

셀룰라아제의 흡착에 미치는 셀룰로오스 결정성의 효과

김 동 원 · 김 경 미 · 정 정 호 · 김 태 승

충북대학교 자연과학대학 화학과

(1991년 9월 20일 접수)

Effects of the Crystallinity of Cellulose on the Properties of Cellulase Adsorption

Dong Won Kim, Kyeong Mi Kim, Chung Ho Chung, and Tae Seung Kim

Department of Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763, Korea

(Received September 20, 1991)

요 약 : 셀룰로오스에 대한 결정성을 요오드흡착량 (ISV), 퍼센트 결정성지수 (CrI) 및 상관결정성 지수 (C_c)로 나타내어 이들 값을 서로 비교하고, 셀룰로오스에 대한 셀룰라아제의 흡착친화력에 미치는 결정성 효과를 조사하였다. 사용한 셀룰로오스 중 Avicel PH-101, Sigmacell 100 및 Solka Floc BW-300 등은 전처리 없이 사용하였고, α -cellulose는 효소를 이용한 가수분해를 통하여 일정 시간 전처리한 후 회수하여 사용하였다. 실험결과로부터 전처리하지 않은 셀룰로오스의 CrI 값은 ISV와 상관관계가 있고, 전처리한 셀룰로오스의 경우에는 C_c 값과 ISV가 상관관계가 큼을 알았다. 또한 Langmuir등온흡착식으로부터 셀룰라아제의 흡착파라미터를 얻었다. 이때 전처리된 기질의 경우, 셀룰로오스에 대한 셀룰라아제의 친화력이 기질의 C_c 값 또는 ISV에 의존하였으나, 전처리 하지 않은 경우의 기질에 대해서는 매우 작은 의존성을 보여주었다.

Abstract : In determining the crystallinity of cellulose, the three different methods were chosen. The parameters from each experiment i. e., the iodine sorption value (ISV), the percent crystallinity index (CrI) and the correlation crystallinity index (C_c), were correlated with each other to find relationships. The dependence of affinity on the crystallinity of cellulase was studied also. The cellulose samples used were Avicel PH-101, Sigmacell 100, Solka Floc BW-300 and α -cellulose. Among them, α -cellulose was hydrolyzed in the presence of cellulase for various periods of time. The untreated cellulose samples showed a good linear relationship between the CrI and ISV. On the other hand, the pretreated α -cellulose residues showed a good correlation between the C_c and ISV rather than that between CrI and ISV. The affinity of cellulase to pretreated celluloses depended preferably on the values of C_c and ISV comparing with the negligible dependence on the crystallinity parameters of the untreated cellulose.

서 론

생체고분자 물질로서 셀룰로오스는 천연유기물로 는 가장 많은 양이 식물의 광합성에 의해 생산되며, 신물질의 원료로서 또는 대체에너지 자원으로서 활용가능성이 크게 증가되고 있다.^{1,2}

셀룰로오스의 구조는 대부분 비결정성 부분과 결정성 부분으로 나누는 "two-phase concept"로 다루어지고 있다. 또한 셀룰로오스의 결정성은 고분자로서의 특성을 나타내는 기준으로 널리 사용되고 있으며,³ 그 측정방법으로 x-ray diffractometric method, spectroscopic method와 I₂ 흡착방법 등이 널리 사용되고 있다.^{3,4} 특히 Wakelin 등⁵에 의해 개발된 x-ray diffractogram 방법은 Segal 등⁶이 단순화시켜 셀룰로오스의 결정성 측정에 널리 이용되고 있다. 최근 x-ray 방법은 화학적으로 전처리한 셀룰로오스의 결정성 측정에서 요오드흡착 방법⁷과 일치된 결과를 보여주는 것으로 알려져 있다. 그리고 다양한 결정성 셀룰로오스의 분자구조에 대한 연구에서 셀룰로오스 사슬간의 parallel과 antiparallel구조에 대한 연구들이 많이 진행되고 있으나 두 구조에 대한 타당성은 아직 분자구조론적으로 명확하게 설명되지 않고 있다.⁴ 또한 셀룰로오스의 결정성은 측정 방법에 따라 서로 다른 경향을 보이기도 하며, 분자구조와 결정성과의 관계 역시 아직 밝혀져 있지 않다. 더구나 셀룰로오스의 결정성 및 결정구조가 그의 반응성 등에 어떠한 영향을 주는가에 대한 연구는 아직 체계적으로 이루어지고 있지 못한 실정이다. 한편 셀룰로오스를 이용하여 에너지 자원화하기 위한 방법으로 효소적 가수분해반응에 관한 연구가 계속되고 있는데, 이러한 반응에서 셀룰로오스의 결정성이 효소반응 속도를 크게 감소시키는 것으로 알려져 있다.^{8,9} 최근 이와 관련된 연구에서 셀룰로오스-셀룰라아제(celulose-cellulase) 반응계에서의 효소의 흡착이 가수분해 속도에 크게 영향을 주는 것으로 보고되었다.^{10~13} 셀룰로오스에 대한 셀룰라아제의 흡착에 관한 연구에서 여러 연구자들은 이러한 흡착이 셀룰로오스의 흡착분배계수,¹⁰ 결정성¹⁴이나 비표면

적¹⁵ 등에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있으며,¹⁶ 셀룰로오스의 효소적 또는 화학적 전처리나 milling과 같은 물리적 전처리는 효소의 흡착과 가수분해속도에 큰 변화를 가져온다.^{17~19} 그러나 그 결과들의 해석에는 다양한 견해가 제시되고 있어, 셀룰로오스의 물리화학적 성질에 대한 조사방법과 함께 보다 정확한 이해가 필요한 실정이다. 셀룰로오스는 처리 방법 및 전처리 정도에 따라 물리화학적 성질이 달라지며, 특히 효소적 가수분해 반응에서 효소의 흡착에 큰 영향을 주게 될 것이다.

본 연구에서는 다양한 셀룰로오스성 물질과 효소적 가수분해에 의해 전처리된 셀룰로오스의 결정성을 서로 다른 측정 방법으로 결정하여 비교하고, 셀룰라아제의 흡착 특성과의 관계를 조사하였다.

실험 및 방법

시 약

효소는 *Trichoderma viride*로 부터 분리된 셀룰라아제 (Type V)로 Sigma Chemical사 제품을 사용하였다. 효소의 활성도는 4.4 units/mg solid였다. 효소의 활성도 1 unit는 pH 5.0, 37 °C에서 셀룰로오스 1g을 1시간동안 반응시켰을때, 1.0 μmole의 글루코오스를 생성하는 양이다. 기질로 사용한 셀룰로오스는 Avicel PH-101 (FMC Co., USA), Solka Floc BW-300 (JR Co., USA), Sigmacell 100 및 α-cellulose (Sigma Chem. Co., USA)를 사용하였다. 또한 기타 시약들은 모두 분석용 시약을 정제없이 그대로 사용하였다.

결정성 지수의 결정

요오드의 흡착량(ISV, iodine sorption value): 기질로 사용한 각 셀룰로오스에 대한 I₂의 흡착량은 Hessler 등⁷에 의한 방법을 사용하였다. 즉, 셀룰로오스 분말 0.3g을 250 mL 비이커에 넣고 2 mL의 요오드 용액(I₂, 5g과 KI, 40g을 증류수에 녹여 50 mL로 만든 용액)을 첨가한다. 여기에 100 mL의 포화 황산나트륨용액을 넣은 다음, 1시간 동안 방치하고, 이 용액에 1% 녹말용액을 1 mL 가한

후 0.2N 티오황산나트륨으로 적정한다. 이때 α-cellulose 그램 당 흡착된 요오드의 양은 다음과 같은 식으로 결정하였다.

$$\frac{(a-b) \times 2.04 \times 2.54}{0.3} = \frac{I_2(\text{mg})}{\text{cellulose}(\text{g})} \quad (1)$$

여기서 a는 검정을 위하여 요구된 0.2N 티오황산나트륨 용액의 부피, b는 흡착량 결정을 위하여 요구된 0.2N 티오황산나트륨 용액의 부피이다.

퍼센트 결정성 지수 (CrI(%), percent crystallinity index)⁵: 셀룰로오스에 대한 퍼센트 결정성 지수는 x-ray diffraction analyzer (Rikakikai Co, Japan)를 사용하였다. 이때 diffraction scan은 nikel filter의 Cu-Kα radiation과 Geiger counter를 사용하여 35kV, 20mA에서 실시하였다.

CrI(%)는 Fig. 1과 같은 x-ray diffractogram으로부터 Segal들 방법⁶에 의해 구하였으며, 이때 사용된 CrI 구하는 식은 다음과 같다.

$$\text{CrI}(\%) = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100 \quad (2)$$

(2)식에서 I_{002} 는, 2θ가 22°일 때의 diffractogram의 intensity이고, I_{am} 은 2θ가 18°일 때의 intensity이다.

상관결정성 지수 (C_c , correlation crystallinity index): C_c 는 CrI에서와 Fig. 2와, 같은 diffractogram에서 Wakelin 등⁵의 방법에 의해 다음 식으로부터 얻는다.

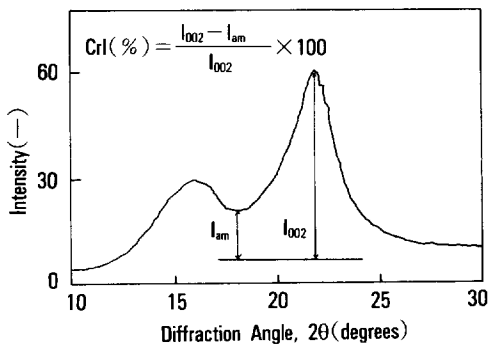


Fig. 1. Typical x-ray diffraction pattern of microcrystalline cellulose.

$$C_c = \frac{[I_s(\theta) - I_a(\theta)]}{[I_{cr}(\theta) - I_a(\theta)]} \quad (3)$$

여기서 $I_s(\theta)$, $I_a(\theta)$ 및 $I_{cr}(\theta)$ 는 각각 시료 셀룰로오스, 비결정성 및 표준결정성 셀룰로오스에 대한 각 θ에서의 x-ray diffraction intensity이다. 이때 사용한 표준 결정성 셀룰로오스는 Avicel PH-101을 사용하였고, 이것을 진한 인산으로 용해한 후 증류수에서 침전시켜 회수하여 비결정성 시료로 사용하였다. Fig. 2의 intensity로부터 Fig. 3과 같이 plot하여 그 기울기로부터 C_c 를 결정하였다.

단백질의 정량

용액 속에 녹아있는 효소의 양을 측정하기 위하여, Lowry 방법²⁰으로 단백질을 정량하였고, 표준 단백질로서 bovine serum albumin을 사용하였다.

효소적 가수분해에 의한 셀룰로오스의 전처리

pH 4.8인 0.05M sodium acetate 완충용액 150 mL에 10g의 α-cellulose를 넣은 현탁액에 70mg의 셀룰라아제로 각각 6, 24 및 48시간씩 가수분해시킨 후, 남은 셀룰로오스를 원심분리하여 회수하였다. 그리고 셀룰로오스에 흡착되어 있는 셀룰라아제를 제거하기 위하여, 1.0M NaCl로 여러번 세척한 뒤 다시 증류수로 충분히 세척하여 냉동 건조하였다.¹⁴

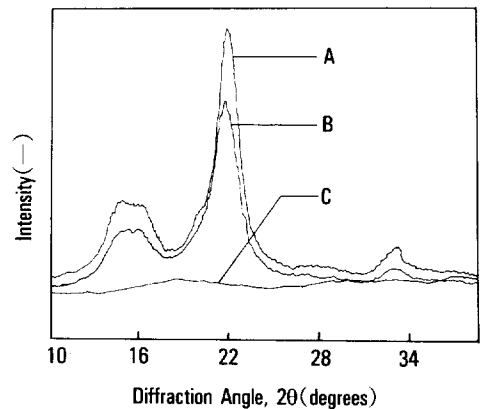


Fig. 2. X-ray diffractograms of crystalline and amorphous standards. (A) Crystalline cellulose, Avicel PH-101; (B) Sample cellulose; (C) Amorphous cellulose, phosphoric acid-regenerated cellulose.

셀룰로오스에 대한 셀룰라아제의 흡착

흡착을 위하여 셀룰로오스 시료 (50mg)를 pH 4.8 인 0.1M sodium acetate 완충용액의 4.5mL에 넣고 30분 동안 30°C에서 preincubation한 다음 효소 용액 0.5mL를 첨가하여 0.2mg/mL에서 1.8mg/mL까지 다양한 농도의 반응 용액을 만들었다. 이 반응의 혼합물을 항온 reciprocal shaker (25°C)에서 30분 동안 shaking한 후, 원심분리기 (3,000 r. p. m.)에서 5분 동안 원심분리하고, 상등액의 흡착되지 않고 남아있는 효소 양을 Lowry 방법²⁰에 의하여 측정하였다.

결과 및 고찰

셀룰로오스성 물질의 구조적 특성

셀룰로오스성 물질의 결정성을 측정하기 위하여 Fig. 1과 같이 각 셀룰로오스에 대한 x-ray diffracto-

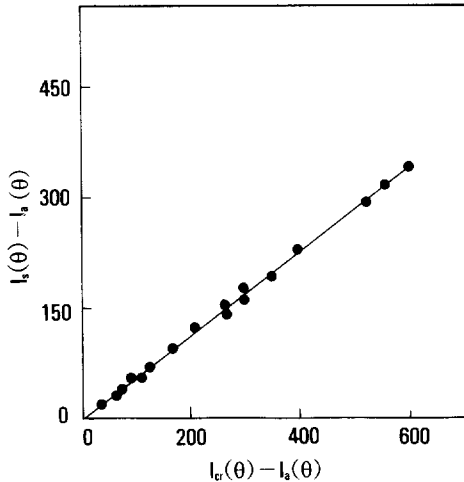


Fig. 3. Plot of $[I_s(\theta) - I_a(\theta)]$ vs. $[I_{cr}(\theta) - I_a(\theta)]$.

gram을 얻었다. 이러한 diffractogram으로부터 CrI와 C_c 를 계산하였고, 요오드흡착에 따른 ISV를 측정하여 이들을 Table 1에 수록하였다.

여기서 얻어진 결과로부터 셀룰로오스의 결정성을 나타내는 파라미터는 그 측정방법에 따라 값이 서로 다를 수 있었다. 고분자물질의 결정성을 측정하는 방법인 요오드 흡착에 의한 ISV와 CrI 및 C_c 값과의 상관관계를 Fig. 4와 Fig. 5에 각각 나타내었다.

요오드는 셀룰로오스의 비결정성 부분에 대부분 흡착된다. 따라서 요오드의 흡착량은 셀룰로오스의

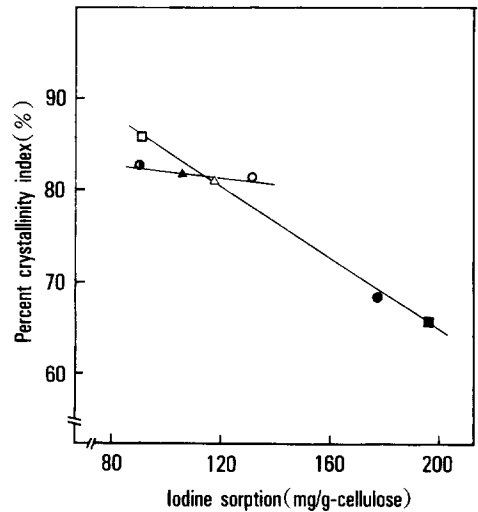


Fig. 4. Correlation between percent crystallinity index (CrI) and iodine sorption value (ISV) for various celluloses. (■) Solka Floc BW-300; (●) Sigmacell type 100; (□) Avicel PH-101. Enzymatic pretreated α -cellulose, enzymatic hydrolysis time: (○) 0 h; (△) 6 h; (▲) 24 h; (●) 48 h.

Table 1. Crystallinities of Celluloses Determined by Various Methods

Crystallinity	Solka Floc BW-300	Sigmacell type 100	Avicel PH-101	α -cellulose			
				0 h*	6 h*	24 h*	48 h*
ISV	197.4	174.5	89.8	135.6	120.6	100.8	86.1
CrI	66.7	68.5	85.3	81.6	80.1	81.2	82.3
C_c	0.62	0.39	1.00	0.64	0.77	0.86	0.97

* Enzymatic pretreated time.

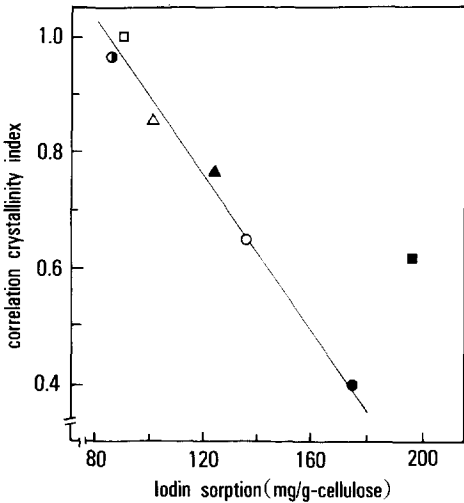


Fig. 5. Relationship between correlation crystallinity index (C_c) and iodine sorption value (ISV) for various celluloses. Symbols are the same as in Fig. 4.

결정화도에 반비례한다. 이는 Fig. 4와 Fig. 5에서와 같은 CrI 및 C_c 값과의 비교에서 그 경향을 알 수 있다.²¹ 전처리하지 않은 시료에 대한 결정성은 CrI값과 ISV 사이에 서로 밀접한 관계가 있음을 보여 주었으며, 각 셀룰로오스에 대하여 뚜렷한 값의 차이를 보여 주었다. 반면에, 효소적 가수분해에 의해 전처리된 셀룰로오스들에 대한 CrI 값은 전처리 시간에 따라 크게 변화하지 않았다. 그러나 C_c 값 또는 ISV는 전처리 시간에 따라 일정한 값의 변화를 보여 주었다. 따라서 CrI값은 전처리된 셀룰로오스의 결정성을 나타내는데 적당하지 않음을 알 수 있었다. 효소적 가수분해에 의한 전처리에서 셀룰라아제는 셀룰로오스의 표면을 가수분해시킴으로 셀룰로오스 입자의 내부의 구조보다 표면에서 더 큰 구조변화를 가져올 것이다. 이러한 셀룰로오스의 구조의 부분적인 변화는 특정한 diffraction angle의 변화에 의해 계산되는 CrI값에 작은 변화를 보여 줄 것이다. 다른 실험 결과로서, Saafan 등²¹은 화학적 전처리를 통한 실험에서는 CrI와 요오드흡착량이 서로 밀접한 관계가 있음을 보고하였는데, 이러한 결과는 이들의 화학적 전처리가 효소적 전처리와는 달리 셀룰로오스의 전체적 구조에 영향을 주기 때문이다.² 한편, C_c

에 의해 얻어진 값은 전처리한 셀룰로오스에 대한 요오드흡착량과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. C_c 값은 x-ray diffraction intensity를 갖는 모든 회절각에 대한 intensity로부터 얻어지므로, 전처리된 셀룰로오스의 구조변화를 나타내는데는 CrI 값보다 효과적일 것이다. 전처리하지 않은 다양한 셀룰로오스에 대하여 C_c 값이 다른 값과 작은 관련성을 보여주는 것은 서로 다른 셀룰로오스성 물질의 x-ray diffractogram에서 발견되는 diffraction 형태의 부분적인 차이에 기인하는 것이다. 이러한 diffractogram 형태의 차이는 Wakelin식, 즉 (3)식에 의해 좋은 직선관계가 얻어지기 어렵다. 따라서 전처리하지 않은 셀룰로오스에 대한 ISV는 오히려 CrI와 유사한 경향을 나타내는 것이다.

위와 같은 결과들을 종합할 때, ISV는 전처리하지 않은 시료에 대하여 CrI값과 보다 더 관계있으며, 효소적 전처리에 의한 시료에 대해서는 C_c 와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. 따라서 ISV는 다양한 셀룰로오스성 물질의 결정성을 비교하는 방법으로 사용할 수 있을 것이다. 또한 셀룰로오스의 결정성을 셀룰라아제와 같은 흡착특성과 관련지어 생각할 때, 다양한 결정성 측정방법에 의하여 검토되어야 할 것이다.

셀룰로오스에 대한 셀룰라아제의 흡착

이미 언급한 바와 같이 셀룰로오스의 효과적 가수분해과정은 셀룰라아제의 흡착과정을 거쳐 진행된다. 따라서 흡착현상의 이해는 가수분해반응의 메커니즘을 이해하는데 필수적으로 연구되어야 할 분야이다. 특히 가수분해의 속도에 크게 영향을 미치는 셀룰로오스의 결정성은 효소의 흡착과 관련지어 이해되어야 할 것이다.

셀룰로오스에 대한 각 성분 효소의 흡착은 주어진 온도에서 일정한 농도의 기질용액과 함께 실시되었다. 효소-기질간의 흡착반응은 Stuart와 Ristroph²²가 제시한 바와 같이 기질의 한 흡착자리에 한 효소가 흡착하여 평형에 도달된다는 것을 가정하였다. 효소의 농도변화에 따른 흡착량의 변화는 다음과 같이 Langmuir 등온흡착식에 적용하였다.

Table 2. Langmuir Adsorption Parameters on Various Cellulosic Adsorbents at 30 °C

Parameter	Solka Floc BW-300	Sigmacell type 100	Avicel PH-101	α-cellulose			
				0 h*	6 h*	24 h*	48 h*
A _{max}	50.0	46.8	43.1	27.7	26.5	24.4	20.3
K	1.7	2.3	3.2	3.4	3.8	4.3	6.2

* Enzymatic pretreated time.

$$A = A_{max} \cdot K \cdot E / (1 + K \cdot E) \quad (4)$$

여기서 A는 기질에 흡착된 효소량 (mg/g-cellulose), A_{max}는 효소의 최대흡착량, K는 흡착평형상수 (mL/mg), E는 용액 내에 흡착되지 않은 효소의 농도 (mg/mL)이다. 또한 흡착등온식의 각 파라미터를 얻기 위하여 (4)식을 다음 식과 같이 쓸 수 있다.

$$E/A = 1/(K \cdot A_{max}) + (1/A_{max}) \times E \quad (5)$$

(5)식을 E/A 대 E로 plot하여 그 기울기와 절편으로부터 A_{max}와 K값을 구할 수 있다. 본 실험에서 얻어진 각 효소에 대한 흡착 실험값으로부터 두 성분 효소의 흡착은 Langmuir 등온흡착 형태에 따라 진행됨을 알 수 있었다 (Fig. 6).^{11,14,15} 그리고 (5)식을 이용하여 얻어진 Langmuir 파라미터 값들을 각각 Table 1에 수록하였다.

Langmuir 파라미터에서 K는 흡착친화력을 의미하는 것으로 여러 연구에서 셀룰로오스의 물리화학적 특성, 특히 결정성과 같은 성질에 관계되어 있음이 보고된 바 있다.¹⁴ 또한 A_{max} 값은 주로 셀룰로오스의 비표면적에 의존하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이들 두 파라미터 값은 셀룰라아제 각 성분에 따라 서로 다르며, 셀룰로오스의 여러가지 물리화학적 특성들이 복합적으로 효소의 흡착에 영향을 미친다.

Fig. 7에 나타난 것 처럼 전처리하지 않은 셀룰로오스에 대한 각 결정화도 값과 ln K값 사이에는 분명한 상관성이 발견되지 않았다. 다만 CrI값과 ISV는 α-cellulose를 제외한 경우 이 값이 K값과 부분적으로 관계있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 셀룰라아제의 흡착에 셀룰로오스의 구조적 차이 이외에도 표면적이나 중합도 등의 차이가 복합적으로 영향을

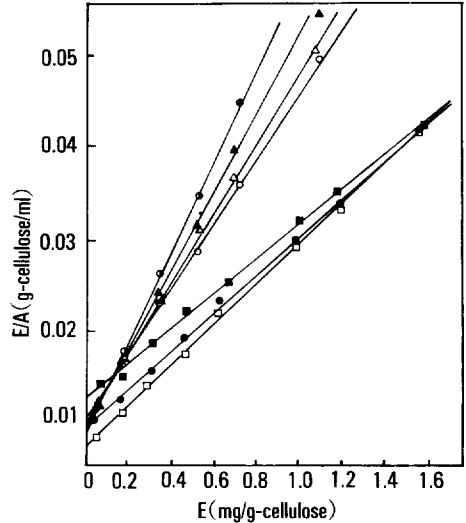


Fig. 6. Plots of E/A vs. E at 30 °C. Symbols are the same as in Fig. 4.

미치기 때문인 것이라 생각된다. 셀룰로오스의 표면적에 의한 흡착특성의 변화는 이미 보고된 바 있다.¹⁵ 반면에, 효소적 가수분해를 통하여 전처리된 α-셀룰로오스의 경우에 C_c 또는 ISV와 ln K 값과는 아주 밀접한 관계를 보여주었다. 즉 C_c 또는 ISV에 의해 얻어진 셀룰로오스의 결정성 값이 증가할수록 K값이 증가하였다. Ooshima 등¹⁴도 효소적 처리에 의해 이와 유사한 결과를 얻은 바 있다. 그러나 CrI 값과는 이러한 관계를 발견할 수 없었다. 따라서 복합효소인 셀룰라아제의 흡착에서 셀룰로오스의 결정도는 K값과 관련지어 설명하기 어려울 것이다. 반면에 셀룰로오스의 표면을 전처리하는 경우 K 및 ISV 및 C_c 값으로부터 흡착에 대한 성질을 예측할 수 있게 될 것이다. 이러한 결과는 전처리된 셀룰로오스들 사이의 구조적 특성이 다른 셀룰로오스성 물질에 비

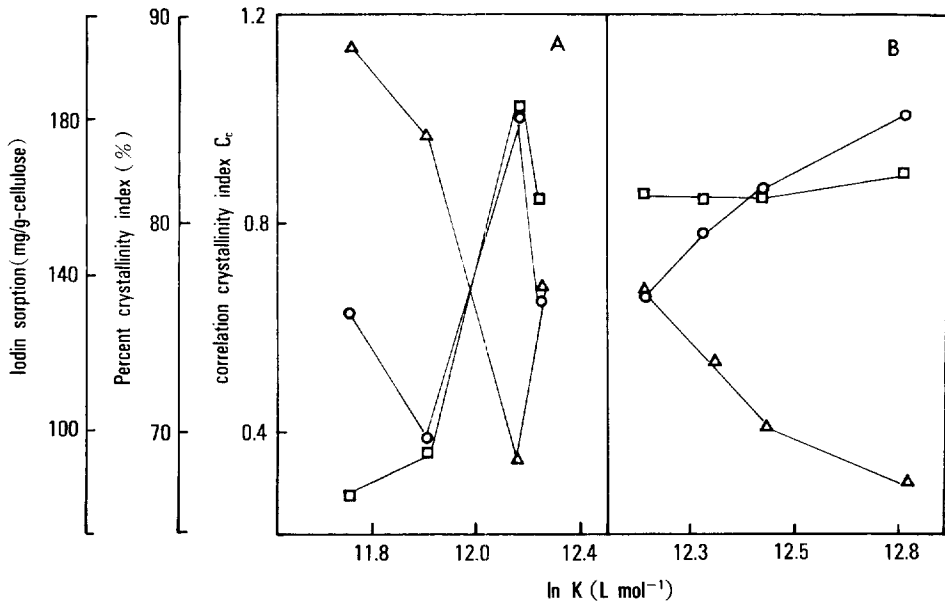


Fig. 7. Correlation between $\ln K$ and crystallinity of cellulose at 30 °C. (○) Correlation crystallinity index(C_c) ; (□) percent crystallinity index (CrI) ; (△) iodine sorption value (ISV). (A) Solka Floc BW-300, Sigmacell type 100, Avicel PH-101 and α -cellulose. (B) Enzymatic pretreated α -cellulose, enzymatic hydrolysis time ; 0 h, 6 h, 24 h, and 48 h.

하여 보다 유사한 물리화학적 특성을 가지기 때문인 것이라 여겨진다. 특히 ISV의 측정에 의한 상대적인 결정성의 측정은 셀룰로오스의 전처리 전후에 대한 결정성을 다루는 데 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

결 론

전처리하지 않은 셀룰로오스의 결정도 측정에서 CrI값과 ISV은 값은 결과를 보여 주었으나 효소적 전처리를 통한 셀룰로오스에 대해서는 ISV과 C_c 의 값이 같은 경향을 보여 주었다. 셀룰로오스에 대한 셀룰라아제의 흡착에서 효소 흡착의 친화력은 대부분 셀룰로오스의 결정성에 크게 의존하지 않았으나 효소적으로 전처리된 셀룰로오스의 C_c 값과 ISV에 의한 결정성과는 밀접한 관계를 보여주었다.

참 고 문 헌

1. M. R. Ladisch, K. W. Lin, M. Voloch, and G. T. Tsao, *Enzyme Microb. Technol.*, **5**(2), 82 (1983).
2. D. Fengel and G. Wegener, "Wood", Walter de Gruyter, New York (1984).
3. L. E. Alexander, "X-Ray Diffraction Methods in Polymer Science", John Wiley and Sons, New York (1969).
4. R. H. Atalla, "The Structures of Cellulose", ACS Symposium Series 340 (1987).
5. J. H. Wakelin, H. S. Virgin, and E. Crystal, *J. Appl. Phys.*, **30**, 1654 (1959).
6. L. Segal, J. J. Creely, A. E. Martin, Jr., and C. M. Conrad, *Textile Res. J.*, **29**, 786 (1959).
7. L. E. Hessler and R. E. Power, *Textile Res. J.*, **23**, 822 (1954).
8. E. T. Reese, L. Segal, and V. M. Tripp., *Textile*

- Res. J.*, **27**, 626 (1957).
9. K. Nisizawa, *J. Ferment. Technol.*, **51**, 262 (1973).
 10. A. A. Klyosov, *Biochemistry*, **29**, 10577 (1990).
 11. S. B. Lee, H. S. Shin, D. D. Y. Ryu, and M. Mandels, *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 2137 (1982).
 12. M. Mandels, J. Kostick, and R. Parizek, *J. Polymer Sci.*, **36**, 445 (1971).
 13. A. O. Converse, R. Matsuno, M. Tanaka, and M. Taniguchi, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 38 (1988).
 14. H. Ooshima, M. Sakata, and Y. Harano, *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 3103 (1983).
 15. D. W. Kim, J. H. Yang, and Y. K. Jeong, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 148 (1988).
 16. L. T. Fan, Y. H. Lee, and D. H. Beardmore, *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 177 (1980).
 17. B. Focher, A. Marzett, M. Cattaneo, P. L. Beirame, and P. Carniti, *J. Appl. Poly. Sci.*, **26**, 1989 (1981).
 18. T. Sasaki, T. Tanaka, N. Nanbu, Y. Sato, and K. Kainuma, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1031 (1971).
 19. S. B. Lee, I. H. Kim, D. D. Y. Ryu, and H. Taguchi, *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 33 (1983).
 20. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. E. Farr, and R. J. Randal, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
 21. A. A. Saafan, S. H. Kandil and A. M. Habib, *Textile Res. J.*, **54**, 863 (1984).
 22. J. Y. Stuart and D. L. Ristroph, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1056 (1985).