

Alginate-enclosed Microspheres를 이용한 메틸 프루토시드의 연속생산공정

허 주 형 · †김 해 성

명지대학교 공과대학 화학공학과

Continuous Production Process of Methyl Fructoside Using Alginate-enclosed Microspheres

Joo-Hyung Heo and Hae-Sung Kim[†]

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Myong Ji University,
Young-in 120-178, Korea

ABSTRACT

Methyl fructoside was continuously produced in suspended bed enzyme reactor using alginate-enclosed microspheres biocatalyst which was developed for enzymatic synthesis of methyl fructoside. And the continuous operating conditions were optimized with reactor simulation in order to demonstrate a feasibility of commercialization of the continuous enzymatic production process development. The yield and productivity of methyl fructoside were as high as 47.1% and 2g/ℓ-hr, respectively. The optimum operating conditions were pH 4.8, 30% (v/v) of methanol content and 2U/ml of enzyme activity when the initial concentration of sucrose is 0.291mol/ℓ at the reaction temperature of 25°C.

서 론

당단백질 (glycoprotein)과 당지질 (glycolipid)이 다양한 기능성과 생활성을 나타내는 것은 당분자들이 결합할 때에 입체 특이성과 위치 특이성에 의해서 그 특성에 따라 고유한 3차원 배열 구조 (conformational structure)를 형성하기 때문이라고 밝혀져 있으며 (1), 천연물질에 다양한 기능성과 생활성을 부여하거나 기능성 신물질 혹은 생활성 물질을 합성하기 위해서는 적절한 결합구조를 가진 배당체 (glycoside)를 이용하여 glycosylation하여야 한다. 배당체를 이용하여 필요로 하는 결합구조를 형성시키거나 그 배열 구조를 조절함으로써 신물질을 창출하고자

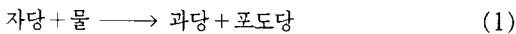
하는 정밀화학, 신소재, 약리학, 의학 등의 연구 분야에서는 최근 많은 관심과 함께 배당체에 관한 연구가 계속되고 있으며 (2-4), 머지않아 상업적으로 다양한 배당체를 생산해야 할 것으로 기대된다.

배당체의 합성법은 neighbouring group assisted procedure, in situ anomerization procedure, heterogeneous catalyst procedure 등의 화학적인 합성법 (5)으로 시행되어 왔으나 관능기 보호 (functional group protection), 활성화 (activation), 탈보호 (deprotection)로 이루어지는 다단계 반응과정을 거쳐야 하므로 수율과 생산성이 낮고 필요한 입체 구조를 갖는 아노머 (anomer)를 얻기 위해서는 입체 선택성을 조절하여야 하지만 근본적으로는 해결할 수 없어서 수율과 생산성이 높은 연속생산 기술로 발전되지 못하였다. 한편, 생물반응에 의한 생

† Corresponding Author

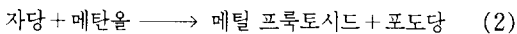
변환공정(biotransformation process)은 효소반응 기술의 발전과 함께 위치 특이성과 입체 특이성을 다양하게 활용하여 반응단계를 단순화할 수 있고 각 단계마다 문제가 되는 분리 정제 비용을 절감할 수 있으므로 배당체의 유망한 합성법으로 평가되고 있다. 그러나, 생변환공정에 의한 배당체의 생산 기술은 효소 비용의 비중이 크고, 실험실 규모의 연구 수준에 머물러 있으므로 상업화할 수 있는 연속공정으로는 실용화되지 못하고 있다. 배당체의 효소적 합성은 Selisko 등(6), Straathof 등(7) 및 Hirai 등(8) 그 밖의 많은 연구 결과가 보고되고 있으나, Selisko 등(6)의 경우 높은 효소의 농도와 고농도의 기질을 사용함에도 불구하고 효소를 고정화시키지 않고 반응을 수행하여 효소의 불활성화로 인해 그 전환율과 수율을 크게 증가시키지 못하였으며, Vulfson 등(9)의 결과에서는 효소를 고정화하여 사용하였으나, 적절한 담체의 개발없이 상업적으로 시판되고 있는 기존의 담체를 사용함으로써 역시 그 수율과 농도는 실험실 수준에 머물렀다. 기타 Chahid 등(3), Stevenson 등(2), 및 Beecher 등(10)은 여러 방법으로 배당체의 수율과 농도를 증가시키려 하였으나 여전히 실험실 수준을 넘지 못하고 있을 뿐만 아니라 현재까지 연속생산공정이 가능한 조업조건 최적화에 관한 체계적인 연구 결과는 제시되어 있지 못한 실정이다. 따라서 경제적이고 효율적인 연속생산공정으로 실용화하기 위해서는 효소 촉매를 효과적으로 이용하는 신촉매 기술이 개발되어야 하고 배당체의 수율과 생산성을 획기적으로 높일 수 있는 방안이 제시되어야 하므로 효소 반응 기술에 관한 체계적인 연구를 필요로 하고 있다. 그러므로 본 연구에서는 이와 같은 문제점에 관한 해결 방안을 제시하고자 자당 수용액과 메탄올 수용액을 전화당 효소와 함께 반응시키고, 가수분해 반응(hydrolysis)과

전화당효소



알코올 분해반응(alcoholysis)이

전화당효소



동시에 일어나는 효소에 의한 메틸 프루토시드의 합성 반응을 모델 반응으로 선정하여 이에 관한 생산 공정 연구를 수행하면서 alginate-enclosed microspheres를 이용한 고정화 효소 촉매가 메틸 프루토시드의 연속생산공정에 유용한 효소 촉매임을 밝히

고, 고정상(fixed bed), 유동상(fluidized bed), 분산상(suspended bed) 등의 임의의 반응 양식을 수용하면서 특별한 여과장치 없이도 반응물과 쉽게 분리될 수 있으며, 효소가 세균과 곰팡이로부터 차폐되어 멸균시키지 않고도 무균조업이 가능하도록 하였다. 또한, 고정화 전화당 효소 촉매의 주변을 microenvironmental optimization하여 메틸 프루토시드의 수율과 생산성을 높임은 물론, 최적반응 조건의 선정, 반응기 모사에 의한 생산성 극대화 등을 통하여 배당체의 연속생산공정이 상업적으로 실용화될 수 있도록 하였다.

재료 및 방법

Biocatalyst 제조

본 실험에서 사용한 biocatalyst는 alginate-enclosed microspheres 효소 촉매로서, 아크릴 공중합체 라텍스 폴리머(입경 0.3 μ m, 고형분 45wt%, pH 4~5, styrene/acryl ratio 55/45, acrylamide함량 0.3wt%)를 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI, M.W. 40,000~50,000, 30% 수용액, Tokyo Kasei Kogyo)으로 도포하고 글루타르알데히드(glutaraldehyde, 25% 수용액, Merck)로 가교 결합하여 전화당 효소(β -D-fructofuranosidase, EC. 3.2.1.26, Fluka, 140.7U/mg)를 고정화시킨 뒤, 알지네이트(sodium-alginate, Junsei Chemical)로 구상체를 형성하여 제조하였다.

0.1% PEI-붕산염 완충액(borate buffer, pH 8.5) 9ml에 라텍스 폴리머 현탁액 1ml(solid content 45%)를 가해 25 $^{\circ}$ C로 1시간 동안 표면 처리하여 아미노기를 도입시키고 여과 세정한 후, 2.5% 글루타르알데히드-인산염 완충액(phosphate buffer, pH 7) 20ml에 표면 처리된 라텍스 폴리머 450mg을 가해 25 $^{\circ}$ C로 2시간 동안 알데히드가 도입되도록 반응시킨 후 여과 세정하였다. 글루타르알데히드가 결합된 PEI-microspheres와 초산염 완충액(acetate buffer, pH 4.8)에 농도 4mg/ml로 조제한 전화당 효소 수용액 15ml를 4 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 반응시켜 효소를 고정화하였다. 전화당 효소가 고정화된 latex microspheres 2.25g을 1.2% (w/v)의 알지네이트-초산염 완충액(pH 4.8) 500ml에 고르게 분산시키고 기포를 제거한 후 0.1mol/l의 CaCl₂ 수용액에 적하하여 액적을 형성시켜서 입경이 1.49mm의 alginate-enclosed microspheres biocatalyst를 제조하였다.

최적반응 조건

자당과 메탄올 수용액으로부터 메틸 프룩토시드를 연속생산하고 그 생산성을 극대화하기 위해서는 메틸 프룩토시드의 생성 반응이 최적화 되어야 하므로 메탄올 함량, pH, 효소 농도 등의 영향을 검토하였다.

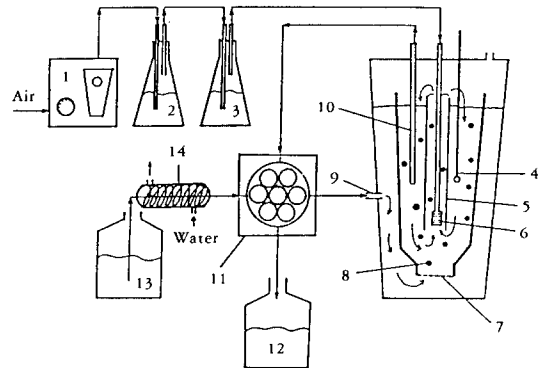
최적 메탄올 함량을 결정하기 위해서는 반응 체적을 기준으로 하여 그 함량을 10~50%(v/v)로 변화시키면서, 25℃, pH 4.8, 자당농도 0.291mol/l, 효소 농도 2U/ml로 유지된 4ml의 시험관 반응기에서 메틸 프룩토시드를 합성하고 0.2mol/l의 Na₂CO₃ 수용액 2ml로 반응을 정지시킨 후, RI검출기(R401, Waters)를 사용하는 HPLC(μ-Bondapak-NH₂ Column, Waters; acetonitrile:water=80:20, 2.5ml/min)로 메틸 프룩토시드의 농도를 측정하고, 그 농도가 최대가 되는 메탄올 함량을 최적 메탄올 함량으로 하였다.

최적 pH를 결정하기 위해서는 앞서 설명한 반응 조건으로 유지된 4ml의 시험관 반응기에서 초산염 완충액으로 pH를 4.2~5.4로 변화시키면서 전화율이 1~2%가 되도록 반응시키고 0.2mol/l의 Na₂CO₃ 수용액으로 정지시킨 후 시료 1ml에 DNS시약 3ml로 발색시켜서 640nm에서 측정된 흡광도로부터 총환원당 농도를 계산하였다. DNS법(11)으로 측정된 총환원당의 농도로부터 효소 활성도를 구하여 최적 pH를 결정하였다.

최적 효소 농도를 결정하기 위해서는 앞서 설명한 반응 조건으로 유지된 4ml의 시험관 반응기에서 효소 농도를 1.5~3.0U/ml로 변화시키면서 1시간마다 20시간 동안 시료를 채취하여 Na₂CO₃ 수용액으로 정지시킨 후 HPLC법으로 메틸 프룩토시드의 농도를 측정하여 최대 농도가 얻어진 효소 농도를 최적 효소 농도로 하였다.

메틸 프룩토시드의 연속생산

Fig. 1은 현탁상 효소반응기(suspended bed enzyme reactor)를 이용하여 메틸 프룩토시드를 연속 생산하기 위한 장치로서, alginate-enclosed microspheres는 draught tube를 통과하는 기포에 의하여 체적 1700ml인 반응기 내를 순환한다. 메탄올 함량 30%(v/v), 자당 농도 0.291mol/l, pH 4.8인 반응물은 열 교환기를 거쳐서 25℃로 유지된 다음에 효소 농도가 2U/ml인 반응기의 하부로 미량 펌프에 의하여 급송되고 기포 흐름에 편승하는 alginate-enclosed microspheres와 함께 반응기 내부를 순환한



- 1. Air pump
- 2. CO₂ trap
- 3. Vapor saturator
- 4. Thermometer
- 5. Draught tube
- 6. Air Distributor
- 7. Mesh screen
- 8. Alginate-enclosed microsphere
- 9. Inlet tube
- 10. Outlet tube
- 11. Microtube pump
- 12. Effluent reservoir
- 13. Influent reservoir
- 14. Heat exchanger

Fig. 1. Suspended bed enzyme reactor for continuous production of methyl fructosider.

다. draught tube를 통과하는 기포에 의한 교반방식은 alginate-enclosed microspheres가 기계적 마찰 손상이 없이 균일하게 분산되도록 하였으며 충분한 혼합 효과를 주었다. 한편, 반응기의 중앙부에 설치한 출구에서는 반응물의 유량과 동일한 유량으로 생성물이 제거되고 1시간마다 시료를 채취하여 HPLC법으로 메틸 프룩토시드, 과당, 포도당 및 자당의 농도를 측정하였다. 이와 같이 측정된 전이농도와 정상 상태 농도들은 반응기 모사에 관한 실험자료로 이용되었으며, 메틸 프룩토시드의 생산성이 최대가 되는 임계공간시간, 최적공간시간이 결정되도록 하였다.

결과 및 고찰

최적 메탄올 함량

자당 수용액과 메탄올 수용액을 전화당 효소와 함께 반응시키면 자당의 가수분해 반응이 일어나면서 메틸 프룩토시드가 생성된다. 메탄올은 반응 매질이면서 반응물이 되므로 메틸 프룩토시드의 생성 반응에 직접적으로 참여하며, 그 함량은 효소의 활성에 미치는 영향이 크므로 반응속도론적 관점에서 최적

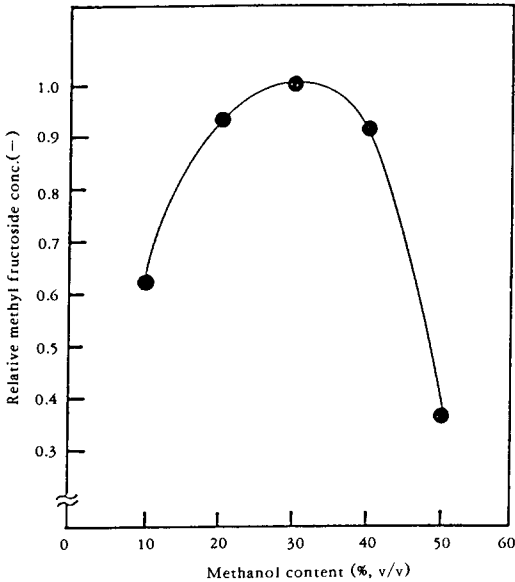


Fig. 2. Effect of methanol content on relative methyl fructoside conc. with 2U/ml of enzyme activity, 0.291mol/l sucrose, pH 4.8 and 25°C.

화 되어야 한다.

일반적으로, 반응 매질의 체적을 기준으로 할 때, 유기상 성분의 함량이 5% 미만이면 효소의 활성도에 미치는 영향은 무시할 수 있으나, 50% 이상이 되면 불활성화가 심화되므로 효소 반응은 진행되지 않는다(12). 이와 같은 경향을 고려하여 메탄올 함량을 10~50% (v/v)로 변화시키면서 메틸 프루토시드의 생성에 미치는 메탄올의 함량의 영향을 밝힘으로서 최적 메탄올 함량을 결정하였다.

Fig. 2에는 자당 농도 0.291mol/l, 효소농도 2U/ml, pH 4.8, 25°C로 유지한 반응기에서 11시간 동안 반응시켜 생성된 메틸 프루토시드의 양을 메탄올 함량이 30%일 때 얻은 최대 농도를 기준으로 하여 상대 농도로서 도시하였다. 그림에 나타난 바와 같이 최적 메탄올 함량은 메틸 프루토시드의 농도가 최대가 되는 함량인 30% (v/v)임을 알 수 있었다. 메탄올은 메틸 프루토시드의 생성반응에 직접 관여하므로 그 함량이 높을수록 메틸 프루토시드의 생성량이 증가할 것으로 예측되지만, 임계 수준 이상의 메탄올 함량에서는 효소의 불활성화가 시작되고 50% 이상의 함량에서는 그 경향이 심화되면서 메틸 프루토시드의 농도가 급격히 감소하였다. 이와 같은

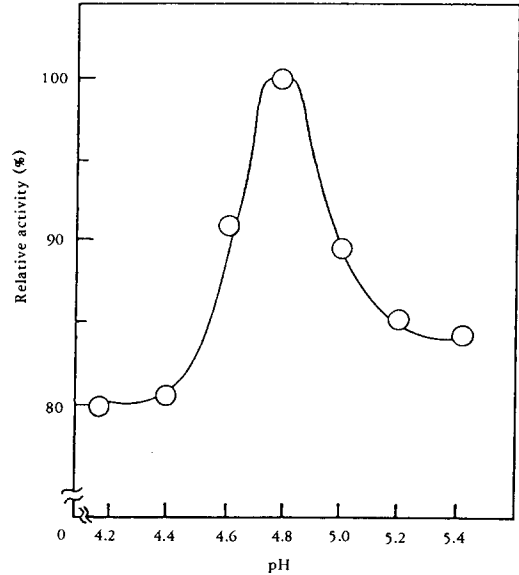


Fig. 3. Effect of pH on relative activity with 2 U/ml of enzyme activity, 0.291mol/l sucrose, 30%(v/v) MeOH and 25°C.

경향으로 판단할 때에 최적 메탄올 함량이 존재함을 알 수 있으며 본 연구에서는 30% (v/v)이었다.

최적 pH

전화당 효소의 활성점이 이미다졸기(imidazolium)와 카르복실기(carboxylate)로 활성화되면, 이 이미다졸기가 자당의 산소 원자를 프로톤화(protonation)한 후에 자당의 탄소 원자와 활성점의 카르복실기가 결합하여 효소-자당 착화합물을 형성한다. 이 활성착화합물에 물분자가 결합하면 포도당과 과당으로 가수분해되고, 메탄올분자가 반응하면 알코올 분해반응에 의하여 메틸 프루토시드와 포도당이 생성된다. 이와 같은 반응 기구(7)에 의하여 진행되는 전화당 효소 반응에서는 우선 효소의 활성점이 이온화하여 이미다졸기와 카르복실기를 포함하여야 하므로, 적절한 pH가 유지되지 않으면 이온화할 수 없으며, 이미다졸기와 카르복실기를 형성할 수 없게 된다. 따라서, pH에 대응하여 활성점의 이온화 수준이 결정되는 효소 반응에서는 완전 활성화되는 최적 pH 범위가 존재하며, 수용상 전화당 효소의 최적 pH는 4.7이라고 보고되어 있다(13). Fig. 3에는 alginate-enclosed microspheres에 고정화된 전화당 효소의 활성도와 30% 메탄올이 함유된 수용

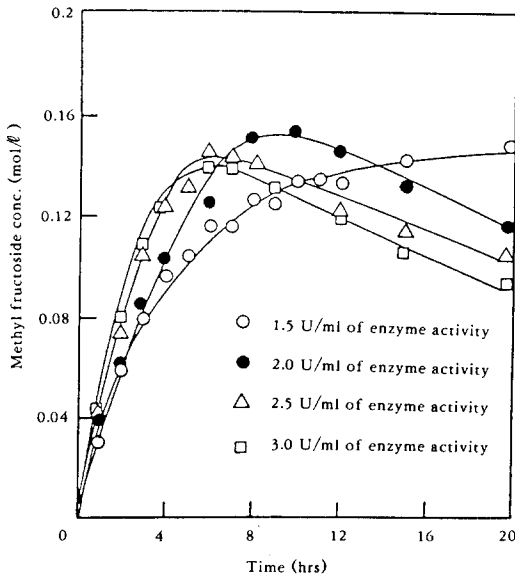


Fig. 4. Effect of enzyme activity on methyl fructoside conc. with 0.291mol/l sucrose, 30% (v/v) MeOH, pH 4.8 and 25°C.

액에서의 pH를 도시하였으며, 최적 pH가 4.8임을 알 수 있었다. alginate-enclosed microspheres에 고정화된 전화당 효소의 최적 pH가 0.1만큼 이동하여 거의 변함이 없다고 판단되며, 30% 메탄올 수용액에서도 앞서 논의한 반응 기구에 의하여 자당의 가수분해 반응과 알코올 분해반응이 일어나면서 메틸 프룩토시드가 생성된다고 추론하였다.

최적 효소 농도

자당 수용액과 메탄올 수용액을 전화당 효소와 함께 반응시키면 자당의 가수분해 반응과 알코올 분해 반응이 일어날 뿐만 아니라 생성물인 메틸 프룩토시드가 전화당 효소의 기질로 작용하여 다음과 같은 반응이 일어나며(7)

전화당효소



알코올 분해반응과 함께 자당에 대하여 직렬 반응 (series reaction)을 이룬다. 따라서, 주어진 효소 농도에 대하여 메틸 프룩토시드의 농도를 시간의 함수로 나타내면 최대농도값을 가지며, 이 최대 메틸 프룩토시드 농도는 효소 농도에 따라서 변화한다.

Fig. 4는 효소 농도를 1.5~3.0U/ml로 변화시키면서 시간의 함수로 메틸 프룩토시드의 농도를 나타내었는데, 효소 농도가 증가할수록 최대 메틸 프룩토시드 농도에 도달하는 반응시간은 감소하는 경향을 보였으나, 메틸 프룩토시드의 최대 농도는 효소 농도 2U/ml인 경우에 가장 큰 값을 나타내었다. 이와 같은 경향과 메틸 프룩토시드의 최고 농도를 기준으로 하여 최적 효소 농도는 2U/ml로 판단하였다.

반응기 모사 및 최적화

Alginate-enclosed microspheres에 고정화된 전화당 효소의 효소 촉매 특성과 생변환 공정에 의한 메틸 프룩토시드의 연속생산에 관하여 그 실용화의 타당성을 검증하기 위하여 시험용 반응기를 제작하고 무균상태에서 운전하였으며, 공정 최적화에 관한 기초 자료를 제시하였다. 이 반응기는 유동상 혹은 현탁상으로 연속 조업할 수 있으며 정상 상태와 전이 거동에 관한 실험자료를 얻을 수 있었다. 자당 농도 0.291mol/l, 효소 농도 2U/ml, pH 4.8 및 25°C로 유지된 반응 조건하에서 자당 농도 S, 포도당 농도 G, 과당 농도 F, 메틸 프룩토시드 농도 M 라 할 때 체적 유량 v, 반응기 체적 V인 현탁상 효소 반응기계에 관하여 몰수지를 취하면 다음과 같다.

$$V \frac{dS}{dt} = v_0(S_0 - S) - V(r_{11} + r_A) \quad (4)$$

$$V \frac{dM}{dt} = -v_0 \cdot M + V \cdot r_A \quad (5)$$

$$V \frac{dG}{dt} = -v_0 \cdot G + V(r_{11} + r_A) \quad (6)$$

$$V \frac{dF}{dt} = -v_0 \cdot F + V \cdot r_{11} \quad (7)$$

$$r_{11} = \frac{V_{m1} \cdot S}{K_{m1} + S} \quad (8)$$

$$r_A = \frac{V_{m2} \cdot S}{K_{m2} + S} \quad (9)$$

메틸 프룩토시드의 가수분해 반응은 반응기의 평균체류시간이 Fig. 4에서 구한 메틸 프룩토시드의 최대농도에 도달하는데 걸리는 반응시간(2U/ml인 경우에는 10~11시간)보다 작으면 반응식 (3)의 영향은 무시할 수 있다고 판단되므로, 자당의 가수분해 반응속도식(8)과 알코올 분해반응 속도식(9)

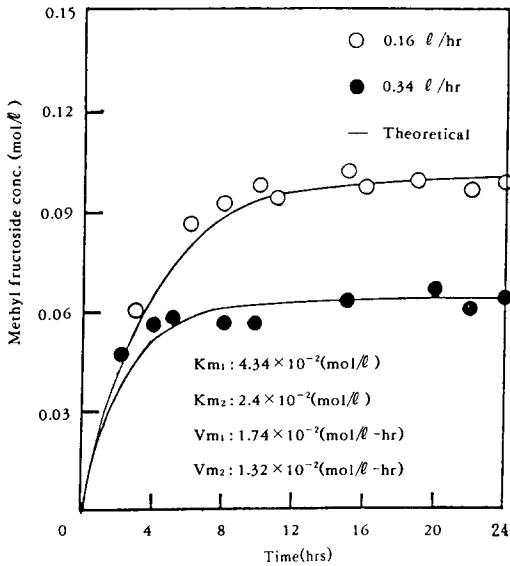


Fig. 5. Comparison of theoretical conc. to experimental conc. of methyl fructoside at different flow rates.

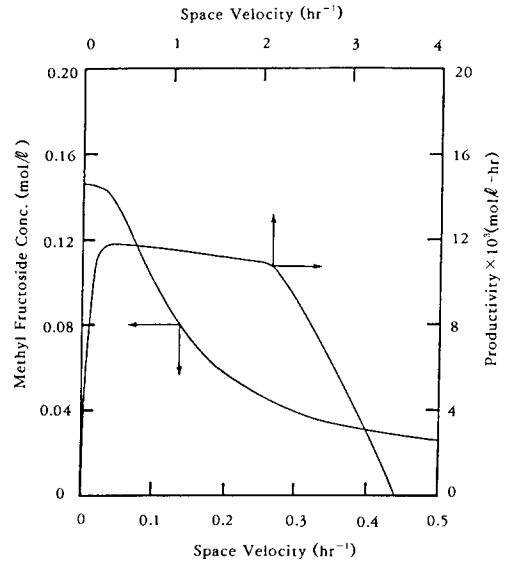


Fig. 7. Dependency of maximum concentration and productivity of methyl fructoside on space velocity.

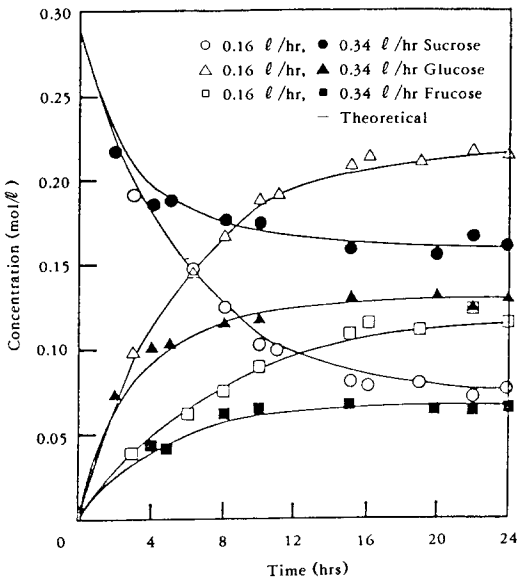


Fig. 6. Comparison of Theoretical conc. to experimental conc. of sucrose, glucose and fructose at different flow rates.

응기에 의한 메틸 프루토시드의 합성 반응에서 초기 속도법으로 결정한 $4.34 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$, $2.40 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ 을 사용하였고, V_{m1} 과 V_{m2} 는 정상 상태에서 측정된 농도와 수치계산한 이론치가 일치되도록 한 결과 $1.74 \times 10^{-2} \text{ mol/l-hr}$, $1.32 \times 10^{-2} \text{ mol/l-hr}$ 이었다. 식 (4), (5), (6), (7)에 식 (8), (9)를 대입하고 수치 적분하면 자당, 포도당, 과당 및 메틸 프루토시드에 관한 이론해를 얻을 수 있으며, Fig. 5, 6에는 유량 0.16 l/hr와 0.34 l/hr인 경우에 측정된 실험치와 이론치를 비교하였다. 본 연구 범위에서는 메틸 프루토시드의 연속공정이 정상 상태뿐만이 아니라 전이 거동 역시 올바르게 묘사될 수 있음을 알 수 있었다.

이와 같은 연구 결과를 토대로 하여 공간 속도에 대응하는 메틸 프루토시드의 정상 상태 농도와 생산성을 반응기 모사법으로 구하여 Fig. 7에 나타내었다. 연속생산공정으로 얻을 수 있는 메틸 프루토시드의 최대 농도는 0.146 mol/l 이며, 임계공간속도는 2.12 hr^{-1} 이었다. 메틸 프루토시드의 생산성은 공간속도가 0.217 hr^{-1} 에서 최대가 되나 메틸 프루토시드의 생산성과 농도를 다같이 고려하여 최적 공간속도는 0.1 hr^{-1} 부근이라고 판단하였으며, 그 생산성은 2 g/l-hr 이고 수율은 47.1% 이었다.

만 고려하였다. K_{m1} 과 K_{m2} 는 김(14)이 회분식 반

요 약

현탁상 효소반응기(suspended bed enzyme reactor)에서 alginate-enclosed microspheres를 이용하여 메틸 프루토시드의 연속생산과 그에 따른 반응기 모사로부터 조업 조건의 최적화를 검토하고 메틸 프루토시드의 연속생산 공정에 관한 체계적인 자료를 제시하여 효소법에 의한 메틸 프루토시드 연속생산의 상업적 실용성을 제고하고자 하였다. 그 결과, 자당농도 0.291mol/l, 반응온도 25℃에서 최적 메탄올 함량은 30% (v/v), 최적 pH는 4.8, 최적 효소 활성도는 2U/ml로 나타났으며, 연속생산으로 얻을 수 있는 메틸 프루토시드의 최대 농도는 28.4g/l이며, 메틸 프루토시드의 생산성과 농도를 함께 고려한 최적 공간 속도는 0.1hr⁻¹ 부근으로 판단되었고, 그때의 생산성은 2g/l-hr이며, 그 수율은 47.1%이었다.

감 사

본 연구는 1993년 특정 기초연구과제의 연구비로 이루어졌으며 연구비를 제공해 주신 한국과학재단에 심심한 감사의 말씀을 드립니다.

참 고 문 헌

1. C. F. Goochee and T. Monica(1990), *Bio/Technol.*, **8**, 421.
2. D. E. Stevensen, R. A. Stanley and R. H. Furneaux(1993), *Biotechnol. and Bioeng.*, **42**, 657.
3. Z. Charhid, D. Montet, M. Pina, F. Bonnot and J. Graille(1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 795.
4. E. N. Vulfson, R. Patel and B. A. Law (1990), *Biotechnol. Lett.*, **12**, 397.
5. H. Paulsen(1986), *New Synthetic Methodology and Functionally Interesting Compounds*, (Z. I. Yoshida, ed), 243, Elsevier, N. Y.
6. B. Selisko, R. Ulbrich and A. Schellenberger (1990), *Biotechnol. & Bioeng.*, **35**, 1006.
7. A. J. J. Straathof, J. P. Vrijenhoef, E. P. A. T. Sprangers, H. V. Bekkum and A. P. G. Kieboom(1988), *J. Carbohydr. Chem.*, **7**, 223.
8. Hirai, S. Rokuhara and S. Shimizu(1986), *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **60**, 713; *Chem. Abstr.*, **105**, 224497(1986).
9. E. V. Vulfson, P. Patel, J. E. Beecher, A. T. Andrews and B. A. Law(1990), *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 950.
10. J. E. Beecher, A. T. Andrews and E. N. Vulfson(1990), *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 955.
11. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
12. R. U. Hofmann and B. Selisko(1993), *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 33.
13. J. Woodward(1985), *Immobilised Cells and Enzymes*, (J. Woodward, ed), 15, IRL Press, Oxford.
14. 김해성, 김우식(1993), *한국생물공학회지*, **8** (4), 320.