

Biomass의 고효율 효소당화에 적합한 Attrition Coupled Bioreactor 개발에 관한 연구 ; Tumbling Drum Type Bioreactor를 활용한 섬유소 당화

이 용 현 · 조 구 형 · 박 진 서
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Development and Evaluation of the Attrition Coupled Bioreactors for Enzymatic Hydrolysis of Biomass ; Tumbling-Drum Type Bioreactor for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose

Yong-Hyun Lee, Ku-Hyung Jo and Jin-Seo Park
Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea.

ABSTRACT

To develop high efficiency-low energy consumption attrition coupled bioreactor for enhanced enzymatic hydrolysis of insoluble biomass, a tumbling drum type bioreactor was installed, and its efficiency was evaluated. The effect of drum structure and operational conditions were investigated. The optimal saccharification at 3L drum was obtained at 8 baffled drum, drum diameter to baffle height ratio of 1:0.05, 100rpm, and addition of 600g of 3mm glass bead per liter. The consumed power for rolling of drum and energy consumption for half digestion of cellulose were measured, and compared with enhanced rate and yield to predict the economic prospect of the process. The tumbling drum type bioreactor seems to have appropriated structure for industrial scale operation, and further investigation for scale-up need to be conducted.

서 론

섬유질 biomass는 매년 광합성에 의하여 축적되는 재생자원으로서 이를 대체에너지 생산의 기질로 활용하여 알코올을 생산하고 이를 수송용 액체연료로 사용코자하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 섬유소를 활용하는데 있어 가장 큰 애로점은 불용성 섬유소를 고효율로 당화시키는데 있다. 섬유소는 물에 불용성일 뿐만아니라 결정형 구조로 존재함으로 섬유소의 당화를 용이하게 하기 위하여 전처리 과정이 필요하다(1).

최근 섬유소의 효소분해시 효소-섬유소 현탁액에 분쇄마찰매체를 첨가하여 분쇄마찰효과를 동시에 줌으로써 상호작용으로 인하여 섬유소 당화율을 현저히 상승시키는 분쇄마찰매체함유 반응계가 발표된 바 있다(2,3,4,5). 이와 같은 분쇄마찰매체 함유 반응계는 전처리 과정

과 효소당화를 동시에 수행하는 효율적 당화법으로서 산업적으로 활용될 가능성이 크다고 판단되며 공업화를 목표로 한 기술적 가능성과 경제성을 면밀히 분석 검토할 필요가 있다. 이를 위해서는 당화효율이 높지만 교반에 필요한 동력소모가 적은 반응장치를 설계 제작하고 이로부터 분쇄마찰매체의 교반에 소요되는 동력 그리고 장치에 부하되는 power를 섬유소의 효소당화 촉진효과와 비교 검토하는 것이 필수적으로 요망된다. 본인등은 전보에서(6) 분쇄마찰매체를 회전축에 부착된 impeller로 교반하여주는 agitated bead 형 bioattritor를 설계 제작하고 그 효율성을 섬유소 효소당화의 관점에서 검토한 바 있다.

본 연구의 목적은 drum 자체를 회전시킴으로서 내부의 섬유소-효소-분쇄마찰매체의 혼합액을 교반 마찰시켜 섬유질 biomass의 효소당화를 촉진시키는 tumbling drum type bioreactor를 설계 제작하여 그 반응조의 특성 및 회전에 소요되는 에너지 등을 분석 검토하여 공업적 규모

의 활용을 위한 기술적, 경제적 타당성의 평가를 위한 기초 자료를 확보코저 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

사용효소는 *Trichoderma viride*의 배양액을 농축한 산업용 효소인 Celluclast(Novo)였다. Lowry method(7)로 분석한 soluble protein 함량은 300mg/ml였다. 효소역가는 Mandels 등이 제안한 방법(8)으로 측정된 결과, filter paper activity는 402IU/ml였으며 CMCase activity는 837IU/ml였고, specific filter paper activity는 1.33IU/mg이었다. 사용기질은 α -cellulose(Sigma)로서 순도는 99.5%였고 평균 입자크기는 100-200mesh였다. 분쇄마찰매체는 직경이 3, 6 그리고 13mm인 유리구(glass bead)를 사용하였으며, 비중은 2.56이었다.

Tumbling Drum Type Bioreactor의 구성

설계 제작된 bioreactor는 반응조인 drum, drum 회전용 roller, 동력소모량 측정장치 그리고 각종 controller로 구성되었다.

반응조인 drum은 Fig. 1과 같이 직경이 15cm이며 용량이 3L인 PVC통으로서 실험 조건에 따라 baffle의 모양, 크기 및 수를 변형시키면서 실험하였으며, drum의 직경과 baffle 크기의 상대비가 1:0.05인 반응조를 주로 이용하였으며, 1:0.1, 1:0.2가 되는 반응조도 병용하였다. 또한 직경이 21cm인 6L 용량의 반응조도 비교를 목적으로 사용하였다. Drum의 회전은 drum을 받치고 있는 두 개의 roller 중 한개의 roller를 1/8HP의 정밀 AC motor로 600rpm까지 회전하도록 제작하였다.

또한 motor에 부하되는 volt와 ampere를 측정하여 motor 작동에 소요되는 전력소모를 측정토록 하였다. 온도조절은 공기온도 조절식으로 55℃를 유지하였다.

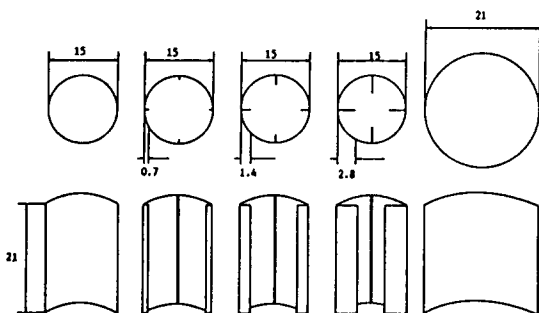


Fig. 1. The shape and dimension of drum (dimension; cm).

Bioreactor의 조작에 소모되는 동력 측정

Bioreactor의 조작시 소모되는 동력은 일정한 회전속도를 유지하기 위하여 motor에 부하되는 전압과 전류를 측정 후 모터의 고유동력소모치인 0 rpm에서의값을 감하여 얻었으며 전류는 0.4-0.9A, 전압은 20-70V 범위에 있었다.

Tumbling Drum Type Bioreactor에서의 당화

Bioreactor에서 섬유소의 분해는 α -cellulose 50g/l, 증류수 0.75L, 0.2M Na-citrate buffer(pH 4.8) 0.25L을 혼합하여 55℃로 조절한 후 여기에 효소액 0.03L를 첨가하여 일정 교반속도에서 당화시켰다.

최적조건을 조사하기 위해서 교반속도, 분쇄마찰매체 첨가량, 분쇄마찰매체의 종류, 반응조의 내부구조등을 각각 변화시켰다.

분석방법

Soluble protein은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry법(7)으로, 생성화원당은 표준물질로 glucose를 사용하여 DNS법으로 측정하였다(10). Glucose는 효소적 방법인 PGO(peroxidase-glucose oxidase-o-paraininsidine)법으로 정량하였다(11).

결과 및 고찰

섬유소의 고효율 효소당화를 위한 Tumbling Drum Type Bioreactor의 효용성.

불용성 기질인 섬유소는 효소당화시 분쇄마찰매체를 첨가 교반하면 효소의 작용에 의한 섬유소 입자의 침식과 교반매체의 기계적운동이 서로 보완관계를 형성하여 작은 많은 입자로 붕괴되게 된다(6). 이와같은 작은 입자는 용액중에 colloid상으로 분산되게 되고 또한 효소작용을 받을 수 있는 표면적이 크게 증가되어 효소작용을 쉽게 받게된다. 따라서 최대의 당화촉진효과를 주기 위해서는 반응조내의 마찰매체의 운동패턴을 최대의 분쇄마찰효과를 줄 수 있도록 조절하여 줌이 요망된다. 통자체를 회전시켜 반응조 내부의 분쇄마찰매체를 교반하는 tumbling drum type bioreactor의 효용성을 검토코저 3L 용량의 baffle이 부착되어 있지 않은 drum을 활용하여, 분쇄마찰매체를 첨가한 군과 첨가하지 않은 비교군의 당화 결과를 Fig. 2에 비교하였다.

분쇄마찰매체인 glass bead를 첨가한 군의 당농도는 4시간후 21g/l, 24시간후 42g/l로서 bead를 첨가치 않은 비교군에 비하여 약 2배 정도 증가하였다. 이는 전보에서(6) 보고한 바 있는 impeller로 매체를 교반하는 agitatead bead형 bioattritor에서 얻은 결과와 유사해지는 다

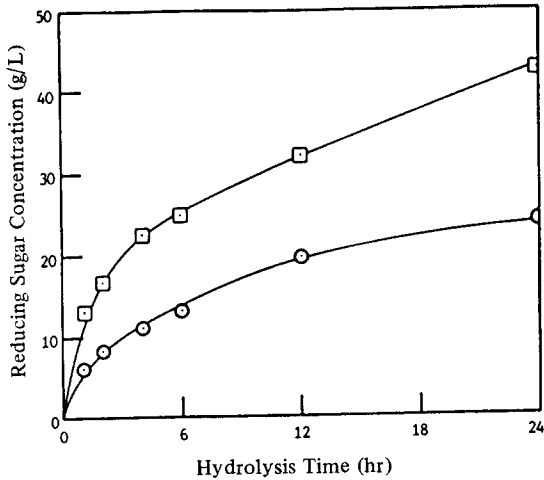


Fig. 2. Hydrolysis of α-cellulose on tumbling drum type bioreactor with and without glass bead; 5% (w/v) slurry concentration, 600g glass bead/L, 100rpm, 55°C.
 ○ Without bead, □ With bead

소 우수한 수준이다. 그러나 통자체를 회전시켜 매체를 교반하는 tumbling drum type bioreactor는 impeller교반 형에 비하여 scale-up된 대용량의 impeller 경우보다 용이하게 공업적인 규모의 장치에 접근할 수 있는 형태의 반응장치라 사료된다.

Baffle 크기의 영향.

위의 결과는 baffle을 부착하지 않은 반응조에서 당화시킨 결과로서 분쇄마찰매체의 기계적 충돌 또는 마찰현상을 증대시키기 위하여 drum 내부에 각종 크기의 baffle을 부착하여 그 영향을 검토하였다. 3L 반응조의 내경은 15cm이며, 반응조 직경에 대한 baffle 크기의 상대적인 비가 1:0.05, 1:0.1 그리고 1:0.2가 되는 3종류의 drum형 반응조에 4개의 baffle을 부착시켰다. 이 반응조

들을 각각 50, 100, 그리고 200rpm으로 회전시키면서 섬유소를 6시간 그리고 24시간 당화시킨 후 당농도를 Table 1에 비교하였다.

가장 우수한 당화 결과는 상대비가 1:0.05인 baffle을 부착한 당화조를 100rpm으로 교반하였을때 얻어졌다. 100rpm 이상의 회전속도하에서는 baffle의 크기가 커짐에 따라 당화율은 오히려 감소되었다. Baffle이 큰 경우에는 오히려 낮은 rpm에서 더 우수한 당화결과를 보였다. 반면 baffle을 부착하지 않은 반응조의 경우에는 rpm이 증가할수록 당화율도 따라서 증가하였다. 이와같은 현상은 당화조내의 분쇄마찰매체의 운동양상과 밀접한 관계가 있으며 분쇄마찰매체의 운동양상을 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다.

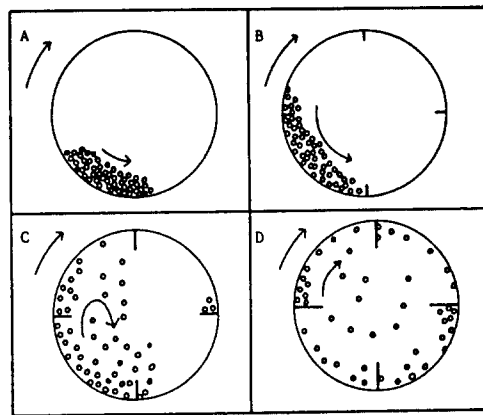


Fig. 3. Schematic diagram of the physical motion of milling media in various baffle size bioreactor.
 A No baffle, B 1:0.05 baffle, C 1:0.10 baffle, D 1:0.20 baffle

Table 1. Effect of baffle size and rolling speed on enzymatic hydrolysis of cellulose.

Speed \ Baffle Size	6hr			24hr		
	50	100	200	50	100	200 (rpm)
No Baffle	21	24	26	35	38	48
1:0.05 Baffle	26	30	27	40	48	38
1:0.10 Baffle	22	27	15	39	41	33
1:0.20 Baffle	22	24	16	38	37	25

(g/L)

Experimental condition; 50g cellulose/L, 600g of glass bead/L, 3mm glass bead, 3L drum, 55°C, pH 4.8.

Baffle이 없는 반응조에서는 bead가 반응조 하부에 가라앉은 상태로 마찰운동을 함이 관찰되었다. 상대비 1 : 0.05 baffle이 부착된 반응조의 경우는 baffle에 의하여 bead가 적당한 높이까지 끌어 올려진 후 중력으로 벽면을 따라 미끄러지며 하강하는 운동양상을 보였다. 이 경우에도 역시 대부분의 분쇄마찰매체가 반응조 저부에 가라앉은 상태로 있었으며 bead간에 맹렬히 마찰운동을 함으로서 섬유소의 효소당화를 크게 촉진시키게 된다. 반면 baffle의 크기가 큰 1 : 0.1 baffle 및 1 : 0.2 baffle 반응조에서는 bead를 상부까지 끌어올린 후 용액중에 끌고루 분산시키거나 또는 반응조 벽면을 따라 같이 회전하게 함으로서 bead간의 마찰이 현저히 감소되게 된다. 분쇄마찰매체의 적절한 운동양상의 유지는 효율 높은 attrition coupled bioreactor 설계에 있어 무엇보다 중시하여야 할 요소로 판단된다. 다음으로 상대비 1 : 0.05 baffle 당화조에 baffle의 수를 증가시켜 8개를 부착하여 당화를 시킨 결과는 Fig. 4와 같다. 4개의 baffle을 부착한 군과의 사이에 큰 차이가 관찰되지 않았다.

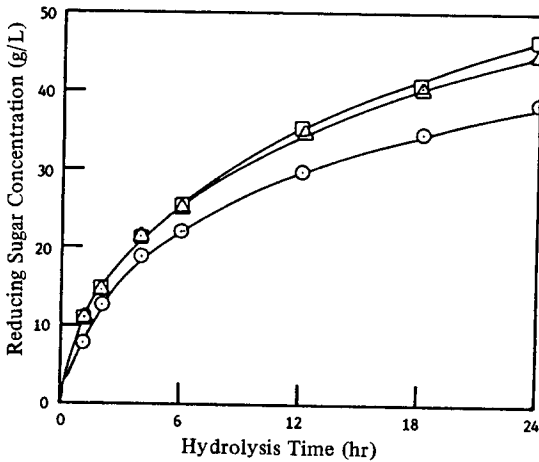


Fig. 4. Effect of the number of baffle in tumbling drum type bioreactor on enzymatic hydrolysis of α -cellulose.
 ○ Without baffle, Δ 4 baffles, \square 8 baffles

Bead크기에 의한 영향.

분쇄마찰매체의 운동양상은 glass bead의 크기와도 밀접한 관계가 있으리라 예상이 된다. 따라서 3mm, 6mm, 13mm glass bead와 원판형(plated)인 바둑알을 각각 600 g / l 첨가하여 상대비 1 : 0.05 baffle이 부착된 당화조에서 100rpm의 회전속도로 교반하면서 당화를 시킨 결과는 Fig. 5와 같다.

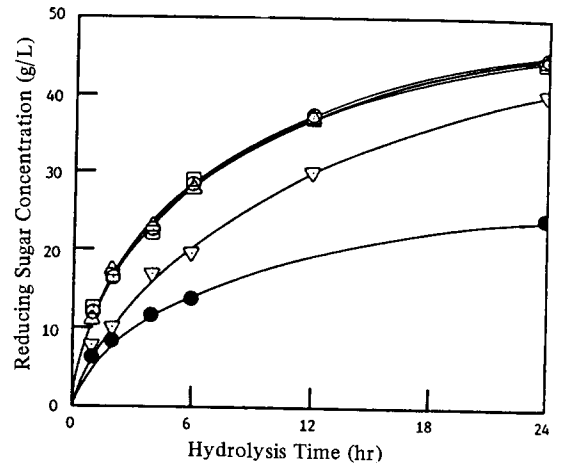


Fig. 5. Effect of the size of milling media on hydrolysis of α -cellulose in 1:0.05 baffle bioreactor; 100rpm, 55°C.
 ○ 3mm bead, ∇ 6mm bead, \triangle 13mm bead, \square Plated, ● Without bead

Fig. 5에서와 같이 3mm bead 사용시 가장 우수한 당화율을 보였으며, 6mm, plated, 13mm bead순이었다. 그러나 13mm bead를 제외한 다른군 사이에는 큰 차이가 없었다. 3mm bead가 다른군에 비하여 우수한 이유는 크기가 적어 void space가 작을 뿐만아니라 충돌마찰할 수 있는 표면적이 커서 높은 마찰효과를 주기 때문이라고 사료된다.

Bead첨가량에 의한 영향.

상대비 1 : 0.05 baffle이 부착된 반응조에서 3mm glass bead를 300g / l, 450g / l, 600g / l, 750g / l, 900g / l 첨가하고 100rpm에서 24시간 당화시킨 후 당화율을 비교한 결과는 Fig. 6과 같다.

Fig. 6에서와 같이 450g / l-600g / l 수준의 bead를 첨가하였을때 가장 우수한 당화율을 보였으며 300g, 900g / l에서는 다소 저조하였다. 이는 전보에서(6) 관찰한 바와 유사한 결과로서 bead 첨가량이 600g / l 이상될때는 bead의 운동공간이 감소되어 bead의 기계적 운동이 방해받게 되며, 300g / l이하의 소량의 bead 첨가의 경우에는 충돌마찰할 수 있는 bead량이 적기 때문이라고 유추된다. Bead를 450g / l에서 600g / l 정도로 첨가할 경우 반응조가 차지하는 부피는 반응조 전체부피의 약 15-20%에 상당한다.

섬유소 고농도 당화.

섬유소의 고농도 당화는 일정량의 당액을 생산하는데 필요한 reactor volume을 적게할 수 있을 뿐만아니라 고

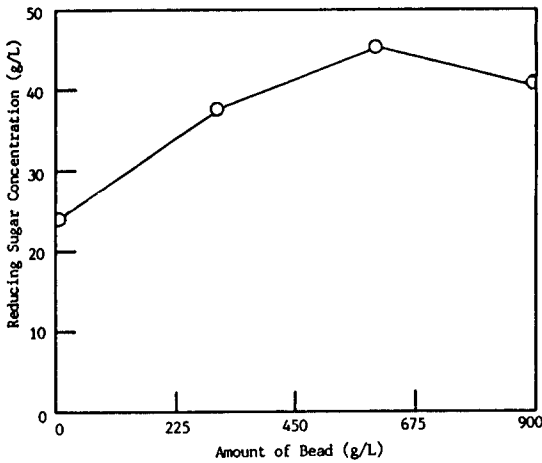


Fig. 6. Effect of the amount of glass bead charged on enzymatic hydrolysis of α -cellulose in 1:0.05 baffle bioreactor.

농도 당액을 얻을 수 있어 농축에 필요한 에너지를 절감할 수 있는 등 장점이 많다. 따라서 기질 첨가량을 증가시켜 고농도에서 당화시켰으며, 그 결과는 Fig. 7 및 Fig. 8과 같다. 이때 기질 증가량만큼 효소첨가량을 상대적으로 증가시켰다.

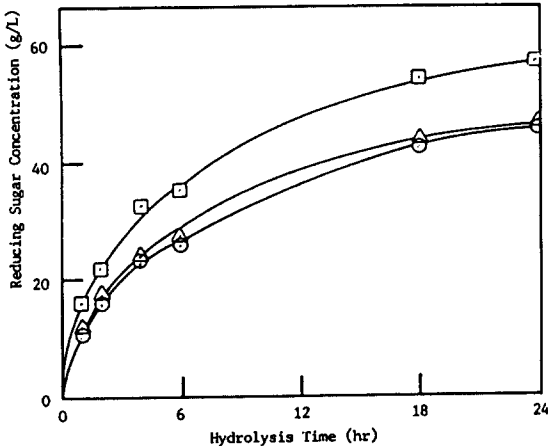


Fig. 7. Hydrolysis of α -cellulose at various substrate concentration in 1:0.05 baffle bioreactor.
 ○ 50g/L, △ 75g/L, □ 100g/L

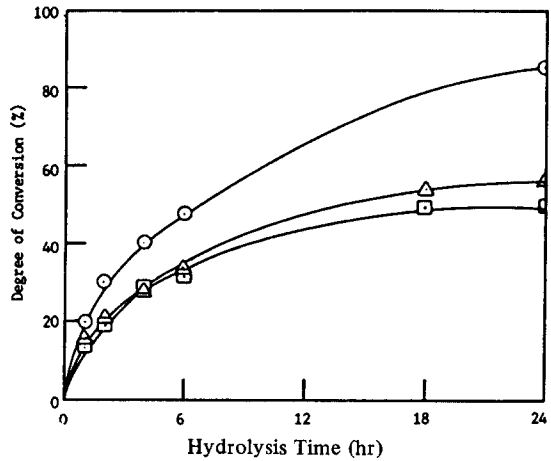


Fig. 8. Hydrolysis of α -cellulose at various substrate concentration in 1:0.05 baffle bioreactor.
 ○ 50g/L, △ 75g/L, □ 100g/L

Fig. 7에서와 같이 기질 농도가 증가함에 따라 당농도는 다소 증가하였으나 5% 기질 첨가량에 비하여 높지 못하였으며 이를 Fig. 8에서와 같이 degree of conversion으로 환산했을 경우 5% 기질 첨가량의 경우 87% 당화되는데 비하여 24시간 이후 각각 56%, 50%로서 낮았다. 일반적으로 5%이상의 기질 첨가의 경우는 섬유소의 흡수성때문에 대부분의 유동성수분이 섬유소 내부에 흡수되어 cellulose network를 형성하여 현탁액의 유동성이 현저하게 감소되며 효소 당화작용이 저해를 받게된다. 분쇄마찰매체의 기계적 운동은 이와같은 network를 파괴시켜 당화를 크게 촉진시킬 것으로 예상하였으나 impeller 부착형 agitated bead형 bioatritor의 경우와는 달리 (6) 본 장치로는 소기의 기대효과를 얻지 못하였다.

반응조의 내부용적 증가에 따른 영향.

반응조의 크기도 분쇄마찰매체의 운동양상에 중요한 변수로 작용할 것으로 사료되어, 반응조 용량이 두배인 6L 당화조(내경 21cm)를 사용하여 당화하였으며 그 결과는 Fig. 9와 같다.

이때 drum을 회전시키는 roller의 회전수를 3L 반응조와 같이 일정하게 고정시키고 실험하였는데 소형반응조(3L) 회전수는 100rpm이며 대형반응조(6L)의 회전수는 70rpm이었다. 반응조의 크기는 당화율에는 큰 영향을 주지 않았다. 당화조내에서의 glass bead의 운동양상은 반응조 크기에 크게 영향받지 않음을 알 수 있다. 이는 반

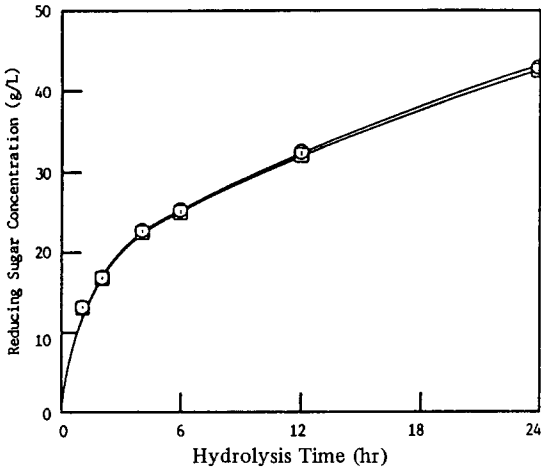


Fig. 9. Effect of the drum size on enzymatic hydrolysis of α -cellulose in tumbling drum type bioreactor.

○ 3L drum, □ 6L drum

응조의 크기가 증가하더라도 glass bead 첨가량도 상대적으로 증가됨으로 같은 강도의 분쇄마찰효과를 주게되며 반응조용량의 약 20%(w/v) 수준의 bead량을 첨가하여 주면 반응조 크기와는 상관없이 비슷한 당화촉진효과를 얻을 수 있다고 판단된다.

각 반응조의 형태 및 제반 실험조건하에서의 동력소모량 비교.

Tumbling drum type bioreactor의 산업적 활용 가능성을 평가하기 위해서는 반응조의 각종 내부구조 및 제반 운전조건하에서의 동력 소모량을 측정하고 이를 당화촉진효과와 연관시켜 고찰함이 요망된다. Table 2는 각종 실험조건하에서 장치의 회전에 소요되는 power(watt/1), 첨가 기질량의 반이 당화되는데 소요되는 시간($T_{1/2}$), 첨가 기질의 반을 당화시키는데 소요된 동력, 그리고 포도당 1g을 생성시키는데 소모되는 에너지를 각각 표시하였다. 포도당 1g을 생성시키는데 필요한 동력 소모량계산은 첨가 기질의 반이 분해되는데 소요되는 에너지를 생성당으로 나누어 산출하였다. 표준당화조건에서의 power 소모량은 11.12watt/1이며, 포도당 1g 생성에 소모되는 에너지는 1.63watt h/g이다. Table 2에서 bead량, baffle 크기 및 bead크기가 증가함에 따라 power 소모량이 증가하나 반응조의 회전속도, baffle 수 및 drum의 용량 증가시에는 오히려 power소모량이 감소함을 알 수 있다. 그러나 경제성 평가는 power소모량보다는 당생성율에 대한 에너지 소모량을 비교검토함이 바람직하다. 표준당화조건과 비교할 경우 보다 낮은 회전속도에서

는 에너지소모가 적은 반면 당생성율이 낮고 보다 높은 회전속도에서는 에너지소모도 크고 당생성율도 낮아 당화율에 대한 에너지소모량이 보다 큼을 알 수 있다. 또한 분쇄마찰매체의 양 및 baffle의 크기, bead크기의 증감시에도 포도당 1g 생성시 소모되는 에너지가 표준당화조건보다 증가함을 알 수 있다. 특히 주목할만한 것은 baffle의 수를 증가시킬 경우 당화율과 연관된 에너지소모량이 감소함을 알 수 있다. 이는 당화율은 일정하나 단위용적당 power 소모량이 감소된데 기인한다. 또한 drum용량증가시에도 동일한 양상의 결과를 보이고 있어 scale-up할 경우 단위용적당 당생성량의 에너지소모가 감소됨을 예시하고 있다.

상기의 결과 표준당화조건에서보다 baffle수를 8개로 증가시킨 반응조에서 가장 적은 에너지소모로 당화시킬 수 있었다. 이때 1g 당을 생성하는데 소모되는 에너지는 1.39watt h/g로서 전보에서 보고한(6) impeller교반형 agitated bead형 bioattritor의 2.62watt h/g에 비하여 다소 적었다. 그러나 상기 결과는 실험실적 규모(3-6L)의 결과로써 이 공정의 경제성을 평가하기에는 다소 미흡하지만 에너지소모량은 교반조의 크기, 분쇄마찰매체의 종류, 현탁액의 유동패턴 등 여러 변수에 의존함을 알 수 있으며, 공업적 활용을 위한 scale-up 연구가 요망된다.

요 약

불용성 기질인 섬유소의 고효율 효소당화에 적합한 분쇄마찰매체 함유 반응장치의 개발을 목표로 섬유소-효소-분쇄마찰매체의 혼합액을 통사체를 회전시켜 교반마찰시키는 tumbling drum type bioreactor를 제작하여 그 효용성을 검토하였다. 반응조 내부의 구조 및 제반 운전조건하에서의 당생성효율을 분쇄마찰매체의 교반에 소요되는 에너지와 비교분석 검토함으로써 공업적 규모의 활용을 위한 기술적, 경제적 타당성을 평가하였다.

3L규모의 장치의 경우 반응조내경과 baffle의 크기의 비가 1:0.05이고 8개의 baffle을 설치한 반응조에서 3mm glass bead를 600g/1로 첨가하여 100rpm으로 교반할때 가장 우수한 결과를 얻었다. Tumbling drum type bioreactor는 매우 효율적인 attrition coupled된 당화장치로 판단되며, 특히 산업적 규모로 scale-up하기 용이한 구조를 갖고 있어 이에 대한 구체적 연구가 요망된다.

감 사

본 연구는 86-88년도 한국과학재단 목적기초연구비의 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

Table 2. Comparison of power and energy consumption for half saccharification of α -cellulose in bioreactor.

	Power (watt/L)	T _{1/2} (hr)	Energy (watt·h/L)	ECRHG (watt·h/g)
Rolling Speed				
50rpm	12.39	5	61.95	2.25
100rpm	11.12	4	44.84	1.63
200rpm	8.68	5.3	46.00	1.67
Amount of Bead				
300g/L	9.12	5	45.60	1.66
600g/L	11.21	4	44.84	1.63
900g/L	13.34	6	80.46	2.93
Size of Baffle				
1:0.00	12.48	6	74.88	2.72
1:0.05	11.21	4	44.84	1.63
1:0.10	13.11	5.3	69.48	2.53
1:0.20	15.97	7.3	116.58	4.24
Number of Baffle				
4	11.21	4	44.84	1.63
8	9.58	4	38.32	1.39
Size of Drum				
3L	12.48	6	74.88	2.72
6L	8.67	6	52.02	1.89
Size of Bead				
3mm	11.21	4	44.84	1.63
6mm	11.27	4	45.08	1.64
13mm	11.83	7.3	86.36	3.14
Plated	14.95	4	59.80	2.17

Standard hydrolysis condition; 50g cellulose/L, 100rpm, 600g glass bead/L, 3mm glass bead, 1:0.05 baffle, 4 baffle, 3L drum, 55°C, pH 4.8.

P; Power, T_{1/2}; Half Saccharification Time, Energy; Energy Consumption.

ECRHG; Energy Required for Production of 1g of Glucose.

참 고 문 헌

- L.T. Fan, Y.H. Lee and M.M. Gharpuray (1982), *Advances in Biochemical Engineering*, **23**, 157.
- R.G. Kelsey and F. Shafizadeh (1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1025.
- M.G. Neilson, R.G. Kelsey and F. Shafizadeh (1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 293.
- S.K. Ryu and J.M. Lee (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 53.
- Y.H. Lee (1985), *J. Natural Sciences of Kyungpook National University*, **3**, 115.
- 이 용현, 박 진서, 윤 대모 (1989), *한국생물공학회지*, 4(2), 78.
- O.H. Lowry, H.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951), *J. Bio. Chem.*, **193**, 265.
- M. Mandels, R. Andreotti and C. Roche (1976), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **No.5**, 21.
- J.Y. Oldshue (1983), *Fluid Mixing Technology*, p46, McGraw-Hill, New York.
- G.L. Miller (1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
- Sigma Corporation (1984), *Sigma Diagnostics Glucose Procedure* No. 510.

(Received May 19, 1989)