

바이오센서용 CTA와 PCL 혼합막에의 효소고정화 기법의 개발

홍 성 현 · *김 태 진 · **정 용 섭 · 김 승 옥 · †윤 정 원
수원대학교 유전공학과, *수원대학교 화학공학과, **전북대학교 식품공학과

Study of Enzyme Immobilization on Composite of CTA and PCL Membrane for Biosensor

Sung-Hyun Hong, Tai-Jin Kim*, Yong-Seob Jeong**,
Seung-Wook Kim and Jeong-Weon Yoon†

Department of Genetic Engineering, Suwon University, Suwon P. O. Box 77, Suwon 440-160, Korea

*Department of Chemical Engineering, Suwon University, Suwon 440-160, Korea

**Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

ABSTRACT

The disposable glucose biosensor using composite of CTA and PCL membrane was developed for measurement of glucose. The most effective membrane was composed of CTA/PCL(80/20, w/w) and glutaraldehyde one-step immobilization method (10 μ m thickness) for glucose sensor gave the best result among various methods, considering oxygen permeability and electronic sensitivity. A scanning electron micrograph of the cross-section of a typical asymmetric CTA/PCL composite membrane showed that the membrane fused with a dense layer covered with a GOD-glutaraldehyde. Glucose oxidase immobilized on the membrane showed the linearity between difference of absolute amperometric values and glucose concentrations within 7mM when the GOD immobilized electrode was used. About 35% of activity was remained after 8 days when the tyrosinase was immobilized on CTA/PCL (80/20) membrane.

서 론

효소를 이용한 바이오센서로 효소센서는 효소의 기질특이성, 작용특이성 및 저농도 반응특이성 등의 특징 등을 이용하여 고도의 정확성을 요구하는 센서로서 적합하다(1). 특히 기질 및 작용특이성은 여러 가지 측정대상물질이 혼합되어 있는 시료에서도 동시에 각각의 측정대상물질의 농도를 정량화할 수 있으므로 효소센서는 매우 유용한 측정방법이다(2).

효소센서의 개념은 Clark와 Lyon(3)에 의해 제

시되었고 Updike와 Hicks(4)는 *Aspergillus niger*에서 추출한 glucose oxidase를 entrapment방법으로 고정화하여 산소전극에 고정화 층을 입혀 효소센서를 제조하였다. Williams 등(5)은 glucose oxidase를 platinum 전극위에 투석막과 함께 입혀 산소대신 quinone을 이용하여 quinone의 electrode oxidation으로 glucose농도를 결정하였다. 그 후로 효소적 분석방법이 여러 가지로 발전되어 왔으나(6-8), 효소의 안정성, 효소의 고정화방법 및 고정화 지지체 등의 기술적인 문제로 실용화에는 제한적이었다

† Corresponding Author

(9). 현재, 바이오센서는 일반적으로 의학이나 생물 공정분야, 식품분야, 임상분야에서 널리 연구개발 및 이용되고 있다(10-14). 한편, tyrosinase는 방향족 화합물(monophenol, *o*-diphenol)등의 hydroxylation반응을 수행하는데, phenol을 catechol로 변환시키는 cresolase와 catechol을 dopachrome으로 산화시킨다. 다시말하면 phenol을 catechol로 변환시키고, catechol을 dopachrome으로 변환시키는 catecholase의 두 가지 촉매활성을 갖고 있다.

Tyrosinase의 산업적인 응용을 보면 폐수처리 공정에서 주로 나타나는 phenol류의 농도분석, 파킨슨 씨병 치료제 생산, 식품, 의약 등의 갈변현상의 지표, 공해물질의 산화능력에 의한 공해방지 등 다양하다. 또한 tyrosinase를 담체에 고정화하여 다방면에 응용이 되고 있다(15, 16). 그러나, tyrosinase는 고농도로 존재할 경우(1mg/ml)에는 매우 안정하지만 낮은 농도의 효소용액내에서는 15~20분만에 효소활성이 크게 저하되는 성질이 있으며 자신의 반응생성물인 dopachrome에 의해 효소가 친핵성 공격을 받아 conformation의 변형이 일어나 활성이 급격하게 저하된다.

본 연구에서는 cellulose triacetate에 polycaprolactone를 혼합하여 산소투과도를 조절한 혼합막이 바이오센서용 효소고정화 막으로의 기능을 검토하여 최적의 고정화막 개발을 시도하고 이 혼합막에 적합한 glucose oxidase 및 tyrosinase의 활성을 최대한으로 유지시키기 위한 고정화 방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

Glucose oxidase (GOD, E.C. 1.1.3.4)는 *Aspergillus niger*로부터 얻은 Sigma 제품을 0.05M sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 2,000unit/ml로 녹여 사용하였고, 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI)은 Sigma 제품을 사용하였다. cellulose triacetate (CTA)와 polycaprolactone(PCL) 그리고 glutaraldehyde는 Aldrich 제품을, ethylenediamine은 Junsei 제품을 사용하였고 산소전극은 김(27) 실험실에서 제작된 inner cathode type을 이용하였다. Tyrosinase (Polyphenol oxidase, E C 1.14.18.1)는 mushroom에서 얻은 Sigma 제품을 사용하였다.

효소의 고정화

Cellulose triacetate와 polycaprolactone의 산소투과성 혼합막을 $3 \times 3\text{cm}$ 로 자른 후 증류수에 30분 동안 담가서 충분히 swelling시키고 1M sodium hydroxide 용액에서 5시간 동안 상온에서 반응시켜 표면을 수산화 시킨 다음 증류수로 세척하여 공기 중에서 건조 시킨다. 차가운 증류수에 과량의 CDI를 첨가한 용액에 담가 15분간 혼합막을 활성화시킨다. 그리고 차가운 증류수로 세척한 후 glucose oxidase 용액을 1cm²에 3.3unit (2,000unit/ml)이 되도록 처리하여 4℃에서 12시간 동안 효소고정화를 시킨 다음 0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.2)로 세척하여 고정화되지 않은 효소나 CDI를 제거한다. 그리고 0.05M의 sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 담가 4℃에 보관하면서 실험하였다(17-19).

위의 방법의 변형방법으로 CDI로 활성화된 막을 12.5% ethylenediamine이 녹아 있는 0.1M sodium carbonate buffer (pH 10)에 담가 상온에서 3시간 반응하여 아민화시켰다. 그 후 증류수로 세척하여 공기중에서 건조한다.

One-step glutaraldehyde 방법으로는 2.5% glutaraldehyde와 glucose oxidase용액을 1:2(v/v) 비율로 섞어 효소고정화층의 건조전 두께가 10 μm 와 20 μm 가 되도록 막의 양쪽에 tape로 고정화한 후 유리막대로 밀어서 처리하고 1cm²의 막에 각각 GOD를 3.3unit와 6.7unit가 되도록 CTA/PCL의 혼합막에 처리하여 4℃에서 12시간 동안 냉장건조하여 고정화시켰다.

Two-step glutaraldehyde 방법으로는 2.5% glutaraldehyde용액을 1cm²에 1 $\mu\ell$ 를 처리하여 5분간 반응시키고 증류수로 세척한 후 glucose oxidase용액을 1cm²에 3.4unit이 되도록 처리하여 12시간 동안 4℃에서 고정화를 시켰다(20, 21).

12시간 동안의 고정화반응이 끝난 후 0.05M의 Tris-HCl buffer (pH 7.2)로 세척하여 고정화되지 않은 효소나 과량의 glutaraldehyde를 제거하고 0.05M sodium phosphate buffer (pH 6.0) 용액에 담가서 4℃에서 보관하면서 실험하였다.

한편, cellulose triacetate membrane을 1M NaOH으로 수산화시킨 후 CDI로 활성시킨 다음에 tyrosinase (3,900 units/ml) 40units를 도포하여 고정화시켰다. 이때, 수산화기의 치환시간, tyrosinase의 농도 및 효소고정화 반응시간 등을 가감하여 고정화를 최적화시켰다.

효소센서의 제조

김(27)이 자체 제작한 효소센서를 이용하여 CTA와 PCL의 산소투과성 혼합막의 표면에 GOD가 고정화된 막을 dialysis membrane (M. W. C. O. 12,000, Sigma Chem. Co.)으로 덮어 실험실에서 제작된 inner type dissolved oxygen probe에 고정하였다. 효소전극을 Potentiostat Model P-100(JI SANG ELECTRONIC Co.)에 연결하여 용존산소의 소비량에 따른 변화를 전류의 변화로 1초간격으로 연결된 컴퓨터로 측정하였다. Cell의 온도를 일정하게 유지하기 위해 circulating system(LAUDA U.S.A.)를 이용하여 $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 를 유지하였고, cell내의 용존산소를 일정하게 유지하기 위해 air bubbling kit를 사용하였다. 또 cell내의 magnetic stirrer의 회전속도를 일정하게 하여 기질과 효소센서의 반응이 용이하도록 유지하였다(22, 23).

고정화 효소의 활성 측정

GOD 고정화효소의 활성을 측정하기 위해 고정화된 CTA와 PCL의 혼합막을 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 의 크기가 되도록 절단하여 1M glucose solution 0.1ml, 0.1M guaiacol 0.05ml, peroxidase (60unit/ml) 0.05ml의 효소반응용액에 넣고 0.05M sodium phosphate buffer(pH 6.0)를 가하여 최종부피가 1ml이 되도록 만들어 10분간 30°C 로 반응시킨 후 ice-bath에 담가서 반응을 정지시켰다. 흡광도는 HITACHI UV-VIS spectrophotometer Model 200-20을 이용하여 470nm에서 효소의 활성도를 측정하였다(24). 또한, 고정화된 tyrosinase의 활성은 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.5)에 50mM로 녹아 있는 L-DOPA(L-3,4-Dihydroxyphenylalanine)를 기질로 하여 고정화된 tyrosinase의 catecholase 활성을 비색법으로 475nm에서 측정하였다(25).

고정화 효소의 고정화를 측정

고정화된 GOD의 활성률을 비교하기 위해 고정화된 효소막층을 1M의 HCl로 12시간 처리하여 혼합막에 부착된 효소를 가수분해시킨 다음에 Bio-Rad 법으로 protein 정량하여 고정화된 효소의 양을 측정하였다.

고정화 막의 전자현미경 관찰

GOD를 2.5% glutaraldehyde one-step방법으로 고정화 시킨 CTA/PCL ; 80/20 혼합막을 4°C 에서

건조한후 -80°C 에서 절편을 제조하여 그의 단면을 전자현미경(JEOL, Model : JSM 5200, Japan)으로 관찰하였다.

GOD 고정화 막의 Dissolved Oxygen Sensor의 응답특성

GOD를 여러 가지 방법으로 고정화한 막을 김(27) 실험실에서 제작된 inner type의 dissolved oxygen probe에 부착시켜, glucose농도에 따른 고정화 막의 감응도를 computer가 연결된 potentiostat를 이용하여 전류의 세기를 측정함으로써 고정화방법에 따른 효소고정화막의 감응도를 측정하였다(26).

고정화된 Tyrosinase의 안정성 측정

Tyrosinase를 direct CDI 방법으로 고정화한 막을 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.5)에 담가서 4°C 냉장보관하면서 막의 종류별 효소의 안정성을 측정하였다. 또한, 고정화막을 공기중에서 건조된 상태와 0.1M sodium phosphate buffer용액에 담가 4°C 보관하면서 각각의 안정성을 측정하였다.

결과 및 고찰

GOD의 고정화

CTA/PCL 혼합막의 hydroxyl group과 glutaraldehyde의 알데히드기와 효소분자의 표면에 있는 amino group을 결합시키거나 CDI를 이용한 알데히드기와 효소분자 표면의 amino group과의 결합시키거나 여기에 ethylenediamine을 이용하여 GOD를 고정화시켰다.

각각의 방법으로 고정화된 효소의 활성률은 CDI를 이용하여 직접고정화한 방법(A)은 86.6% 그리고 2.5% glutaraldehyde two-step방법(B)은 87.3% 그리고 2.5% glutaraldehyde one-step방법(C)에서 효소고정화층을 $10\mu\text{m}$ 로 처리한 (C-10)의 고정화 막은 90%의 상당히 높은 고정화효소의 활성을 보였고 그 2배의 효소를 처리한 (C-20)의 고정화 막은 80.6%의 고정화효소의 활성을 나타내었다.

한편, 고정화 종류에 따른 고정화효소의 활성도를 측정해 본 결과 glutaraldehyde를 이용한 one-step 방법이 활성도가 높았으며 C-20은 C-10보다 2배의 효소가 처리되었으나 그 활성도는 1.29배의 증가에 그쳐 $10\mu\text{m}$ 두께로 효소고정화층을 형성하는 것이 그 두께에 있어서는 적당하다고 여겨졌다(Table 1).

Table 1. Characteristics of various immobilization methods of glucose oxidase on CTA/PCL (80/20) membrane.

Imm. Meth.	Applied GOD (unit)	Washed GOD (unit)	Bound GOD (unit) [A]	Activity of immobilized GOD(unit)[B]	B/A (%)	O.D. at 470nm with GOD & POD of 30mm ² immobilized membrane
A	3.3	0.3	3	2.6	86.6	0.067
B	3.4	0.56	2.84	2.48	87.3	0.062
C-10	3.3	0	3.3	3.0	90	0.094
C-20	6.7	0	6.7	5.4	80.6	0.121

A: Direct immobilized glucose oxidase on activated CTA/PCL(80/20) membrane treated with CDI: CDI direct immobilization

B: Immobilized glucose oxidase on the activate aminated membrane treated with 2.5% glutaraldehyde: Glutaraldehyde linking two-step immobilization

C: Glucose oxidase mixed with 2.5% glutaraldehyde and immobilized on aminated CTA/PCL(80/20) membrane: Glutaraldehyde crosslinking one-step immobilization

(C-10; 10 μ m, C-20; 20 μ m thickness before dry)

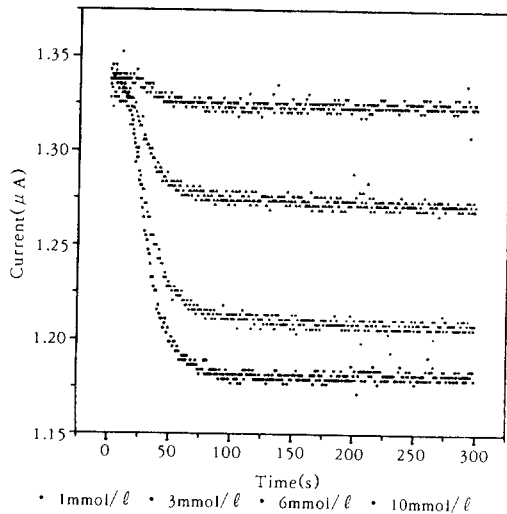


Fig. 1. Typical point recordings by computer showing dynamic response curve of immobilized GOD by glutaraldehyde crosslinking one-step immobilization on CTA/PCL(80/20) membrane by the inner type cathode electrode for DO sensor.

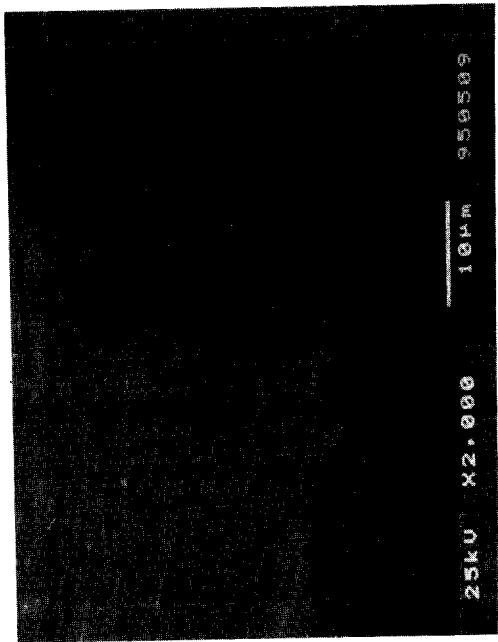
다양한 혼합비의 CTA/PCL 막의 GOD 고정화 CTA와 PCL의 혼합비율이 90/10, 85/15 및 80/20(w/w)의 세 종류의 혼합막을 2.5% glutaraldehyde를 이용하여 GOD를 one-step 방법으로 고정화

한 다음에 실험실에서 제작된 inner type의 dissolved oxygen probe에 고정하여 glucose농도별 고정화막의 감응도를 전류의 세기로 측정된 결과 이 세 종류의 막중에서 CTA와 PCL의 혼합비율이 80/20인 막이 효소고정화율이 높았으며(Fig. 4), glucose농도의 증가에 따른 전극에 흐르는 전류의 세기가 정확히 일정비율로 증가하는 것이 관찰되었다. 그러므로 CTA/PCL (80/20)의 산소투과성 혼합막이 바이오센서용 효소고정화 막으로 가장 적합함을 알 수 있었다.

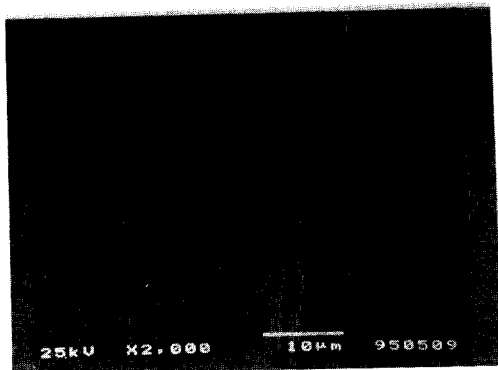
한편, 효소가 고정화된막의 단편을 전자현미경으로 관찰한 결과, 막의 표면에 건조 후 약 3 μ m 두께의 glucose oxidase와 glutaraldehyde가 cross-linking 된 효소고정화 층을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

GOD 고정화막의 D.O. Sensor 응답특성

여러 가지 GOD의 고정화 방법으로 제조된 효소 고정화막들을 glucose농도에 따른 감응도를 자체 제작한 산소전극으로 측정된 결과, glucose용액을 가 하였을 때 50초 이내에 전류의 강도가 정류상태에 도달했으며 이 중에서glutaraldehyde one-step방법으로 두께를 10 μ m가 되게 처리한 효소고정화막은 glucose의 농도가 증가함에 따라 전류의 차이 값이 glucose 7mM까지는 선형적으로 비례하였으므로 glucose sensor에 적합한 효소고정화 방법으로 증명되었다(Fig. 1, Table 2).



(a)



(b) CTA/PCL(80/20)membrane GOD 2.5% glutaraldehyde crosslinking layer

Fig. 2. Scanning electron microscoph showing the cross-section of cellulose triacetate/polycaprolactone (80/20) membrane.

- [A]:The cross-section of a typical asymmetric intact cellulose triacetate/polycaprolactone (80/20) membrane.
- [B]:The cross-section of glucose oxidase immobilized with 2.5% glutaraldehyde on cellulose triacetate/polycaprolactone (80/20) membrane by SEM.

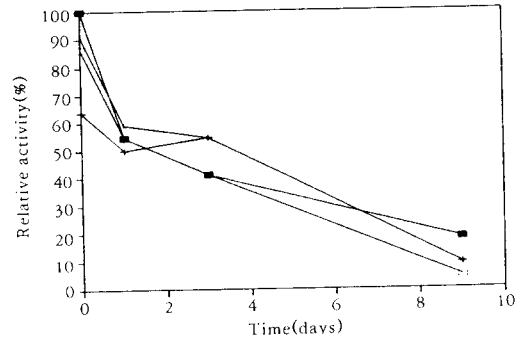


Fig. 3. The stability of immobilized tyrosinase by direct CDI method on various cellulose acetate membranes stored in 0.1M phosphate buffer ph 6.5, 4C

- : Cellulose acetate/polycaprolactone; 95/5
- + : Cellulose acetate/polycaprolactone; 90/10
- * : Cellulose acetate/polycaprolactone; 85/15
- : Cellulose acetate/polycaprolactone; 85/20

Table 2. Charateristics of response curve of various immobilized GOD membranes by DO sensor.

Immobilization method	Difference of amperometric value (10mM glucose conc.)	Linearity of $\mu A/mM$ glucose
A	0.148 μA	R = 0.961
B	0.156 μA	R = 0.905
C-10	0.160 μA	R = 0.994
C-20	0.108 μA	R = 0.815

Cellulose Acetate와 Cellulose Triacetate 막의 PCL비율이 고정화된 Tyrosinase 활성에 미치는 영향 Cellulose acetate (CA)와 cellulose triacetate (CTA) membranes에 polycaprolactone (PCL)이 95/5, 90/10, 85/15, 80/20의 혼합비로 각각 혼합된 막에 tyrosinase를 고정화한 후 활성도를 비교해 볼 때에 CA는 O.D 0.022의 활성도를 나타냈고, CTA는 O.D 0.038의 활성도를 나타내어 CA보다는 CTA membranes이 tyrosinase의 고정화에 적합하다는 결론을 내렸다.

CA와 PCL의 혼합비율에 따른 활성도의 차이를 실험한 결과 PCL의 혼합비율이 증가할수록 약간의 고정화율의 증가는 나타났으나 유의적인 차이는 나

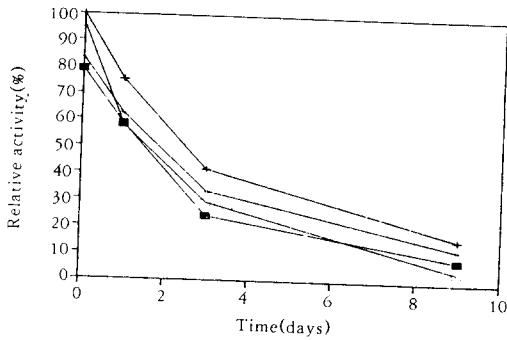


Fig. 4. The stability of immobilized tyrosinase by direct CDI method on various cellulose triacetate membranes stored in 0.1M phosphate buffer ph 6.5, at 4C.

- : Cellulose triacetate/polycaprolactone; 95/5
- + : Cellulose triacetate/polycaprolactone; 90/10
- * : Cellulose triacetate/polycaprolactone; 85/15
- : Cellulose triacetate/polycaprolactone; 85/20

타나지 않았다(Fig. 3). 한편 CTA와 PCL의 혼합 비율에따른 활성도의 차이에서는 혼합비율이 80/20인 혼합막이 가장 좋았음을 알 수 있었다(Fig. 4).

고정화 Tyrosinase의 안정성

고정화된 Tyrosinase의 활성을 측정하기 위해 비교적 고정화가 잘된 CTA/PCL (80/20) membrane에 direct CDI method로 고정화한 후 공기중에서 건조된 상태와 0.1M sodium phosphate buffer (pH 6.5)용액에서 4°C 보관하면서 안정성을 비교정화 효소와 비교 측정한 결과, 2일 동안에 급격히 효소의 활성이 저하되어 40%의 활성이 남아 있었으며, 8일 후에는 공기중에 보관한 고정화효소는 15%, 완충용액에 보관한 고정화효소는 35%의 효소활성이 남아 있었다(Fig. 4). 이러한 잔여활성도는 비고정화효소의 활성에 약 1/3에 지나지 않으나 polyacrylamide로 고정화한 효소의 활성이 1일 이내에 거의 비활성화된 것에 비교하면 비교적 tyrosinase의 바이오센서용 고정화방법으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

Glucose biosensor용 glucose oxidase 고정화 막의 단일화 및 일회용의 간편화를 위한 연구로서,

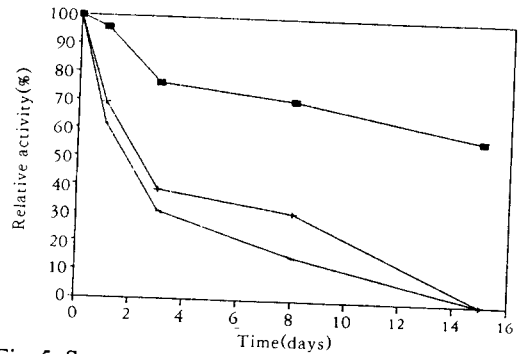


Fig. 5. Storage stability of immobilized tyrosinase by direct CDI method on various cellulose triacetate/polycaprolactone(80/20) membranes.

- : free-tyrosinase in buffer stored at 4C
- + : Immobilized tyrosinase in 0.1M phosphate buffer(ph 6.5) stored at 4C
- * : Immobilized tyrosinase in air stored at 4C

glucose oxidase의 고정화 대상막으로는 CTA와 PCL의 혼합비율이 80/20인 혼합막을 사용한 고정화 방법 중에서는 glutaraldehyde one-step 방법으로 효소고정화층의 건조 전 두께가 10μm인 효소고정화 막이 효과적이었다. 이 고정화 막을 전자현미경으로 관찰해 본 결과, 고밀도의 CTA/PCL 막층 위에 GOD-glutaraldehyde 층이 건조 후 3μm 정도로 덮여 있는 것을 알 수 있었다. Dissolved oxygen 전극을 사용하여 glucose농도의 증가에 따른 전류세기의 차이 값을 측정해 본 결과, glucose 7mM의 농도범위 내에서 선형성을 나타냈으므로 이 고정화 방법이 glucose sensor용 효소고정화 방법으로 가장 적합하였다. 한편, tyrosinase는 CTA와PCL의 혼합비율이 80/20인 혼합막에 direct CDI 방법으로 고정화한 것이 가장 효과적이었으며, 8일 후에도 고정화된 tyrosinase의 활성이 35% 이상 유지되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 특정연구과제(93-0400-09-01-3)에 의하여 수행되었음을 감사드립니다.

참고문헌

1. A. P. F. Turner, I. Karube and G. S. Wilson

- (1987), *Biosensor*, p. 85, Oxford Univ. Press, New York.
2. A. E. G. Cass (1990), *Biosensors, A practical approach*, p. 1, IRL Press, New York .
 3. S. J. Clark and C. Lyons (1962), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, 29.
 4. S. J. Updike and G. P. Hicks (1967), *Nature*, **214**, 986.
 5. D. L. Williams, A. R. Doig and A. Korsi (1970), *Anal. Chem.*, **42**, 118.
 6. C. G. J. Koopel, R. J. M. Nolte and B. de Rooter (1991), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1691.
 7. Y. Degani and A. Heller (1989), *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 2357.
 8. P. C. Pandey, A. M. Kayastha and V. Pandey (1992), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **33**, 139.
 9. N. C. Foulds and C. R. Lowe (1986), *J. Chem. Soc., Faraday, Trans. I.*, **82**, 1259.
 10. G. Melendon and A. E. Martell (1976), *Coord. Chem. Rev.*, **19**, 1.
 11. E. C. Niederhohher, J. H. Timmons and A. E. Martell (1984), *Chem. Rev.*, **84** 137.
 12. M. S. Stewart and I. D. Watson (1987), *Ann. Clin. Biochem.*, **24**, 552.
 13. R. A. Strickland, T. R. Hill and G. P. Zagola (1989), *J. Clin. Anesthesiol.*, **1**, 248.
 14. J. P. Gosling (1990), *Clin. Chem.*, **36**, 1408.
 15. S. Wada, H. Ichikawa and K. Tatsumi (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 854.
 16. G. F. Payne, Q. W. Sun and A. Sohrabi (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1011.
 17. G. S. Cha and M. E. Meyrhoff (1989), *Talanta*, **36**, 271.
 18. G. S. Cha and M. E. Meyrhoff (1989), *Electroanalysis*, **1**, 205.
 19. H. S. Yim, C. E. Kibbey, S. C. Ma, D. M. Kliza, D. Lju, S. B. Park and M. E. Meyrhoff (1993), *Biosensors & Bioelectronics*, **8**, 1.
 20. J. Woodward (1985), *Immobilized Cells and Enzymes*, p. 55, IRL Press, Oxford.
 21. R. Barnard and B. Gilbert (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 361.
 22. X. M. Li and H. Y. Wang, (1987), *Horizons of Biochemical Engineering*, S. Aiba, ed., 213, Oxford Univ. Press, Oxford.
 23. O. K. Lee, T. J. Kim and B. S. No (1995), *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 266.
 24. 전재현, 권형주, 한미영, 김두식 (1990), *Korean Biochem. J.*, **23**, 34.
 25. F. Schubert and F. Scheller (1988), *Method in Enzymology*, K. Mosbach, ed., **137**, 152, Academic Press, New York.
 26. Y. H. Lee, G. T. Taso (1979), *Advan. in Biochem. Eng.*, A. Fiechter, ed., **13**, 35, Springer-Verlag Press, Berlin.
 27. 김태진, 정태훈, 정용섭, 윤정원 (1995), 한국생물공학회지 인쇄중.