

Chitosan Bead에의 Amyloglucosidase 고정화에 관한연구

이 성 일 · 서 한 수 · 김 계 용

한양대학교 공과대학 공업화학과
(1987년 3월 19일 접수)

Immobilization of Amyloglucosidase on Chitosan Beads

Seong Il Rhee, Han Soo Suh, and Kea Yong Kim

Dept. of Industrial Chemistry, College of Eng., Hanyang Univ., Seoul 133, Korea

(Received March 19, 1987)

요 약 : Chitosan으로 ionotropic gel을 만든 후 amyloglucosidase (exo- α -1,4 glucanase)를 그 표면에 공유결합으로 고정화하였다. 고정화 방법은 1.2% (w/v) chitosan-acetate 용액에 pH4인 2%(w/v) polyphosphate 용액에 미량주입기를 통해 적하하여 겔화시켜 직경 2.0-2.2mm인 구형의 beads를 제조한 후 그 beads를 안정화시키기 위하여 pH9인 2%(w/v)polyphosphate 용액내에 2.5시간 침지시켜 직경 1.0-1.1 mm의 강도있는 beads를 얻었다. 가교제로 사용한 glutaraldehyde의 농도와 반응시간에 따른 효소고정화도를 Lowry방법에 의해 조사하여 0.025% glutaraldehyde 용액내에서 10분간 반응시켰을때 35%의 고정화율을 나타내었으며 저장성이 좋은 고정화효소를 얻었다. 또한 효소고정전후의 beads의 morphology를 비교하여 효소의 고정화 여부를 조사하였다. pH와 온도를 변화시키면서 고정화효소의 활성을 측정한 결과 pH3.5, 60℃에서최고의 활성을 나타내었다. Batch 및 컬럼반응장치를 사용하여 효소의 활성, 저장성, 반복사용성 및 연속사용성을 검토하였다. 순수 효소와 고정화효소의 Michaelis constant (K_m)값은 0.074와 0.079였으며 이 값으로부터 고정화효소의 기질분해능이 우수함을 알 수 있었다. 고정화된 amyloglucosidase의 반복사용성은 batch반응기의 경우 4회이후 약간 감소하였으나 그 이후는 안정화됨을 알 수 있었다. 컬럼반응기를 사용하여 유속과 기질농도 및 컬럼길이를 변화시키면서 시간 경과에 따른 기질분해능을 연속적으로 측정하였으며 특히 유속 14ml/hr일때는 각 농도에 대해 높은 활성을 나타내었다. 본 실험의 결과로부터 컬럼반응기의 취약점인 beads의 표면과 기질간에 형성되는 농도경계층의 영향보다는 유속과 컬럼길이의 영향이 큼을 알 수 있었다.

Abstract : Amyloglucosidase (exo- α -1,4 glucanase) (AMG) was immobilized on ionotropic gel of chitosan (deacetylated chitin) by coupling reaction with glutaraldehyde. The diameter of the enzyme-immobilized chitosan beads was about 1.0-1.1mm and bead hardness was comparatively high. The efficiency of enzyme immobilization by concentration and crosslinking time of glutaraldehyde was determined by Lowry method and the storage stability of immobilized enzyme was excellent. The immobilization of AMG was investigated by SEM. The activities of immobilized AMG were investigated by changing pH and temperatures. The stability of enzyme activity and storage, iterative and continuous usage were also estimated in batch and column reactor. Michaelis constants of pure and immobilized enzyme were 0.074 and

0.079, respectively and they showed that the activity of immobilized enzyme was good. The stability of immobilized AMG slightly decreased after four times usages but maintained high activity for more usages. In continuous system, column reactor showed high activity when flow rate was 14 ml/hr. From the experimental results, it was concluded that the effects of concentration of substrate and column length of column reactor in activities of immobilized enzyme were greater than those of concentration boundary layer formed between beads and substrate that was a weak point of column reactor.

서 론

순수효소는 그 활성이 불안정하고 효소반응 자체가 수용액 상태에서 진행되기 때문에 반응완료 후 생성물과 효소의 분리 및 정제가 곤란하여 효소의 재사용과 반응 프로세스의 연속화가 어렵다. 그러나 효소의 활성을 안정화시키고 고가의 효소를 재사용함으로써 연속 프로세스의 설계를 가능하게 하는 효소고정화 방법에 대해 최근 많이 연구되고 있다.

1960년대 후반 이후 기술연구소와 기업체에서 고정화 효소의 응용이 확장되면서 *L*-amino acid,¹ fructose syrup² 그리고 6-aminopenicillanic acid 등 산업적인 규모의 생산이 이루어지고 있다. 이외에도 핵산의 생산, 정밀화학, 유기합성, 폐수처리 및 분석화학 등에서 광범위하게 연구되고 있다. 그리고 최근의 유전자 조작에 있어서의 개발과 bioreactor 설계 및 컴퓨터 제어공정의 뛰어난 진보로 말미암아 생물공학은 산업, 농업 및 의학 분야에 있어서 기술적인 혁신을 가져올 것이 예견되므로 효소활용의 산업화에 따른 여러가지 문제들의 해결에 밝은 전망을 주고 있다.

앞으로 고정화효소에 관한 연구는 값싼 담체의 개발과 고정화효소의 활성을 높일 수 있는 프로세스의 개발 및 multienzyme계를 이용한 새로운 반응기를 개발함으로써 경제성이 높은 산업화가 요망된다.

Chitosan과 chitin은 여러가지 효소들에 대한 담체로써 많이 사용되고 있다.³⁻⁵ 특히 ionotropic gel을 이용하여 효소를 고정화시키는 반응은 조작이 간단하여 자주 연구의 대상이 되고 있는데

alginate^{6,7} carrageenan,⁷ carboxyguar gum 등 많은 예가 있다. 본 연구에서는 ionotropic gel로 형성된 chitosan beads의 아민기에 glutaraldehyde를 spacer arm으로 사용하여 amyloglucosidase를 coupling 반응으로 고정화시켰다. 순수 효소와 고정화 효소의 활성변화는 pH와 온도를 변화시키면서 검토하였으며 batch 및 column 반응장치를 사용하여 고정화효소의 저장 안정성 및 연속사용시의 활성변화도 검토하였다.

실 험

시 약

Amyloglucosidase는 Novo사 제품인 반응최적 pH 4.5, 최적온도 70℃인 액상 amyloglucosidase (EC 3.2.1.3, *exo*- α -1.4 glucanase) 300L을 인산나트륨 완충용액으로 10배로 희석하여 사용하였다.

녹말(日本, 伸陽化學(株)), chitosan(日本, 東京化成工業(株)) 및 glutaraldehyde(日本, 國產化學(株))제품은 정제하지 않고, 그대로 사용하였다.

Chitosan Beads에의 Amyloglucosidase 고정화

Chitosan Bead의 제조⁸: Chitosan은 천연고분자인 chitin을 탈아세틸화하여 얻을 수 있는 다당류이다. 중화적정으로 탈아세틸화도가 76%인 chitosan을 사용하였다.⁹ Chitosan beads의 제조때 polyphosphate의 pH에 따라 두가지의 메커니즘을 거치게 되는데 pH5.5 이하에서는 ionotropic gel을 형성하게 되며 pH7.5 이상에서는 beads에 함유된 물분자의 탈수로 인한 beads의 shrinking에 의해 beads가 안정화되는 두 단계로 이루어진

다. 본 연구에서는 1.2%(w/v) chitosan-acetate 용액을 미량주입기를 통해 pH 4인 2%(w/v) polyphosphate 용액에 적하하여 겔화 시켰으며 30분 이후 지름 2.0-2.2mm의 gel beads를 얻었다. 생성된 gel beads를 안정화시키기 위해 pH9인 2%(w/v) polyphosphate 용액에서 2.5시간정도 침지시켜 지름 1.0-1.1mm의 강도가 큰 beads를 제조한 다음 세척하여 효소고정용 담체로 사용하였다.

Amyloglucosidase의 고정화^{10,11} 및 저장안정성

Chitosan beads에 효소고정을 위한 spacer arm을 도입시키기 위해 pH 7의 인산염 완충용액중에서 일정량의 chitosan beads와 glutaraldehyde를 상온에서 반응시켰다. 반응 후 chitosan beads에 부착된 미반응의 glutaraldehyde를 제거하기 위해 물로 충분히 세척하고 pH7의 인산염 완충용액중에 chitosan beads의 일정량과 amyloglucosidase를 넣고 4℃에서 12시간 이상 반응시켰다. 이때의 반응은 enzyme중의 L-lysine 등 염기성 아미노산의 측쇄에 갖고 있는 amine과 glutaraldehyde의 알데히드기간의 schiff base의 형성으로 고정화된 amyloglucosidase를 얻는 것인데 반응경로는 Scheme 1과 같다.

고정화된 효소의 양은 Lowry방법으로 측정하였으며 scanning electron micrograph (Fig. 2)에서 보는 바와 같이 효소고정화 전후의 morphology

는 서로 상이성을 나타냄을 알았다.

Chitosan bead에 고정화시킨 amyloglucosidase의 시간경과에 따른 활성도를 조사하기 위하여

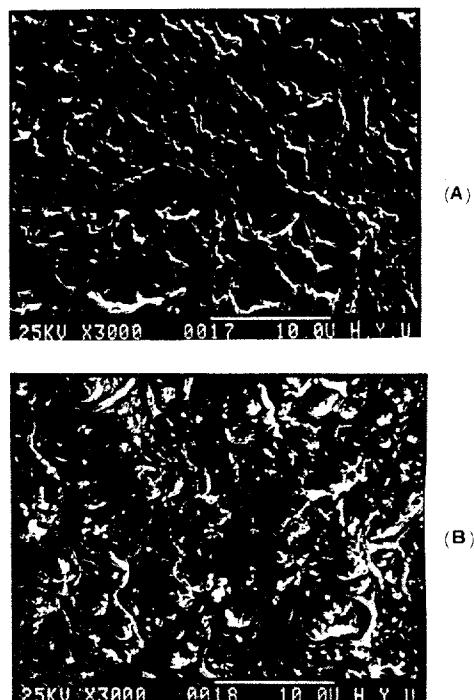


Fig. 2. Scanning electron micrograph of chitosan bead surface(A) and enzyme immobilized bead surface(B).

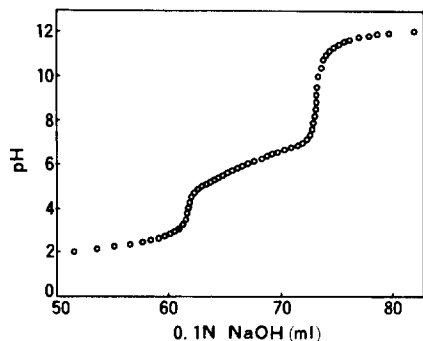


Fig. 1. Titration curve of chitosan sample dissolved in HCl with NaOH solution.

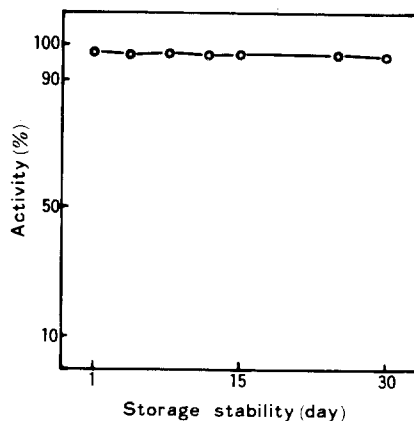
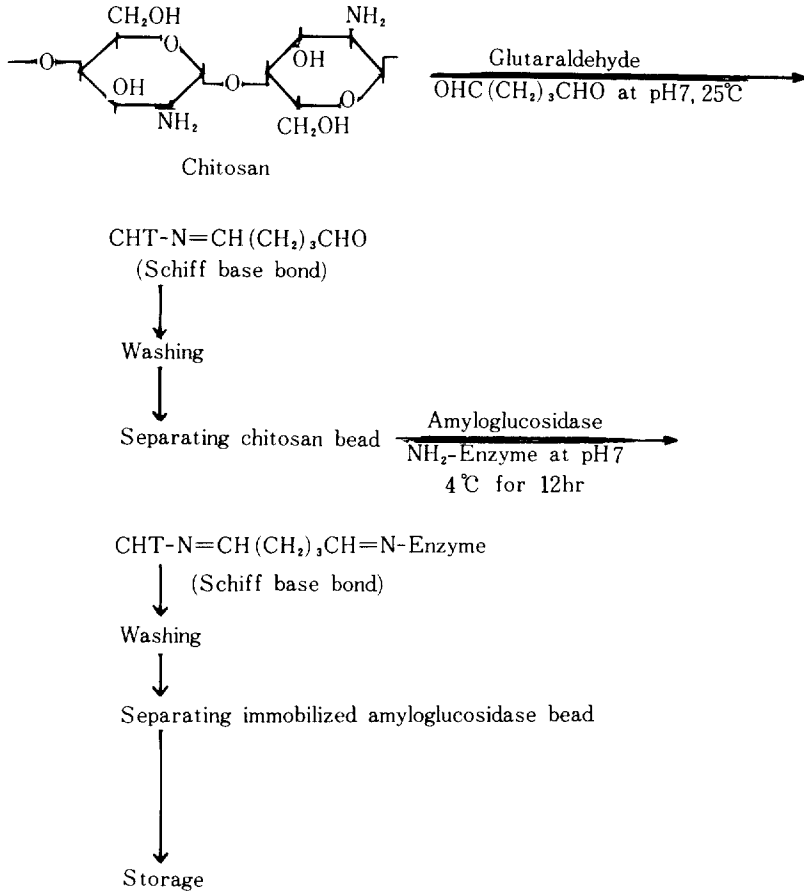


Fig. 3. The storage stability of immobilized amyloglucosidase for a month.

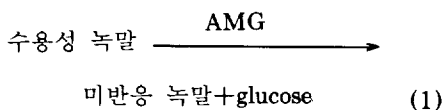


Scheme 1. Immobilization of amyloglucosidase on chitosan bead

4°C에서 1개월간 보관하면서 임의의 시간 간격으로 이 시료를 꺼내서 pH3.5 인산염으로 조정된 1%(w/v) 녹말용액에 넣고 30분간 반응시켜 활성을 비교함으로써 저장 안정성을 조사하였다.

Amyloglucosidase (exo- α -1,4 glucanase)의 기질 분해능 측정¹²

Amyloglucosidase의 활성은 기질인 수용성 녹말을 사용하여 기질분해능을 광도계법으로 측정하여 계산하였다. 이때 반응은 아래식(1)과 같다.



수용성 녹말의 반응량은 0.07N 요오드용액으로

반응액을 발색시킨 후 Bausch & Lomb spectronic 20 (light path : 1 cm)을 사용하여 540nm 파장에서의 흡광도 변화를 읽어 미반응 기질량으로부터 계산하였다.

효소반응장치 및 조건

Chitosan beads표면에 공유결합으로 효소를 고정시킬때 수용액의 pH와 온도, 가교제인 glutaraldehyde의 농도 및 반응시간 등을 측정하여 반응의 최적조건을 구하는 것이 필요하다.^{13,14} 효소의 고정화와 고정화된 효소의 반응기내에서의 활성을 검토하기 위해 Fig. 4와 같은 장치로 실험을 하였다.

컬럼(2)에 고정화효소 2.3g을 충전시키고 이 컬럼에 pH 3.5인 기질용액을 미량펌프(4)로 상향

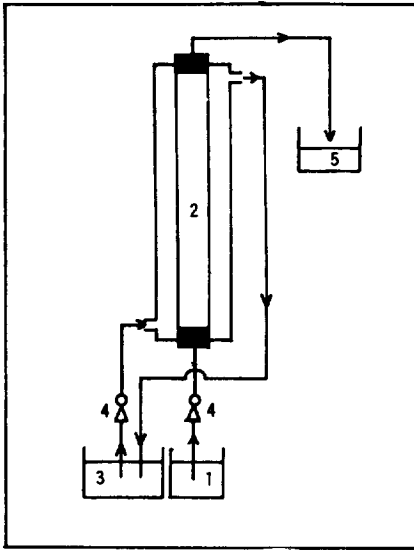


Fig. 4. Column reactor for measurement of enzyme activity (1 : Starch solution, 2 : Immobilized beads, 3 : Incubator, 4 : Pump, 5 : Product reservoir).

식으로 유입시켰다. 이때 유속을 14ml/hr, 35ml/hr 및 53ml/hr로 변화시키고 또한 기질농도와 컬럼길이를 변화시키면서 반응기 내에서의 활성 변화를 검토하였다. 사용한 컬럼의 내경은 5mm, 길이는 100mm 이며 반응한 물질을 (5)에서 시간에 따라 일정량을 채취하여 전화율을 구하였다. 반응온도를 일정하게 유지시키기 위해 항온수(3)를 순환시켰다.

결과 및 고찰

효소고정에 대한 담체와 가교제의 영향

효소고정화를 위한 담체로서 많은 종류의 무기 및 유기체료들이 연구 검토되고 있으며,¹⁵⁻¹⁷ 담체는 다음과 같은 몇가지 조건을 만족시킬 수 있어야 한다.^{18,19} 첫째는 표면적이 커서 다량의 효소를 고정시킬 수 있을 것, 둘째는 간단한 반응조건 하에서 효소와 결합할 수 있는 작용기가 많이 있을 것, 세째는 친수성의 특성을 가질 것, 네째는 용매, pH 및 온도변화에 안정하고 불용성이며 저

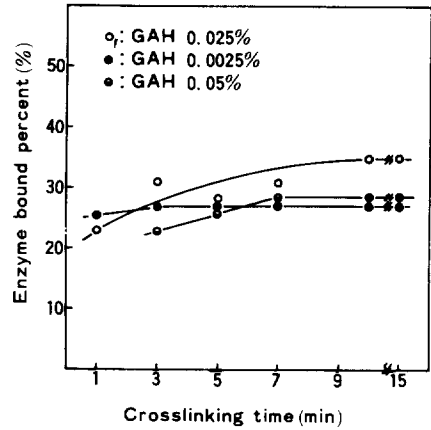


Fig. 5. Influence of glutaraldehyde (GAH) concentration and crosslinking time on enzyme immobilization at pH7, 25°C, measured by Lowry method.

장성이 좋을 것, 다섯째는 화학적, 기계적, 열적 안정성 및 세균에 대한 저항성이 있을 것, 여섯째는 담체의 강도가 크고 적절한 형태로 제조 가능할 것, 일곱째는 재사용이 가능하며 염가이어야 한다.

본 실험에서 사용한 chitosan은 구입이 용이하고 값이 저렴할 뿐만 아니라 아민, 히드록시기 등의 반응성기를 가지고 있어서 효소의 고정화가 가능하다. 또한 ionotropic gel을 형성할 때에는 강도가 크고 다공성인 지름 1.0-1.1mm의 beads를 얻을 수 있었다. Glutaraldehyde로써 가교시켰을 때는 용매, pH 및 온도에 안정하여 불용성이며 저장성이 좋은 장점을 지니고 있다. 담체로 사용한 chitosan beads에 효소를 고정하기 위한 가교제로써 가장 많이 사용되고 있는 glutaraldehyde는 효소고정화만이 아니라 표면의 가교로 낮은 pH에서의 beads의 계속적인 팽윤을 막아주는 역할을 하였다. 이때 chitosan과 효소의 아민기와 spacer arm이며 가교제로 사용한 glutaraldehyde 사이에서는 schiff base의 형성으로 효소가 chitosan에 고정되는데, 이때 가교제의 농도와 반응시간이 효소고정에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. Lowry방법²⁰으로 측정한 효소의 고정화도는 Fig. 5와 같다. 0.025%(v/v) glutaraldehyde 수용액

에서 10분간 처리하여 beads에 효소를 고정시켰을 때 고정화도가 35%로서 가장 좋았으며 나머지 경우도 20% 이상의 고정화도를 나타내었다. Glutaraldehyde의 농도가 크고 반응시간이 길어질 때는 겔표면에서의 심한 가교로 인해 beads가 파손되므로 glutaraldehyde 농도는 0.025%(v/v)일 때가 가장 좋았다.

고정화 효소의 반응최적 조건

최적 pH : 효소를 chitosan에 고정화시킬 경우 미시환경이라고 할 수 있는 pH변화에 따른 고정화 효소의 기질분해율을 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 순수효소의 최적 pH는 4.5인데 비하여 고정화효소의 최적 pH는 2-3.5로 산성쪽으로 약간 이동하여 높은 기질분해능을 나타내었다. 이것은 chitosan의 양이온 때문에 효소주위에 전하의 차이를 가져와 미시환경이 변하였기 때문이다.^{13,14,21} 그러나 pH2에서 장기간 사용할 때 낮은 pH에서 schiff base의 해리로 인한 효소의 탈리로말미암아 기질분해능이 급격히 저하되었다.

최적온도 : 효소 고정시의 최적온도를 알기위하여 순수효소와 고정화효소를 최적 pH인 4.5와 3.5에서 온도를 변화시키면서 활성율을 측정한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 순수효소는 최적온도가 70℃이며 고정화효소는 60℃임을 알았다.

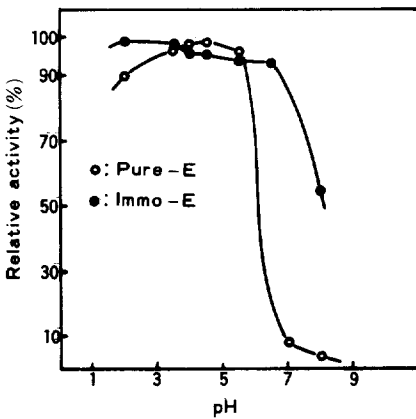


Fig. 6. Effect of pH on activity of pure and immobilized amyloglucosidase, using 1%(w/v) starch as substrate at 40℃.

효소의 반응 메카니즘 및 반응속도²²

일반적으로 효소의 총괄화학반응기구는 식(2)로 주어진다.



E : 효소 S : 기질

ES : 효소-기질복합체 P : 생성물

Michaelis와 Menten은 정상상태하에서의 효소의 반응속도를 식(3)으로 나타내었다.

$$V = V_{\max} \cdot [S] / (K_m + [S]) \quad (3)$$

V : 반응속도 $V_{\max}$: 최대속도

K_m : Michaelis constant [S] : 기질농도

순수효소와 고정화효소의 Michaelis constant인 $K_m = (k_2 + k_3) / k_1$ 과 $V_{\max}$ 를 결정하기 위해 식(3)을 역수로 취하면 식(4)를 얻을 수 있다.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (4)$$

식(4)에서 $\frac{1}{[S]} : \frac{1}{V}$ 의 선형그래프인 Lineweaver-Burk Plot를 Fig. 8에 나타내었다. 이 그래프로

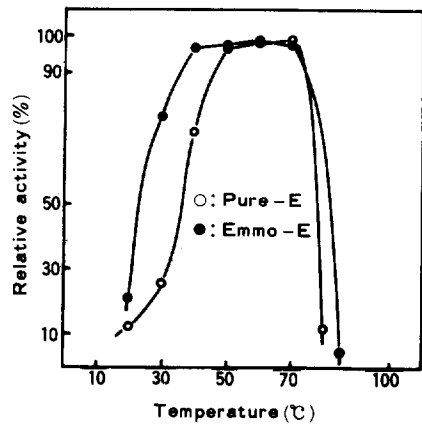


Fig. 7. Effect of temperature on activity of pure (at pH4.5) and immobilized (at pH3.5) amyloglucosidase, using 1%(w/v) starch as substrate.

부터 순수효소의 Michaelis constant(K_m)은 0.074 이고 고정화효소의 apparent Michaelis constant (K_m)은 0.079이었다. 두 경우 K_m 값의 차가 크지 않은 것으로 보아 고정화 효소의 기질분해능이 좋음을 알았다. 대개의 경우 효소가 고정화될 때 K_m 의 증가를 가져오는데 이는 기질과 담체의 전 하변화와 기질의 확산영향 및 효소의 3차 구조의 변화에 인하는 것으로 알려져 있다.¹³

반복사용성 검토

일반적으로 고정화된 효소는 순수효소와 비교할 때 활성은 저하되나 반응액으로부터 분리하여 다시 사용할 수 있다는 이점을 가지고 있다.

Chitosan beads에 효소를 고정화시켰을 때 형성되는 schiff base는 아주 낮은 pH의 수용액상태에서는 가역성을 나타내어 효소의 탈리를 가져올 수 있다고 한다.²³ 고정화효소의 최적 pH는 2-3.5 이었다.

Schiff base에 대한 pH의 영향을 검토하기 위하여 batch 반응기에서 실험한 결과 pH 2에서 반복실험을 했을 때 급격한 활성의 저하를 가져왔으나 pH 3.5에서는 4회 반복실험한 결과 약간의 활성저하가 있을 뿐이었으며 5회 이후에도 82%라는 높은 활성을 나타내는 것으로 보아 이 방법으로 제조한 고정화효소는 반복사용이 가능한 것

이 사려된다. pH 3.5에서 보인 약간의 활성저하는 beads 표면에 흡착되어 있던 효소의 탈리로 인한 현상이라 사려된다. 이를 확인하기 위해서 물리적인 흡착방법으로 효소를고정화하여 pH 3.5의 기질용액에서 같은 방법으로 반복사용성을 실험한 결과 효소의 탈리로 인한 급격한 활성저하를 가져왔다. 또한 beads가 팽윤됨으로 물리적 흡착법을 사용하여 amyloglucosidase를 chitosan에 고정화하는 것은 부적합함을 알았다. 이 결과를 Fig. 9에 나타내었다.

컬럼반응기에 의한 연속사용성 검토

고정화된 amyloglucosidase의 컬럼반응기 내에서의 활성변화를 측정하여 연속사용성을 검토하고 공업적 응용 가능성을 검토하였다.

고정화효소의 활성을 수용성 녹말의 유속과 농도 그리고 컬럼길이를 변화시키면서 측정한 결과를 Fig. 10, 11 및 12에 나타내었다. 유속 14ml/hr에서는 컬럼내에서의 반응시간과 주어진 농도에 관계없이 97% 이상의 높은 활성을 연속적으로 유지하였다. 특히 0.5%기질 농도에서는 10시간 이상 Fig. 10과 같이 높은 활성을 나타내는 것으로 보아 beads와 기질간에 형성되어지는 농도경계층의 영향은 크지 않음을 알 수 있었다.

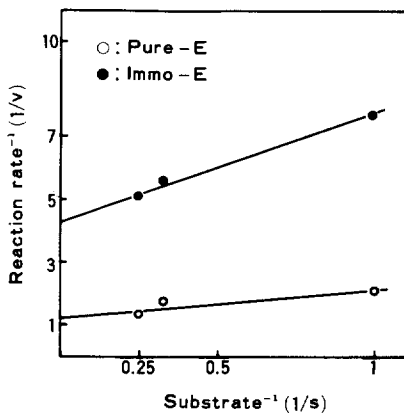


Fig. 8. Lineweaver-Burk plots for pure(at pH4.5) and immobilized amyloglucosidase(at pH3.5) assayed in a batch reactor at 25°C.

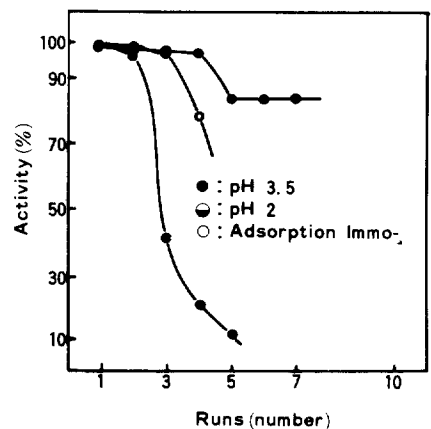


Fig. 9. Stability of covalent binding and adsorption immobilization, and influence of pH on Schiff base bond when repeated reaction with 1% starch solution at 40°C.

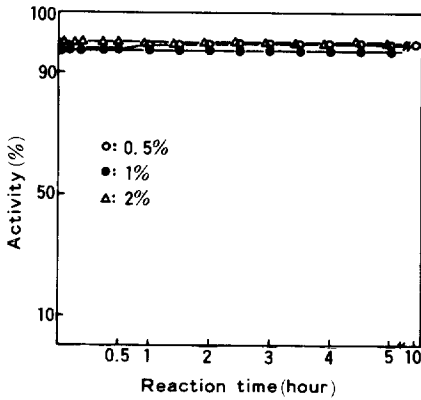


Fig. 10. Effect of starch concentration in column reactor of a constant flow rate (14 ml/hr) at 45°C, pH 3.5.

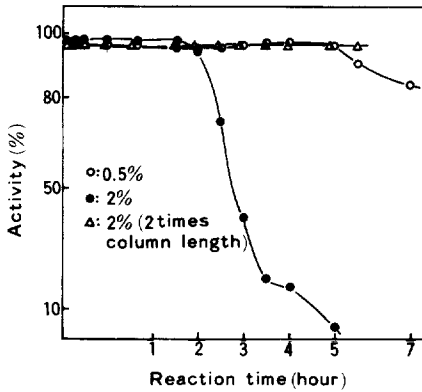


Fig. 11. Effect of starch concentration and column length in column reactor of a constant flow rate (35 ml/hr) at 45°C, pH 3.5.

유속이 35 및 53ml/hr에서는 Fig. 11 및 12와 같이 각각 2%와 1% 기질농도에서 시간이 경과 컬럼길이의 영향으로 기질과 효소간의 반응시간이 짧기때문이라 생각되어 컬럼길이를 두배로 하였다. 그 결과 Fig. 11 및 12와 같이 활성을 97% 이상으로 높일 수 있었다. 이상의 실험결과 컬럼 반응기의 취약점인 농도경계층의 영향보다는 유속과 컬럼길이의 영향으로 기질과 효소간의 반응시간이 짧기 때문이라 생각되어 컬럼길이의 영향이 큼을 알 수 있었다. 그러므로 본 연구에서 제조한 고정화효소는 좋은 활성을 나타내므로 컬럼

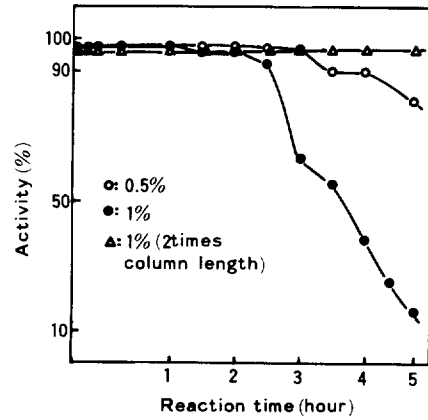


Fig. 12. Effect of starch concentration and column length in column reactor of a constant flow rate (53 ml/hr) at 45°C, pH 3.5.

반응기의 용량을 크게하여 반응시간을 늘리거나 membrane reactor를 사용하여반응물을 순수하게 분리한다면 더 좋은 결과를 기대할 수 있어 공업적으로도 이용가능하리라 사려되어진다.

결 론

Chitosan은 ionotropic gel을 형성할 때 담체가 갖추어야 할 여러 조건을 만족하였다. Amyloglucosidase를 chitosan beads에 공유결합으로 고정화시킨 효소의 반응최적 pH와 온도는 3.5 및 60°C였고 가교화제인 glutaraldehyde의 농도와 반응시간은 효소고정에 영향을 미쳤다. 0.025%(v/v) glutaraldehyde 농도로 10분간 반응시켰을 때의 효소고정화도가 35%로 제일 좋았으며 1개월간의 저장기간에도 안정한 활성을 갖는 고정화효소를 얻었다. 효소의 고정화는 beads의 morphology로부터 확인할 수 있었으며 수차례의 반복사용에도 82%의 높은 활성을 유지하여 반복사용이 가능함을 알았다. 순수효소 및 고정화효소의 michaelis constant(K_m) 값이 각각 0.074와 0.079로 고정화효소의 기질분해능이 우수함을 알 수 있었다. 연속반응실험에서 유속 14ml/hr를 제외하고는 유속과 농도가 증가함에 따라 활성은 감소하였으나

컬럼길이를 두배로 하여 기질과 효소간의 반응시간을 길게 함으로 활성을 높일 수 있었다.

본 실험에서는 컬럼반응기의 취약점인 beads와 기질간에 형성되는 농도경계층의 영향보다는 오히려 유속과 컬럼길이의 영향이 큼을 알았다.

참 고 문 헌

1. T. Tosa, T. Sato, and I. Chibata, *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 69(1973).
2. G. W. Standberg and K. L. Smiley, *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 509(1972).
3. W. L. Stanley and G. G. Watters, *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 315(1975).
4. T. Kasumi and M. Tsuji, *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1865(1977).
5. F. Bissett and D. Sternberg, *Appl. & Environ. Microb.*, **35**, 750(1978).
6. P. S. J. Cheethan and K. W. Blunt, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2155(1979).
7. H. Eikmeier and F. Westmeier, *Appl. Microb. Biotechnol.*, **19**, 53(1984).
8. K. D. Vorlop and J. Klein *Biotechnol. Lett.*, **3**, 9(1981).
9. R. A. A. Muzzarelli, "Chitin" p. 105, Pergamon Press (1977).
10. H. H. Weetall and A. A. Filbert, "Method in Enzymology", Vol. 44, p.59, Academic Press (1976).
11. D. A. Lappi and N. O. Kaplan, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **69**, 878(1976).
12. H. Fuwa, *J. Biochem.*, **41**, 5583(1954).
13. H. H. Weetall, *Anal. Chem.*, **46**, 602A(1974).
14. W. H. Scouten, "Solid Phase Biochemistry", p.350, John Wiley & Sons (1983).
15. J. M. S. Corbral and J. M. Novaus, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2083(1981).
16. O. V. Lomako and I. I. Menyailova, *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 89(1982).
17. J. Klein and M. Kluge, *Biotechnol. Lett.*, **3**, 65(1981).
18. W. H. Scouten, "Solid Phase Biochemistry", p.415, John Wiley & Sons (1983).
19. 이규현, 김계용, *폴리머* **8**, 159(1984).
20. T. G. Copper, "The Tools of Biochemistry", p.53, John Wiley & Sons(1977).
21. Atkinson, Mavituna, "Biochemical Engineering & Biotechnology Handbook", p.554, The Nature Press (1983).
22. *ibid.*, p.475(1983).
23. W. H. Scouten, "Solid Phase Biochemistry", p.297, John Wiley & Sons (1983).