

셀룰로오스성 물질의 효소적 가수분해에 의한 당생성 메카니즘 : 셀룰라아제의 Component 효소에 의한 셀룰로오스의 효소적 가수분해반응의 속도론적 연구

김 동 원 · 정 정 호 · 김 태 승

충북대학교 자연과학대학 화학과

(1992년 3월 9일 접수)

Sugar Production Mechanism by the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials : Kinetic Study of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose by Cellulase Components

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

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

(Received March 9, 1992)

요 약 : *Trichoderma viride*의 셀룰라아제로부터 CMCase와 Avicelase를 분리하여 이들 component 효소에 의한 몇 가지 셀룰로오스성 물질의 가수분해반응을 속도론적으로 연구하였다. CMCase와 Avicelase는 DEAE-Sephadex A 수지를 사용하여 관크로마토그래피법으로 분리하였다. 각 효소에 의한 가수분해반응은 유사일차반응의 합으로 표현된 속도식으로 나타낼 수 있었다. 그리고 이러한 속도식을 이용하여 가수분해반응에 미치는 기질의 표면적 및 결정성의 효과를 조사하였다. 실험 결과로부터 두 component 효소에 의한 가수분해속도와 초기반응에 의존하는 기질의 농도가 기질의 표면적에 비례함을 알 수 있었다. 그러나 후기 가수분해반응은 주로 Avicelase에 의해 진행되며, 기질의 결정성이 이 반응에 크게 영향을 주었다.

Abstract : The kinetic study of the hydrolysis of some cellulosic materials by CMCase and Avicelase isolated from *Trichoderma viride* cellulase was performed. These two components, CMCase and Avicelase, were separated by a column chromatographic method using DEAE-Sephadex A resin. All hydrolysis reactions of cellulose by respective components could be described by the summation of two parallel first-order reactions. Two reactions combined was separated by the reaction time. With the application of this kinetic equation, the effects of the crystallinity and surface area of cellulose on hydrolysis reaction were examined. From the results, it was found that the initial reaction rate and the concentration of substrate hydrolyzed in the initial reaction are proportional to the surface area of the substrates. But the hydrolysis in later reaction time appeared by Avicelase and depended on the crystallinity of the substrates.

서 론

생체고분자물질인 섬유소 물질을 분해시켜 포도당을 생산하기 위한 방법 중 셀룰라아제 (cellulase)를 이용하는 효소적 가수분해반응이 매우 효과적인 방법으로 고려되고 있다.¹ 이러한 가수분해반응에 이용되는 대부분의 셀룰라아제는 복합효소로서 endo-glucanase(EC 3.2.1.4), exoglucanase(EC 3.2.1.91) 및 β -glucosidase(EC 3.2.1.21)등의 3가지 유형의 component효소로 구성되어 있으며, 이들 효소는 기질의 활성도 특성에 따라 각각 CMCase, Avicelase 및 PNPGase로 구분하기도 한다.^{1,2} 결정성 셀룰로오스는 이들 component사이의 상승작용 (synergistic action)에 의해 효과적으로 가수분해 되는 것으로 알려져 있다.^{3,4} 특히 endo- 및 exo-type의 효소는 결정성 셀룰로오스의 완전한 가수분해를 위해 필수적인 효소로 작용한다. 그러나 셀룰라아제의 복합적인 효소구성고체의 기질로서 셀룰로오스성 물질의 복잡한 물리화학적 특성^{5,6}은 효소적 가수분해 메카니즘을 명확하게 이해하는데 어려움을 준다. 기질의 성질과 각 component가 효소적 가수분해반응에 어떤 영향을 미치는지에 대한 많은 연구에도 불구하고 아직 부분적인 이해만이 이루어지고 있다.

셀룰로오스성 물질의 효소적 가수분해에 대한 반응메카니즘을 규명하기 위하여 많은 반응모형이 제시되어 왔다. Klyosov등⁷은 효소의 흡착친화력이 가수분해속도와 밀접하게 관계되어 있음을 보고하였으며, 효소의 흡착을 포함하는 속도식의 모형이 다수 보고되었다.^{8,9} 또한 가수분해속도에 영향을 미치는 요인으로 기질의 중합도, 결정성, 비표면적, 및 pore의 크기가 가수분해속도에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{9,10} 셀룰라아제는 효소의 활성이 다른 여러가지 component효소로 구성되어 있어, 이들의 가수분해의 역할을 고려한 모형들이 제시되고 있다.¹¹ 한편 가수분해과정에서 나타나는 생성물에 의한 반응의 저해작용이 역시 가수분해속도에 크게 영향을 주며, 가수분해과정에서 기질의 물리화학

적 특성의 변화는 반응속도의 예측을 어렵게 하는 요인이다.^{11,12} 그리고 반응에서 생성된 포도당 및 올리고당의 정량은 전체 생성물의 양을 결정하는데 어려움을 준다. 또한 다른 연구자들은 부분적으로 실험 인자(experimental factor)를 도입한 속도식을 유도하여 반응속도를 예측하고자 하였다.¹³ 이와 같은 대부분의 속도식은 많은 이론적 또는 실험적 파라미터를 포함하고 있어 속도식의 응용적 측면에서 그의 활용이 매우 어렵다. 한편 Sattler등¹⁴은 새로운 방법의 속도식으로서 일차속도식의 합으로 매우 간단하고 편리하게 전체 가수분해반응을 나타낼 수 있음을 보고하였고, 그 속도식의 유용성을 제시한 바 있다. 그러나 이러한 속도식에 미치는 component효소 및 기질의 물리화학적 성질등의 영향 등은 아직 고려되고 있지 않는 실정이다.

본 연구에서는 물리화학적 성질이 다른 셀룰로오스성 물질의 가수분해반응을 이해하기 위하여 셀룰라아제의 각 component효소를 분리한 후 가수분해반응에 대한 결과를 유사일차반응속도의 합으로 표현된 속도식에 적용하였다.

실험 및 방법

시 약

Trichoderma viride 셀룰라아제는 Sigma Chemical사 제품으로 activity가 4.4 units/mg이었다. 기질로서 사용한 셀룰로오스 중 Avicel PH-101(particle size, 50 μ) 및 Solka Floc BW-200(particle size, 35 μ)과 Solka Floc SW-40(particle size, 120 μ)은 각각 FMC사와 JRC사의 미국제 시약을 사용하였다. 그리고 셀룰라아제의 분리 또는 정제를 위하여 사용한 컬럼 충전제는 DEAE-sephadex A-50와 Sephadex G-25로서 Sigma Chemical사 시약을 사용하였다. 또한 기타 시약들은 모두 분석용 시약을 그대로 사용하였다.

결정성 지수의 결정

셀룰로오스에 대한 결정성을 조사하기 위해 X-Ray Diffraction Analyzer(Rikakikai Co, Japan)를

사용하였다. 이때 diffraction scan은 nikel filter의 Cu-K α radiation과 Geiger counter를 사용하여 35 kV, 20 mA에서 실시하였다. 결정성 지수(CrI; crystallinity index)는 Fig. 1에서 얻어진 x-ray diffractogram으로 부터 Segal 방법¹⁵에 의해 구하였으며, 이때 사용된 CrI 구하는 식은 다음과 같다.

$$CrI(\%) = \{(I_{002} - I_{am}) / I_{002}\} \times 100 \quad (1)$$

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

효소의 농도와 활성도의 측정

용액 속에 있는 효소의 양은 Lowry방법¹⁶에 의해 결정된 단백질의 양으로 나타내었으며, 표준 단백질로서 bovine serum albumin을 사용하였다. 효소의 활성도 측정에서 PNPCase와 CMCCase 활성도는 각각 *p*-nitrophenyl-D-glucopyranoside(PNPG)와 carboxymethylcellulose(CMC, Sigma Chemical Co. USA)를 기질로 하여 Berghem등의 방법¹⁷으로 측정하였고, Avicelase 활성도는 Avicel PH-101(FMC Co. USA)을 기질로 하여 Beldman등의 방법¹⁸에 따라 측정하였다. 이때 활성도의 단위는 unit (U)로 나타내며, 1 unit는 주어진 조건에서 생성물 1 μ mol을 생성하는데 요구되는 효소의 양으로 정의된다.

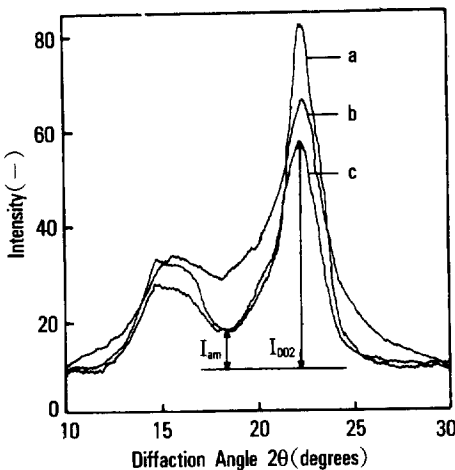


Fig. 1. X-ray diffractograms of cellulose. Sample celluloses were (a) Avicel PH-101, (b) Solka Floc BW-200, and (c) Solka Floc SW-40.

셀룰라아제 Component효소의 분리 및 정제

*Trichoderma viride*에서 얻은 시약용 셀룰라아제 분말 1.5 g을 pH 4.8인 0.1 M sodium acetate 완충 용액에 녹인 후 DEAE sephadex A-50을 충전시킨 column (20×300 mm)에서 chromatography를 실시하였다. Eluent는 같은 완충용액을 사용하였고, fraction no. 40부터 0~0.5 M의 NaCl 용액으로 salt gradient를 적용하였다. 각 fraction에 대하여 PNP-Gase, CMCCase, Avicelase등의 활성도 및 280 nm 흡광도를 측정하였다. Fig. 2에서 얻어진 Avicelase의 peak를 냉동건조에 의해 농축시킨 후 salt gradient에 의해 첨가된 과량의 염을 Sephadex G-25를 충전한 column(20×600 mm)으로 제거하였다. 이때 사용된 용출액은 위에서 사용된 0.1 M sodium acetate 완충용액을 그대로 사용하였다. 그리고 분리된 각 component 효소는 acetone 용액 (1 : 3, v/v)에서 침전시켜, 냉동건조 후 보관하였다.

셀룰로오스의 효소적 가수분해

pH 4.8인 0.1 M sodium acetate 완충용액 4 mL에 50 mg의 셀룰로오스의 시료와 cellulase용액(2 mg/mL) 1 mL를 넣고 50°C에서 Shaker Bath를 이용하여 120 storkes/min으로 흔들면서 반응시켰다. 이때 반응 용기는 50 mL polyethylene vial을 사용하였다. 반응 용액을 원심분리한 후, 가수분해 속도식의 유도를 위하여 시간별로 반응용액을 취하여 원심분리한 후 그 상등액에 포함된 환원당의 생성량을 측정하였다. 모든 환원당의 정량은 DNS방법¹⁹으로 실시하였다.

결과 및 고찰

셀룰로오스성 물질의 구조적 특성

셀룰로오스성 물질의 효소적 가수분해반응에 크게 영향을 미치는 요인으로서 기질의 결정성 지수(CrI)는 Fig. 1과 같은 각 기질의 x-ray diffractogram으로부터 얻었다. 여기서 얻어진 각 셀룰로오스의 CrI (%)의 값은 Avicel PH-101, Solka Floc BW-200 및 Solka Floc SW-40이 각각 85.3, 58.8 및 67.3 이

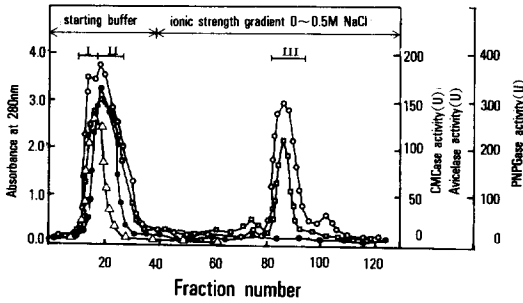


Fig. 2. Elution pattern of cellulase on DEAE-Sephadex A-50 column chromatography. (●-●) Absorbance at 280 nm; (●-●) CMCase activity; (□-□) Avicelase activity; (△-△) PNPCase activity.

었다. 또한 셀룰로오스 입자의 크기가 서로 다른 기질을 사용하여 기질간의 표면적의 차이를 다르게 하였다. 즉 입자의 크기가 작은 기질의 경우 같은 질량에서 더 많은 표면적을 가지게 된다. 한편 셀룰로오스에 대한 표면적은 주로 기체흡착방법을 이용하여 얻어지는데, 이러한 방법으로 구한 비표면적(SSA)의 값은 실제 효소가 흡착할 수 있는 넓은 공간이외에 기질의 비결정성 부분의 작은 구멍의 면적을 모두 포함하게 된다. 따라서 실제 효소가 흡착되는 표면적과는 다소 차이를 가져 올 수 있다.

셀룰라아제 Component의 정제 및 분리

T. viride 셀룰라아제의 분리를 위하여 침전법으로 정제된 셀룰라아제를 크로마토그래피법으로 분리한 결과, PNPCase, CMCase, Avicelase의 활성도의 특성에 따라 Fig. 2과 같이 분리되었다. 여기서 II부분은 주로 endoglucanase(CMCase)이며, III부분은 exoglucanase(Avicelase)임을 보여주었다. 셀룰로오스성 물질의 가수분해에 직접 관련된 이 두 component가 각각 가수분해를 위한 효소로서 사용되었다. 이때 얻어진 효소는 DEAE sephadex A-50의 친화력이 다른 특성을 가진 것으로 각 component는 복합효소로서 평균분자량이 약 50 kDa로 알려져 있다.¹⁸

셀룰로오스의 효소적 가수분해

셀룰로오스의 가수분해에 대한 당생성을 속도론적으로 설명하기 위한 많은 연구가 보고되어 왔다. 그

러나 이러한 속도론적 접근은 기질의 구조적 특성의 다양성과 효소의 복합성으로 아직 일반화된 형태의 속도식이 제공되고 있지 못하다. 한편 Sattler등¹⁴은 셀룰로오스의 복합효소에 의한 가수분해반응에서, 기질이 가수분해되기 쉬운 부분(C_a)과 가수분해되기 어려운 부분(C_b)으로 그 반응성이 뚜렷하게 분리됨을 보고하였다. 그들은 이러한 가수분해반응에서의 기질특성을 속도식에 고려하여, 가수분해 속도가 매우 다른 두 부분이 서로 다른 시간에 가수분해됨을 가정하여 (2)식과 같이 두 일차반응속도식의 합으로 전체 반응에 대한 속도식을 유도하였다. 그 결과 시간에 따른 가수분해반응이 이러한 속도식으로 잘 표현됨을 보여주었다. 본 연구에서는 셀룰라아제의 각 component효소에 의한 여러가지 기질의 가수분해반응을 (2)식에 적용하였다.

$$C_t = C_a \exp(-k_a \cdot t) + C_b \exp(-k_b \cdot t) \quad (2)$$

여기서 C_t 는 가수분해 후 남아 있는 기질의 농도(g/L)이고, C_a 와 C_b 는 각각 기질 내에서의 가수분해되기 쉬운 부분(easily hydrolyzable part)과 어려운 부분(difficult hydrolyzable part)의 농도(g/L)이다. 또한 k_a 와 k_b 는 C_a 와 C_b 에 대한 가수분해속도상수(h^{-1})이며, t 는 가수분해 시간(h)이다. 생성된 당은 가수분해된 셀룰로오스의 농도(Y)로 환산할 수 있다. Y 는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$Y = (C_a + C_b) - C_t \quad (3)$$

(2)식을 (3)식에 대입하면 다음과 같다.

$$Y = (C_a + C_b) - C_a \exp(-k_a \cdot t) - C_b \exp(-k_b \cdot t) \quad (4)$$

초기의 기질 농도를 C_0 라 하면, t 시간에서 가수분해된 기질의 분율을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{Y}{C_0} = \frac{C_a - C_b}{C_a} \frac{C_a}{C_0} \exp(-k_a \cdot t) - \frac{C_b}{C_0} \exp(-k_b \cdot t) \quad (5)$$

이때 $(C_a + C_b)/C_0 = 1$ 이라할 때, (5)식은 다음과 같이 쓸 수 있다.

$$\frac{Y}{C_0} = 1 - \frac{C_a}{C_0} \exp(-k_a \cdot t) - \frac{C_b}{C_0} \exp(-k_b \cdot t) \quad (6)$$

이러한 속도식에서 C_a/C_0 와 C_b/C_0 는 모두 가수분해의 속도식의 결과에 의해 얻어지는데 이것은 기질이 가수분해 될 때 기질의 두 영역, 즉 가수분해의 속도가 크게 다른 영역으로 구분되기 때문에 나타난다. 또한 이 값들은 그 합이 1이됨으로 서로 다른 가수분해영역의 분율이라할 수 있다. CMCase 및 Avicelase에 의해 각 기질이 가수분해될 때의 당생성량은 Fig. 3과 4에서 보는 것처럼 시간에 따라 증가하였다. 이때 반응의 초기에 일정한 시간동안 당생성량이 급격하게 증가하는 반면에 반응 후기에는 완만한 증가를 보여 주었다. CMCase의 경우 반응 후기에는 거의 당이 생성되지 않았다. 왜냐하면 CMCase가 주로 비결정성부분을 공격한다¹는 효소적 특성을 고려할 때 가수분해반응의 진행에 따른 기질의 결정성의 증가가 가수분해반응을 어렵게 만들기 때문이다. 이러한 반응의 결과를 $\ln(C_t/C_0)$ 대 t 로 도시한 결과, 각 가수분해반응이 두 단계의 다른 유사일차반응을 포함한다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 5와 6). 즉 식(6)의 속도식으로부터 얻어진 이론적 값으로부터 속도상수값이 크게 다른 두 유사일차반응의 합으로 이러한 반응을 나타낼 수 있음을 알았다. 이때 C_b 의 가수분해반응의 속도는 C_a 의 가수분해속도에 비해 매우 작은 값을 갖기 때문에 k_a 값에

거의 영향을 미치지 않게 된다. 여기서 식(5)의 각 파라미터는 비선형최소자승법(NLS)에 적용하여 얻

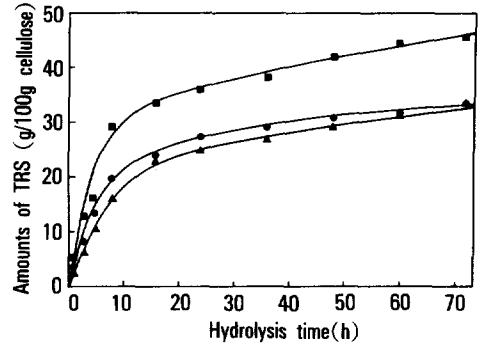


Fig. 4. Hydrolysis curves for cellulose with Avicelase. The symbols are the same as in Fig. 3.

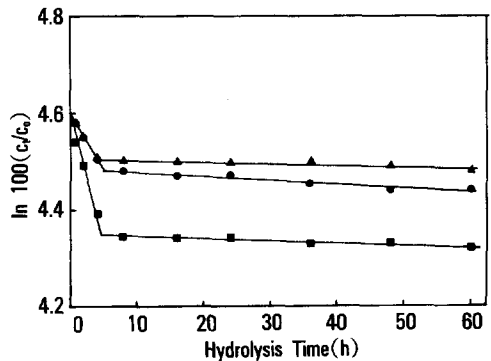


Fig. 5. Semilogarithmic plots of residual unhydrolyzed substrates vs. reaction time for the hydrolysis with CMCase. The symbols are the same as in Fig. 3.

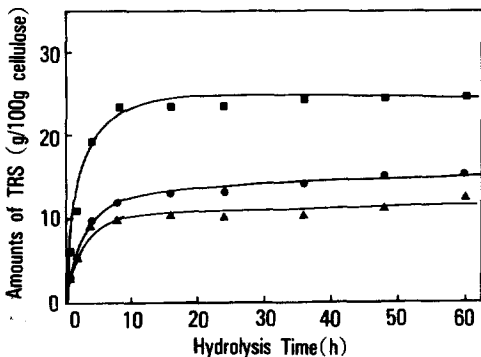


Fig. 3. Hydrolysis curves for cellulose with CMCase. (●) Avicel PH-101, (■) Solka Floc BW-200, and (▲) Solka Floc SW-40.

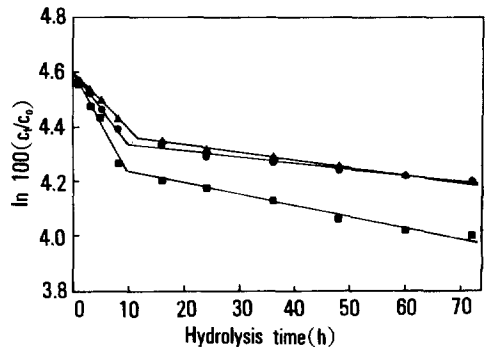


Fig. 6. Semilogarithmic plots of residual unhydrolyzed substrates vs. reaction time for the hydrolysis with Avicelase. The symbols are the same as in Fig. 3.

었다(Table 1과 2).

이들 결과로부터 모든 가수분해반응의 C_a/C_0 값은 가수분해에 사용한 기질의 입자크기가 작아짐에 따라 증가하였는데, 이는 기질의 표면적이 증가하여 효소가 접근할 수 있는 반응자리가 증가하기 때문일 것이다. 따라서 셀룰로오스를 쉽게 가수분해시키기 위하여는 기질의 표면적을 증가시키는 것이 중요하다는 것을 의미한다. 한편 Avicelase에 의한 셀룰로오스의 C_a 부분은 모든 반응에서 기질의 입자크기가 작아짐에 따라 증가하였다. 이것은 가수분해에 따른 당생성량이 기질의 표면적에 크게 의존함을 나타내는 것이다. 특히 Avicelase의 경우에 이러한 증가와 마찬가지로 k_a 값도 증가하였는데, 이러한 결과는 기질의 비환원성 말단기에 작용하는 Avicelase의 작용 형태와 관계있는 것으로 생각된다. 즉 보다 작은 입자의 기질이 보다 효과적으로 비환원성 말단기를 노출시키고 있는 것이라 할 수 있다. 그러나 k_b 값은 결정성이 가장 큰 Avicel에 대하여 가장 작은 값을

보여 주었는데, 이러한 결과는 반응 후기에 Avicelase에 의한 가수분해가 기질의 결정성과 밀접한 관계를 가지기 때문인 것이다. 일반적으로 기질의 결정성이 클수록 가수분해되기가 더 어려워지기 때문이다.

한편, CMCase에 의한 가수분해 반응에서의 C_a/C_0 값도 기질의 입자크기가 작아짐에 따라 증가하였다. 또한 k_a 값은 Solka Floc BW-200에서 상대적으로 매우 큰 값이 나타났으며, 이러한 결과는 이 기질이 큰 표면적을 가지고 있는 동시에 결정성이 다른 기질에 비해 매우 작기 때문인 것이라 할 것이다. 반면에 Avicelase의 경우, 이 값은 입자의 크기가 더 큰 Solka Floc SW-40 보다 더 작은 값을 보여 주어 CMCase의 가수분해는 초기에도 결정성과 표면적이 동시에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 즉 CMCase는 기질의 비환원성 말단기 보다 셀룰로오스 사슬을 임의로 공격하는 공격형태(random-attack type)의 효소임을 고려하여 이러한 결과를 설명할 수

Table 1. C_a/C_0 and C_b/C_0 in Various Cellulosic Substrates and Associated Rate Constants k_a and k_b with the Hydrolysis by CMCase

Substrate	particle size(μ)	CrI (%)	C_a/C_0	C_b/C_0	$k_a \times 10$ (h^{-1})	$k_b \times 10^3$ (h^{-1})
Solka Floc SW-40	120	67.3	0.01	0.90	3.6	0.4
Avicel PH-101	50	85.3	0.12	0.88	3.4	0.7
Solka Floc BW-200	35	58.8	0.24	0.76	4.8	0.2

Table 2. C_a/C_0 and C_b/C_0 in Various Cellulosic Substrates and Associated Rate Constants k_a and k_b with the Hydrolysis by Avicelase

Substrate	particle size(μ)	CrI (%)	C_a/C_0	C_b/C_0	$k_a \times 10$ (h^{-1})	$k_b \times 10^3$ (h^{-1})
Solka Floc SW-40	120	67.3	0.23	0.77	1.3	2.0
Avicel PH-101	50	85.3	0.25	0.75	1.5	1.7
Solka Floc BW-200	35	58.8	0.33	0.67	1.7	3.1

있을 것이다.¹ CMCase에 의한 가수분해에서 k_b 의 값은 Avicelase 경우 보다 훨씬 작은 값을 보여 주어 이 component효소가 반응후기의 속도에는 거의 영향을 주지 않는 것으로 생각되었다. 왜냐하면 이 component효소가 가수분해가 진행될 때 기질의 결정성이 증가하기 때문에 급격하게 공격할 가수분해자리를 잃기 때문인 것이다.

이상과 같은 결과를 토대로 셀룰로오스의 효소적 가수분해는 두 단계를 거쳐 가수분해됨을 알 수 있으며, 초기의 반응에서 CMCase 뿐만아니라 Avicelase도 가수분해에 크게 영향을 미치는 것이라 볼 수 있으며, 반응의 후기에는 거의 Avicelase에 의해 반응속도가 의존함을 알 수 있었다. 또한 기질의 표면적과 결정성은 가수분해 반응속도에 모두 영향을 미치며 반응의 초기에는 표면적이 영향을 크게 미치는 반면에, 후기 반응은 기질의 결정성에 의존함을 k_a 및 k_b 의 값으로부터 각각 알 수 있었다. 따라서 복합효소인 셀룰라아제에 의한 셀룰로오스의 반응은 효소의 각 component의 역할이 가수분해의 시간에 따라 다르게 나타나며, 기질의 구조가 가수분해 속도에 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 효소의 각 component에 대한 가수분해반응 특성을 이해하는 것은 전체 가수분해반응의 이해를 위하여 필수적일 것으로 생각된다. 또한 반응속도식으로서 유사일차반응의 함으로 나타내는 표현방법은 전체반응을 간편하게 표현할 수 있는 속도식으로 사용할 수 있을 것이다.

감사의 글: 본 연구는 한국과학재단 기초연구비 지원(1989~1991년도, 과제번호 001-1005-024-2)에 의해 이루어진 것으로서 당 재단에 감사드립니다.

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. K. E. Eriksson and B. Pettersson, *Eur. J. Biochem.*, **51**, 193-206 (1975).
3. G. Beldman, A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, and W. Pilnik, *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 173 (1988).
4. T. M. Wood and S. I. McCrae, *Biochem. J.*, **171**, 61 (1978).
5. C. M. Chen, M. Gritzali, and D. W. Stafford, *Bio/Technology*, **5**, 274 (1987).
6. L. T. Fan, Y. H. Lee, and D. H. Beardmore, *Adv. Biochem. Eng.*, **14**, 102 (1980).
7. A. A. Klyosov, O. V. Mitkevich, and A. T. Sinityn, *Biochemistry*, **25**, 540 (1986).
8. A. O. Converse, R. Matsuno, M. Tanaka, and M. Taniguchi, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 38 (1988).
9. D. D. Y. Ryu and S. B. Lee, *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1047 (1982).
10. L. T. Fan, Y. H. Lee, and H. David, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 177 (1980).
11. M. Okazaki and M. Moo-Young, *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 637 (1987).
12. M. T. Holtzapple, H. S. Caram, and A. E. Humphrey, *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 753 (1984).
13. S. Brandt, L. Hontz, and M. Mandels, *AIChE Symp. Ser.*, **69**, 127 (1973).
14. W. Sattler, H. Esterbauer, O. Glatter, and W. Steiner, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1221 (1989).
15. L. Segal, J. J. Creely, A. E. Martin, and C. M. Conrad, *Textile Res. J.*, **29**, 786 (1959).
16. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. E. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
17. L. E. R. Berghem and L. G. Pettersson, *Eur. J. Biochem.*, **37**, 21 (1973).
18. G. Beldman, M. F. Searle-van Leeuwen, F. M. Rombouts, and F. G. J. Voragen, *Eur. J. Biochem.*, **146**, 301 (1985).
19. M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).