

*Trichoderma viride*속 셀룰라아제에 의한 폐신문지의 효소가수분해반응의 속도론적 연구

박진원 · 이승무 · 梶内 俊夫* · 明島 高司*

연세대학교 공과대학 화학공학과
*일본 동경공업대학 환경화학공학과
(1990년 5월 24일 접수, 1990년 9월 22일 채택)

Kinetic Study on Enzymatic Hydrolysis of Wasted Newspaper by Cellulase from *Trichoderma viride*

Jin Won Park, Sung Moo Lee, Toshio Kajiuchi* and Takashi Akehata*

Department of Chemical Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

*Department of Environmental Chemistry and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 227, Japan

(Received 24, May 1990; accepted 22 September 1990)

요 약

Trichoderma viride(IFO 30498)로부터 생성된 셀룰라아제를 이용한 폐신문지의 효소가수분해반응에 있어서 생성물인 환원당의 생성속도식에 관하여 연구하였다.

환원당의 생성속도는 생성물저해요인, 반응온도에 의한 효소의 실활과, 셀룰로오스 표면에 강하게 흡착하는 효소의 실활에 의하여 감소하였다. 셀룰로오스의 구조적 복잡성을 설명할 수 있는 활성기질계수를 도입하여, 생성물저해요인과 효소가수분해 과정에서 효소의 실활을 고려한 속도식을 연구하였다. 비활성화된 효소의 양은 gel filtration chromatography(GFC) 법으로 분석하였다. 속도식은 폐신문지로부터 생성되는 환원당의 농도를 정확히 예측할 수 있었다.

Abstract— A kinetic study of enzymatic hydrolysis of newspaper with cellulase prepared from *Trichoderma viride* (IFO 30498) has been carried out. The rate of reducing sugar formation decelerated due to inhibition by the products, enzyme thermoinactivation, and substrate inactivation of the enzymes tightly adsorbed on the cellulose surface. The kinetics take into account the structural complexity of cellulose which can be explained by the activated substrate coefficient, the inhibition by reaction products, and the inactivation of enzyme in the course of the enzymatic hydrolysis. The inactivated enzyme quantity is measured by GFC analysis. The kinetics satisfactorily predict the reducing sugar accumulation from newspaper.

1. 서 론

석유에너지의 대체에너지 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 오늘날, 일반적으로 폐기되고 있는 셀룰로오스계 물질은 미래의 에너지와 식량문제에 재활

용가치가 큰 자원으로 부각되고 있다.

지구상 가장 풍부한 재활용 자원중의 하나인, 리그노셀룰로오스계 바이오매스로부터 액체연료와 화학제품을 생산하는 공정이 많은 학자들에 의하여 개발되어 왔으나[1-3] 아직까지 경제적 타당성이 부족하므로

산업화가 되지 못하고 있다.

효소당화공정을 실제적으로 실현하기 위해서는 당화반응의 최적화에 관련된 여러 문제점을 해결하여야 한다. 그러므로 반응과정중 여러 조건에서 생성속도를 예측할 수 있도록, 정확한 반응메카니즘을 통한 모델식이 발전되어야 한다.

셀룰로오스의 효소가수분해에 관한 여러 모델식이 제안되었다. Suga[4]와 Lee[5]는 가수분해도중 셀룰라아제의 구성효소들은 고분자로 볼 수 있는 셀룰로오스의 중합도를 감소시킨다는 점을 묘사한 이론적 모델을 제창하였다. 또한 Okazaki[6]는 셀룰로오스계 물질의 가수분해에 작용하는 효소는 endo형과 exo형 glucanase의 상승작용에 의한다고 하였으며, 기질의 복합성을 설명한 모델들[7, 8]과 셀룰로오스의 표면에 흡착되는 셀룰라아제의 현상을 고려한 모델[9, 10] 등이 있다. 그러나 반응도중에 있어서, 셀룰로오스는 물리적, 화학적 특성이 변화하며, 셀룰라아제의 정량분석이 어렵기 때문에 효소-기질의 반응메카니즘에 의한 속도식의 연구가 미비한 상태이다.

본 연구에서는 유리효소량의 GFC 분석에 의하여, 비활성화된 기질-효소 복합체를 고려한 속도식을 고찰하였다. 또한 실험데이터를 기초로 한 속도식은 반응에 미치는 여러 요인들을 설명할 수 있었다.

2. 실험방법

2-1. 효소생산

Trichoderma viride(IFO No. 30498)의 종균을 오오사카 발효 기구로부터 구입하였다. 1% 미결정 Avicel (Merck Co.)을 주탄소원으로 한 Mandel's salt medium[11] 액배지를 이용하여 10L 발효장치에서 배양시켜 조효소용액을 구한 다음, 동결건조시켜 4°C에 보관하였다. 당화반응에 필요한 효소액은 0.5 mM NaN_3 (antiseptic)과 0.1M sodium acetate 완충용액(pH 4.8)으로 조제하여 사용하였다.

2-2. 기질

기질은 페리그노셀룰로오스중 가장 풍부한 것중의 하나의 폐신문지를 선택하였다. 폐신문지의 전처리에는 간단한 조작을 행하였는 바, 신문지를 완충용액으로 필요한 농도로 만든 다음, 믹스기(Toshiba, MX-150)로 파쇄시키는 기계적 전처리를 행하였다.

표준기질로서는 Avicel, filter paper(FP)와 수용성 셀룰로오스인 carboxymethyl-cellulose(CMC)를 사용

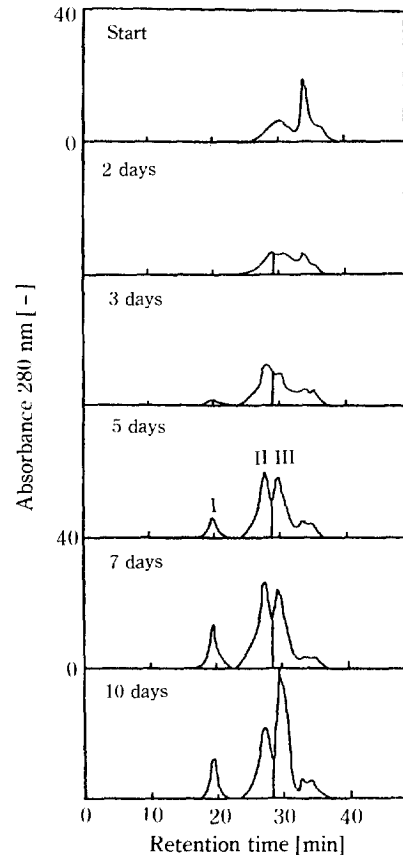


Fig. 1. GFC chromatograms of the culture solution with respect to cultivation days.

하였다.

2-3. 당화반응

폐신문지의 농도는 4-100g/L, 조효소는 0.01-0.7FPU/mL 범위였으며, 반응조건중 pH와 온도는 각각 4.8, 50°C였다. 반응기는 600 mL의 삼각플라스크를 사용하였으며, 1분간 120회 왕복운동하는 진탕배양기로 교반시켰다. 시료는 0.6μm glass fiber(Advante, Tosoh Co.)로 여과시킨 다음, 환원당과 유리효소량을 측정하였다.

2-4. 분석방법

효소량은 gel filtration chromatography(GFC) 법[12]으로 분석하였다. 배양시간에 따른 배양액의 GFC 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다.

처음 2일동안의 크로마토그램의 변화는 배지속의 기질분해에 의한 단순한 변화라고 사료된다. 3일부터 새로운 피크(peak I)가 체류시간 19분에 나타났으며,

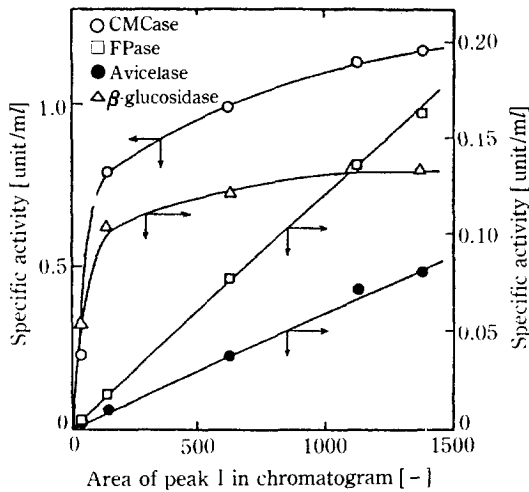


Fig. 2. Relation between area of peak I and specific activities.

그 물질의 분자량은 약 60,000이었다. 5일후에는 peak I이외에 peak II, III이 선명하게 나타났다. Peak II의 물질은 체류시간 27분에 검출되었으며, 분자량은 약 10,000이며, peak III은 체류시간 30분에 검출되며 분자량은 1,000미만의 물질로 이루어져 있다. Peak I과 II는 배양시간 7일경에 가장 높은 단계에 이르렀으며, 반면에 peak III은 배양시간에 따라 계속 증가하여 peak I, II와는 다른 경향을 보였다. Endo-glucanase종의 분자량은 약 12,500과 50,000[13], exo-glucanase는 약 59,000[14, 15]이라는 기존의 연구결과로부터 peak I과 II는 셀룰라아제의 구성성분으로 사료되며, 분자량 1,000미만인 peak III은 기질의 분해물 및 부수물질로 사료된다.

Fig. 2에 peak I의 면적과 CMCase, FPase, Avicelase 그리고 β -glucosidase의 활성의 관계를 나타내었다. Peak I의 면적과 선형적인 관계가 있는 활성 즉, Avicelase와 FPase는 peak I과 대응한다는 결론을 얻었다.

CMCase와 β -glucosidase는 peak I과는 선형성이 나타나지 않았으나, 여러 실험을 통해 본 결과 peak II와 관계가 있는 것으로 사료된다.

어떤 활성을 가지고 있는 효소분말을 0.2-4%의 농도로 만들어 GFC법으로 분석하면 GFC 크로마토그램과 효소의 농도는 선형적으로 비례하기 때문에(Fig. 3) GFC 크로마토그램으로 효소의 양을 측정하는 것은 타당하다.

똑같은 효소분말을 0.2-4%의 농도로 만들어 활성을

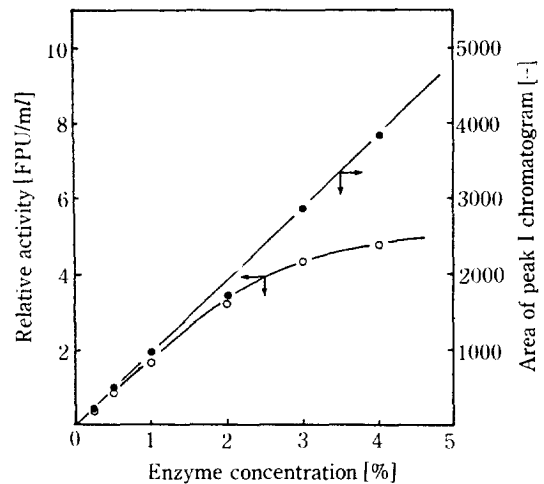


Fig. 3. Enzyme activity and GFC chromatogram with respect to concentration of enzyme

측정하면 FPU의 경우, 4-5FPU/mL 이상의 높은 활성의 범위에서는 효소량과 활성은 Fig. 3에 나타난 것처럼 비례하지 않는다. 이것이 전통적인 활성으로 효소농도를 표현하는 문제에 있어서 딜레마이다. 또 활성측정시 곡선이 되는 원인이, 활성측정은 언제나 생성물의 농도에 의한 간접적인 방법이므로 생성물 저해요인이나 기질 저해요인 때문이라고 생각된다.

Fig. 2에서 FPase와 Avicelase의 관계를 보면 잘 알 수 있는 바, 효소량(크로마토그램의 peak I)과 효소활성 사이에는 비례관계가 있다. 활성이 높은 범위(4 FPU/mL 이상)의 효소액은 peak I의 면적과 활성사이에 차가 생기는 바(Fig. 3), 이것은 GFC법의 문제가 아니라 전형적인 활성측정방법의 단점이라고 생각한다.

이상의 결과로부터 peak I, II는 셀룰라아제의 구성 효소들로 이루어진 물질을 나타내는 것을 확인하며, GFC크로마토그램법은 개략적인 셀룰라아제의 활성과 효소의 정량분석에 유용함을 알 수 있음과 동시에 효소가수분해에 있어서 효소-기질반응중 효소의 거동을 추적할 수 있다.

환원당은 DNS법[16]으로 분석하였으며, 글루코오스는 glucose oxidase peroxidase 법[17]으로 분석하였다. 효소의 활성중 filter paper activity[FPA]는 FP-5C여과지(Advantec, Tosoh Co.)를 사용하여 측정하였으며[18], CMCase, Avicelase 그리고 β -glucosidase의 활성은 각각 CMC, Avicel, 셀로비오스를 표준기질로 사용하여 측정하였다[19].

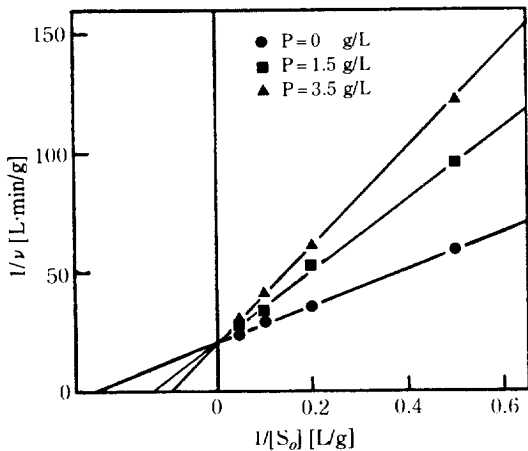


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot for enzymatic cellulose hydrolysis and inhibition by the product.

3. 실험결과 및 검토

3-1. 모델가정의 근거

3-1-1. 생성물에 의한 반응의 억제

반응속도식에 있어서 생성물에 의한 반응의 억제영향을 고려하기 위하여, 반응초기에 억제작용을 하는 생성물로서 서로 다른 농도의 셀로비오스를 첨가하였다. 반응혼합물에 셀로비오스를 첨가한 경우는 첨가하지 않은 경우보다 생성되는 환원당의 초기속도를 감소시켰다. Fig. 4에 첨가된 3종류의 셀로비오스 농도에 대하여 효소 가수분해속도의 Lineweaver-Burk plot를 나타내었다. 억제물질의 존재하에서 표현할 수 있는 생성물의 초기속도식을, 경쟁억제모델을 적용하여 다음에 표현하였는 바,

$$v = \frac{V_m[S_0]}{[S_0] + K_m(1 + P/K_i)}$$

여기서,

V_m : 최대속도 [g/L · hr]

S : 기질농도 [g/L]

K_m : Michaelis 상수 [g/L]

P : 생성물농도 [g/L]

K_i : 저해물질정수 [g/L]

Fig. 4와 같이 $1/v$ 축에 일정한 절편을 가지는 직선군이 이루어짐으로서 억제모델중 경쟁억제모델이 잘 맞음을 알 수 있었다.

반응초기에 첨가된 셀로비오스의 농도에 따라 Line-

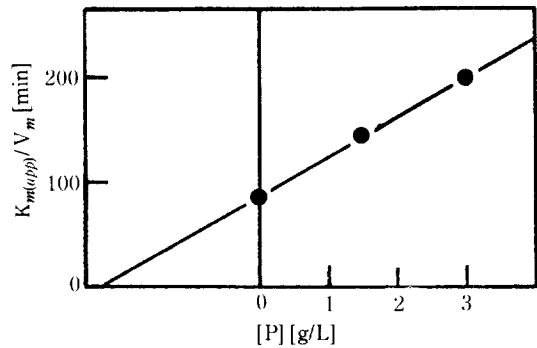


Fig. 5. Determination of K_i by the second plot of Lineweaver-Burk plot.

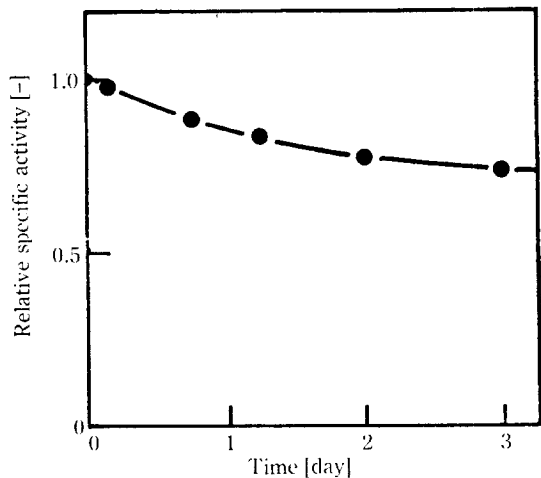


Fig. 6. Thermoactivation of enzyme with respect to reaction time at 50°C.

weaver-Burk plot한 직선들의 기울기로부터 겉보기 Michaelis상수, 즉 $K_m(1 + [P]/K_i)$ 의 값을 구할 수 있다. 반응초기 첨가된 셀로비오스 농도 $[P]$ 에 따른 $K_{m(app)}/V_m$ 의 변화를 Fig. 5에 나타내었으며, 기울기값인 $K_m/V_m K_i$ 로부터 저해물질 정수, K_i 를 구한 결과 그 값은 2.2g/L였다.

3-1-2. 가수분해 과정에서의 효소의 실행

셀룰라아제는 다음과 같은 이유로 그 활성을 상실한다. (1) 반응열에 의한 실행, (2) 가수분해도중 강력한 교반에 의한 실행, (3) 비활성 기질의 표면에 강하게 흡착된 효소의 실행.

반응온도에 의하여 셀룰라아제의 활성이 상실되는 현상을 검토하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 효소액을 50°C의 인큐베이터에 보관하면서, 보관시간에 따른 셀룰라아제중 FPase 활성의 변화를 관찰하였으며,

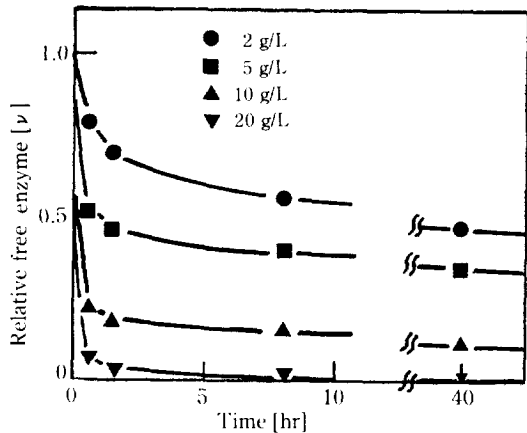


Fig. 7. Change of relative free enzyme with respect to reaction time.

그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 열에 의한 효소의失활은 긴 반응시간에 걸쳐 완만히 나타났으며, 72시간 후 약 25%의 활성을 상실하였다.

그리고 두번째 경우, 교반에 의한失활은 본 실험에서 사용한 셰이커 반응장치에서는 나타나지 않았다. 세번째 경우인, 기질에 강력한 흡착을 함으로서 생기는 효소의失활을 고찰하기 위하여 다음과 같은 실험을 행하였다. 농도 2, 5, 10, 20g/L의 신문지와 0.05FPU/mL의 셀룰라아제를 pH 4.8, 온도 50°C에서 반응시키면서, 상등액의 셀룰라아제의 활성을 GFC 크로마토그램법으로 분석하였다. 상등액의 셀룰라아제의 활성은 기질과 결합하지 않은 유리셀룰라아제를 의미하므로 반응시간에 따른 유리효소비율을 구하여 Fig. 7에 나타내었다. 반응개시 후 1시간 동안 셀룰라아제는 기질에 급속히 흡착됨을 보였으며, 5시간후부터는 완만한 감소현상을 보였다. 기질농도가 2g/L인 경우, 당화율과 유리효소비율은 반응개시 40 hr에 각각 40%, 38%의 값을 보였다. Ooshima[20], Castanon[21]에 의하면 셀룰라아제는 반응초기에 빠른 흡착을 한 후, 당화가 진행됨에 따라서 유리효소량이 증가한다고 보고하고 있지만, 본 연구에서는 거의 일정한 값을 보이고 있다.

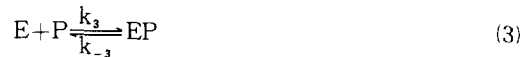
이상과 같은 결과로부터 다음과 같은 두 가지 가정을 할 수 있었다. 첫째, 기질은 활성과 비활성을 띤 부분이 혼합적으로 이루어진 복합체라는 가정과, 둘째, 비활성기질에 강하게 흡착한 셀룰라아제는 흡착한 부분의 당화를 끝낸 다음에도 기질의 비활성에 의하여 탈착할 수 없다는 가정이다.

3-2. 효소失활에 의한 속도식

셀룰라아제의 효소가수분해반응은 근본적으로 Michaelis-Menten 모델을 따르나 반응도중 효소는 높은 반응온도에 의하여 활성을 잃으며, 또한 비활성의 기질에 의한 강력한 흡착으로 인하여 그 활성을 상실한다. 이러한 효소의失활을 고려한 이론적 해석을 하기 위하여서는 다음과 같은 가정을 제시한다.

1. 셀룰라아제 체계는 정상적으로 단일한 효소성분으로 나타낼 수 있다.
2. 생성물중 셀로비오스는 경쟁저해물질로 작용한다.
3. 구조적으로 복합체로 이루어져 있는 셀룰로오스는 활성이 있는 부분과 비활성부분으로 나누어져 있다.
4. 기질의 비활성부분에 의하여 강력하게 흡착된 효소는 그 활성을 잃는다.
5. 반응열에 의한 효소활성의失활은 반응시간에 따라 1차반응으로 나타난다.

이상과 같은 가정들에 의하여 셀룰로오스의 효소가수분해반응은 다음과 같은 메카니즘으로 나타난다.



기질은 두 부분으로 나누어져 있으며, 한 부분은 효소의失활과 관계가 없는 활성기질(S_1)이며, 다른 부분은 당화반응이 끝난 효소-기질의 결합부위로부터 효소가 탈착하는 것을 방해하는 비활성기질(S_N)이다. 식(1), (2)는 효소(E)와 활성기질(S_1)이 활성반응복합체(ES_1)을 이루어 생성물(P)을 형성하는 단계이다. 식(3)은 효소의 활동이 생성물에 의하여 억제되는 단계이다. 식(4)는 비활성기질(S_N)에 강한 흡착을 한 효소의失활을 나타내며, 비활성반응복합체(ES_N)는 가수분해반응 후 효소의 탈착을 방해하므로, 주반응에 기여하지 못하는 복합체이다. 또한 반응열에 의한 효소의失활을 식(5)에 고려하였다.

식(1)-(5)로부터 물질수지식을 취하면

$$\frac{d(ES_1)}{dt} = k_1(E)(S_1) - k_{-1}(ES_1) - k_2(ES_1) \quad (6)$$

$$\frac{d(EP)}{dt} = k_3(E)(P) - k_{-3}(EP) \quad (7)$$

$$\frac{d(P)}{dt} = k_2(ES_1) - k_3(E)(P) + k_{-3}(EP) \quad (8)$$

$$\frac{d(ES_N)}{dt} = k_4(E)(S_N) \quad (9)$$

$$\frac{d(E_o)}{dt} = -k_5(E_o) \quad (10)$$

만약 반응중간체인 (ES_1)과 (EP)가 정상상태농도에 의존한다고 가정하고, 효소와 기질의 보존원리를 적용하면,

$$\frac{d(ES_1)}{dt} = 0, \quad \frac{d(EP)}{dt} = 0 \quad (11)$$

$$(E_o) = (E) + (ES_1) + (EP) + (ES_N) \quad (12)$$

$$(S) = (S_1) + (S_N) \quad (13)$$

$$(S_1) = \alpha(S), \quad (S_N) = (1 - \alpha)(S) \quad (14)$$

여기서, α 는 활성기질계수이다.

식(6), (7), (11), (12)로부터 (ES_1)과 (EP)를 나타내면

$$(ES_1) = \frac{(S_1) \{ (E_o) - (EP) - (ES_N) \}}{K_m + (S_1)} \quad (15)$$

$$(EP) = \frac{(P)}{K_i + (P)} \{ (E_o) - (ES_1) - (ES_N) \} \quad (16)$$

여기서, $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ 이며, $K_i = k_{-3}/k_3$ 이다.

식(12), (15), (16)으로부터

$$(ES_1) = \frac{(S_1)}{K_m(1 + (P)/K_i) + (S_1)} \{ (E_o) - (ES_N) \} \quad (17)$$

식(14), (17)로부터

$$(ES_1) = \frac{\alpha(E_o)(S)}{K_m(1 + (P)/K_i) + (S)} \quad (18)$$

생성물 속도식(8)과 효소-생성물 복합체(EP)에 관한 식(16)으로부터

$$\frac{dP}{dt} = k_2(ES_1) \quad (19)$$

식(18)과 (19)로부터 반응속도식은 다음과 같다.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\alpha(E_o)(S)}{K_m(1 + (P)/K_i) + (S)} \quad (20)$$

Table 1. Kinetic parameter values used for computation in terms of the mathematical model

Parameter	Values
K_m	3.6 (g/L)
V_m	0.3 (g/L-hr)
K_i	2.2 (g/L)
k_5	0.00394 (1/hr)
α	0.375 (-)

한편, 반응열에 의한 효소의 실활은 긴 반응시간에 걸쳐 1차식으로 나타낼 수 있다고 가정하였으므로, 식(10)을 경계조건($E_o = E_o$ at $t=0$, $E_o = E_o'$ at $t=t$)에서 적분하면

$$(E_o') = (E_o) \exp(-k_5 t) \quad (21)$$

여기서, E_o' 는 반응열에 의한 실활 후의 전효소량.

식(20)의 (E_o)항은 식(21)처럼 표현될 수 있으므로 최종적으로 생성물 속도식은 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\alpha V_m(S) \exp(-k_5 t)}{K_m(1 + (P)/K_i) + (S)} \quad (22)$$

여기서, $V_m = k_2(E_o)$.

이상과 같은 가정으로서, 구한 속도식(22)의 매개변수, K_m , V_m , K_i , k_5 는 Lineweaver-Burk plot, 2차 plot 그리고 적분법으로 각각 구하였다. 규명하지 못한 1개의 매개변수인 활성기질계수(α)는 식(23)에 나타난 바와 같이 비선형회귀분석법으로 최적값을 구한 결과, 37.5%로 반응초기의 기질상태는 활성기질이 37.5%를 차지하고 있음을 알 수 있었다.

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i) \quad (23)$$

여기서,

y_i : 실험치

\bar{y}_i : 예측치

n : 데이터 갯수

매개변수들의 값을 Table 1에 나타내었으며, 모델식으로부터 계산한 값과 실험결과를 Fig. 8에 나타내었다. 곡선 A는 생성물에 의한 억제작용과 효소실활을 전혀 고려하지 않은 전형적인 효소-기질반응을 나타내는 Michaelis-Menten 모델식으로부터 예측한 값을 나타내며, 곡선 B는 쉐를로오스를 반응억제물질로 채택하여 생성물에 의한 억제작용을 고려한 모델식으로부터 구한 값을 나타내며, 곡선 C는 생성물에 의한 억제작용과,

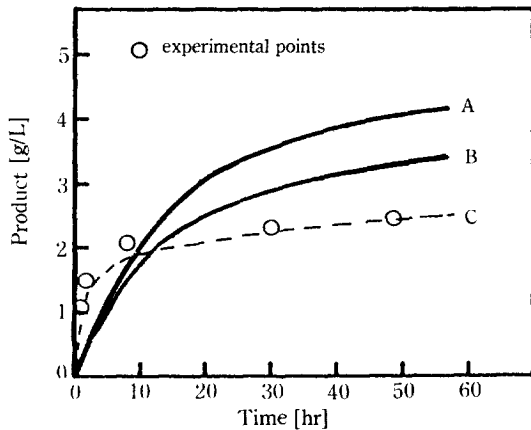


Fig. 8. Effect of various factors on kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis.

Computerized curves: A, ordinary Michaelis-Menten equation; B, inhibition by cellobiose is considered; C, all factors are considered. O, experimental points. Substrate concentration 10 g/L, enzyme activity 0.1 FPU/mL.

열과 기질에 의한 효소의 실활을 고려한 속도식의 예측치를 나타낸다. 그 결과 곡선 C와 같이 영향인자들을 고려한 모델식이 효소가수분해 과정을 가장 근접하게 묘사하여 줄 수 있음을 알 수 있었다.

4. 결 론

효소가수분해반응의 메카니즘은 생성물저해요인과 효소의 실활에 의하여 생성물이 영향을 받는다고 가정하였다. 셀룰라아제는 두 가지 이유로 실활을 하는 바, 첫째는 높은 반응온도에 의한 열실활과 둘째는 비활성기질의 표면에 강하게 흡착된 효소들의 기질에 의한 실활이다. 그러므로 본 연구에서는 효소의 실활과 셀룰로오스의 복합성을 설명할 수 있는 활성기질계수(α)를 도입한 속도식을 연구하였는 바, 효소당화과정을 잘 묘사해 줄 수 있음을 알 수 있었다.

NOMENCLATURE

E : enzyme activity [FPU/mL]
 E_o : total enzyme activity [FPU/mL]
 E'_o : total enzyme activity after thermoinactivation [FPU/mL]
 ES_1 : enzyme-activated substrate complex
 ES_N : enzyme-inactivated substrate complex
 EP : enzyme-product complex

K_i : inhibition constant [g/L]
 K_m : Michaelis-Menten constant [g/L]
 $K_{m(app)}$: apparent Michaelis-Menten constant [g/L]
 k_5 : reaction constant [hr^{-1}]
 P : product concentration [g/L]
 S : substrate concentration [g/L]
 S_o : initial substrate concentration [g/L]
 S_1 : activated substrate concentration [g/L]
 S_N : inactivated substrate concentration [g/L]
 t : reaction time [hr]
 V_m : maximum rate of reaction [g/L·hr]
 ν : reaction rate [g/L·hr]
 y_i : data value
 \bar{y}_i : predicted value

Greek Letter

α : activated substrate coefficient

REFERENCES

- Dunn, N.W. and Gray, P.P.: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 419 (1981).
- Tanaka, M., Song, G.J. and Matsuno, R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 13 (1985).
- Jackson, M.A. and Talburt, D.E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 903 (1988).
- Suga, K., Van Dedem, G. and Moo-Young, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 433 (1975).
- Lee, S.B., et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 141 (1978).
- Okazaki, M. and Moo-Young, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 637 (1978).
- Pettersen, N. and Rose, E.W.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 997 (1979).
- Ryu, D.D.Y., et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1047 (1982).
- Howell, J.A. and Mangat, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 847 (1978).
- Dwivedi, C.P. and Ghose, T.K.: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 15 (1979).
- Mandels, M. and Weber, J.: *Adv. Chem. Ser.*, **95**, 391 (1969).
- Park, J.W., et al.: *J. Chem. Eng. Japan*, **23**, 4, August (1990).
- Shoemaker, S.P. and Brown, R.D.: *J. Biochem. Biophys. Acta.*, **523**, 147 (1978).
- Nishizawa, K.: *J. Ferment. Technol.*, **51**, 267 (1973).
- Shikata, S. and Nishizawa, K.: *J. Biochem.*, **78**, 499 (1978).
- Miller, G.L.: *Analytical Chemistry*, **31**, 426 (1959).

17. Messer, M. and Dahlqvist, A.: *Anal. Biochem.*, **14**, 376 (1966).
18. Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **6**, 21 (1976).
19. Canevascini, G. and Gattlen, C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1573 (1981).
20. Ooshima, H., Sakata, M. and Harano, Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1727 (1986).
21. Castanon, M. and Wilke, C.R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1365 (1981).