

## 분쇄마찰매체 불균일상 효소반응계를 활용한 생전분을 당공여체로 하는 Cyclodextrin Glucanotransferase의 당전이 반응

이용현\* · 백승길 · 신현동 · 박동찬  
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

### Transglycosylation Reaction of Cyclodextrin Glucanotransferase in the Attrition Coupled Reaction System using Raw Starch as a Donor

Lee, Yong-Hyun\*, Seung-Gul Baek, Hyun-Dong Shin and Dong-Chan Park

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

**Abstract** — Transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) was analyzed in the attrition coupled heterogeneous reaction system using raw starch as a donor; and mono-, di-saccharide, and glycoside as acceptors. For transglycosylation reaction of stevioside, the transglycosylation rate was similar and the transglycosylation yield was increased compare with conventional process using liquefied starch as the donor. Also the accumulation of maltooligosaccharides in reaction mixture was minimized. The residual raw starch can be easily separated out from reaction mixture, that will facilitate the purification of transglycosylated stevioside. Optimal conditions were determined to be 200 g of raw starch/l, mixing ratio of CGTase to raw starch of 15~30 unit/g of starch, ratio of stevioside to raw starch of 1 mM of stevioside/g of starch, 400 g of glass bead/l, and agitation of 200 rpm. The role of intermediate cyclodextrin on transglycosylation of stevioside were also investigated. Transglycosylation reaction in the bioattritor using raw starch as a donor seems to have many potential advantages over conventional methods. Hence the attrition coupled reaction system is expected to be utilized for industrial production of coupling sugar and transglycosylated stevioside.

Cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19 ; 1,4- $\alpha$ -glucan 4- $\alpha$ -D-(1,4 glucano) transferase, cyclizing : CGTase)는 전분에 작용하여 cyclization, coupling reaction, cyclodextrin(CD) hydrolysis, 그리고 disproportionation과 같은 반응을 촉매하는 amylase 계통의 효소이다(1-4). 그 중 coupling reaction은 전분에서 합성된 CD를 개환하고 생성된 말단 당분자를 당수용체에 전이시키는 분자간 당전이반응(intermolecular transglycosylation reaction)을 의미한다. 당수용체로는 단당류, 이당류, 그리고 배당체와 같은 각종 당이 이용되며, CGTase의 coupling reaction을 이용하면

중합도가 다른 각종 당전이 생성물을 합성할 수 있다(5-11).

배당체인 stevioside는 감미도가 높고 저칼로리의 대체감미료로서 현재 널리 사용되고 있다. Stevioside에 한개 이상의 glucose분자를  $\alpha$ -1,4-glycosidic bond로 전이시켜 분자구조를 가감 수식시킨 당전이 stevioside는 원래의 stevioside에 비하여 감미도는 약간 감소하나 원래 갖고 있는 독특한 쓴맛이 제거되므로 맛이 부드러워져 최근 산업적으로 대량 생산되고 있다(12-16).

당전이 stevioside의 제조에는 전분에 액화효소를 첨가 가열하여 가용화시킨 액화전분 또는 호화 덱스트린등을 당공여체로 사용하며, 당공여체인 전분, 당수용체인 stevioside, 당전이효소, 그리고 당전이 stevioside 등 모든 성분이 물에 녹아있는 균일상 효소

**Key words:** Transglycosylation, cyclodextrin glucanotransferase, bioattritor, raw starch as donor, mono- and di-saccharides, stevioside

\*Corresponding author

반응계가 활용되고 있다(17). 이와같은 기존의 방법은 전분 또는 전분질을 증자 액화시키는데 다량의 에너지가 소모되고, 모든 성분이 수용상태로 혼합되어 있어 반응후 생성된 당전이 stevioside의 분리 정제가 어렵고, 잔류 전분이 수용상태이므로 분리 재활용이 어려우며, 반응중 다량의 maltooligo당이 축적되고, 또한 당전이 반응 수율이 낮은 결점이 있다.

본 연구실에서는 생전분을 기질로 한 각종 amylase 계통의 효소 반응시 고품 분쇄마찰매체를 첨가하여 효소의 작용을 촉진시키는 불균일상 효소반응계에 관한 일련의 연구를 수행해 오고 있으며(18-21), 특히 최근에는 CD의 직접 생산에 관한 연구를 수행한 바 있다(22).

본 연구에서는 생전분을 당공여체로 하고 단당류, 이당류, 그리고 배당체를 당수용체로 하는 분쇄마찰매체 함유 불균일상 효소반응계를 활용한 CGTase의 당전이 반응에 관한 연구를 수행하였다. 먼저 분쇄마찰매체 효소반응계에서 각종 당수용체에 대한 당전이반응 효율을 조사하였으며, 당전이 stevioside의 제조에 활용 가능성을 검토하였고, 당전이 반응 조건을 확립하였다. 또한 중간산물인 CD가 당전이반응에 미치는 영향을 검토하였다. 이와 같은 연구는 새로운 고효율 당전이 효소 반응계 개발을 위한 기초자료로 활용될 것이다.

## 재료 및 방법

### 당전이 효소

당전이 효소는 *Bacillus macerans* 유래의 산업용 CGTase(Amano Co., 60 units/mg protein)를 사용하였으며, 최적 pH와 온도는 각각 6.0과 50°C 였다. CGTase의 활성은 5%(w/v) 가용성 전분용액(pH 6.0) 1.0 ml에 CGTase 0.002 ml를 첨가하여 50°C 에서 30분간 반응시킨 후 생성된 CD량을 측정 결정하였으며, 분당 1mg의 CD를 생성시키는 효소의 양을 1 unit로 정하였다.

### 당공여체 및 당수용체

당공여체로는 옥수수 생전분(corn starch)을 사용하였으며, 당수용체로는 단당류인 glucose, xylose, inositol, 이당류인 sucrose, cellobiose, maltose, 그리고 배당체인 stevioside(M.W. 804.9, Sigma Co.)를 사용하였다. 또한 부분정제된 산업용 stevioside(국내 T사, stevioside 90%와 rebaudioside-A 10% 함유)도

사용하였다.

### 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분을 이용한 당전이 반응

분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분을 이용한 당전이 반응조건은 전보(18-22)의 결과를 기초로하여 결정하였으며, 당공여체인 옥수수 생전분 100 g을 20 mM Tris-maleic acid-NaOH buffer(pH 6.0) 1 L에 현탁하고, 각종 당수용체 0.1 M, CGTase 8.0 ml(1,200 unit), 그리고 유리구(glass bead, 직경 3 mm, 비중 2.54) 400 g을 첨가하여 50°C 에서 200 rpm으로 교반하면서 반응시켰으며, 경우에 따라 상기 반응조건을 변화시켰다.

### 액화전분을 이용한 당전이 반응

옥수수 생전분 100 g/l(w/v)에 *Bacillus licheniformis* 유래의  $\alpha$ -amylase(Sigma Co.) 4,400 unit/l를 첨가하여 90°C 에서 20분간 처리하여 얻은 액화전분을 당공여체로 사용하였다. 상기 액화전분에 각종 당수용체 0.1 M과 CGTase 8.0 ml(1,200 unit)을 첨가하여 50°C 에서 200 rpm으로 교반하면서 반응시켰다.

### 분석방법

각종 당수용체와 생성된 CD의 농도는 high performance liquid chromatography(HPLC, Model-305, Gilson Co.)를 사용하여 측정하였고, column은 Cosmosil 5NH<sub>2</sub> packed column(Nacalai Co.), 용출용매는 acetonitril과 H<sub>2</sub>O(65 : 35)의 혼합용액, 용출속도는 1.0 ml/min이었고, RI detector로 검정하였다. 환원당은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)법(23)으로 분석하였다.

### 당전이 반응 수율

당전이 반응 수율은 반응 전후의 당수용체의 농도를 측정하여 다음과 같이 구하였다.

$$\text{당전이 반응 수율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응후 당수용체의 농도}}{\text{반응전 당수용체의 농도}}\right) \times 100$$

## 결과 및 고찰

분쇄마찰매체 효소반응계에서 각종 단당류, 이당류 및 배당체에 대한 당전이성

**Table 1. Transglycosylation of various acceptors in attrition coupled reaction system using raw starch as a donor**

Acceptor	Transglycosylation yield (%)
(Monosaccharides)	
Glucose	79
Xylose	41
Inositol	43
(Disaccharides)	
Maltose	82
Sucrose	72
Cellobiose	77
(Glycosides)	
Stevioside	81

Reaction conditions; 100 g raw corn starch/l, 1 mM acceptor/g of starch, 1,200 units CGTase/l, 400 g glass bead/l, pH 6.0, 50°C, 200 rpm, and after 24 h.

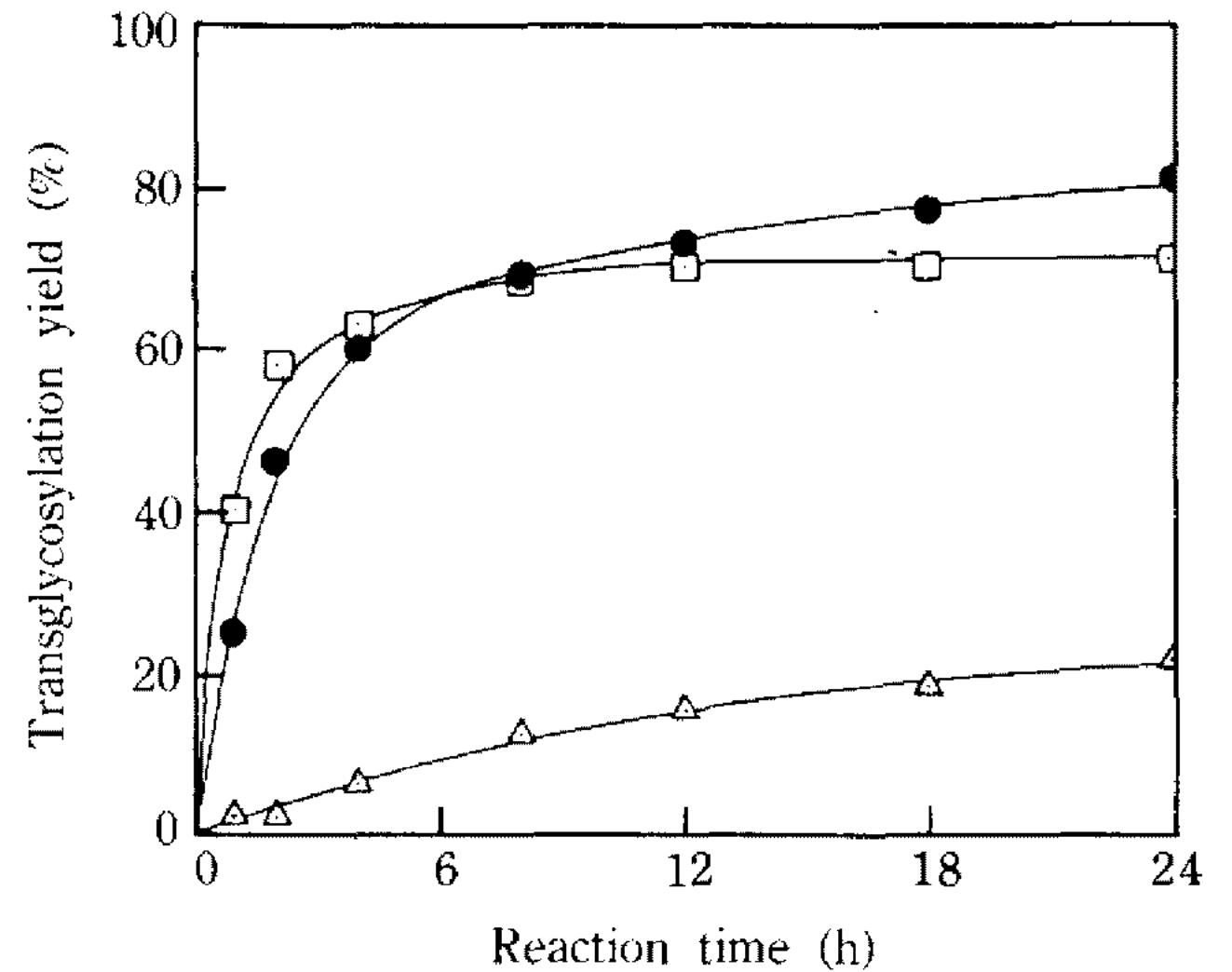
Table 1은 생전분을 당공여체로 하고 단당류인 glucose, xylose, inositol과, 이당류인 maltose, sucrose, cellobiose, 그리고 배당체인 stevioside를 당수용체로 하여 분쇄마찰매체 불균일상 효소반응계에서 CGTase로 24시간 당전이 반응을 시켰을 때의 전환수율을 나타내고 있다. 모든 당류에서 당전이 반응이 관찰되었으며, 특히 glucose의 경우 79%, maltose는 82%, sucrose는 72%, 그리고 cellobiose는 77%로 높은 전환수율을 보였다. 이와같은 전환수율은 액화전분을 당공여체로 한 연구결과(6)와 유사한 수준이다.

한편 배당체인 stevioside는 전환수율이 82%에 이르러, 당전이 반응이 매우 원활히 진행됨을 알 수 있었다. 따라서 분쇄마찰매체 함유 효소반응계는 당전이 반응을 이용하는 각종 전이당 제조, 특히 산업적으로 중요한 coupling sugar나 당전이 stevioside 합성에 유용하게 활용될 수 있음을 제시하고 있다.

#### 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분을 당공여체로 하는 Stevioside의 당전이 양상

분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분을 당공여체로 하는 stevioside의 당전이 반응 양상은 Fig. 1과 같다. 또한 생전분을 당공여체로 사용하지만 분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 경우와 기존의 제조방법에서와 같이 증자액화전분을 당공여체로 사용하는 경우도 비교하였다.

분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 경우 전환수율은

**Fig. 1. Comparison of progresses of stevioside transglycosylation in the three different reaction systems.**

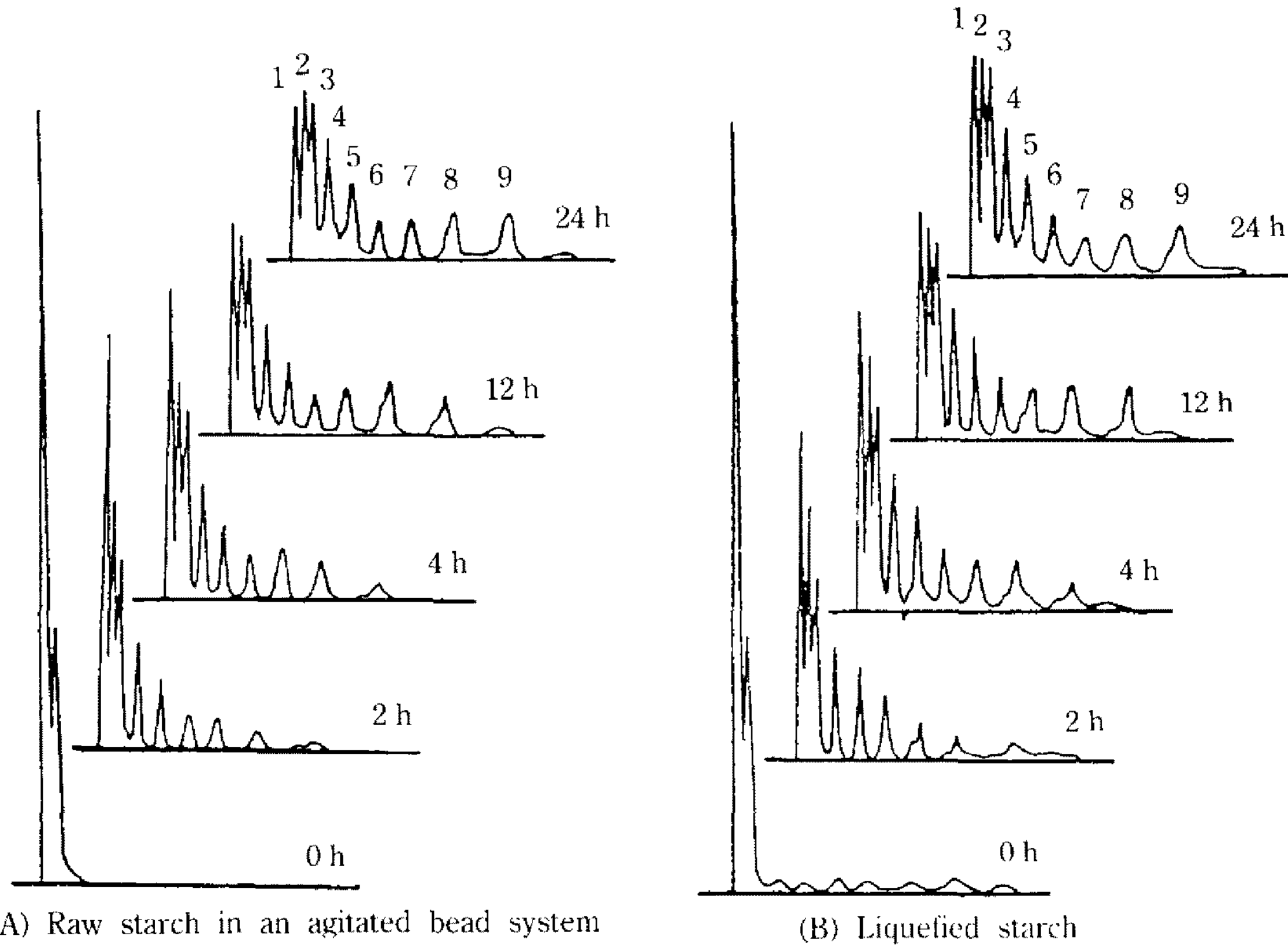
Conditions: 0.1 M stevioside/l, 100 g raw corn starch/l, 1200 units CGTase/l, pH 6.0, 50°C, 200 rpm, and (with bead; 400 g glass bead/l).

Raw starch as a donor with (●) or without (△) bead, and liquefied starch as a donor (□).

매우 낮아 24시간 후에도 21%에 불과하였다. 반면 기존의 방법인 증자액화전분을 사용한 경우의 24시간 후의 전환수율은 71%였다. 분쇄마찰매체 효소반응계에서는 초기에는 반응속도가 액화전분을 사용한 경우보다 다소 낮았으나 그 후 반응이 활발히 진행되어 8시간 후에는 당전이수율이 액화전분을 능가하였고, 24시간 후에는 81%에 이르렀다. 초기 반응속도가 다소 낮은 것은 전보(22)에서 기술한 바와 같이 전분입자의 단편화가 충분히 진행되지 못하여 효소 반응가용표면적이 제한되나, 그 후 전분입자의 단편화가 급속히 진행되어 효소 반응이 원활하게 이루어지기 때문인 것으로 유추된다.

분쇄마찰매체 효소반응계와 액화전분 반응계의 0, 2, 4, 12, 그리고 24시간 반응액의 구성성분을 HPLC로 분석 대비한 결과는 Fig. 2와 같다. 양 반응계의 구성성분의 변화를 비교하여 보면, 각 성분의 조성 및 농도는 시간에 따라 차이는 있으나, 유사한 양상으로 진행되어 최종 반응액의 조성 역시 매우 유사하였다.

한편 glucose 및 각종 maltooligo당(G<sub>2</sub>~G<sub>7</sub>)의 peak를 HPLC chromatogram상에서 관찰한 결과 액화전분을 사용한 경우에 비하여 낮은 것으로 관찰되었다. 이를 확인하기 위하여 환원당 농도를 glucose를 표준물질로 하여 DNS법으로 분석한 결과, 24시간 후 분쇄마찰매체 효소반응계는 0.2 g/l, 액화전분의 경우



**Fig. 2. Comparison of HPLC chromatograms.**

Bioatritor using raw starch as a donor (A) and liquefied starch as a donor (B).

1; stevioside, 2; rebaudioside-A, 3, 4, 5, 6; transglycosylated stevioside, 7, 8, 9;  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrin.

는 8.0 g/l였다. 이는 전보(22)에서 관찰한 바와 같이 분쇄마찰매체 효소반응계의 경우에는 생전분 입자의 비환원성 말단으로부터 CGTase의 작용이 진행되어 maltooligo당 및 limit dextrin과 같은 미반응 잔기의 형성이 억제되는 반면, 액화전분의 경우는 증자 액화과정과 CGTase의 작용 후 생성된 maltooligo당과 당전이 미반응 잔기가 반응계에 축적되기 때문으로 유추된다.

이와같은 maltooligo당의 소량 생성은 스테비오사이드에 대한 당전이 수율을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 반응 부산물이 적으므로 고순도 당전이 stevioside 생산을 가능케 할 것이다. 또한 당공여체인 미반응 잔류전분은 불용성 상태로 존재하므로 반응액으로부터 쉽게 분리시킬 수 있었다.

위에서 설명한 바와 같이 생전분을 당공여체로 하는 분쇄마찰매체 함유 효소반응계를 이용한 불균일상 효소반응계에서의 당전이 반응은 모든 성분이 수용 상태로 혼합되어 있는 기존의 전이당 제조법과는 달리 반응수율이 높고, 미반응 전분의 분리가 용이하며, 부산물인 maltooligo당의 함량이 낮아 고순도의 전이당을 얻을 수 있으며 분리 정제도 용이한 등 많은

장점이 예상된다.

**분쇄마찰매체 불균일상 효소반응계에서 Stevioside의 당전이 반응 조건 검토**

**적정 당전이 효소 사용량** : 적정 효소 사용량을 생전분을 기준으로 검토하였으며, 생전분의 농도를 각각 50, 100, 150, 200 g/l으로 변화시키고, stevioside의 농도는 1 mM/g starch 비율로 첨가한 후, CGTase를 300, 600, 900, 1200, 그리고 1500 units/l로 첨가하여 24시간 후의 당전이수율을 측정된 결과는 Table 2와 같다.

일정한 생전분 농도에서는 효소첨가량이 일정한 수준에 이를 때까지는 당전이수율은 증가하였다. 이를 생전분에 대한 효소첨가량의 비율(units/g raw starch)로 환산하면, 첨가 비율이 15일때까지는 수율이 증가하였으나 그 이상에서는 일정한 수준을 유지하였다. 이는 효소가 작용할 수 있는 생전분 입자상의 비환원성 말단의 수가 고정되어 있기 때문으로 유추된다. 또한 효소첨가 비율이 30 이상에서는 CD hydrolysis, disproportionation과 같은 부반응이 진행되어 오히려 약간 감소하였다. 적정 효소첨가 비율은 당전이수율이

**Table 2. Effect of amounts of CGTase on transglycosylation yields at different raw starch concentration**

Amount of CGTase (units/l)	Conc. of raw corn starch (g/l)			
	50	100	150	200
300	75.6(30.4) <sup>a</sup>	73.4(59.1)	68.4(82.6)	63.4(102.1)
600	78.4(31.6)	76.2(62.1)	71.7(86.6)	68.6(110.4)
900	79.6(32.2)	78.5(63.7)	74.1(89.5)	69.7(112.2)
1200	81.8(32.9)	80.8(65.9)	76.0(91.8)	72.2(115.8)
1500	81.0(32.6)	81.0(65.2)	77.3(93.3)	73.9(119.0)

Reaction conditions; 50~200 g raw corn starch/l, 1 mM acceptor/g of raw starch, 300~1500 units CGTase/l, 400 g glass bead/l, pH 6.0, 50°C, 200 rpm, and 24 h.

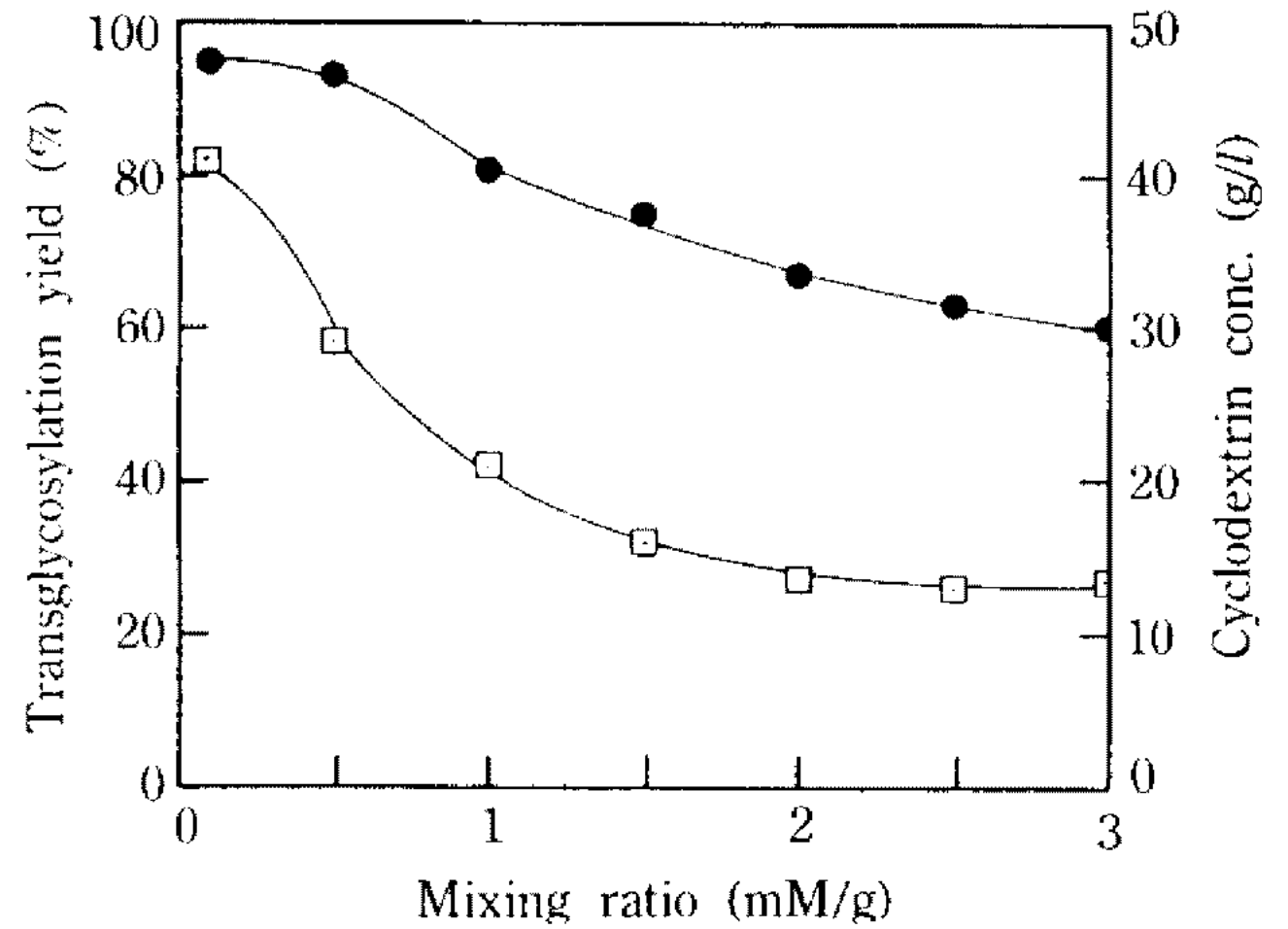
a; Transglycosylation yield (transglycosylated stevioside concentration, g/l) after 24 h.

높고 효소 사용량을 최소화할 수 있는 15~30 unit/g raw starch 범위인 것으로 사료된다.

**생전분과 Stevioside의 적정 혼합비 :** Fig. 3은 생전분에 대한 당수용체인 stevioside의 적정첨가비율을 결정코저, 생전분 농도를 100 g/l으로, 효소첨가량을 1,200 unit/l로 고정하고, stevioside의 농도를 0.01 M에서 0.3 M까지 변화시켜 24시간 반응후의 당전이수율과 잔존 CD량을 관찰한 것이다. Stevioside 농도가 0.05 M일 때까지는 당전이수율이 일정하게 유지되었으며, 그 이상에서는 당전이수율은 감소하였다. 한편 당전이반응의 중간 산물인 CD 잔존량은 41 g/l에서 13 g/l까지 감소하였다. 생전분에 대한 적정 stevioside의 첨가비율은 당전이수율이 높고 CD의 잔존량을 최소화할 수 있는 1 mM~1.5 mM stevioside/g raw starch 범위로 사료된다.

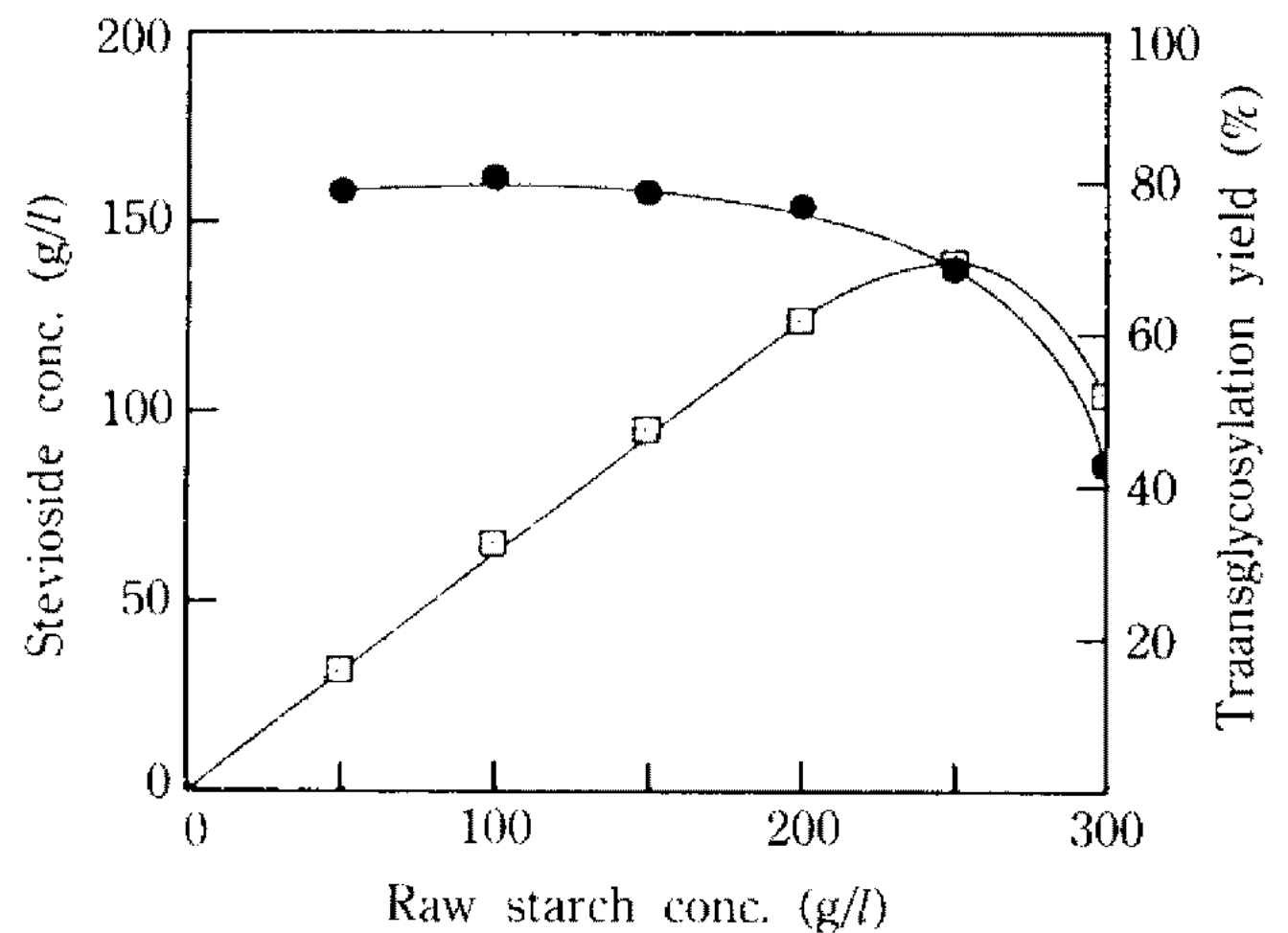
**생전분과 Stevioside 혼합물의 적정 첨가량 :** Fig. 4는 위에서 얻은 생전분과 stevioside의 혼합비율 1 mM/g raw starch로 고정하고, 혼합물을 생전분을 기준으로 50~300 g/l로 변화시키면서 당전이수율을 측정된 결과이다. 당전이수율은 생전분의 농도가 200 g/l 이내 일 때는 큰 변화가 없었으며, 그 이상의 농도에서는 점차 감소하였다. 이는 고농도에서 생전분이 현탁액 중의 수분을 다량 흡수함으로 물성이 변화되어 원활한 분쇄마찰매체의 운동이 어렵게 되기 때문이다. 생전분의 적정 첨가량은 200 g/l 범위로 판단된다.

**당전이 반응 중 전분 유래의 중간 산물들의 변화 양상**



**Fig. 3. Effect of mixing ratio of stevioside and raw starch on transglycosylation yield and cyclodextrin formation in the attrition coupled enzyme reaction system.** Conditions: 100 g raw corn starch/l, 1200 units CGTase/l, 400 g glass bead/l, pH 6.0, 50°C, 200 rpm, and 24 h.

Transglycosylation yield (●), cyclodextrin (□)

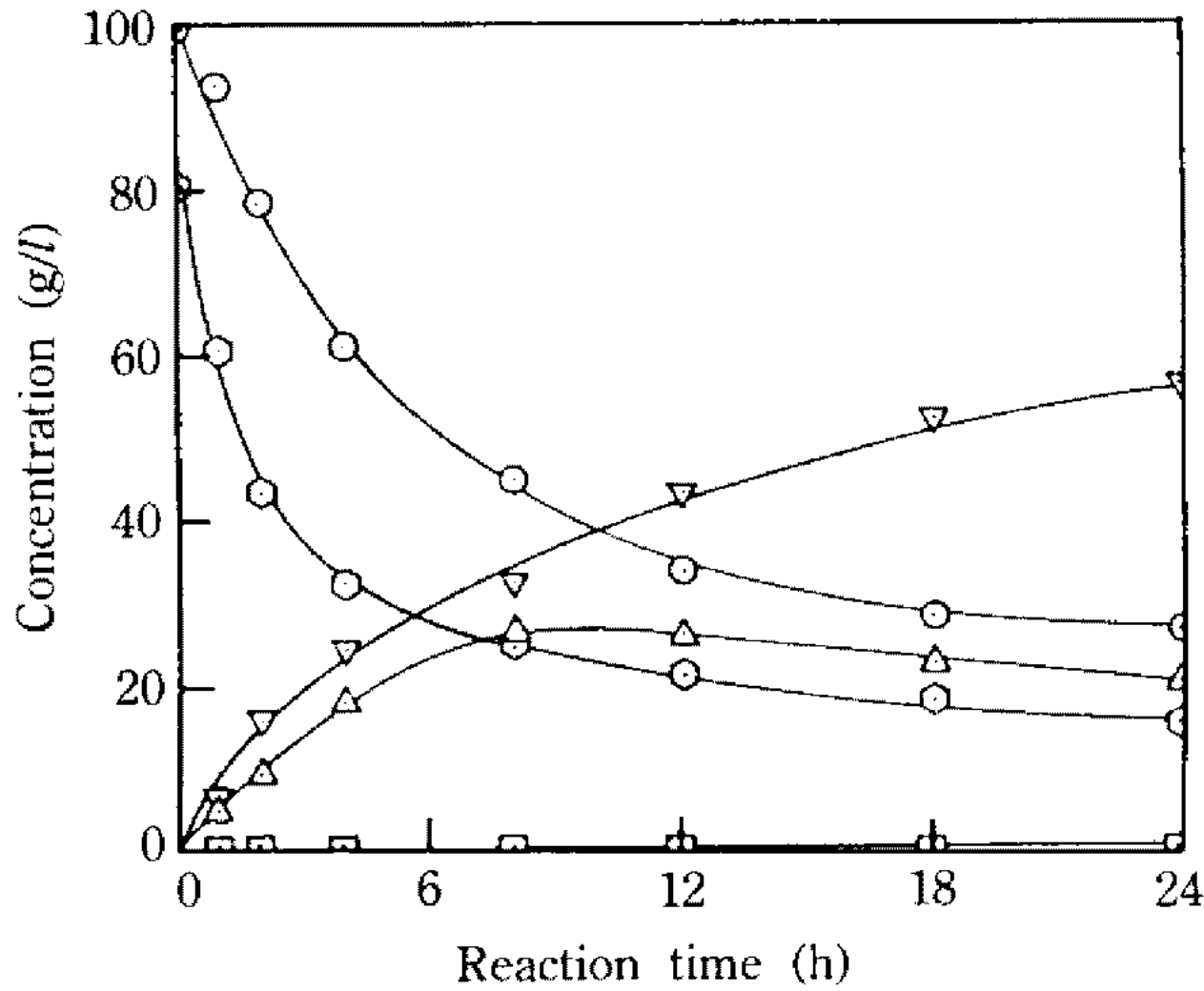


**Fig. 4. Effect of amounts of mixture of stevioside and raw starch (ratio; 1 mM stevioside/g raw starch) in terms of starch on transglycosylation yield.**

Stevioside participated in transglycosylation (□), transglycosylation yield (●)

Fig. 5는 분쇄마찰매체 효소반응계에서의 당전이 반응시 잔류 생전분, maltooligo당을 포함한 수용성 환원당, CD, 그리고 위 결과에서 유추한 당전이 반응에 관여한 전분의 당 환산량 변화를 도시하고 있으며, 아울러 잔류 stevioside 농도 변화도 나타내고 있다. 당공여체인 생전분은 반응초기인 8시간까지는 급격히 감소하였으며, 이는 당전이 속도 및 CD 생성속도가 높기 때문이며, 그 이후에는 서서히 감소하였다. 수용성 환원당은 전 반응기간 중 거의 축적





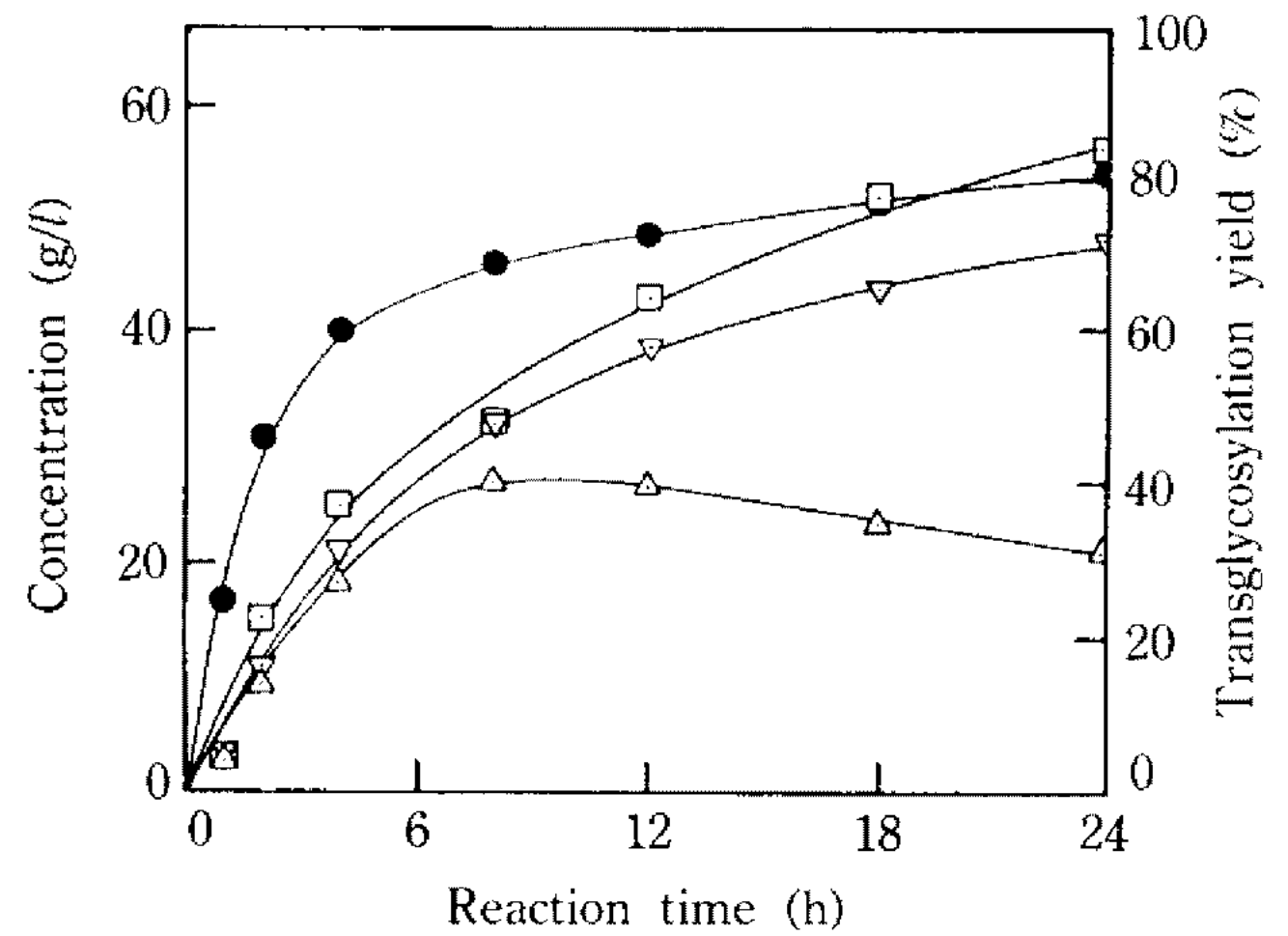
**Fig. 5. Changes of raw starch, cyclodextrin, reducing sugar, transglycosylated sugar, and stevioside during transglycosylation reaction.** Raw starch (○), cyclodextrin (△), reducing sugar (□), transglycosylated sugar (▽), stevioside (○)

되지 않았으며 24시간 후에도 0.2 g/l에 머물렀다. 전이반응 중간산물인 CD 농도는 반응 초기에 급속히 증가하여 8시간 후 최대농도인 27 g/l에 이르고 그 이후에는 점차 감소하여 24시간 후 21 g/l가 잔류하였다.

한편 전이 반응에 사용된 당 환산량은 첨가 생전분량에서 잔류 생전분량, 수용성 환원당, 그리고 CD량을 제한 것으로 구하였으며, 환산 당량은 전 기간에 걸쳐 계속 증가하였다. 또한 잔류 stevioside량은 반응 초기 4시간까지 급속히 감소한 반면 8시간 이후에는 감소율이 현저히 저하되었다.

상기 결과에서 보는 바와 같이, 반응 중 maltooligo당은 거의 생성되지 않고, 반면 CD의 농도 변화는 두드러져, CGTase의 CD 생성능과 stevioside에 대한 당전이 작용 간에는 밀접한 상관관계가 존재할 것으로 짐작된다. Fig. 6은 이를 규명하기 위하여 분쇄마찰매체 효소반응계에서 당수용체인 stevioside를 첨가한 경우와 당수용체를 첨가하지 않은 경우의 CD 농도 변화, 당전이에 사용된 당 환산량, 그리고 당전이 수율의 변화를 나타내었다.

Stevioside를 첨가하지 않은 경우에는 CD 농도는 지속적으로 증가하여 24시간 후 47.5 g/l에 이르렀지만, stevioside를 첨가한 경우에는 12시간 후부터 감소하여 24시간 후에는 21.0 g/l가 되었는데, 이는 생성된 CD가 당전이 반응에 당공여체로서 이용되기 때문인 것으로 사료된다. 또한 당전이 수율은 반응



**Fig. 6. Changes of cyclodextrin concentration, transglycosylated sugar, and transglycosylation yield during reaction.** Cyclodextrin with stevioside (△), cyclodextrin without stevioside (▽), transglycosylated sugar (□), transglycosylation yield (●)

8시간 후 최대치인 82%에 근접한 반면, 전이에 사용된 당 환산량은 그 후에도 꾸준히 증가하여 24시간 후 56.0 g/l에 이르렀으며, 이는 전이된 stevioside에 당이 계속적으로 첨가되는 부가 전이반응이 일어나기 때문인 것으로 추정된다.

상기 결과로 판단컨데 분쇄마찰매체 효소반응계에서 당전이 반응은 생전분으로부터 직접 CD를 생성하고, 이를 개환하여 stevioside에 당을 전이시키는 기작으로 진행되는 것으로 유추되며, CD의 생성과 당전이 반응 간의 정량적인 상관관계를 규명하기 위한 후속 연구가 요망된다.

**요 약**

생전분을 당공여체로 하는 분쇄마찰매체 함유 불균일상 효소반응계를 활용한 cyclodextrin glucanotransferase를 이용한 당전이 반응에 관한 연구를 수행하였다. 당수용체로는 단당류, 이당류, 그리고 배당체를 대상으로 하였으며, 각종 당수용체에 대해서 높은 당전이 수율을 얻을 수 있었다. Stevioside를 당수용체로 한 당전이 반응을 검토한 결과, 높은 반응속도 및 수율, 그리고 낮은 maltooligo당의 축적이 관찰되었다. 뿐만 아니라 잔류 생전분의 분리가 용이하여 전이된 stevioside의 분리 정제가 매우 용이하였다. 적정 전이 반응 조건을 검토하였으며, 생전분에 대한 당전이효소의 사용량은 15~30 unit/g raw

starch, stevioside와 생전분의 혼합비는 1.0~1.5 mM /g raw starch, 그리고 반응 혼합물의 첨가농도는 생전분 기준 200 g/l였다. 또한 당전이 반응기작을 반응 중간물인 cyclodextrin 생성의 관점에서 살펴보았다. 생전분을 당공여체로 하는 불균일상 효소반응계를 이용한 당전이 반응은 액화전분을 공여체로 하는 기존의 방법에 비하여 많은 장점이 있어 산업적 활용이 기대된다.

### 감사의 말

본 연구는 한국과학재단 지원 농업생물신소재연구센터 1993년도 연구비로 수행되었으며, 연구비지원에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Szejtli, Z. 1988. *Cyclodextrin Technology*. Pp. 1-78. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
2. Kitahata, S. and S. Okada. 1975. Transfer Action of Cyclodextrin Glycosyltransferase on Starch. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 2185-2191.
3. Kobayashi, S., H.R.L. Ashraf, P. Braun and D. French. 1988. Coupling Reaction of *Bacillus macerans* Cyclodextrin Glucanotransferase on Glycosyl- $\alpha$ -cyclodextrin and Glucose. *Starch* **40**: 112-116.
4. Kitahata, S. and S. Okada. 1982. Comparison of Action of Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **29**: 13-18.
5. French, D., M.L. Levine, E. Norbery, P. Nordin, J. Pazur and G.W. Wild. 1954. Studies on the Schardinger Dextrins. VII. Co-substrate Specificity in Coupling Reaction of *Macerans* Amylase. *J. Am. Chem. Soc.* **76**: 2387-2390.
6. Kitahata, S. and S. Okada. 1979. Intermolecular Transglycosylation of Cyclodextrin Glycosyltransferase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **26**: 68-75.
7. Vetter, D. and W. Thorn. 1992. Directed Enzymatic Synthesis of Linear and Branched Gluco-oligosaccharide, using Cyclodextrin Glucanotransferase. *Carbohydrate Res.* **223**: 61-69.
8. Okada, S. 1987. Studies on Cyclomaltodextrin Glucanotransferase and Coupling Sugar. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **34**: 75-82.
9. 손천배, 유미경, 김명희, 문숙경. 1991. 호알칼리성 *Bacillus* sp. No. 4의 Cyclodextrin Glycosyltransferase에 의한 Glycosyl Sucrose의 생산과 저충치성당으로서의 응용. *한국식품과학회지* **23**: 503-509.
10. Sato, M., T. Matsuo, N. Orita and Y. Yagi. 1991. Synthesis of Novel Sugars, Oligoglucosyl-inositols, and their Growth Stimulating Effect for *Bifidobacterium*. *Biotechnol. Letters* **13**: 69-74.
11. 오평수, 고성철, 서정원. 1986. *Bacillus* sp.의 Cyclodextrin Glucanotransferase 생산 및 이용에 관한 연구. *산업미생물학회지* **14**: 461-466.
12. 龜和田光籃. 1987. 食品新素材의 開發과 應用. Pp. 161-203. CMC. 東京.
13. Bakal, A.I. and L.O. Nabors. 1985. Stevioside, Pp. 295-308. In L.O. Nabors and R.C. Gelardi(ed.), *Alternative Sweeteners*, Marcel Dekker, New York.
14. Fukunaga, Y., T. Miyata, N. Nakayasu, K. Mizutani, R. Kasai and O. Tanaka. 1989. Enzymatic Transglucosylation Products of Stevioside: Separation and Sweetness-evaluation. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1603-1607.
15. Ishikawa, H., S. Kitahata, K. Ohtani, C. Ikuhara, and O. Tanaka. 1990. Production of Stevioside and Rubusoside Derivatives by Transfructosylation of  $\beta$ -Fructofuranosidase. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 3137-3143.
16. Lobov, S.V., R. Kasai, K. Ohtani, O. Tanaka, and K. Yamasaki. 1991. Enzymatic Production of Sweet Stevioside Derivatives: Transglycosylation by Glucosidases. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 2959-2965.
17. Miyake, T. 1980. Process for Producing a Sweetener. *U.S. Patent* 4219571.
18. Lee, Y.H. 1992. Mechano-Enzyme Reaction on Insoluble Substrates and its Feasibility of Industrial Application. Pp.53-63. 한국산업미생물학회 1992년도 추계학술발표대회 논문초록. 한국산업미생물학회. 10월 30-31일. 대구.
19. 이용현, 박진서. 1989. 무증자 전분당화용 분쇄마찰매체 함유 효소반응기의 조작조건과 동력소모의 검토. *산업미생물학회지* **17**: 349-357.
20. 박동찬, 이용현. 1990. Glucoamylase 및  $\alpha$ -Amylase의 분쇄마찰매체 효소반응계에서의 생전분 효소분해 Mechanism. *산업미생물학회지* **18**: 260-267.
21. 이용현, 박동찬. 1990. 분쇄마찰 효소반응계에서 생전분 효소당화를 위한 Glucoamylase 및  $\alpha$ -Amylase의 보완작용. *산업미생물학회지* **18**: 352-359.
22. 한일근, 이용현. 1991. 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서의 Cyclodextrin 생산과 Cyclodextrin Glucanotransferase의 작용 Mechanism. *산업미생물학회지* **19**: 163-170.
23. Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.

(Received August 31, 1993)