

## 펩신의 固定化에 관한 研究

朴 鍾 來

慶北大學校 農科大學 酪農學科

### A Study on Immobilization of Pepsin

Park, Jong Lae

Dept. of Dairy Science, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Several enzyme immobilization methods has been compared for immobilization of pepsin. Carboxymethyl cellulose and diethylaminoethyl cellulose were activated with HCl and with NaOH, and were used for immobilization of pepsin. Sepharose-4B was activated cyanogen bromide, and was used for immobilization of pepsin. Porous glass beads were derivatized with 3-aminopropyltriethoxysilane and with succinicanhydride, and were used for immobilization of pepsin.

The results obtained were summarized as follow,

1. 10 mg/gr. dry bead and 15 mg/gr. dry bead of pepsin were absorbed to CM-cellulose and DEAE-cellulose, 20 mg/gr. dry bead and 27 mg/gr. dry bead were coupled to CM-cellulose and DEAE-cellulose with glutaraldehyde respectively. Enzyme yields were 22 % and 24 % of soluble pepsin.
2. 16 mg/gr. dry bead of pepsin was attached to cyanogen bromide activated sepharose-4B, 19mg/gr. dry bead was cross linked to the activated bead with glutaraldehyde. Immobilized enzyme activity was 23 % of soluble pepsin.
3. 40 mg/gr. dry bead of pepsin was conjugated to the derivatized glass beads. Immobilized enzyme activity was 45 % of soluble pepsin.

### 結 論

食品工業, 製藥, 化學, 農業 그리고 醱酵工業 等에서 유기촉매로서 주요한 機能을 하고 있는 酵素를 自然으로부터 순수하게 分離하기까지에는 많은 시간과 노력이 所要되고 生産된 酵素라 할지라도 용액내에서 溶解상태로 存在할 경우에만 酵素로서의 機能을 發揮하

기 때문에 한번 사용한 酵素는 基質과 生産物과 같은 용액내에 混合된 상태로 存在하고 있음으로 용액으로부터 分離하여 酵素를 再利用하는 것이 어려울 뿐 아니라, 反應후, 生産物내에 殘存하는 일부 酵素가 필요 이상의 反應을 일으킴으로 生産物의 品質을 低下시키는 要因이 되기도 하며, 경우에 따라서는 生産物이 酵素作用에 抑制要因이 되고 있어 계속적인 酵素作用이 不可

能해지며, 사용하는 酵素의 순수程度에 따라 精製過程에 混合되어 있는 異物質이 生産物의 品質을 阻害하는 등, 용해상태의 酵素를 사용하는데는 여러가지의 어려움이 發生하고 있음으로 이러한 諸問題들을 解決하기 위하여 지금까지 수많은 노력을 하여왔다.<sup>14, 16)</sup>

용해상태의 蛋白質을 不溶解性의 支持劑를 이용하여 固定化 蛋白質로 만들기 위한 노력은 1930 년대에 Chacoal, Kaolin, Cellulose 등에 蛋白質을 吸着시키는 데서부터 시작되었으며, 不溶解性의 支持劑에 吸着된 抗原蛋白質을 이용해서 특수抗體를 生産하는데 사용하였다고 報告함으로써 蛋白質의 固定化方法에 대하여 더 많은 관심을 기울이게 되었다.<sup>9)</sup>

酵素는 그 크기에 따라 수십내지 수백의 아미노酸으로 되어있는 polypeptide의 일종으로서 3 차구조를 이루고 있고, 그중 일부분만이 酵素作用에 關與하는 活性中心을 이루고 그의 대부분의 아미노산들은 酵素의 3 차구조를 安定하게 形成하여 酵素作用을 間接적으로 돕고 있는 것으로 알려지고 있음으로 酵素蛋白質도 活性中心에 變化를 주지 않는 상태로 分離가 容易하고 取扱하기 쉬운 不溶解性 支持劑에 結合시켜 固定化 상태로 사용함으로써 溶解性 酵素의 사용시에 發生하는 여러가지의 어려움을 解決할 수 있는 가능성을 示唆하게 되었다.

지금까지 固定化 酵素에 關한 研究는 수없이 報告되고 있지만 酵素의 1 차구조 내지 3 차구조의 特性에 따라 固定化방법이 다를뿐 아니라 사용하는 支持劑와 基質과 生産物의 性質에 따라서도 固定化방법이 달라져야 되는 것으로 報告되고 있음으로, L-amino alylase, glucose isomerase 등 몇몇 酵素를 제외하고는 産業적으로 固定化酵素의 이용가치를 높게 하기까지에는 새로운 支持劑의 開發, 固定化 技術의 改善등 아직도 여러가지의 問題點이 남아있는 것으로 報告되고 있다.<sup>22)</sup>

本 研究에서는 固定化 protease를 製造하여 이용하기 위하여 지금까지 研究報告된 固定化 protease의 방법들중에서 實用性이 높은 것으로 評價되는 몇가지 固定化 방법에 따라 蛋白質 分解 酵素를 固定化하였고 그 固定化 酵素를 서로 比較하여 보았다.

## 材料 및 方法

### 1. 實驗材料

○支持劑 : Carboxymethyl cellulose (sigma), Di-

ethylaminoethyl cellulose (Sigma), Sepharose-4 B (Pharmacia, Sweden), Porous glass beads (Sigma)을 使用하였고, 酵素는 pepsin (sigma) 분말을 0.2 M phosphate buffer (pH 4.0)에 溶解하여 사용하였다.

### 2. 試驗方法

가. 酵素의 固定化 : ○ Cellulose beads : Hornby<sup>9)</sup> 등, Valentova (1981)<sup>21)</sup> 등의 방법을 模倣하여 beads를 1M NaOH 용액으로 洗滌한 후 젖은 beads 23 ml를 취하여 1M NaOH 용액 16 ml와 epychlorohydrin 3 ml를 混合한 용액에 沈漬하여 60°C로 加溫하여 2 시간동안 교반한 후 濾過하여 濾過液을 버리고 다시 1 M NaOH 용액 16 ml에 ethylene diamine 0.9 ml와 di-amino hexane 1.5 gr을 溶解한 용액에 濾過된 젖은 beads를 沈漬하여 60°C에서 2 시간 동안 교반한 후 1 M NaOH 용액과 蒸溜水를 차례로 사용하여 中性이 될 때까지 洗滌하였다.

洗滌된 beads 1.0 gr에 glutaraldehyde 10% 용액 5 ml와 酵素液 20 ml (5 mg/ml)을 넣고 그림 1에서 보는 바와 같은 순환장치를 이용하여 4°C에서 24 시간 동안 再循環시키면서 固定化시켰으며 固定化되지 않은 酵素는 0.02 M phosphate buffer pH4.0으로 洗滌하였고, 分析에 사용할 때까지 0.02 M phosphate buffer (pH 4.0)에 sodium azide을 0.06%까지 添加한 용액에 담가 低溫에서 保存하였다.

○ Sepharose 4B : Axen<sup>1, 2)</sup> 등의 방법을 다소 改善하여 sepharose beads를 5M NaOH 용액에 沈漬한 후 上等液을 suction으로 濾過하여 除去시켰다. 젖은 beads 50 ml를 epichloro hydrin 1.5 ml와 NaBH<sub>4</sub> 0.25 gr을 1M NaOH 용액 80 ml에 溶解한 液에 沈漬하여 60°C에서 2 시간 동안 교반한후 suction을 사용하여 濾過하였고 다시 2M NaOH 용액과 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 10.1)로 洗滌하였다. 洗滌된 beads 1gr을 cyanogen bromide sol. (25 mg/ml) 40 ml에 담가 pH 10.1로 調節하여 23 - 25°C에서 20분 동안 活性化시킨 후 다시 0.1 M sodium carbonate 용액 (pH 10.1)으로 洗滌한후 다시 0.02 M sodium phosphate buffer로 세척하였다. 세척된 beads 1gr에 0.5 M phosphate buffer (pH 4.0) 5 ml와 glutaraldehyde 10% 용액 5 ml와 pepsin 용액 20 ml (5 mg/ml)을 동시에 添加하여 그림 1과 같은 순환장치를 사용하여 4°C에서 24 시간 동안 再循環시키면서 固定化시킨후 固

定化 되지않은 酵素는 0.02 M phosphate buffer (pH 4.0)으로 洗滌하였으며 固定化된 酵素는 0.02 M phosphate buffer (pH 4.0)에 0.06 % sodium azide 을 溶解한 液에 沈漬하여 低溫에서 分析에 사용할 때까지 保存하였다.

○有機 porous glass beads: Line et al<sup>12)</sup>, Weetal<sup>24)</sup> (1970)의 방법을 모방하여 5gr 의 glass beads 을 濃 窒酸液으로 100 °C에서 1시간동안 끓인후 蒸溜水로 洗滌하여 100 °C에서 24 시간동안 乾燥한 후, 乾燥된 beads 에 10 % 3-aminopropyltriethoxysilane 용액 15 ml 을 添加하고 pH 7.5 로 調節하여 75 °C에서 30 분간 反應시킨후 상등액을 버리고 反應이 완전히 일어날 수 있도록 하기 위하여 100 °C에서 24 시간동안 乾燥시켰

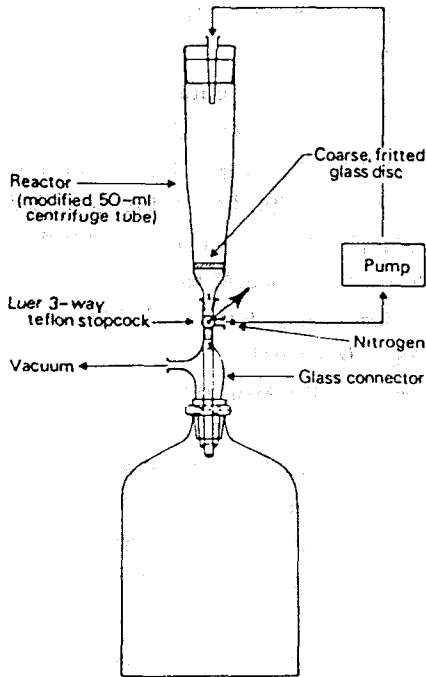


Fig. 1. Schematic of the reactor system used for all immobilization experiments. The glass bottle serves as a reservoir for vacuum-facilitated rapid collection of washes following the activation step. The three-way stopcock allows rapid switching between various steps.

다. 乾燥된 beads (amino propyl glass beads) 1gr 에 succinic anhydride 5gr 와 triethylamine 용액 (아세톤 (23) : triethylamine(1)) 50 ml 을 添加하여 한시간 동안 N<sub>2</sub> gass 로 bubbling 하면서 反應시켰다. 反應이 끝난후 상등액을 버리고 같은 방법으로 反應을 反復하였

고, 蒸溜水로 反應하지 않은 succinic anhydride 가 없어질 때까지 洗滌한 후 24 시간 동안 100 °C 乾燥機 내에서 乾燥시켰다. succineamidopropyl glass beads 2gr (dry base)에 Tris-Hcl buffer pH 4.0 100 ml 을 넣고 眞空상태에서 glass beads 의 공극 사이에 있는 空氣를 除去시킨후 buffer 을 버리고 1 % polyethylen glycol 용액 25 ml 을 glass beads 를 통하여 서서히 흘러 내리게 한후 蒸溜水로 씻어 내었다. 씻어낸 succineamidopropyl glass bead 을 0.1 M EDC 용액 (pH 4.75)에 담가 20 분간 活性化시킨 후 0.02 M phosphate buffer (pH 4.0)로 씻어내었다. 세척한 beads 을 그림 1 과 같은 순환장치에 충전시킨후 펠산용액 20 ml (5 mg/ml)을 4 °C에서 20 시간 동안 채순환시키면서 고정화시켰다. 固定化되지 않은 酵素는 0.02 M phosphate buffer (pH 4.0)로 洗滌한후 固定化 酵素는 0.2 M phosphate buffer 에 Sodium azide 0.06 % 을 溶解한 液에 담가 냉장고 속에 貯藏하였다.

나. 固定化 酵素의 活力 測定 그림 2에서 보는 바와 같이 Taylor<sup>20)</sup>와, Swaisgood 와 Janolino 등<sup>10)</sup>의 방법에 따라 考案된 micro circulation system 을 이용하여 固定化 酵素를 100 ml 정도 micro reactor 에 넣고 Gly-Gly-phe-phe-ethylester 을 0.04 M sodium citrate buffer pH 4.0 에 3mM 濃度로 溶解한 용액

IMMOBILIZED ENZYME REACTOR

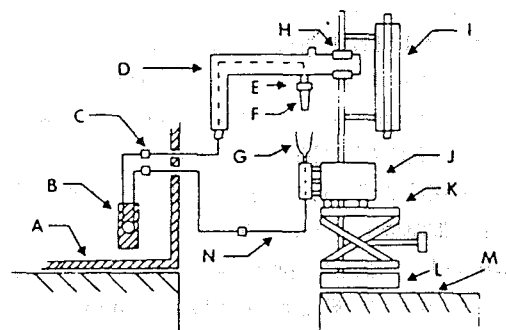


Fig. 2. Differential microrecirculation reactor system. A. UV-VIS spectrophotometer; B. flow-through cuvet; C. Teflon tubing coupling assembly; D. heat exchanger; E. reactor coupler; F. two-prong extension clamp; I. flowmeter; J. Masterflex pump; K. jack support; L. porcelain support stand; M. cart. and N. microbore Teflon tubing.

5 ml 을 30 분간 再循環시키면서 일정한 간격으로 50 ml 씩 취하여 OPA test 를 하였다. reactor 의 溫度는

40 °C로 維持하였다.

다. O-phthalaldehyde reagent (OPA) test : goodno<sup>10)</sup>와 Swaisgood와 Church等<sup>9)</sup>의 방법에 따라 基質(GGPP)로 부터 分離된 遊離 아미노酸의 量을 定量하기 위하여 採取된 試料 50 ml에 1.0 M NaOH 5 ml을 混合하여 중화시킨후 그 中에서 10 ml을 取하여 OPA reagent 3 ml을 混合하여 室溫에서 2분간 反應시킨후 Fluorescence intensity을 測定하였다. OPA reagent는 50 ml의 0.1 N sodium borate에 80 mg의 O-phthalaldehyde (Sigma Co)을 95% ethanol 2 ml에 溶解한 용액, β-mercaptoethanol 200 μl, 20% sodium dodecyl sulfate 용액 5 ml을 混合하고 蒸溜水로 100 ml가 되도록 稀釋하여 使用하였다. (단 이 試藥은 保存性이 없으므로 分析에 使用할 때마다 새로 混合하여 使用하였다.)

라. 窒素化合物의 分析 : 마이크로 켈달 방법과 Lowry의 방법에 따라 folin phenol reagent에 의한 發色程度를 280 nm에서 吸光度의 차이로 分析하였고

albumin을 使用하여 회귀 방정식을 구하고 그에 따라 窒素 化合物의 量으로 產出하였다.<sup>6)</sup>

## 結果 및 考察

가. Carboxymethyl Cellulose와 Diethylamino-ethyl cellulose 가성소다 용액으로 洗滌하고 活性化시킨 CM-cellulose와 DEAG-cellulose에 酵素蛋白質을 직접 吸着시킨 경우와 酵素液에 glutaraldehyde을 添加하여 蛋白質間의 共有結合을 誘導하여 固定화시킨 結果를 서로 比較하였던바 表 I에서 보는 바와 같다. CM-cellulose와 DEAE-cellulose가 다 같이 펩신의 吸着能力이 있는 것으로 나타났으나 그 吸着程度는 낮았으며 glutaraldehyde을 添加함으로써 pepsin의 吸着量이 增加된 것을 알 수 있었다.

glutaraldehyde는 Haynes (1969), Chmiya等<sup>15)</sup>의報告에 따르면 그림 3과 같은 形態로 蛋白質間의 共有結合을 誘導할 수 있으므로 支持劑에 蛋白質의 吸着量을

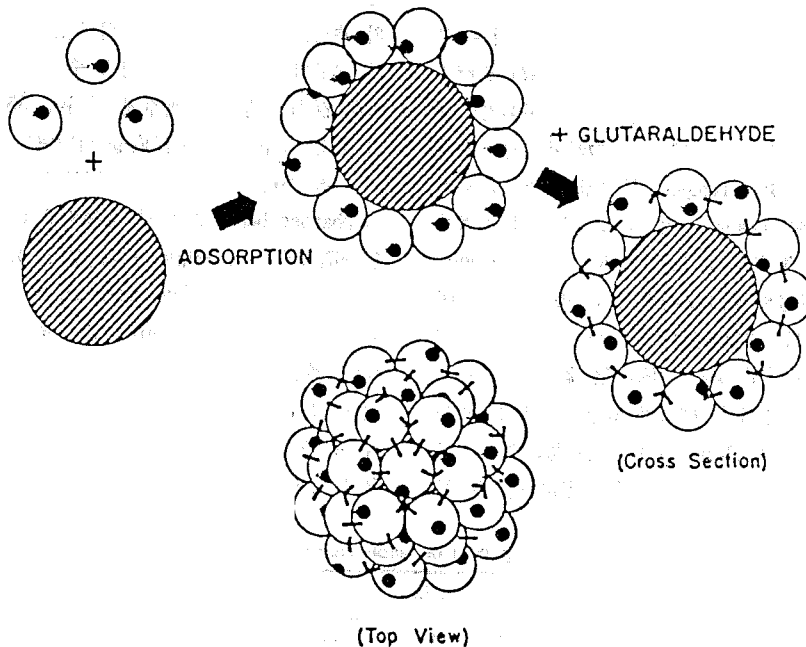


Fig. 3. Schematic representation of the method for preparing insoluble proteins as envelopes on colloidal particles. The shaded area represents the silica particle, the dark circles represent the active sites of a protein with biological activity and the bars represent covalent intermolecular crosslinks.

增加시킬 수 있을뿐 아니라 吸着된 蛋白質의 安定性도 增加시킬 수 있는 것으로 알려지고 있으므로 이러한

glutaraldehyde의 性質이 CM-cellulose와 DEAE-cellulose에 펩신을 固定化시키는 데에도 좋은 影響을

Table 1. Activity of adsorbed pepsin on carboxymethyl cellulose

Preparation	Protein concentration (mg/ml)	protein immobilization (mg/gr. dry beads)	Activity immobilized pepsin (Unit/gr. dry bead)	Ratio of activity (Imm. pep/ sol. pep)
C. M-cellulose	20	8.5	80	23
	40	10.2	95	22
	60	10.5	95	23
C. M-cellulose glutaraldehyde	20	15.5	100	22
	40	20.3	110	22
	60	21.5	115	23

Table 2. Activities of adsorbed pepsin on Diethylaminoethyl cellulose

Preparation	Protein concentration (mg/ml)	Protein immobilization (mg/gr dry beads)	Activity of immobilized pepsin (Unit/gr dry bead)	Ratio of activity (Imm. pep/ sol. pepsin)
DEAE-cellulose	20	10.3	98	25
	40	15.5	120	24
	60	16.0	125	24
DEAE-cellulose glutaraldehyde	20	18.5	110	24
	40	27.0	180	24
	60	28.3	185	23

미친 결과라고 생각된다.

용해성 펩신과 고정화 펩신의 활력을測定하기 위하여 gly-gly-phe-phe-ethylester 용액 (mg/ml) 5 ml을 micro recirculation system을 이용하여 再循環시키면서 5분간격으로 10  $\mu$ l의 試料를 採取하여 遊離 아미노기의 生成量을 OPA-reagent에 대한 發色 反應의 程度로서 測定하여 beads 1 mg가 1분동안에 遊離 아미노酸 1 mol을 生産할 수 있는 酵素의 量을 1 unit로 하여 計算하였던바 表 1.2에서 보는 바와 같이 固定化 펩신의 活力을 溶解狀態의 펩신에 비해 25%程度로 나타났다. 이러한 現象은 固定化 過程에 그림 3에서 보는 바와 같이 일부 酵素가 酵素의 活力中心이 固定化 酵素의 表面에 露出되지 않은 狀態로 있음으로서 基質과 接觸기회가 적어짐으로서 固定化 펩신의 活

력이 낮아진 것으로 判斷된다. 固定化 過程에 펩신간의 共有結合을 誘導하기 위하여 添加한 glutaraldehyde가 펩신의 吸着量은 增加시킬 수 있었으나 固定化 펩신의 活力은 溶解性 펩신에 비하여 35%로서 添加하지 않은 경우와 같은 傾向을 나타내었다.

나. Sepharose-4B : 1M NaOH 용액으로 洗滌한 sepharose beads을 다시 蒸溜水로 洗滌한후 Axen (1967, 1971)의 方法에 따라 젖은 beads을 cyanogen bromide로 活性化시켜 imino carbonate의 形態로 만든후 그림 1에서 보는 바와 같은 固定化 장치를 이용하여 펩신 용액을 4°C에서 再循環시키면서 固定化 시킨후 그 活力을 測定하여 溶解性 펩신과 서로 比較하여 보았던 바 表 3에서 보는 바와 같이 sepharose-4B의 경우에 乾燥된 sepharose bead gr 당 펩신 15 mg

Table 3. Activities of chemically attached pepsin on sepharose-4B

Preparation	Protein concentration (mg/ml)	Protein immobilization (mg/gr. dry bead)	Activity of immobilized pepsin (Unit/gr. dry bead)	Ratio of activity (Imm. pep. / Sol. pep)
Sepharose-4B	20	10.2	97	24
	40	15.7	105	23
	60	16.0	107	23
Sepharose-4B+ glutaraldehyde	20	15.3	105	25
	40	19.0	110	23
	60	20.1	115	24

Chemical Fixation of Enzymes to Cyanogen Halide Activated Polysaccharide Carriers

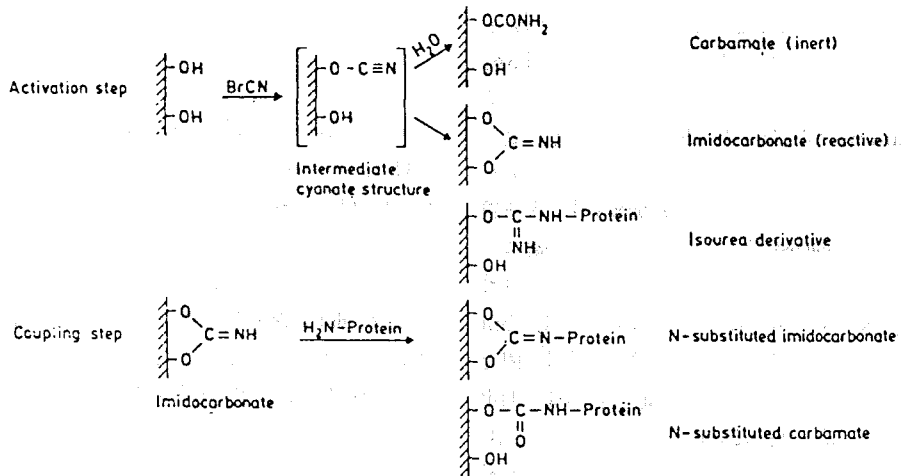


Fig. 4. Chemical activation of polysaccharides by means of cyanogen halides and chemical coupling of proteins to cyanogen halide activated polysaccharides.

을 결합할 수 있었고 glutaraldehyde 을 사용하여 蛋白質간의 共有結合을 誘導함으로써 蛋白質 結合력이 19 mg/gr. 로 增加하였음을 알 수 있었다. 溶解性 펩신에 비해 固定化 펩신의 活力은 23 %로서 낮아진 것을 알 수 있었고 이러한 現象은 酵素 蛋白質과 支持劑간에 새로운 化學結合을 形成하는 과정에 酵素 蛋白質 中の 일부 酵素 活性部位에 어떤 變化가 發生함으로써 酵素 活力의 損失을 가져올 수도 있을 것으로 判斷되고 固定化 酵素의 活力損失의 주된 이유는 固定化過程에 活性中心이 그림 3에서 보는 바와 같이 表面에 位置하지 않고 内部로 向한 狀態로 支持劑와 結合함으로써 酵素의 活性中心이 基質과 接觸할 수 있는 幾회가 줄어들기 때문인 것으로 判斷된다.

다. Porous glass beads : glass-beads 을 濃窒酸 液에 넣고 1시간 동안 끓여서 異物質을 완전히 溶解

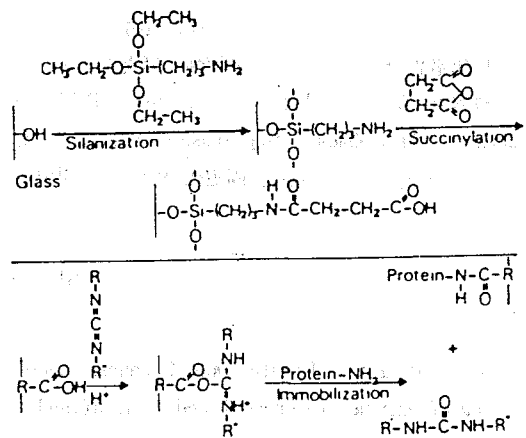


Fig. 5. Chemistry of the derivatization and carbodiimide-mediated surface carboxyl activation for immobilization of biochemicls to the derivatized glass surface.

Table 4. Activities of chemically attached pepsin on glass beads derivatives

Preparation	Protein Concentration (mg/ml)	Protein immobilization (mg/gr bead)	Activity of immobilized pepsin (Unit/gr. bead)	Ratio of activity (Imm. pep / Sol. pep)
Succinylamino propyl glass bead	20	25	160	42
	40	40	210	45
	60	45	220	43
	80	47	225	45
Succinyl amino propyl glass bead glutaraldehyde	20	27	170	45
	40	40	220	45
	60	44	225	47
	80	45	430	40

시켜 除去하고 蒸溜水로 洗滌하여 乾燥시킨 beads의 表面에 酵素 蛋白質의 結合部位를 넓게 하고, 酵素 蛋白質과 쉽게 結合할 수 있도록 하기 위하여 그림 5에서 보는 바와 같이 3-aminopropyltriethoxysilane 으로 反應시켜 aminopropyl glass beads의 形態로 만들었고 다시 succinic anhydride을 反應시켜 succinylamino propyl glass beads의 形態로 glass beads의 遊導體를 만들어서 carbodiimide을 이용하여 beads 誘導體의 -COOH group과 酵素 蛋白質의 -NH<sub>2</sub>을 結合시켜 固定化 펩신으로 製造하기 위하여 그림 1과 같은 再循環 장치를 이용하여 펩신용액을 再循環시키면서 固定化시켰다. 固定化 펩신과 溶解性 펩신의 活力을 測定하여 서로 比較하였던 바 表 4에서 보는 바와같이 glass 誘導體의 蛋白質 結合량은 40 mg/gr. bead 로서 대단히 높았으며 glutaraldehyde을 사용하여 蛋白質間의 共有結合을 誘導해 보았으나 蛋白質 結合力에는 차이가 나타나지 않았다. 固定化 酵素와 溶解性 酵素의 活力의 比率는 50%程度로서 溶解性 酵素에 비해 固定化 酵素의 活力이 떨어지기는 하였으나 DEAE-cellulose, CM-cellulose, Sepharose-4B와 같은 有機 支持劑를 사용해서 製造한 固定化 펩신에 비하여

酵素의 活力損失이 적은 것을 알 수 있었다.

## 摘 要

펩신을 DEAE-cellulose, CM-cellulose, Sepharose-4B와 porous glass beads을 사용하여 固定化시켰던 바 그 결과를 要約하면 다음과 같다.

1. CM cellulose와 DEAE-cellulose의 펩신 吸着량은 건조된 bead 1gr에 대하여 각각 10 mg와 15 mg이었고 glutaraldehyde을 사용함으로써 20 mg와 27 mg로 吸着량이 증가하였고 酵素의 活力은 溶解性 酵素에 비해 각각 22%, 24%로 나타났다.

2. Sepharose-4B을 cyanogen bromide을 사용하여 活性化시킨후 glutaraldehyde을 사용하여 공유결합을 유도하였던 바 건조된 bead 1gr에 펩신 19 mg가 統合되었고 酵素의 活力은 23%로 나타났다.

3. Porous glass beads의 表面을 succineamido-propyl glass beads의 形態로 유도체를 만든후 펩신을 固定化시켰을 때 bead 1gr가 펩신 40 mg을 統合할 수 있었고 酵素의 活力은 溶解性 酵素에 비해 45%로 나타났다.

## 引 用 文 獻

1. Axen, R, and J. Porath 1966. Chemical coupling of enzymes to cross linked dextran(Sephadex). Nature. 210 : 367-369.
2. Axen, R, J. Porath and S. Ernback. 1967. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halrides. Nature 214 : 1302-1304.
3. Axen, R, and S. Ernback. 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carries. Bur. J. Biochem. 18 : 351-360.
4. Chan, W. W-C. 1973. Studies on protein subunits. V. Specific interaction between matrix-bound subunits of aldorase and soluble aldolase subunits. Can. J. Biochem. 51 : 1240-1247.
5. Church, F. C, H. E. Swaisgood, D. H. Porter and G. L. Catignani 1983. Spectrophotometric assay using O-phthalaldehyde for determination proteolysis in milk and isolated milk protein.
6. Habeeb, A. F. S. A. 1965. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. Anal. Biochem. 14 : 328-336.
7. Habeeb, A. F. S. A. 1967. Preparation of enzymically active, water insoluble derivatives of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics 119 : 264-268.
8. Haynes, R and K. A. Walsh 1969. Enzyme envelopes on colloidal particles. Biochemical and Biophysical research Communications 36 (2) : 235-242.
9. Hornby, W. B. and M. D. Lilly 1968. Some changes in the reactivity of enzymes resulting

- from their chemical attachment to water-insoluble derivatives of cellulose. *Biochem. J.* 107 : 669-674.
10. Goodno, C. C., H. E. Swaisgood and G. L. Catignani 1981. A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Anal. Biochem.* 119 : 203-211.
  11. Janolino, V. G., and H. E. Swaisgood, 1982. Analysis and optimization of methods using water-soluble carbodiimide for immobilization of biochemicals to porous glass. *Biotech. and Bioeng.* 24 : 1069-1080.
  12. Line, W. F., A. Kwong, and H. H. Weetal. 1971. Pepsin insolubilized by covalent attachment to glass preparation and characterization. *Biochem. et Biophysica Acta* 242 : 104-202.
  13. Line, W. F., A. Kwong and P. H. Weetal. 1971. Pepsin insolubilized by covalent attachment to glass : preparation and characterization. *Biochimica Et Biophysica Acta* 242 : 194-202.
  14. Munro, P. A., P. Dunnill, and M. D. Lilly 1977. Nonporous magnetic materials as enzyme supports : studies with immobilized chymotrypsin. *Biotech and Bioeng* 19 : 101-124.
  15. Ohmiya, K., S. Tanimura, T. Kobayashi, and S. Shimizu. 1978. Preparation and properties of proteas immobilized on anion exchange resin with glutaraldehyde. *Biotech. and Bioeng.* 20 : 1-15.
  16. Porath, J, K, Aspberg, H. Drevin and R. Axen. 1973. Preparation of cyanogen bromide-activated agarose gels. *J. of chrom.* 86 : 53-56.
  17. Robinson, P. J., P. Dunnill and M. D. Lilly. 1971. Porous glass as a solid support for immobilization or affinity chromatography of enzymes. *Biochem. Et Biophysica Acta* 242 : 659-661.
  18. Porath, J, R. Axen and S. Brnback 1967. Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature* 215 : 1491-1492.
  19. Svensson, B. 1976. Preparation and enzymatic properties of subtilisin novo chemically attached to soluble DBAB-dextran and insoluble DBA-sephadex. *Biochimica Et Biophysica, Acta* 429 : 954-965.
  20. Taylor, J. B. and H. E. Swaisgood. 1980. Microcirculation reactor system for characterization of immobilized enzymes. *Biotech and Bioeng.* 22 : 2617-2631.
  21. Valentova, O, M, Marek, F. svec, J. Stamberg and Z. Vodrazka 1981. Comparison of different methods of glucose oxidase immobilization. *Biotech. and Bioeng.* 23 : 2093-2104.
  22. Walter, B. 1976. Characterization of agarose-bound trypsin. *Biochimica Et Biophysica. Acta.* 429 : 950-953.
  23. Wasserman, B. P. and H. O. Hultin 1980. High yield methods for immobilization of enzymes. *Biotech and Bioeng.* 22 : 271-287.
  24. Weetal. H. H. 1969. Trypsin and papain covalently coupled to porous glass : preparation and characterization. *Science* 166 : 615-617.
  25. Weetal. H. H. 1969. Alkaline phosphatase insolubilized by covalent linkage to porous glass. 1969. *Nature* 223 : 959-960.
  26. Weetal. H. H. 1970. Storage stability of water insoluble enzymes covalently coupled to organic and inorganic carriers. *Biochimica Et. Biophysica Acta.* 212 : 1-7.