

固定化酵素와 그 利用 Immobilized Enzymes and Their Applications

李奎珪* · 金啓用*

1. 서 론

최근 미생물(효소)이 가지고 있는 특이한 기능을 공학적으로 이용하려고 하는 Biotechnology가 크게 각광을 받고 있다. 이 Biotechnology는 미생물이 가지고 있는 生合成, 物質代謝 등의 기능을 효율적으로 이용하여 化學物質의 합성이나 식량의 생산, 지구상에 존재하는 생물유기체를 이용한 에너지생산(Biomass), 생명현상의 연장 및 초미량성분의 분석등 여러분야에서 연구검토되고 있다.

미생물 특히 효소는 生體觸媒로서 生體內的 반응을 원활하게 조절하여 생명을 유지시키는 대단히 중요한 역할을 담당하고 있는데 그 반응자체는 상온, 상압과 같은 비교적 온화한 조건하에서 진행이 되며 특이한 물질(substrate, 基質)과 선택적으로만 반응을 일으키는 특이성을 가지고 있다.

그러나 일반적으로 효소는 그 활성이 불안정하고 효소반응자체가 수용액상태에서 진행되기 때문에 반응완료후 생성물과 효소의 분리가 곤란하여 효소를 재사용할 수 없기 때문에 반응프로세스가 연속화되지 못하고 있는 실정이다. 이와 같은 효소의 활성을 안정화시키고 고가의 효소를 재사용함으로써 연속프로세스의 설계를 가능하게 하는 방법이 효소固定化(Immobilization of Enzyme)이다.

효소의 종류는 그 모체가 되는 미생물, 동물 및 식물의 종류가 다양하여 거의 200여종이 현재까지 생산이 가능하며 앞으로 연구가 진행되면 더 많은 효소의 생산이 가능하기 때문에 이를 이용한 고정화방법도 활발히 연구되어야 할 것이다.

효소固定化는 효소를 불용성담체에 결합시켜

非水溶化하는 방법으로 이를 공업적으로 이용한 역사는 대단히 오래되었다. 즉 1916년 Nelson과 Griffin¹은 석탄에 Invertase를 흡착시킨 고정화 효소가 효소활성을 가지고 있음을 확인한 후 1950년 후반기부터 고정화에 필요한 有機化學 및 合成高分子化學이 발전함과 함께 급속하게 발전하게 되었다. 여기에는 Manecke그룹과 Katchalski그룹의 공로²가 대단히 크며 공업적인 연구로는 Goldstein (1964)³이 고정화효소의 담체, 효소, 基質의 靜電氣性質에 의한 Michaelis constant Km과 최적 pH가 원래의 효소와 다른 것을 확인하고 Lilly^{4,5}는 Michaelis-Menten형 반응에 따른 고정화효소반응기의 수율에 관한 연구를 발표하였는데 이것이 고정화효소 반응공학의 시초가 되었다.

그후 Chibata⁶(1969)는 DEAE sephadex-고정화 아미노아실라제젤입자 고정층을 이용하여 라셈화합물을 분리하였으며 아실-L-아미노산의 연속제조프로세스의 공업화에 성공하였다. 이 프로세스는 중래방법에 비해 40%의 생산가격을 낮추는등 획기적인방법으로 인정받게 되었다. 또한 1976년 미국에서는 약 5억달러의 과당을 고정화방법에 의해 생산하고 있다.

이와같은 효소고정화에 이용되는 불용성담체로는 여러가지가 있는데 대표적인 것을 Table 1에 나타내었다.

Table 1에서와 같이 담체로는 有機擔體와 無機擔體로 분류할 수 있다.

이와같은 고정화담체용 재료가 갖추어야 할 조건은 다음과 같다.

1. 表面積이 크고 다량의 효소를 고정시킬 수

* 漢陽大學校 工業學科 (Kyu-Hyun Lee and Kea-Yong Kim, Dept. of Industrial Chemistry, College of Engineering, Han Yang University, Seoul, 133, Korea)

Table 1. 酵素固定化用 擔體

담 체 재 료	화 학 구 조	유도체의 종류
(천연유기고분자)		
a. 덱스트린	a. $\left[R-(OH)_x \right]_n$	셀룰로오스 → 트리아실화, 디아조화
b. 셀룰로오스	b. $\left[R-(OH)_x \right]_n$	세파로스 → CNBr화
c. 콜라겐	c. $\left[R-NH-CO \right]_n$	콜라겐 → 알데히드화, 아지드산화
d. 세파덱스	d. $\left[R-(OH)_x \right]_n$	
(합성유기고분자)		
a. 나일론	a. $\left[R-NH-(CH_2)_x-CO \right]_n$	
b. 폴리스티렌	b. $\left[\begin{array}{c} CH-CH_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \right]_n$	폴리스티렌 → 클로로메틸스티렌
c. 폴리아크릴아미드	c. $\left[\begin{array}{c} CH_2-CH \\ \\ CONH_2 \end{array} \right]_n$	$\begin{array}{c} -CH-CH_2- \\ \\ CONH- \text{C}_6\text{H}_4 -NH_2 \end{array} \rightarrow \text{디아조화}$
d. 폴리비닐알코올	d. $\left[\begin{array}{c} CH_2-CH \\ \\ OH \end{array} \right]_n$	폴리비닐알코올 → 트리아실화
e. 폴리아미노산	e. $\left[\begin{array}{c} NH-C-CO \\ \\ R \end{array} \right]_n$	폴리글루탐산 → 아지드화
f. 합성인지질	f. $\begin{array}{c} CH_2-O-CO-R_1 \\ \\ CH-O-CO-R_2 \\ \\ CH_2-O-PO_3H-X \end{array}$	포스파티딜에탄올아민 → 아미노기 치환
(무기담체)		
a. 실리카, 유리	a. $\left[\begin{array}{c} OH \\ \\ O-Si-O \\ \\ OH \end{array} \right]_n$	$-OH$ 기 → 알킬아민화
b. 알루미늄, 스테인리스		
c. Ti, Zr, Fe 등의 산화물	c. $\left[\begin{array}{c} OH \\ \\ O-M-O \\ \\ OH \end{array} \right]_n$	
d. 세라믹, 탄소섬유		

있는 것.

- 고정화에 의한 효소의 활성저하가 없는 재료
- 효소가 안정되고 활성이 장기간 지속되는 재료
- 용매, pH 및 온도변화에 안정한 것.
- 재료의 기계적강도가 크고 세균에 의한 변형이 일어나지 않아야 한다.

따라서 수많은 有機 및 無機材料들이 연구검토

되고 있으며 새로운 재료들의 개발도 활발히 진행되고 있다.

여기에서는 酵素의 고정화에 관한 여러 방법 중에서 有機 및 高分子材料에 관해 해설하고 이들을 이용한 응용분야 즉 화학공학, 식품공학, 醫療分野, 分析, 計測分野 및 에너지분야에서의 현황과 앞으로의 전망에 관하여 해설하고자 한다.

2. 酵素의 분리 및 정제

효소를 醫療나 物質生産에 이용할 경우 분리 및 정제과정은 대단히 중요하다. 만약 **protease**가 존재하는 효소를 이용하게 되면 효소활성이 감소되는 원인이 되며 정제가 불충분한 것을 사용하면 부반응에 의해 目的物質의 생산효율이 감소되고 醫療用的 경우에는 發熱原因物質이 된다. 또 고정화의 경우에도 활성이 적은 고정화효소가 얻어지거나 고정화하는 경비가 많이 들게 된다. 따라서 효소를 사용하기 이전에는 반드시 분리 및 정제를 하여야 한다. 酵素는 동물, 식물 및 미생물의 세포내에서 만들어져 加水分解酵素와 같이 세포나 菌體의 外液中으로 분비되는 것과 세포나 菌체내에 존재하는 경우가 있어 각각의 경우에 따라 그 분리 및 정제방법이 다르다. 개략적인 분리방법은 Fig.1과 같이 나타낼 수 있다.

효소의 분리정제는 목적하는 효소를 얻기 위한

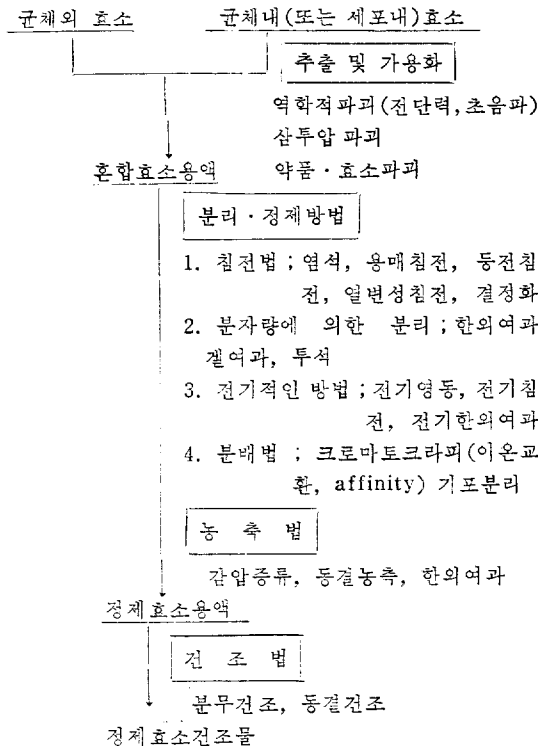


Fig. 1. 효소의 분리 및 정제방법

것이지만 효소의 양은 균체내에서 한정되어 있기 때문에 균체내에 존재하는 유용한 효소들을 종합적으로 이용하기 위한 複數酵素의 동시 분리회수를 검토하는 것⁷도 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이다.

또 효소는 그 아미노산의 결합방법에 따라 기능을 나타내기 때문에 분리정제 과정에서 이 구조의 변화를 일으키지 않아야 한다. 따라서 酵素構造의 안정성에 영향을 주는 온도, pH 이온농도, 완충액의 조성, 용매 등 環境因子를 충분히 고려하여야 한다. 또 酵素의 高次構造를 유지하기 위해서는 金屬과 蛋白質과의 相互作用, 水素結合, 疎水性結合 등과 함께 S-S 결합의 산화를 방지하기 위하여 용액중의 산소농도를 최소로 유지하여야 하고 용액중의 기포발생에 의해 효소분자가 氣液界面에서 활성을 잃어버리는 것을 방지하여야 하며 액체중에서 剪斷力을 받게 되면 가역적 또는 비가역적으로 활성을 잃어버리게 된다⁸⁻⁹. 즉 효소의 초기활성을 x_0 라고 하면 剪斷速度가 $\dot{\gamma}$ 인 剪斷作用을 t 시간 동안 받을 경우 잔존 활성 x 는

$$\dot{\gamma}t = a(x/x_0)^b$$

와 같이 된다¹⁰.

3. 固定化方法

酵素를 불용성담체에 고정화시키는 방법을 대별하면 크게 다음과 같이 분류할 수 있다. (Table 2)

이와같은 방법에는 각각 특징이 있으며 현재까지 효소의 고정화에 사용되고 있는 방법들로 어떠한 것이 가장 우수하다고 결론지을 수는 없다. 따라서 효소의 특성에 따라 가장 적합한 조건과 방법을 선택하여야 한다.

지금까지 연구되어 있는 고정화효소의 형태로는 粒狀(particle), 膜狀(membrane, film, plate), 管狀(tube) 또는 纖維型態(fiber)의 4종류가 있다. 이중 대부분은 粒狀이지만 이용목적에 따라 膜이나 管 및 纖維型도 사용되고 있으며 특히 酵素療法과 같은 경우에는 酵素管이 가장 적합하다.

Table 2. 효소의 고정화방법

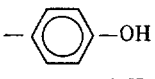
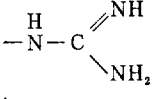
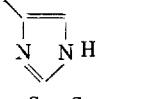
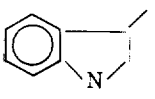
고정화 방법	고정화되는 효소	고정화에 이용되는 담체의 종류
1) 담체결합법 i) 공유결합법 a) 디아조법 b) 펩티드법 c) 알킬화 또는 아실화법 d) 가교결합에 의한 결합법 e) Ugi시약(이소시아나이드시약)을 이용한 축합법 ii) 이온결합법 iii) 물리적흡착법 iv) 생물학적흡착 또는 생화학적 친화력에 의한 것 2) 가교법 3) 포괄법 i) 격자형 ii) 마이크로캡슐형	고분자 및 저분자 효소 고분자효소 및 균체 " " " " " " "	i) 불용성담체 a) 세파로스(sepharose) b) 세파덱스(sephadex) c) 셀룰로오스 및 그유도체 d) 합성고분자(폴리스티렌, 아미노산 공중합체, 기타) e) 다공질유리 ii) 수용성담체(포괄법을 병용) a) 텍스트린 b) 합성고분자(폴리에틸렌이민) 셀룰로오스 및 세파덱스유도체 콜로이드, 활성탄 2작용기시약(글루타알데히드등) 폴리아크릴아미드 반투막고분자(콜로이드, 합성고분자)

또 효소를 고정화할 경우 일반적으로 활성은 약간 감소하게 되는데 이것은 고정화처리중의 효소의 손실 또는 액체-고체와 같은 불균일계 반응

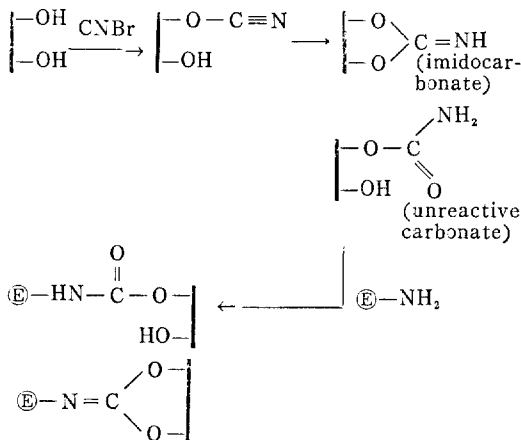
여기에는 物理的吸着法, 이온결합법, 共有結合法 등 3가지 방법이 있지만 먼저 2가지 방법에 비해 공유결합법은 비교적 격렬한 조건하에서 반



Table 3. 효소단백질에 있는 작용기

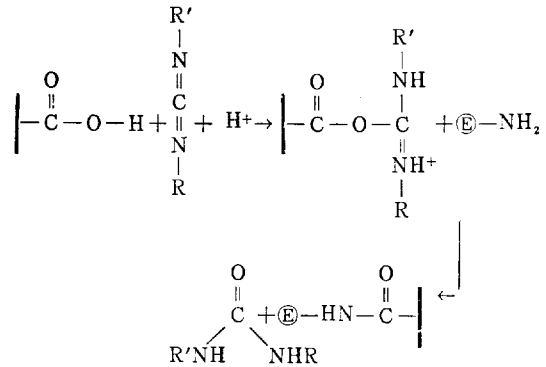
-NH ₂	ε-Amino of lysine (Lys) and N-terminus amino group
-SH	Sulphydryl of cysteine(Cys)
-COOH	Carboxyl of aspartate (Asp) and glutamate (Glu) and C-terminus carboxyl group
	Phenolic of tyrosine(Tyr)
	Guanidino of arginine(Arg)
	Imidazole of histidine(His)
-S-S-	Disulfide of cystine
	Indole of tryptophan(Trp)
CH ₃ -S-	Thioether of methionine(Met)
-CH ₂ OH	Hydroxyl of serine (Ser) and threonine(Thr)

펩티드방법은 담체와 효소사이에 펩티드결합을 형성시켜 고정화하는 방법으로 -OH기를 가지고 있는 담체(셀룰로오스유도체, Agar, Agarous, Sephadex)를 Cyanogen bromide로 활성화시켜 imido carbonate를 형성시켜 효소를 고정화하는 방법이다¹¹⁻¹⁴.



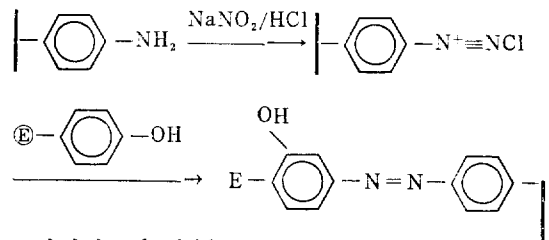
또 -COOH기나 -NH₂기를 가지고 있는 경우에는 효소를 수용성 Carbodiimide로 결합시키거나

나 酸아지드유도체로 만든 다음 효소와 반응시켜 고정화한다¹⁵⁻¹⁸.

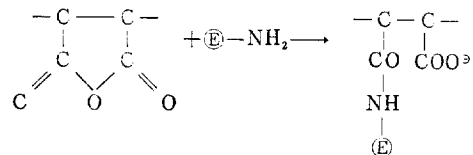


알킬화법은 담체를 할로젠화 아세틸유도체나 트리아디닐유도체로 변화시켜 효소를 화학적으로 결합시키는 방법이다.

또 디아조화법은 방향족아미노기를 가진 담체를 아질산나트륨과 반응시켜 디아조늄화합물을 만든 다음 효소의 lysyl, tyrosyl 및 histidinyll 잔기와 반응시키는 방법이다.



담체에 anhydride기가 있으면 lysyl, cysteinyl, tyrosyl 및 histidyl 잔기와 쉽게 결합할 수 있다.



이 이외에도 공유결합법에는 schiff鹽基를 형성시켜 효소를 고정화하는 방법, Ugi 반응을 이용하는 방법¹⁵등이 있다.

한편 吸着法은 담체에 효소를 물리적으로 흡착시키는 방법으로 이온간의 상호작용이나 疎水性結合 등을 이용하여 효소를 담체에 결합시킨다.

각종 흡착제, 예를 들면 DEAE-셀룰로오스폴리메타아크릴레이트, 다공성 폴리염화비닐등이 이

용¹⁹⁻²⁰되고 있다. 이 방법은 고정화가 쉽지만 吸着된 효소가 빠져나오는 단점을 가지고 있다.

3-2. Entrapment(包括法)

고분자의 매트릭스공간에 효소를 包括시켜 고정화하는 방법이다.

담체로 이용되고 있는 것은 폴리아크릴아미드 겔²¹, 콜라겐, 카라기난, 셀룰로오스, 폴리비닐알콜, 폴리비닐피리리돈 등이 있다. 이 방법은 효소 단백질의 변성이 없고 효소의 종류에 관계없이 적용할 수 있지만 고분자겔이나 마이크로캡슐을 만드는 반응조건에 따라 효소의 활성이 저하되거나 마이크로캡슐膜的 투과성에 의해 高分子基質의 透過가 곤란하게 되어 효소활성을 나타내지 못하는 경우도 있다. 따라서 이 방법에서 주의하여야 할 것은 겔이나 캡슐의 생성시의 반응조건과 투과성이 좋은 캡슐膜을 형성시키는 것으로 膜의 透過性和 기계적 강도는 서로 상반되는 성질이기 때문에 이 두성질을 적절히 겸비한 새로운 재료의 개발연구가 선행되어야 한다.

고분자담체에 효소를 包括시키는 방법에는 각종 고분자중합방법을 이용하고 있다. 즉 용액중합, 현탁중합, 공중합등이 이용되고 있는데 이는 반응용기에 모노머와 개시제 및 효소를 넣고 중합과 동시에 효소를 중합체내에 包括시키는 방법이다.

Glucose oxidase를 폴리아크릴아미드에 고정화시킬 경우 먼저 아크릴아미드모노머를 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)에 녹이고 가교제로 N,N-methylene bisacrylamide와 개시제를 첨가하여 0~4°C에서 반응을 시키면서 Glucose oxidase를 첨가하여 중합이 진행됨과 동시에 효소를 중합체내에 包括시킨다.

또 다른 방법으로는 고분자용액에 효소와 가교제를 첨가하여 고분자를 가교시키면서 고정화하는 방법²³도 있다.

마이크로캡슐에 의한 包括法은 液中乾燥法, 相分離法, 界面重合法등이 있다. 液中乾燥法은 먼저 물보다 증기압이 큰 水不溶性溶媒에 고분자를 녹인 후 이 용액중에 효소수용액을 분산시켜 1차에멀전을 만들고 이것을 보호콜로이드를 함유하고 있는 수용액중에 분산시켜 복합에멀전을 형

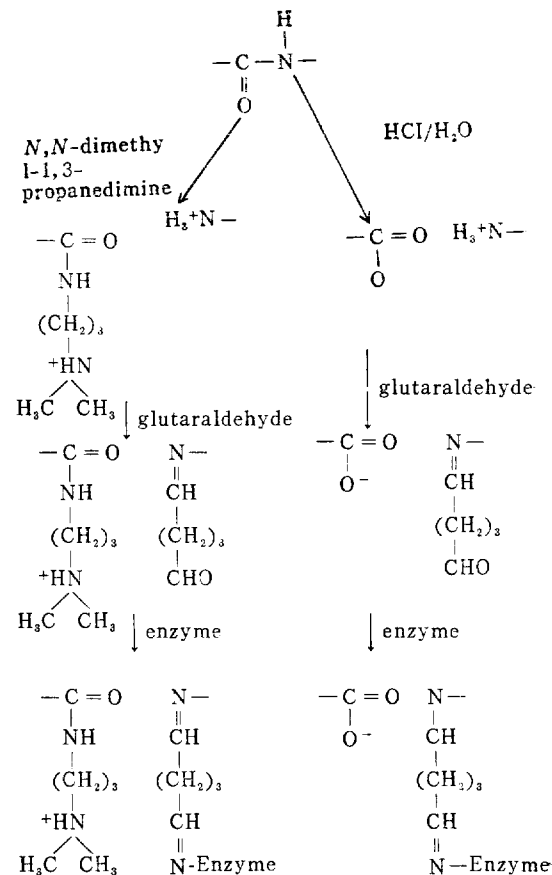
성시킨 다음 고분자를 건조시켜 마이크로캡슐을 형성시키는 방법이다.

相分離法은 水溶液相分離法과 有機溶媒分離法이 있는데 전자는 친수성고분자에 알코올, 아세톤, 鹽등을 첨가하여 수용액에서 분리시키는 방법이며 이 방법은 효소의 마이크로캡슐에는 이용되고 있지 않다. 후자는 고분자를 녹이는 용매와 비용매를 이용하여 고분자를 석출시키는 방법으로 물에 녹지 않는 고분자와 유기용매를 이용하여 고정화시키는 방법이다.

界面重合法은 水溶性 및 水不溶性 모노머들을 용액에 혼합하여 界面에서 중합시킴으로서 마이크로캡슐을 만드는 방법이다. 이 3가지 방법중 液中乾燥法이 반응조건도 온화하며 효소의 활성도 가장 큰 우수한 방법이다.

3-3. 架橋化法

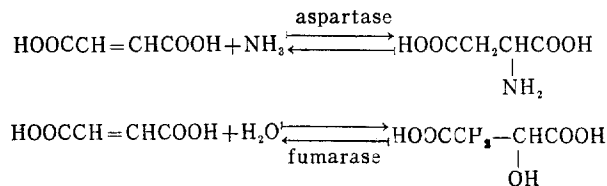
低分子량의 多作用基試藥을 이용하여 酵素分子間에 공유결합을 도입하거나 酵素를 不溶化하는



이 방법도 비교적 격렬한 조건하에서 반응이 진행되기 때문에 얻어지는 고정화효소의 활성은 높지 않지만 안정성은 높은 편이다. 架橋劑로는 glutaraldehyde 이외에도 hexamethylene diisocyanate, hexamethylene diisothiocyanate, N,N-polymethylene-bis iodo acetamide, bisdiazobenzidine, 에틸렌 공중합체등이 이용되고 있다.

固定化酵素의 공업적 이용은 酵素를 사용하고

또 ATP²⁵, FAD²⁶, 5'-GMP²⁷, NAD²⁸, C₆A²⁹의 경우에는 합성 또는 발효에 의해 얻어지는 중간체를 효소반응으로 더욱 순도가 높은 생성물을



생 성 물	주 원 료	관 련 반 응	관련효소 및 균체
L-말산	푸말산	푸말산 + H ₂ O ⇌ L-말산	Lactobacillus brevis (fumarase)
L-아스파라긴산	푸말산, 암모니아	푸말산 + NH ₃ ⇌ L-아스파라긴산	Escherichia coli (aspartase)
ATP	글루코스 인 산 아 데 닌	1) 아데신 + PRPP ⇌ AMP + PP _i 2) AMP + ATP ⇌ 2ADP 3) ADP → ATP	Brevibacterium ammoniagences 1) AMP pyrophospholyase 2) adenylatekinase
FAD	FMN ATP	FMN + ATP → FAD	Brevibacterium ammoniagences (FAD sensetase)
ATP	아데노신 및 ADP	1) 아데노신 + ATP ⇌ AMP + ADP 2) AMP + ATP ⇌ 2ADP 3) ADP → ATP	Saccharomyces cerevisiae 1) adenosinekinase 2) adenylatekinase
5'-GMP	5'-XMP 글루코스 인 산 암모니아	1) 5'-XMP + ATP + NH ₃ → 5'-GMP + AMP + PP _i 2) AMP → ATP	Brevibacterium ammoniagences 1) GMP sensetase
NAD	니코틴아미드 ATP 글루코스 인 산	1) 니코틴아미드 + PRPP + (ATP) → NMN + PP _i + (ADP + P _i) 2) NMN + ATP → NAD + PP _i	Brevibacterium ammoniagences

CoA	Pantothenic acid ATP 시스틴	$\begin{array}{c} \text{Pantothenic acid} \xrightarrow[\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}]{(1)} \text{4'-phosphopantothenic acid} \\ \xrightarrow{(2)} \text{4'-phosphopanthenylsystemic} \\ \text{CTP CDP} \\ (\text{ATP})(\text{ADP}) \\ \xrightarrow{(3)} \text{4'-phosphopanthenyl} \xrightarrow[\text{CO}_2]{(4)} \text{3'-dephospho} \\ \xrightarrow[\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}]{(5)} \text{CoA} \end{array}$	Brevibacterium ammoniagences
L-티로신	페놀암모니아 피르빈산	페놀+피르빈산+NH ₃ →티로신+H ₂ O	Erwinia herbicola (tyrosinase)
L-DOPA	피로카테콜 피르빈산 암모니아	피로카테콜+피르빈산+NH ₃ ⇒3,4-DOPA+H ₂ O	"
L-트리프로판	인돌 피르빈산 암모니아	인돌+피르빈산+NH ₃ ⇒L-트리프로판+H ₂ O	Proteus rettgeri (tryptophanase)

언고 있다. 특히 이와같은 반응에 필요한 고에너지의 인산화합물인 ATP의 재생에 미생물이 가지고 있는 解糖系 또는 磷酸化系를 이용하는 것이 특징이다.

L-리진의 효소에 의한 제조³⁰는 나일론 제조의 부산물인 DL-amino-ε-caprolactam을 출발물질로 하고 2종의 유도효소를 이용하여 L-리진을 생산하는 방법으로 有機化成分과 효소법을 병용한다는 점에서 볼때 종래의 화학공업의 일대 변혁이라고 할 수 있을 것이다.

또 L-아미노산의 光學分離法에는 物理的인 방법, 化學的 방법, 生物學的 방법 및 효소법이 있는데 이중에 효소에 의한 방법은 효소가 가지고 있는 고도의 특이성을 이용하여 光學分離하는 방법이다.

그 중에서도 다음과 같이 DL-아미노산의 N-아실유도체를 아미노아실라제를 이용하는 방법은 다른 방법에 비해 光學純度가 매우 높은 L-아미노산을 얻을 수 있다. 이 경우에 효소의 고정화 방법은 이온결합법, 공유결합법, 包括法등이 이용되는데 고분자 담체와 각 고정화법을 비교하면 다음 Table 5와 같다.

β-tyrosinase나 tryptophanase의 역반응을 이용하여 각각의 분해생성물에서 역반응으로 L-DOPA, L-tyrosin, L-tryptophan등을 효소로 합성하는데 이와같은 효소의 역반응을 이용하는 방법도 앞으로 검토되어야 할 과제라 생각된다. 또 이와같은 가수분해효소의 역반응을 이용하여 합성페니실린인 아스피린이나 펩티드를 합성한 경우도 있다.

4-2. 새로운 식품생산과 가공에의 이용

식품생산이나 가공법에서의 응용에는 Table 6과 같다. 식품공업에서 고정화효소의 이용은 현재까지 사용하던 배치식반응기를 연속화시키는 bioreactor이다. 식품의 생산이나 가공은 식품위생면에서 격렬한 화학반응을 사용할 수 없다는 점과 식품자체의 품질을 변화시키면 안된다는 조건등의 특수성 때문에 효소반응을 많이 이용하고 있다.

福本³²은 酵素糖化法으로 結晶性글루코오스를 생산하였는데 이 방법은 종래의 방법에 비해 부산물인 올리고당의 생성량이 적다.

또 國中³³에 의해 개발된 RNA의 酵素分解法에 의한 핵산조미료 이노신산이나 구아닌산의 제

Table 5. 아미노아실라제의 고정화방법과 그 특성

Properties	Native aminoacylase	Immobilized aminoacylases		
		Ionic binding to DEAE-Sephadex	Covalent binding to iodoacetyl-cellulose	Entrapping by poly-acrylamide
Optimum pH on the reaction	7.5~8.0	7.0	7.5~8.5	7.0
Optimum temperature on the reaction(°C)	60	72	55	65
Activation energy (kcal/mole)	6.9	7.0	3.9	5.3
Optimum concentration of Co ²⁺ (mM)	0.5	0.5	0.5	0.5
K _m (mM)	5.7	8.7	6.7	5.0
V _{max} (μmoles/hr)	1.52	3.33	4.65	2.33
Operation stability, half-life ^b (days)	—	65(50°)	—	48(37°)

^aData for acetyl-DL-methionine.

^bThe time required for 50% of the enzyme activity to be lost.

Table 6. 식품공업에서의 효소이용

프 로 세 스	화 학 반 응	효소(균체)
효소당화법에 의한 결정글루코스의 제조	액화전분+H ₂ O → 글루코스	glucoamylase(Rhizopus delmar)
RNA의 효소분해에 의한 5'-IMP, 5'-GMP의 제조	(1) RNA+H ₂ O→5'-AMP+5'-GMP+5'-UMP+5'-CMP (2) 5'-AMP+H ₂ O→5'-IMP+NH ₃	(1) phosphodextranase (phicillium citrinum) (2) deamylase (Aspergillus mellaus)
프라스테인방법에 의한 단백질의 개질	펩티드+메티오닌, 에틸에스테르→메티오닌이 있는 펩티드	papain
glucose isomerase에 의한 과즙의 제조	D-글루코스 ⇌ D-플락토오즈	glucose isomerase(streptomyces phaeochromogenes)
β-galactosidase에 의한 우유중의 유당분해	유당+H ₂ O→D-갈락토즈+D-글루코스	β-galactosidase (saccharomyces fragilis)
catalase에 의한 식품중의 H ₂ O ₂ 제거	H ₂ O ₂ +H ₂ O ₂ →O ₂ +2H ₂ O	Catalase(Aspergillusniger)
hemicellulase, cellulase pectinase에 의한 곡물에서 전분 회수율증가	전분+헤미셀룰로오즈+단백질→전분+단백질+저분자량셀룰로오즈	hemicellulase, cellulose, pectinase
효소에 의한 사료 효과개선	단백질+전분+헤미셀룰로오즈+셀룰로오즈→단백질+저분자량셀룰로오즈 및 헤미셀룰로오즈	(Inpex lacteus)
미생물에 의한 치즈제조	우유카제인→고분자량단백질	endopetidase (Mucor, Endothia)
lipase에 의한 치즈의 제조	우유지방→저급지방산	lipase

조법도 획기적인 방법이다. 글루코오스아밀라제를 고정화하여 맥스트린을 연속제조하는 경우에 생산가격을 비교하면 Table 7,8과 같다.

4-3. 醫 療에의 利用

효소가 의약품으로 醫療에 이용된 것은 전분을 가수분해 하는 아밀라제계 소화제이다. 그후 단백질분해효소, 지방분해효소 및 섬유소분해효소 등이 개발되었는데 이들은 모두 經口로 투여하여

소화기관에서 작용하는 것들이다. 그러나 효소의 제조, 분리정제기술이 진보함에 따라 이들을 치료에 사용할 목적으로 경구투여하지 않고 全身的인 작용에 의해 각종 환자를 치료하는 방법으로 정맥에 투여하는 기술이 가능하게 되었다. 그러나 지속적으로 투여할 경우 抗體가 형성되어 抗原抗體反應에 의한 anaphylaxis shock나 항체에 의한 효소활성의 不活性化가 초래된다. 따라서 고정화효소를 의료분야에서 이용되는 주목적은 효소의 지속적인 활성유지와 효소의 안정화를 도모하므로서 酵素療法, 人工臟器 및 臨床檢査등에 응용하는 데 있다.

현재 의료분야에 사용되고 있는 효소는 Table 9와 같다.

아밀라제나 프로테아제등의 가수분해효소는 소화제로 사용되고 특별한 프로테아제는 소염제로

사용되기도 하며 유로키나제는 血栓症의 치료나 항암제인 마이토마이신과 함께 항암작용을 촉진한다. 또 아스파라키나제는 특정 백혈병세포의 필수영양원인 혈액중의 아스파라긴을 분해제거함으로써 치료효과를 상승시킨다. 이 분야에서의 고정화효소의 이용은 다음과 같이 분류할 수 있다.

4-3-1. 酵素療法에의 이용

이는 고정화효소의 특징을 이용하는 방법으로 효소결핍증이나 신진대사이상증 등의 치료에 사용한다. 이 방법에는 효소의 마이크로캡슐이나 酵素管을 이용하는 血液體外循環法이 이용되고 있다. 효소마이크로캡슐이란 효소주위를 콜라겐 나일론, 폴리우레아등으로 된 반투막을 피복한 직경이 수 μ 에서 수백 μ 정도의 현미경적 크기를 갖고 있는 캡슐이다. 이 캡슐의 작용은 Fig.2에 나타내었다.

즉 저분자의 基質은 캡슐막을 자유롭게 투과하여 효소와 반응한 후 농도차이에 의해 캡슐밖으로 나가므로 고분자량의 효소는 캡슐내에만 존재한다.

Chang³⁴은 콜라겐을 이용한 catalase마이크로캡슐로 선천성 acatalasemia(무카타라제증)치료 효과를 검토한 결과 용액상태로 투여한 것은 투여 20분후의 소도량이 70%마이크로캡슐로 투여한 것은 16%이었다. 또 용액상태로 계속 투여한 경우에는 사망하였으나 캡슐의 경우는 항체가 형성되지 않아 치료에 성공하였다.

Mori³⁵는 나일론 및 폴리에스테르피막을 이용

Table 7. 프랜트설계비^a

Operating temperatures (°C)	Number halflives enzyme utilization	Column capacity (ft ³)	Plant cost (\$)
40	3	1,247	793,000
40	2	970	634,000
40	1	728	457,000
50	3	668	658,000
50	2	519	512,000
50	1	390	368,000
60	3	448	576,000
60	2	349	442,000
60	1	262	312,000

^aBasis: 10³ lb/yr plant, 3rd quarter-1974 prices.

Table 8. 글루코오즈아밀라제의 가격^a

Operating temperature (°C)	Number halflives enzyme utilization	Processing cost (¢/cwt dry solids)				
		IME Cost (\$/lb):	5	10	15	20
40	3		32.8	38.7	44.6	50.4
40	2		30.5	37.4	44.2	51.0
40	1		30.6	40.9	51.1	61.4
50	3		37.4	50.6	63.8	77.0
50	2		36.6	52.0	67.5	82.9
50	1		41.5	64.6	87.7	110.8
60	3		63.7	105.0	146.2	187.5
60	2		68.0	116.1	164.3	212.3
60	1		89.5	161.7	233.9	306.2

^aBasis: 10³ lb/yr plant (20%/yr plant cost for maintenance, depreciation, interest, taxes, etc.).

Table 9. 의료분야에 이용되는 효소반응

酵 素	酵 素 反 應	酵 素 源	治 療 效 果
α -amylase	전분의 液化	<i>Aspergillus niger</i>	消 化 劑
glucoamylase	" 糖化	<i>Endomyces</i>	"
protease	단백질의 加水分解	<i>Aspergillus oryzae</i>	"
lipase	지방의 加水分解	<i>Aspergillus niger</i>	"
protease	단백질의 加水分解	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus</i>	"
"	"	<i>Bacillus subtilis</i>	消 炎
"	"	<i>Streptomyces griseus</i>	"
"	"	<i>Aspergillus niger</i> <i>Asp. melleus</i>	"
streptokinase	Plasminogen activators (plasminogen $\rightarrow$ Plasmin)	Group C streptococci	血栓症治療
asparaginase	"	人 尿 <i>Escherichia coli</i>	同上, 항암제의 작용촉진 Antileukemia
glutaminase	L-아스파라긴 + $H_2O \rightarrow$ L-아스파라긴 酸 + NH_3	<i>Acinetobacter</i>	Asparaginase-resistant ascites tumors에 대한 효과
asparaginase	L-글루타민 + $H_2O \rightarrow$ L-글루타민酸 + NH_3	<i>Pseudomonas</i>	Solid tumor에 대한 效果
carboxyl peptidase G_1	葉酸의 加水分解	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Murine leukemias, L 1210에 대한 效果
β -galactosidase	乳糖 $\rightarrow$ D-글루코오즈 + D-갈락토오즈	<i>Aspergillus niger</i>	小兒下痢
ribosome	溶菌作用	卵 白	目藥用殺菌劑

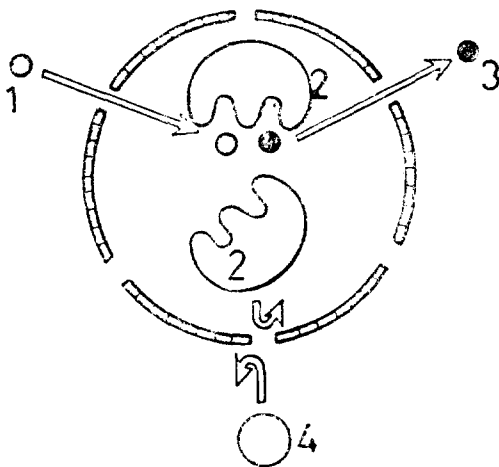


Fig. 2. 고정효소 마이크로캡슐의 반응모형도

1. 低分子物質
2. 酵素
3. 反應生成物
4. 高分子物質

한 界面重合法으로 제조한 아스파라키나제 마이크로캡슐을 이용하여 백혈병치료에 이용한 결과 이 마이크로캡슐 방법은 단백질분해효소에 안정

하고 토끼의 腹腔內에 투여하여도 급성독성을 나타내지 않아 抗原성이 없음을 확인하였다.

體外循環法은 혈액을 體外로 나오게 한 후 고정효소와 접촉시켜 치료하는 방법으로 生體내에 축적된 노폐물이나 유해물질을 효소반응을 이용하여 분해제거하는 방법이다. Fig.3은 이 體外循環시스템을 나타낸 것이다.

Allison은 내경 1mm, 길이 2m인 나일론관의 내면을 염산으로 가스분해한 후 glutaraldehyde로 처리하고 아스파라키나제를 공유결합으로 고정시킨 관을 제조하고 37°에서 2ml/min으로 혈액을 통과시키면 혈액중의 아스파라긴의 농도가 급격하게 감소됨을 확인하였으며 관에 결합된 효소의 양을 증가시키면 완전하게 아스파라긴을 분해제거 할 수 있음을 확인하였다.

또 Sampson³⁷은 백혈병치료를 목적으로 아스파라키나제관을 제조하였는데 즉 폴리메틸메타아크레이트관을 γ -아미노프로필 트리에톡시실란으로 처리하고 glutaraldehyde로 활성화시킨 다음

아스파라키나제를 고정화하였다. 이 酵素板을 Fig. 4와 같은 장치내에 넣고 혈액중의 아스파라긴 및 아스파라긴산의 농도변화를 측정하였다. 측정결과 정맥과 동맥에서의 아스파라긴 혈중농도는 감소하는 반면에 아스파라긴산의 농도는 높아짐을 확인하였으며 부작용 및 순환후의 각종 부위에서의 組織學的인 이상이 전혀 발견되지 않았다. 또한 단백질분해 효소에 대해 안정하며 혈액중에 소량의 헤파린을 첨가하면 혈액응고를 방지

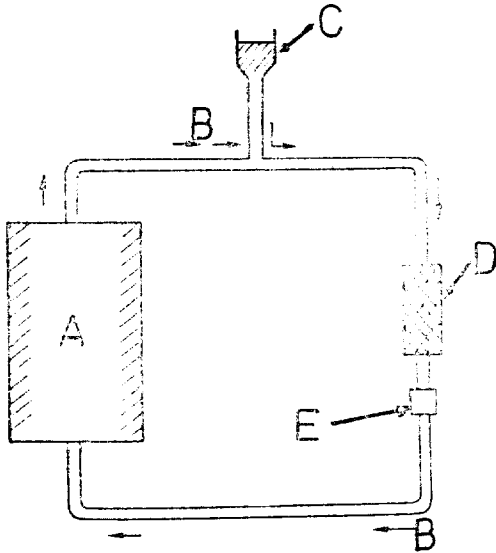


Fig. 3. 체외순환 System.

A ; 生體 B ; 혈액 C ; 혈액응고방지제 (Heparin)
D ; 효소관 또는 고정화효소 Column
E ; 활성탄, 이온교환수지에 의한 분해물 제거장치

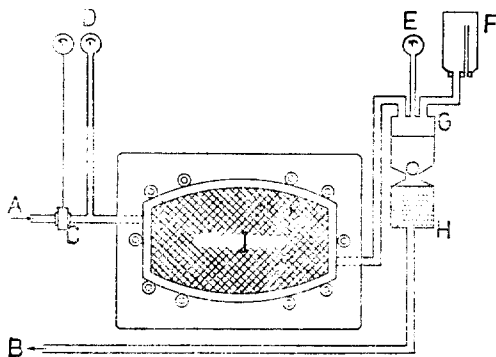


Fig. 4. Asparaginase板을 이용한 體外血液循環裝置 (효소판의 크기 ; 20cm×10cm×4cm)

A ; 동맥 B ; 정맥 C ; 電磁式流量計
D ; 동맥측혈압계 E ; 정맥측혈압계
F ; Zinc lactate액
G ; 기포제거기 H ; 여과기 I ; asparaginase板

지할 수 있어 장기간 사용이 가능하다.

4-3-2. 人工臟器에의 利用

현재 腎臟疾患의 치료에 이용되고 있는 人工腎臟은 生體外에서 혈액이 透析膜을 통해 요소나 요산등의 노폐물을 제거하고 있는데 대량의 透析外液을 사용하기 때문에 대규모의 장치가 필요하며 경제적인 부담이 크다. 이에 비해 Sparks는 사용하는 透析外液의 양을 적게 쓰고 장치를 소형화하기 위하여 Fig.5와 같은 고정화효소를 이용한 人工腎臟을 개발하였다.

즉 우레아제와 이온교환수지를 동시에 마이크로캡슐화하고 이 캡슐과 活性炭을 Fig.5와 같이 컬럼에 충전시킨다. 이 컬럼과 小型透析器를 연결하고 펌프에 의해 透析外液을 순환시키면 透析外液中の 요소는 酵素캡슐에 의해 암모니아와 탄산가스로 분해된다. 암모니아는 이온교환수지에 의해 제거되고 다른 노폐물은 활성탄에 의해 흡착 제거된다.

Chang³⁰⁾은 우레아제캡슐을 컬럼에 충전시키고 이 컬럼에 혈액을 직접 흐르게 하는 體外循環 방법을 이용하여 혈액중의 요소를 분해하는 방법을 개에 실험하여 좋은 결과를 얻었다. 이와같은 人工臟器에의 고정화효소의 이용은 人工肝臟의 解

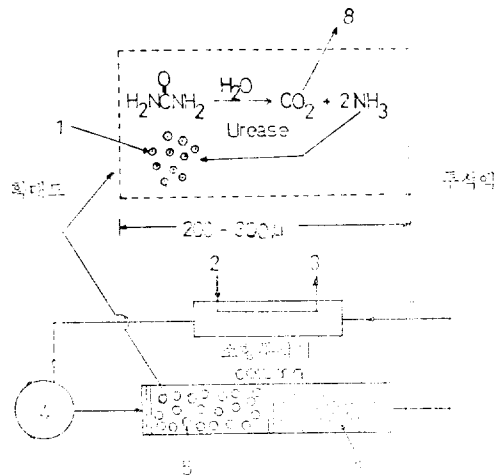
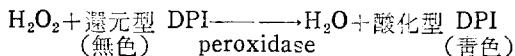
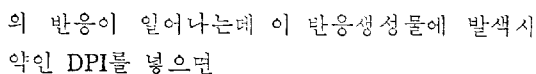


Fig. 5. 固定化 urease를 이용한 小型人工腎臟模型圖

1. 이온 교환수지 2. 血液入口
3. 血液出口 4. 定量펌프
5. 마이크로캡슐 6. 活性炭
7. 透析液 8. 肺에서 제거

4-3-3. 臨床檢査에의 利用

Hicks와 Updilk⁴⁶⁾은 유산탈수소효소인 글루코스옥시타제를 폴리아크릴아미드겔에 包括法으로 고정화시킨 켈럼을 Fig.6과 같은 장치와 함께 유산이나 글루코스를 자동분석하였다.

$$\text{젖산} + \text{NAD} \xrightleftharpoons{\text{유산탈수소효소}} \text{피르빈산} + \text{NADH}_2$$


NADH₂ : 還元型 nicotinamide adenine dinucleotide

의 반응에 의해 比色定量할 수 있다.

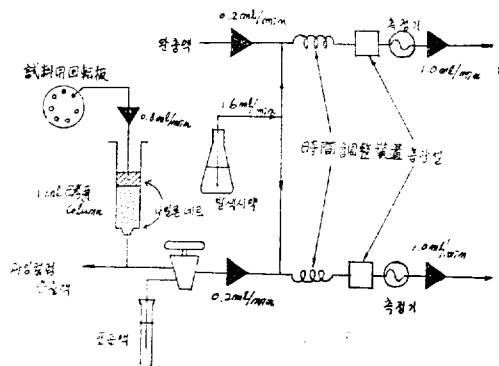


Fig. 6. 글루코스 또는 乳酸의 自動分析裝置

4-4. 分析, 計測에의 利用

호소를 이용한 分析, 計測은 원칙적으로 크게 2가지로 분류하고 있다.

4-4-1. 酵素反應의 反應物, 生成物을 電氣化學的으로 計測하는 방법

이 방법은 효소반응의 반응물을 전극으로 측정하는 방법으로 주로 酸素를 측정하게 되며 생성물을 측정할 경우에는 酸素, 암모니아, 수소이온, 과산화수소 등을 전극으로 측정한다.

Table 10. 분석, 계측에 이용되는 효소

(i) 임상화학검사용약

분 석 대 상	분 석 방 법	정 량 범 위	효 소 반 응	효 소 원
글 루 코 스	1) hexokinase 2) G-6-P 탈수소효소	0~1 g/dl	1) 글루코스+ATP→G-6-P+ADP 2) G-6-P+NADP→6-PG+NADPH+H ⁺	Saccharomyces cerevisiae
요 소	1) urease 2) glutamate dehydrogenase	0~150 mg/dl	1) 요소+H ₂ O→CO ₂ +2NH ₃ 2) NH ₃ +α-케토글루탈산+NADPH+H ⁺ →L-글루타민산+NADP+H ₂ O	"
요 산	urease	0~15 mg/dl	요소산+O ₂ →allantoin+H ₂ O ₂	Candida utilis
암 모 니 아	glutamate dihydrogenase	1~8 γ/ml	NH ₃ +α-케토글루탈산+NADPH+H ⁺ →글루타민산+H ₂ O	S. cerevisiae
콜 레 스 트롤 (에스테르형)	1) collestol oxidase 2) peroxidase	0~400 mg/dl	1) Cholesterol+O ₂ →Δ ⁴ -cholestenon+H ₂ O ₂ 2) 4-아미노아세틸페놀+2H ₂ O ₂ →적색퀴논색소+4H ₂ O	1) Brevibacterium sterolicum

(ii) 식품분석에의 응용

L-글루타민산	L-glutamate decarboxylase	0.5~2.0 mg/ml	L-glutamic acid → 아미노초산 + CO ₂	Escherichia coli
구연산	1) aconitase 2) 이소구연산 탈수소효소		1) 구연산 → d-이소구연산 2) d-이소구연산 + NADP ⁺ → α-keto-glutamic acid + CO ₂ + NADPH + H ⁺	1) Saccharomyces cerevisiae 2) "
암모니아	L-글루타민산 탈수소효소	1~8 γ/ml	α-keto-glutaric acid + NH ₃ + NADPH + H ⁺ → L-glutamic acid + NADP ⁺ + H ₂ O	Saccharomyces cerevisiae
글루코스	1) 글루코스 옥시라제 2) 갈락타제	20~100 γ/ml	1) 글루코스 + H ₂ O + O ₂ → 글루콘산 + H ₂ O ₂ 2) H ₂ O ₂ + CH ₃ OH → HCHO + 2H ₂ O	Aspergillus niger
슈크로스	1) 이소펜타제 2) 글루코스 옥시라제 3) 갈락타제	1~10 mg/ml	1) 슈크로스 → β-D-프락토스 + α-D-글루토스 2) α-D-글루토스 → β-D-글루코스	1) Saccharomyces cerevisiae

(iii) BOD센서

BOD	수소생성균 및 (Clostridium butyricum) 용막산소전극			
-----	--	--	--	--

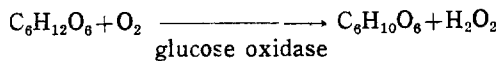
(iv) ATP센서

ATP	luciferase	5 × 10 ⁻⁵ mg/ml	ATP + Mg ⁺⁺ + O ₂ + luciferin → 빛	
-----	------------	----------------------------	---	--

(v) 산소전극

글루코스	glucose oxidase	10 ⁻⁶ ~10 ⁻⁴ M	글루코스 + H ₂ O + O ₂ → 글루콘산 + H ₂ O ₂	효소전극
요소	urease	10 ⁻⁴ ~10 ⁻² M	요소 + H ₂ O → CO ₂ + 2NH ₃	1가 양이온전극
L-아미노산	L-glutamate oxidase	10 ⁻⁴ ~10 ⁻² M	L-아미노산 + H ₂ O + O ₂ → α-keto-acids + NH ₃ + H ₂ O ₂	"
D-아미노산	L-glutamate oxidase	10 ⁻⁴ ~10 ⁻² M	D-아미노산 + H ₂ O + O ₂ → α-keto-acids + NH ₃ + H ₂ O ₂	"
페니실린	페니실리나제	10 ⁻⁴ ~10 ⁻¹ M	페니실린 + H ₂ O → 페니시론산	pH전극

측정장치는 대부분 Fig.7과 같은 것을 이용하며 글루코스의 경우⁴¹⁾에는



尿酸의 경우⁴²⁾에는

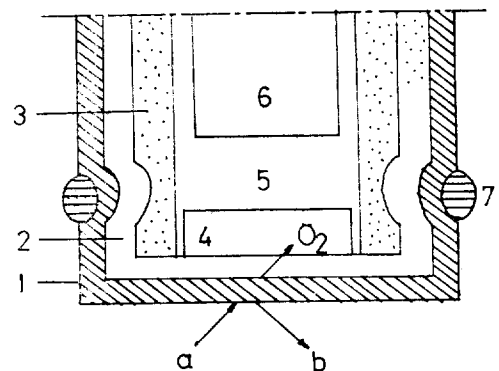
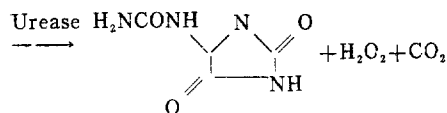
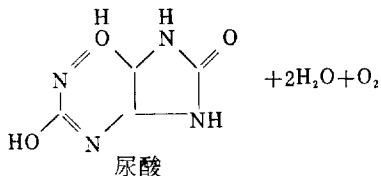


Fig. 7. 효소센서장치

1. Urease 고정화 콜라겐막
2. 테프론막 (50μ)
3. 支持材
4. 음극 (Pt)
5. 알칼리電解液
6. 양극 (Pb)
7. 코루팅
- a. 尿酸
- b. allantoin

의 반응에서 소모되는 醎素의 농도변화를 전극으로 측정하는 방법과 생성물에서의 과산화수소의 농도를 측정하는 방법이다.

고정화효소에 의한 각 전극의 특성은 Table 11과 같다.

4-4-2. 전지시스템을 이용하는 방법

酵素와 NAD 및 NADP*등의 補酵素를 이용하여 酵素反應電池를 구성하여 이 電池시스템으로

有機物을 정량적으로 측정하는 방법⁴³⁾이다. 효소는 基質特異性이 있어 많은 화합물중에서 특정 물질과 선택적으로 반응하므로 특정성분의 分析이 가능하다.

4-5. 새로운 자원, 에너지개발에의 이용

酵素反應을 이용하여 空中窒素의 固定 또는 물에서 水素의 생산등의 자원문제와 에너지관계에 이용하는 경우는 Table 12와 같다.

Table 11. Some Enzyme Electrodes and their Characteristics

Type	Sensor	Stability	Response time (min)	Range (M)
1. Urea	Cation	>4 Months	1-2	10^{-2} to 10^{-4}
	pH	3 Weeks	5-10	5×10^{-8} to 5×10^{-5}
	Gas(NH ₃)	>4 Months	1-4	5×10^{-2} to 5×10^{-5}
2. Glucose	Pt(O ₂)	>4 Months	1	10^{-1} to 10^{-5}
	Pt(H ₂ O ₂)	>14 Months	1	2×10^{-2} to 10^{-4}
	Gas(O ₂)	3 Weeks	2-5	10^{-2} to 10^{-4}
	pH	1 Week	5-10	10^{-1} to 10^{-3}
3. L-Amino acids (general)	Pt	4-6 Months	0.2	10^{-3} to 10^{-5}
	NH ₄ ⁺	>1 Month	1-3	10^{-2} to 10^{-4}
L-Tyrosine	Gas(CO ₂)	3 Weeks	1-2	10^{-1} to 10^{-4}
L-Asparagine	Cation	1 Month	1	10^{-2} to 5×10^{-5}
4. D-Amino acids	Cation	1 Month	1	10^{-2} to 5×10^{-5}
5. Lactic acid	Pt	<1 Week	3-10	2×10^{-3} to 10^{-4}
6. Alcohols	Pt(O ₂)	>4 Months	0.5	0.5 to 100mg/100ml
7. Penicillin	pH	1-2 Weeks	1-2	10^{-2} to 10^{-4}
8. Uric acid	Pt(O ₂)	>4 Months	0.5	10^{-2} to 10^{-4}
9. Amygdalin	CN ⁻	1 Week	1-3	10^{-1} to 10^{-5}

Table 12. 새로운 자원, 에너지개발에의 효소이용

目 的	利 用 酵 素	酵 素 反 應	酵 素 源
纖維資源의 發酵原料化	Cellulase β-Glucosidase	Cellulose + H ₂ O → Glucose	<i>Cellulomonas</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i>
	Cellulase		<i>Trichoderma viride</i>
치이즈에서 단백질 및 糖의 回收	Lactase	Lactose + H ₂ O → D-Glucose + D-Galactose	
암모니아의 生産 (N ₂ 의 固定)	Nitrogenase	N ₂ + 還元型 phrentasin + 6ATP(?) → 2NH ₄ ⁺ + 6ADP + 6P _i + phrentasin	<i>A Derepressed mutant</i> <i>of Klebsiella pneumonia</i> <i>A Derepressed mutant</i> <i>of Azotobacter vinlandii</i>
물에서의 水素의 生産	Hydrogenase 光合成의 電子傳達系	NADPH + H ⁺ → NADP ⁺ + H ₂ H ₂ O + NADP ⁺ $\xrightarrow{\text{光}}$ NADPH + H ⁺ + $\frac{1}{2}$ O ₂	<i>Scenedesmus</i>

* NADP : Nicotinamide adenine diphosphate

5. 장래의 전망

효소고정화는 앞으로 효소의 배양기술과 분리 정제기술의 발달로 다양한 효소의 개발과 특수 환경에도 견딜 수 있는 고정화방법의 개발이 이루어진다면 그 응용분야는 무한하다 하겠다.

또한 현재까지의 분해반응에의 이용뿐만 아니라 합성반응에까지 그 응용범위를 넓히고 단일 효소만이 아닌 복합효소의 고정화에 의해 抗生物質, 비타민, 아미노산, 핵산염기등의 합성에까지 개발될 수 있는 여지가 있다. 이 경우에 중요한 것은 生合成에 필요한 에너지 및 補助酵素인 ATP, NADH 등의 재생기술이 개발되어야 한다는 것이다.

고정화효소에 의한 질소나 탄산가스의 고정과 水素의 생산등은 흥미있는 연구과제가 될 것이다.

가수분해효소인 셀룰라제에 의해 천연에 존재하는 셀룰로오스를 가수분해하여 글루코스의 생산도 아직 해결되지 않은 큰 연구과제중의 하나이다.

최근 *Trichoderma viride*와 같은 活性이 큰 셀룰라아제가 개발되어 이 방법의 연구도 주목을 받고 있는데 고정화셀룰라제를 이용하는 대신에 한외여과막을 사용한 반응장치로 遊離酵素를 이용하는 것이 유리할 것이다.

生體內反應기구와 효소기능 연구에도 고정화효소의 이용이 크게 기대되고 있는데 특히 복합효소의 고정화 또는 酵素膜의 제조는 生體內反應을 모델화하는데 크게 기여하게 될 것이다.

특수생체반응의 분석이나 분리정제용 affinity chromatography에는 고정화효소의 이용이 필수적이다.

醫學分野에서도 免疫反應性이 없는 마이크로캡슐이나 혈액응고와 반알성이 없는 재료의 개발이 선행된다면 복합효소고정화로 生體內機能을 대신할 수 있는 人工臟器의 개발도 멀지 않을 것 같다.

특히 흥미있는 과제로는 生物化學電池나 燃料電池에 고정화효소의 이용이다. 화학공학면에서도 효소가 복잡한 장애를 받지 않으면서 효소의 활성을 재생시키는 방법, 복합효소반응의 이용

등 아직도 해결해야 할 문제점등이 많아 고정화효소의 연구과제는 무궁무진하다 하겠다.

참 고 문 헌

1. Nelson, J. M. and E. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.*, **38**, 1109 (1916).
2. Wingard, L. B. and E. Katchalski-Katizier, et., al., "Applied biochem. and bioengineering Vol. 1, Academic press (1976).
3. Goldstein, L., et., al., *Biochemistry*, **2**, 1913 (1964).
4. Lilly, M. D. et., al., *Biochem. J.* **100**, 718 (1966).
5. Lilly, M. D. et., al., *Chem. Engineering*, **CE 12** (1968).
6. Chibata, I., et., al., "Proceedings of 4th Intern. Ferment. Symp., Fermentation Technology Today, p.383 (1972).
7. Dunill, D., *Ibid.*, p.187 (1972).
8. Charm, S. E., et., al., *Biotechnol. & Bioeng.*, **12**, 1107 (1970).
9. Tirrell, M., et., al., *Ibid.*, **17**, 299(1975).
10. Charm, S. E., et., al., *Ibid.*, **20**, 451(1978).
11. Karube, I., et., al., *Anal. Chim. Acta.*, **106**, 243 (1979).
12. Neujahr, H. Y., *Biotechnol. & Bioeng.*, **22**, 913 (1980).
13. Robert, L., et., al., *Arch. Biochem & Biophys.*, **202**, 370 (1980).
14. Leblond, D. J., et., al., *Anal. Biochem.*, **104**, 370 (1980).
15. Goldstein, L., *Biochimie*, **62**, 401 (1980).
16. Minamoto, Y., et., al., *Biotechnol. & Bioeng.*, **22**, 1225 (1980).
17. Beddows, C. G., et., al., *Ibid.*, **22**, 311 (1980).
18. Kennedy, J. F., et., al., *Carbohydr. Res.*, **80**, 25 (1980).
19. Ishimori, Y., et., al., *Biotechnol. & Bioeng.*, **23**, 1267 (1981).

20. Carleysmith, S. W., et., al., *Ibid.*, **22**, 957 (1980).
21. Chen, A. K., et., al., *Ibid.*, **21**, 1905(1979).
22. Hicks, G. P., et., al., *Anal. Chem.*, **38**, 762 (1966).
23. Brown, H. D., et., al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **2**, 231 (1968).
24. 北原賞雄, et., al., 農化, **33**, 528 (1959).
25. Tanaka, H., et., al., *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 721 (1968).
26. 中村信雄, 農化, **42**, 281 (1968).
27. Furuya, A., et., al., *Biotech. & Bioeng.*, **13**, 229 (1971).
28. Nakayama, K., et., al., *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1331 (1968).
29. Ogata, K., et., al., *Ibid.*, **36**, 93 (1972).
30. Fukumura, T., *Ibid.*, **40**, 1687 (1976).
31. Tosa, T., et., al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 788 (1971).
32. 福本壽一郎, 核酸, 酵素, **4.3** (1959).
33. 國中明 et., al., 日本公開特許 61-4977 (1961).
34. Chang, T.M.S., et., al., *Nature*, **218**, 243 (1968).
35. Mori., T., et,al., *Biochim. Biophys. Acta.*, **321**, 653 (1973).
36. Allison, J. P., et., al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 66 (1972).
37. Sampson, D., et., al., *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs.*, **18**, 54 (1972).
38. Sparks, R. E., et., al., Annual Progress Report, Chem. Eng. Sci. Div., Case Western Reserve University (1968).
39. Chang, T.M.S., *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs*, **12**, 13 (1966).
40. Hicks, G. P., et., al., *Anal. Chem.*, **38**, 726 (1966).
41. Hicks, G.P., et., al., *Nature*, **214**, 986 (1967).
42. Suzuki, S., et., al., *Chem. Letter*, 9(1974).
43. 水口純 et., al., 工化誌 **67**, 138 (1964).