

## 음이온하전막을 이용한 NAD 재생형 bioreactor에 의한 fructose로부터 sorbitol의 생산

박선영 · 윤세억  
전북대학교 농과대학 식품공학과

### Production of Sorbitol from Fructose in Charged Membrane Bioreactor with NAD-Regeneration System

Sun Young Park and Se Eok Yun

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,  
Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

#### ABSTRACT

An anion-charged membrane was used for selective retention of coenzyme NAD(H) in reactor without any chemical modification. The membrane could reject permeation of NAD (H) (80.9%) but not reject permeation of product. The retention ratio was enhanced in the presence of albumin and Tris-maleate buffer.

A bioreactor equipped with a membrane, NTR 7410 was constructed and used in the repeated batch production of sorbitol. NADH-dependent sorbitol dehydrogenase from sheep liver was used for the production of sorbitol from fructose. The coenzyme oxidized was regenerated with alcohol dehydrogenase. 47 g/L sorbitol was produced for 198 hr with a substrate conversion ratio of 70%. The retention ratio was almost maintained throughout the entire reaction.

#### 서 론

효소의 촉매로서의 장점이 널리 인정되어 있으며 수많은 효소(2,500여종)가 알려져 있으나 실제로 효소가 공업적 물질생산에 이용되고 있는 것은 20여 종에 지나지 않는다. 이와같이 효소가 공업적 물질 생산에 널리 이용되지 못하고 있는 이유는 해결되어야 할 몇가지 문제점 때문이다.

우선 효소는 비교적 불안정하여 장기간의 사용에 적절하지 못한 때문인데 고정화효소의 개발로 이러한 문제점을 보완하고 있다. 그러나 보다 큰 문제는

전 효소의 약 40% 이상이 보효소를 필요로 하기 때문인데 이러한 보효소의존성 효소를 반응에 이용하고자 할 경우에는 보효소를 기질의 농도만큼 bioreactor 내에 공급해 주어야하나 가격이 비싸므로 (\$ 1,000/mol NAD, \$ 800/mol ATP) 경제적인 면에서 불리하다. 그러나 한번 공급된 보효소를 bioreactor 내에서 재생하여 계속적으로 사용하게 된다면 보효소의존성 효소의 물질생산에의 이용은 현실적으로 가능해 질 것이다.

따라서 세계 각국에서는 보효소 NAD(P)에 의존하는 산화환원효소 반응계와 NAD(P)의 재생반응

계를 공역한 NAD(P)재생형 bioreactor시스템에 관한 연구(1-3)와 합성반응계와 ATP재생반응계를 공역한 ATP재생형 bioreactor시스템에 관한 연구(4-8)가 활발히 행하여지고 있다. 장차 효율적인 보조효소재생계 bioreactor시스템이 확립될 경우, 보조효소의존성 효소의 공업적생산에의 이용이 가능해 질 것이며 따라서 효소의 공업적 이용도는 훨씬 증대될 것이다.

이에 관련하여 본 연구에서는 반응의 model로서 NAD의존성 산화환원 효소인 sorbitol dehydrogenase를 이용한 fructose로부터 sorbitol의 생산을 위한 효율적인 NAD재생형 bioreactor system을 개발하고자 하였다. Sorbitol은 vitamin C의 중요한 원료가 되는 동시에 저열량 감미료로서 수요가 많은 범용화합품으로서, 현재 니켈촉매를 이용하여 고온고압하에서 glucose에 수소첨가를 행하여 제조되고 있는데 이 방법을 대체하기 위한 NAD(P)를 보조효소로 하는 reductase반응계와 NAD재생반응계를 공역시킨 효소적방법에 의한 sorbitol의 생산을 도모하고자 하였다.

그런데 NAD는 수용성의 저분자물질이므로 고정화되지 않은 상태로 bioreactor 내에 공급해 주었을 경우에는 연속반응중에 생산물과 함께 유출되어 버리므로 NAD가 bioreactor로부터 유출됨이 없이 bioreactor 내에 retention하면서 효과적으로 regeneration 될 수 있도록 하지 않으면 안된다.

NAD의 retention 방법으로는 NAD를 insoluble polymer matrix(9,10), water-soluble polymer(11-13) 또는 용액상의 효소에 결합시켜 고분자화시키거나(14,15), 효소에 대한 affinity가 큰 NAD를 계속적으로 recycling 시키므로써 NAD가 bioreactor 내에 머무르도록 하는 방법(3,16)등이 있으나 NAD는 고분자화하는 과정에서 실활되거나 고정화된 NAD는 용액상의 NAD에 비하여 Km치가 증가하는 등의 결점이 있으며, recycling 방법을 채용하는 경우 NAD가 점진적으로 유출되는 결점을 안고 있다. 따라서 최근 NAD를 native 상태로 bioreactor 내에 retention 시키기 위한 방법이 시도되고 있는데(17,18) 이는 NAD가 pI 이상의 pH에서 phosphodiester bond가 음이온상태에 있으므로 이러한 pH 조건하에서, 음이온 하전시킨 membrane(anion-charged membrane)을 이용할 경우 membrane과 NAD간에 electrostatic repulsion이 생기므로써 NAD가 membrane을 빠져나갈 수 없는 사실을 이용한 것으로 NAD를 modify하지 않고 그대로 이용한다는 장점이 있다.

한편 NADH regeneration 방법으로 화학적 방법, 전기화학적 방법 및 효소적 방법이 있는데 효소적 방법은 주반응 효소의 반응에 의하여 산화 또는 환원된 NAD를 역시 효소를 이용하여 재환원 또는 재산화시키는 방법으로써 반응속도면에서나 선택성의 면에서 가장 효과적인 방법으로 기대되고 있다(20).

본 연구에서는 효소적방법으로 NAD regeneration을 행하고 anion-charged membrane를 이용하여 NAD를 bioreactor내에 retention시키는 NAD재생형 bioreactor system을 구축, 효소적방법에 의한 sorbitol생산의 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

Sorbitol dehydrogenase, Alcohol dehydrogenase, NADH 및 NAD는 Sigma로부터 구입하였으며, sorbitol과 fructose 측정용 Kit는 Boehringer Mannheim의 제품을 사용하였다.

Membrane은 Nitto Electric Industrial Co.(일본) 제품인 NTR 7410을 사용하였다. 이 membrane은 얇은 spongy층의 상부에 음이온 하전된 sulfonated polysulfone으로 coating된 것으로서 UHP-25K Ultrafiltration apparatus(Advantec Toyo Kaisha Ltd., 일본)에 부착하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### (1) Sorbitol dehydrogenase 활성측정법

NADH(0.4 mM), SDH(1.75  $\mu$ g)를 함유한 Tris-Maleate buffer(100 mM, pH 7.5) 용액에 D-fructose(400 mM)을 가하여 25°C에서 30분간 반응시킨 후 340nm에서의 흡광도 증가량을 측정하였다.

#### (2) Alcohol dehydrogenase 활성측정법

Ethanol(4 M), NAD(10 mM)를 함유한 Tris-Maleate buffer(100 mM, pH 8.8) 용액에 ADH(1U)를 가하여 25°C에서 30분간 반응시킨 후 340nm에서의 흡광도 증가량을 측정하였다.

#### (3) Fructose와 Sorbitol 측정

Boehringer Mannheim제의 Kit를 사용하여 측정하였다. 즉,

① NADH(28 mg), ATP(75 mg), NAD(22 mg), pyruvate(32 mg), MnSO<sub>4</sub>를 함유한 pH 8.0의 triethanolamine buffer(total volume 12ml)로부터 0.1ml를 취하여 0.1ml의 sample용액에 가하고, 1.9 ml의 증류수를 가하여 3분간 반응시켰다.

② ①의 용액에 lactate dehydrogenase(13 U), hexokinase(80 U), glucose-6-phosphate dehydrogenase(40 U)를 함유하는 용액(total volume 0.3ml) 0.02ml를 가하여 15분간 반응시킨 후 340nm에서의 흡광도를 측정하였다.(→ A<sub>2</sub>)

③ ②의 용액에 phosphoglucose isomerase (210 U) 용액 0.02ml를 가하여 15분간 반응시킨 후 340nm에서의 흡광도를 측정하였다.(→ A<sub>3</sub>)

④ ③의 용액에 SDH(25 U)용액(total volume 0.25ml) 0.02ml를 가하여 30분간 반응시킨 후 340nm에서의 흡광도를 측정하였다.(→ A<sub>4</sub>)

이상에서 측정된 흡광도로부터 아래의 식을 이용, fructose와 sorbitol의 양을 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{Content of fructose (g/100 g)} \\ &= \frac{C_f (\text{g} / \ell)}{\text{Sample soln. (g} / \ell)} \times 100 \\ [C_f &= \frac{5.441}{6.3} (A_3 - A_2)] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Content of sorbitol (g/100 g)} \\ &= \frac{C_s (\text{g} / \ell)}{\text{Sample soln. (g} / \ell)} \times 100 \\ [C_s &= \frac{5.574}{6.3} (A_4 - A_3)] \end{aligned}$$

#### (4) Charged membrane의 투과성 측정

사용하는 charged membrane(NTR 7410)이 NAD의 투과를 어느 정도 저지하는지를 검토하기 위하여 UHP-25K Ultrafiltration apparatus에 하전막을 장착하고 NAD용액(1mM) 10ml를 가하여 N<sub>2</sub> gas로 압력(3kg/cm<sup>2</sup>)을 가하여 2ml가 남을 때까지 dead end filtration을 행하였다.

Retention ratio는 [(여액중의 NAD량/여과전의 NAD량) × 100]의 방법으로 나타냈으며 NAD의 농도는 260nm의 흡광도로써 측정하였다.

#### (5) Anion-charged membrane bioreactor의 구성

UHF-25K Ultrafiltration apparatus에 NTR 7410을 장착하고, 이 곳에 D-fructose(400 mM), ethanol(400 Mm), NAD(4 μM), SDH(300 U), ADH(300 U), NaN<sub>3</sub>(0.02%), BSA(1.5%)를 녹인 Tris-maleate buffer 용액(100 mM, pH 8.0)10ml를 넣어 25°C에서 반응시켰으며 semi-continuous operation을 행하였다.

## 연구결과 및 고찰

### 1. 효소를 이용한 sorbitol 생산의 가능성 검토

Sorbitol은 현재 니켈촉매를 사용한 고온고압하에서의 glucose에의 수소 첨가반응에 의해 제조되고 있는데, 근년 *Zymomonas mobilis*를 이용한 fructose, glucose 및 sucrose로부터 sorbitol을 생산하기 위한 발효적 방법이 시도되고 있으나(20-23), 낮은 효소활성과 반응액으로부터 sorbitol을 분리해야하는 등의 문제로 개선될 점이 남아 있다. 효소반응을 이용할 경우 온화한 조건에서 효율적으로 생산될 수 있겠으나 만족할 만한 활성을 가진 효소의 발견이 선행되지 않으면 안된다. *Zymomonas mobilis* 이외에 *Bacillus subtilis*(24), *Candida boidinii*(25), *Candida tropicalis*(26) 등이 sorbitol dehydrogenase를 합성하는 것으로 알려져 있는 데 특히 *Candida tropicalis*로부터 분리 정제된 sorbitol dehydrogenase는 glucose로부터 sorbitol의 생산의 가능성을 보여 주었으나(18), 이 효소가 안정성이 낮고 가격에 있어서도 고가인 NADPH 의존성이므로, 본 연구에서는 보다 안정하고 가격이 낮은 NAD 의존성으로서 시판되고 있는 sorbitol dehydrogenase를 이용하여 fructose로부터 sorbitol 생산을 행하고자 하였다.

본 효소는 reductive activity가 있음을 확인하였으며, fructose로부터 sorbitol로의 환원반응을 극대화할 수 있는 몇가지의 조건에 관하여 검토하였다. 즉 Buffer용액의 종류와 pH에 따라 활성에 차이가 있을 것으로 예상되어 100mM의 Tris-HCl, Tris-maleate, Potassium phosphate 또는 glycylglycine buffer용액을 각각 pH 6.0, pH 7.0, pH 7.5 및 pH 8.0으로 조제하여 이들 buffer용액내에서의 sorbitol dehydrogenase의 촉매활성을 측정, 비교하였다. 그 결과 pH 7.5의 Tris-maleate buffer 용액에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

한편 본 효소의 활성에 대한 몇가지 metal ion들과 sodium azide 및 bovine serum albumin(BSA)의 영향을 검토한 결과(Table 1) metal에 의한 영향은 없었으나 sodium azide와 BSA는 약 2배의 활성 증진 효과를 나타내었다. 이는 sodium azide와 BSA가 coenzyme stabilizer로서 작용하였기 때문인 것으로 여겨졌다.

### 2. Charged membrane의 NAD에 대한 selective retention

Bioreactor 내에서 반응을 완료한 후 반응생성물

**Table 1. Effect of metal ions and stabilizers on sorbitol dehydrogenase activity**

Compounds	Concentration (mM)	Relative activity (%)
FeCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10	125
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	10	95
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10	60
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10	72
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	10	82
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	78
Sodium azide	0.02%	220
Semicarbazide · HCl	0.02%	117
BSA	1.50%	196

을 membrane을 통과시켜 효소등 고분자화합물로부터 분리, 회수하고자할 때에 저분자량의 NAD (MW = 663.44)가 반응생성물과 함께 bioreactor 밖으로 유출되는 것을 방지하기 위하여 NAD의 bioreactor 내의 retention ratio를 높이기 위한 검토를 행하였다.

NAD의 membrane 내의 retention에 대한 buffer 용액의 종류와 BSA의 영향을 조사하였다. NAD는 주반응효소(sorbitol dehydrogenase)의 최적 pH인 7.5에서는 음이온을 띄어 음으로 하전된 membrane과 정전기적 반발이 생길 것이므로 pH 7.5의 여러종류의 buffer 용액(100 mM)에 NAD를 1 mM의 농도로 용해시킨 후 500 RPM의 속도로 교반하면서 3kg/cm<sup>2</sup>의 N<sub>2</sub> gas의 압력을 가하여 용액의 volume이 10ml로부터 2ml로 줄어들 때까지 membrane을 통과 시키어 NAD의 retention 정도를 측정하였다.

그 결과 Table 2에서와 같이 Tris-maleate buffer와 Glycylglycine buffer 용액에서 retention ratio가 높았으며 Tris-HCl buffer와 Potassium phosphat buffer 용액에서 낮았는데, 후술의 2종의 buffer 용액의 양 이온이 NAD나 membrane의 음 이온을 상쇄하므로써 NAD와 membrane간의 electrostatic repulsion이 감소하였기 때문인 것으로 추측되었다. Tris-maleate buffer 용액에서 가장 높은 retention ratio를 나타내었는데 62.8%에 불과하였다. 그러나 1.5%의 BSA 용액을 NAD 용액에 가하여 membrane을 통과시켰을 때

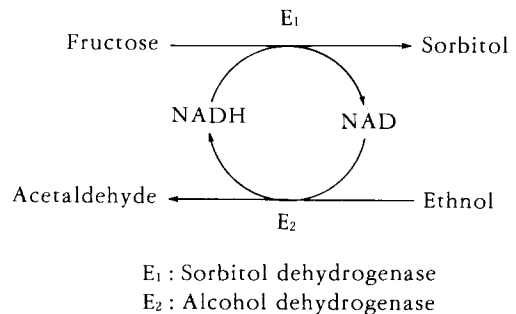
NAD의 retention ratio는 훨씬 증가하였으며, Tris-maleate buffer 용액에 있어서는 retention ratio가 80.9%이었다.

**Table 2. Retention ratio of NAD in sulfonated polysulfone membrane with various buffer solutions**

Buffers (100 mM, pH 7.5)	Retention ratio(%)	
	-BSA	+BSA
Tris-HCl	32.8	62.5
Potassium phosphate	27.2	62.5
Glycylglycine	60.2	70.5
Tris-maleate	62.8	80.9

### 3. Charged membrane bioreactor(CMBR)의 구성과 CMBR에서의 sorbitol의 생산

NAD의 Charged membrane내에서의 retention ratio는 BSA의 첨가로 매우 증진되었으며, sorbitol dehydrogenase의 활성은 BSA와 NaN<sub>3</sub>의 첨가에 의해 증가되었으므로 반응액중에 BSA와 NaN<sub>3</sub>의 첨가는 필수적이다. 또한 NAD regeneration(NAD → NADH)에는 glucose dehydrogenase(18), hydrogenase(1), acetaldehyde dehydrogenase(19), formate dehydrogenase(27), alcohol dehydrogenase(19)등이 이용될 수 있는 데 이들의 반응상의 장단점을 고려하여 alcohol dehydrogenase를 이용하고자 하였는데(Fig. 1), 이는 가격이 싼 ethanol이 기질이 되며 생성물인 acetaldehyde는 반응액의 pH



**Fig. 1. Schematic diagram of reactions in production of sorbitol.**

변화에 영향을 주지 않으며 boiling point가 매우 낮으므로(21°C), 증류에 의해 반응생성물로 부터 쉽게 분리될 수 있는 장점이 있기 때문이었다.

반응의 pH는 sorbitol dehydrogenase의 최적 pH인 7.5와 alcohol dehydrogenase의 최적 pH인 8.8의 중간 정도인 pH 8.0으로 하였고 Table 3과 같은 조건에서 sorbitol 생성반응을 행하였다.

Table 3. Enzyme reaction conditions

Components	Conditions
Fructose	400 mM
Ethanol	400 mM
NAD	4 $\mu$ M
SDH	300 U
ADH	300 U
NaN <sub>3</sub>	0.02%
BSA	1.50%
Tris-maleate	100 mM, pH 8.0
Temperature	25°C
Reactor volume(working volume)	10ml

Batch process에서 fructose의 sorbitol로의 전환율(conversion ratio)이 70% 되는 시점에서 반응액에 압력을 가하여 반응액의 90%를 membrane을 통하여 bioreactor의 밖으로 여과한 후, 0.02%의 NaN<sub>3</sub>를 함유한 기질용액(fructose와 ethanol) 9ml를 가하여 반응액이 10ml가 되도록 하였다. Sorbitol dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, NAD 및 BSA는 용출과정에서 membrane을 통과함이 저지되었으므로 반응을 종결할 때까지 재차 공급하지 않았다.

제2회, 제3회의 batch process에 있어서도 상기와 마찬가지로 기질전환율이 70%에 달하는 시점에서 반응생성물을 용출시키고 기질액을 보충하였다.

제1회의 batch process에서 기질전환율이 약 70%에 달하는데에 45시간이 소요되었으며 제2회, 제3회의 batch process에 있어서는 62시간 및 91시간이 소요되었다(Fig. 2).

3회의 repeated batch operation에서 alcohol dehydrogenase의 경우 84%의 잔존활성을 나타내었으나 sorbitol dehydrogenase의 잔존활성은 46%로서 실패이 컸으므로 3회의 repeated batch opera-

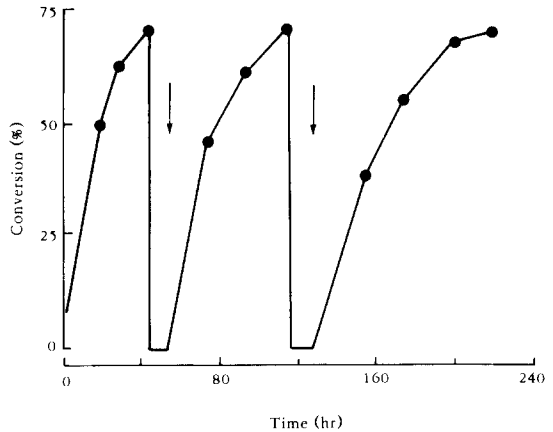


Fig. 2. Repeats batch production of sorbitol in the CMBR. Arrows show the additions of substrates.

tion에서 반응을 종결하였는데 198시간의 반응에서 sorbitol의 생산성은 47g/L 이었다(Table 4).

Table 4. Result of semi-continuous operation

Operation time	198 hr
Residual activity of SDH	46%
Residual activity of ADH	84%
Conversion ratio	70%
Sorbitol concentration	47 g/L

Candida tropicalis 기원의 sorbitol dehydrogenase를 이용한 glucose로부터 sorbitol 생산반응에서의 효소의 반감기가 880시간이었던 사실(18)에 비추어 본 연구에서 사용한 효소의 안정성은 매우 낮았다. 또한 sorbitol의 생산성에 있어서도 Ikemi들(18)의 결과에 비하여 본 연구의 결과는 매우 낮았는데 이는 사용한 효소의 활성이 낮았거나 또는 반응조작상의 문제 즉 3회의 repeated batch process를 행함에 있어 NAD는 첫회의 batch시에만 가하였는데 3회의 batch에서 NAD의 34%가 실패하였으므로 결과적으로 생산성이 저하된 것으로 여겨졌다. 따라서 생산성을 높이기 위하여는 매회의 batch시마다 NAD의 보강이 필요할 것으로 여겨지며 이에 관하여는 계속 실험중에 있다.

또한 membrane의 bioreactor system에 사용한

후의 성질을 검토한 결과 3회의 사용에서 retention ratio의 감소는 매우 작았다.(Table 5)

**Table 5. Membrane permeation characteristics before and after reaction**

	Permeation rate (ml/cm <sup>2</sup> /hr)	Retention ratio (%)
before	0.25	81
after	0.21	75

The test solution contains 400 mM fructose, 400 mM ethanol, 1 mM NAD, 1.5% BSA and 1 mM Tris-maleate(pH 7.5)

따라서 주반응 효소의 활성을 좀 더 극대화시킬 수 있도록 하며 반응기조작상의 문제점을 개선할 경우 CMBR은 NAD의존 효소반응에 유용하게 이용될 수 있는 가능성을 보여주었다.

## 요 약

NAD재생형 bioreactor를 구축함에 있어 음이온 하전막을 이용하고자 하였다. 사용한 막은 용액상의 NAD의 통과를 저지하여 80.9%를 bioreactor내에 존속시켰는데 NAD의 bioreactor내에의 존속율은 Tris-maleate 완충용액을 사용하고 albumin을 첨가 하므로써 증가되었다.

음이온하전막을 장착한 bioreactor내에서 주반응 효소로서 sorbitol dehydrogenase와 재생반응효소로서 alcohol dehydrogenase를 사용하여 NADH로의 재생과 함께 fructose로부터 sorbitol의 생산을 행하였다.

반응형식은 반복회분조작을 행하였는데 매 회분마다 70%의 전환율이 될 때까지 반응시킨 후 반응액의 90%를 회수한 후 fructose와 ethanol을 feed하여 다음의 회분반응을 행하였다. Sorbitol의 생산량은 198시간의 반응에서 47g/L이었다. 한편 사용한 막의 NAD존속율은 반응종료후에도 거의 감소되지 않았다.

## 참고문헌

1. T. Matsunaga, N. Matsunaga and S. Nishimura(1985), *Biotech. Bioeng.*, **27**,1277.
2. C. Wong and G.M. Whitesides(1981), *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4890
3. O. Miyawaki, K. Nakamura and T. Yano (1982), *J. Chem. Eng. Jpn.*, **15**, 224.
4. M. Lindberg and K. Mosbach(1975), *Eur. J. Biochem.*, **53**, 481.
5. A. Pollok, R.L. Baughn and G.M. Whitesides (1979), *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 2366.
6. K. Murata(1981), *Enzyme Microbiol. Technol.*, **3**, 233.
7. M. Asada, K. Nakanishi, R. Matsuno, A. Tanaka, A. Kimura and T. Kamikubo(1979), *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1773.
8. H. Kondo, I. Tomioka, H. Nakajma and K. Imahori(1984), *J. Appl. Biochem.*, **6**, 29.
9. Y. Yamazaki and H. Maeda(1982), *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1571.
10. M.A. Mazid and K.J. Laidler(1982), *Biotech. Bioeng.*, **24**, 2087.
11. A.F. Buckmann, M.R. Kula, R. Wichmann and C. Wandrey(1981), *J. Appl. Biochem.*, **3**, 301.
12. Y. Yamazaki, H. Maeda and H. Suzuki (1976), *Biotechnol Bioeng.*, **18**, 1761.
13. 尹世億, 朴宣映, 金明坤, 金康賢(1989), *韓國生物工學會誌*, **4**, 229.
14. A. Nakamura, H. Minami, I. Urabe and H. Okada(1988), *J. Ferment. Technol.*, **66**, 267.
15. M.D. Legoy and D.D. Thomas(1978), *Enz. Eng.*, **3**, 93.
16. O. Miyawaki, K. Nakamura and T. Yano (1982), *J. Chem. Eng. Jpn.*, **15**, 142.
17. V. Kitpreechavanich, N. Nishio, M. Hayashi and S. Nagai(1985), *Biotech. Lett.*, **7**, 657.
18. M. Ikemi, N. Koizumi and Y. ishimatsu (1990), *Biotech. Bioeng.*, **36**, 149.
19. 鈴木修一(1988), *不齊合成 bioreactor*, p.102, 學生出版 center, 東京.
20. L. Viikari(1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 118.
21. K.D. Barrow, J.G. Collins, D.A. Leigh, P.L.

- Rogers and R.G. Warr(1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 225.
22. D.A. Leigh(1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 413.
23. I.H. Jung, D.J. Choi and U.H. Chun(1990), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**(3), 223.
24. S.B. Horwitz and N.O. Kaplan(1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 830.
25. Y. Tani and V. Vongsuvanlert(1987), *J. Ferment. Technol.*, **65**, 405.
26. S. Kise, N. Koizumi and H. Maeda(1988), *J. Ferment. Technol.*, **66**, 615.
27. J. Shaked and G.M. Whitesides(1980), *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7105.