

고분자에 지지된 천이금속촉매 (I) Chitosan-Cu(II) 및-Fe(III) 착체촉매에 의한 L-Ascorbic Acid의 산화

이 학 기* · 신 영 조**

* 경북대학교 공과대학 공업화학과

**부산대학교 공과대학 고분자공학과

(1984년 11월 29일 접수)

POLYMER-SUPPORTED TRANSITION METAL CATALYSIS (I) Oxidation of L-Ascorbic Acid by Using Chitosan-Cu(II) and -Fe(III) Complex Catalysts.

Hak-Ki Lee* and Young-Jo Shin**

* Dept. of Chemical Technology, Kyungpook National University, Dae-gu, Korea

** Dept. of Polymer Sci. and Engineering, Pusan National University, Pusan, Korea

(Received November 29, 1984)

Abstract: In the present study, polymer-supported metal complexes were synthesized by chelating chitosan with Cu(II) and Fe(III) ions and were investigated as catalysts for the oxidation of L-ascorbic acid. The results obtained from this study can be summarized as follows: 1) The chitosan-Cu(II) and -Fe(III) complex catalysts exhibited relatively high catalytic effect and good catalyst recovery when compared to the cases of free Cu (II) and Fe(III) ions in the oxidation of L-ascorbic acid and the kinetic behavior followed enzymatic kinetics of Michaelis-Menten type. 2) The chitosan-Cu(II) complex catalyst showed higher catalytic activity than the chitosan-Fe(III) system. 3) The catalytic reaction rate constants (k_{cat}) of this oxidation at 25°C were estimated to be 1.19 min⁻¹ and 0.10 min⁻¹ for the chitosan-Cu(II) and -Fe(III) catalyst systems, respectively. 4) The calculated parameters at 25°C obtained with the Arrhenius and Eyring rate expressions for the chitosan-Cu(II) and -Fe(III) catalytic systems were as follows: E_a , 4.32 and 5.28 Kcal/mole; ΔG^\ddagger , 7.34 and 18.81 Kcal/mole; ΔH^\ddagger , 3.73 and 4.69 Kcal/mole; ΔS^\ddagger , -0.046 and -0.047 cal/mole°C, respectively.

1. 서 론

구리(II) 및 철(III) 이온을 촉매로 하는 L-ascorbic acid의 산화에 대한 연구는 오래전부터 Klemper¹, Weissberger, Luvalle², Nord³ 및 Grinsted⁴ 등에 의해 연구되었다. 고분자 금속착물이 생체내 산화효소의 모델로서 주목되어 고분자 금속착물에 의한 L-ascorbic acid의 산화는 생체내에서의 L-ascorbic acid의 산화와 관련된 생리현상을 규명하고자 하는 중요한 과제의 하나이다. L-ascorbic acid는 수용체로서 산소에 의해 수소가 이동하여 dehydroascorbic acid로 산화할 뿐 아니라 그 산화생성물인 dehydroascorbic acid의 확인이 비교적 용이하므로 새로운 촉매를 합성하여 이 촉매의 촉매능의 유무 및 촉매활성을 측정하는 한 수단으로서 L-ascorbic acid가 반응기질로서 많이 쓰여지고 있다. 고분자 금속착물촉매로서 부분 4 급화된 Polyvinylpyridine-구리착물⁵ Poly-β-diketone-구리착물⁶ 및 Poly-β-ketoester-구리착물 등이 합성되어 이들의 촉매작용이 L-ascorbic acid를 반응기질로 하여 연구되었다.

고분자 금속착물촉매에 의한 산화반응은 반응기질의 전자적 구조 및 입체적 구조의 차이, 중심금속, 배위자의 종류, 용매, pH등이 각각의 소반응에 영향을 미쳐 촉매작용을 지배하게 된다.

특히 고분자 배위자의 성질은 촉매작용에 민감하게 반영되어 고분자 배위자로서의 효과가 현저하게 나타난다.

Pecht⁷ 등은 Poly-L-histidine-구리 착물촉매에 의한 L-ascorbic acid, homogentisic acid 및 p-hydroquinone의 산화반응에 대한 연구에서 고분자 착물촉매가 활성이 높은 이유를 반응기질과 고분자 배위자의 정전기적 효과로서 설명하고 있다. 중성 혹은 음으로 하전된 p-hydroquinone, homogentisic acid, ascorbic acid의 산화에 대하여 Poly-L-histidine-Cu²⁺ 착물촉매의 촉매활성은 pH 4~6에서 Cu(II) 이온보다 활성이 크고 양으로 하전된 N,N,N',N' -

tetramethyl-p-phenylenediamine과 1-(2,5-dihydroxyphenyl)-1-methylamine에 대해서는 Cu(II) 이온보다 활성이 떨어짐을 알았다. 또한 음하전을 가진 반응기질에 대하여 과염소산소-다와 같은 중성염을 가하면 반응이 저지되고 반대로 중성 혹은 양전하를 가진 반응기질에 대해서는 반응이 가속된다고 발표되었다.

chitosan금속착물은 다수의 금속이온을 함유하는 고분자전해질 폴리양이온으로 고분자 골격에 이온기가 도입되어 있으며 전체로 매우 큰 양하전을 띠게 된다. 따라서 반응기질이 이온성 분자일 것 같으면 촉매반응은 폴리양이온과 저분자 이온간의 반응으로서 취급할 수 있다. 이온-이온간의 반응에서는 정전기적 작용의 영향이 크고 특히 입체장애를 수반하는 고분자 금속착물의 경우 멀리 떨어져 있는 정전기적 상호작용의 영향이 크다. 즉 반응기질이 아스콜빈음이온(HA⁻)과 같이 음이온이면 촉매 폴리양이온의 domain중에 농축되어 촉매반응의 빈도인자가 증가됨으로 반응은 가속된다. 반응기질이 양이온성 기질일때는 그 반대의 현상이 일어난다. 이 폴리양이온에 의한 반응기질의 결합력은 다른 관점에서 볼것 같으면 반응에 앞서서 촉매와 반응기질간에 착음이 형성됨을 의미하며 이러한 형태의 반응에는 Michaelis-Menten^{8,9}의 속도론이 성립한다.

이러한 배경하에서 본 연구는 오징어 뼈로부터 chitin을 얻고 chitin을 탈아세틸화하여 chitosan을 만들고 이chitosan을 배위자로서하여 chitosan-구리(II) 및 chitosan-철(III) 고분자 금속착물을 합성하였다.

이 새로운 고분자 금속착물의 촉매능과 촉매활성을 연구하기 위하여 chitosan 금속착체를 촉매로 하여 L-ascorbic acid를 산화시킬때 반응속도론적 연구를 목적으로 하였다.

2. 실험

2-1. 시약 및 기기

chitosan은 오징어 뼈로부터 Hackman의 방

고분자에 지지된 천이금속착매 (I) Chitosan-Cu(II) 및 -Fe(III) 착체 촉매에 의한 L-Ascorbic Acid의 산화

법으로 제조한 chitin을 가성소-다로 탈아세틸화하여 사용했다. L-ascorbic acid는 Hayashi Pure Chemicals의 특급시약을 사용했고 CuSO₄·5H₂O는 Mellinchedt제의 특급 시약을

Bath와 Kamatsu-Electronics제의 Coolic Circulator CTE-220을 사용하였다.

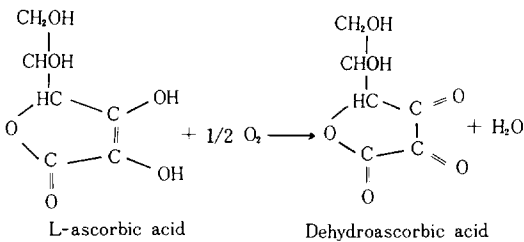
2-2. Chitin 및 Chitosan의 제조

chitin 및 chitosan의 제조는 Kimura에 의거하여

rohydrin으로 가교 결합시켜 산과 알칼리에 안정한 착물을 만들고 이를 여과 수세하여 70°C에서 감압건조시켜 150mesh로 분쇄하여 촉매로 사용하였다. 이 고분자 금속착물중의 금속함량은 일정량의 착물촉매를 450±10°C에서 5시간 가열하여 생성되는 금속산화물을 평량하여 중량분석법을 통하여 금속함량을 정량 분석했다. 이 결과는 AA에 의한 금속의 분석과 X선 형광분석법에 의한 분석 결과와 일치하였다. chitosan의 금속이온과의 착물형성시에 착물의 안정도상수를 알기 위하여 구리이온 존재하에서 chitosan의 전위차적정 곡선을 그렸는데 그 결과는 Fig. 2의 b, c와 같다.

2-4. L-Ascorbic acid의 산화

L-Ascorbic acid의 분자상 산소에 의한 산화반응식은 다음과 같이 쓸 수 있다.



항온조속이 장치된 4 구플라스크에 교반기 pH메타전극, 온도계 및 끝이 다공질로 되어 있는 산소유도관을 장치한다. 0.1M-ascorbic acid 50ml를 넣고 1N-가성소-다로 소정의 pH값에 맞춘다. 교반기로 맹렬히 교반하면서 산소를 100ml/min의 속도로 도입하고 촉매를 가하여 L-ascorbic acid를 산화시킨다. 일정한 시간 간격으로 1ml의 반응용액을 채취하여 반응생성물의 분석에 사용한다. 반응용액의 pH를 일정히 유지하기 위하여 1N-NaOH용액을 적하하며 조절한다.

2-5. Dehydroascorbic acid의 분석

반응속도론적 고찰을 위하여 일정한 시간 간격으로 채취한 반응생성물은 Roe¹²의 방법으로 다음과 같이 dehydroascorbic acid를 정량하였다. 1ml의 반응용액을 25ml mess flask에 들어있는 5ml의 2,4-dinitrophenylhydrazine-

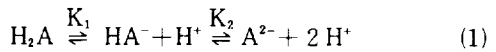
thiourea속에 넣어 흔들면 고농도의 thiourea와 낮은 pH때문에 산화반응은 정지한다. 낮은 pH용액중에서 dehydro-1-ascorbic acid는 자동가수분해되어 diketo-1-gluonic-acid가 되고 이것은 2,4-dinitrophenylhydrazine과 반응하여 bis(2,4-dinitrophenyl hydrazone)이 된다. 반응은 37°C에서 3시간 이내에 완결된다. 생성된 적갈색의 2,4-dinitrophenyl hydrazone을 여별하여 85%-H₂SO₄에 용해시켜 냉각시킨다.

이 용액은 적갈색을 띠는 매우 안정한 용액으로서 최대흡수파장이 500~550mμ와 300~380mμ이다. 525mμ에서 광전비색법에 의해 dehydroascorbic acid를 정량하고 이를 표준검량선에 의해 보정하였다. 이 방법에 의해 dehydroascorbic acid를 분석한 결과는 매우 신뢰도가 크며(1%이내) 반응생성물에 공존하는 금속이온의 영향을 받지 않는다.

3. 결과 및 고찰

3-1. L-Ascorbic acid의 해리

L-ascorbic acid, (H₂A)는 수용액중에서 다음과 같이 해리한다.



L-ascorbic acid의 산화에 주로 관여하는 것은 ascorbic monoanion, (HA⁻)이다. Tagui¹³ 등에 의하면 H₂A가 산화될 때의 속도상수를 k₁, HA⁻가 산화될때의 속도상수를 k₂ 라면 25°C에서 k₂/k₁이 약 800임을 보고하였다.

pH적정으로부터 계산된 L-ascorbic acid의 해리상수, K₁ 및 K₂의 값은 Table 1과 같고 이 값이 계산에 사용되었다¹³.

Table 1. Dissociation Constants of L-Ascorbic Acid

Temp. (°C)	K ₁ × 10 ⁵	K ₂ × 10 ¹²
25	9.16	4.75
15	5.82	--
5	3.55	--

μ = 0.10M KNO₃

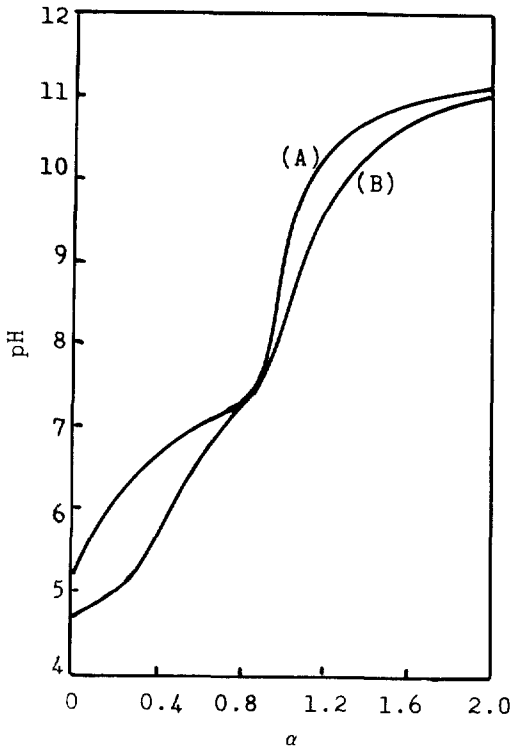


Fig. 3. The titration curves at 25°C for the chitosan, (A) and chitosan-Cu(II), (B) systems. [Chitosan] = 2×10^{-3} mole/liter; [Cu(II)] = 2×10^{-4} mole/liter; $\mu=1.0$ M (NaCl).

3-2. Chitosan-Cu(II) 착체의 생성

chitosan의 전위차적정 곡선은 Fig. 2의 a와 같고 구리(II)이온 존재하에서의 전위차적정 곡선은 Fig. 2의 b, c와 같다. 이 적정곡선에서 chitosan-Cu(II) 착물은 pH 5 부근에서 생성됨을 알 수 있다. Takemoto¹⁴ 등은 chitosan-Cu(II) 계의 전위차적정 곡선을 그렸는데 그 결과는 Fig. 3과 같고 변형된 Bjerrum plot는 Fig. 4와 같다. 이로부터 Cu^{2+} 이온에 대하여 배위수 $\bar{n}=3$ 인 것을 알 수 있다. 이들은 또한 Henderson-Hasselbalch의 약산 해리에 관한 식

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad (2)$$

를 이용하여 chitosan 계에 Henderson-Hasselbalch plot를 한 결과는 Fig. 5와 같다¹³. 이

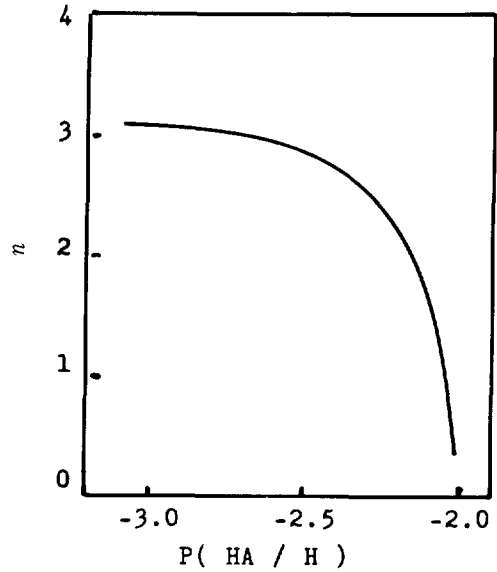


Fig. 4. Modified Bjerrum plot for the chitosan-Cu(II) system.

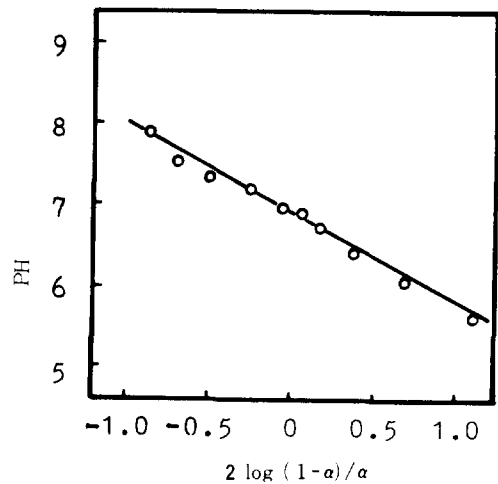
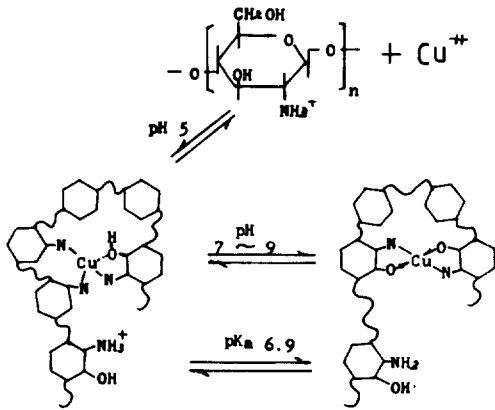


Fig. 5. The Henderson-Hasselbalch plot for chitosan-system.

결과로부터 얻어진 chitosan계의 25°C에서의 pKa는 약 6.9이다.

이상의 결과로부터 chitosan-Cu(II)의 생성은 다음과 같이 생각할 수 있다.

따라서 구리(II)은 3개의 glucosamine 단위와 배위되고 있으며 착물생성시 구리(II)이온이 부족할수록 유리된 NH_3^+ 가 많이 남아있게 될



것이다. 이 남아있는 NH_3^+ 가 L-ascorbic acid가 해리하여 생성된 monoionic ascorbate HA^- 이온을 촉매 금속쪽으로 끌어당겨 부분적으로 농도를 크게 하여 산화속도를 증가시키는 한 원인으로 생각된다. 이것이 사실이라면 반응기질 속 해리도가 큰 중성염이 존재하면 산화속도가 떨어질 것을 예상하여 여러가지 농도의 중성염 (KNO_3)을 가한 결과 산화속도는 중성염의 첨가에 따라 감소함을 알 수 있었다.

3-3. Chitosan-Cu(II) 및 chitosan-Fe(III) 촉매에 의한 L-ascorbic acid의 산화

Chitosan-Cu(II) 및 Chitosan-Fe(III) 촉매를 촉매로 하여 L-ascorbic acid를 산화시킬때도 금속 구리(II) 및 철(III) 이온을 촉매로 하여 L-ascorbic acid를 산화할 때와 마찬가지로 반응기질의 수소이온 농도와 산소분압의 영향을 받으므로 pH5에서 과잉산소 존재하에 산화반응을 시켰다. 다른 고분자금속착물촉매의 경우와 마찬가지로 chitosan-Cu(II) 및 chitosan-Fe(III) 촉매를 사용한 L-ascorbic acid의 산화는 Michaelis-Menten의 동력학적 거동에 잘 따랐고, 또한 반응기질의 농도에 따른 반응속도를 구한 결과는 chitosan-Cu(II)에 대하여 Table 2 및 Fig. 6에 chitosan-Fe(III)에 대하여 Table 3 및 Fig. 7에 나타낸 바와 같다.

3-4. 반응속도 parameter

일정한 촉매농도 (0.001mol/l)의 반응계에 있어서 반응기질의 처음농도 $[S]$ 를 여러가지로 바

Table 2. Rate of Oxidation Reaction of L-Ascorbic Acid at Various Temperature by Chitosan-Cu(II) Catalyst

$[\text{HA}^-] \times 10^4$ (mole/l.)	5°C		15°C		25°C	
	$v \times 10^4$ (mole/l. min.)	$(\text{HA}^-) \times 10^4$ (mole/l.)	$v \times 10^4$ (mole/l. min.)	$(\text{HA}^-) \times 10^4$ (mole/l.)	$v \times 10^4$ (mole/l. min.)	$(\text{HA}^-) \times 10^4$ (mole/l.)
1	2.53	1	3.60	1	4.75	1
2	3.85	2	5.40	2	7.10	2
3	4.65	3	6.50	3	8.35	3
4	5.19	4	7.20	4	9.10	4
5	5.56	5	7.60	5	9.60	5
6	5.70	6	7.91	6	9.90	6
7	5.88	7	8.13	7	10.10	7
8	5.95	8	8.25	8	10.30	8
9	6.05	9	8.32	9	10.45	9
10	6.15	10	8.40	10	10.60	10

Catalyst; chitosan-Cu(II) 0.001mole/liter.

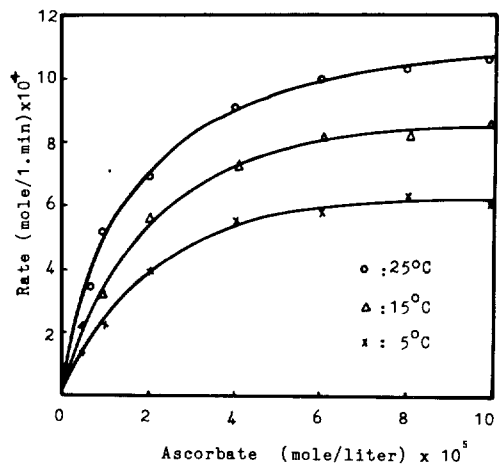


Fig. 6. Rate of oxidation as a function of ascorbate concentration. pH=5.0 chitosan-Cu(II)=0.001mole/l.

꾸면서 초속도를 측정하여 식(4)에 따라 Michaelis-Menten의 정수 K_m 및 최대속도 V_{max} 를 구할 수 있으나 보통은 식(4)를 변형한 식(5)을 사용하여 $1/v$ 과 $1/[S]$ 를 plot하여 직선을 얻을 수 있다.

$$v = V_{max} / (1 + K_m/[S]) \tag{4}$$

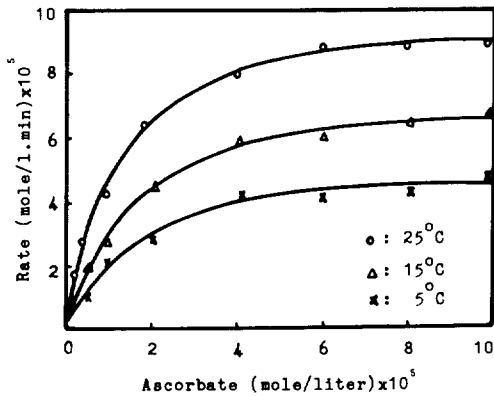


Fig. 7. Rate of oxidation as a function of ascorbate concentration. pH=5.0 Chitosan-Fe(III)=0.001 mole/l.

Table 3. Rate of Oxidation Reaction of L-Ascorbic Acid at Various Temperature by Chitosan-Fe(III) Catalyst

5 °C		15 °C		25 °C	
(HA ⁻) × 10 ³ (mole/l.)	v × 10 ⁴ (mole/l. min.)	(HA ⁻) × 10 ³ (mole/l.)	v × 10 ⁴ (mole/l. min.)	(HA ⁻) × 10 ³ (mole/l.)	v × 10 ⁴ (mole/l. min.)
1	2.10	1	3.18	1	4.52
2	3.15	2	4.52	2	6.53
3	3.70	3	5.13	3	7.61
4	4.00	4	5.59	4	8.16
5	4.10	5	5.88	5	8.42
6	4.20	6	6.06	6	8.65
7	4.30	7	6.20	7	8.83
8	4.35	8	6.40	8	8.90
9	4.50	9	6.48	9	9.03
10	4.60	10	6.55	10	9.12

Catalyst; chitosan-Fe(III) 0.001 mole/liter.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

이 직선의 기울기와 절편으로부터 V_{max} 와 K_m 을 얻을 수 있는 Lineweaver-Burk plot¹⁴와 식(4)로부터

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{[S]}{V_{max}} \quad (6)$$

의 관계식을 얻고 $[S]/v$ 와 $[S]$ 를 plot하여 기울기와 절편으로부터 각각 V_{max} 와 K_m 을 구하는

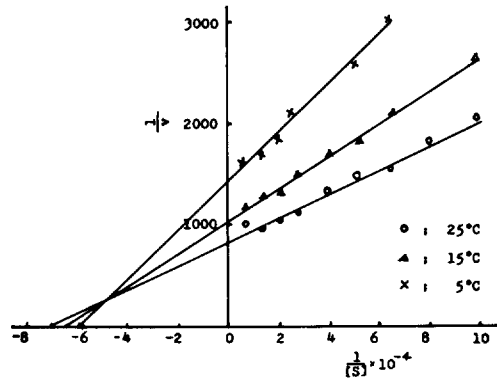


Fig. 8. The Lineweaver-Burk plot for the oxidation of L-ascorbic acid by using chitosan-Cu(II) as catalyst at various temperature. catalyst conc. = 0.001mole/liter.

Hofstee¹⁶의 방법이 있는데 이 두 방법은 각기 나름대로 이점을 가지고 있으므로 이들을 이용하여 속도 parameter의 값 V_{max} 와 K_m 을 구하고 두 방법으로 구한 값의 평균값을 V_{max} 및 K_m 값으로 하여 이 값들로부터 여러가지 동력학적인 parameter를 구하려고 한다. Table 2와 Fig. 6을 근거로 하여 chitosan - Cu(II)계의 Lineweaver-Burk plot를 하면 Fig. 8과 같다. 이를 정리하여 얻은 결과는 Table 4와 같다.

Chitosan-Fe(III) 착물을 촉매로하여 L-ascorbic acid를 산화할때 Lineweaver - Burk plot부터 얻어진 결과는 Table 5와 같다.

3-5. 열역학적 Parameter

Chitosan-Cu(II) 및 Chitosan-Fe(III) 착물 촉매를 사용하여 L-ascorbic acid를 산화할때 여러가지 온도에 있어서 반응속도상수, k_{cat} 는 Table 4 및 Table 5와 같다. 반응속도상수의 온도 의존성을 알기 위해 Arrhenius plot를 한 결과는 Fig. 9와 같다. 이상의 결과로부터 얻어진 열역학적 parameter를 Table 6에 종합하였다.

Table 6의 결과 L-ascorbic acid의 산화에 있어서 Chitosan-Cu(II) 착물촉매는 Chitosan-Fe(III) 착물촉매에 비하여 촉매활성이 큰 것을 알 수 있다.

Table 4. The Summarized Data from the Lineweaver-Burk Plot for the Chitosan-Cu(II) System

Temp. (°C)	$V_{max} \times 10^4$ (mole/l. min)	$K_m \times 10^5$ (mole/l.)	k_{cat} (min. ⁻¹)
5	7.02	1.69	0.72
15	9.75	1.53	0.98
25	12.12	1.36	0.20

Catalyst conc. = 0.001 M Chitosan-Cu(II)

Table 5. The Summarized Data from the Lineweaver-Burk Plot for the Chitosan-Fe(III) System

Temp. (°C)	$V_{max} \times 10^5$ (mole/l. min.)	$K_m \times 10^5$ (mole/l.)	k_{cat} (min. ⁻¹)
5	5.41	1.38	0.05
15	7.41	1.28	0.07
25	10.03	1.17	0.10

Catalyst conc. = 0.001 M Chitosan-Fe(III).

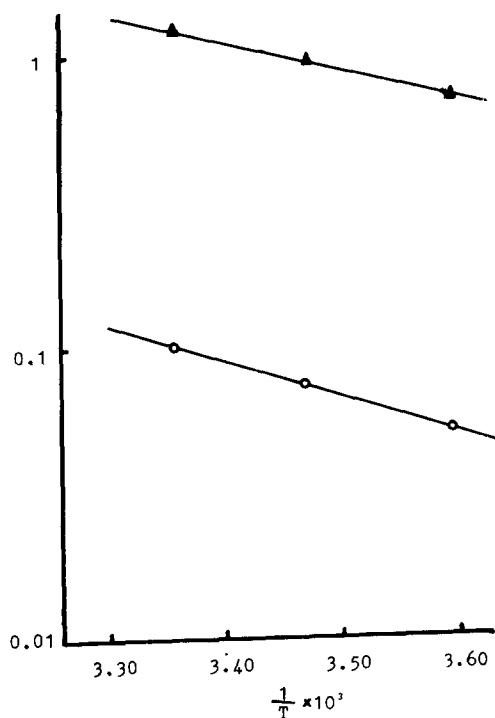


Fig. 9. The Arrhenius plot for the oxidation of L-ascorbic acid by using chitosan-Cu(II) (▲) and chitosan-Fe(III) (○) as catalyst.

Table 6. The Summarized Thermodynamic Data at 25°C from the Oxidation of L-Ascorbic Acid by using Chitosan-Cu(II) and Chitosan-Fe(III) as Catalysts.

Catalyst	k_{cat} (min. ⁻¹)	E_a (Kcal/mol)	ΔG^\ddagger (Kcal/mol)	ΔH^\ddagger (Kcal/mol)	ΔS^\ddagger (cal/mol°C)
Chitosan-Cu(II)	1.209	4.320	17.335	3.728	-0.0457
Chitosan-Fe(III)	0.1007	5.277	18.807	4.685	-0.0474

4. 결 론

자원적으로 대단히 풍부하고 그 용도가 아직 미개척분야에 있는 천연다당류 고분자 전해질인 chitosan을 배위자로 하여 구리(II) 및 철(III)을 결합시킨 Chitosan-Cu(II) 및 Chitosan-Fe(III)의 고분자 금속착물을 촉매로 하여 L-ascorbic acid를 산화시켰다. Chitosan-Cu(II) 및 Fe(III) 착물촉매는 금속인 Cu(II) 및 Fe(III) 이온 촉매에 비하여 L-ascorbic acid를 산화시키는 데 훌륭한 촉매활성을 나타내고 반응생성물로부터 촉매의 분리가 매우 용이하다. Chitosan-Cu(II) 및 Fe(III) 착물 촉매가 우수한 촉매효과를 나타내는 이유는 Chitosan-Cu(II) 및 Fe(III) 착물촉매중의 Cu(II) 및 Fe(III)가 금속으로서 촉매활성을 나타낼 뿐 아니라 chitosan중 배위되지 않은 R-NH₂가 정전기적 인력으로 1가 이온의 ascorbic acid, HA⁻를 끌어들이어 촉매활성점인 금속주위에 HA⁻이온의 농도를 높여줌으로써 촉매활성점과의 충돌이 빈번해질 뿐 아니라 고분자 배위자인 Chitosan이 L-ascorbic acid를 산화시키기 적합한 반응장을 제공하기 때문이라 생각된다.

Chitosan-Cu(II) 및 Fe(III) 착물촉매를 사용하여 L-ascorbic acid를 산화시킨 반응속도론적으로 다른 고분자 금속착물과 마찬가지로 전형적인 Michaelis-Menten형의 농도학 현상을 나타내었다. 연구를 통하여 얻어진 결과는 다음과 같다.

- i) Chitosan-Cu(II) 및 Fe(III) 착물촉매는 Cu(II) 이온 및 Fe(III) 이온 촉매보다 훌륭한 촉매효과를 나타내었고 산화속도는 전형적인 Michaelis-Menten의 동력학 거동에 따랐다.
- ii) Chitosan-Cu(II) 착물촉매는 Chitosan-Fe(III) 착물촉매보다 촉매활성이 컸다.
- iii) 25°C에서 속도상수 k_{cat} 는 Chitsoan-Cu(II)와 Chitosan-Fe(III)에서 각기 1.198min^{-1} 과 0.101min^{-1} 이었다.
- iv) 25°C에서 열역학 Parameter는 Chitsoan-Cu(II)와 Chitosan-Fe(III)의 E_a 가 각각 4.320Kcal/mol 및 5.277Kcal/mol 이고 ΔH^* 는 3.728Kcal/mol 및 4.685Kcal/mol , ΔS^* 는 $-0.0457\text{cal/deg.mol}$ 및 $-0.0474\text{cal/deg.mol}$, ΔG^* 는 17.335Kcal/mol 및 18.807Kcal/mol 이었다.

REFERENCES

1. E. S. G. Barron, R. De Meic, and F. W. Klemper, *J. Biol. Chem.* **112**, 625 (1936).
2. A. Weissberger and J. E. Luvalle, *ibid.*, **66**, 700(1944).
3. N. Nord, *Acta Chem. Scand.*, **9**, 442(1955)
4. R. Grinsted, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3464 (1956).
5. N. A. Vengerova, Y. E. Kirsh, and V. A. Kabanov, *Vysokomol. Soed.*, **A13**, 2509 (1971).
6. Y. Nose, M. Hatano, and S. Kambara, *Makromol. Chem.*, **98**, 136(1966).
7. I. Pecht, A. Levitski, and M. Anbar, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 1589(1967).
8. Michaelis L. and M. L. Menten, *Biochem. Z.*, **49**, 333(1913).
9. S. Ainsworth "Steady-State Enzyme Kinetics" p43(1977), Unwin Brothers Ltd.
10. Hak-Ki Lee, Y. J. Shin, *Polymer(Korea)*, **8**, 2, 114(1984).
11. R. H. Hackman, *Austr. J. Biol. Sci.*, **7**, 168(1954).
12. J. H. Roe "Methods of Biochemical Analysis" Vol. 1, Interscience Pub. Inc. N. Y. pp115-139.
13. M. M. Tagui Kahn and A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4176(1967).
14. Y. Inaki, M. Otsuru, K. Takemoto, *J. Macromol. Scie-Chem.*, **A12**,(7) pp953-970 (1978).
15. H. Lineweaver and D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658(1934),
16. B. H. Hofstee, *Science*, **116**, 688(1952).