

## 셀룰로오스성 물질의 효소적 가수분해에 의한 당생성 메카니즘 : 셀룰로오스에 대한 *Trichoderma viride* 셀룰라아제 Component들의 흡착

김동원 · 김공수\* · 고성덕\*\* · 황희숙 · 정정호 · 김태송

충북대학교 자연과학대학 화학과, \*공업화학과, \*\*과학교육과  
(1991년 9월 4일 접수, 1991년 12월 12일 채택)

## Sugar Production Mechanism by the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials : Adsorption of Cellulase Components from *Trichoderma viride* on Cellulose

Dong Won Kim, Gong Soo Kim\*, Sung Duk Koh\*\*, Hee Suk Whang,  
Chung Ho Chung and Tae Seung Kim

Department of Chemistry, \*Department of Engineering Chemistry,  
\*\*Department of Science Education, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea  
(Received 4 September 1991; accepted 12 December 1991)

### 요 약

*Trichoderma viride*의 셀룰라아제로부터 CMCase와 Avicelase를 분리하여 이들 효소 component의 흡착특성에 미치는 셀룰로오스의 결정성 및 표면적의 영향에 관하여 연구하였다. CMCase와 Avicelase는 DEAE-Sephadex A 수지에 대한 흡착친화력이 현저하게 다른 성질을 이용, 관크로마토그래피법에 의해 분리되었다. 등온흡착실험에서 여러 가지 셀룰로오스성 흡착제에 대한 셀룰라아제 component들의 흡착은 모두 Langmuir 등온흡착 형태이었다. 여기서 CMCase의 최대흡착량( $A_{max}$ )은 Avicelase보다 컸으나, 흡착친화력은 Avicelase의 경우 보다 작았다. 한편 셀룰로오스의 표면적은 CMCase의 흡착에, 그의 결정성은 Avicelase의 흡착에 보다 크게 영향을 주었다. 또한 흡착평형상수(K)로부터 흡착에 대한 열역학적 상수를 구하였다. 그 결과, 흡착엔트로피( $\Delta S$ )는 CMCase의 흡착에 주요한 역할을 하며, 흡착엔탈피( $\Delta H$ )는 Avicelase의 흡착에 주요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

**Abstract**—The effects of the crystallinity and the surface area of cellulose on the adsorption behaviors of CMCase and Avicelase obtained from *Trichoderma viride* were studied. The two components, CMCase and Avicelase, were separated by a column chromatographic method which was based on distinctly different affinities on DEAE-Sephadex A resin. From the adsorption experiments, their adsorption of cellulase components on various cellulosic adsorbents was found to obey the Langmuir isotherm. The maximum adsorption amount( $A_{max}$ ) of CMCase was larger than that of Avicelase, while the adsorption affinity of CMCase was smaller than that of Avicelase. It was also found that the surface area of cellulose was the important factor for the adsorption of CMCase, and the crystallinity for the Avicelase. In addition, thermodynamic parameters were calculated from the adsorption equilibrium constant(K). From this result, it was found that the adsorption entropy( $\Delta S$ ) plays the principle role in the adsorption of CMCase and that the adsorption enthalpy( $\Delta H$ ) plays the major role in the adsorption of Avicelase.

## 1. 서 론

셀룰로오스성 물질은 방대한 양의 탄수화물자원으로 이를 이용하여 포도당을 생산하기 위한 효소적 가수분해의 연구가 활발히 진행되고 있다[1]. 이러한 가수분해반응에 이용되는 대부분의 셀룰라아제는 복합효소로서 endoglucanase(EC 3.2.1.4), exoglucanase(EC 3.2.1.91) 및  $\beta$ -glucosidase(EC 3.2.1.21) 등의 3가지 효소 component로 구성되어 있으며, 이들 효소는 기질의 활동도 특성에 따라 각각 CMCase, Avicelase 및 PNPCase로 구분하기도 한다[2]. 결정성 셀룰로오스는 이들 효소 간의 협력작용(synergistic action)에 의해 효과적으로 가수분해되는 것으로 알려져 있다[3, 4]. 그러나 셀룰라아제의 다양한 구성과 셀룰로오스성 물질의 물리화학적 특성의 복잡성은 효소적 가수분해 메커니즘을 명확하게 이해하는데 어려움을 준다. 또한 불용성 물질인 기질을 포함하는 셀룰로오스-셀룰라아제 효소반응계의 속도론적 해석은 흡착과 같은 현상을 고려하여야 하는 어려움이 있다. 최근까지 효소의 흡착현상을 포함하여 셀룰로오스성 물질의 가수분해에 대한 반응 모형이 다양하게 연구되고 있다.

효소적 가수분해속도가 효소흡착량에 비례한다는 결과를 보여주는 간단한 반응모형[5]과 endoglucanase의 흡착친화력의 크기에 따라 가수분해속도가 증가한다는 결과[6] 및 흡착을 고려한 반응속도론적 연구가 진행되고 있다[7, 8]. 또한 셀룰로오스성 물질의 효소적 가수분해반응에서 당생성량에 영향을 미치는 물질로 비이온성 계면활성제는 당생성을 증대시키는 것으로 알려져 있다[9]. 이러한 효과는 효소의 흡착과 탈착이 가수분해에 영향을 준다는 것을 보여주는 것이다. 그러나 이와 같은 연구는 아직 초보적인 단계로서 셀룰로오스의 효소적 가수분해 메커니즘을 밝히는데 이러한 흡착특성의 연구는 필수적이라 할 것이다. Fan[10]과 Ooshima 등[11]은 셀룰로오스를 전처리하거나 가수분해시켰을 때 결정성지수(CrI)값의 증가에 따라 셀룰라아제의 흡착친화력이 증가한다고 보고하였으나, 이와는 달리 Tanaka 등[12]은 가수분해에서와 마찬가지로 셀룰라아제의 흡착이 CrI에 크게 영향을 받지 않음을 보고한 바 있고, Kim 등[13]은 CrI가 일정할 때 셀룰라아제의 흡착이 비표면적(SSA)에 영향을 받는 것으로 보고하였으며, 또한 부분적으로 분리된 Avicelase의 흡착이 복합 셀룰라아제의 흡착과 다르다는 것이 보고되었다[14]. 또한 Ryu 등[15]과 Kyriacou 등[16]은 부분적으로 셀룰라아제를 분리정제하여 한 가지의 기질에 대한 exoglucanase와 endoglucanase의 흡착특성을 조사한 바 있으며, *Trichoderma viride* 셀룰라아제의 component

들을 모두 분리하여 Avicel에 흡착시킬 때, 흡착친화력이 효소 성분에 따라 다양한 것으로 알려져 있다[17]. 이외에도 셀룰로오스에 대한 셀룰라아제의 흡착에 관하여 다수의 연구가 진행되고 있는데, 대부분의 연구에서 효소의 흡착이 Langmuir 등온흡착형태이며, 흡착특성이 기질의 결정성 지수(CrI)와 비표면적(SSA)에 부분적으로 의존함을 보고하고 있다. 그러나 기질의 물리화학적 성질에 대한 각 효소 component의 흡착특성은 구체적으로 연구되지 않고 있다.

본 연구에서는 다양한 셀룰로오스를 기질로 사용하여 분리정제한 셀룰라아제의 component 효소들의 흡착특성을 조사하고자 한다.

## 2. 실험 및 방법

### 2-1. 시약

*Trichoderma viride* 셀룰라아제는 Sigma chemical사 제품으로 activity가 4.4units/mg이었다. 기질로서 사용한 셀룰로오스 중 Avicel PH-101(Particle size, 50 $\mu$ ) 및 Solka Floc BW-200(Particle size, 35 $\mu$ )과 Solka Floc SW-40(Particle size, 120 $\mu$ )은 각각 FMC사와 JRC사의 미국제 시약을 사용하였다. 그리고 셀룰라아제의 분리 또는 정제를 위하여 사용한 컬럼 충진제는 DEAE-sephadex A-50와 Sephadex G-25로서 Sigma Chemical사 시약을 사용하였다. 또한 기타 시약들은 모두 분석용 시약을 그대로 사용하였다.

### 2-2. 결정성 지수의 결정

셀룰로오스에 대한 X-ray Diffraction Analyzer(Rikakikai Co., Japan)가 사용되었다. 이 때 diffraction scan은 nickel filter의 cu-K $\alpha$  radiation과 Geiger Counter를 사용하여 35 kV, 20 mA에서 실시하였다.

결정성 지수(CrI, crystallinity index)는 Fig. 1에서 얻어진 X-ray diffractogram으로부터 Segal방법[18]에 의해 구하였으며, 이 때 사용된 CrI 구하는 식은 다음과 같다.

$$\text{CrI}(\%) = \{(I_{002} - I_{am})/I_{002}\} \times 100 \quad (1)$$

(1)식에서  $I_{002}$ 는, 2 $\theta$ 가 22°일 때의 intensity이고,  $I_{am}$ 은 2 $\theta$ 가 18°일 때의 intensity이다.

### 2-3. 단백질의 정량과 효소의 활성도 측정

용액 속에 녹아있는 효소의 양을 측정하기 위하여, Lowry방법[19]으로 단백질을 정량하였고, 표준 단백질로서 bovine serum albumin을 사용하였다.

효소의 activity측정으로, PNPCase 활성도와 CMCase

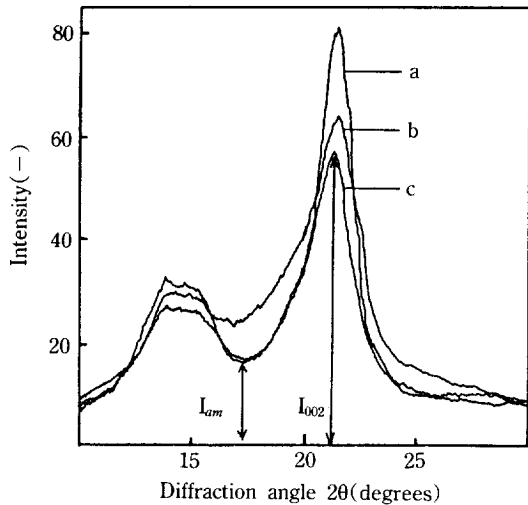


Fig. 1. X-ray diffractograms of various celluloses. Sample celluloses were (a) Avicel PH-101, (b) Solka Floc BW-200, and (c) Solka Floc SW-40.

활성도는 각각 carboxymethyl cellulose(CMC, Sigma Chemical Co.)를 기질로 하여 Berghem 등의 방법[20]으로 측정하였고, Avicelase activity는 Avicelase PH-101(FMC Co.)을 기질로 하여 Beldman 등의 방법[21]에 따라 측정하였다. 또한 환원당의 정량은 DNS방법[22]으로 실시하였다.

#### 2-4. 셀룰라아제의 분리 및 정제

*Trichoderma viride*에서 얻은 시약용 셀룰라아제 분말 1.5 g을 pH 4.8인 0.1 M sodium acetate 완충용액에 녹인 후 DEAE sephadex A-50을 충전시킨 column(20×300 mm)에서 chromatography를 실시하였다. Eluent는 같은 완충용액을 사용하였고, fraction No. 40부터 0-0.5 M의 NaCl 용액으로 salt gradient를 적용하였다. Salt gradient에 의하여 분리된 부분에는 endoglucanase(EC 3.2.1.4)와 exoglucanase(EC 3.2.1.91)가 포함되어 있어, 이들을 각각 sephadex G-25를 충전한 column(20×600 mm)에서 chromatography를 실시하여 염을 제거하였다. 이 때 사용된 eluent는 위에서 사용된 0.1 M sodium acetate 완충용액을 사용하였다. 그리고 분리된 각각의 효소는 acetone용액(1:3, v/v)에서 침전시켜, 냉동건조 후 보관하였다.

#### 2-5. 셀룰로오스에 대한 CMCase와 Avicelase의 흡착

Avicel PH-101, Solka Floc BW-200 및 Solka Floc SW-40을 CMCase와 Avicelase의 흡착에 대한 흡착제

로서 각각 사용하였다. 흡착을 위하여 셀룰로오스 시료(50 mg)를 pH 4.8인 0.1 M sodium acetate 완충용액의 4.5 mL에 넣고 30분 동안 30°C에서 preincubation한 다음 효소용액 0.5 mL를 첨가하여 0.2 mg/mL에서 1.8 mg/mL까지 다양한 농도의 반응 용액을 만들었다. 이 반응의 혼합물을 일정한 온도에서 reciprocal shaker에서 30분 동안 shaking한 후, 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상등액에서의 효소의 양을 Lowry방법[19]으로 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 셀룰로오스성 물질의 구조적 특성

셀룰로오스성 물질의 구조적 특성으로서 주로 CrI에 대하여 측정하였는데, Fig. 1과 같이 각 기질의 diffractogram이 얻어졌으며, 여기서 얻어진 각 셀룰로오스의 CrI(%)는 Avicel PH-101, Solka Floc BW-200 및 Solka Floc SW-40이 각각 85.3, 58.8 및 67.3이었다.

한편 셀룰로오스는 입자의 크기가 서로 다른 기질을 사용하였다. 셀룰로오스에 대한 표면적은 주로 기체흡착방법을 이용하여 얻어지는데, 이러한 방법으로 구한 비표면적(SSA)의 값은 실제 효소가 흡착할 수 있는 표면뿐만 아니라 기질의 비결정성 부분의 작은 구멍의 면적을 모두 포함하게 되어 효소의 흡착표면적 보다 더 큰 값을 갖는다. 본 연구에서는 표면적의 차이를 갖게 하기 위하여 기질 입자의 크기가 다른 것을 사용하였다.

#### 3-2. 셀룰라아제의 정제 및 분리

*T. viride* 셀룰라아제의 분리를 위하여 침전법으로 정제된 셀룰라아제를 크로마토그래피법으로 분리한 결과,  $\beta$ -glucosidase, CMCase, Avicelase의 활성도의 특성에 따라 Fig. 2와 같이 분리하였다. 여기서 I부분은 부분적으로  $\beta$ -glucosidase 활성도를 보여주는 부분으로 이 효소는 셀룰로오스에 거의 흡착되지 않는 것으로 알려져 있다[11]. II부분은 주로 endoglucanase(CMCase)이며, III부분은 exoglucanase(Avicelase)임을 보여주었다[11, 15]. 각 분획 중 II부분의 CMCase와 III부분의 Avicelase를 냉동건조 후 흡착실험에 사용하였다.

#### 3-3. 셀룰로오스에 대한 셀룰라아제의 흡착

셀룰로오스에 대한 각 성분 효소의 흡착은 주어진 온도에서 일정한 농도의 기질용액과 함께 실시되었다. 효소-기질간의 흡착반응은 Stuart와 Ristroph[23]가 제시한 바와 같이 기질의 한 흡착자리에 한 효소가 흡착

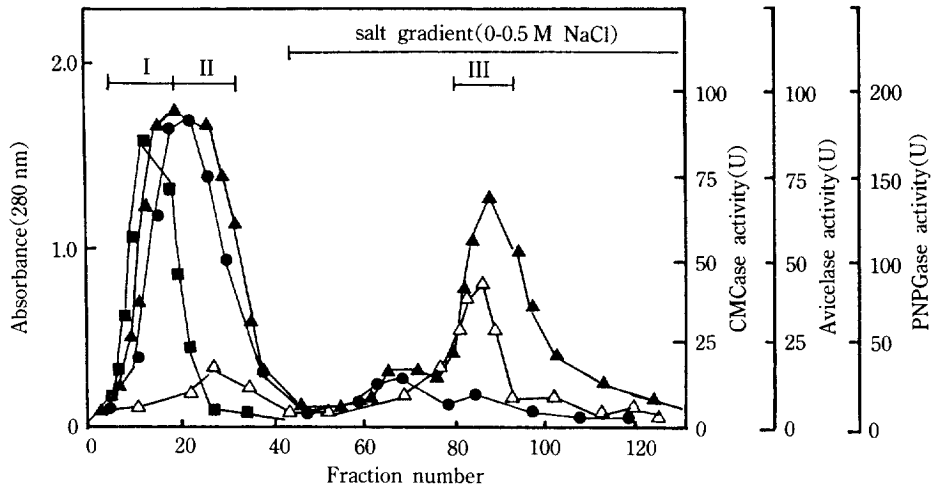


Fig. 2. Elution pattern of cellulase on DEAE-Sephadex A-50 column chromatography. (▲—▲) Absorbance at 280 nm; (●—●) CMCase activity; (■—■) PNPase activity; (△—△) Avicelase activity.

하여 평형에 도달된다는 것을 가정하였다. 효소의 농도변화에 따른 흡착량의 변화는 다음과 같이 Langmuir 등온흡착식에 적용하였다.

$$A = A_{max} \cdot K \cdot E / (1 + K \cdot E) \quad (3)$$

여기서 A는 기질에 흡착된 효소량(mg/g),  $A_{max}$ 는 효소의 최대흡착량, K는 흡착평형상수(mL/mg), E는 용액 내에 흡착되지 않은 효소의 농도(mg/mL)이다. 또한 흡착등온식의 각 파라미터를 얻기 위하여 (3)식을 다음 식과 같이 쓸 수 있다.

$$A/E = 1/(K \cdot A_{max}) + (1/A_{max}) \cdot E \quad (4)$$

(4)식을 E/A대 E로 plot하여 그 기울기와 절편으로부터  $A_{max}$ 와 K값을 얻는다. 본 실험에서 얻어진 각 효소에 대한 흡착실험값으로부터 두 성분효소의 흡착은 Langmuir 등온흡착형태에 따라 진행됨을 알 수 있었다(Fig. 3과 4). (4)식을 이용하여 얻어진 Langmuir 파라미터 값들을 각각 Table 1에 수록하였다. 그 결과, 같은 기질에 대하여 Avicelase에 대한 K값이 CMCase의 경우보다 크고,  $A_{max}$ 값은 CMCase에서 더 크게 나타났다. 또한 Avicelase의 K값은 기질의 표면적 차이에도 불구하고 CrI가 증가함에 따라 증가하였고, CMCase의 경우 Solka Floc BW-200이 가장 큰 값을 보여주었다. 이러한 결과는 Avicelase의 흡착이 기질의 결정성과 밀접한 관계가 있음을 의미하는 것이며, CMCase는 K값이 기질의 CrI와 관계가 작음을 의미하는 것이다. Avicelase의 흡착에 대한 결과는 Ooshima 등[5]이 보고한 결정성 셀룰로오스에 대한 복합효소의 흡착의 결과와 일치하는

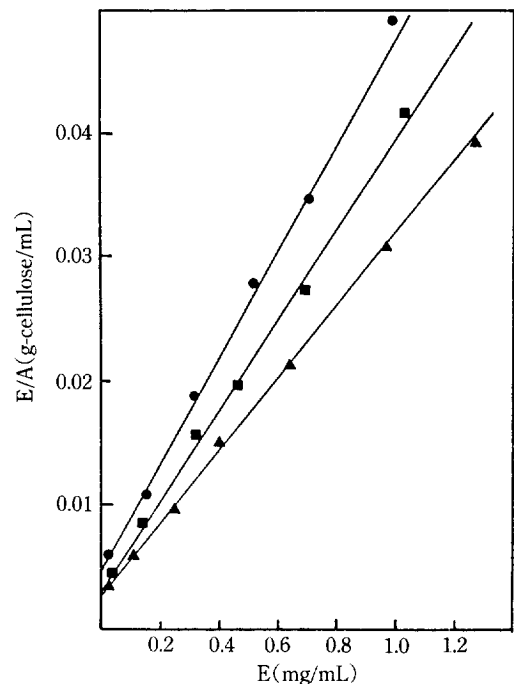


Fig. 3. Determination of adsorption equilibrium constant (K) and the maximum adsorption amount ( $A_{max}$ ) of CMCase by the plot of E/A vs. E. Adsorption temperature; 5°C. (▲) Avicel PH-101; (■) Solka Floc BW-200; (●) Solka Floc SW-40.

것이다. 따라서 복합효소로서 셀룰라아제의 흡착 성질을 고려할 때 기질의 표면적과 CrI를 동시에 고려해야 할

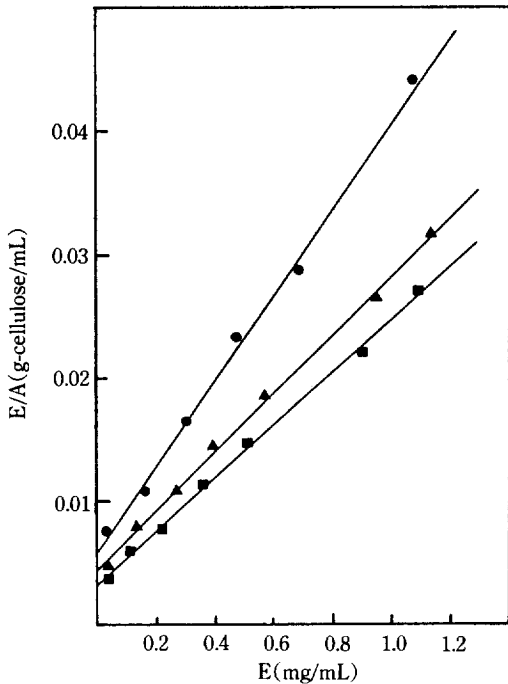


Fig. 4. Determination of adsorption equilibrium constant (K) and the maximum adsorption amount ( $A_{max}$ ) of Avicelase by the plot of  $E/A$  vs.  $E$ . Adsorption temperature; 5°C (Symbols are the same as in Fig. 3).

Table 1. Dependency of Langmuir adsorption parameters on various cellulosic adsorbents at 5°C

Cellulose (Average particle size)	CrI (%)	Avicelase		CMCase	
		$A_{max}$ (mg/ g-cellulose)	K (mL /mg)	$A_{max}$ (mg/ g-cellulose)	K (mL /mg)
Avicel PH-101 (50 $\mu$ )	85.5	34.7	10.3	41.7	5.5
Solka Floc BW-200 (35 $\mu$ )	58.8	28.4	8.8	46.9	6.8
Solka Floc SW-40 (120 $\mu$ )	67.3	23.7	8.9	27.8	6.4

것이다.

한편, 여러 온도에서 위와 같은 실험을 실시하여 K 값을 이용한 다음과 같은 식으로부터 열역학적 파라미터를 얻었다.

$$-\Delta H/R = d \ln K / d(1/T) \quad (5)$$

여기서  $\Delta H$ 는 흡착에 대한 엔탈피이고, R은 기체상수이다. Fig. 5와 6에서  $\ln K$ 와  $1/T$ 의 기울기로부터 흡착에

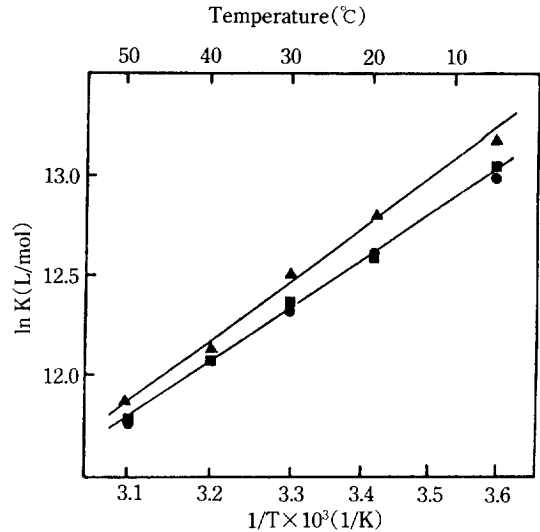


Fig. 5. Plot of  $\ln K$  vs.  $1/T$  for the adsorption of Avicelase. Symbols are the same as Fig. 3.

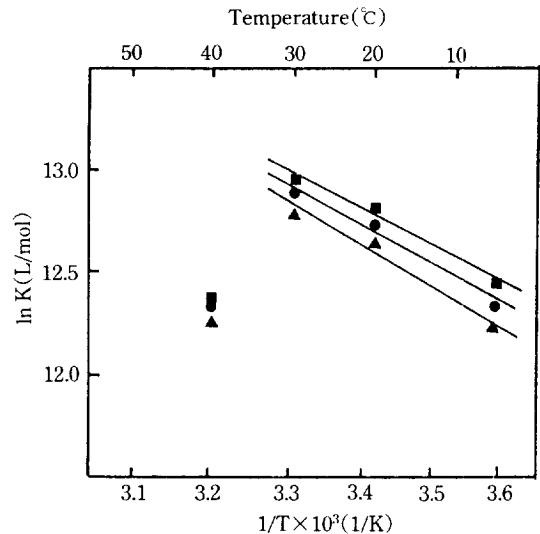


Fig. 6. Plot of  $\ln K$  vs.  $1/T$  for the adsorption of CMCase. Symbols are the same as Fig. 3.

대한  $\Delta H$ 가 얻어졌다. 이 때 Avicelase와 CMCase에 대한 평균 분자량은 40 kDa와 50 kDa를 각각 사용하였다[11, 21]. 또한 흡착에 대한 자유에너지( $\Delta G$ )와 엔트로피( $\Delta S$ )는 다음과 같은 식으로부터 얻어졌다.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \quad (7)$$

**Table 2. Thermodynamic parameter in adsorption of CM-Case and Avicelase on cellulosic adsorbents at 5°C**

Thermodynamic parameter	Adsorbent		
	Avicel PH-101	Solka Floc BW-200	Solka Floc SW-40
<b>CMCase</b>			
$\Delta G$ (kJ/mol)	-28.2	-28.7	-28.6
$\Delta H$ (kJ/mol)	17.7	15.5	17.2
$\Delta S$ (kJ/mol·K)	165.3	159.1	164.7
<b>Avicelase</b>			
$\Delta G$ (kJ/mol)	-30.5	-30.5	-30.2
$\Delta H$ (kJ/mol)	-21.0	-21.0	-20.2
$\Delta S$ (kJ/mol·K)	34.5	34.5	36.7

이 값들로부터 Table 2와 같이 CMCase와 Avicelase에 대한 열역학적 상수의 값들이 5°C에서 얻어졌다. Fig. 5에서와 같이 Avicelase의 흡착이 발열반응임을 알 수 있다. 그러나 CMCase의 경우(Fig. 6)에는 낮은 온도에서 흡열반응의 기울기를 보인 반면에 높은 온도에서는 반대의 기울기를 보여주어, 흡착반응을 열역학적으로 간단히 설명하기 어렵다. 이러한 결과는 높은 온도에서의 CMCase에 의한 셀룰로오스의 비결정성 부분의 부분적인 가수분해 때문인 것으로 생각된다. 왜냐하면, 흡착과정에서 이러한 가수분해반응은 효소를 탈착시키거나 기질의 물리화학적 특성을 변화시킬 수 있기 때문이다. 반면에 Avicelase의 경우에는 실험조건 하에서 흡착에 영향을 주는 가수분해가 일어나지 않는 것으로 보인다. 흡착실험이 보다 높은 온도에서 진행되는 경우에는 흡착현상 이외의 변화를 고려해야 할 것이다. 여기서는 낮은 온도 영역에서의 흡착에 대한 열역학적 상수를 구하여 Table 2에 요약하였다. 얻어진 결과로부터 효소의 흡착이, CMCase의 흡착은 엔트로피( $\Delta S$ )의 증가에 의존하는 반면, Avicelase의 흡착은 주로 엔탈피( $\Delta H$ )의 감소에 의존함을 알 수 있었다. CMCase보다 Avicelase의 기질에 대한 친화력이 더 크다는 것으로부터 알 수 있다. 또한 CMCase의 흡착이 양의  $\Delta S$ 값을 갖는 이유는 효소구조의 변화나 용매에 의한 영향으로 볼 수 있다. 이와 같은 결과를 종합할 때 셀룰로오스의 효소적 가수분해반응에 있어서 가수분해반응 초기에 두 효소는 기질의 물리화학적 특성에 따라 서로 다르게 흡착할 것이고, 이러한 흡착의 차이는 가수분해반응의 속도에 영향을 미치게 될 것이다. Klyosov 등[6]이 언급한 바와 같이 endoglucanase의 흡착력은 가수분해반응의 속도에 직접 비례하며, 더욱이 흡착의 세기가 결정성 셀룰로오스의 가수분해에서의 협력작용에 밀접하게 관계되어 있음을 생각할 때 효소의 흡착에

관한 결과는 가수분해반응 메카니즘의 구명에 필수적인 연구분야가 될 것이다.

## 4. 결 론

셀룰라아제를 Avicelase와 CMCase로 분리하여 셀룰로오스에 대한 이들의 흡착특성을 조사한 결과, Avicelase는 기질의 결정성에 크게 의존하였으나 CMCase는 기질의 표면적에 의존함을 알 수 있었다. 그리고 온도에 따른 흡착평형상수(K)의 값을 구하여 얻어진 열역학적 파라미터로부터 Avicelase의 흡착이 흡착엔탈피( $\Delta H$ )에 의존하고 CMCase의 흡착은 흡착엔트로피( $\Delta S$ )에 의존함을 알았다.

## 감 사

본 연구는 한국과학재단 기초연구비 지원(1989-1991년도, 과제번호 001-1005-024-2)에 의해 이루어진 연구 결과로서 당 재단에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Ladisch, M. R., Lin, K. W., Voloch, M. and Tsao, G. T.: *Enzyme Microb. Technol.*, **5**(2), 82(1983).
2. Wood, T. M. and McCrae, S. I.: *Adv. Chem. Ser.*, **181**, 181(1979).
3. Beldman, G., Volagen, A. G. J., Rombouts, F. M. and Pilnik, W.: *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 173(1988).
4. Wood, T. M. and McCrae, S. I.: *Biochem. J.*, **171**, 61(1978).
5. Ghose, T. K. and Bisaria, V. S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 131(1979).
6. Klyosov, A. A., Mitkevich, O. V. and Sinitsyn, A. T.: *Biochemistry*, **25**, 540(1986).
7. Fan, L. T. and Lee, Y. H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2707(1983).
8. Lee, S. B., Shin, H. S., Ryu, D. D. Y. and Mandels, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 2137(1982).
9. Ooshima, H., Sakata, M. and Harano, Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1727(1986).
10. Fan, L. T., Lee, Y. H. and Beardmore, D. H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 177(1980).
11. Ooshima, H., Sakata, M. and Harano, Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 3103(1983).
12. Tanaka, M., Ikesaka, M., Matsuno, R. and Converse, A. O.: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 698(1988).
13. Kim, D. W., Yang, J. H. and Jeong, Y. K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 148(1988).

14. Kim, D. W., Rhee, N. K., Lee, J. H. and Kim, T. S.: *Bulletin of the Natural Science*(Chungbuk National University), **3**, 73(1989).
15. Ryu, D. D. Y., Kim, C. and Mandels, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 448(1984).
16. Kyriacou, A., Neufeld, R. J. and Mackenzie, C. R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 631(1989).
17. Beldman, G., Voragen, A. G. J., Rombouts, F. M., Searle-van Leeuwen, M. F. and Pilnik, W.: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 251(1987).
18. Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E. and Conrad, C. M.: *Textile Res. J.*, **29**, 786(1959).
19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. E. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
20. Berghem, L. E. R. and Pattersson, L. G.: *Eur. J. Biochem.*, **37**, 21(1973).
21. Beldman, G., Searle-van Leeuwen, M. F., Rombouts, F. M. and Voragen, F. G. J.: *Eur. J. Biochem.*, **146**, 301(1985).
22. Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19(1952).
23. Stuart, J. Y. and Ristroph, D. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1056(1985).
24. Klyosov, A. A.: *Biochemistry*, **29**, 10577(1990).