

Glucoamylase 및 α -Amylase 의 분쇄마찰매체 효소반응계에서의 생전분 효소분해 Mechanism

박동찬 · 이용현*

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Mechanism of Enzymatic Hydrolysis of Raw Corn Starch by Purified Glucoamylase or α -Amylase in an Agitated Bead Reaction System

Park, Dong-Chan and Yong-Hyun Lee*

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

The mechanism of enzymatic hydrolysis of raw corn starch by the purified glucoamylase and α -amylase in an agitated bead reaction system was studied by investigating the changes of sugar profiles produced by each enzyme, the granular structure of raw corn starch, the amount of enzyme adsorption on residual starch, and the amylose content in residual raw starch. The sugar profiles produced by the action of exo-type glucoamylase or endo-type α -amylase in an agitated bead system were not recognizably differed with those produced in reaction system without bead. Without enzyme the intergenic microcrystalline structure of starch granule was not changed by the simple mechanical impact of solid media, but it was cleaved. However, starch granule was fragment into large number of small particles by the synergistic action of enzyme and attrition-milling media, identified to be the major saccharification enhancing mechanism along with the increased amount of enzyme adsorption. The amylose content decreased more readily in an agitated bead reaction system, especially by α -amylase.

전분질 당화에 활용되고 있는 증자 효소당화법은 에너지 소모가 크고, 전분질의 팽윤 때문에 고농도 기질첨가가 어려워 생성당의 농도가 낮음으로 당화액을 고농도로 농축하는 과정이 필요하고, 고순도의 포도당을 얻기 위하여 장시간 당화하여야 하며, 또한 증자과정 중에 생성되는 불순물을 제거하기 위한 분리·정제과정이 요구되는 등 단점이 많아 이에 대한 개선이 필요하다(1-3).

본 연구실에서는 생전분 효소당화시 분쇄마찰매체를 첨가하여 분쇄마찰효과를 줌으로써 효소반응을 현저하게 촉진시키는 새로운 무증자 효소당화법을 발표한 바 있다(4). 새로운 무증자당화법은 기존의 증자당화법에 비하여 에너지소모가 매우 적은 에너지절약형 당화법으로

(5), 증자법과 유사한 수준의 당화율과 당화속도로 전분을 당화시킬 수 있었으며, 35~40%(w/v)와 같은 고농도에서도 생전분을 효율적으로 당화시킬 수 있었고, 24시간 당화 후 최고 400g/l의 높은 당농도를 얻을 수 있었다. 또한 당화액의 조성도 94%의 고순도 포도당을 함유하고 있어, high fructose corn syrup(HFCS) 생산 공정에 도입할 경우의 잠재적 가능성을 제시한 바 있다(6). 또한 분쇄마찰매체 효소반응계에서의 생전분의 효소당화 촉진 mechanism을 순수분리 되지 않은 산업용 복합 amylase로 단편적으로 연구한 바 있으며(7), 이를 주정생산 공정에 도입코자하는 각도에서 연구하여 왔다(8-10).

본 연구는 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분의 효소당화촉진 mechanism을 보다 명확히 규명코자 순수 분리된 exo형 glucoamylase와 endo형 α -amylase를 사용하여 옥수수 생전분(raw corn starch)를 당화시킬

Key words: Mechanism of enzymatic hydrolysis, raw corn starch, agitated bead reaction system, purified glucoamylase or α -amylase

*Corresponding author

때 일어나는 당화양상, 생성당의 조성, 전분의 입자구조 (granular structure), 효소의 흡착양상 그리고 amylose 함량의 변화 등을 관찰하였다. 이러한 연구는 불용성 기질인 생전분의 효소분해 mechanism 을 이해함으로써 보다 효율적인 분쇄마찰매체 효소반응계에 필요한 무증자 효소개발연구의 기초적인 자료가 된다.

재료 및 방법

사용효소

사용효소는 *Rhizopus* 속 곰팡이에서 분리·정제된 Sigma 사의 glucoamylase (Amyloglucosidase, exo-1,4- α -glucosidase ; EC 3.2.1.3)로서 specific activity 는 2,940 unit/mg 였다. 또한 *Bacillus licheniformis* 유래의 α -amylase (1,4- α -D-glucan-glucanohydrolase ; EC 3.2.1.1)도 병용하였으며, specific activity 는 680 unit/mg 였다(11).

사용전분

사용전분은 옥수수 생전분 (corn starch, Hayashi, 1급) 으로 수분함량은 12% 였다.

분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분의 효소당화

생전분의 효소당화는 전분기질 220g/l(w/v)와 유리구 (glass bead, 직경 3mm, 비중 2.54) 400g/l 를 50 mM sodium-citrate buffer 에 현탁하고 glucoamylase 10,500 unit/l 와 α -amylase 10,880 unit/l 를 각각 첨가하여 50°C에서 200 rpm 으로 교반하면서 진행하였다. 원심분리하여 잔류전분을 제거하고 얻은 당화액을 10 분간 열처리하여 효소를 실험시킨 후 원심분리한 상등액을 분석시료로 하였다. 미당화 잔류전분은 팽윤된 구조를 유지하기 위해서 methanol 과 acetone 으로 solvent drying 시켜 시료로 하였다(12).

분석방법

생성된 환원당은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 법 (13)으로, 환원당 중 glucose 의 양은 효소적 방법인 PGO (peroxidase glucose oxidase-o-parain isidine, Sigma Kit 510A) 법 (14)으로 정량하였다. 당조성은 high performance liquid chromatography (Waters Associates)로 분석하였으며, carbohydrate analysis column (3.9 mm×30 cm stainless steel column, P/N 84038)으로, acetonitril : water (65 : 35)를 용매로 2 ml/min 로 용출하면서 RI detector 를 이용하여 검출하

였다. Soluble protein 함량은 Bradford 법 (15)으로 측정하였다.

Scanning electron microscope (SEM) 관찰

미당화 잔류생전분을 백금으로 ion coating (Eiko IB-5 ion coater)한 후 scanning electron microscope (ISI-SS 130 SEM, Akashi, Japan)로 그 형태변화를 관찰하였다.

흡착된 glucoamylase 와 α -amylase 의 양 측정

생전분에 흡착된 효소의 양은 효소반응액을 원심분리시킨 상등액 중의 미흡착효소의 양과 활성을 측정하여 간접적으로 결정하였다.

Amylose 의 함량분석

Amylose 의 함량은 McCready 의 요오드 비색법 (16)에 따라, 분말전분 100 mg 에 ethanol 1 ml, 증류수 10 ml, 10% NaOH 용액 2 ml 을 가하고 가열하여 완전 호화시킨 후, 전분용액의 농도를 5 mg/500 ml 로 조절하고 요오드 용액 (0.2% I₂/2% KI) 5 ml 를 가하여 20 분간 발색시킨 후 620 nm 에 흡광도를 측정하여, 일정비율의 amylose 와 amylopectin 의 혼합전분을 기준물질로 작성한 표준곡선과 비교하여 구하였다.

결과 및 고찰

Glucoamylase 에 의한 분쇄마찰매체 효소반응계에서의 생전분 효소당화

분쇄마찰매체 효소반응계에서 옥수수 생전분을 분리 정제된 exo 형 glucoamylase 로 효소당화시킬 경우의 생성당의 농도 변화를 분쇄마찰매체를 첨가하지 않고 무증자당화시킨 비교군과 경시적으로 비교한 결과는 Fig. 1 과 같다. 분쇄마찰매체 효소반응계에서 exo 형 전분분해 효소인 glucoamylase 단독으로 생전분을 당화시켰을 경우 환원당 농도는 8 시간 후 135g/l 로 비교군인 무첨가군의 100g/l 에 비하여 증가하였으며 이 때 환원당수율은 51% 였다. 또한 24 시간 경과 후에는 194g/l 로서 비교군의 125g/l 에 비하여 크게 증가하였으며 환원당수율은 78% 였다.

또한 Fig. 2 는 생성당 조성의 변화를 HPLC 로 분석하여 비교군의 당조성과 경시적으로 비교한 결과이다. 양군 공히 glucose 가 반응초기부터 주로 생성되었으며 생성당 조성은 큰 차이가 없었고, 단지 분쇄마찰매체 효소반응계에서는 당농도만이 비교군에 비하여 높았다. 이는 분쇄마찰매체 효소반응계는 exo 형 전분당화효소인

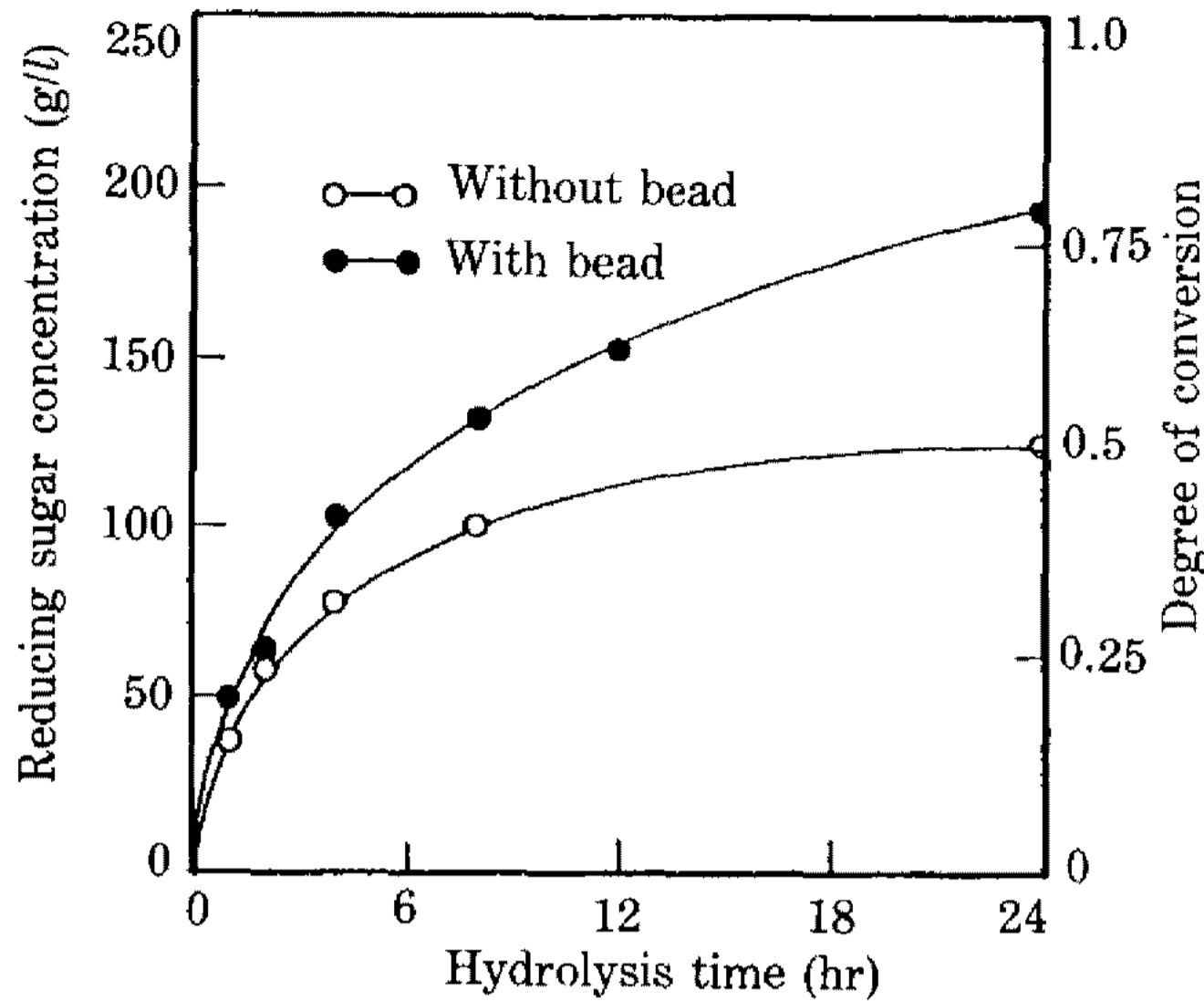


Fig. 1. The progress of hydrolysis of raw corn starch by purified glucoamylase in reaction system without bead and in an agitated bead reaction system.
 220 g/l (w/v) corn starch, 400 g/l glass bead, 10,500 unit/l glucoamylase, pH 4.4, 50°C, and 200 rpm.

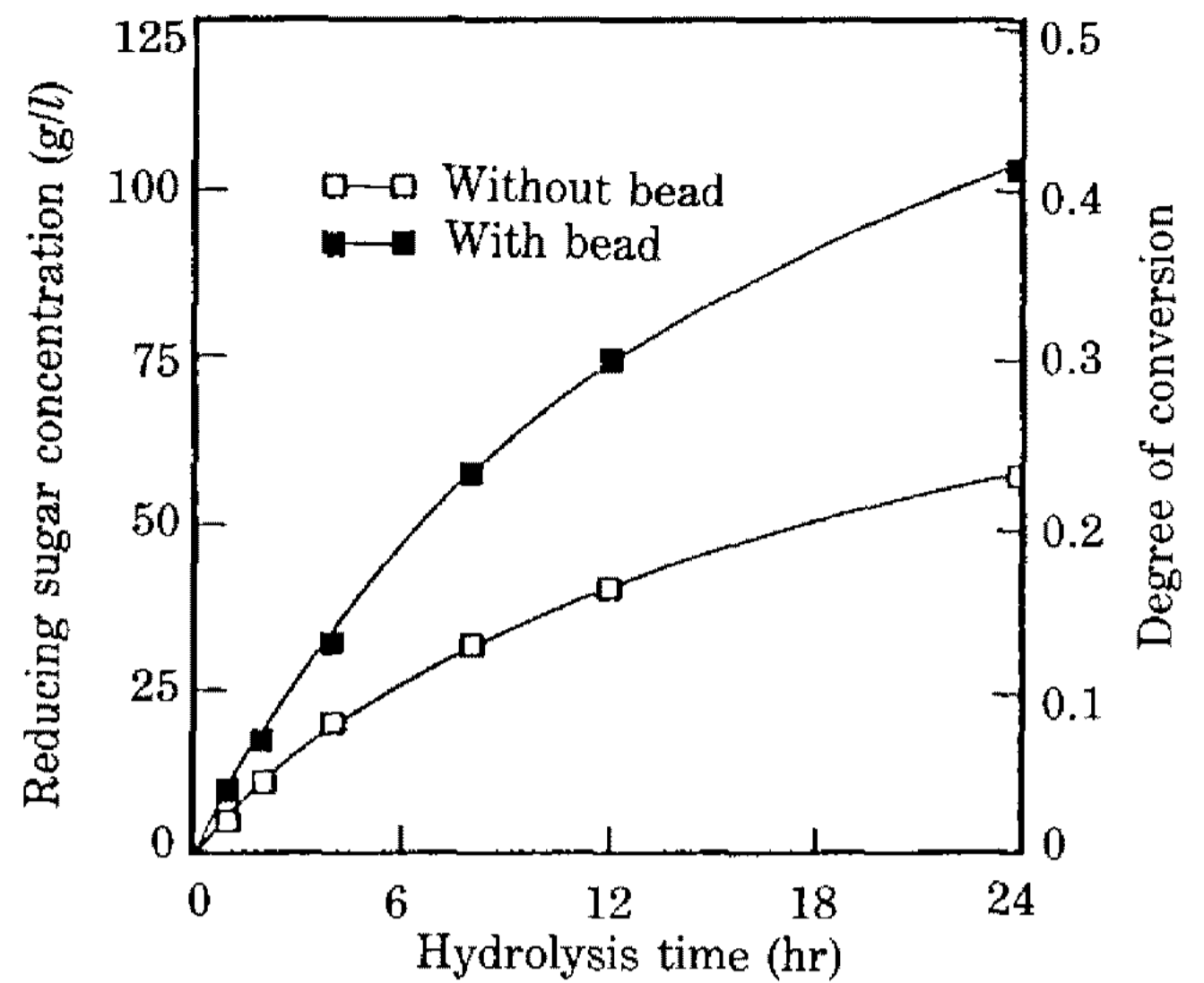


Fig. 3. The progress of hydrolysis of raw corn starch by purified α -amylase in reaction system without bead and in an agitated bead reaction system.
 220 g/l (w/v) corn starch, 400 g/l glass bead, 10,880 unit/l α -amylase, pH 6.9, 50°C, and 200 rpm.

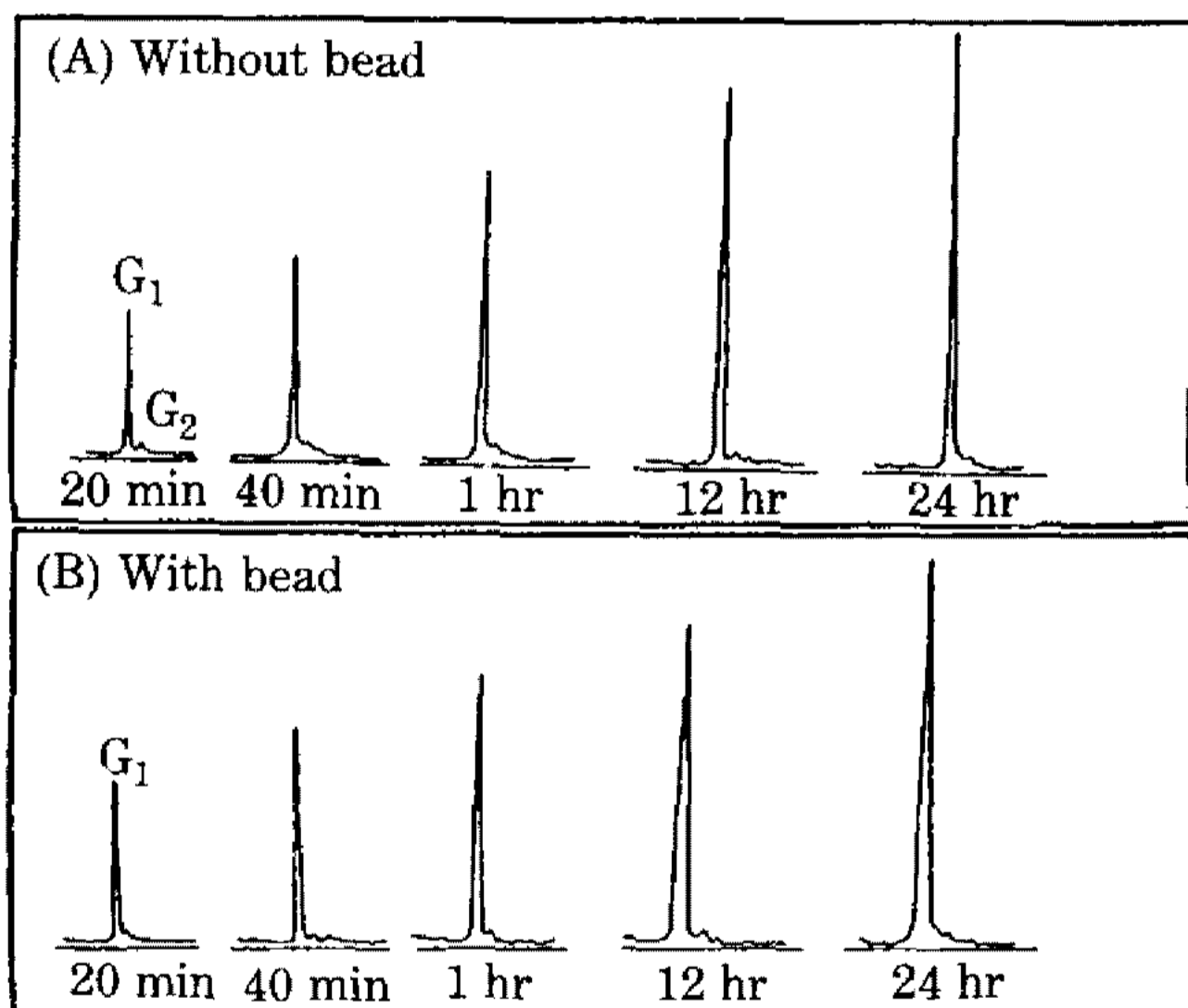


Fig. 2. HPLC chromatogram of hydrolyzate saccharified by glucoamylase from raw corn starch in reaction system without bead (A) and in an agitated bead reaction system (B).

220 g/l (w/v) corn starch, 400 g/l glass bead, 10,500 unit/l glucoamylase, pH 4.4, 50°C, and 200 rpm.

glucoamylase의 작용 특성인 전분분자의 비환원성 말단으로부터 glucose 단위를 유리하는 효소작용 mechanism에는 전혀 영향을 주지 않고 다만 생전분 당화속도 및 당화율을 향상시키는 역할을 함을 의미한다.

α -amylase에 의한 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분의 효소당화

분쇄마찰매체 효소반응계에서 정제된 endo형인 α -amylase만으로 옥수수 생전분을 당화시켰을 경우, Fig. 3에서와 같이, 당농도 및 당수율은 24시간 당화 후 각각 112g/l와 45%로서, 비교군의 57g/l와 23%에 비하여 현저히 증가하였다. 그러나 exo형 glucoamylase로 당화시킨 194g/l와 78%에 비하여 매우 낮아 대조적이었으며 전분분자에 random으로 작용하는 α -amylase 단독작용의 한계성을 예시하고 있다.

또한 Fig. 4는 α -amylase 작용시 생성되는 당조성을 분석하여 경시적으로 비교한 결과이다. Exo형 효소인 glucoamylase로 분해시켰을 때와는 대조적으로 소량의 glucose만이 생성되었고 대신 각종 oligosaccharides($G_2 \sim G_8$)가 주로 생성되었으며, 분쇄마찰매체 함유군과 비교군 사이의 경시적인 당조성의 변화 역시 관찰되지 않았다.

위의 결과로 볼 때 분쇄마찰매체 효소반응계에서도 생전분의 효소당화시 생성되는 당조성은 주로 사용 amylase의 특성에 의해서만 결정되며, 분쇄마찰매체의 기계적 충격은 단지 전분입자의 구조변화를 유발시켜 당화를 촉진시키는 역할을 함을 알 수 있었다. HFCs의 생산을 위한 고순도의 glucose 용액을 얻기 위해서는 현재 증자공정에서와 같이 작용 mechanism이 다른 여러 종류의 amylase를 혼합사용하는 것이 바람직할 것으로 예상된다. 위에서는 효소당화시 생성되는 당의 조성을 분석함으로써 효소의 작용특성을 규명코자 하였으나, 전분입자의 구조적 변화를 관찰함으로써 보다 명확한 분쇄

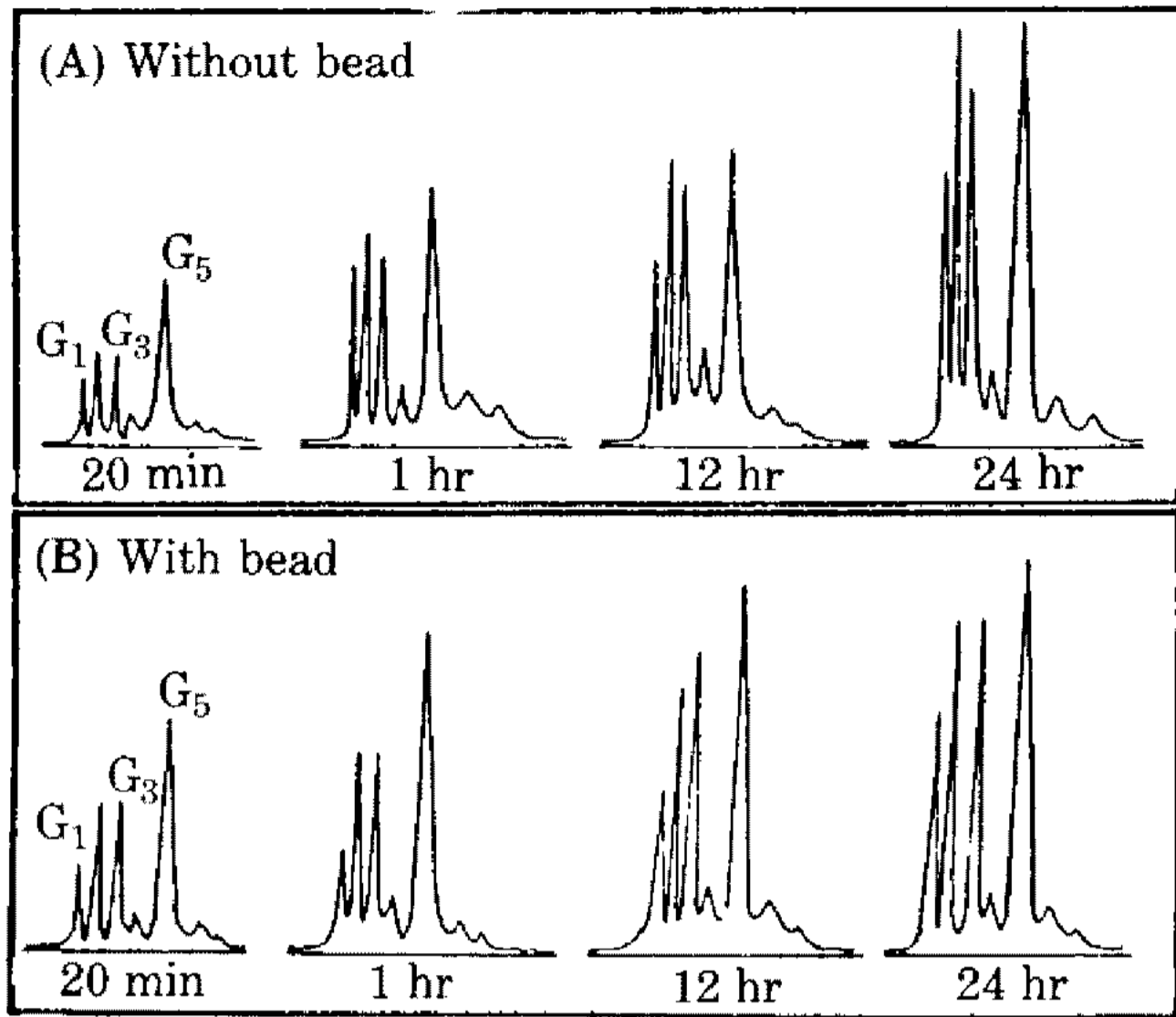


Fig. 4. HPLC chromatogram of hydrolyzate saccharified by α -amylase from raw corn starch in reaction system without bead (A) and in an agitated bead reaction system (B).

220 g/l (w/v) corn starch, 400 g/l glass bead, 10,880 unit/l α -amylase, pH 6.9, 50°C, and 200 rpm.

마찰매체 효소반응계에서 생전분 효소당화 mechanism 을 규명할 수 있을 것이다.

Scanning electron microscope 에 의한 전분입자 구조의 변화 관찰

효소 무처리군 : 사용기질인 옥수수 생전분은 Fig.5 (A)와 같이 둥근 형태와 모난형태가 혼합된 그리고 표면에 굴곡과 홈이 있는 부정형입자 구조를 갖고 있었다. 옥수수 생전분을 효소첨가없이 젖은 상태에서 고풍매체로 8시간, 24시간 동안 분쇄마찰 처리한 전분입자의 형태는 Fig.5(B, C)에서 보는 바와 같이 시간이 경과함에 따라 균열이 생기고 또한 점차 확대되는 현상이 관찰되

었을 뿐 작은 입자로의 단편화(fragmentation)와 같은 급속한 입자구조의 변화는 관찰되지 않았다. 위의 결과는 전보(7)에서 기술한 바 있는 분쇄마찰매체의 기계적 충격은 전분입자의 미세결정구조(microcrystalline structure)의 파괴효과는 없고 단지 입자의 표면에 균열을 일으키는 정도의 구조적 변화를 유발시킬 것이라는 결론을 뒷받침하고 있다.

Glucosylase 처리군 : Raw corn starch를 glucoamylase로 당화시키면서 분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 비교군과 첨가한 군에서의 전분입자의 구조변화를 scanning electron microscope로 관찰·비교한 결과는 Fig. 6과 같다. 분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 군은 반응초기인 4시간(Fig.6(A)) 전후에 이르러 입자표면에 작은 cavity가 형성되었고, 시간이 경과함에 따라(Fig.6(B, C)) cavity가 점차 커지면서 입자의 중심을 향해 내부로 침식하면서 당화가 진행되었다. 이 때 Fuwa(17)가 보고한 바 있는 입자내부의 terraced 또는 step-shaped 한 layered internal structure도 관찰되었다.

한편 분쇄마찰매체 효소반응계에서는 반응초기인 4시간(Fig.6(D))까지는 효소의 침식작용으로 입자에 cavity가 형성됨이 관찰되었고 단편화 현상은 별로 일어나지 않았다. 그 이후부터 생전분입자는 점차적으로 단편화되기 시작하였고 12시간 및 24시간 당화 후에(Fig. 6(E, F))많은 작은 전분입자로 붕괴되었다. 이는 단편화되지 않고 입자크기가 그대로 유지되면서 계속적으로 효소의 작용을 받은 무첨가군과 대조적인 현상이었다. 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분은 glucoamylase에 의하여 반응초기에 일차적으로 침식작용을 받아 입자에 cavity가 생기고, 일정시간 동안 효소의 작용을 받아 cavity가 커진 전분입자는 고풍분쇄마찰매체의 기계적 충격으로 급속히 작은 입자로 단편화됨을 알 수 있었다.

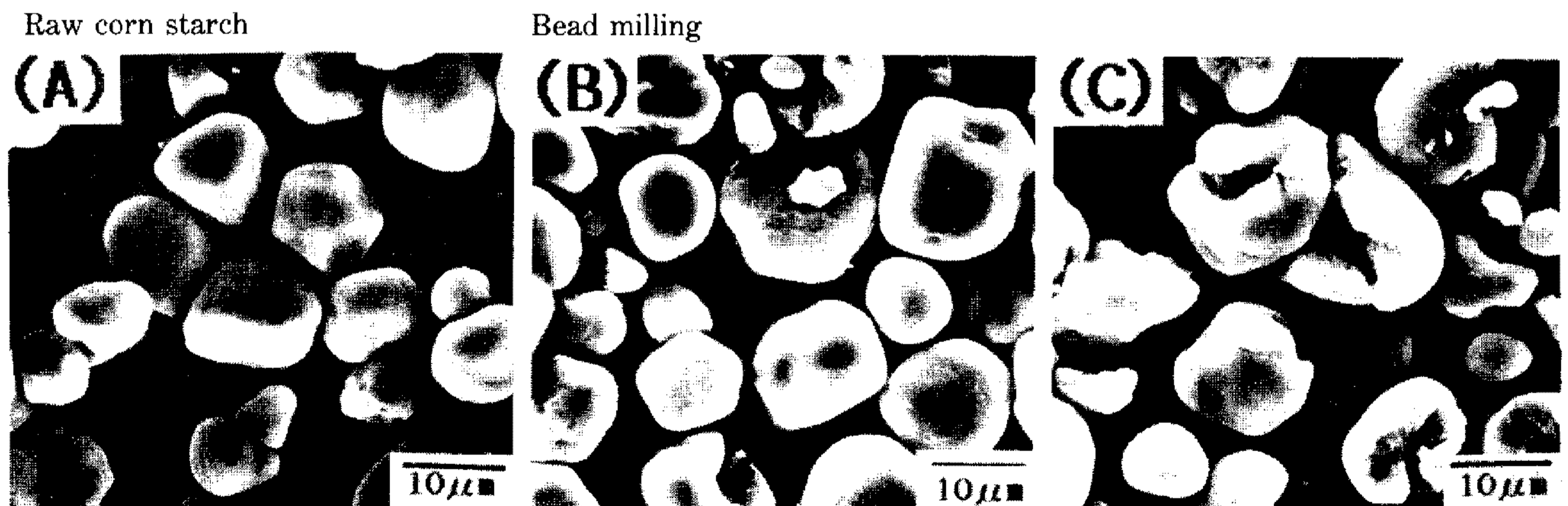
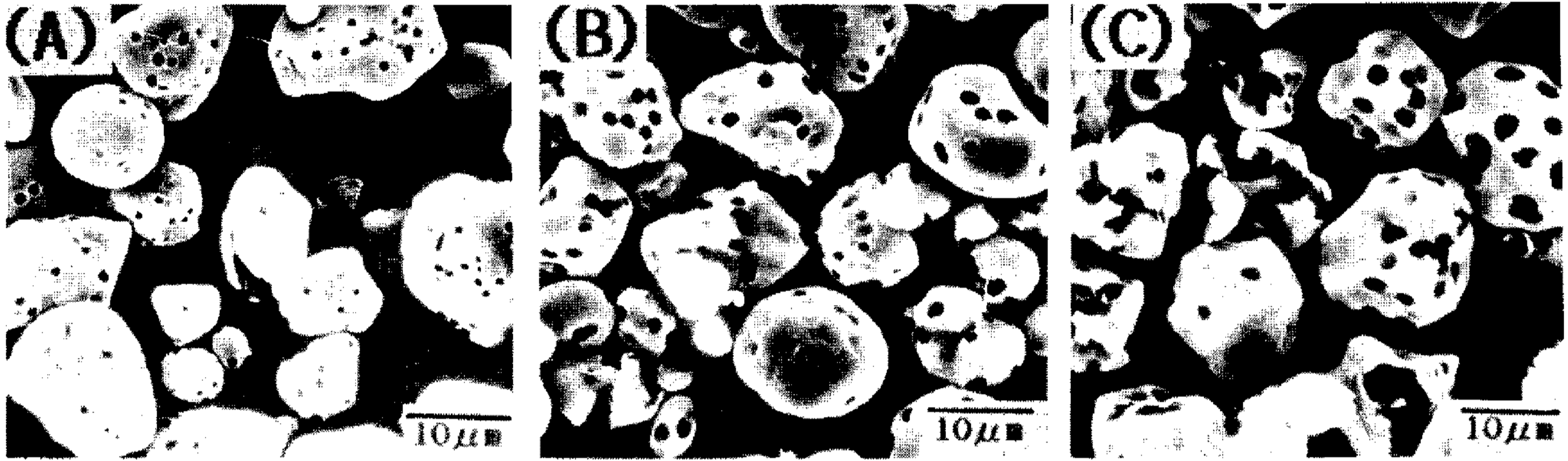


Fig. 5. Scanning electron microscopic photograph of granular structure of raw corn starch. (A) raw corn starch, (B) (C) bead milling without enzyme for 8 hr and 24 hr, respectively.

Without bead



With bead

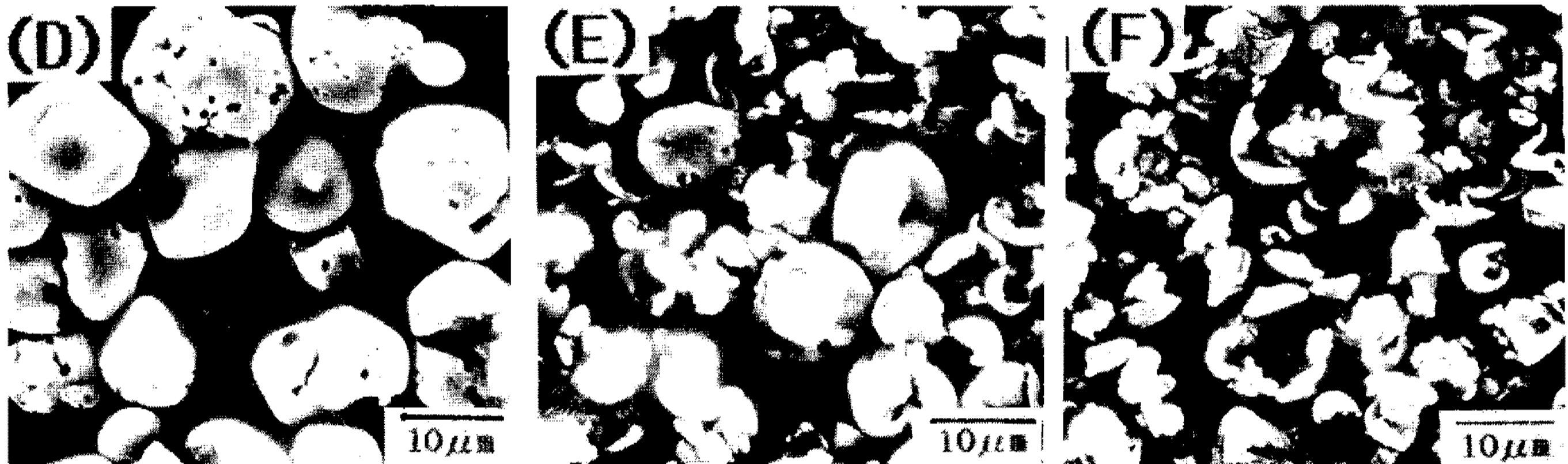


Fig. 6. Scanning electron microscopic photograph of granular structure of raw corn starch saccharified by glucoamylase. (A) (B) (C) in reaction system without bead for 4 hr, 12 hr and 24 hr, (D) (E) (F) in an agitated bead reaction system for 4 hr, 12 hr, and 24 hr, respectively.

α-Amylase 처리군 : 분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 비교군의 경우 Fig. 7(A-C)와 같이 전분입자에 cavity가 형성되는 현상을 관찰할 수 있었으나, glucoamylase 경우보다는 cavity의 크기는 작은 반면 숫적으로 많았으며 전체적인 침식 정도는 낮았다.

분쇄마찰매체 함유반응계에서는 glucoamylase 처리군과 유사하게 단편화된 입자형태는 반응초기에는 관찰되지 않았으며 (Fig. 7(D)), 12시간 이후 (Fig. 7(E))부터 서서히 단편화되는 현상을 나타내었으며, 24시간 당화 후 (Fig. 7(F)) 비로소 glucoamylase에서와 같이 많은 작은 입자로 단편화되는 현상을 관찰할 수 있었다. 즉 endo형 α-amylase의 경우는 exo형 glucoamylase와는 달리 단편화 현상이 반응초기부터 진행되지 않고 일정시간이 경과하여 효소의 침식작용이 상당히 진행된 후에 비로소 분쇄마찰매체의 기계적 충격이 동시에 작용하여 급속히 작은 입자로 단편화되는 양상을 나타내어 대조적이었다.

위의 결과를 종합해 보면, 분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 일상적인 무증자당화의 경우에는 glucoamylase나

α-amylase와 같은 전분분해 효소는, Fuwa(17)와 Sugimoto(18) 등이 관찰한 바와 같이, 생전분입자의 표면에 cavity를 형성하면서 입자구조는 단편화되지 않은 채 점차적으로 입자의 중심부로 침식되어가는 작용 양상을 나타내고 있었다. 반면 분쇄마찰매체 효소반응계에서는 생전분입자는 효소의 침식작용과 분쇄마찰매체의 기계적 충격작용이 상호보완적으로 작용하여 많은 작은 입자로 단편화됨으로써 효소가 접근할 수 있는 가용표면적 (accessible surface area)이 급속히 증가되므로 효소 당화가 현저히 촉진됨을 알 수 있었다.

효소 흡착량의 변화와 생전분의 당화

생전분의 효소당화가 진행되기 위해서는 일차적으로 효소가 생전분의 표면에 직접 흡착되어야 하므로 효소당화작용은 효소의 흡착능과 밀접한 관계가 있다(19, 20). 분쇄마찰매체 효소반응계와 무첨가 비교군에서 잔류생전분에 흡착된 glucoamylase와 α-amylase의 양을 비교하여 Fig. 8에 나타내었다.

분쇄마찰매체 효소반응계에서 glucoamylase의 흡착

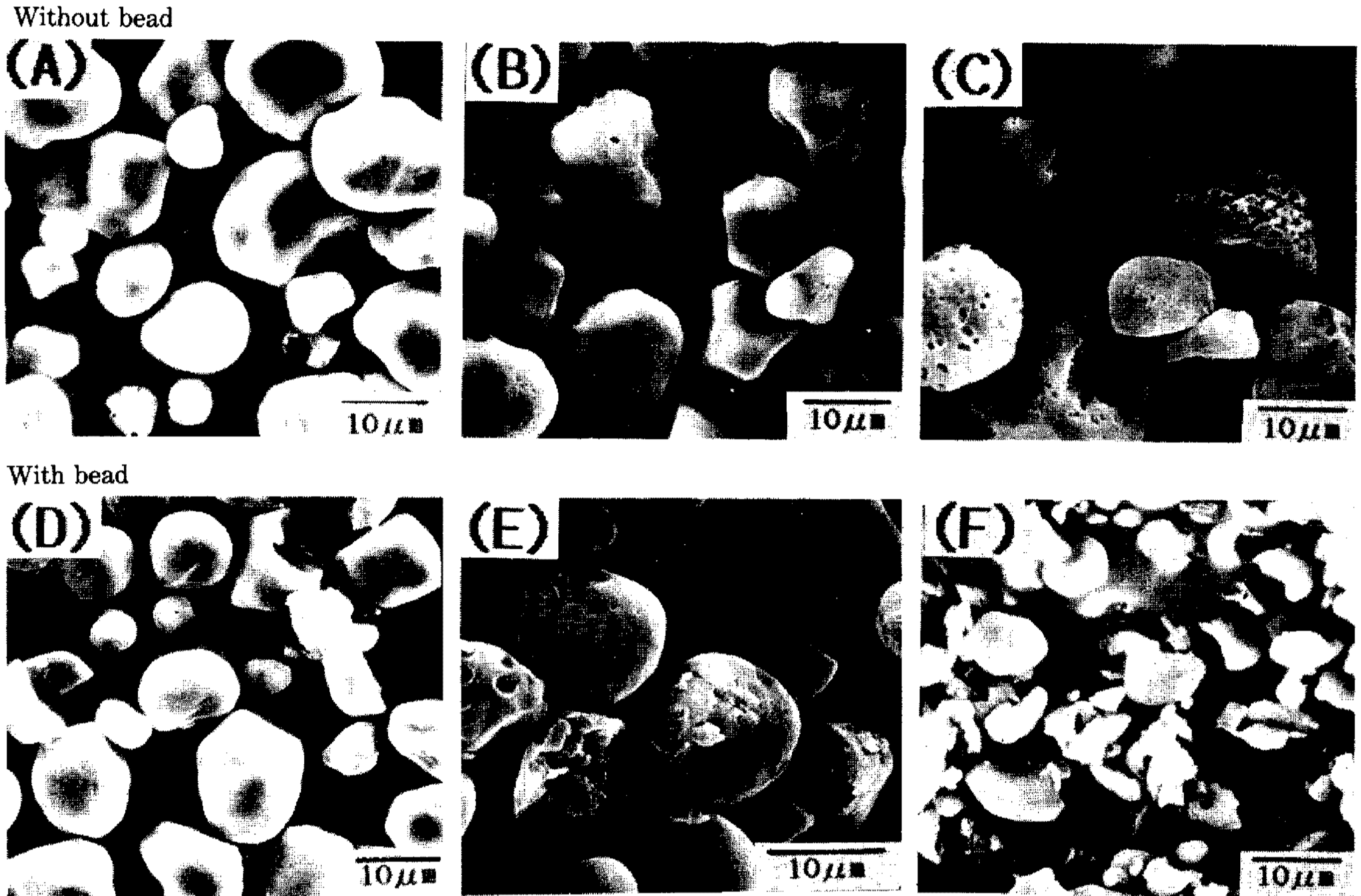


Fig. 7. Scanning electron microscopic photograph of granular structure of raw corn starch saccharified by α -amylase. (A) (B) (C) in reaction system without bead for 4 hr, 12 hr and 24 hr, (D) (E) (F) in an agitated bead reaction system for 4 hr, 12 hr and 24 hr, respectively.

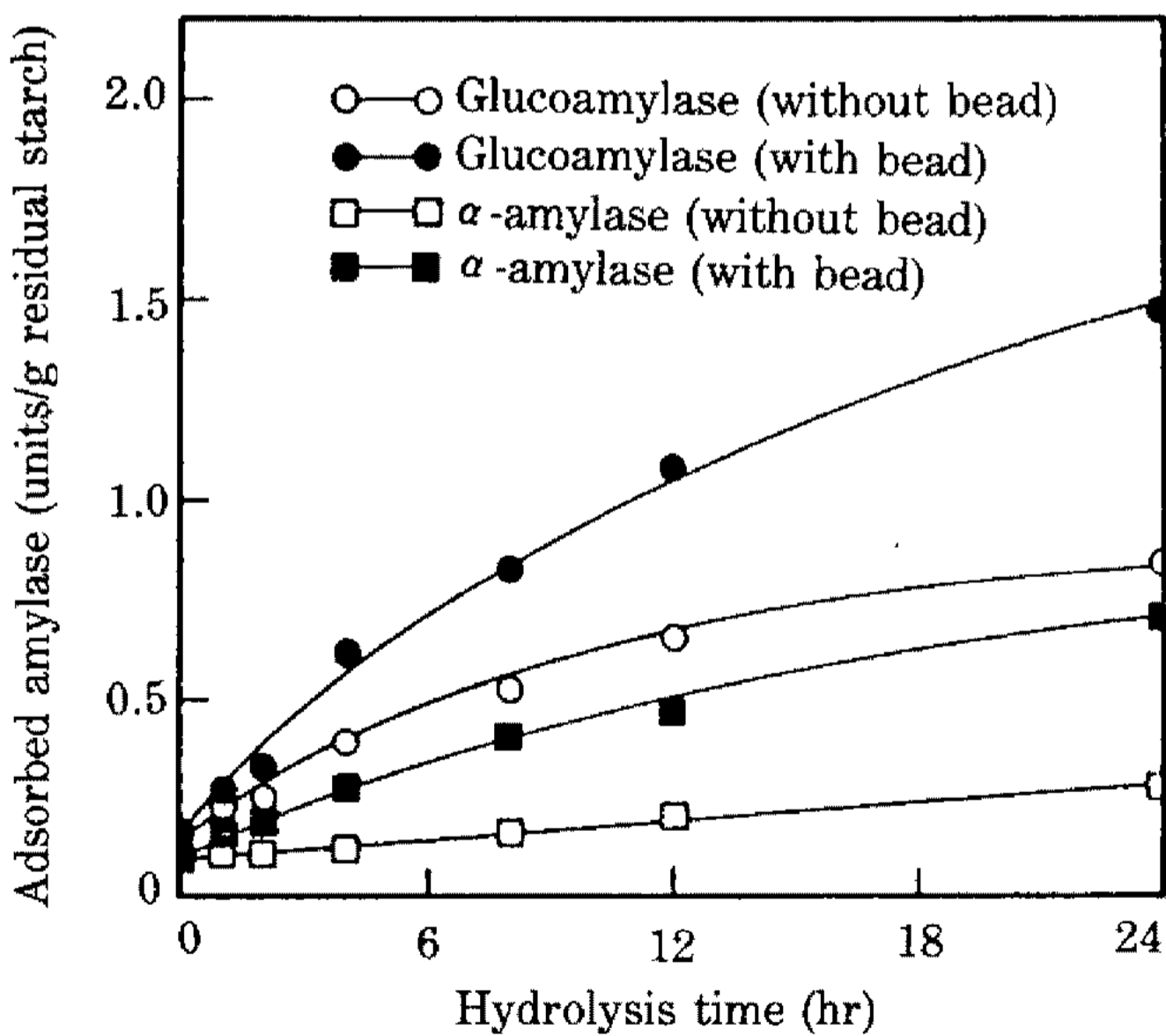


Fig. 8. The amount of glucoamylase and α -amylase adsorbed on residual raw corn starch in reaction system without bead and in an agitated bead reaction system. 220 g/l (w/v) corn starch, 400 g/l glass bead, 10,500 unit/l glucoamylase (pH 4.4), 10,880 unit/l α -amylase (pH 6.9), 50°C, and 200 rpm.

량은 4 시간 경과 후부터 분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 비교군보다 현저하게 증가되고 있는데 이는 위의 SEM 관찰 결과인 4 시간을 전후하여 단편화가 진행되는 것과 관련시킬 수 있다. 즉 효소흡착량의 증가는 전분입자의 균열 또는 단편화가 진행됨으로 효소의 흡착이 가능한 가용표면적이 증가되기 때문이다. 분쇄마찰매체 효소반응계에서 8 시간 경과 후 효소의 흡착량은 0.81 unit/g residual starch로서 무첨가군의 0.51 unit/g residual starch 보다 약 60% 증가되었다.

반면 α -amylase의 경우는 효소의 흡착량이 24 시간까지도 무첨가군보다 크게 증가되지는 않았다. 이는 SEM 관찰에서 알 수 있었듯이 전분입자의 단편화가 24 시간 후에야 비로소 본격적으로 진행되므로 가용표면적이 크게 증가하지 않기 때문인 것으로 판단된다. 또한 exo형인 glucoamylase가 endo형인 α -amylase보다 많이 흡착되었고, 생전분분해능도 우수하였다. 이는 Ueda (19) 등이 관찰한 바와 유사한 결과이다. 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분의 효소당화촉진 현상은 효소의 흡착량과 밀접한 관계를 가지고 있음을 알 수 있으며

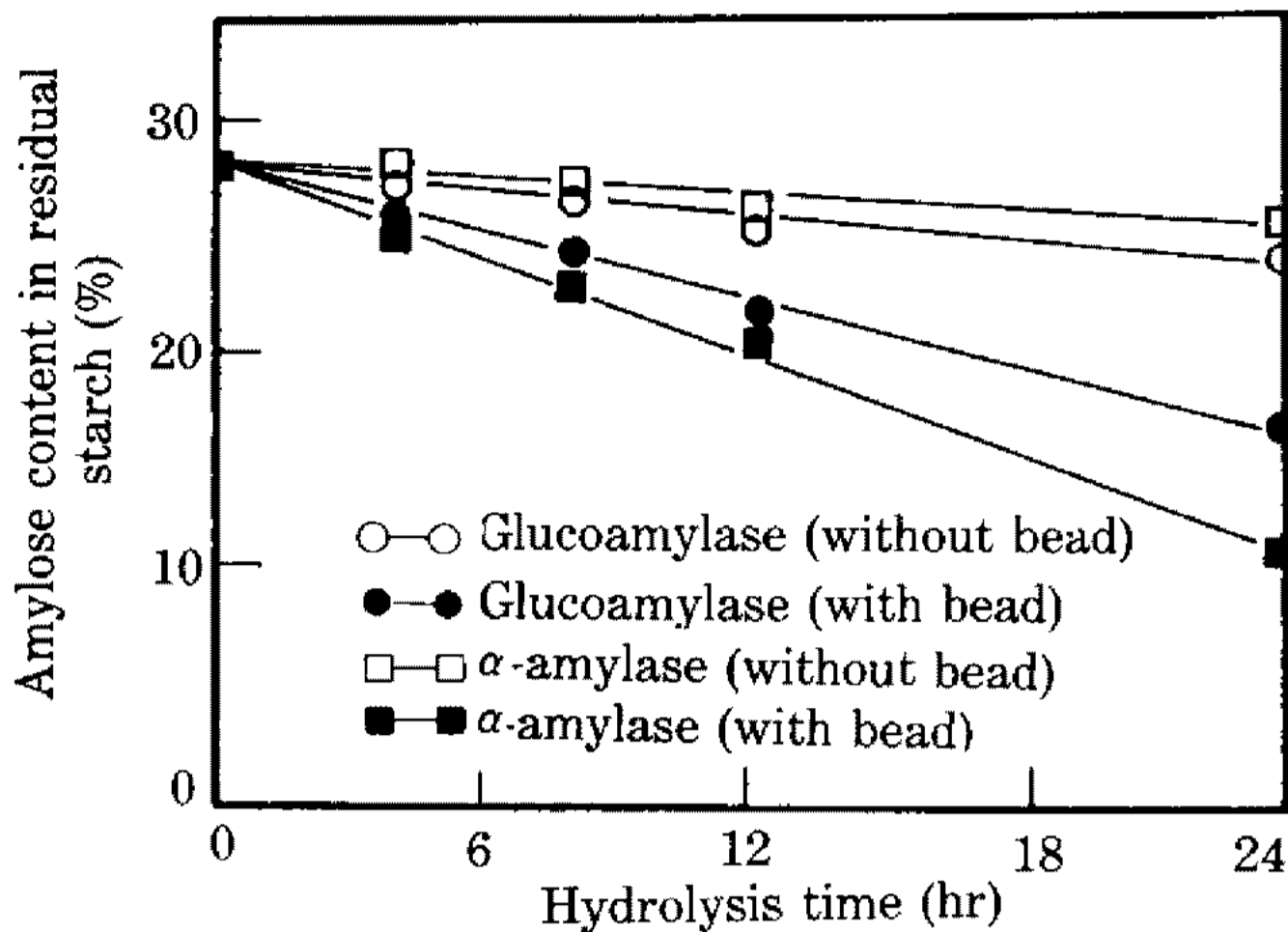


Fig. 9. Amylose content in residual raw corn starch hydrolyzed by glucoamylase and α -amylase in reaction system without bead and in an agitated bead reaction system.

220 g/l (w/v) corn starch, 400 g/l glass bead, 10,500 unit/l glucoamylase (pH 4.4), 10,880 unit/l α -amylase (pH 6.9), 50°C, and 200 rpm.

kinetic 한 각도에서의 정량적인 규명이 필요하다.

Amylose 함량의 변화

전분의 amylose와 amylopectin 두 성분으로 이루어지며, amylose의 함량은 전분의 종류에 따라 다양하고 전분입자의 물리적 특성은 이에 따라 결정된다(21). 옥수수 생전분을 glucoamylase와 α -amylase로 당화시키면서 잔류전분내의 amylose 함량의 변화를 측정하여 비교한 결과는 Fig. 9와 같다. Glucoamylase와 α -amylase 모두 분쇄마찰매체 함유 반응계에서 분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 군에 비하여 amylose가 용이하게 분해되었으며, 또한 glucoamylase보다는 α -amylase가 amylose를 더 용이하게 분해하였다.

전분입자에는 amylopectin과 amylose가 조밀하게 배열된 결정형 부분(crystalline region)과 주로 amylose로 이루어진 비결정형 부분(amorphous region)이 존재하며(21, 22), Colonna 등(22)은 효소분해가 입자의 결정형 부분보다는 비결정형 부분에서부터 진행된다고 하였다. 분쇄마찰매체 효소반응계에서 전분입자는 매우 작은 입자로 단편화되므로 비결정형 부분에 존재하는 amylose 성분이 마찰매체 무첨가군보다 쉽게 효소에 의해 분해된다고 생각된다. 그리고 단편화된 입자의 amylose 성분은 exo형 효소인 glucoamylase보다 endo형 효소인 α -amylase에 의해 보다 빨리 분해가 됨을 알 수 있었다. 그러나 보다 명확한 효소의 작용양상을 규명하기 위해서는 amylose-amylopectin의 분획

및 분석, X-ray 회절양상, particle size 분포 등 전분입자의 구조변화에 관한 후속 연구가 필요하다.

요 약

분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서 순수분리된 glucoamylase 또는 α -amylase에 의한 옥수수 생전분의 효소당화 mechanism을 규명코자, 생성된 당조성, SEM을 이용한 전분입자의 구조, 효소흡착량 그리고 amylose 함량 등의 변화를 관찰하였다. 생성당 조성은 분쇄마찰매체 효소반응계에서도 큰 변화없이 glucoamylase의 경우 반응초기부터 glucose가 주로 생성되었고, α -amylase의 경우에는 maltopentaose(G_5)를 포함한 oligosaccharide(G_2 - G_8)가 주로 생성되었고 약간의 glucose가 포함되었으며, 당조성은 경시적으로 크게 변하지 않았다. SEM으로 전분입자의 구조를 관찰한 결과, 효소를 첨가하지 않을 경우 분쇄마찰매체의 기계적 충격은 전분입자의 구조변화에 큰 영향을 미치지 못하였고 다만 전분입자를 균열시켰다. 효소를 첨가하였을 때에는 효소의 침식작용에 의하여 생전분입자에는 많은 구멍들이 형성되었으며, 분쇄마찰매체와 효소를 동시에 작용시킬 때에는 효소의 침식작용과 분쇄마찰매체의 기계적 충격이 상호보완적으로 작용하여 전분입자가 다수의 작은 입자로 단편화되었다. 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분의 효소당화촉진 mechanism은 전분입자가 단편화됨에 따라 효소가 접근할 수 있는 가용표면적이 증가되기 때문인 것으로 판단되며, 이에 따른 전분에 흡착된 효소의 양도 증가하였다. 한편 분쇄마찰매체 효소반응계에서 α -amylase를 처리했을 때 미분해전분의 amylose 함량이 가장 적었다.

감사의 말

본 연구는 1989년도 한국과학재단의 목적기초연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Maiorella, B., C.R. Wilke and H.W. Blanch: *Adv. in Biochem. Eng.*, Fiechter A. (ed), Springer-Verlag, Berlin, 20, 43 1981.
2. Cheremisinoff, P.N. and R.P. Oullette: *Biotechnology-Applications and Research*, Technomic Pub. Co., Lancaster, 165 1985.
3. Van Beynum G.M.A. and J.A. Roels: *Starch Conver-*

- sion Technology, Marcel Dekker Inc., New York, 1985.
4. 이용현, 조구형 : 산업미생물학회지, **14**, 29(1986).
 5. 이용현, 박진서 : 산업미생물학회지, **17**, 349(1989).
 6. 이용현, 조구형 : 산업미생물학회지, **14**, 399(1986).
 7. 조구형, 이용현 : 산업미생물학회지, **14**, 407(1986).
 8. 조구형, 이상호, 이용현 : 산업미생물학회지, **15**, 196 (1987).
 9. 이용현 : 주류공업, **8**, 57(1988).
 10. 이용현 : 주류공업, **9**, 47(1989).
 11. Sigma Co.: Sigma Catalog, 176 (1990).
 12. Merchant, M.V.: *TAPPI*, **40**, 771 (1957).
 13. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
 14. Sigma Co.: Sigma Diagnostics Glucose Procedure, No.510, Sigma (1990).
 15. Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
 16. McCready, R.M. and W.Z. Hassid: *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1154 (1943).
 17. Fuwa, H.: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **24**, 128 (1977).
 18. Sugimoto, Y.: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **27**, 28 (1980).
 19. Ueda, S.: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **25**, 124 (1978).
 20. Saha, B.C. and S. Ueda: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 67 (1983).
 21. Whistler, R.L., J.N. Bemiller and E.F. Paschall: *Starch-Chemistry and Technology*, Academic Press, New York, 183 (1984).
 22. Colonna, P., A. Buleon and F. Lemarie: *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 895 (1988).

(Received April 26, 1990)