

반응표면분석법을 이용한 알파셀룰로오스 가수분해 반응조건 최적화

오경근 · 김승욱 · 정용섭* · 홍석인†

고려대학교 화학공학과

*전북대학교 식품공학과

(1995년 5월 4일 접수, 1995년 9월 27일 채택)

Optimization of Operation Conditions for the Hydrolysis of Cellulose by Response Surface Methodology

Kyeong-Keun Oh, Seung-Wook Kim, Yong-Seob Jeong* and Suk-In Hong†

Dept. of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

*Dept. of Food Sci. and Tech., Chonbuk Nat'l University, Chonju 560-756, Korea

(Received 4 May 1995; accepted 27 September 1995)

요 약

환원당의 농도를 극대화시키기 위하여, 반응표면분석법을 이용하여 섬유소 가수분해 반응조건을 최적화 시키고자 하였다. 효소역가, 기질농도, 그리고 반응온도를 독립변수로 선정하였으며, 종속변수로는 환원당 농도와 생산수율(단위효소당 환원당 농도)을 정하고, 분석하였다. 3변수, 3수준, 분류인자 실험계획법에 따라 5가지 스타포인트와 4번의 중심점 반복실험을 포함하여, 모두 17가지 조건에서 실험을 수행하였다. 본 실험에서 얻은 섬유소 가수분해의 최적조건은 효소역가가 274 FPU, 기질농도가 8.9%, 그리고 반응온도는 51°C이었으며, 이 조건에서 최대 환원당 농도, 47.89 g/L를 얻었다.

Abstract—To obtain the maximize the concentration of reducing sugar, optimum operating conditions for the hydrolysis of cellulose was investigated by using the response surface methodology. The independent variables were enzyme activity, substrate concentration and reaction temperature and reducing sugar concentration and production yield(reducing sugar concentration per amount of enzyme) were dependent variables. Following the 3¹-fractional factorial experimental design, 17 experiments were carried out at various conditions, with 5 starpoints and 4 replicates at the center point. The optimum condition for the hydrolysis of cellulose was as follows, enzyme activity; 274 FPU, substrate concentration; 8.9%, and reaction temperature; 51°C. The maximum production of reducing sugar, 47.89 g/L, was obtained in this optimum condition.

Key words: Hydrolysis of Cellulose, Optimization, Response Surface Methodology

1. 서 론

석탄, 석유, 천연가스 등 화석에너지 자원의 유한성과, 이들 연료를 사용하는 데 기인하는 탄산가스 증축에 의해 지구 온난화가 크게 문제가 되고 있어서, 재생산성 자원인 섬유소계 바이오매스로부터 수송 연료용 에탄올을 생산하기 위한 효과적인 기술개발에 대하여 많은 관심이 집중되고 있다. 에탄올은 깨끗하게 연소되는 액체연료로서 수송 연료로서는 가솔린에 가장 유사한 물리적 특성을 가지고 있어서 에너지 파동에 대한 가솔린의 대체에너지로서 뿐만 아니라 일산화탄소의 축적을 줄여 도시의 공기오염문제를 감소시킬 수 있으면서도, 높은 옥탄가를 가지며 발화점이 낮아 가솔린에 비해 성능이 우수한 차세대 에너지로 각광 받고 있다[1].

생물공학이 발달하면서 비교적 온화한 조건에서 적은 양으로 높은 수율을 얻을 수 있는 효소에 의한 당화, 미생물에 의한 에탄올로의 전환에 대한 많은 연구가 실험실에서 이루어져 왔고 공정의 개발 및 유전공학에 의한 발효미생물의 개발로 에탄올 생산가를 크게 낮

출 수 있었다. 그러나 원료가 난분해성이라는 문제점과 바이오매스로부터 에탄올이 생산되기까지의 전처리, 당화, 발효, 정제 등 여러 단계의 공정을 거쳐야 하기 때문에 아직까지는 공업화되지 못하고 있는 형편이다[2-4]. 이러한 에탄올의 생산가를 낮추기 위해서는 섬유소로부터 에탄올의 생산수율을 최대화시켜야 하며, 이를 위해 끊임없는 공정개발을 통해 전처리 기술뿐만 아니라 발효시간 단축, 효소생산비 절약, 그리고 교반이나 전처리에 요구되는 에너지를 최소화시켜야 한다.

생물공학적 에탄올 전환공정을 비교해 보면 분리당화발효(SHF: separate hydrolysis and fermentation)는 1차적으로 섬유소를 효소에 의해 가수분해시켜 당을 생산하는 당화 공정과 생산된 당을 이용하여 에탄올로 전환시키는 미생물 발효공정 두 단계를 각각 분리해서 수행하는 반면 동시당화발효(SSF: simultaneous saccharification and fermentation)는 이러한 연속적인 공정들을 하나의 반응기에서 동시에 수행하는 공정이다. 효소에 의해 섬유소 물질이 당화가 될 때 가장 커다란 문제점으로 생성물 억제 효과를 들 수 있는데 이는 생산

된 셀로바이오스나 포도당이 효소의 생산성을 저해하므로 당화 효율을 크게 감소시킨다. 동시당화 발효공정은 이러한 셀로바이오스나 포도당이 생산되는 즉시 미생물 발효를 통해 에탄올로 전환되므로 생성물에 의한 효소의 생산성 저해를 크게 감소시킬 수 있기 때문에 분리 당화발효공정에 비해 높은 반응속도와 수율을 얻을 수 있다. 또한 당화와 발효 두 공정이 한 반응기에서 일어나기 때문에 장치비 및 유틸리티 비용을 절감할 수 있으며 반응기내에 에탄올이 존재하기 때문에 미생물에 의한 오염문제를 감소시킬 수 있는 장점을 가지고 있다[5-8]. 그러나 동시당화발효공정은 당화와 발효의 최적조건이 서로 다르기 때문에 이러한 조건들의 최적화가 먼저 선행되어야 한다는 과제를 남기고 있다. 분리당화발효 또는 동시당화발효 두 공정 모두 높은 당 생산성이 요구되며 특히 동시당화발효공정에서 속도결정 단계는 역시 당화반응이 된다.

본 연구에서는 생물공학적인 에탄올 생산을 공업화시키기 위한 첫 단계로 섬유소 가수분해 반응에 있어 당의 생산을 최대화시키는데 목적을 두었으며 중요한 공정 변수인 효소역가, 기질농도 그리고 반응온도들 간의 상호 영향을 관찰하고, 당생산성을 최대화시키기 위하여 반응표면분석법(response surface methodology)을 도입하여 섬유소 가수분해 공정조건을 최적화시키고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 효소

효소는 *Trichoderma reesei* 변이 균주에 의해 생산된 상업용 효소인 Celluclast 1.5 L(Novo Co., Denmark)와 β -glucosidase를 강화한 Novozym 188(Novo Co., Denmark)을 사용하였다. 효소 역가는 단위 가용성 단백질 함량당 각각 33.0 FPU/mg, 62.2 CBU/mg이었으며, Celluclast 1.5 L은 19 FPU/ml, Novozym 188은 20 CBU/ml가 되도록 citrate buffer(pH 4.8)로 희석하여 사용하였다.

2-2. 기질

효소에 의한 당화반응의 기질로 이용된 섬유소는 순수한 섬유소인 α -cellulose(Sigma Co. Germany)를 사용하였다. 섬유소는 citrate buffer와 혼합하여 pH 4.8로 조절하여 섬유소 슬러리를 만든 다음 최대의 수화를 위해 가수분해 반응에 앞서 12시간 동안 진탕배양기에서 교반시켰다.

2-3. 분석

섬유소 가수분해 효소의 역가는 DNS 방법에 의해 환원당 농도를 측정하여 결정하였으며[9-11], β -glucosidase의 역가는 15.0 mM 셀로바이오스를 기질로 하여 효소 1 ml를 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시킨 다음 생성된 포도당 농도를 측정하여 그 역가를 결정하였다. 포도당은 포도당 측정용 시약[영동제약(주)]을 이용해 GOD-POD 효소법으로 0.02 ml의 당화액에 glucose oxidase 3 ml를 첨가하여 37°C에서 18분간 반응시킨 다음 505 nm에서 흡광도로 포도당의 농도를 결정하였으며[12] 셀로바이오스는 DNS 방법에 의해 얻어진 환원당 농도에서 포도당의 농도를 뺀 값을 그 농도로 결정하였다[13].

2-4. 섬유소 가수분해 최적화

효소를 이용하여 섬유소를 가수분해시키는 당화반응은 250 ml 플라스크에 섬유소와 citrate buffer(pH 4.8)를 실험조건에 따라 100 ml의 슬러리로 만들어 진탕 배양기(B. Braun Co., Germany)에서 반응시켰다. 이때 진탕 배양기의 회전속도는 200 rpm이었으며 온도는 실험조건에 따라 38-55°C까지 변화시켜 당화 반응을 수행하였다. 예

비실험을 통해 섬유소의 가수분해 반응속도에 효소의 역가 그리고 기질의 농도가 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며, 이 외에 반응온도 또한 반응속도에 대한 중요한 변수가 될 수 있을 것으로 생각되어 이 세 가지 공정 조건들을 독립변수로 하여 이들 변수들간의 상호작용을 관찰하고 당 생산성을 최대화시키기 위하여 반응표면분석법(RSM: response surface methodology)을 이용하여 당화반응 조건을 최적화시키고자 하였다.

2-5. 실험계획 및 결과분석

실험계획은 Table 1에서처럼 3변수 3수준 분류인자 설계(3^3 -fractional factorial design)에 따라 5 스타포인트와 4 중심점 반복실험을 포함하여 17가지 조건에서 실험을 수행하였다. 이 실험계획은 적은 실험 횟수로 각각의 독립변수에 대하여 5개의 수준에서 실험할 수 있는 장점이 있으며 2차 다항회귀 모형을 적합시키는데 적절하게 이용할 수 있다.

실험결과는 RSREG(SAS: statistical analysis system, SAS institute U.S.A)를 이용하여 통계적으로 분석되어 종속변수(환원당농도, 단위 효소당 환원당 생산성)에 대한 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 반응조건들에 대한 상호영향 및 최대 환원당 생산을 위한 최적반응조건을 구하였다[14-19].

3. 결과 및 고찰

3-1. 섬유소 가수분해효소의 역가가 당화에 미치는 영향

기질과 완충용액 및 효소액으로 구성된 100 ml의 슬러리 중 효소

Table 1. Three-variables, three-level fractional factorial design for response surface methodology

Level	Cellulase activity (FPU)	Substrate concentration (%)	Temperature (°C)
α	309	9.8	55
1	285	9	53
0	228	7	50
-1	171	5	47
$-\alpha$	147	4.2	45

Run no.	X(1) ^{a)}	X(2) ^{b)}	X(3) ^{c)}
1	-1	-1	-1
2	1	-1	1
3	-1	1	1
4	1	1	1
5	-1	1	1
6	1	-1	1
7	-1	-1	1
8	1	1	1
9	$-\alpha$	0	0
10	α	0	0
11	0	$-\alpha$	0
12	0	α	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	$-\alpha$

^{a)}X(1): cellulase activity

^{b)}X(2): substrate concentration

^{c)}X(3): temperature

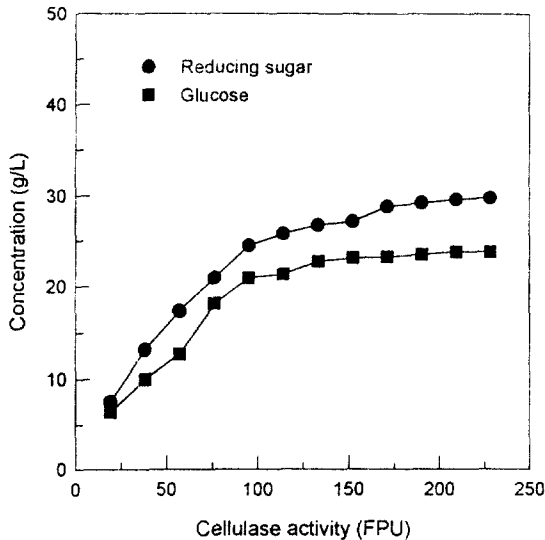


Fig. 1. Effect of cellulase activities on the hydrolysis of α -cellulose.

의 양을 1-12 ml(19-228 FPU)까지 1 ml씩 변화시켜 가면서 당화 반응을 수행하였다. 이때 기질의 농도는 50 g/L이고 반응온도는 38°C였으며 β -glucosidase 역가는 20 CBU로 고정시키고 반응시켰으며 반응 최종시간을 50시간으로 하여 그때의 환원당 및 포도당 농도를 측정하여 효소 농도가 당화반응에 미치는 영향을 비교하였다. Fig. 1에 나타난 것처럼 환원당 농도는 초기 7.57 g/L에서 29.93 g/L까지 증가되었으며 포도당 역시 6.40 g/L에서 24.93 g/L까지 증가되었다. 그러나 효소의 양이 증가함에 따라 환원당 및 포도당 생성량은 쌍곡선 형태로 증가하였으며, 19 FPU에서 100 FPU까지는 비례적으로 당화속도가 증가되었으며 100 FPU에서 171 FPU까지는 다소 완만하게 그리고 171-228 FPU까지는 당화속도는 크게 변화하지 않는 것으로 나타났다.

3-2. β -Glucosidase 첨가에 따른 당화속도의 변화

환원당 중 포도당 분율은 대개의 경우 80% 내외가 된다. 섬유소 가수분해 효소만을 이용해 당화하는 경우는 셀로바이오스에 의한 효소억제 효과가 있을 것으로 생각되며 Kautola 등[19] 결과에 의하면 포도당에 의한 억제효과보다 셀로바이오스에 의한 억제 효과가 더 심각하므로 β -glucosidase를 첨가하여 셀로바이오스를 포도당으로 전환시켜 효소의 생성물 억제 효과를 줄이는 가능성을 검토하였다. 또한, 섬유소 가수분해 효소 역가가 낮은 범위(19-100 FPU)에서 환원당 중 포도당의 분율이 80-91%이었지만 섬유소 가수분해 효소 역가가 높은 범위에서 포도당의 분율이 약 73%를 차지하므로 포도당의 분율을 높이기 위해 섬유소 가수분해 효소 역가를 228 FPU로 고정하고 다음 β -glucosidase 역가를 40-100 CBU까지 변화시켜 가면서 당화반응을 수행한 결과 Fig. 2에서 보여주는 것처럼 50시간 이후 80시간까지 거의 비슷한 환원당을 생산하여 β -glucosidase를 첨가하였을 경우 당 생산성을 증가시킬 수는 있지만 β -glucosidase 첨가에 의한 당 생산성 증가는 크게 제한받는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 β -glucosidase가 생성물인 포도당에 의해 작은 양에도 쉽게 억제 효과를 받는 것으로 사료된다.

3-3. 당화반응에 미치는 기질의 영향

일반적으로 높은 전환율을 얻을 수 있는 기질의 농도는 5%로 알려져 있다. 그러나 5%의 기질을 이용하였을 때 최대의 당화가 이루어진다 하더라도 당농도는 2.5-3%에 불과하므로 효율적인 에탄올

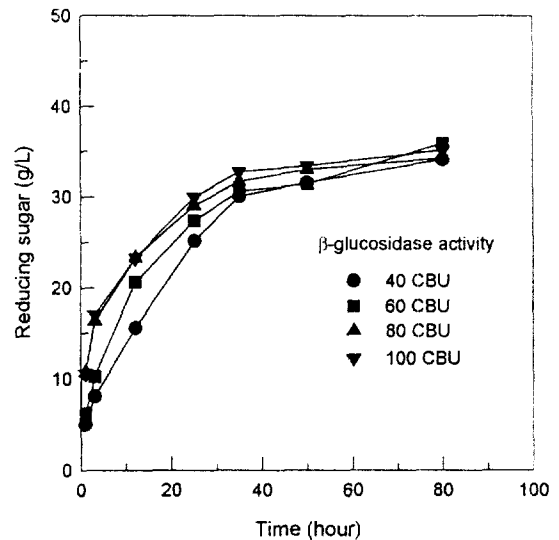


Fig. 2. Effects of the various activities of β -glucosidase on the hydrolysis of α -cellulose (cellulase activity: 228 FPU).

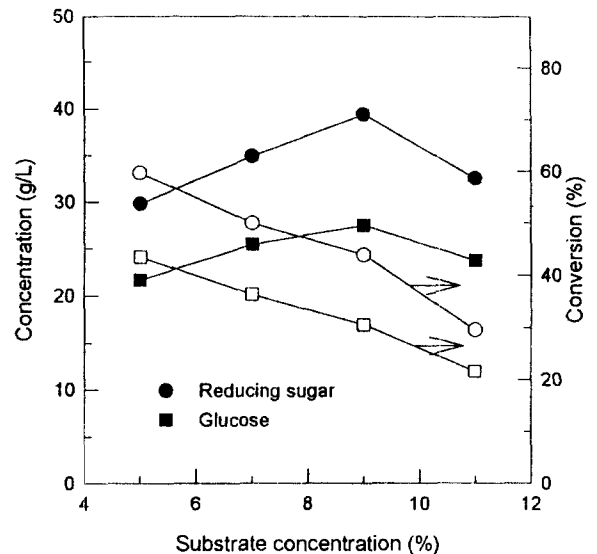


Fig. 3. Effects of substrate concentration on the hydrolysis rate and conversion (cellulase activity: 228 FPU).

발효가 어려운 것이 문제점으로 남아 있다. 따라서 전환율은 다소 떨어지더라도 환원당의 농도를 높이기 위해서는 효소뿐만 아니라 기질농도의 영향도 클 것으로 판단된다. 따라서 기질의 농도를 5%에서 11%까지 변화시켜 당화반응을 수행한 결과 Fig. 3에서처럼 80시간을 기준으로 5%일 때 환원당의 농도가 33 g/L에서 9%일 때는 42 g/L로 27%가 증가하였으며 포도당 농도 역시 5%일 때 23 g/L에서 9%일 때는 30 g/L로 30%가 증가됨을 알 수 있었다.

기질농도가 9%이상일 때를 고려해보면 초기 반응속도는 다소 떨어지고 중기 이후에는 당화액의 점도가 감소하여 11%일 때 9%일 때와 비교하여 다시 높아질 것으로 생각되었지만 결과는 오히려 반대현상을 나타내었다(Fig. 4). 즉 기질농도가 11%일 때를 고려해보면 초기 30시간까지는 반응속도가 더 높았지만 그 이후에는 9%와 7%일 때를 비교하여 오히려 반응속도가 더 낮아지는 현상을 보였다. 따라서 이같이 9%를 넘어서 오히려 반응속도가 떨어지는 현상은 혼합 이외에 기질 억제효과의 영향으로 생각된다. 또한 높은 농

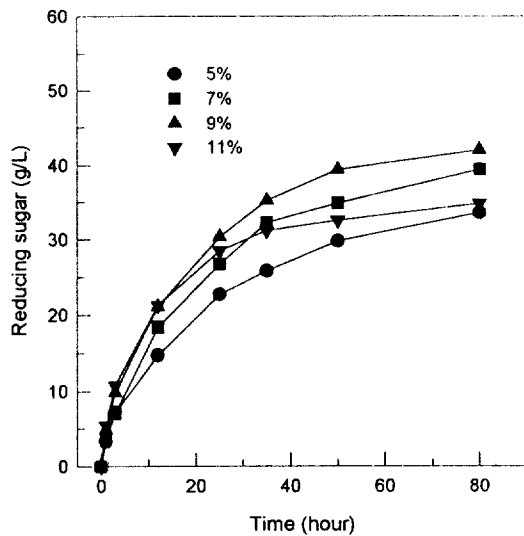


Fig. 4. Hydrolysis curves for various concentration of α -cellulose (cellulase activity : 228 FPU).

Table 2. Experimental results under various conditions

Run no.	Experimental conditions			Experimental results	
	X(1)	X(2)	X(3)	R.S.(g/l) ^{a)}	Y ^{b)}
1	-1	-1	-1	30.00	3.33
2	1	-1	-1	33.86	2.26
3	-1	1	-1	38.43	4.27
4	1	1	-1	44.86	2.99
5	-1	-1	1	42.30	4.70
6	1	-1	1	34.20	3.80
7	-1	1	1	40.80	2.72
8	1	1	1	46.00	3.07
9	$-\alpha$	0	0	36.71	4.70
10	α	0	0	44.14	2.72
11	0	$-\alpha$	0	31.71	2.64
12	0	α	0	46.14	3.85
13	0	0	0	42.71	3.56
14	0	0	0	43.00	3.58
15	0	0	0	43.29	3.61
16	0	0	0	42.70	3.56
17	0	0	$-\alpha$	40.20	3.35

^{a)}R.S.: Reducing sugar concentration of hydrolysate at 50 hours.

^{b)}Y: Production yield for cellulase in the hydrolysis of cellulose during 50 hours.

{Reducing sugar(g/L)/Enzyme concentration(ml)}

Table 3. Regression equations^{a)} and coefficients for response surface

Coefficient	Parameter estimate	
	Reducing sugar concentration	Productivity of cellulase
β_0	42.925***	3.578***
β_1	21.190***	-0.655***
β_2	4.830***	0.386***
β_3	1.417***	-0.180***
β_{11}	-1.250***	0.066
β_{12}	0.560	-0.095**
β_{22}	-2.001***	-0.166
β_{13}	-0.601	0.045***
β_{23}	-0.164	0.053
β_{33}	-1.470**	-0.850
R-square	0.9954	0.9949
Prob > F	0.0000	0.0000

^{a)}Regression equations :

$$\text{Response } Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{33} X_3^2$$

Where, Y=R.S. or P

X1 : coded value for cellulase activity

X2 : coded value for substrate concentration

X3 : coded value for temperature

P < 0.05, *P < 0.01

도의 기질에서 환원당의 생산은 증가시킬 수 있었지만 전환율은 5%의 기질농도에서 60%를 나타낸 반면 9%에서는 45%까지 전환율이 낮아지는 것으로 관찰되어 Fig. 3에서 보여주는 것처럼 섬유소 전환율에 반비례함을 알 수 있었다.

3.4. 당화반응 결과

각각의 독립변수들을 실험계획에 따라 변화시켜 50시간 동안 당화반응을 수행하여 그 당화액의 환원당 농도를 측정하였으며, 생산된 환원당 농도를 첨가된 효소의 양(ml)으로 나누어 효소 1 ml당 환원당 생산성을 측정하였다. Table 2에서 보여주는 것처럼 효소의 역가가 높은 범위(285-309 FPU)에서 환원당은 33.86-44.14 g/L의 값을 얻었으며 이때의 효소에 대한 생산수율은 2.26-3.80 g/L/ml을 얻었다. 효소의 역가가 상대적으로 낮은 범위(147-171 FPU)에서는 환원당 농도는 30-42.30 g/L를 나타냈으며 이때의 효소에 대한 생산수율은 2.72-4.79 g/L/ml까지 약간 높은 값을 얻었다. 기질의 농도가 높은 범위(9-9.8%) 38.43-46.14 g/L의 환원당 농도를 얻었고 낮은 기질농도 범위(4.2-5%)에서는 31.71-40.80 g/L의 환원당을 얻을 수 있었다. 반응온도가 높은 범위(53-55°C)에서는 34-46.00 g/L의 환원당을 생

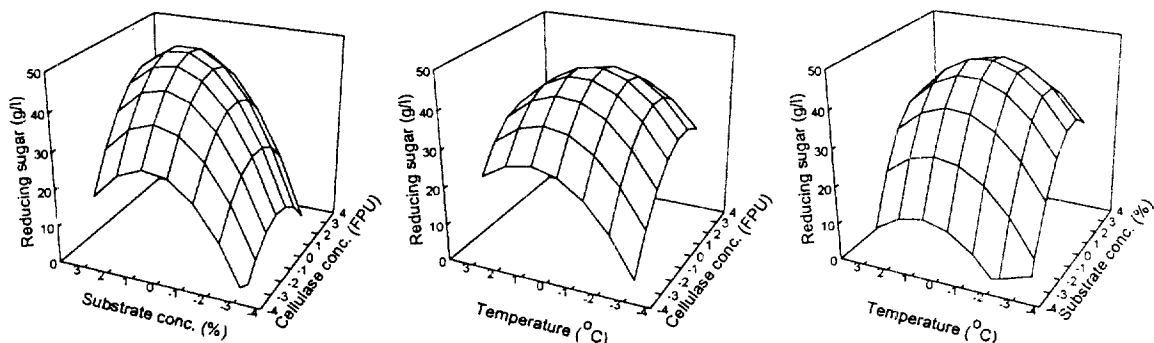


Fig. 5. Response-surfaces for the independent variables, substrate concentration, temperature, cellulase activity, showing the cross-influence in the production of reducing sugar.

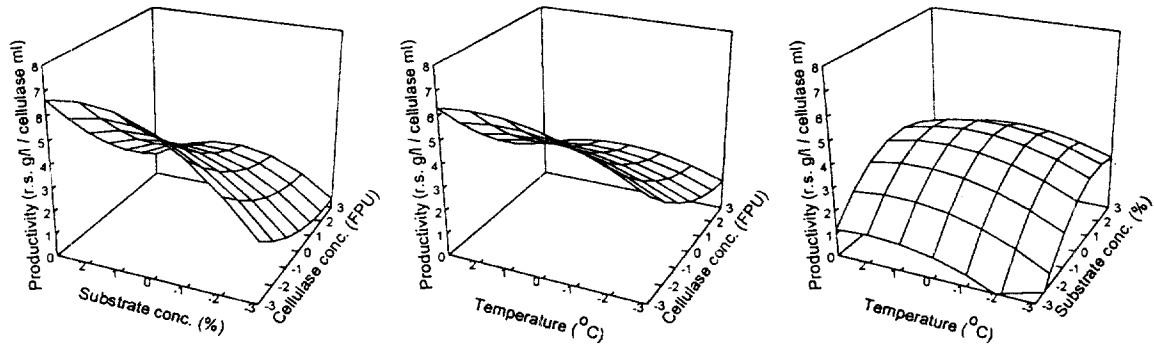


Fig. 6. Response-surfaces for the independent variables, substrate concentration, temperature, cellulase activity, showing the cross-influence in the reducing sugar yield.

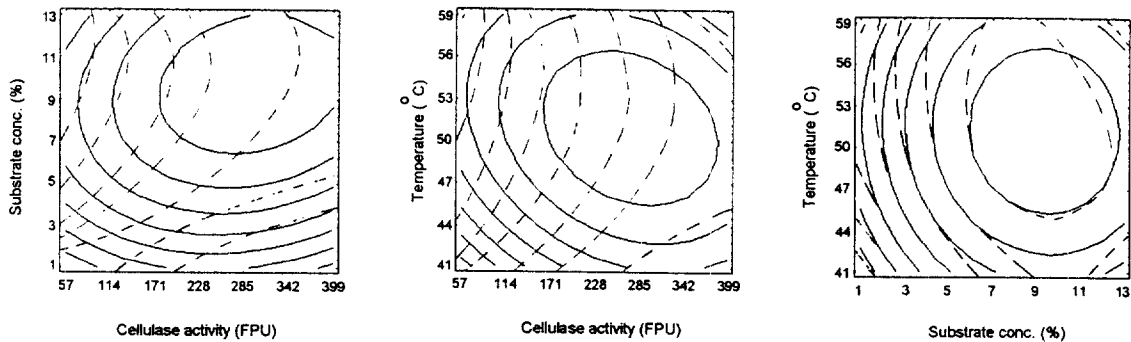


Fig. 7. Feasible region for production of reducing sugar.

Production of reducing sugar: —, Reducing sugar yield: ---

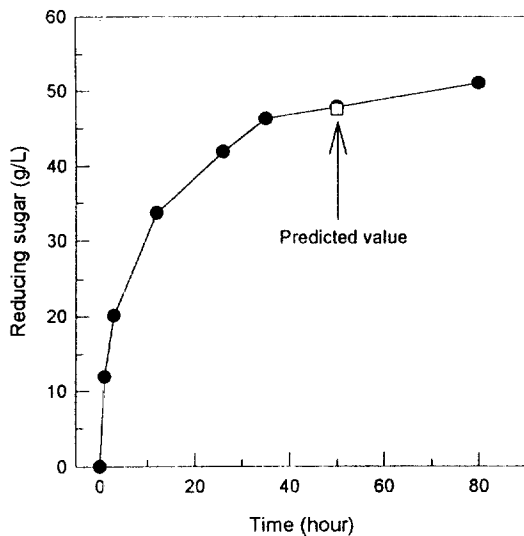


Fig. 8. Hydrolysis of α -cellulose at optimum conditions; cellulase activity: 274 FPU, substrate concentration: 8.9%, temperature: 51°C.

산하였으며 낮은 반응온도(45-47°C)에서는 30-44.86 g/L의 환원당 농도를 얻었다.

3-5. 반응표면 방정식 및 계수 결정

당화반응의 결과를 다중회귀분석을 통하여 반응표면방정식 계수를 결정하였으며, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 유의성 검증, 적합결여 및 잔차분석 등을 해석한 결과 모든 실험자료들이 95% 이상

의 신뢰도를 가졌으며, 반응표면분석결과 Fig. 5에서 보여주는 것처럼 환원당 농도에 대해서는 최고점에서 최적 반응표면을 얻었지만 효소에 대한 생산수율에 대해서는 Fig. 6과 같이 기질 농도와 반응온도간의 결과를 제외하면 안부점을 얻었기 때문에 효소의 생산수율에 대해서는 최적화시키지 못하였다. 이것은 효소에 대한 생산수율이 당생산성이 다른 조건들보다는 효소의 농도에 의존하기 때문으로 우선 당의 생산을 최대화시키고 Fig. 7에서처럼 허용되는 효소의 범위를 맞추는 방법밖에는 없다고 생각된다. 효소의 양, 기질의 농도 그리고 반응온도 모두 비슷한 정도로 당화속도에 영향을 미치지만, 그중 기질의 농도에 가장 민감함을 알 수 있었다.

3-6. 공정조건 최적화

Fig. 8은 앞에서 얻은 공정의 최적조건을 이용하여 실제로 당화반응시켜 얻은 환원당 농도를 시간에 따라 나타낸 것이다. 본 연구에서 얻은 최적공정 조건은 효소역가가 274 FPU, 기질의 농도가 8.9%, 반응온도가 51°C이었으며, 50시간 경과후 당화액의 환원당 농도는 47.89 g/L로 통계 분석된 예상값 47.58 g/L와 거의 일치하는 값을 얻었다.

4. 결 론

반응표면분석법을 이용하여 섬유소 가수분해 공정 조건을 최적화시키고자 하였다. 이때 선정된 공정의 독립변수로는 효소역가, 기질 농도, 그리고 반응온도이었으며 이에 대한 종속변수로는 환원당 농도와 효소 수율을 선정하였다. β -Glucosidase의 첨가는 가수분해 반응속도를 증가시킬 수는 있었지만 생산된 포도당에 의해 크게 제한을 받았기 때문에 반응전체에는 커다란 영향을 미치지 않았다. 효

소 수율에 대해서는 다른 공정 변수들에 비해 효소 역가에 너무 크게 의존하기 때문에 최적화시키지 못하였지만, 환원당 농도를 최대화시킬 수 있는 조건으로는 효소역가: 274 FPU, 기질농도: 8.9%, 그리고 반응온도: 51°C를 얻었으며 이 조건에서 50시간 동안 가수분해하여 얻은 환원당 농도는 47.89 g/L로 매우 높은 값을 얻었다. 통계적 분석에 이용된 자료들은 유의성 검증, 적합결여, 그리고 잔차 분석 등을 해석한 결과 모든 자료가 95% 이상의 신뢰도를 가지므로 매우 유익한 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 에너지자원기술개발지원센터의 지원(1994)에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참고문헌

1. Nowell, G. P.: *Energy Policy*, Sept., 652(1990).
2. Ghose, T. K., Roychoury, P. K. and Ghosh, P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 377(1984).
3. Takagi, M., Abe, S., Suzuki, S., Emert, G. H. and Yata, N.: *Proceedings, Bioconversion Symposium, IIT*, 551(1977).
4. Wright, J. D.: *Chem. Eng. Prog.*, 62(1988).
5. Okazaki, M. and Moo-young, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 637 (1978).
6. Holtzapple, M. T., Caram, H. S. and Humphery, A. E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 775(1984).
7. Philippidis, G. P., Smith, T. K. and Wyman, C. E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 846(1993).
8. Spindler, D. D., Wyman, C. E. and Grohmann, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 189(1989).
9. Ghose, T. K.: *Pure & Appl. Chem.*, **59**(2), 257(1987).
10. Lee, J. M.: "Biochemical Engineering", Prentice Hall, New Jersey, p.94(1992).
11. Miller, G. L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426(1959).
12. Bergmeyer, H. U. and Bernt, E.: *Methods of Enzymatic Analysis*, **13**, 1205(1974).
13. Huang, S. Y. and Chen, J. C. J.: *Ferment. Technol.*, **66**(5), 509 (1988).
14. Oh, K. K., Jung, H. W., Park, J. Y., Lim, J. K. and Kim, J. C.: *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **25**(1), 1(1993).
15. Sattler, W., Esterbauer, H., Glatter, O. and Steiner, W.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1221(1989).
16. Kautola, H., Gronlund, B., Horitsr, H., Linko, Y.-Y. and Linko, P.: *Proc. 4th European Congress on Biotechnology*, **1**, 106(1987).
17. Kautola, H., Vassilev, N. and Linko, Y.-Y.: *J. of Biotechnol.*, **13**, 315(1990).
18. Box, G. E. P., Hunter, G. and Hunter, J. S.: "Statistics for Experimenters", John Wiley & Sons, N.Y., p.510(1978).
19. Kautola, H., Vassilev, N. and Linko, Y.-Y.: *Biotechnol. Lett.*, **11**(5), 313(1989).