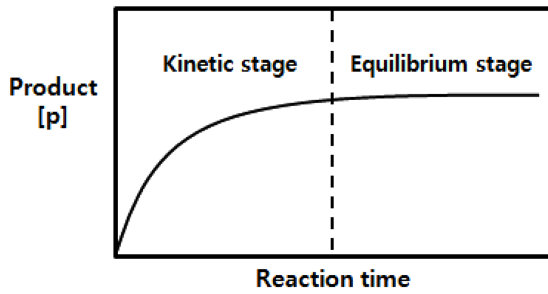


Fig. 1. Kinetic and equilibrium regions in the enzyme-substrate reaction.

여기서 K 는 평형상수로서, 평형에 도달했을 때 정반응 대 역반응 속도상수의 비에 상당한다.

또한, Gibb's free energy theory는 다음의 식 (4)와 같이 나타낼 수 있다(Bruins et al., 2006).

$$\Delta G = -(RT \ln p - RT \ln s \cdot w) = -RT \ln \frac{p}{s \cdot w} = -RT \ln K \quad (4)$$

여기서 ΔG 는 반응물과 생성물의 Gibb's free energy 차이, R 은 이상기체상수, T 는 절대온도를 의미한다.

한편, 평형에서 압력과 반응의 자유에너지와의 관계는 다음의 식 (5)와 식 (6)과 같다.

$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial Pr}\right)_T = \Delta V \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta V \cdot Pr + \text{constant} \quad (6)$$

여기서 Pr 은 압력, ΔG 는 계의 반응부피의 변화를 의미하며 반응물과 생성물의 partial molar 부피의 차와 동일하다. 단, 식 (5)에서 식 (6)로 전개하는 데는 온도는 일정한 상태에서의 변화를 가정한다.

최종적으로 임의의 압력에서 평형상수를 산출할 수 있는 식을 다음과 같이 유도하였다. 즉, 등온조건(isothermal) 하에서 식 (4)와 식 (6)를 연립하여 식 (7)을 얻었다.

$$\ln K = \left(-\frac{\Delta V}{RT}\right) \cdot Pr + \text{constant} \quad (7)$$

따라서 식(7)로부터 얻은 압력에 따른 평형상수를 식(8)에 대입하여 평형에서의 생성물의 양을 산출할 수 있었다.

$$\frac{p}{s \cdot w} = \frac{p}{(s_0 - p)^2} = K \quad (8)$$

여기서 s_0 는 초기 반응물 농도이다. 식 (8)은 식 (9)와 같은 이차방정식으로 정리되어 생성물의 농도를 계산할 수 있었다.

$$p^2 - \left(2s_0 + \frac{1}{K}\right)p + s_0^2 = 0 \quad (9)$$

(2) Kinetic단계 모델링

식 (2)에서 반응물 농도 항을 생성물 농도로 치환하여 식 (10)을 유도하였는데, 미분방정식의 analytical 해법은 복잡하여 식 (11)과 같이 수치해석적 해법을 적용하여 시간에 따른 생성물의 농도를 구하였다(Fig. 1).

$$\frac{dp}{dt} = k \cdot s \cdot w - k' \cdot p = k(s_0 - p)^2 - k'p \quad (10)$$

$$p_{i+1} = p_i + \left(\frac{dp}{dt}\right)_i \cdot \Delta t \quad (11)$$

여기서 i 는 임의의 시간 시점을 나타내며, 정반응속도 k 는 식 (12)와 같이 초기의 생성물 농도를 무시하여 실험적으로 구하였고, k' 은 식 (3)으로부터 구하였다. 연산은 MS Excel(microsoft, Redmond, WA, USA)프로그램을 사용하여 행하였다.

$$\frac{dp}{dt} = k \cdot s \cdot w = k(s_0 - p)^2 = k \cdot s_0^2 \quad (12)$$

$$k = \frac{\left(\frac{dp}{dt}\right)}{s_0^2} \quad (13)$$

초기반응속도로부터 구한 k 의 압력의존성은 다항식으로 나타내었다.

$$k = ap^2 + bp + c \quad (14)$$

여기서 a, b, c 는 상수이다.

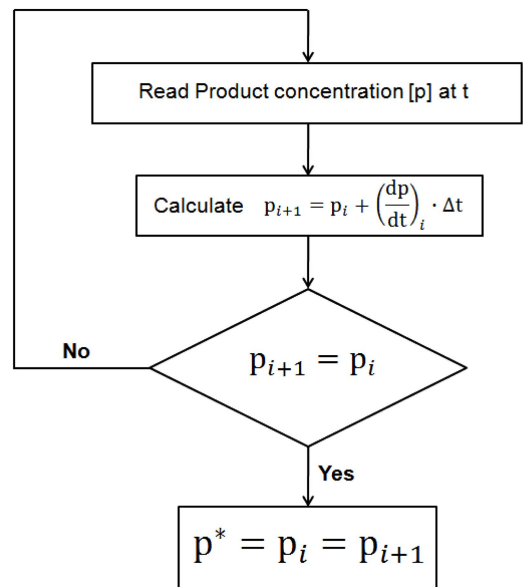


Fig. 2. Flowchart of numerical analysis for calculating the product concentration vs. reaction time until reaching an equilibrium concentration (p^*).

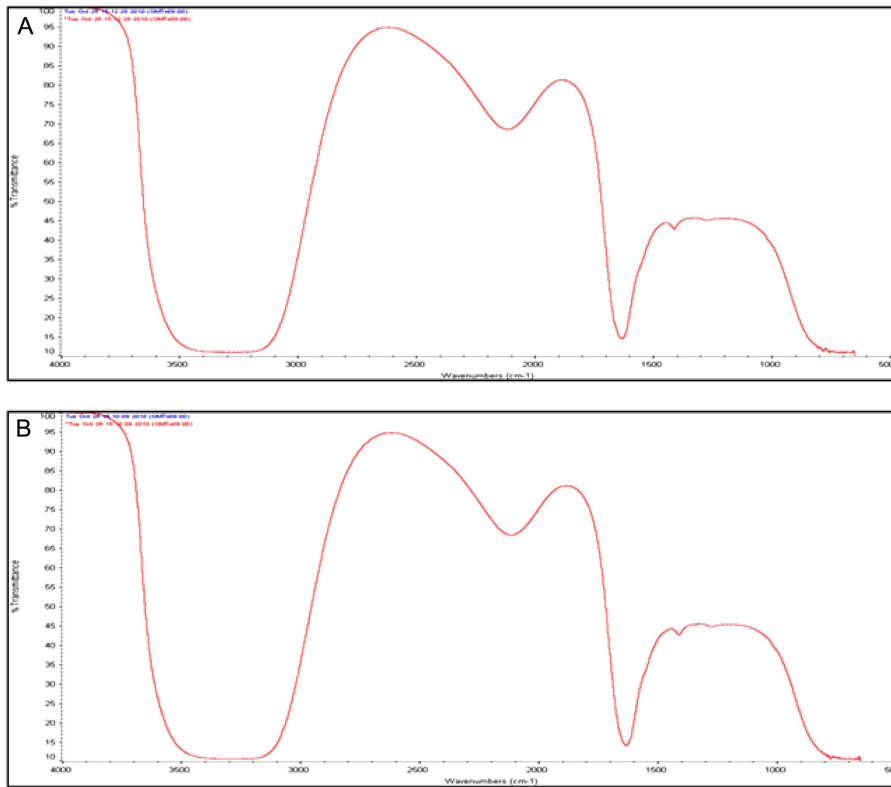


Fig. 3. FT-IR spectra of β -glucosidase-acetate buffer mixture. (A) Control (atmospheric pressure), (B) sample with hydrostatic pressure (100 MPa).

결과 및 고찰

효소 안정성

가압처리의 효과는 크게 반응물과 생성물의 반응성 또는 효소의 촉매기능의 변화로 세분화해 볼 수 있는데 전자는 압력의 물리화학적 해석에 근거하며, 후자는 효소 변성에 따른 긍정적 또는 부정적 효과를 낳는다. 이를 분석하기 위하여 β -glucosidase와 acetate buffer 용액을 Fourier transform-infrared(FT-IR) 분석을 행하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 β -glucosidase-acetate buffer (pH 5.0) 용액의 가압 전후 차이는 현저하게 나타나지 않았다. FTIR spectra database에 따라 3300 cm^{-1} 부근에서 O-H 결합 피크, 1630 cm^{-1} 부근에서 C=O 결합 피크 등이 동일하게 나타남을 알 수 있었다.

한편, β -glucosidase와 기질(pNPG) 및 acetate buffer(pH 5.0)의 혼합액의 가압 전후 FT-IR 분석을 행하였다. Fig. 4에서 보면, 3300 cm^{-1} 부근에서 O-H 결합 피크, 1630 cm^{-1} 부근에서 C=O 결합 피크는 동일하게 나타난 반면, 가압 처리를 한 시료(b)에서만 1340 cm^{-1} 부근에서 C-O 결합 피크가 나타났다. 이는 가압 처리를 함으로써 혼합액 내 C-O 결합 기능기의 변화가 생긴 것으로 사료된다.

물리화학적 모델링

(1) 압력에 따른 반응속도상수 모델링

실험적으로 정반응속도상수와 평형상수를 산출하고 역반응속도상수는 이들로부터 식 (3)에 의해 계산하였다. 먼저 정반응 속도상수는 가압 초기 단계의 선형 구간의 기울기를 측정하여 식 (13)에 의하여 구하였다. 각 압력에 대한 정반응속도상수는 Fig. 5와 같으며 압력과의 관계를 나타내는 다항식인 식 (14)에 대하여 비선형 회귀분석을 통하여 완성하였다. 추세선의 식은 $k = (5 \times 10^{-11})P^2 + (2 \times 10^{-10})P + 2 \times 10^{-7}$ 이고, R^2 값은 0.998이었다. 최종적으로 시간에 따른 생성물의 농도를 예측할 때 정반응속도상수, 평형상수, 이들로부터 계산된 역반응속도상수가 사용되었다.

(2) 압력에 따른 평형상수 모델링

압력(0, 25, 50, 75 MPa)에 따른 평형상수(K)의 자연로그 값을 plotting한 결과는 Fig. 6와 같다. 추세선의 식은 $\ln k = 0.058P - 11.005$ 이고, R^2 값은 0.9953이었다. Fig. 6의 결과를 식 (7)에 근거하여 해석해보면, ΔV 값은 -0.01558 이 나왔으며, 상수값은 -11.004 이었다. 따라서 식 (9)에 따라 압력에 따른 평형에서의 생성물의 양을 산출할 수 있는 식을 완성하였다.

효소 반응에 대한 압력의 효과를 보면, 열역학적으로 고압 하에서 반응물이 생성물로 바뀐 후 부피가 감소하는 경

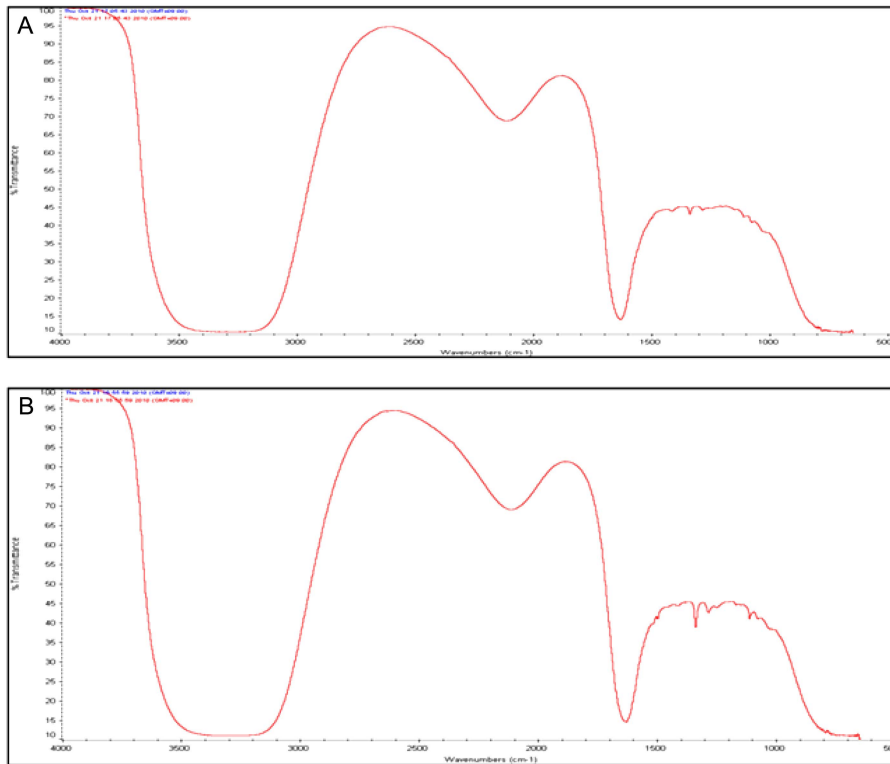


Fig. 4. FT-IR spectra of β -glucosidase, p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside and acetate buffer mixture. (A) Control (atmospheric pressure), (B) sample with hydrostatic pressure (100 MPa).

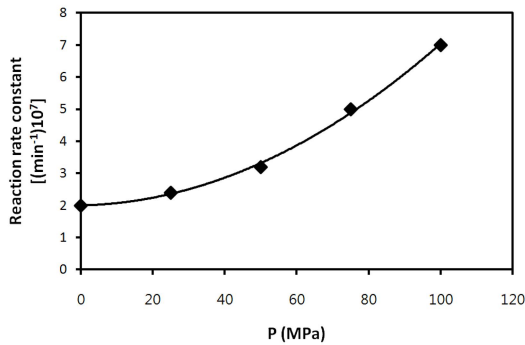


Fig. 5. Reaction rate constant (k) vs. pressure (P) as described by a polynomial equation [$k = (5 \times 10^{-11})P^2 + (2 \times 10^{-10})P + 2 \times 10^{-7}$].

우에는 그 반응은 촉진된다. 이에 따라 고압 하의 효소반응에서는 효소는 불활성되지만, 만약 효소에 의한 반응 자체의 체적 감소가 동반된다면 압력 상승에 의하여 활성화되는 상충되는 현상이 공존하는 애매모호함이 내재한다. 실제 효소반응의 체적 감소를 실험적으로 측정된 자료는 많지 않지만, 효소적 가수분해반응은 대부분 음수를 갖는 것으로 알려져 있다. 그러나, 가수분해가 아닌 다른 효소적 반응에서는 부피가 감소하지 않을 수 있다. 즉, 물분자를 방출하면서 분자가 서로 결합되는 condensation형(예, 포도당 \rightarrow oligo당) 반응에서는 부피 변화가 거의 없는 것으로 보고되었다(Bruins et al. 2006). 이 경우 분자간 단지 결합

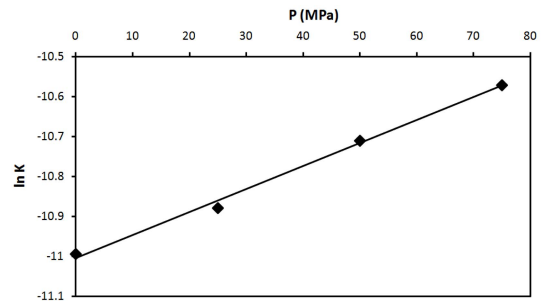


Fig. 6. Logarithm of the equilibrium constant (K) at different pressure (P).

만 더 생성이 돼서 부피 변화가 거의 없다고 고찰하였다.

(3) 고압에서 kinetic 구간 생성물 농도 예측

일반적으로 기질-효소의 반응은 시간에 따라 반응속도가 다른 kinetic 구간과 반응속도가 일정한 평형 구간으로 나누어지는데(Fig. 1), 정반응속도상수, 평형상수, 역반응속도상수의 압력의존 함수식을 수치해석에 적용하여(Fig. 2), 연산한 결과는 Fig. 7과 같았다. 계산치와 실험치가 매우 일치하게 나타났다. 이로부터 kinetic 구간의 수리적 모델링은 매우 정확한 것으로 판단된다. 예측결과로부터 평형에서 생성물 농도는 압력이 증가할수록 그 증가하였다. 평형 도달시간은 압력이 증가할수록 단축되게 나타났다.

한편 상대적으로 낮은 압력 범위인 중고압(약 <150 MPa)

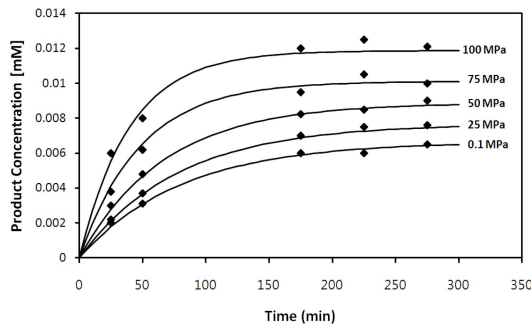


Fig. 7. Plot of product concentration vs. reaction time. — : estimates, \blacklozenge : experimental data.

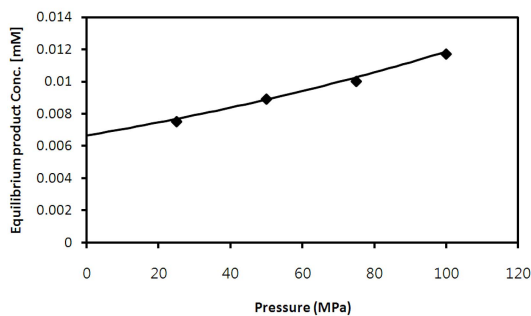


Fig. 8. Plot of equilibrium product concentration vs. pressure. — : estimates, \blacklozenge : experimental data.

범위에서는 오히려 효소의 안정성이 높아진다고 보고된 바 있다(Heinz et al., 2005; Ferreira et al., 2008). 비록 그 메커니즘이 아직도 불분명하지만 가압에 의하여 intramolecular 상호반응, 극성기의 수화, 결합수층의 와해, 수소결합의 안정화와 관련되어 효소의 안정화에 기여하는 것으로 알려졌다. 이와 같은 효과가 예측 결과에도 잘 반영되어 상기 모델링은 중고압 범위에서 효소반응을 예측하는데 유효한 것으로 나타났다.

(4) 고압에서 평형 구간 생성물 농도 예측

압력에 따른 평형에서의 생성물의 농도는 식 (9)에 초기 기질의 농도와 평형상수를 대입하여 연산한 결과 실험치와 계산치가 거의 동일하게 나타났다. 이로부터 역시 수리적 모델링은 매우 성공적임을 알 수 있다.

또한 상기와 같이 고압에서 효소반응의 최종 생성물의 양을 예측할 수 있을 뿐만 아니라 평형에 도달하는 시간은 kinetic 구간의 생성물 예측 곡선(Fig. 7)에 대입함으로써 예측할 수 있다.

Su et al. (2006)이 연구한 β -glucosidase가 ginsenoside의 한 종류인 Rg_3 를 항암성분으로 알려진 Rh_2 로 변화시킨다는 사실을 고려해볼 때, 중고압 하에서 β -glucosidase 효소반응이 효과적이라는 본 연구가 홍삼 제조기술에 크게 응용될 수 있을 것으로 생각된다. 나아가, 홍삼을 비롯한 여러 기능성 식품 내에 존재하는 배당체 분해반응에도 적용하여

기능성물질의 생산에 매우 효과적일 것으로 예상된다. 또한 반응속도론 및 평형 연구에 기반을 둔 생성물의 예측 모델에 따라 중고압 기술을 여러 기능성 식품에 적용할 때, 생성물의 농도를 예측할 수 있고, 처리하고자 하는 압력의 범위를 지정할 수 있다는 점에서 공정의 최적화가 용이할 것으로 생각된다.

요 약

중고압 하에서 β -glucosidase 효소반응을 물리화학적 관점에서 연구하였다. 모델 기질 (p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside)에 대한 β -glucosidase 효소의 작용에 대한 압력 효과를 실험하였다. 즉, 압력 조건(25 MPa, 50 MPa, 75 MPa, 100 MPa)과 시간 (10 분, 60 분, 1 시간, 6 시간, 24 시간, 40 시간)의 처리 조건에서 효소 활성도를 분광학적인 표준방법에 따라 측정하였다. 효소-기질 반응의 단계를 크게 kinetic 구간과 평형 구간으로 구분하여 물리화학적 모델을 적용하여, 정역반응속도 상수, 평형상수, 압력에 의한 부피 감소 등을 산출하였다. 대기압에서 100 MPa까지 압력이 증가할수록 효소-기질 반응의 생성물이 더 많이 형성되었으며 전형적인 kinetic 구간과 평형 구간이 나타났다. 압력, 시간, 생성물농도 등의 데이터로부터 kinetic 구간과 평형에서의 생성물 예측 모델을 완성하였다. 결론적으로 중고압 처리에 의하여 효소-기질 반응이 촉진됨을 알 수 있었고, 임의의 압력 및 시간 조건에 따른 생성물의 농도를 예측할 수 있게 되었다.

참고문헌

Boyaci IH. 2005. A new approach for determination enzyme kinetic constants using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 25: 55-62.

Bruins ME, Janssen AEM, Boom RM. 2006. Equilibrium shifts in enzyme reactions at high pressure. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 39: 124-127.

Dallet S, Legoy MD. 1996. Hydrostatic pressure induces conformational and catalytic changes on two alcohol dehydrogenases but no oligomeric dissociation. *Biochim. Biophys. Acta* 1294: 15-24.

Eisenmenger MJ, Reyes-De-Corcuera JI. 2009. High hydrostatic pressure increased stability and activity of immobilized lipase in hexane. *Enzyme Microb. Technol.* 45: 118-125.

Ferreira L, Afonso C, Vila-Real H, Alfaia A, Ribeiro MHL. 2008. Evaluation of the effect of high pressure on naringin hydrolysis in grapefruit juice with naringinase immobilised in calcium alginate beads. *Food Technol. Biotechnol.* 46:146-50.

Flachner B, Brumbauer A, Reczey K. 1999. Stabilization of beta-glucosidase in *Aspergillus phoenicis* QM 329 pellets. *Enzyme Microb. Technol.* 24: 362-367.

Gueguen Y, Chemardin P, Janbon G, Arnaud A, Galzy P. 1996. A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor

- precursors of wines and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2336-2340.
- Heinz V, Buckow R, Knorr D. 2005. Catalytic activity of beta-amylase from barley in different pressure/temperature domains. *Biotechnol. Prog.* 21: 1632-8.
- Knez Z, Laudani CG, Habulin M, Reverchon E. 2007. Exploiting the pressure effect on lipase-catalyzed wax ester synthesis in dense carbon dioxide. *Biotechnol. Bioeng.* 97: 1366-1375.
- Kokova M, Zavrel M, Tittmann K, Spiess AC, Pohl M. Investigation of the carboligase activity of thiamine diphosphate-dependent enzymes using kinetic modeling and NMR spectroscopy. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 61: 73-79.
- Michels PC, Clark DS. 1997. Pressure enhanced activity and stability of a hyperthermophilic protease from a deep-sea methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3985-3991.
- Mishra A, Kumar S. 2009. Kinetic studies of laccase enzyme of *Coriolus versicolor* MTCC 138 in an inexpensive culture medium. *Biochem. Eng. J.* 46: 252-256.
- Orruno E, Apenten RO, Zabetakis I. 2001. The role of beta-glucosidase in the biosynthesis of 2,5 dimethyl-4-hydroxy-3(H)-furanone in strawberry (*Fragaria X ananassa* cv. *Elsanta*). *Flavour Fragrance J.* 16: 81-84.
- Su JH, Xu JH, Lu WY, Lin GQ. 2006. Enzymatic transformation of ginsenoside Rg3 to Rh2 using newly isolated *Fusarium proliferatum* ECU2042. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 38: 113-118.
- Zhang HY, Bao Y, An L, Jin F. 2001. Purification and characterization of ginsenoside-beta-glucosidase from ginseng. *Chem. Pharm. Bull.* 49: 795-798.