

Alcohol Oxidase와 Alcohol Dehydrogenase를 이용한 기상에서의 Ethanol의 산화반응

박 현 규 · 장 호 남 · *김 동 옥

한국과학기술원 화학공학과, 생물공정연구센터
*럭키 중앙연구소

Oxidation of Ethanol in the Gas Phase with Alcohol Oxidase and Alcohol Dehydrogenase

Hyun Gyu Park, Ho Nam Chang and *Dong Ok Kim

*Lucky Research and Development Center,
Petrochemicals and Polymers, Taejon 305-343, Korea
Bioprocess Engineering Research Center and Department of Chemical Engineering,
Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

The effects of reaction temperature and the level of hydration(water activity) were studied for gas phase reactions of alcohol oxidase and alcohol dehydrogenase immobilized on DEAE-cellulose and controlled pore glass(CPG). Optimum reaction temperature zone of gas phase reaction was similar to that of aqueous phase reaction. The activity of alcohol oxidase increased dramatically and the stability decreased when the water activity was increased from 0.3 to 0.8. The apparent activation energies of the gas phase reaction decreased approaching the values obtained in the aqueous phase reaction as the water activity increased. In the both cases of alcohol oxidase and alcohol dehydrogenase, the rate constants of the gas phase reaction were lower than those of aqueous phase reaction by two orders of magnitude and these results could be correlated to the vapor-liquid equilibrium data of the substrate, ethanol.

서 론

효소반응은 액상에서뿐만 아니라 다른 특수한 조건에서도 가능한데, 최근에는 기상에서의 효소반응에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 기상반응은 효소를 적당한 담체에 고정시키고 기질을 기체상태로 공급해 주어 반응을 일으키게 하는 방식인

데, 액상에서의 반응에 비해 대체로 다음과 같은 장점들을 갖는다.

1) 기상에서는 기질의 확산속도가 액상에 비해 비교할 수 없을 정도로 빨라서 기질의 mass transfer에 의한 제한을 액상반응에 비해 덜 받는다.

2) 기질로 사용하는 물질이 난용성이거나 비교적 끓는점이 낮을 때는 기질을 기체 상태로 바로 사용

할 수 있어 편리하다. 특히 산소나 이산화탄소 등은 고온일수록 용해도가 떨어지므로 이와 같은 기상반응계는 효과적일 것이다.

3) 액상반응에서 생성물의 분리정제는 비교적 여러 공정들을 거쳐야 하기 때문에 생산단가가 올라거나 기상반응계에서는 fractional condensation으로 쉽게 분리 정제가 가능하다.

4) 고정화된 효소를 dehydration시키면 열적 안정성이 높아져 고온에서도 반응이 가능하여 기존의 효소반응보다 높은 온도에서도 조업이 가능하고 보관의 측면에서도 유리하다.

새로운 바이오센서의 개발(1, 2)과 waste gas에서 유해한 성분의 제거(3), 그리고 기존의 화학공정을 대체하기 위한 연구 등의 측면으로 기상에서의 효소반응 연구가 진행되고 있는데, 그 한 예가 alcohol dehydrogenase와 조효소인 NAD를 albumin-glutaraldehyde porous particle에 coimmobilization시켜서 기상반응을 통해 알코올이나 알데히드를 생산하는 공정에 대한 연구이다(4-7). 그들은 기상반응을 통해 효소의 안정성을 높히고, 난용성 기질의 반응문제를 해결하려 하였다. 이들의 연구에서, 회분식 반응기를 이용하여 아세트알데히드의 환원반응이 수행되었을 때 반응이 약 1시간 정도 일정하게 유지되었으며 충전총 반응기를 이용한 부탄올의 산화반응과 아세트알데히드의 환원반응의 경우 약 3시간 정도 정상상태가 유지되었고 반응이 25시간 지속되었다. 그리고 이 정상상태 기간에서는 고정화된 효소의 안정성이, 같은 온도에서의 액상에서의 경우와 대체로 일치하다고 보고하였다.

이와 같이 기상에서의 효소반응은 많은 장점을 가지고 있으며 이를 여러 분야에 응용할 수 있으나 이 분야에 대한 연구는 상대적으로 많이 진전되어 있지 않으며, 특히 기상에서의 효소반응 속도식에 관해서는 많이 연구되어 있지 않은 상태이다. 그리고 효소를 이용한 기상반응에서는 반응온도와 효소의 hydration의 정도가 효소의 활성에 큰 영향을 미치므로 이에 대한 연구도 절실한 실정이며 이들에 대한 연구가 진전된다면 보다 정확한 바이오 기체센서의 제작이나 기존의 화학공정을 대체할 수 있는 새로운 공정의 개발에 큰 기여를 할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 액상에서의 반응속도식이 밝혀진 alcohol oxidase(EC 1.1.3.13)와 alcohol dehydrogenase-NAD(EC 1.1.1.1)의 두 효소를 서로 상반된 성질을 가진 담체인 DEAE-Cellulose와 controlled pore glass(CPG)에 고정화시켜서 에탄

올을 산화시키는 반응실험을 통해, 반응온도와 효소의 hydration의 정도가 기상반응의 반응활성 등에 미치는 영향과 담체의 흡착성능이 반응에 미치는 영향, 그리고 기상반응에서 효소반응속도식의 속도상수를 구하여 액상에서의 경우와 비교하고, 그 두계에서의 각각의 값이 갖는 연관성을 찾는 실험을 수행하였다. 그리고 이러한 연관성이, alcohol dehydrogenase와 같이 조효소(NAD)를 필요로 하고 전혀 다른 반응속도식을 가진 효소에도 적용되는지 알아보는 것이 본 연구의 주요 연구목적이다. 알코올은 비교적 쉽게 구할 수 있고, 값이 싸며, 끓는점이 낮아 상온에서 잘 기화되는 장점을 가지므로 본 실험에 적합한 기질로 선택되었다.

재료 및 방법

효소 및 효소고정화

사용한 효소는 *Pichia pastoris*에서 추출한 alcohol oxidase(EC 1.1.3.13)와 *Bakers yeast*에서 추출한 alcohol dehydrogenase(EC 1.1.1.1), 그리고 *Aspergillus niger*에서 추출한 catalase(EC 1.11.1.6)를 사용하였고 이는 모두 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다. Alcohol oxidase와 alcohol dehydrogenase를 고정화시키기 위해서 DEAE-cellulose와 controlled pore glass(CPG)를 사용하였다. 이 두 가지 담체는 Table 1과 같은 물성을 가지고 있으며, cellulose는 기체기질을 잘 흡착하는 성질이 있으며 CPG는 기질을 상대적으로 잘 흡착하지 못하는 성질이 있어, 담체의 흡착성능이 기상의 효소반응에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에 선정되었다. DEAE-Cellulose나 CPG 각각 1g에 phosphate buffer solution(pH 7.5) 8ml와 일정량의 효소를(alcohol oxidase : 1000 units, alcohol dehydrogenase : 1200units) 혼합하고, 효소가 담체에 잘 부착하도록 30분간 4°C에서 잘 저어주며 보관한 후, 이를 페트리디ッシュ에 얇게 펼쳐서 먼저 상온에서 적당히 건조시키고 이어 상온의

Table 1. Physical properties of solid matrix.

DEAE-Cellulose	Controlled Pore Glass(CPG)
Fine mesh	120~200mesh
Capacity : 0.9meq/g	Mean pore size : 2823 Å Surface area : 10.4m ² /g Pore distribution : 7.4 Pore volume : 1.07cc/g

vaccum oven에서 완전히 건조시키는 절차를 통해 고정화하였으며 DEAE-Celulose의 경우에는 425m 정도의 채로 걸러서 냉장고에 보관하였다. 이런 과정을 거치면 효소의 활성이 최소한 몇 달간 유지된다는 연구결과가 보고된 바 있다(9, 10).

효소의 Hydration

기상에서의 효소반응은 효소 표면에 어느 정도의 물분자들을 입히느냐 하는 것이 효소의 활성에 큰 영향을 미치므로 hydration의 정도를 정확히 조절하는 것이 매우 중요하다. 본 실험에서는 수산화나트륨용액으로 원하는 습도가 이루어진 밀폐된 공간에 얇게 펼친 효소를 12시간 동안 놓아두고 외부에서 온도를 조절해 줌으로써 효소 표면을 hydration시켰다.

분석

기상반응에서 에탄올과 아세트알데히드의 농도는 적정시간에 반응기의 윗부분에서 gas tight syringe로 2ml 뽑아내어 gas chromatography로 분석하였다. 액상에서의 효소반응에서는 생성물인 H_2O_2 를 Hildebrandt method(8)를 사용하여 분석하였다.

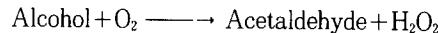
효소반응

액상 효소반응은 이중 water jacket이 설치된 10ml의 반응기에서 25°C에서 1분간 진행시켰다. 반응은 1 N HCl에 의해 정지되었으며 Hildebrandt method(8)에 의해 발색된 H_2O_2 의 농도를 측정하여 반응 속도식을 구하였다. 기상 효소반응은 0.8mM의 에탄올이 들어 있는 3.5ml의 vial에 30mg의 고정화 효소를 넣고 각기 다른 온도에서 수행되었으며 (8-9) 반응속도식은 생성물로 나오는 acetaldehyde의 농도를 측정하여 구하였다. 효소의 안정성 측정 실험에서는 hydration시킨 고정화 효소를 50°C의 항온오븐에 넣고 효소의 활성이 free enzyme 활성의 반으로 떨어질 때까지의 보관시간을 구하여 측정하였다. 이때 효소의 활성은 액상에서 에탄올의 산화반응에서의 반응활성으로 구하였다.

결과 및 고찰

Alcohol Oxidase

Alcohol oxidase는 호기성 박테리아의 이화작용에서 메탄올, 에탄올 등을 기질로 이용하는 효소로 아래와 같은 반응을 일으킨다.



이 효소는 각종 알코올에 대해 넓은 반응성을 가지며 대체로 탄소사슬이 길어지면 활성이 떨어진다. 효소반응에 있어서 반응온도는 반응에 큰 영향을 미치는 중요한 인자중의 하나이다. 액상의 효소반응에 있어서 효소의 활성은, 일반적으로 반응온도에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 본 기상반응에서의 온도의 영향을 알아보기 위하여 CPG에 고정화시킨 alcohol oxidase를 이용하여 에탄올을 산화시키는 반응을 20°C에서 50°C의 온도 구간에서 반응속도를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig에서 볼 수 있듯이 기상반응에서도, 반응속도가 반응온도에 의해 크게 영향을 받는다는 것을 알 수 있다. 액상에서의 효소반응의 경우 효소가 최고의 활성을 나타내는 온도구간은 35~40°C이다. 본 기상반응의 경우도 최고의 반응활성이, 액상에서와 비슷한 온도구간에서 얻어졌다. 이는 효소반응의 경우 반응온도가 액상과 기상반응에 미치는 영향의 양상이 비슷함을 말해준다.

위의 기상반응에서의 활성화에너지를, hydration 정도가 서로 다른 효소를 사용하여, Arrhenius plot

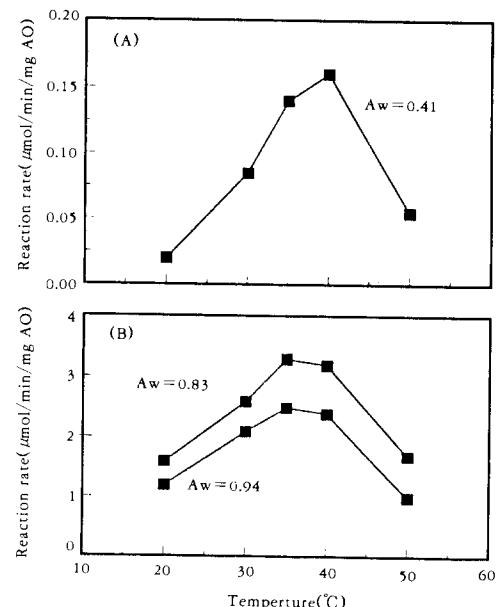


Fig. 1. Effect of temperature on alcohol oxidase dispersed on CPG.

(a) Aw=0.41

(b) Aw=0.83 and Aw=0.94

을 이용하여 구하였다(Fig. 2). 재료 및 방법에 명시한 절차에 의해서 효소를 hydration 시켰으며, 이를 수치적으로 표시하기 위하여 water activity (A_w)라는 parameter를 도입하였다.

Water activity(A_w) =

$$\frac{\text{partial pressure of water in salt solution}}{\text{vapor pressure of pure water}}$$

참고로 고정화시킨 효소 표면에 물분자를 monolayer로 hydration시킨다고 할 때 이때의 water activity는 약 0.2 정도가 된다고 한다(9, 10). Fig. 2에서 알 수 있듯이 기상반응에서의 활성화에너지는 효소의 hydration 정도가 클수록 감소하는 경향을 보이면서 액상반응에서의 활성화에너지의 값(5.5 kcal/mol)에 접근하였다. 이것은 효소 주위에 물분자가 많이 흡착되어 있으면 기상효소반응의 환경이 마치 액상에서와 같이 되기 때문인 것으로 고려된다. 또한 기상반응에서의 활성화에너지가 액상반응에서 보다 높게 나타났는데 이는 반응시 넘어야 할 에너지 장벽이 기상반응에서 더 높다는 것을 의미하는 것으로 기상반응에서는 효소의 고정화로 인해 효소주위의 미세환경이 액상에서와 같이 유연하지 못하므로 삼차원적인 입체성이 꼭 맞아야 반응이 일어날 수 있기 때문에 기상반응의 활성화에너지가 액상 반응에 비해 높게 나타나는 것으로 생각된다. 이는 기상에서의 반응속도가 액상에서의 반응속도보다 작

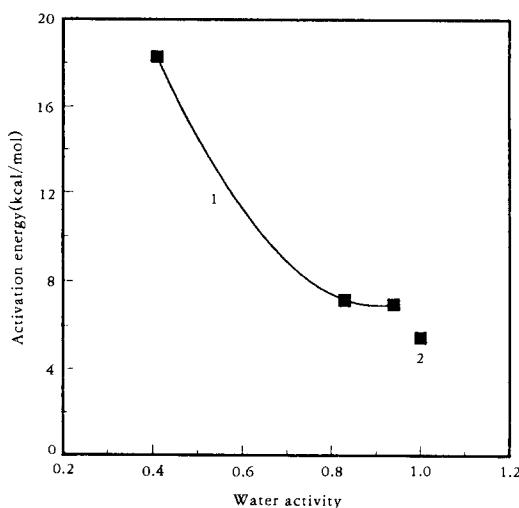


Fig. 2. Effect of water activity on activation energy(1:gas phase, 2:liquid phase).

다는 것에 대한 설명도 될 수 있을 것이다.

위의 결과에서도 어느 정도 알 수 있듯이 기상에서의 효소반응에서는 고정화된 효소 표면의 hydration 정도가 중요한 반응요소 중의 하나이다. 따라서 water activity에 따른 반응활성과 효소의 안정성의 변화를 알아보았다(Fig. 3). 효소의 활성은 water activity가 증가함에 따라서 현저히 증가하다가 water activity가 0.83에서 최고의 활성을 나타냈으며, 그 이상의 water activity에서는 오히려 반응활성이 water activity가 증가함에 따라 다소 감소하는 경향을 보였다. 이 결과로 볼 때, 지나친 hydration은 오히려 기체상태의 기질이 효소와 접촉하는 것을 방해하는 듯하다. 효소의 안정성은 전 구간에 있어서 water activity가 증가함에 따라 감소하였는데, water activity가 0.5 정도까지는 안정성이 비교적 급격히 감소하였고 그 이상의 water activity에서는 효소의 안정성이 water activity의 영향을 크게 받지 않고 어느 정도 일정하게 유지되었다. 이는 hydration 이 효소의 안정성을 저하시킬 수 있는 한계가 있음을 말해준다. 일단 효소의 안정성이 이 한계에 까지 저하되고 나면 더 이상의 hydration은 효소의 안정성에 별 영향을 끼치지 못한다. 이와 같이 기상의 효소반응에 있어서 효소의 hydration 정도는 효소반응의 활성과 효소의 안정성에 큰 영향을 미친다. 따라서 기상반응에 있어서 반응을 최적화 시키는 hydration 정도를 찾아 반응을 수행하는 것이 중요하다.

다음은 고정화된 효소를 사용하여 기상에서 효소

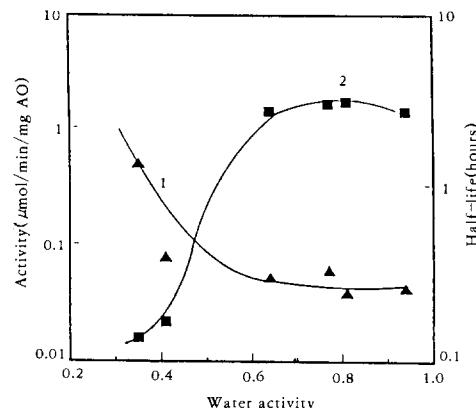


Fig. 3. Effect of water activity on gas phase activity and half-life at 40°C.
(1: stability, 2: activity)

반응을 하는 경우 사용된 담체의 특성이 반응에 영향을 주는지를 알아보기 위하여, 기체기질을 잘 흡착하는 DEAE-Cellulose와 상대적으로 흡착성능이 좋지 않은 CPG에 효소를 고정화시키고 기상반응의 결과를 비교해 보았다(Fig. 4). DEAE-Cellulose와 CPG 두 가지 경우 모두 시간에 따른 생성물의 농도가 비슷하게 나온 Fig. 4의 결과로 볼 때 고정화 효소를 사용하여 기상반응을 할 때 사용된 담체의 흡착성능은 반응에 영향을 주지 않음을 알 수 있다. 담체의 특성이 반응에 미치는 영향을 더욱 폭넓게 알아보기 위해서는, 이와 관련된 많은 연구가 필요하겠다. Fig. 4에서 DEAE-Cellulose의 경우 기질인 에탄올의 농도가 CPG보다 낮게 나왔는데 이는 담체에 기질이 더 많은 흡착되어, CPG에 비해 상대적으로 기체상에서의 기질농도가 더 낮기 때문이다.

Alcohol oxidase의 액상에서와 기상에서의 효소 반응속도식을 분석, 비교하기 위하여 각각의 속도식의 속도상수를 구하였다. 에탄올이 산화할 때 생성물로 나오는 과산화수소수는 반응에 저해작용을 하는데, 이 저해작용을 없애기 위하여 alcohol oxidase의 3.6배의 양의 catalase를 넣어주었다. 액상

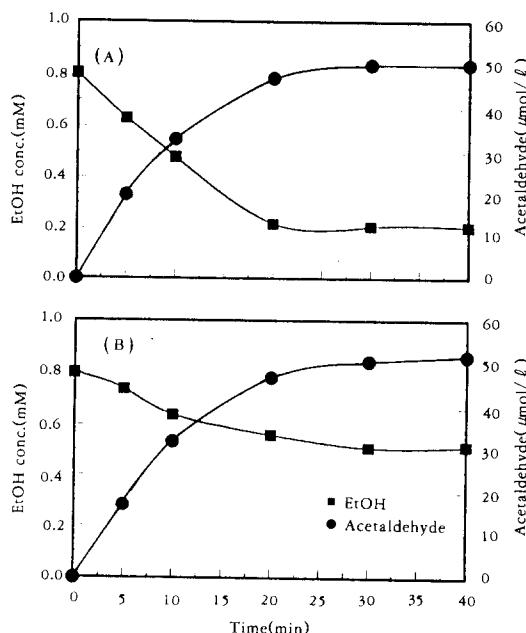


Fig. 4. Gas phase reaction of the immobilized enzyme at 40°C.
 (a) support:DEAE-cellulose
 (b) support:CPG

반응의 경우에는 통상의 효소반응과 같이 catalase를 Alcohol oxidase와 같이 섞어 반응기에 넣어주었으며 기상반응에서는 효소고정화 과정을 거쳐서 Alcohol oxidase와 같이 고정화시켜서 사용하였다. 액상반응에 있어서 이 catalase의 첨가가 반응에 미치는 영향이 Fig. 5에 나타나있다. 반응이 40분 경과된 후의 반응수율이 catalase를 첨가한 경우가 그렇지 않은 경우에 비해 다섯 배 이상 높았다.

Alcohol oxidase에 의한 에탄올의 산화반응은 다음의 Michaelis-Menten 속도식을 따르는데, 각각 기상과 액상에서의 반응속도상수(Km)를 Lineweaver-Burk 도해법으로 구하여 비교하였다(11). 반응은 25°C에서 수행되었다.

$$v = \frac{V_{max} S}{K_m + S}$$

기상반응은 활성이 가장 률 매인 water activity 가 0.83일 때 실시하였다. 실험결과 액상에서의 Km 값은 11.2mM이고 기상에서의 Km값은 약 0.238 mM로 2 정도의 order of magnitude 차이가 났다. Klibanov 등은(9), 기상 중의 에탄올 분자와 고정화 된 효소와의 평형이 존재한다고 가정하고 이러한 현상을 설명하였다. 즉, 효소 표면의 hydration으로 인해 기질분자와 효소와의 평형이 마치 에탄올 용액

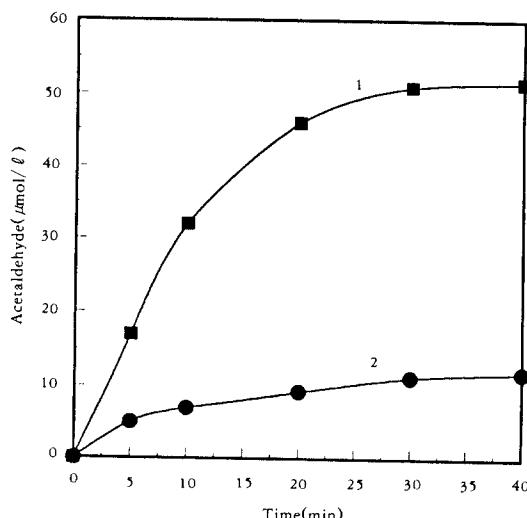


Fig. 5. Effect of catalase on the gas phase reaction at 40°C.
 (Aw=0.83, 1:with catalase, 2:without catalase)

에서의 기-액 평형처럼 될 것이고 따라서 교반으로 인해 각상에서의 반응에 물질전달 문제가 큰 영향을 끼치지 못할 때 반응속도는 효소가 에탄올 분자와 접촉하여 반응을 일으킬 수 있는 기회에 의해 결정된다. 그러므로 기상반응에서의 속도상수값이 액상반응에 비해 낮게 나오는 것은, 효소와 기질분자간의 평형으로 인한 에탄올 용액의 기-액 평형시, 기상에서의 에탄올 농도가 액상반응의 경우보다 작기 때문이라고 설명하였다. 본 실험에서는 Klibanov팀과는 달리 CPG에 고정화된 효소를 사용하여 기·액상에서의 반응속도상수를 알아보았는데 이들의 order of magnitude 차이가 Fig. 6에 나타난 에탄올의 기·액 평형에서의 각상의 농도의 order 차이와 같았다. 이 사실로 보아 이러한 논리는 성질이 다른 담체들에 대해서도 적용될 수 있을 것 같다. 즉 기상에서의 효소반응 속도상수값은 담체의 종류에 관계없이 사용된 기질의 solution-vapor equilibrium data로부터 어느 정도 유추가 가능했다. 그리고 이 상관성이 효소의 종류에도 관계없이 적용될 수 있는지를 알아보기 위하여 같은 산화환원 효소류이지만 조효소(NAD)를 필요로 하고 좀더 복잡한 반응속도식을 가진 alcohol dehydrogenase의 반응속도상수를 구하여 액상과 기상의 수치를 비교 분석하였다.

Alcohol Dehydrogenase

Alcohol dehydrogenase는 효소원에 따라 여러 가지 종류가 있고 또한 그것들의 물리적 성질, 기질 특이성, 반응속도식 등도 서로 다르다. 본 실험에서

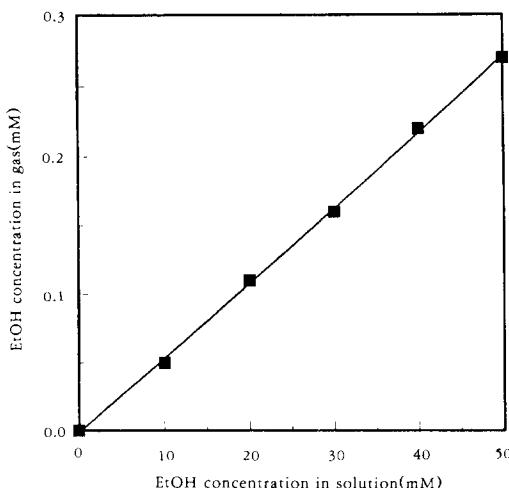


Fig. 6. Water-Ethanol equilibrium data at 25°C.

는 yeast에서 나온 alcohol dehydrogenase를 사용하여 에탄올을 산화시키는 아래 반응에 대해서 반응온도와 효소의 hydration 정도에 따른 효소의 활성변화와 효소반응 속도상수를 알아보았다. Fig. 7의 결과로 볼 때 alcohol dehydrogenase 효소는 alcohol oxidase의 경우와 비슷하게 최적의 온도영역이 35°C 부근에서 나타났으며 반응활성이 반응온도와 hydration의 정도에 의해서 크게 영향을 받았다.



Alcohol dehydrogenase는 alcohol oxidase와 달리 ordered bi bi mechanism을 따르는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 Wratten 등의(12) 연구에서 보고된 다음의 모델식을 이용하여 반응속도식의 상수값들을 구하였다(11).

$$1/v = (K_{ia}K_b/AB + K_a/A + K_b/B + 1)/V_1$$

A와 B는 각각 NAD와 에탄올의 농도이다. 위의 식에서 $1/v$ vs. $1/B$ 와 $1/v$ vs. $1/A$ 를 도해하여 속도상수값들을 구하였는데 그 결과가 Table 2에 나타나 있다.

Table 2에서 볼 수 있듯이 기상에서의 속도상수

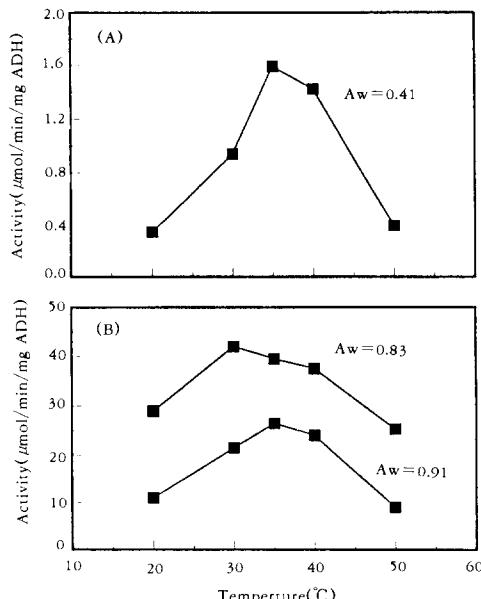


Fig. 7. Effect of temperature on alcohol dehydrogenase activity dispersed on CPG.

(a) $Aw=0.41$

(b) $Aw=0.83$ and $Aw=0.91$

Table 2. Kinetic constants of alcohol dehydrogenase at liquid and gas phase.

Liquid phase reaction(mM)	Gas phase reaction(mM)
Wratten(1963)	
K _a (7.4±2.5)×10 ⁻²	7.41×10 ⁻⁴
K _b (130±10)×10 ⁻¹	0.211
K _{ia} (6.1±0.5)×10 ⁻¹	3.03×10 ⁻³

값인 K_a, K_b, K_{ia}들이 기존에 보고된(11) 액상에서의 상수값에 비해 역시 2 정도의 order of magnitude가 작았다. 이 결과는 같은 산화환원 효소류지만 조효소를 필요로 하면서 한층 복잡한 반응속도식을 가진 효소의 기상반응 속도식의 속도상수도 액상에서의 속도상수와 기질의 solution-vaper equilibrium data에 의해서 결정되는 연관성을 가진다는 사실을 말해준다.

요 약

Alcohol oxidase와 alcohol dehydrogenase를 DEAE-Cellulose와 CPG에 고정화시켜 에탄올을 산화시키는 반응을 기상에서 수행하였다. 이 기상반응의 반응활성은 반응온도와 효소의 hydration 정도에 큰 영향을 받았다. 온도에 의한 효소활성의 변화는 액상에서의 경우와 비슷한 경향을 보였다. 즉 기상반응에서도 35°C에서 40°C 사이에서 최고의 활성을 나타내었다. 효소의 hydration 정도는 효소의 활성에 매우 큰 영향을 끼치는 인자였는데 water activity가 0.8 정도까지는 water activity가 증가함에 따라 효소의 활성이 급격히 증가하다가 그 이상에서는 다소 감소하는 경향을 보였다. 효소의 안정성도 water activity에 의해서 크게 영향을 받았는데 water activity가 0.5 정도까지는 water activity가 증가함에 따라 안정성이 비교적 급격히 감소하였고 그 이상의 water activity에서는 효소의 안정성이 water activity의 영향을 크게 받지 않고 어느 정도 일정하게 유지되었다. 담체의 흡착성능이 기상반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 서로 흡착성능이 다른 DEAE-Cellulose와 CPG에 고정화된 효소를 사용하여 반응을 비교해 본 결과 담체의 흡착성능은 반응에 별 영향을 주지 못했다. Alcohol oxidase의 기상반응 속도상수(Km=0.24mM)는 액

상에서의 값(Km=11.22mM)과 order of magnitude가 약 2 정도의 차이를 보여주었는데 이는 기질인 에탄올의 기-액 평형상태에서의 각상간의 농도의 order of magnitude 차와 비슷하였다. 같은 산화효소류이나 조효소를 필요로 하고 반응속도식이 많이 다른 alcohol dehydrogenase 효소에도, 기상반응속도상수와 사용기질의 기-액 평형 데이터와의 이와 같은 연관성이 성립하였다. 이같은 연관성이 산화환원효소류가 아닌 다른 효소류에도 적용될지의 여부는 앞으로의 연구로 밝혀야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. J. Nageh-Ngwainbi, P. H. Foley, S. S. Kuan and G. G. Guilbault(1986), *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5444.
2. Yikai Zhou, Hong Li and Shu Ren(1990), *Anal. Chem.*, **62**, 182.
3. M. Zilli, A. Converti, A. Lodi, M. Del Borghi and G. Ferraiolo(1993), *Biotech. Bioeng.*, **41**, 693.
4. G. G. Guilbault and J. H. Luong(1988), *J. Biotechnology*, **9**, 1.
5. S. Pulvin, M. D. Logoy, R. Lortie, M. Pensa and D. Thomas(1986), *Biotechnology Letters*, **8**, 783.
6. L. P. Nells, J. A. Arnold and D. S. William (1990), *Biotech. Bioeng.*, **36**, 834.
7. V. I. Efremenko, S. V. Stolvin and L. I. Grekov(1990), *Prikladnaya Biokhimiya Mikrobiologiya*, **26**, 11.
8. A. G. Hildebrandt, M. Roots, and G. Heinemeyer(1978), *Meth. Enzymol.*, **52**, 342.
9. E. Barzana, A. M. Klivanov and M. Karel (1987), *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **15**, 25.
10. E. Barzana, A. M. Klivanov and M. Karel (1989), *Biotech. Bioeng.*, **34**, 1178.
11. Dong Ok Kim(1992), M. S. Thesis, KAIST, 31.
12. C. C. Wratten and W. W. Cleland(1963), *J. Biochemistry*, **2**, 935.