제 6회 : 메조포어 분자체를 이용한 효소 고정화 및 단백질 분리

단백질 이나 비타민 같은 생화학 물질의 분리는 식품이나 의약품 산업에서 중요한 위치를 차지하고 있으며, 불순물이나 유사한 물리화학적 물성을 지닌 혼합물 간에 높은 순도로 정제하는 것이 필요하다. 현재 이용되고 있는 활성탄(activated carbon)이나 벤토나이트(bentonite)과 같은 흡착분리제의 경우 세공의 팽창(swelling) 이나 낮은 분리 선택성의 문제가 존재한다. 메조포어 분자체 물질의 경우에는 규칙적 세공과 넓은 표면적, 그리고 생화학 물질의 분자 크기를 수용할 수 있는 세공 크기의 범위로 인하여, 세공 크기 효과에 의한 이들의 분리(size exclusion based-selectivity)가 기대된다. 실제로 lysozyme, trypsin, 그리고 riboflavin의 세가지 물질을 pH 6의 buffer 용액, 섭씨 20도의조건에서 MCM-41에 흡착시켜 본 결과 흡착 속도는 생화학 물질의 분자 크기에 의존성을 나타내어, 가장 작은 riboflavin이 가장 빠르게 흡착이 진행되었다 [1]. 3차원 세공 구조의 MCM-48이 1차원 세공 구조의 MCM-41 보다 세공 내부로의 물질 유입이 쉽고, 일부 세공이 흡착된 물질로 인하여 세공이 좁아져서 후속적인 물질 유입이 어렵게 되면 다른 세공 방향으로 물질이 유입될 수 있는 장점이 있겠지만, 세공의 크기가 다소 작은 MCM-48은 세공경이 보다 큰 MCM-41 보다 흡착된 양이 상당히 적게 측정되었다. 따라서 메조물질의 세공 크기가 세공 배열보다 중요한 분리 인자인 것으로 판단된다. 한편 이러한 생화학 물질의 메조물질 상 흡/탈착은 가역적으로 진행되지 않기 때문에, 흡착된 생화학 물질의 회수 및 재활용의 경우에는 어려움이 예상된다. 한편 메조물질의 표면을 hexamethyldisilazane으로 코팅한 결과 흡착된 lysozyme의 양이 2배 정도로 증가하였고, 수분에 대한 메조 물질의 구조적 안정성도 크게 개선되었다고 하였다[2].

효소는 높은 촉매 활성과 선택도를 가지고 있기 때문에 이를 적당한 고체 지지체에 고정화하여 물리적으로나 화학적으로 쉽게 분리하려는 노력이 시도되고 있고 다양한 효소를 고정화 하여 사용하고 있다. 대부분의 고체 지지체들은 그 외부표면의 유기 그룹으로 인해 효소를 고정화 하는데 용이하고, 강한 물리적, 화학적인 환경을 제공한다. 일반적으로 효소는 외부의 온도에 매우 민감하고 활성에 있어 큰 차이를 보인다. 이러한 특성을 지닌 효소를 다양한 고체 지지체에 고정화 시켜서 사용하면 열적 안정성이 증가되고 활성이 그대로 유지된다[3]. 특히 효소는 pH에 대해서 그 활성이 매우 크게 변하기 때문에 특정 효소의 pH의 영향에 대해 많은 연구가 진행되고 있다[4,5]. 효소를 고정화 시키기 위해서는 효소가 세공 안에 고정화되는데 충분한 공간이 있어야 한다. 고체 지지체의 세공의 크기는 buffer ions, substrate, product, 효소 등이 이동하는데 영향을 주지 않아야 하고 동시에 고정화된 효소가 밖으로 쉽게 빠져 나오지 않도록 크기가 적당해야 한다. 대부분의 효소의 크기는 30-60 Å이므로 메조포어 분자체는 효소를 고정화하는 지지체로 사용하는데 매우 적합하다고 할 수 있다.

이제까지 효소를 고정화시킨 지지체는 폴리머[6], sol-gel matrix[7], 메조포어 분자체[8-11]등이 보고되었다. 일반적으로 효소를 고정화 하는 방법에는 고체 지지체의 표면에

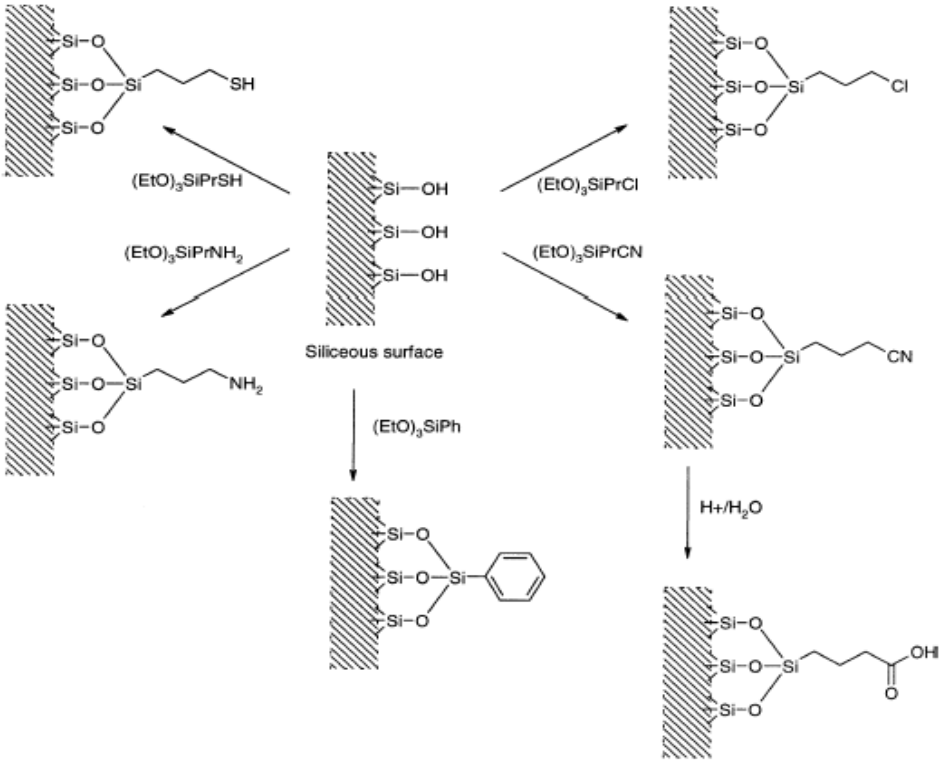
있는 OH그룹에 효소를 물리적으로 흡착시키는 방법[11], 졸-겔 실리카의 내부에 encapsulation 시키는 방법[12], 적당한 유기그룹을 고체 지지체 표면에 붙이고 여기에 효소의 말단에 있는 유기그룹과 공유결합을 시키는 방법[13] 등이 있다.

효소를 고체 지지체에 물리적으로 흡착시키는 원리는 정전기적인 인력을 이용한다. 실리카의 isoelectric point는 pH 2이고 2보다 더 큰 환경에서 실리카는 (-)를 띤다. 보통 효소의 경우에는 고정화 시키는 조건의 pH를 효소의 isoelectric point 보다 작게하여 효소가 (+)를 띠도록 한다. 이러한 효소와 지지체 사이의 정전기적 인력에 의해 물리적으로 흡착이 일어나고 고정화된다. 예를 들어, 효소를 고정화 시키는데 많이 사용하는 cytochrome c는 isoelectric point 가 pH 10을 갖는다[14]. 이 효소는 중성의 조건에서 (+)를 띠게 되고 따라서 (-)를 띠는 실리카 표면에 고정화될 수 있다. 효소를 MCM-41, MCM-48, SBA-15, swelling agent를 첨가한 SBA-15과 같은 메조포어 분자체에 물리적으로 흡착시켜서 효소의 활성을 알아보는 실험에서 대부분의 효소가 메조 포어 분자체에 흡착되었다[11]. 그러나 효소가 외부로 용출되는 정도를 측정하는 실험에서 40-70%의 효소가 용출되는 것을 알 수 있었다. 이는 물리적으로 흡착된 효소는 고체지지체와 약한 결합을 하고 있어서 고정화 과정후의 용출 실험에서 또는 반응에 응용되는 과정에서 쉽게 빠져 나오기 때문이다. 큰 세공을 가진 SBA-15(56Å, 100Å)의 경우에는 비교적 용출되는 양이 적었으나 비교적 세공이 작은 MCM-41(35Å), MCM-48(24Å)의 경우에는 많은 양의 효소가 용출되었고 더 낮은 촉매활성을 나타냈다. 이러한 현상은 24Å, 35Å의 비교적 작은 세공의 크기를 갖는 경우에는 효소가 고체 지지체의 내부로 들어가지 못하고 외부에 흡착되기 때문에 쉽게 빠져 나오기 때문이고 따라서 세공크기가 효소의 흡착에 있어 매우 중요한 요소라는 것을 알 수 있다[3]. 한편 비교 실험의 결과에 의하면 40Å의 세공크기를 가진 silica gel에 흡착시킨 효소의 활성이 SBA-15에 의한 것보다 더 높게 관찰되었다. 이것은 silica gel의 경우 외부 표면적이 전체 면적에 대하여 차지하는 비율이 메조포어 분자체 보다 상당히 높으며, 반응 기질에 쉽게 노출된 이 외부 표면적에 흡착된 효소의 양이 많아서 반응에 효과적으로 참여한 결과로 해석하였다.

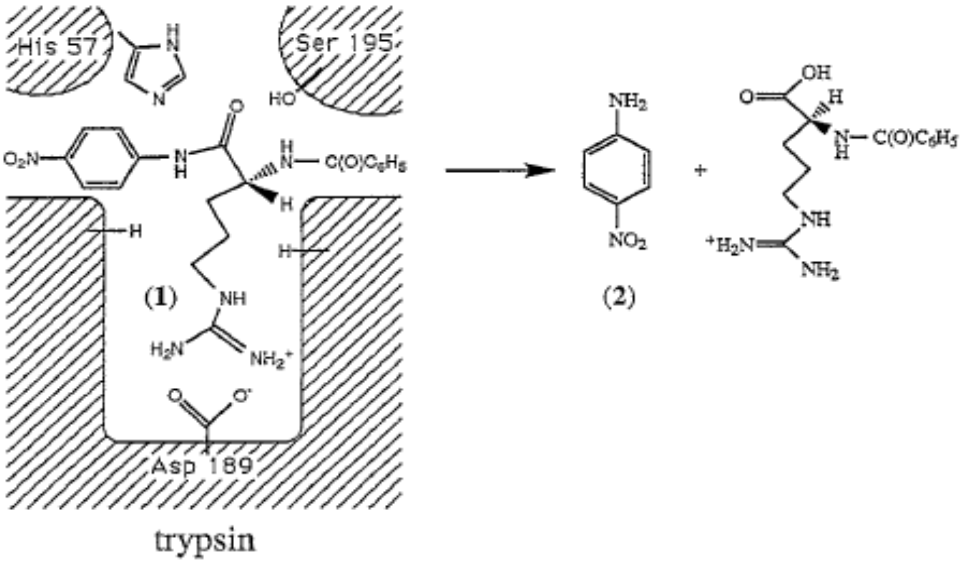
졸-겔 방법에 의해 효소를 졸-겔 구조 안에 고정화하고 이들의 활성을 측정하는 연구도 많이 진행되었다[15]. 이 방법은 효소가 존재하는 상태에서 이 주위로 졸-겔의 무기 지지체 연결 구조가 형성되고 효소가 'cage'안에 존재하기 때문에 효소가 엉기거나 펼쳐지는 것이 보호되고 효소의 고정화에서 가장 큰 문제인 용출되는 현상을 줄일 수 있다는 장점이 있다. 또한 졸-겔에 의해서 형성되는 실리카 구조는 화학적으로 매우 안정하고 친수성이며 합성하는데 비용이 적게 든다. 따라서 여기에 고정화된 효소는 유기 폴리머 등에 고정화된 것과 비교하여 더 높은 기계적 강도와 열적 안정성, 세균에 의해 보호되는 장점이 있다. 일반적인 졸-겔 방법은 합성시에 전구체로서 TMOS(tetramethyl orthosilicate) 또는 TEOS(tetra ethyl orthosilicate)를 사용한다[16,17]. 한편 이러한 실리카 전구체를 사용하여 효소를 고정화 시키는 졸-겔 방법의 과정 중 전구체의 condensation에 의해 생성되는 메탄올이나 에탄올은 효소의 활성을 방해하는 역할을 한다. 따라서 실리카 원으로서

sodium silicate를 사용하여 합성하면 메탄올이나 에탄올이 전혀 생성되지 않는다[15]. Sodium silicate를 전구체로 하여 만든 졸-겔 실리카는 120Å-400Å의 세공 크기를 가지고 있어 완충 용액 이온과 반응물과 효소 등이 확산되는데 큰 영향을 주지 않는다. 이러한 지지체에 horseradish peroxidase(HRP)와 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)를 중성의 완충용액에서 고정화시키고 졸-겔 구조의 지지체로서의 효과를 측정하는데 사용하였다. 이 두 가지의 효소들은 거의 100%가 고정되었고 오랜 시간동안 용출되지 않았다. 고정화된 효소의 활성을 측정하는 실험에서 HRP는 ABTS(azinobis-ethylbenz-thiazoline-sulfonic acid)를 산화시키는데 free enzyme의 73%에 해당하는 활성을 보였고, G6PDH는 glucose-6-phosphate를 산화시키는 경우 36%의 활성을 보여 이전의 졸-겔에 의한 방법에 비해 매우 뛰어난 활성을 보였다. 고정화된 효소의 최적 pH를 알아내기 위해 2에서 9까지 측정한 pH실험에서 HRP는 free enzyme인 경우에 pH 4에서 가장 큰 활성이 나타났지만, 졸-겔의 구조 내에 고정화된 효소는 pH 5에서 가장 큰 활성을 나타냈다. 즉 효소가 고정화된 후에 반응의 최적 pH가 변하는 것이 관찰되었다. 또한 졸-겔 구조 안에 고정화된 효소에 대해 수행된 용출실험에서 pH 7, 상온의 조건에서 30일이 지난 다음에도 효소가 거의 용출되지 않는 것을 확인하였다. 이러한 졸-겔 방법에 의한 효소의 고정화는 졸-겔 구조 안에 효소가 있어서 용출되는 현상이 거의 일어나지 않는 장점이 있으나, 대부분의 졸-겔 물질들은 넓은 세공분포도를 갖으며 일부 작은 세공 크기로 인해 효소 또는 큰 분자 기질의 확산에 많은 영향을 끼치고, 효소의 크기에 세공 크기를 조절할 수 없어서 다양하게 사용할 수 없고, 졸-겔 물질이 제조될 때 적용되는 가혹한 합성 조건과 reagent로 인하여 효소가 denaturation현상이 발생되기 쉽다는 단점도 존재한다[18].

메조포어 분자체의 경우에는 20-100Å 범위로 조절이 가능한 규칙적인 세공, 넓은 표면적, hydrophilic 또는 hydrophobic 성질을 가지고 있고 open-pore 구조를 가지고 있기 때문에 졸-겔에 의한 고정화보다 유리한 점이 있다. 또한 이들의 표면특성으로 인해 다양한 유기그룹의 기능화가 가능하고, 정전기적인 인력 또는 반발력을 이용하여 단백질을 흡착시키거나 탈착시키기가 용이하다. 이러한 메조포어 분자체의 장점은 효소를 고정화하여 biosensor[19], biocatalytic[20], biomolecule separation systems[21]등의 응용에 유리한 점을 제공한다. 특히 mesitylene과 같은 swelling agent를 사용하여 세공을 효소의 크기에 맞게 조절할 수 있기 때문에 크기가 큰 효소의 고정화에도 사용할 수 있는 장점이 있다. 최근에는 고체 지지체와 효소의 공유결합에 의한 고정화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, trypsin 고정화에는 3-mercaptopropyltrimethoxysilane 과 같이 SH 그룹을 함유한 유기 실란을 메조 물질에 부착시킨 다음 진행하면 효과적이다. Yiu 등[13]은 Scheme 1과 같은 다양한 유기그룹을 메조포어 물질의 표면에 기능화하여 trypsin을 고정화하였는데, trypsin의 말단에 있는 S-S그룹과 공유결합을 할 수 있는 기능화 시킨 메조 물질상의 SH 그룹이 더 많은 양의 효소와 결합하고 free enzyme의 활성에 근접한 결과를 나타냈다. 특히 직접적으로 SH 그룹을 도입시키는 방법이 후 처리에 의한 grafting 방법보다, 얻어진 물질의 세공이 균일하지 못하고 구조적으로 안정성이 떨어지지만, 더 많은 양의 유



Scheme 1. Preparation of post-synthesis functionalised SBA-15 materials.[13]



Scheme 2. Reaction scheme for the amide hydrolysis of BAPNA (1) by the protease trypsin. The cleavage of the amide bond in BAPNA to produce p-nitroaniline (2) takes place by mediation of a serine side-chain(Ser195) and a histidine group (His57). An aspartic acid residue(Asp189) located at the bottom of the substate binding pocket is responsible for the selectivity of trypsin towards substrates with positively charged side-chains[14].

기그룹을 메조물질에 도입할 수 있고, 결과적으로 더 높은 양의 효소와 결합할 수 있으며,

용출되는 효소의 양도 훨씬 적게 나타난다. 직접적인 방법으로 유기 그룹을 도입하게 되면, 실리카 구조 상에서 이들의 결합이 이루어 지므로, SH 그룹의 구조적 안정성이 증가하게 되기 때문이다. 이렇게 고정화 시킨 Trypsin 효소를 이용한 N-α-benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide(BAPNA)의 hydrolysis 반응을 Scheme 2에 표시하였다. 이 결과에서 초기 반응활성이 free enzyme의 84%이고 상대적으로 적은 양의 효소가 도입되었는데(0.2% w/w) 이것은 세공의 크기가 (<6nm) 효소나 반응 기질의 분자 크기에 비하여 충분하지 않기 때문이라고 해석하였다. 이러한 문제를 해결하기 위하여, 최근 발표된 논문에서 Lei 등[22]은 큰 세공을 가진 메조 포어 분자체에 2%의 HOOC-CH_2-CH_2를 기능화 시킨 후 여기에 효소를 고정화하여 더 많은 양의 효소를 도입하고 결과적으로 높은 촉매활성을 가지게 하는데 성공하였다. 이들은 계면활성제로 non-ionic block copolymer를 사용하였고, 30nm의 세공 크기와 533m^2/g의 표면적을 나타내는 메조물질[23]을 합성하여 지지체로 사용하였다. 이러한 지지체에 tris-(methoxy)carboxylethylsilane 과 tris-(methoxy)aminopropylsilane을 유기 그룹으로 도입하였고 이 물질들의 전기적, 수소 결합, 친수성인 특성을 이용하여 효소를 고정화하였다. 그 결과 2%의 HOOC 그룹을 기능화시킨 물질에 3.8%(w/w)의 효소를 고정화 시킬 수 있었고 이는 이전까지의 효소의 고정화에 있어서 가장 큰 도입량을 보였다. 20%의 HOOC 그룹도 위와 같은 지지체에 도입되었는데 이 실험에서 도입된 양과 촉매 활성은 2% 때보다 감소하였다. 이러한 사실은 기능화된 유기그룹이 서로 인접한 곳에 있게 되고 따라서 실리카 표면에 효과적으로 효소가 고정화되지 못하기 때문에 촉매활성으로 작용하는 부분이 감소하기 때문이다. 메조포어 분자체의 지지체로서의 기능을 비교하기 위하여 세공이 비교적 불규칙적이고 넓은 세공 분포도를 가진 NPS(normal porous silica)를 사용하였는데 HOOC-NPS는 매우 낮은 도입량과 활성이 나타나 메조포어 분자체가 효소의 고정화에 보다 우수한 지지체로서의 역할을 한다는 것이 증명되었다.

Kirel 등[19]은 메조 포어 분자체를 채널의 구조에 따라 분류하여 각각의 구조에 효소를 고정화하고 이들의 도입된 양과 효소의 활성을 비교하였다. 지지체로는 MCM-48, Nb-TMS4, SBA-15를 사용하였고 여기에 모양은 구형이고 비교적 작은 크기(3nm)를 가진 cytochrome c를 고정화하였다. MCM-48은 3차원의 채널을 가지고 있어 모든 방면에서 효소 및 기질의 접근이 매우 쉬운 구조를 가지고 있고 따라서 촉매의 지지체로서 많이 사용되고 있다[24,25]. Nb-TMS4 (Niobium Transition Metal Oxide Molecular Sieves)[26]은 octadecylamine을 계면활성제로 사용하고 niobium (V) ethoxide를 전구체로 사용하여 합성하였다. Nb-TMS4는 2차원 구조를 가지고 있으며 전이금속과 효소와의 상호작용을 통하여 효소의 고정화에 도움을 줄 수 있는 장점이 있기는 하지만, 계면활성제가 추출하는 과정에서 단지 25%만이 제거 되기 때문에 세공의 크기와 표면적(<500m^2/g)이 매우 작은 단점이 있다. SBA-15은 1차원의 비교적 큰 세공 구조를 가지고 있으며 매우 두꺼운 벽(31-64Å)을 가지고 있다[27]. Cytochrome c를 pH 7인 조건에서 흡착시킨 결과 3차원의 구조를 가진 MCM-48이 가장 많은 흡착량을 보였고 가장 적합한 지지체로 판명되었다.

메조 포어 분자체인 FSM-16, MCM-41, SBA-15에 horseradish peroxidase(HRP)를 흡

착시키고 이 물질을 유기 용매에서의 효소 활성과 열적 안정성에 대해 연구한 결과가 보고되었다[3,28].

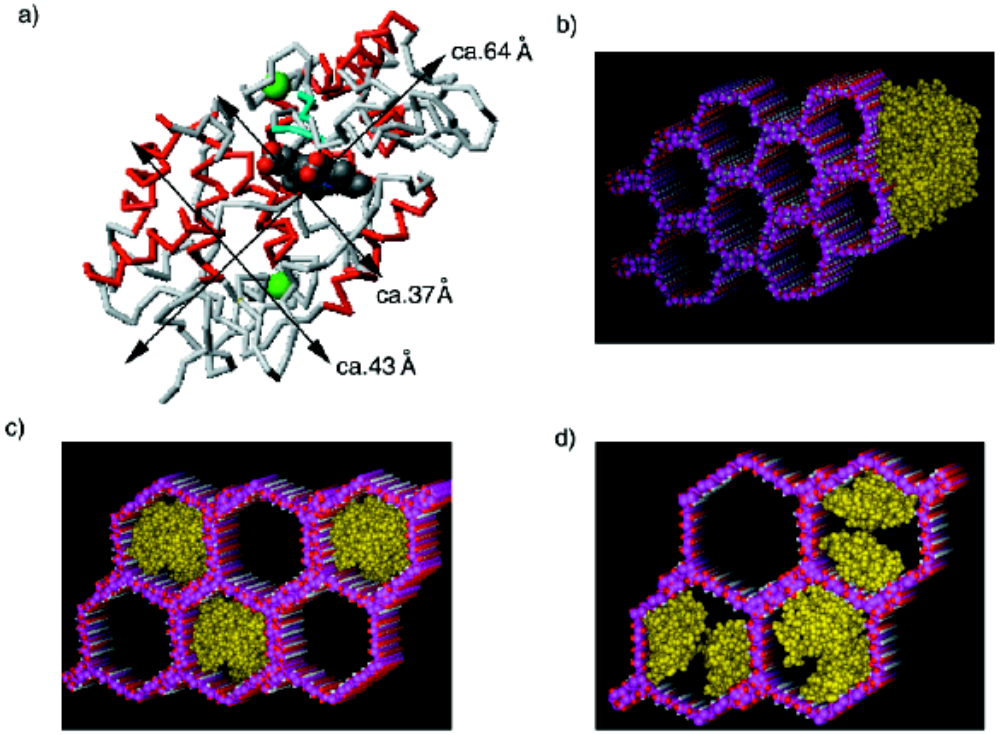


Fig. 1. Structual model of an HRP molecule (a) and image models of immobilized HRP in FSM-16 with various sizes using a computer schematic model. The FSM-16 model was constructed in accordance with the folded sheet formation mechanism. The pore diameters of the FSM-16 model selected were 30, 50, and 90Å for model (b)-(d), respectively.[3]

각각의 물질은 1,3,5-triisopropylbenzene(TIPB)를 swelling agent로 사용하여 세공크기를 확장[29,30] 하여 다양한 세공 크기를 가진 지지체를 제조하고 도입된 효소의 양 및 촉매 활성을 측정하였다. FSM-16은 세공을 확장하여 27Å, 51Å, 89Å을 세공 크기를 갖는 물질을 합성하였고 여기에 HRP를 흡착시켰다. 각각 물질들의 세공의 구조와, HRP의 구조가 Fig. 1.에 나와 있다. 이 물질들에 대한 세공 크기 분포도에서 51Å, 89Å의 지지체에서는 효소 고정화 후에 세공 크기가 크게 감소한 것을 확인할 수 있었으나, 27Å의 세공 크기 분포도에서 HRP의 흡착 전후에 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어볼 때 27Å의 세공 크기는 효소의 크기보다 더 작아 외부 표면적에만 효소가 흡착된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 경향은 MCM-41의 경우에도 비슷하게 나타난다. 그러나 세공의 크기가 50Å 이상의 세공 크기를 가지고 있는 물질에서는 거의 대부분의 효소가 각각의 지지체에 고정화 되었고 특히, FSM-16과 MCM-41은 SBA-15보다 더 많은 양의 효소가 흡착되는 것을 알 수 있었다. 예를 들어, 비슷한 세공 크기를 가진 FSM-16과 SBA-15에서 FSM-16은 183, 198mg/g 의 흡착량을 보인 반면 SBA-15은 단지 24, 28mg/g의 흡착량을

보였다. 이 물질들의 표면의 성격 차이를 조사하기 위하여 양이온 안료와 음이온 안료를 흡착시켜 본 결과 우선 음이온의 안료보다 2-3배 더 많은 양의 양이온 안료가 흡착되는 것을 알 수 있었다. 이것은 고체 지지체의 표면이 (-)를 띠고 있기 때문이다. 또한 음이온의 안료는 3개의 물질 모두 거의 비슷한 양을 보였으나 양이온의 안료의 경우에는 FSM-16과 MCM-41이 SBA-15보다 더 많은 양의 흡착량을 보였다. 이러한 이유는 전자의 경우에는 양이온의 계면활성제를 사용하여 합성하지만 후자의 경우에는 non-ionic block copolymer를 사용하기 때문이다. 따라서 지지체와 효소 또는 단백질과의 정전기적 인력이 이러한 물질들을 흡착하는데 매우 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 위의 각각의 지지체에 대하여 유기 용매 하에서의 촉매 활성을 측정한 실험에서도 역시 50Å이상의 세공 크기를 가진 FSM-16, MCM-41에 HRP를 고정화시킨 것이 가장 좋은 활성을 보였다. 또한 이것의 열적 안정성을 측정하기 위하여 70℃에서 30, 60, 90, 120분에 걸쳐 phenol의 polymerization에 의해 측정한 실험에서도 51Å의 세공 크기를 가진 FSM-16이 가장 좋은 촉매 활성을 유지하고 있었다.

이밖에도 중요한 의약품인 penicillin 합성과정 중 penicillin G의 가수분해에 사용되는 penicillin acylase를 (PA)를 무기 지지체인 메조 포어 분자체에 고정화하여 사용하는 연구가 발표되었다[31]. 이제까지의 연구에서 PA는 흡착, crosslinking, 공유결합 등의 여러가지 방법에 의해 polymeric resin, 폴리머 유도체, 유기 겔 또는 유기 섬유 같은 지지체에 고정화하여 사용하였다[32,33]. 이렇게 합성한 물질들은 재사용하기가 어렵고 표면에 있는 유기 그룹을 제어하기가 어려운 단점이 있었다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 세공이 크고 규칙적이며 넓은 표면적을 가지고 표면에 OH그룹이 존재하여 효소와의 상호작용이 매우 쉬운 메조 포어 분자체를 사용하여 보다 쉽게 효소를 도입할 수 있었고 더 높은 활성을 얻을 수 있었다. 이 연구에서는 PA를 MCM-41에 흡착시킨 물질과 crosslinking agent로 glutaraldehyde를 사용하여 PA를 crosslinking시킨 물질의 효소 활성을 비교하였는데 PA를 흡착시킨 물질이 5배 더 높은 활성을 나타내었다.

이상에서 살펴본 것과 같이 메조포어 분자체는 효소를 고정화하여 온화한 조건의 액상 반응에 응용하고 이를 재사용하는데 매우 유용하다. 효소를 고정화하여 사용하는데 있어 중요한 요소는 반응 기질 및 생성물, buffer ions, 효소 등이 이동하는데 충분한 세공크기가 중요하며, 지지체가 가지고 있는 세공의 표면 특성과 구조도 고정화의 효율에 영향을 미칠 수 있다. 효소의 용출을 억제하기 위해서는 메조포어 물질 상에 적절한 유기 그룹의 기능화를 수행하고 효소를 공유결합으로 부착하는 방법이 바람직 하다고 생각된다. 효소의 고정화가 이루어진 다음에는 효소가 가장 높은 활성을 나타내는 pH 와 반응 온도 등을 반응 조건의 최적화를 통하여 찾아내고 반응에 이용함이 필요하다.

참고 문헌

1. J.M.Kisler, A.Dahler, G.W.Stevens, A.J.O'Connor, Micropor. Mesopor. Mater., 44-45,769 (2001).

2. J.M.Kisler, G.W.Stevens, A.J.O'Connor, Mater.Phys.Mech. 4,89 (2001).
3. H.Takahashi, B.Li, T.sasaki, C.Miyazaki, T.Kajino, S.Inagaki, Chem. Mater., 12,3301 (2000).
4. Y.J.Han, J.T.Watson, G.D.Stucky and A.Butler, J. Mol. Catal. B:Enzymatic, 17,1 (2002).
5. M.Huckel, H.J.Wirth, M.T.W.Hearn, J. Biochem. Biophys. Methods., 31,165 (1996).
6. Z.Yang, A.Mesiano, S.Venkatasubramanian, S.H.Gross, J.M.Harris, A.J.Russell, J. Am. Chem. Soc., 117,4843 (1995).
7. B.C.Dave, B.Dunn, J.S.Valentine, J.I.Zink, Anal. Chem., 66,1120 (1994).
8. A.M.Kibanov, Science, 219,722 (1983).
9. A.Corma, Q.B.Kan, M.T.Navarro, J.Perez -pariente, F.Rey, Chem. Mater., 9,2499 (1997).
10. S.Inagaki, Y.Fukushima, K.Kuroda, Chem. Commun., 680 (1993).
11. H.P.Yiu, P.A.Wright, N.P.Botting, Micropor. Mesopor. Mater., 44 -45,763 (2001).
12. S.Shtelzer, S.Rappoport, D.Avnir, M.Ottolenghi, S.Braun, Biotech. Appl. Biochem., 15,227 (1992).
13. H.P.Yiu, P.A.Wright and N.P.Botting, J. Mol. Catal. B:Enzymatic, 15,81 (2001).
14. J.F.Diaz, K.J.Balkus, J. Mol. Catal B:Enzymatic 2,115 (1996).
15. R.B.Bhatia, C.J.Brinker, A.K.Gupta, A.K.Singh, Chem. Mater., 12,2434 (2000).
16. S.A.Yamanaka, F.Nishida, L.M.Ellerby, C.R.Nishida, B.S.Dunn, J.S.Valentine, J.I.Zink, Chem. Mater., 4,495 (1992).
17. L.M.Ellerby, C.R.Nishida, F.Nishida, S.A.Yamanaka, B.S.Dunn, J.S.Valentine, J.F.Zink, Science, 255,1113 (1992).
18. I.Gill, A.Ballesters, J. Am. Chem. Soc., 120,8587 (1998).
19. L.W.Kriel, V.L.Jimenez, K.J.Balkus, J. Mol. Catal. B:Enzymatic 10,453 (2000).
20. J.Deere, E.Magner, J.G.Wall, B.K.Hodnett, Chem. Commun., 465 (2001).
21. Y.J.Han, G.D.Stucky, A.Butler, J. Am. Chem. Soc., 121,9897 (1999).
22. C.H.Lei, Y.S.Shin, J.Liu, E.J.Ackeman, J. Am. Chem. Soc., 124,11242 (2002).
23. D.Zhao, J.Feng, Q.Huo, N.Melosh, G.H.Fredrickson, B.F.Chmelka, G.D.Stucky, Science, 279,548 (1998).
24. A.Corma, Q.Dan, F.J.Rey, Chem. Commun., 579 (1998).
25. A.A,.Romero, M.D.Alba, W.Zhou, J.Klimowski, J. Phys. Chem., B 102,5292 (1997).
26. D.M.Antonelli, A.Nakahira, J.Y.Ying, Inorg. Chem., 35,3126 (1996).
27. D.Zhao, Q.Huo, J.Feng, B.F.Chmelka, G.D.Stucky, J. Am. Chem. Soc., 120,6024

(1998).
28. H.Takahashi, B.Li, T.sasaki, C.Miyazaki, T.Kajino, S.Inagaki, Micropor. Mesopor. Mater., 44-45,755 (2001).
29. J.S.Beck, J.C.Vartuli, W.J.Roth, M.E.Leonowicz, C.T.Kresge, K.D.Schmitt, C.T.Chu, D.H.Dlsou, E.W.Sheppard, S.B.McCullen, J.L.Schlenker, J. Am. Chem. Soc., 114,10834 (1992).
30. S.Inagaki, A.Koiwai, N.Suzuki, Y.Fukushima, K.Kuroda, Bull. Chem. Soc. Jpn., 69,1449 (1996).
31. J.He, X.Li, D.G.Evans, X.Duan, C.Li, J. mol. Catal. B:Enzymatic, 11,45 (2000).
32. F.Ishimura, H.Seijo, J.Fermen, Bioeng., 71(2),140 (1991).
33. K.K.Yashi, B.Kageyama, S.Yagi, T.Sonoyama, J.Fermen, Bioeng., 74(6),410 (1992).